

Aus dem  
Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie  
des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie in Dummerstorf  
und der  
Tierklinik für Fortpflanzung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# **Untersuchungen zur Eizellqualität in unterschiedlichen Follikelpopulationen bei Stuten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Andreas Vernunft**  
Tierarzt  
aus Rotenburg (Wümme)

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3458



Aus dem  
Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie  
des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie in Dummerstorf  
und der  
Tierklinik für Fortpflanzung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

## **Untersuchungen zur Eizellqualität in unterschiedlichen Follikelpopulationen bei Stuten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Andreas Vernunft**  
Tierarzt  
aus Rotenburg (Wümme)

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3458

## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2011

© 2011 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-028-1

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: VR Prof. Dr. W. Kanitz  
Zweiter Gutachter: PD Dr. H. Torner  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Handler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horse, mares, oocytes, ovarian follicles, chromatin, glucose 6 phosphate dehydrogenase,  
enzyme activity, mitochondria

Tag der Promotion: 03.05.2011



Für meine Familie





# Inhalt

<b>Verwendete Abkürzungen .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Physiologie der Fortpflanzung bei Stuten .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Grundlagen.....	3
2.1.2 Der ovarielle Zyklus und seine endokrine Regulation .....	3
2.1.3 Follikeldynamik bei Stuten.....	4
<b>2.2 Follikulogenese .....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Primordialfollikel .....	6
2.2.2 Primärfollikel.....	7
2.2.3 Sekundärfollikel .....	7
2.2.4 Tertiärfollikel .....	8
2.2.5 Quartärer Follikel.....	8
<b>2.3 Funktionelle Follikelentwicklung .....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Wachsende, vitale Follikel .....	9
2.3.2 Dominanter Follikel.....	10
2.3.3 Präovulatorischer Follikel .....	11
2.3.4 Atretische Follikel .....	12
<b>2.4 Eizellreifung .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Oogenese.....	14
2.4.2 Grundbegriffe der Oozytenmaturation .....	14
2.4.3 Chromosomale Maturation und ihre Regulation .....	15
2.4.3.1 Strukturelle Veränderungen und Vorkommen vom Chromatin in der Prophase I und während Wiederaufnahme der Meiose.....	16
2.4.3.2 Regulation der Wiederaufnahme der Meiose in Oozyten .....	16
2.4.3.3 Strukturelle Veränderungen des Chromatins nach der Wiederaufnahme der Meiose bis zur Metaphase II .....	17
2.4.3.4 Regulation der Meiose in Oozyten bis zur Metaphase II .....	18
2.4.3.5 Dauer und Vorkommen von Meiosestadien nach erfolgter Wiederaufnahme in Oozyten .....	18
2.4.3.6 Postovulatorische Vollendung der Meiose .....	19
2.4.4 Zytoplasmatische Reifung der Oozyte.....	20
2.4.4.1 Umverteilung von zytoplasmatischen Organellen während der Maturation....	20
2.4.4.2 Dynamik der Zellskelettfilamente während der Maturation.....	21
2.4.4.3 Molekulare Reifung.....	22
<b>2.5 Bedeutung der Mitochondrien in Oozyten während der Maturation .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Bedeutung der Kumuluszellen für die Prozesse der Eizellreifung .....</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Parameter zur Bestimmung der Eizellqualität .....</b>	<b>26</b>
2.7.1 Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Oozyten .....	26
2.7.2 Verteilungsmuster von Mitochondrien in Oozyten .....	28
2.7.3 Aktivität von Mitochondrien in Oozyten .....	30
2.7.4 Morphologie des Kumulus oophorus .....	32

<b>2.8 In-vivo-Oozytengewinnung bei Stuten .....</b>	<b>33</b>
2.8.1 Ultraschallgeleitete transvaginale Follikelaspiration.....	34
2.8.2 Differenzierung von Follikeln während der ultraschallgeleiteten Follikelaspiration..	36
<b>3 Material und Methode .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Versuchstiere und Versuchszeitraum .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Versuchsaufbau zur Oozytengewinnung und Follikelgruppeneinteilung .....	37
3.2.1.1 Versuchsablauf des ersten Aspirationstyps (in der Rosse), zur Gewinnung von KOK aus den präovulatorischen und subordinanten Follikelgruppen .....	38
3.2.1.2 Versuchsablauf des zweiten Aspirationstyps (nach vorangegangener Follikel- ablation), zur Gewinnung von KOK aus wachsenden Follikelgruppen .....	38
3.2.2 Durchführung der transvaginalen ultraschallgeleiteten Follikelaspiration.....	39
3.2.2.1 Technische Ausrüstung .....	39
3.2.2.2 Vorbereitung der Stuten für die Follikelaspiration.....	40
3.2.2.3 Durchführung der Follikelaspiration .....	40
3.2.3 Auffinden und Klassifizieren der Kumulus-Oozyten-Komplexe .....	42
3.2.3.1 Auffinden der Kumulus-Oozyten-Komplexe in den Aspiraten .....	42
3.2.3.2 Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplex-Morphologie.....	43
<b>3.3 Steroidanalysen der Follikelflüssigkeiten.....</b>	<b>44</b>
3.3.1 Probennahme .....	44
3.3.2 Methoden zur quantitativen Steroidkonzentrationsbestimmung in den Follikelflüssigkeiten.....	44
3.3.2.1 Östradiol-17- $\beta$ ( $E_2$ ).....	44
3.3.2.2 Progesteron ( $P_4$ ).....	45
<b>3.4 Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität.....</b>	<b>45</b>
3.4.1 Methode zur Bestimmung der G-6-PDH-Aktivität .....	45
3.4.2 Durchführung der Brillant-Cresyl-Blau-Färbung .....	45
3.4.3 Einteilung der Oozyten nach ihrem G-6-PDH Status aufgrund der BCB-Färbung	46
<b>3.5 Färbetechniken zur Bestimmung der Chromatinkonfiguration, sowie der         Aktivität und Aggregation der Mitochondrien .....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Entfernung des Kumulus oophorus vor dem Färbeprozess .....	46
3.5.2 Bestimmung der Aktivität und Verteilung der Mitochondrien.....	46
3.5.2.1 Methode der Mitochondrienfärbung.....	46
3.5.2.2 Durchführung der Färbung mit MitoTraker Orange CMTM Ross .....	47
3.5.2.3 Fixieren der Oozyten in Paraformaldehyd .....	47
3.5.3 Bestimmung der Chromatinkonfiguration .....	47
3.5.3.1 Methode der Chromatinfärbung.....	47
3.5.3.2 Durchführung der Färbung mit Hoechst 33258 .....	47
<b>3.6 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Oozytenpräparate .....</b>	<b>49</b>
3.6.1 Methode der Fluoreszenzmikroskopie.....	49
3.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Ermittlung der Chromatinkonfiguration und Einteilung der Oozyten in Chromatinkonfigurationsgruppen .....	49
3.6.2.1 Grundeinstellung am Fluoreszenzmikroskop .....	49
3.6.2.2 Einordnung der Oozyten zu einer Chromatingruppe .....	49
3.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Ermittlung der mitochondrialen Aggregation .....	50
3.6.3.1 Grundeinstellung am Fluoreszenzmikroskop .....	50

3.6.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der mitochondrialen Aggregationsmuster.....	50
3.6.4 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der mitochondrialen Aktivität.....	51
<b>3.7 Statistische Auswertung .....</b>	<b>51</b>
<b>3.8 Anfertigen der Stammlösungen.....</b>	<b>53</b>
3.8.1 Brillant-Cresyl-Blau (260µM) .....	53
3.8.2 MitoTracker Orange CMTM Ros (1 µM).....	53
3.8.3 Hoechst 33258 (4,7 µM).....	53
3.8.4 Hanks-Lösung .....	53
3.8.5 Paraformaldehyd-Fixierlösung (3%).....	53
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Kumulus-Oozyten-Komplex-Gewinnung mittels transvaginaler ultraschallgeleiteter Follikelpunktion .....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Umfang der durchgeführten Follikelaspirationen.....	54
4.1.2 Anzahlen aspirierter Follikel und gewonnener KOK pro Aspirations Sitzung.....	54
4.1.3 KOK-Morphologie.....	55
<b>4.2. Steroidkonzentrationen in den Follikelflüssigkeiten der unterschiedlichen Follikelpopulationen.....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Konzentrationen von Östradiol-17β (E <sub>2</sub> ) und Progesteron (P <sub>4</sub> ) in den Follikelflüssigkeiten.....	56
4.2.2 Quotient aus den Konzentrationen von Östradiol-17β (E <sub>2</sub> ) und Progesteron (P <sub>4</sub> ) .....	57
<b>4.3 Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase der gewonnenen Oozyten....</b>	<b>58</b>
4.3.1 G-6-PDH Status in den Oozyten in Abhängigkeit von der Follikelgruppe .....	59
4.3.2 G-6-PDH Status in Abhängigkeit von der Kumulurmorphologie .....	60
4.3.3.1 G-6-PDH Status der Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulurmorphologie und der Follikelgruppe .....	61
4.3.3.2 G-6-PDH Status von Oozyten mit expandiertem Kumulus in Abhängigkeit von der Follikelgruppe .....	62
<b>4.4 Untersuchungen zur Chromatinkonfiguration der Oozyten.....</b>	<b>63</b>
4.4.1 Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Follikelgruppe .....	64
4.4.2 Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Kumulurmorphologie .....	65
4.4.3 Chromatinkonfiguration der Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulurmorphologie und der Follikelgruppe .....	66
4.4.4 Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit vom G-6-PDH Status.....	68
<b>4.5 Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität in den gewonnenen Oozyten....</b>	<b>70</b>
4.5.1 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit zur Follikelgruppe .....	70
4.5.2 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulurmorphologie.....	71
4.5.3 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulurmorphologie und der Follikelgruppe .....	72
4.5.4 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von ihrer G-6-PDH-Aktivität .....	73
4.5.5 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration.....	73

4.5.6	Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlicher Diplotänkonfiguration in Abhängigkeit von der Follikelgruppe.....	74
4.5.7	Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlicher Diplotänkonfiguration in Abhängigkeit von der Kumulismorphologie .....	75
4.5.8	Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit vom mitochondrialen Aggregationsmuster.....	75
<b>4.6</b>	<b>Untersuchungen zur mitochondrialen Aggregation der gewonnenen Oozyten... 76</b>	
4.6.1	Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit von der Follikelgruppe..	77
4.6.2	Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulismorphologie .....	78
4.6.3	Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit von dem G-6-PDH Status der Oozyten .....	79
4.6.4	Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit zu ihrem G-6-PDH Status und der Kumulismorphologie.....	80
4.6.5	Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit zur Chromatinkonfiguration.....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen mittels transvaginaler ultraschallgeleiteter Follikelaspiration aus entwicklungsphysiologisch</b>	
	<b>differenten Follikelpopulationen .....</b>	<b>82</b>
5.1.1	Experimentelles Design.....	82
5.1.2	Steroidanalysen der Follikelflüssigkeiten.....	82
5.1.3	Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen.....	84
5.1.4	Kumulismorphologie der gewonnenen Oozyten.....	86
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen zur Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in den</b>	
	<b>gewonnenen Oozyten .....</b>	<b>88</b>
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungen zur Chromatinkonfiguration in den gewonnenen Oozyten.....</b>	<b>91</b>
<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität in den gewonnenen Oozyten... 96</b>	
<b>5.5</b>	<b>Untersuchungen zur mitochondrialen Aggregation in den</b>	
	<b>gewonnenen Oozyten .....</b>	<b>100</b>
<b>5.6</b>	<b>Abschließende Betrachtung und Ausblick .....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Zitierte Literatur.....</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>125</b>
<b>11</b>	<b>Selbstständigkeitsversicherung .....</b>	<b>126</b>

## Verwendete Abkürzungen

A I	Anaphase 1
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCB	Brillant Cresyl Blau
BCB <sup>-</sup>	BCB-negativ (=hohe G-6-PDH-Aktivität)
BCB <sup>+</sup>	BCB-positiv (=niedrige G-6-PDH-Aktivität)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CSF	Cystostatic Factor
DD	Diffuses Diplotän
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub>	Östradiol-17-beta
FADH	Flavinadeninnukleotid, reduzierte Form
FBN	Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
FD	Fibrilläres Diplotän
FN	Fluorescent nucleus
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
GnRH	Gonadotropin Realsing Hormon
GSH	Glutathion
GV	Germinalvesikel
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IE	Internationale Einheit
IGF	Insulin-like Growth Factor
IVF	In-vitro-Fertilisation

IVM	In-vitro-Maturation
KD	Kondensiertes Diplotän
KOK	Kumulus-Oozyten-Komplex
LH	Luteinisierendes Hormon
LSM	Least Squares Means
M I	Metaphase 1
M II	Metaphase 2
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MHz	Megahertz
MPF	Maturation Promoting Factor
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Anzahl
NADH	Reduziertes Nikotinsäureamid-adenindinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-adenindinukleotid-Phosphat
OMI	Oocyte Maturation Inhibitor
P <sub>4</sub>	Progesteron
PBS	Phosphat buffered saline
PVA	Polyvinylalkohol
Pykn.	Pyknotisch
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	radikale Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
SE	Standard Error
T I	Telophase 1
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
μA	Mikroampere (10 <sup>-4</sup> A)

# 1 Einleitung und Zielstellung

In den letzten 10 Jahren ist ein steigendes Interesse an assistierten Reproduktionstechniken bei Pferdezüchtern zu beobachten. Im Zuge dessen hat sich die Besamung in nahezu allen deutschen Zuchtverbänden durchgesetzt (Sieme et al., 2009). Parallel dazu wurden auch Reproduktionstechniken weiterentwickelt, mit denen das biologisch vorhandene große Fortpflanzungspotential von weiblichen Tieren züchterisch intensiver genutzt werden kann. Diese Techniken zielen darauf ab, die natürlich mögliche Vermehrungsrate von einem Fohlen pro Jahr zu erhöhen. Züchterisch sind diese Techniken insbesondere zur Erhöhung der Selektionsintensivität und der vermehrten Reproduktion züchterisch wertvoller maternaler Genreserven eines Zuchtbestandes wichtig (Kanitz, 2008b).

Insbesondere hat sich der klassische Embryotransfer zur praxisreifen, jedoch bei Stuten biologisch limitierten Biotechnologie entwickelt (Allen, 2009). Parallel wurden aber auch effiziente Methoden zur wiederholten Eizellgewinnung bei Pferden erarbeitet (Galli et al., 2007; Mari et al., 2005; Kanitz et al., 2003). Die Gewinnung von Eizellen und deren Befruchtung in vitro eröffnet, zusätzlich zum Embryotransfer, die Möglichkeit, in Zukunft eine Verkürzung des Generationsintervall im Zuchtbestand zu erreichen, Nachkommen von Stuten die im Hochleistungssport eingesetzt werden zu erzeugen sowie Nachkommen von wertvollen infertilen Stuten zu produzieren (Barbacini et al., 2010; Kanitz, 2008b). Die In-vitro-Produktion von equinen Embryonen mit anschließenden Embryotransfer gestaltet sich jedoch im Gegensatz zur Situation bei anderen Nutztierspezies wie dem Rind, Schaf und Schwein sehr schwierig (Galli und Lazzari, 2008; Galli et al., 2002).

Die In-vitro-Embryonenerzeugung setzt sich aus der Gewinnung und Beurteilung von Oozyten, ihrer Reifung in vitro nach der Gewinnung aus unreifen Follikeln, der Befruchtung sowie der anschließenden Kultivierung bis zum transfertauglichen Stadium der Blastozyste zusammen (Kanitz, 2008a). Obwohl nach der In-vitro-Reifung (In-vitro-Maturation, IVM) von equinen Eizellen Kernreifungsraten (Metaphase II der Meiose) von 50-70% erreicht werden (Alm und Torner, 1994), bleibt die Entwicklung eines Embryos nach konventioneller In-vitro-Fertilisation (IVF) eher ein sporadisches Ereignis (Alm et al., 2001). Neben einer unzureichenden Kapazitation von equinen Spermien bei der In-vitro-Fertilisation (Alm et al., 2001) wird auf der maternalen Seite eine unzureichende zytoplasmatische Reifung der Eizellen in vitro als ein möglicher Grund diskutiert (Torner et al., 2007).

Einen Durchbruch zur erfolgreichen Befruchtung von equinen Oozyten brachte die Anwendung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI). Dadurch konnten Blastozystenentwicklungsraten von 27-38% realisiert werden (Hinrichs et al., 2005). Trotzdem ist die In-vitro-Produktion von Embryonen bei Pferden nach wie vor ineffizient und weltweit wenigen Experten vorbehalten, deren Erfolg großen Schwankungen unterworfen ist (Kanitz, 2008a).

Ein Grund könnte die Inhomogenität der gewonnenen Oozyten hinsichtlich ihres chromosomalen und zytoplasmatischen Reifegrades zu Beginn und während der IVM sein (Torner et al., 2007; Hinrichs et al., 2005). Da sich auf den Ovarien von Stuten im Verlauf des Zyklus unterschiedliche Populationen an Follikeln in verschiedenen physiologischen Entwicklungsstadien befinden (Rödiger, 2000), führt eine Aspiration aller Follikel zu einem

Zeitpunkt zu Oozyten, die zum Teil aus sehr unterschiedlichen folliculären Milieus stammen. Follikuläre Einflussfaktoren, die eine Entkoppelung der chromosomalen und zytoplasmatischen Reifung bereits vor der IVM bewirken, könnten zu einem Verlust der Entwicklungsfähigkeit der Oozyten führen (Landim-Alvarenga et al., 2002). Auf der anderen Seite wurde die Hypothese aufgestellt, dass z.B. eine beginnende Follikelatresie auch einen positiven Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der isolierten equinen Eizellen in In-vitro-Systemen haben kann (Dell'aquila et al., 2003; Hinrichs, 1997).

Die Zielstellungen der vorliegenden Arbeit bestanden deshalb darin:

1. chromosomale und zytoplasmatische Reifungsparameter von Oozyten in Abhängigkeit von den physiologischen Entwicklungsstadien ihrer Herkunftsfollikel darzustellen
2. den Entwicklungsstatus einer Follikelpopulation als einen weiteren Parameter zur Abschätzung der Oozytenqualität zu evaluieren

Dafür war es notwendig, die zur Oozytengewinnung genutzten Follikelpopulationen hinsichtlich ihrer physiologischen Entwicklungsstadien zu definieren und eine follikelspezifische Zuordnung, der individuell anhand mehrerer Qualitätsparameter charakterisierten Oozyten, zu gewährleisten.

Die Untersuchungen zielten damit mittelbar auf eine verbesserte Beurteilung des Ausgangsmaterials für die In-vitro-Produktion von Embryonen und auf eine genauere Bewertung der Vorgänge während der In-vitro-Eizellreifung ab. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen die Oozytengewinnung in vivo methodisch weiter zu optimieren um eine möglichst hohe Anzahl entwicklungscompetenter Oozyten zu erlangen.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Physiologie der Fortpflanzung bei Stuten

#### 2.1.1 Grundlagen

Die Geschlechtsreife und die damit verbundenen zyklischen Ovarfunktionen setzen bei Stuten im Alter von 2-4 Jahren ein (Busch und Klug, 1999). Stuten zeigen ein saisonal-polyöstrisches Fortpflanzungsverhalten. Auf der nördlichen Halbkugel erstreckt sich die ovulatorische Periode bei Stuten von April bis Oktober, wobei große inter- und intraindividuelle Variabilitäten auftreten können. Im Winter befinden sich Stuten in einer anovulatorischen Periode, in der kaum oder keine Ovulationen stattfinden. Beeinflusst wird die Ovaraktivität von der Tageslänge. Da die Ovaraktivität mit einer steigenden Tageslänge zunimmt (Ginther, 1979), werden Pferde auch als „long-day-breeder“ bezeichnet. Eine Übergangszeit im Herbst und Frühjahr trennt die beiden Perioden. In der ca. zweimonatigen Übergangszeit findet noch verlangsamtes, wellenförmiges Follikelwachstum statt, jedoch bleibt eine Ovulation aus. Während der Decksaison (ovulatorische Periode) finden regelmäßige Zyklen mit einer Länge von  $21 \pm 2$  Tagen statt (Hughes et al., 1975). Der ovarielle Zyklus lässt sich in eine vom Gelbkörper dominierte Phase (Diöstrus, Lutealphase) und eine folliculäre Phase (Östrus, Rosse) unterteilen. Während die Dauer des Diöstrus mit 14-15 Tagen in der Decksaison konstant bleibt (Hughes et al., 1972), zeigt die Östruslänge eine Abhängigkeit von der Jahreszeit. Im norddeutschen Raum dauert die Rosse im März  $6,0 \pm 2,6$  Tage und im Juli  $4,2 \pm 1,9$  Tage (Abel, 1984), jedoch sind die Rosseanzeichen bei Stuten in der frühen Decksaison schwächer ausgeprägt.

#### 2.1.2 Der ovarielle Zyklus und seine endokrine Regulation

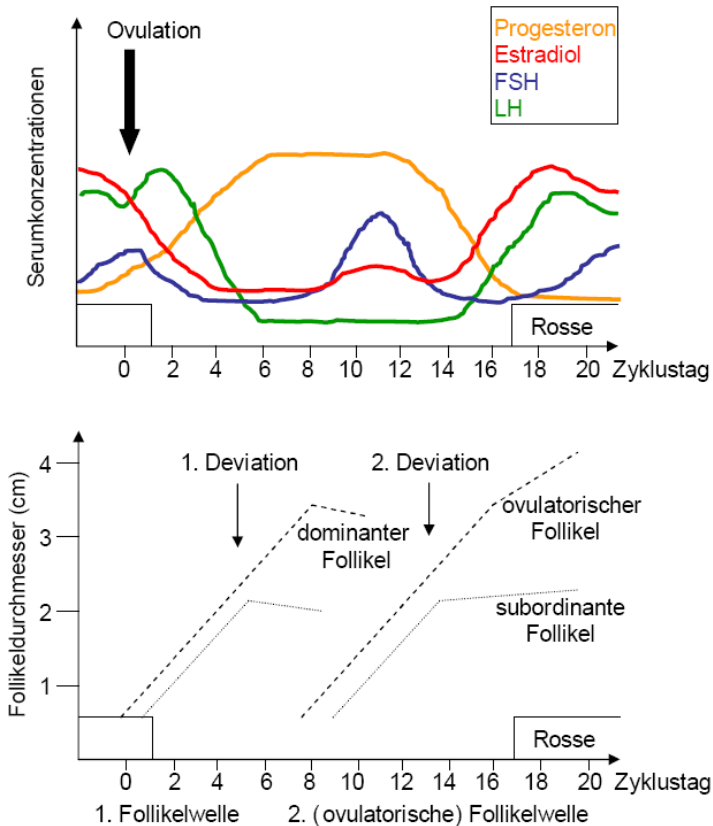
Der Ovarialzyklus mit seiner regelmäßigen Abfolge von Östrus und Diöstrus ist das Ergebnis von komplexen hormonellen Steuerungssystemen, die über endo-, para-, und autokrine Sekretionswege sowie über zusätzliche zentralnervale Beeinflussung zusammenwirken. Am zyklischen Ablauf der Ovarfunktionen sind verschiedene Organe beteiligt, die sowohl Hormone sekretieren als auch von ihnen beeinflusst werden. Im zentralen Nervensystem (ZNS) sind der Hypothalamus und die Hypophyse als übergeordnetes Regelzentrum des Zykluses angelegt. Zusätzlich ist im ZNS die Epiphyse durch ihre lichtbeeinflusste Melatoninsynthese an der Steuerung der Saisonalität der Stute beteiligt. Mit zunehmender Tageslänge wird im Frühjahr vermehrt Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) vom Hypothalamus sekretiert. GnRH bewirkt die Freisetzung von Follikelstimulierendem Hormon (FSH). Dieses Gonadotropin stimuliert das Wachstum von mehreren sekundären und tertiären Follikeln im Ovar (Abb.1). Ein Follikel aus der heranwachsenden Follikelkohorte setzt sich durch ein besonderes Größenwachstum von der Gruppe ab (Deviation). Dieser selektierte Follikel erwirbt in dem Deviationsprozess die Dominanz über die übrigen Follikel der Kohorte. Die Granulosazellen des dominanten Follikels beginnen mit der verstärkten Synthese von Östradiol sowie Inhibin und steigern gleichzeitig ihre Expression von FSH-Rezeptoren (Abb.2). Diese Hormone führen über einen negativen Feedbackmechanismus mit der Hypophyse zur Verminderung der FSH-Sekretion. Der dominante Follikel, im Gegensatz zu den subordinanten Follikeln, erhält seine Sensibilität gegenüber den geringen FSH-Serumkonzentrationen jedoch durch die zusätzliche Anbildung von FSH-Rezeptoren. Die Östrogene induzieren gleichzeitig die Entwicklung von LH-Rezeptoren an den Granulosazellen und bewirken zudem eine steigende Freisetzung

von Luteinisierendem Hormon (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen, parallel zur sinkenden FSH-Sekretion. Während das Follikelwachstum vor Ausprägung der Dominanz von FSH abhängig war, wird für das Wachstum des dominanten Follikels LH zunehmend bedeutender. Bei Pferden manifestiert sich zu Beginn der Rosse ein hohes LH-Serumkonzentrationsplateau, ein präovulatorischer LH-Peak bleibt hingegen aus. Die LH-Serumkonzentration persistiert für etwa eine Woche auf einem hohen Niveau. Sie reguliert die präovulatorische Follikelreifung und leitet die Ovulation zum Ende der Rosse ein. Nach der Ovulation steigt die LH-Serumkonzentration bei Stuten noch kurzfristig an und erreicht ein Maximum einen Tag nach der Ovulation. Die Granulosazellen des Follikels differenzieren unter dem Signal des LH zu Luteinzellen. Aus ihnen bildet sich der Gelbkörper, welcher während des Diöstrus das Steroidhormon Progesteron sekretiert. In der frühen Gelbkörperphase kommt es bei 25% der Stuten zum Heranreifen einer neuen, anovulatorischen Follikelkohorte. Durch das negative Feedback der hohen Progesteronkonzentrationen auf die Hypophyse kann sich aus dieser ersten Follikelwelle kein präovulatorischer Follikel entwickeln, da es unter dem Progesteronblock zu keiner Steigerung der LH-Ausschüttung kommt. Erfolgte keine Konzeption, kommt es durch das uterine Peptidhormon PGF<sub>2α</sub> zur Regression des Gelbkörpers und damit zum Wegfall des negativen Feedbacks auf die Sekretion des Gonadotropins LH. Das Ovar tritt nun wieder in die Follikelphase ein und ein dominanter Follikel kann erneut die ovulatorische Kompetenz erlangen. Das hormonelle Milieu des Östrus stellt sich wieder ein. (Rödiger und Bostedt, 2004; Aarle et al., 1999; Busch und Klug, 1999)

### 2.1.3 Follikeldynamik bei Stuten

Die Entwicklung von antralen Follikeln bei Stuten ist gekennzeichnet durch das periodische Heranwachsen von Follikelkohorten. Analog zu anderen Spezies wird dieses Wachstum als Follikelwelle bezeichnet (Bergfelt und Ginther, 1993; Sirois et al., 1989). Eine Follikelwelle beinhaltet das simultane Wachstum mehrerer Follikel, das bei Stuten zwei bis drei Millimeter Querschnittserweiterung des Follikels pro Tag beträgt (Gastal et al., 2004). Im Verlauf der simultanen Wachstumsphase kommt es zur Selektion eines Follikels, der die Dominanz in der Follikelkohorte ausbildet. Er kann sich zu einem präovulatorischen Follikel entwickeln, während die subordinanten Follikel atresieren (Donadeu und Pedersen, 2008).

Mit Hilfe der Ultraschalltechnik wurde es möglich, das wellenförmige Follikelwachstum von Follikeln mit einer Mindestgröße von zwei Millimetern bei Stuten zu beschreiben (Donadeu und Pedersen, 2008; Bergfelt und Ginther, 1993; Ginther und Bergfelt, 1992). Vom Wachstum kleinerer Follikelstadien ist nur wenig bekannt. Es wird aber angenommen, dass die Entwicklung eines Follikels von 0,1 bis zu einem Millimeter zwei Zyklen in Anspruch nimmt (Driancourt, 1979). Follikelwellen lassen sich bei Stuten in ovulatorischen (Sommer) und anovulatorischen (Winter) Perioden beobachten. In der Mitte der anovulatorischen Periode kommt es nur zur Anbildung kleiner Follikel (< 21 mm). Dieses wird auf niedrige LH-Serumkonzentrationen zu diesem Zeitpunkt zurückgeführt (Donadeu und Watson, 2007). Während eines Zyklus lassen sich bei Stuten bis zu zwei Follikelwellen beobachten (Ginther et al., 2004b). Allerdings zeigen nur 25% der Stuten eine zweite Follikelwelle (Sirois et al., 1989), die sich während der ersten Hälfte des Diöstrus entwickelt. Obwohl im Diöstrus eine hohe Progesteronkonzentration im Serum die LH-Sekretion minimiert und daher die dominanten, LH-abhängigen Follikel der ersten Follikelwelle wieder atresieren (Abb.1), kann es bei Stuten durchaus zu Ovulationen in der ersten Follikelwelle im Diöstrus kommen (Ginther, 1992). Ab der Mitte des Zyklus lässt sich das



**Abb.1:** Schematische Darstellung der Steroid- und Gonadotropin-Serumkonzentrationen sowie der Follikeldynamik im Verlauf des Zyklus bei Stuten (nach Rödiger und Bostedt, 2004; Busch und Klug, 1999)

gemeinschaftliche Follikelwachstum der primären Follikelwelle, die den späteren Ovulationsfollikel hervorbringt, feststellen. Werden zu diesem Zeitpunkt alle antralen Follikel auf dem Ovar entfernt, lassen sich durchschnittlich 12 neue Follikel zum Beginn einer Welle beobachten (Gastal et al., 2004). Aber nur sechs Follikel einer Follikelwelle erreichen durchschnittlich während der zyklischen Periode einen Durchmesser von mehr als 12 Millimeter (Donadeu und Ginther, 2003). Sieben Tage vor der Ovulation und bei Stuten mit zwei Follikelwellen zusätzlich am Zyklustag fünf, lassen sich bei den Follikeln einer heranwachsenden Follikelkohorte unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten feststellen (Ginther et al., 2003a). Während ein, oder auch zwei Follikel ein Wachstum von zwei bis drei Millimeter am Tag beibehalten, verlangsamen die subordinanten Follikel ihr Wachstum und gehen in Regression über (Ginther et al., 2007b; Ginther et al., 2004b). Dieser Vorgang wird als Deviation bezeichnet. Der Follikel mit dem Wachstumsvorteil besitzt zu diesem Zeitpunkt einen Durchmesser von 22,5 Millimetern (Ginther et al., 2005). Er erwirbt während des

Deviationsprozesses die Funktion zur Ausbildung der Dominanz in der Follikelkohorte. Der Ausprägung der Dominanz geht ein Prozess der Follikelselektion voraus, der bis zur Deviation der Follikel anhält. An dem Selektionsprozess sind eine Vielzahl von Proteinen und Steroiden beteiligt. Dazu gehören insbesondere Östradiol, Inhibine, Aktivine, Follistatin und Proteine der IGF und VEGF Gruppe. Sie wirken über parakrine Wege unterstützend oder inhibierend auf die Wirkung der hypophysären Gonadotropine (Fortune et al., 2004). Obwohl das Größenwachstum von den Follikeln, die sukzessive zu einer neuen Follikelwelle hinzukommen, zu Beginn einer Follikelwelle vergleichbar ist, kann der zukünftige dominante Follikel bereits sechs Tage vor der Deviation an einem Größenvorteil erkannt werden (Gastal et al., 2000). Bis zur Deviation besitzen noch alle größeren Follikel einer Wachstumswelle das Potential zur Ausprägung der Dominanz (Gastal et al., 2004; Ginther et al., 2004b). Erst nach der Deviation, mit dem Ende des Selektionsprozesses geht den zweitgrößten Follikeln dieses Potential verloren. In der Regel erlangt nur ein Follikel die Dominanz über die subordinanten Follikel der Kohorte, jedoch lassen sich in bis zu 30% der Östren Doppelentwicklungen von dominanten Follikeln beobachten (Hohenhaus und Bostedt 1992). Der dominante Follikel ist in der Lage bis zum Zyklusende auf einen Durchmesser von 35-55 mm heranzuwachsen. Während der Rosse kommt es zu grundsätzlichen Umstellungen der Follikelzellfunktionen im dominanten Follikel, die im Kapitel 2.3.2 detailliert besprochen werden. Dadurch wird es dem dominanten Follikel möglich unter dem Einfluss des LH-Signals die finale Follikelreifung zu durchlaufen und zu einem ovulationskompetenten Follikel heranzureifen (Donadeu und Perderson 2008). Im Falle einer Doppelfollikelentwicklung erwerben nur die Hälfte der co-dominanten Follikel die ovulatorische Kompetenz und gelangen nach einem LH-Anstieg zur Ovulation (Hohenhaus und Bostedt 1992).

## **2.2 Follikulogenese**

In der weiblichen Keimdrüse (Eierstock, Ovar) findet die Reifung und Freisetzung der weiblichen Keimzellen (Eizellen, Oozyten) statt. Weiterhin werden Hormone synthetisiert, die über Feedback-Mechanismen mit dem Hypothalamus-Hypophysen-System, die geschlechtsspezifischen, zyklischen Abläufe der Stute steuern. Beide Aufgaben sind eng mit der strukturellen und funktionellen Einheit des Ovarialfollikels verbunden. Diese Einheit besteht aus einer Oozyte im Zentrum und den umgebenen Follikelzellen. Die Follikel umgibt eine Basalmembran, welche sie zum dem Parenchym des Ovars abgrenzt (Liebig, 2004). Die Follikulogenese beschreibt zum einem den Prozess der Follikelentstehung, zum anderen wird darunter aber auch die Entwicklung eines Follikels vom Ruhestadium bis zum sprungreifen (präovulatorischen) oder untergehenden (atretischen) Follikel verstanden (Gordon, 2003).

### **2.2.1 Primordialfollikel**

Die Entwicklung eines Follikels beginnt mit der Entstehung von Primordialfollikeln in den Ovarien im Zeitraum der Embryonalentwicklung. Nach Anlage der weiblichen Geschlechtsorgane aus den Müllerschen Gängen vermehren sich die eingewanderten Urkeimzellen zunächst mitotisch und werden durch den Eintritt in die Meiose zu primären Oozyten (Deansley, 1975). Eine Schicht aus undifferenzierten und flachen Granulosazellen umgibt die Oozyte und bildet mit ihr einen Ur- oder Primordialfollikel (Erickson 1986). Ab dem 70. Trächtigkeitstag lassen sich Meiosen in den Ovarien des Stutfohlenembryos beobachten. Die daraus entstehenden Oozyten verfallen bis zum 150. Trächtigkeitstag weitestgehend der

Atresie, so dass es erst ab dem 150. Trächtigkeitstag zur Bildung von Primordialfollikeln kommt (Deanesly 1975). In der weiteren embryonalen Entwicklung steigt die Zahl an Primordialfollikel gleichmäßig an (Ginther, 1992). Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Entstehung des Pools an Primordialfollikeln auf den Ovarien des Stutfohlens abgeschlossen (Schnorr und Kressin, 2006). Bei erwachsenen Stuten werden bis zu 36000 Primordialfollikel gezählt (Driancourt et al., 1982).

### **2.2.2 Primärfollikel**

Die weiteren Entwicklungsstufen eines Follikels sind geprägt durch die Proliferation der somatischen Zellschichten, die die primäre Oozyte umlagern. Diese Prozesse beginnen bereits im Fötus und setzen sich postnatal fort (Donadeu und Pedersen, 2008). Durch Umwandlung und Teilung der Zellen der Membrana granulosa entsteht aus dem Primordialfollikel ein Primärfollikel. Die Oozyte ist von einer einschichtigen, isoprismatischen Schicht von Follikelzellen umgeben. In diesem Entwicklungsstadium nimmt auch das Zytoplasma der Oozyte geringgradig zu (Liebig, 2004). Über die Faktoren, die diese ersten Follikelentwicklungen initiieren ist wenig bekannt. Obwohl der ausdifferenzierte Primärfollikel bereits FSH-Rezeptoren an den Granulosazellen präsentiert (Ferin, 1998; Amsterdam und Rotmensch, 1987), ist eine Beteiligung von Gonadotropinen bei der Anbildung von Primärfollikeln eher unwahrscheinlich (Ferin, 1998).

### **2.2.3 Sekundärfollikel**

Ein charakteristisches Kennzeichen des Sekundärfollikels ist die Vermehrung der Follikelzellen. Durch Gonadotropine wird eine starke mitotische Aktivität bei den Follikelzellen initiiert. Dabei setzt die Proliferation an zwei gegenüberliegenden Polen ein, so dass ein ovoider Follikel entsteht. Die Oozyte wächst in diesem Prozess annähernd zu ihrer endgültigen Größe heran (100-120  $\mu\text{m}$ ) und die strukturelle Differenzierung des Zytoplasmas setzt ein. Sie wird von mehreren Schichten von Follikelzellen (5 bis 10) umgeben. Bereits in diesem Follikelstadium differenzieren die Follikelzellen zu Corona-radiata-Zellen, die die Oozyte strahlenförmig umgeben, den Basalzellen außen an der Basalmembran des Follikels und den Intermediärzellen dazwischen. Die Stromazellen, welche außerhalb der Basalmembran dem Follikel anliegen, beginnen sich zu vergrößern und ordnen sich zirkulär an. Sie bilden eine bindegewebige Schicht um den Follikel, die als Theka follicularis bezeichnet wird. Ein weiterer wichtiger Prozess bei der Entstehung eines Sekundärfollikels ist die Bildung der Zona pellucida. Sie stellt eine feinfibrilläre, glykoproteinreiche Grenzsicht mit einer Dicke zwischen 12 und 13  $\mu\text{m}$  dar. Sie wird hauptsächlich von der Oozyte durch Sekretion von Proteinen im Spaltraum zwischen der Oozyte und den anliegenden Follikelzellen (perivitelliner Raum) gebildet. Aufgaben der Zona pelucida sind unter anderem die Nährstoffregulation, die Verhinderung von Polyspermie und die zu frühe Nidation des Embryos in die Gebärmutterschleimhaut. Die Follikelzellen der Corona radiata bilden Fortsätze durch die Zona pellucida aus, die über Desmosomen mit der Oozyte verbunden sind (Liebig, 2004; Rüsse und Sinowatz, 1991; Mosimann und Kohler, 1990).

### 2.2.4 Tertiärfollikel

Der Übergang zu einem Tertiärfollikel ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines flüssigkeitsgefüllten Hohlraumes, dem Antrum folliculare. Diese Entwicklung beginnt beim equinen Follikel ab einem Durchmesser von 0,3 mm (Driancourt et al., 1982). In diesem Stadium lässt sich bereits eine Erweiterung der Interzellularspalten lichtmikroskopisch erkennen. Durch ein Zusammenfließen der Flüssigkeit bildet sich schließlich die Follikelhöhle. Sie vergrößert sich durch ständige Sekretion von Follikelflüssigkeit (Liquor follicularis), einer hyaluronsäure- und eiweißreichen Flüssigkeit, welche hauptsächlich von den Granulosazellen sezerniert wird (Liebig, 2004). Beim neugeborenen Stutfohlen sind bereits Tertiärfollikel vorhanden (Petten, 1933). Die Entwicklung von tertiären Follikeln ist ab einem Durchmesser von einem Zentimeter von einer adäquaten Stimulation durch Gonadotropine abhängig. Bei Stuten wurde dieses durch Pedersen (2002) und Imboden et al. (2006) experimentell nachgewiesen. Während die frühe Follikelentwicklung stark durch FSH beeinflusst wird (Ginther et al., 2003b; Bergfelt und Ginther, 1985), ist die späte Entwicklung durch LH beeinflusst (Bergfelt et al., 2001).

Die Follikelzellen vollenden im Tertiärfollikel ihre Differenzierung in Basal-, Intermediär-, und Granulosazellen. Diese Zelltypen bilden im Tertiärfollikel den exzentrisch gelegenen Eihügel (Kumulus oophorus) aus. Er ist bei der Stute im Gegensatz zu anderen Tierarten flach und fest mit der Follikelwand verwachsen (Hawley et al., 1995). In ihm befindet sich die Eizelle, die im frühen Tertiärfollikel ihre endgültige Größe von 100-120 µm erreicht. Die Thekazellschicht differenziert sich in eine Theka follicularis externa und eine Theka follicularis interna. Die Basalzellen der Granulosazellen beginnen Östrogene aus Androgenen zu synthetisieren, die von den Thekazellen (epitheloide Zellen der Theka follicularis interna) gebildet werden. Die Durchblutung dieser Zellschichten nimmt im Tertiärfollikel zu (Liebig, 2004; Rüsse und Sinowatz, 1991).

### 2.2.5 Quartärer Follikel

In den meisten Fällen endet die Entwicklung eines Follikels in der Atesie (Driancourt et al., 1982), da durch eine endo- und parakrine Beeinflussung des dominanten Follikels das Weiterwachsen der subordinanten tertiären Follikel unterdrückt wird (Beg und Ginther, 2006; Imboden et al., 2006; Fortune et al., 2004; Pederson HG, 2002). Der dominante (Tertiär)-Follikel kann sich durch Veränderungen der Hormonrezeptormuster der Follikelwandzellen (Abb.2) auch bei niedrigen FSH-Serumkonzentrationen und den nunmehr wichtigeren Stimulus des LHs weiterentwickeln. Er wird dann als quartärer oder präovulatorischer Follikel bezeichnet. Dieser wächst zum Zyklusende auf eine Größe von 3-4 cm heran und erwirbt durch weitere Funktions- und Rezeptorenbesatzwechsel in und an den Granulosazellen die ovulatorische Kompetenz. Er gelangt nach einem Anstieg der LH-Plasmakonzentration zur Ovulation. Aus den Granulosazellen und den Zellen der Theka follicularis interna erwächst anschließend der progesteronaktive Gelbkörper (Corpus luteum). Die Luteinisierung der Follikelzellen beginnt bereits vor der Ovulation (Sirois et al., 1991; Sirois et al., 1990). Die Oozyte setzt dabei die Meiose bis zur Metaphase II fort (Rüsse und Sinowatz, 1991) und die Granulosazellen des Cumulus oophorus lockern ihren Verbund (Expansion), so dass die Eizelle zur Ovulation von der Follikelwand abgelöst ist (Liebig, 2004).

## 2.3 Funktionelle Follikelentwicklung

Während den wellenförmigen dynamischen Follikelanbildungs- und Rückbildungsvorgängen im ovariellen Zyklus verändern sich die Funktionen und die Struktur der Follikel grundlegend. Die Sekretionsleistungen und das Rezeptorenmuster der Follikelzellen unterliegen dynamischen Veränderungen, um die Aufgaben der Funktionseinheit Follikel in endokrinen und parakrinen Regelkreisen des Sexualzykluses sowie in der Oozytenreifung zu gewährleisten. Dabei entwickelt sich ein Follikel im Prozess der Selektion vom vitalen, progressiv wachsenden Follikel weiter zum dominanten Follikel der sich zum Zyklusende zum präovulatorischen Follikel entwickelt und die reife Eizelle freisetzt. Die übrigen Follikel einer Follikelwelle gehen in Atresie und Rückbildung über, nachdem ein Follikel die Dominanz über die heranwachsende Follikelkohorte erlangt hat.

### 2.3.1 Wachsende, vitale Follikel

Populationen von wachsenden, vitalen Follikeln lassen sich von dem Beginn neuer Follikelwellen, im frühen Metöstrus sowie zwischen den Zyklustagen 8-10, bis zur Ausprägung der Dominanz eines Follikels auf den Ovarien von Stuten feststellen (Rödiger und Bostedt, 2004). Da sich wachsende Follikelpopulationen im Metöstrus und in der Mitte des Diöstrus parallel mit bereits atretischen Follikeln einer vorangegangenen Follikelwelle auf den Ovarien befinden (Ginther et al., 2004b), kommen ausschließlich vitale Follikel auf den Ovarien unter natürlichen Bedingungen kaum vor. Am Zyklustag 10 kann eine neue, homogene Kohorte aus vitalen Follikeln artifiziell durch Aspiration aller Follikel, die größer als 6 mm sind, induziert werden (Gastal et al., 1997). Nach einer Follikelaspiration zu diesem Zeitpunkt lassen sich im Mittel 12 Follikel einer neuen Wachstumswelle zuordnen, die eine tägliche Durchmesserzunahme von 2-3 mm aufweisen (Gastal et al., 2004). Obwohl bereits Primärfollikel FSH-Rezeptoren an den Granulosazellen und Follikel beim Übergang vom Sekundär- zum Tertiärfollikel LH-Rezeptoren an den Thekazellen aufweisen (Amsterdam, A. und S. Rotmensch, 1987), verläuft die Follikelentwicklung bis zu einem Durchmesser von einem Zentimeter weitgehend unabhängig von Gonadotropinen (Pedersen et al., 2002). Der Beginn einer neuen Follikelwelle ist jedoch abhängig von hohen FSH-Serumkonzentrationen. Sie wirken positiv auf das Follikelwachstum und sind essentiell für das Wachstum von Follikeln >10 mm (Pedersen et al., 2002). Bis der größte Follikel einer neuen Follikelwelle einen Durchmesser von 13 mm erreicht hat, lassen sich ansteigende Konzentrationen an FSH im Serum beobachten (Donadeu und Ginther, 2001; Gastal et al., 1997). Anschließend fallende FSH-Serumkonzentrationen sind auf sekretionshemmende Faktoren, wie Inhibin-A und Östradiol zurückzuführen, die im wesentlichen von den drei größten Follikeln gebildet werden (Ginther et al., 2007c; Watson et al., 2002). Werden diese Follikel durch Aspiration entfernt, steigen die FSH-Serumkonzentrationen erneut wieder an (Gastal et al., 1997). Vitale Follikel zeichnen sich durch hohe Konzentrationen an Östradiol in der Follikelflüssigkeit aus. Die Konzentration steigt in der Follikelflüssigkeit mit einer Größenzunahme kontinuierlich an, während die Progesteronkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit der wachsenden Follikel konstant ein niedriges Niveau beibehalten. Dieses ist auf eine vermehrte Syntheserate von Östrogenen in den Granulosazellen zurückzuführen (Belin et al., 2000). Daher nimmt das Verhältnis von Progesteron zu Östradiol während des Wachstums ab (Becker et al., 2006; Belin et al., 2000; Collins et al., 1997; Kenney et al., 1979). In Follikelflüssigkeiten von wachsenden Follikeln werden bereits Östradiolkonzentrationen von über 1000 ng/ml gemessen, wenn diese Gruppen Follikel von bis zu 30 mm mit beinhalten (Becker et al., 2006; Collins et al., 1997). Makroskopisch zeigt

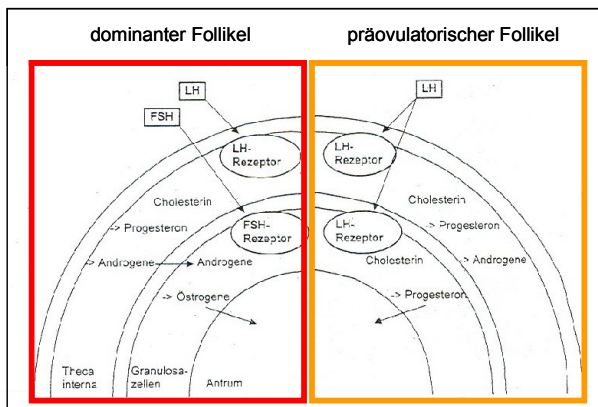
die Auskleidung eines vitalen Follikels einen gelblichen Farbton und in ihr sind zahlreiche, prominente Blutgefäße zu erkennen. Histologisch zeigen die muralen Granulosazellen der vitalen Follikel alle eine Verbindung zur Basalmembran, die Zellkerne liegen zweireihig im basalen Drittel der Zellen und weisen zahlreiche Mitosen auf (Kenney et al., 1979). Die Kumuluszellen des Cumulus oophorus liegen kompakt um die Oozyte. Sie stehen über zahlreiche Zellausläufer miteinander und mit der Oozyte in enger Verbindung. Darüber beeinflussen sie gegenseitig ihre Zellfunktionen (Grondahl et al., 1995). Die chromosomale Arretierung der Oozyte im Diplotän der Meiose ist in diesem Follikelstadium maßgeblich auf den meioseinhibierenden Einfluss der intakten Kumuluszellen zurückzuführen (Blondin et al., 2002). Werden Oozyte und Follikel von einander getrennt, kommt es zur spontanen Wiederaufnahme der Meiose (Edwards, 1965).

### 2.3.2 Dominanter Follikel

Der dominante Follikel entwickelt sich zum Ende einer Phase, die von gleichmäßigen, gemeinschaftlichen Wachstum einer Follikelkohorte geprägt ist (Follikelwelle). Dabei setzt der zukünftige dominante Follikel sein kontinuierliches Wachstum beim Prozess der Follikeldeviation fort, während die subordinanten Follikel der Kohorte ihr Größenwachstum verlangsamen und schließlich in Regression übergehen. Der Deviation geht ein Prozess der Selektion voraus. Wird eine neue Follikelwelle durch eine Follikelaspersion in der Zyklusmitte artifiziell induziert, so lässt sich zu 60 % der spätere dominante Follikel schon früh, ab einer Größe von 0,6 cm erkennen. Bereits ab diesem Durchmesser zeigt der spätere dominante Follikel einen Größenvorteil gegenüber den weiteren, sukzessive an der neuen Follikelwelle teilnehmenden Follikeln und behält diesen bis zur Deviation bei (Gastal et al., 2004). Die meisten Follikel einer Follikelwelle besitzen jedoch noch bis 48 Stunden nach der Deviation die Fähigkeit zur Ausprägung der Dominanz (Gastal et al., 2004). Während der Selektion steigt der Gehalt von Östradiol und Inhibin A in der Follikelflüssigkeit an. Versuche, in denen IGF-1 in die subordinanten Follikel zum Zeitpunkt der Deviation injiziert wurde, konnten endgültig beweisen, dass der Östradiolanstieg nicht die Ausprägung der Dominanz bestimmt. IGF-1 scheint der bedeutendste lokale Faktor bei der Selektion zur Ausprägung der Dominanz zu sein und weitere lokale wichtige Faktoren z. B. der VEGF-Familie zu koordinieren (Ginther et al., 2004a). Der parallele Anstieg des Inhibin A in der Follikelflüssigkeit besitzt eine antiatretische Wirkung auf die Follikelzellen und senkt nach Diffusion systemisch die Konzentration von FSH in der Zirkulation. Die hohe Konzentration an Östrogenen in der Follikelflüssigkeit des dominanten Follikels führen über ihren mitogenen Einfluss zu einer Zunahme der Granulosazellen und den dort angesiedelten FSH-Rezeptoren. Sinkende systemische FSH-Konzentrationen können deshalb weiterhin das Wachstum und eine steigende Follikelvascularisierung des dominanten Follikels fördern (Ginther et al., 2007a). Außerdem führt FSH zur verstärkten Expression von LH-Rezeptoren an den Granulosazellen. Gegenläufig zu der sinkenden Serumkonzentration von FSH steigen die LH-Serumkonzentration (Ginther et al., 2006b; Gastal et al., 1999) und die Östradiol-Serumkonzentration (Gastal et al., 1999) bereits vor der Deviation an. Das LH übernimmt in dieser Entwicklung zunehmend die wachstumsfördernde Rolle für die größeren Follikel (Ginther et al., 2006a). Zwei Tage nach der Deviation steigt der Gehalt an Androgenen aufgrund des LH-Signals in der Follikelflüssigkeit. Die Androgene werden von den in allen Follikelstadien LH-Rezeptoren tragenden Thekazellen produziert und dienen den Granulosazellen als Substrat zur Östrogensynthese. Mit zunehmendem Durchmesser des dominanten Follikels steigt der Gehalt an Östrogen in der Follikelflüssigkeit an



(Gastal et al., 1999). Dieses ist auf eine vermehrte Syntheserate in den Granulosazellen und Thekazellen zurückzuführen. In ihnen ist eine zunehmende Aktivität von Schlüsselenzymen der Steroidogenese (Aromatase, P450<sup>SCC</sup>, 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) sowie deren Genexpression bei der Entwicklung vom vitalen zum dominanten Follikel festzustellen (Bellin et al., 2000; Goudet et al., 1999). In der Follikelflüssigkeit von dominanten Follikeln haben Watson et al. (2002) bei einem Durchmesser von 30 mm eine mittlere Konzentration von 1500 ng/ml Östradiol und eine mittlere Konzentration von 34 ng/ml Progesteron feststellen können. Collins et al. (1997) haben durch Punktion verschiedener Follikelstadien eine Östradiolkonzentration in Höhe von  $1083 \pm 489$  ng/ml in der Follikelflüssigkeit von dominanten Follikeln gemessen. Die Östrogene diffundieren vom Follikel in die Blutbahn. Bereits zum Zeitpunkt der Deviation sind steigende Konzentrationen von Östradiol im Serum festzustellen (Ginther et al., 2007b). Makroskopisch und histologisch stellt sich der dominante Follikel als vitaler Follikel dar (Rödiger et al., 2000).



**Abb.2:** Schematische Darstellung der LH- und FSH-Rezeptorverteilung und der Steroidsynthese in Theka- und Granulosazellen in dominanten und präovulatorischen Follikeln (nach Rödiger und Bostedt, 2004)

### 2.3.3 Präovulatorischer Follikel

Im weiteren Verlauf der Follikelreifung entwickelt sich der dominante Follikel zum präovulatorischen Follikel. Dabei nimmt die LH-Rezeptorexpression in den Theka- und Granulosazellen unter dem Einfluss der steigenden systemischen LH-Konzentration weiterhin zu. Die im Diöstrus nur moderat ansteigenden peripheren LH-Konzentrationen, die essenziell für das Wachstum des dominanten Follikels sind, zeigen zu Beginn der Rosse einen zweiten schnellen Anstieg und bleiben für etwa sieben Tage auf einem hohen Niveau. Die periphere LH-Konzentration erreicht bei Stuten ein Maximum einen Tag nach der Ovulation (Ginther et al., 2006a). Die hohen LH-Konzentrationen sind verantwortlich für die Ausprägung der ovulatorischen Kompetenz des dominanten Follikels und die damit verbundene ovulationsauslösende Wirkung von LH (Donadeu und Watson, 2007). Bereits ab einem Follikeldurchmesser von 25 mm kommen die meisten dominanten Follikel durch eine Applikation des LH-Rezeptoragonisten hCG zur Ovulation (Aarle et al., 1999). Ab einem Durchmesser von 35 mm gilt die Ovulation als Reaktion auf eine Applikation von 2500 IE

hCG als sicher (Gastal et al., 2006). Wird einer Stute mit einem präovulatorischen Follikel mit einem Durchmesser von mehr als 32 mm der LH-Rezeptoragonist hCG in einer Dosis von 2500 IE verabreicht, finden die meisten Ovulationen in einem Zeitintervall von 30 bis 48 Stunden nach der Injektion statt (Gastal et al., 2006). Ohne Ovulationsinduktion ist der Follikeldurchmesser zum Zeitpunkt der Ovulation bei 90% der Follikel allerdings größer als 35 mm und erreicht Durchmesser von bis zu 55 mm (Rödiger und Bostedt, 2004). Die Östradiolkonzentration in der Follikelflüssigkeit steigt während der Entwicklung vom dominanten zum präovulatorischen Follikel bei Stuten extrem stark an. Collins et al. (1997) beschreiben Östrogenkonzentrationen in Höhe von  $3102 \pm 510$  ng/ml in der Follikelflüssigkeit von präovulatorischen Follikeln gegenüber  $1083 \pm 489$  ng/ml in der Follikelflüssigkeit von dominanten Follikeln. Die Östrogenkonzentrationen bleiben bis zur Ovulation in präovulatorischen Follikeln konstant hoch (Watson und Hinrichs, 1988). Die in den Kreislauf diffundierenden Östrogene bewirken die Ausprägung der inneren und äußeren Rosseanzeichen und üben ein positives Feedback auf die LH-Sekretion aus. Nachdem sich die LH-Rezeptoren in den Theka- und Granulosazellschichten ausgebildet bzw. vervielfacht haben und durch das peripher zuströmende LH besetzt worden sind, beginnen die Granulosazellen mit der Sekretion von Progesteron und geben dieses in das Antrum ab (Fay und Douglas, 1987). Kurz vor der Ovulation kommt es parallel zu der ansteigenden Progesteronkonzentration zu einem signifikanten Abfall der Östrogenkonzentration in der Follikelflüssigkeit des präovulatorischen Follikels. Durch die zunehmende Progesteronsynthese in den Granulosazellen stehen der Östrogensynthese die benötigten Substrate nicht mehr zur Verfügung (Belin et al., 2000; Gerard und Monget, 1998; Collins et al., 1997). Die Luteinisierung des Follikels beginnt zunächst mit der vereinzelt, punktuellen Luteinisierung in den Thekazellschichten, bevor es zu einer generalisierten Luteinisierung der Follikelzellen um den Ovulationszeitpunkt herum kommt (Kenney et al., 1979). Die Konzentration von Progesteron in der Follikelflüssigkeit steigt daher bereits vor der Ovulation an (Bogh et al., 2000; Belin et al., 2000). Während dominante Follikel noch relativ niedrige Progesteronkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit aufweisen ( $13 \pm 2$  ng/ml), besitzen präovulatorische Follikel bereits Progesteronkonzentrationen von  $43 \pm 10$  ng/ml und in Ovulationsfollikeln (35 Stunden nach Crude-Equine-Gonadotropin-Administration mit ultrasonographisch nachweisbarer Luteinisierung) werden Progesteronkonzentrationen von  $819 \pm 53$  ng/ml in der Follikelflüssigkeit gemessen (Collins et al., 1997). Im Prozess der Luteinisierung der Granulosazellen werden parallel ablaufende apoptotische Prozesse in den Granulosazellen als physiologisch diskutiert (Piquette et al., 1994). Jüngere Untersuchungen an präovulatorischen Follikeln bei Stuten konnten diese These nicht stützen (Ginther et al., 2007). Präovulatorische Follikel weisen ab einem Durchmesser von 31 mm einen täglichen Zuwachs im Durchmesser von  $5,9 \pm 2,2$  mm auf (Becker et al., 2006). Zwei Tage vor der Ovulation oder nach einer Gabe von hCG zeigt der präovulatorische Follikel keine Größenzunahme mehr (Gastal et al., 2006; Koskinen et al., 1989). In diesem Zeitraum ist ultrasonographisch eine rasche Zunahme der Vaskularisation und eine Verdickung der Granulosazellschicht zu beobachten (Ginther et al., 2007a; Gastal et al., 2006).

### 2.3.4 Atretische Follikel

Nur ca. 0,7 bis 1,3% der ca. 35000 pränatal angelegten Primordialfollikel von Stuten entwickeln sich zu präovulatorischen Follikeln. Die verbleibenden 99% der Follikel gehen in Atresie (Rückbildung) über, die meisten von ihnen noch in präantralen Stadien (Driancourt et al., 1982). Selbst während der Entwicklung von neuen Follikelwellen mit

vitalen Follikeln sind regressive, atretische Follikel von vorgehenden Follikelwellen meistens in der Mehrzahl auf den Ovarien. Zu Beginn einer neuen Follikelwelle befinden sich noch bis zu 12 vitale, antrale Follikel neben den atretischen Follikelpopulationen einer vorhergehenden Follikelwelle auf den Ovarien (Ginther et al., 2003a). Ab der Deviation, die für die primäre Follikelwelle um den Zyklustag 17 stattfindet, zeigen alle Follikel mit Ausnahme des dominanten Follikels bereits ein verlangsamtes Wachstum, und am Zyklustag 18, bzw. drei Tage vor der Ovulation, zeigen bereits alle subordinanten Follikel klinisch eine Regression ihres Durchmessers (Pederson, 2000). Watson et al. (2002) konnten zeigen, dass alle subordinanten Follikel drei bis vier Tage vor der erwarteten Ovulation histologisch bereits moderate Anzeichen von Atresie aufwiesen. Auch Driancourt et al. (1982) zeigten, dass kurz vor der Ovulation alle Follikel, mit Ausnahme des präovulatorischen Follikels atretisch waren. Makroskopisch erscheint die Follikelauskleidung eines atretischen Follikels weiß und nur sehr wenige Blutgefäße sind zu erkennen (Rödiger und Bostedt, 2004; Rödiger, 2000; Kenney et al., 1979). Kenney et al. (1979) teilen den Ablauf der Follikelatresie histologisch in drei Stadien ein. Das erste, frühe Stadium der Atresie ist durch punktuelle Karyorrhexie und Pyknose in den Granulosazellen gekennzeichnet. Im zweiten Stadium weisen die Granulosazellen massive Karyorrhexie und Pyknose mit beginnender Lyse des Chromatins sowie eine Verdickung der Basalmembran auf. Im dritten Stadium löst sich die Basalmembran auf, die Granulosazellen lassen sich nicht mehr eindeutig von den Thekazellen trennen und der Follikel wird zunehmend von Bindegewebszellen infiltriert. Im Laufe der Atresie des Follikels steigt die Apoptoserate in den Kumuluszellen und der Zellverband der Granulosazellen des Cumulus oophorus lockert sich auf, expandiert (Dell'aquila et al., 2003; Piquette et al., 1994). Expandierte Kumulus-Oozyten-Komplexe werden daher neben präovulatorischen auch atretischen Follikeln zugeordnet (Hinrichs und Williams, 1997). Mit der Zellexpansion einhergehend verlieren die Granulosazellen ihr Vermögen, die Oozyte in der Prophase der Meiose zu arretieren (Larsen et al., 1987). Zwischen den histologischen Veränderungen im Follikel (Atresiestadien) und Vorgängen der Apoptose in den Granulosazellen besteht eine positive Korrelation (Dell'aquila et al., 2003; Pedersen et al., 2003). Im periovulatorischen Zeitraum ist die Expression der Schlüsselenzyme der Steroidogenese (Aromatase,  $\beta$ HSD,  $450^{SCC}$ ) in den Granulosazellen von subordinanten Follikeln abgesenkt. Es kann parallel dazu eine Reduktion der Steroidkonzentrationen, im besonderem der Östradiolkonzentration, in den Follikelflüssigkeiten der subordinanten Follikel in diesem Zeitraum beobachtet werden. Da die Östradiol- und Progesteronkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit positiv mit den Enzymen der Steroidogenese korreliert sind, wird dieses von den Autoren als Zeichen der Follikelatresie in den subordinanten Follikeln gewertet (Belin et al., 2000). Gerard et al. (1998) ermittelten in großen subordinanten Follikeln zum Ende der follikulären Phase Östradiolkonzentrationen von  $383,8 \pm 92$  ng/ml und Progesteronkonzentrationen von  $23,1 \pm 92$  ng/ml in der Follikelflüssigkeit, Kenney et al. (1979) fanden 302 ng/ml Östradiol in der Flüssigkeit von Follikeln mit moderater Follikelatresie und 15 ng/ml bei Follikeln mit starker Follikelatresie sowie Progesteronkonzentrationen von 87 ng/ml und 175 ng/ml bei den gleichen Follikelgruppen. Rödiger et al. (2000) stellte zwischen 14,7 ng/ml und 17,5 ng/ml Östradiol sowie 7,6 ng/ml und 7,3 ng/ml Progesteron in der Follikelflüssigkeit von subordinanten, atretischen Follikeln in der frühen und späten Follikelphase des Zyklus fest. Den atretischen Follikel zeichnet neben den niedrigen Steroidgehalten eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen Progesteron und Östrogen zu Gunsten des Progesteron aus. Der Erhöhung des Quotienten aus den Konzentrationen von Progesteron und Östradiol in

der Follikelflüssigkeit von subordinanten Follikeln im präovulatorischen Zeitraum stellten Belin et al (2000), Gerard et al. (1998) sowie Watson et al. (2002) dazu die Erniedrigung des Quotienten aus Östradiol und Progesteron, als Zeichen der Atresie für die subordinante Follikelgruppe dar. In allen funktionalen Follikelentwicklungsstadien lassen sich LH-Rezeptorproteine im Follikelgewebe nachweisen. Im Zeitraum der späten Follikelphase des Zyklus ist die Menge an LH-Rezeptorproteinen jedoch in den muralen Granulosazellen von subordinanten Follikeln signifikant niedriger als in den Granulosazellen des dominanten Follikels (Goudet et al., 1999). Gemessen an der hCG-Bindungsfähigkeit besitzen atretische Follikel zudem nicht mehr die Fähigkeit mit Gonadotropinen zu interagieren (Kenney et al., 1979).

## 2.4 Eizellreifung

### 2.4.1 Oogenese

Die Oogenese beschreibt die Differenzierung von diploiden Urkeimzellen zu haploiden Oozyten. Die Primordialkeimzellen (Urkeimzellen) sind bei Säugetieren zunächst extragonal im Dottersackentoderm lokalisiert und bereits früh durch ihre hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase von den anderen somatischen Zellen abzugrenzen (Leichthammer et al., 1990). Bereits in den ersten Wochen der Embryonalentwicklung wandern die Primordialkeimzellen durch amöboide Bewegung in die Gonadenanlage ein (Schnorr und Kressin, 2006). Bei der Wanderung in die Gonadenanlage und später in deren Kortex, durchlaufen die Primordialkeimzellen mehrere Mitosezyklen. Die Urkeimzellen differenzieren dort zu mitotisch aktiven Oogonien, welche noch pränatal in die Prophase der ersten meiotischen Teilung eintreten. Die meiotischen Kernreifungsprozesse der nunmehr primären Oozyten arretieren im Diplotän (Deansley, 1975). Damit ist die maximale Anzahl Oozyten im Ovar pränatal festgelegt. Ab dem 70. Trächtigkeitstag lassen sich Meiosen in den Ovarien des Stufhohlenembryos beobachten. Die dadurch entstehenden primären Oozyten verfallen zunächst bis zum 150. Trächtigkeitstag weitestgehend der Atresie, so dass es erst ab dem 150. Trächtigkeitstag zur Bildung von Primordialfollikeln kommt (Deanesly 1975). Die primären Oozyten arretieren die Kernreifungsprozesse über Jahre im Diplotän der ersten Prophase der Meiose, bis sie entweder atresieren oder in die antrale Follikelentwicklung eintreten und durch das LH-Signal im präovulatorischen Follikel zur Vollendung der Meiose stimuliert werden (Ginther und Bergfeld, 1992).

### 2.4.2 Grundbegriffe der Oozytenmaturation

Die Oozytenreifung (Maturation) stellt die Entwicklung von einer ruhenden primären Oozyte zu einer befruchtungsfähigen sekundären Oozyte dar. Es handelt sich dabei um ein Zusammenspiel von Reifungsprozessen im Zellkern und im Zytoplasma. Die Oozyte muss zum einem die Fähigkeiten zur Fortführung und Vollendung der meiotischen Kernreifung, vom Diplotänstadium bis zum befruchtungsfähigen Kernstadium der Metaphase II erwerben. Zum anderen muss die Oozyte die zytoplasmatische Reife vollständig ausprägen, welche die sekundäre Oozyte zur erfolgreichen Befruchtung und Embryonalentwicklung befähigt (Eppig, 1993). Die Maturation der Oozyte wird von reifungsfördernden und reifungshemmenden Faktoren bestimmt (Hytel et al., 1997), die auf die Reifungsprozesse im Zellkern, strukturelle und biochemische Veränderungen im Ooplasma sowie auf Veränderungen in den Kumuluszellen Einfluss nehmen. Die Fähigkeit der Oozyte die

meiotische Teilung wieder aufzunehmen und bis zur Metaphase II fortzuführen wird als meiotische Kompetenz bezeichnet. Sie ist in zwei Phasen gegliedert und umfasst als ersten Abschnitt die Fähigkeit der Oozyte zur Auflösung der Kernmembran (Germinal vesicle breakdown, GVBD) mit anschließender Fortführung der Meiose bis zur Metaphase I. Diese erste Fähigkeit wird als GVBD-Kompetenz bezeichnet. In einer zweiten Phase wird die vollständige meiotische Kompetenz durch die Ausbildung der Fähigkeit zur Vollendung der ersten meiotischen Teilung und zur Weiterführung der Meiose bis zum befruchtungsfähigen Stadium der Metaphase II von der Oozyte erworben (Eppig, 1993). Die meiotische Kompetenz wird von der primären Oozyte während der frühen Follikulogenese, noch während der Wachstumsphase der Oozyte erworben. Im Verlauf der Wachstumsphase vergrößert sich der Durchmesser der Oozyte von ca. 30  $\mu\text{m}$  auf bis zu 100-130  $\mu\text{m}$  (Hyttel et al., 1997). Während primäre Oozyten, die sich noch in der Wachstumsphase befinden, nicht die Fähigkeit aufweisen auf Reifungssignale zu reagieren, besitzen bovine Oozyten ab einem Durchmesser von 110  $\mu\text{m}$  in der Mehrzahl die Fähigkeit die Meiose bis zur Metaphase II *in vitro* durchzuführen (Hyttel et al., 1997). Bei Pferden besitzen Oozyten aus kleinen, vitalen Follikeln eine geringe meiotische Kompetenz. Erst im weiteren Verlauf der Follikelentwicklung nimmt das Chromatin, noch im Germinalvesikelstadium, eine kondensierte Form an. Erst in dieser kondensierten Chromatinkonfiguration hat die Oozyte die Fähigkeit *in vitro* die Kernreifung zu durchlaufen vollständig ausgebildet (Hinrichs, 1997). In der Wachstumsphase der Oozyte wird ein Pool an mRNA und Proteinen synthetisiert, der nicht nur für die erfolgreiche Maturation benötigt wird, sondern auch die Regulation der späteren embryonalen Entwicklung bestimmt (Betteridge, 2000). Oozyten erwerben dadurch zum Ende der Wachstumsphase, parallel zur meiotischen Kompetenz, auch ihre Entwicklungskompetenz (Hyttel et al., 1997). Unter dieser Eigenschaft wird die Fähigkeit einer Oozyte verstanden sich nach einer erfolgreichen Fertilisation zu einer Blastozyste zu entwickeln. Der Erwerb der Entwicklungskompetenz wie auch eine physiologische Follikelentwicklung sind an einen engen Kontakt zwischen Kumuluszellen und der sich entwickelnden Oozyte gekoppelt (Eppig et al., 2002). Dabei üben die Kumuluszellen hauptsächlich einen inhibitorischen Effekt auf die Prozesse der Meiose aus. Die dadurch entstehende Verzögerung der Kernreife wirkt sich wiederum positiv auf die zytoplasmatische Reifung aus, die schließlich zum Erwerb der meiotischen Kompetenz und der Entwicklungskompetenz führt (Rodriguez und Farin, 2004; Blondin et al., 2002).

### **2.4.3 Chromosomale Maturation und ihre Regulation**

Das diploide Genom der Oogonien reift durch Reduktionsteilung, der Meiose, zur haploiden befruchtungsfähigen Oozyte heran. Die chromosomale Maturation beginnt mit dem Eintritt des Chromatins der Oogonien in die Prophase der ersten meiotischen Teilung. In diesem Kernstadium wird das Genom bis zum Abschluss Oogenese arretiert. Die Wiederaufnahme der Meiose und die Fortführung der meiotischen Prozesse bis zum befruchtungsfähigen Kernstadium der Metaphase II wird als chromosomale Maturation im engeren Sinne verstanden. Mit dem Erreichen der zweiten Metaphase wird das Chromatin in seiner meiotischen Entwicklung kurzfristig arretiert. Letztendlich führt die Penetration eines Spermiums *post ovulationem* zur erneuten Aktivierung der Kernreifung und mit dem Ausschleusen des zweiten Polkörperchens (Telophase II) und der Bildung der Vorkerne wird die Meiose der Oozyte *post fertilisationem* abgeschlossen. Im Follikel des adulten Individuums wird die Wiederaufnahme der meiotischen Teilungsprozesse in der Oozyte

durch den präovulatorischen LH-Anstieg ausgelöst. Die daraus resultierenden Reaktionen in den Kumuluszellen und in der Oozyte verlaufen spezieübergreifend ähnlich (Sirard et al., 1989).

#### **2.4.3.1 Strukturelle Veränderungen und Vorkommen vom Chromatin in der Prophase I und während Wiederaufnahme der Meiose**

Den Eintritt in die Prophase der ersten meiotischen Teilung haben primäre Oozyten bereits pränatal vollzogen. Dabei wurden bereits die Stadien des Leptotäns, Zygotäns und des Pachytäns durchlaufen. Im Diplotän werden die homologen Chromosomen voneinander getrennt. Die meiotischen Prozesse im Oozytenchromatin werden anschließend im Diktiotän des Diplotän arretiert. In diesem Ruhestadium verharren die Oozyten über Jahre bis die Follikel an der zyklischen Ovaraktivität teilnehmen. Im Diplotänstadium liegen die Chromosomen als diffuse Bivalente im Karyoplasma vor. Im Zentrum des Nukleus befindet sich ein Kernkörperchen (Nukleolus), der zusammen mit den Chromosomen von einer intakten Kernmembran (Germinalvesikel, GV) umgeben ist. Diffuse Diplotänstadien (fibrilläres Chromatin ohne Nukleolus im Germinalvesikelstadium) findet sich bei Pferden in vitalen Follikeln, die einen Durchmesser von weniger als 20 mm aufweisen (Hinrichs und Schmidt, 2000; Hinrichs, 1997; Hinrichs und Williams, 1997). Noch vor dem Auflösen der Kernmembran (Germinal vesicle breakdown, GVBD) kommt es bei Pferden zum Kondensieren des Chromatins im Diplotänstadium (Hinrichs et al., 1993a). Dieses Stadium wird in vitalen Follikeln mit einem Durchmesser von mehr als 20 mm, sowie in atretischen Follikeln vorgefunden und repräsentiert das Stadium in dem die equine Oozyte erst die vollständige meiotische Kompetenz besitzt (Hinrichs und Schmidt, 2000; Alm und Hinrichs, 1996). Faktoren, die zur vollständigen Ausprägung der meiotischen Kompetenz in diesen frühen Kernstadien führen, sind bei Stuten bislang nicht bekannt. Mit der sich anschließenden Auflösung der Kernmembran (GVBD) kann das Chromatin wieder kurzfristig dekodensieren bevor die Chromosomen zum Meiosestadium der Diakinese vollständig kondensieren. Mit der Kondensation des Chromatins zum Diakinesestadium am Ende der Prophase I, der Auflösung der Kernmembran und des Ausbildens des Spindelapparates ist der GVBD abgeschlossen (Grondahl et al., 1995) und die Meiose gilt in den Oozyten als wieder aufgenommen (Gordon, 2003).

#### **2.4.3.2 Regulation der Wiederaufnahme der Meiose in Oozyten**

Die Wiederaufnahme der Meiose wird durch einen präovulatorischen LH-Anstieg induziert. Dabei kommt es zu einer Signaltransduktion über die LH-Rezeptoren der Kumuluszellen. Diese führt zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes in den Kumuluszellen und bewirkt in ihnen eine Protein-G-Aktivierung. Daraufhin kommt es zu einem Influx von extrazellulärem Kalzium sowie zu einem Anstieg von Inositoltriphosphat in den Kumuluszellen. Kalziumionen und Inositoltriphosphat werden direkt und indirekt an die Oozyte weitergegeben und führen dort zu Alterationen in der Proteinphosphorylierung. Die ersten Phosphorylierungen führen zu einem weiteren akzessorischen Anstieg der cAMP- und Kalziumionenkonzentration in der Oozyte selbst (Hurk R. und Zhao, 2005). Durch komplexe Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge in der Oozyte kommt es zur Aktivierung des Maturation Promoting Factor (MPF), der letztendlich als zentraler Faktor die Meiose wieder aktiviert. Neben zahlreichen anderen Kinasen wird die Aktivierung des MPFs hauptsächlich durch die Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) bestimmt, die über den gesamten Prozess der Meiose eine hohe Aktivität aufweist (Fan und Sun, 2004).

Untersuchungen an equinen Oozyten während der IVM zeigten, dass Oozyten mit expandiertem Kumulus bereits zum Zeitpunkt der Gewinnung höhere MAPK-Aktivitäten aufwiesen, währenddessen kompakte KOK erst in der IVM ähnliche Aktivitätswerte entwickeln. Obwohl die Kernentwicklung sich bei dieser Untersuchung zwischen den beiden KOK-Gruppen während der IVM nicht unterschieden, war der Phosphorylierungsgrad der MAPK dennoch mit der Aktivierung des Chromatins korreliert (Alm et al., 2004). Der MPF ist ein Serin-Threonin-Kinase-Heterodimer, der aus einer katalytischen Untereinheit (p34<sup>cdc2</sup>) und einer regulatorischen Untereinheit (Cyclin B) besteht. Sowohl die Untereinheiten des MPF als auch die MAPK sind in allen verschiedenen Kernreifungsstadien von equinen Oozyten vorhanden, jedoch könnte die Entwicklungskompetenz der Oozyten eher von einer ausreichenden und genau terminierten Aktivierung der verschiedenen Faktoren abhängen (Alm et al., 2004; Goudet et al., 1998). Die MPF-Aktivität beginnt im Verlauf der Meiose bei bovinen Oozyten kurz vor dem GVBD kontinuierlich anzusteigen, und erreicht eine Aktivitätsspitze zur ersten Metaphase (Hurk R. und Zhao, 2005). Eine Aktivitätssteigerung der Aktivatoren (AKT, MAPK) des MPFs wurde bereits auch an equinen Oozyten während der IVM beschrieben (Alm et al., 2004). Über verschiedene Zwischenschritte initiiert der MPF den GVBD, die Kondensation des Chromatins sowie die Organisation des Spindelapparates (Grondahl et al., 1995; Murray und Hunt, 1993). Bei den Kumuluszellen kommt es mit der LH-Signaltransduktion parallel zum Abbau von Zellprojektionen und Gap junctions zwischen Granulosazellen und der Oozyte (Grondahl et al., 1995; Granot und Dekel, 1994). Dadurch können maturationshemmende Faktoren der Granulosazellen (Oocyte Maturation Inhibitor, OMI) nicht mehr in die Oozyte geleitet werden (Sirard et al., 1992; Akufo et al., 1988; Larsen et al., 1987). Die Fähigkeit von Oozyten in der IVM die Meiose wieder spontan aufzunehmen (Edwards, 1965) und das Vorkommen von Meiosestadien nach dem GVBD in atretischen Follikeln (Gougeon und Testart, 1986) wird daher auch auf die fehlende Einwirkung von maturationshemmenden Faktoren der Granulosazellen und des Follikelmilieus zurückgeführt. Daraus wird ersichtlich, dass Einflussfaktoren der Kumuluszellen zumindest an der Regulation (Arretierung) der chromosomalen Reifung vor der LH-induzierten Reifung zusätzlich beteiligt sind.

#### **2.4.3.3 Strukturelle Veränderungen des Chromatins nach der Wiederaufnahme der Meiose bis zur Metaphase II**

Nachdem der GVBD erfolgte treten die Chromosomen vom Kernstadium der Diakinese in die Metaphase der ersten meiotischen Teilung (MI) ein. In der Metaphase ordnen sich die gepaarten Chromosomen in der Äquatorialebene des Spindelapparates an. Dabei werden sie durch Mikrotubuli und Mikrofilamente an ihre Position geleitet (Kim et al., 2000). Die Spindelfasern werden nur an einer Seite der Schwesterchromosomen ausgebildet. Dadurch wird es ermöglicht, dass in der sich anschließenden ersten Anaphase (AI) die kompletten homologen Chromosomen durch die Spindelfasern zu den Polen gezogen werden (Segregation). Die darauf folgende erste Telophase (TI) ist gekennzeichnet durch eine Zytoplasmateilung, die zur Ausschleusung eines homologen Chromosomensatzes mit dem ersten Polkörperchen führt. Während der Telophase I kommt an jedem Pol des Spindelapparates nur noch ein Chromosom (mit zwei Chromatiden) eines Typs zu liegen. Mit der Abschnürung des ersten Polkörperchens kommt es zur Ausschleusung eines homologen Chromosomensatzes und damit zu einer Reduktion der Chromosomen auf einen haploiden Satz. Mit der Abschnürung des ersten Polkörpers und der Metaphase II ist die erste meiotische Teilung (Reduktionsteilung) abgeschlossen. Die zweite meiotische Teilung

(Äquationsteilung) ähnelt einer Mitose, an der jedoch nur ein haploider Chromosomensatz beteiligt ist. Daher werden in der Meiose II die haploiden Chromosomen in die Chromatiden geteilt. Eine strukturell abgrenzbare zweite Prophase besteht nicht. Die Vorgänge der zweiten Meiose schließen sich daher an die erste Telophase an. Erneut ordnen sich die Chromosomen für die Metaphase II in der Äquatorialebene an und der Spindelapparat bildet sich aus. Um später die Trennung der Chromatiden zu ermöglichen, bilden sich an beiden Seiten der Schwesterchromosomen nun Spindelfasern aus.

#### **2.4.3.4 Regulation der Meiose in Oozyten bis zur Metaphase II**

In die Regulation der Reduktionsteilung ist der MPF wieder zentral eingebunden. Die Aktivität des MPFs wird durch einen Kontrollmechanismus gesteuert, der bei murinen Oozyten als „Spindel assembly checkpoint“ beschrieben ist (Brunet und Maro, 2005). Der Kontrollmechanismus verhindert durch Enzyminhibierung den proteolytische Abbau der regulatorischen Untereinheit Cyclin B des MPFs in der MI, bis sich die Chromosomen korrekt in der Metaphaseposition angeordnet haben und mit den Spindelfasern assoziiert sind. Aus dem Erhalt von Cyclin B in der Oozyte resultiert, dass die Aktivität des MPFs zur Metaphase auf einem hohen Niveau gehalten wird. Nach dem Aufbau der MI wird die Inhibierung der Cyclin-B-Proteasen aufgehoben und es kommt zur Degradation von Cyclin B. Zum Übergang in die Telophase I lässt sich daher kurzfristig eine drastische Reduktion der MPF-Aktivität beobachten (Winston, 1997). Erst die Reduktion der MPF-Aktivität ermöglicht die Abschnürung des ersten Polkörperchens (Herbert et al., 2003). Zur Metaphase II stellt sich wieder ein hohes Niveau von aktiven MPF ein. Während des darauffolgenden zweiten Arrests der Meiose wird die MPF-Aktivität durch eine Reihe von weiteren Faktoren auf hohem Niveau erhalten. Dazu gehört unter anderem die Serin-Threonin-Protein-Kinase, kodiert durch das Onkogen c-mos, die Cyclin B phosphoryliert und zudem die Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) aktiviert. Außerdem interagiert die Serin-Threonin-Protein-Kinase positiv mit dem Cytostatic Factor (CSF), so dass sie über mehrere Effekte zum Arrest beiträgt (Roy et al., 1996; Gabrielli et al., 1993). Der CSF trägt aber auch als eigenständiger weiterer Faktor seinerseits zur Stabilisierung des MPFs während des zweiten Arrestes bei (Trounson et al., 2001).

#### **2.4.3.5 Dauer und Vorkommen von Meiosestadien nach erfolgter Wiederaufnahme in Oozyten**

Die Wiederaufnahme der Meiose wird nach dem Erreichen einer hohen LH-Konzentration im Plasma über LH-Rezeptoren der Kumuluszellen im präovulatorischen Follikel initiiert (Hurk R. und Zhao, 2005). Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der Meiose bei Stuten ohne hormonelle Vorbehandlung gestalten sich aufgrund eines fehlenden Bezugspunktes schwierig. Der endogene ovulations- und maturationsauslösende Anstieg der LH-Plasmakonzentration, mit einem anhaltend hohen LH-Plasmakonzentrationsplateau, ist bei Stuten schwierig als LH-Peak und damit als Bezugspunkt zu definieren und zu terminieren. Zudem steigt die LH-Serumkonzentration post ovulationem noch an. Das Erheben einer Vielzahl von klinischen Parametern an rossigen Stuten ermöglicht ebenfalls keine zeitgenaue Vorausbestimmung der Ovulation als Bezugspunkt (Rödiger und Bostedt, 2004). Bei Studien an equinen Oozyten, die während einer natürlichen präovulatorischen Follikelentwicklung gewonnen wurden, zeigte sich, dass der Anteil Oozyten, die ihre Kernreifung bis zur MI und MII vollzogen haben parallel mit einer Größenzunahme des Follikels steigt. Zusätzlich konnte dabei retrospektiv festgestellt



werden, dass Follikel, die eine Oozyte in der MII enthalten haben, eine hohe Konzentration an Progesteron in der Follikelflüssigkeit aufwiesen (Grondahl et al., 1995). Dieses wurde als Anzeichen der bevorstehenden Ovulation gewertet, da die Luteinisierung des präovulatorischen Follikels bereits vor der Ovulation beginnt. Zur besseren Vergleichbarkeit des Follikelstatus wird in vielen Studien zur In-vivo-Reifung von equinen Follikeln und den enthaltenen Oozyten der LH-Rezeptoragonist hCG zur Simulation eines endogenen LH-Signals eingesetzt. Der Einsatz von hCG ermöglicht eine nähere Terminierung der Ovulation und bietet einen Bezugspunkt zur Bewertung von Follikel und Oozyte. Oozyten, die 24 Stunden nach einer hCG Behandlung aus einem präovulatorischen Follikel gewonnen wurden, waren in der Mehrzahl noch unreif (Carnevale und Maclellan, 2006). Bereits 30 Stunden nach der Behandlung von rossigen Stuten mit hCG ließen sich bei 78% der gewonnenen Oozyten aus präovulatorischen Follikeln ein ausgeschleustes Polkörperchen als Indikator für ihre Reife beobachten (Ginther et al., 2007a), und 36 Stunden nach einer hCG-Behandlung wurden die gewonnenen Oozyten allgemein alle als reif angesehen (Hinrichs et al., 2000). Da nach Verabreichung einer adäquaten Dosis hCG an rossige Stuten, deren dominanter Follikel einen Mindestdurchmesser von 30 mm aufweist, die meisten Ovulationen im Zeitraum von 30 bis 48 Stunden nach der hCG-Applikation beobachtet wurden (Gastal et al., 2006) wird damit ersichtlich, dass der zweite meiotische Arrest der Oozyte in der Metaphase II bereits einige Stunden vor dem Zeitpunkt der Ovulation eintritt. Ein ähnlicher zeitlicher Ablauf der Meiose läßt sich bei der In-vitro-Maturation von equinen Oozyten beobachten. Oozyten, die nach der Gewinnung von kompaktem Kumulus umgeben waren, befanden sich zu Reifungsbeginn in der Mehrzahl im Kernstadium des Diplotäns und wiesen nach 24 bzw. 32 Stunden in der IVM zu 72% bzw. 100% das Kernstadium der Metaphase II auf (Torner et al., 2007). Oozyten mit einem expandierten Kumulus erreichen die Kernreife in vitro schneller. Sie weisen jedoch bereits zu Reifungsbeginn zu einem großen Anteil eine bereits erfolgte Wiederaufnahme der Meiose auf (Torner et al., 2007). Oozyten nach GVBD, die damit eine Wiederaufnahme der Meiose erkennen ließen, fanden sich hauptsächlich in expandierten Kumulus-Oozyten-Komplexen, die wiederum mit atretischen Follikeln assoziiert waren (Hinrichs und Williams, 1997). Es wird davon ausgegangen, dass in atretischen Follikeln mit zunehmender Kumulusexpansion die Kumuluszellen ihre inhibitorische Wirkung auf die Wiederaufnahme der Meiose der Oozyte durch den Abbau von Zellkontakten vermehrt verlieren (Grondahl et al., 1995; Sirard et al., 1992; Akuko et al., 1988; Larsen et al., 1987).

#### **2.4.3.6 Postovulatorische Vollendung der Meiose**

Bei Pferden wird die Oozyte im arretierten Metaphase-II-Stadium der Meiose durch die Ovulation aus dem reifen, präovulatorischen Follikel freigesetzt. Die MII stellt das befruchtungsfähige Maturationsstadium dar, in welchem die Oozyte nach der Ovulation in den Eileiter gelangt. Der zweite meiotische Arrest wird aufrecht erhalten, bis durch die Penetration eines Spermiums die Kernreifung der Oozyte wieder aktiviert wird. Erst nach der Penetration eines Spermiums werden im Eileiter die Stadien der zweiten Ana- und Telophase durchlaufen und die Meiose durch die Ausschleusung des zweiten Polkörperchens beendet. Es schließt sich die Bildung der Vorkerne als Reaktion auf die erfolgreiche Fertilisation der neu entstandenen Zygote an.

## 2.4.4 Zytoplasmatische Reifung der Oozyte

Für eine erfolgreiche Befruchtung und die anschließende Embryonalentwicklung müssen neben der Kernreifung zahlreiche strukturelle und biochemische zytoplasmatische Reifungsprozesse während der Oozytenmaturation ablaufen. Die chromosomalen und zytoplasmatischen Reifungsprozesse beeinflussen sich gegenseitig, deshalb ist ein genaues zeitliches Zusammenspiel beider Reifungsprozesse für die Entwicklung der Eizelle notwendig (Ferreira et al., 2009). Da die Kernreifung früher als die zytoplasmatische Reifung abgeschlossen werden kann (Leibfried-Rutledge et al., 1987), deutet eine abgeschlossene Kernreifung nicht zwangsläufig auf eine vollständige Maturation und Entwicklungskompetenz hin. Ursachen für eine niedrige Entwicklungskompetenz von Oozyten mit vollendeter Kernreifung werden daher in einer unvollständigen, inkongruenten zytoplasmatischen Reifung gesehen (Ye et al., 2005; Schoevers et al., 2003; Li et al., 2001). Eine verlängerte zytoplasmatische Reifungszeit, erreicht durch eine Präkultivierung mit Meioseinhibitoren vor der IVM, erbrachte eine Erhöhung der Entwicklungskompetenz von kompakten equinen KOK (Franz et al., 2003), jedoch einen Nachteil für die Entwicklungskompetenz von expandierten equinen KOK, die bereits durch ihre Herkunft aus einem atretischen Follikel als prämaturiert gelten (Choi et al., 2006b). Spätere Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe konnten diese Ergebnisse jedoch nicht im vollem Umfang bestätigen (Choi et al., 2006a).

Während die Kernreifung hauptsächlich die chromosomale Segregation beinhaltet, handelt es sich bei der zytoplasmatischen Reifung um einen komplexen Prozess, der die Reorganisation der Zellorganellen sowie das Synthetisieren und Bevorraten von mRNAs, Proteinen und Transkriptionsfaktoren umfasst. Die Syntheseprodukte werden über den gesamten Prozess der Maturation, der Fertilisation und der frühen Embryonalentwicklung zu bestimmten Zeitpunkten benötigt, aktiviert und verbraucht (Ferreira et al., 2009). Die zytoplasmatische Reifung kann nach Ferreira et al. (2009) in drei Teilprozesse unterteilt werden, die parallel während der Maturation ablaufen. Dabei handelt es sich erstens um die Umverteilung von Zellorganellen, zweitens um die Dynamik des Zellskelettes und drittens um die molekulare Reifung.

### 2.4.4.1 Umverteilung von zytoplasmatischen Organellen während der Maturation

Die Aktivierung von metabolischen Vorgängen in der Oozyte, die die Proteinsynthese und die Proteinphosphorylierung beinhalten, ist untrennbar mit der Oozytenreifung verbunden. Diese Vorgänge sind energieabhängig. Die Mitochondrien nehmen als Hauptenergielieferanten der Oozyte deshalb eine Schlüsselrolle unter den Zellorganellen während der Eizellreifung ein (Stojkovic et al., 2001). Während der Maturation nimmt ihre Anzahl zu (Shoubridge und Wai, 2007), ihre Verteilung ändert sich zugunsten der Orte mit hohem Energieverbrauch und ihre oxidative Aktivität passt sich dem Maturationsstadium an (Torner et al., 2007; Stojkovic et al., 2001). Diese Vorgänge werden in einem folgenden Kapitel gesondert besprochen. Als Substratdepots dienen den Mitochondrien Lipidtröpfchen, mit denen sie verbunden sind. Bei einer erfolgreichen chromosomalen Reifung sind sie gehäuft polar aggregiert, während sie in unreifen Oozyten gleichförmig im Ooplasma verteilt sind (Ambruosi et al., 2009). Die Proteinsynthese ist während der Maturation an eine ausreichende Anzahl an Ribosomen gebunden. Sie werden bereits während der Wachstumsphase der Oozyte angelegt. Die Proteinsynthese in der Oozyte wird zwischen dem GVBD und der MI verdreifacht. Mit Erreichen der MII nimmt die mRNA-Translation

wieder basale Werte in der Oozyte an. Der Rückgang der Proteinsynthese zwischen der MI und der MII ist damit zu erklären, dass zur MI noch ein ausreichender Vorrat an rRNA zur Bildung von Ribosomen vorhanden ist, der bis zur MII aufgebraucht wird. Die Anzahl an Ribosomen nimmt dadurch im Verlauf der Meiose ab, denn eine Neubildung von rRNA während der Meiose ist durch den inaktiven Nukleus der Oozyte nicht mehr möglich (Tomek et al., 2002). Die Anzahl der Golgi-Apparate steigt in der Wachstumsphase in der Oozyte an (Fair et al., 1995). Mit dem Einsetzen der Maturation nimmt ihre Anzahl stetig ab und in den meisten Oozyten, welche die MII erreicht haben, sind sie nicht mehr nachweisbar (Hyttel et al., 1997; Grondahl et al., 1995). Die physiologisch aktiven Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums (GER) nehmen durch ihre Aufgaben in der Proteinsynthese, Lipidmetabolismus, Kompartimentation des Nukleus, Membransynthese und der Bevorratung von Kalziumionen entscheidend an Prozessen und Regelkreisen der Maturation teil (Ferreira et al., 2009; Hurk R. und Zhao, 2005). Während Membranen des endoplasmatischen Retikulums im GV-Stadium gleichmäßig im Ooplasma verteilt vorgefunden werden, werden zum Kernstadium der MI frequente Anordnungen von Golgi-Apparaten noch im zentralen Ooplasma gefunden, bevor sie zur MII nicht mehr beobachtet werden können (Grondahl et al., 1995). Eine unikate Besonderheit von Golgi-Komplexen in Oozyten ist das Abscheiden von speziellen kortikalen Granula, die in keinem anderem Zelltyp gefunden wurden (Wessel et al., 2001). Sie entstehen im GV-Stadium und enthalten Proteine, Strukturmoleküle und Enzyme (Gordon, 2003). Im GV-Stadium liegen die Granula zu Clustern angeordnet im Ooplasma verteilt vor und ordnen sich zur MII dicht der inneren Oberfläche des Oolemmas an (Goudet et al., 1997). Die kortikalen Granula haben die Aufgabe, eine Polyspermie bei der Fertilisation durch den Aufbau eines Polyspermieblocks zu verhindern (Sun, 2003).

#### **2.4.4.2 Dynamik der Zellskelettfilamente während der Maturation**

Die Filamente des Zytoskelettes sind dynamische, adaptive Strukturen, die maßgeblich an der Organisation der chromosomalen Segregation in der Meiose, der Zellteilung und dem intrazellulären Transport von Molekülen und Zellorganellen beteiligt sind. An den Vorgängen der Oozytenmaturation sind im Besonderen Mikrotubuli, Mikrofilamente und Aktinfilamente beteiligt (Ferreira et al., 2009). Die Mikrotubuli sind von den drei Filamenttypen am stärksten in den Prozess der Organellenbewegung und der Organisation der Kernreifung eingebunden. Beteiligt an dem Bewegungsprozess sind zudem Bewegungsproteine wie Dynein, Dynactin und Kinesin, die sich zunächst an die Zellorganellen binden. Erst durch die Bewegungsproteine wird eine Bewegung entlang der Mikrotubuli im weiteren vermittelt (Steffen et al., 1997). Dynein ist zusammen mit den Mikrotubuli an der Formierung der Spindel und der Metaphaseplatte beteiligt (Karki und Holzbaur, 1999) und trägt damit direkt zur chromosomalen Bewegungen bei. Die Mikrotubuli, wie auch die Aktinfilamente, liegen im GV-Stadium gleichmäßig im Ooplasma verteilt vor. Bereits zum GVBD nähern sich Ausläufer der Mikrotubuli dem bereits kondensierten Chromatin an. Mit der Weiterentwicklung der Meiose beginnen diese ersten Ausläufer der Mikrotubuli die Spindel zu formieren (Goudet et al., 1997) und die Chromosomen in der Äquatorialebene der Metaphaseplatte zu positionieren. Die Aktinfilamente ordnen sich in der gleichen Zeit zu einem um die Chromosomen an und bilden zum anderen eine Aktinfilamentschicht unter dem Oolemma (Kim et al., 2000; Albertini, 1992). An dieser Position nehmen sie aktiv an der Chromosomenbewegung und der Polkörperausschleusung während der Ana- und Telophase teil.

### 2.4.4.3 Molekulare Reifung

Die molekulare Maturation findet sowohl in der Phase des Oozytenwachstums als auch nach der Wiederaufnahme der Meiose statt. Sie umfasst die Transkription, Bevorratung und Umsetzung von mRNA, die von den Chromosomen exprimiert und anschließend von den Ribosomen in Proteine translatiert wird. Die entstehenden Proteine sind zum einen für die Maturation selbst unerlässlich, zum anderen werden sie in Zellprozessen nach dem Abschluss der Maturation, wie der Fertilisation, Pronukleusformation und den ersten embryonalen Teilungen benötigt (Sirard, 2001). Zu einem Großteil werden regulatorische Proteine, wie z. B. der MPF mit seinen Untereinheiten Cyclin B und p34<sup>cdc2</sup>, Proteine des c-mos pro-oncogens und die MAPK neben vielen anderen Proteinen durch Transkription und Translation bereits während der Wachstumsphase der Oozyte in der Zelle angereichert (Ferreira et al., 2009). Zum Ende der Wachstumsphase der Oozyte, parallel mit dem Erreichen der meiotischen Kompetenz, wird die Transkriptionsaktivität im Zellkern nahezu beendet (Hyttel et al., 2001). Das embryonale Genom bleibt anschließend bei Equiden inaktiv, bis im Entwicklungsstadium des Vierzellers erstmals wieder eine initiale Aktivierung stattfindet (Betteridge, 2000). Daher kommt der Bevorratung mit anschließender gezielter Aktivierung der mRNA während der Maturation eine große Bedeutung zu. Eine Neusynthese von mRNA ist im inaktiven Nukleus aufgrund der Kondensation des Chromatins während der Meiose nicht möglich. Die mRNA wird im Zytoplasma in Form von Nukleoproteinpartikeln gelagert und ist in dieser Form bis zu ihrer Aktivierung und Translation vor nukleolytischen Enzymen geschützt (Fulka, Jr. et al., 1998). Die Translation der mRNA zu Proteinen wird durch die Phosphorylierung verschiedener Faktoren initiiert. Dazu zählen der eIF-4F (Thach, 1992), das 6S-Protein der ribosomalen 40S-Untereinheit (Gavin und Schorderet-Slatkine, 1997) und die Dephosphorylierung der Poly-A-Polymerase (Colgan et al., 1996). Doch eines der wichtigsten regulatorischen Ereignisse, das zur Translation der mRNA führt, ist die zytoplasmatische Elongation des Poly-A-Restes am 3' Ende der mRNA. Die Länge des Poly-A-Restes, die entscheidend die Translationshäufigkeit der mRNA bestimmt, nimmt vom GV-Stadium bis zum Erreichen der MII ab (Shim et al., 1997).

## 2.5 Bedeutung der Mitochondrien in Oozyten während der Maturation

Die chromosomale und zytoplasmatische Reifung ist geprägt durch die Aktivierung von Regulationsfaktoren und Strukturproteinen mittels Phosphorylierung und der Umsetzung der gespeicherten mRNA zu Proteinen. Diese Prozesse sind energieabhängig und die Energie dafür stellt die Oozyte überwiegend in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereit. Das benötigte ATP wird von der Oozyte hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien generiert (Dumollard et al., 2004). Die oxidative Phosphorylierung läuft an der inneren Membran der Mitochondrien ab (Atmungskette). Die dabei freiwerdende Energie wird auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen und in Form von dem dabei entstehenden ATP gespeichert und auf diese Weise für energieabhängige biologische Stoffwechselforgänge nutzbar. Zur oxidativen Phosphorylierung wird die Energie eines Protonengradienten an der Intermediärmembran der Mitochondrien genutzt, der durch eine Kaskade an Redoxreaktionen von hochenergetischen Elektronen und Protonen erzeugt wird. Die benötigten Elektronen und Protonen entstammen den energiereichen Verbindungen NADH und FADH<sub>2</sub>. Diese Verbindungen werden wiederum in den katalytischen Prozessen des Citratzyklus, der Glykolyse und der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren erzeugt. Da die

Ausprägung der vollständigen meiotischen Kompetenz und Entwicklungskompetenz der Oozyte von einer hohen mitochondrialen ATP-Synthese abhängt, wird ersichtlich, dass die Mitochondrien eine der wichtigsten Zellorganellen im Prozess der Maturation, Fertilisation und frühen Embryonalentwicklung sind (Stojkovic et al., 2001). Um den Energiebedarf während der Maturation zu decken steigt die Anzahl der Mitochondrien während der Eizellentwicklung stark an. Sind in den Urkeimzellen nur wenige Mitochondrien zu finden, so steigt ihre Anzahl auf 200 in Oogonien, 6000 in Oozyten aus bovinen Primordialfollikeln und auf 92 500 bzw. 795 000 Mitochondrien pro maturer Eizelle beim Labornager und Menschen (Cummins, 2004; Barritt et al., 2002). Im Zuge der Oogenese und Maturation kommt es zudem zu Differenzierungsvorgängen der Mitochondrien. In humanen Primordialkeimzellen lassen sich große, runde Mitochondrien mit vesikulären Cristae nachweisen, die in dieser Form als undifferenziert gelten. Bereits in Oogonien nehmen die Mitochondrien eine ovoide Form an und die Cristae verlieren ihren vesikulären Charakter. In der reifen humanen Oozyte werden noch differenzierte und undifferenzierte Mitochondrien gefunden und erst beim Embryo, im Stadium der Morula, werden vorwiegend längliche Mitochondrien mit zahlreichen transversalen Cristae gefunden, die damit als ausdifferenziert gelten (Motta et al., 2000). Eine insuffiziente ATP-Synthese in der humanen Oozyte, die in einer Funktions-, Genom- oder Verteilungsstörung der Mitochondrien begründet liegen kann, führt zu Störungen bei der Formierung des Spindelapparates, der Trennung der Chromosomen, dem Ablauf des Zellzyklus sowie einer Entwicklungsbeeinflussung der frühen Embryonalphasen (Van, 2004). Bei humanen Oozyten wurden mitochondriale Störungen in den meisten Fällen auf Defekte der maternalen mitochondrialen DNA (mtDNA) zurückgeführt und Behandlungsstrategien von mitochondrialen Reproduktionsstörungen der Frau bereits diskutiert (St John et al., 2004). Der Gehalt an mtDNA ist in den einzelnen Mitochondrien konstant. Jedoch variiert die gemessene mtDNA-Menge in Oozyten und damit indirekt die Anzahl der Mitochondrien pro Oozyte unter physiologischen Bedingungen sehr stark. Selbst in Oozyten, die von einer Donorin stammen, variiert die Anzahl der Mitochondrien pro Oozyte stark (Barritt et al., 2002). Untersuchungen an porcinen Oozyten zeigten, dass entwicklungskompetente Eizellen mehr mtDNA enthielten als nichtkompetente und somit die Anzahl der Mitochondrien in der Oozyte sowohl die Fertilisation als auch die frühen embryonalen Entwicklungsphasen beeinflusst (El Shourbagy et al., 2006). Dass sich eine geringere mitochondriale Aktivität in Oozyten negativ auf die spätere Embryonenentwicklung *in vitro* und die Implantation auswirkt, wurde zudem durch Untersuchungen an humanen Oozyten gezeigt. Fruchtbarkeitsprobleme aufgrund von geringen mitochondrialen Aktivitäten in Oozyten wurden hauptsächlich älteren Patientinnen zugeordnet (Wilding et al., 2001).

## 2.6 Bedeutung der Kumuluszellen für die Prozesse der Eizellreifung

Ab dem Beginn der Follikulogenese, mit der Formierung der Primordialfollikel, ist die Oozyte eng von Follikelzellen umgeben. Mit der Entwicklung zum sekundären Follikel beginnt die Differenzierung der Follikelzellen zu Granulosazellen und Thekazellen. Die Oozyte ist direkt von einer Schicht hochprismatischer Follikelzellen umgeben, welche die Corona radiata darstellen. Die Zellen der Corona radiata werden durch den perivitellinen Raum von der Oozyte getrennt. In diesen Zwischenraum wurde bereits im Sekundärfollikelstadium eine 11-12µm starke feinfibrilläre, glykoproteinreiche Grenzschicht, die Zona pellucida, durch Sekretion der Oozyte eingelagert. Trotz dieser räumlichen Trennung zur Oozyte, stehen die Kumuluszellen über Zellausläufer, Desmosomen und Nexus sowie Gap junctions mit der Oozyte im engen Kontakt. Um die Corona radiata formieren sich in mehreren Schichten Granulosazellen zum Cumulus oophorus, die mit den Granulosazellen der Follikelwand die Innenauskleidung des Follikels als Grenzschicht zur Follikelflüssigkeit stellen (Liebig, 2004). Durch die enge Verbindung der Kumuluszellen über Desmosomen und Gap junctions mit der Oozyte wird ein Austausch von Stoffwechselprodukten und Signalmolekülen ermöglicht. Die Eizelle und die Kumuluszellen beeinflussen über den engen Stoffaustausch gegenseitig ihre Funktionen. Ohne diese Kommunikation ist weder eine physiologische Oogenese noch eine Follikulogenese möglich (Buccione et al., 1990). Eine wichtige Rolle beim Signal- und Stoffaustausch nehmen die oben erwähnten Gap junctions ein. Bei Ihnen handelt es sich um Tunnelproteine, die das Zytoplasma der Kumuluszellen direkt mit dem Ooplasma verbinden. Dieser transzelluläre Kanal wird aus verschiedenen Subtypen des Transmembranmoleküls Connexin gebildet (Alberts et al., 1990). Die häufigste Untereinheit stellt das Connexin 43 dar (Vozzi et al., 2001), das an den Kontaktflächen zwischen der Oozyte und den Kumuluszellen konzentriert gefunden wurde. Der Einfluss der Kumuluszellen auf die Maturationsprozesse der Eizelle, besonders auf die Kernreifung ist, bis zum Auslösen der präovulatorischen Reifung, inhibitorisch. Oozyten maturationshemmende Faktoren (OMI) werden über die oben beschriebenen innigen Zellverbindungen bis zum Empfangen des LH-Signals von den Granulosazellen in die Oozyte geleitet (Sirard et al., 1992; Akufo et al., 1988; Larsen et al., 1987). Die Eigenschaft von Oozyten in der IVM die Meiose spontan wieder aufzunehmen (Edwards, 1965) sowie das Vorkommen von fortgeschrittenen Meiosestadien in atretischen Follikeln (Gougeon und Testart, 1986) wird auf die fehlende Einwirkung von maturationshemmenden Faktoren der Granulosazellen zurückgeführt. Durch die inhibitorische Wirkung der Kumuluszellen wird daher zum einem der Pool an ruhenden Oozyten aufrecht erhalten, zum anderen wird vermutet, dass während der präovulatorischen Reifung die rasche chromosomale Reifung verzögert wird, so dass die länger andauernde zytoplasmatische Reifung in der Oozyte ablaufen kann. Eine Präkultivierung von equinen Oozyten zusammen mit Meioseinhibitoren vor der IVM und die dadurch verlängerte zytoplasmatische Reifungszeit, bewirkte eine Erhöhung der Entwicklungskompetenz von kompakten equinen KOK (Franz et al., 2003). Durch das Signal, das vom präovulatorischen LH Anstieg ausgeht, induzieren die mit LH-Rezeptoren ausgestatteten Granulosazellen des präovulatorischen Follikels die Wiederaufnahme der Meiose. Dabei kommt es zu einer Signaltransduktion über die LH-Rezeptoren der Kumuluszellen, die einen Anstieg des intrazellulären cAMP und eine Protein-G-Aktivierung in den Kumuluszellen bewirkt. Daraufhin kommt es zu einem Influx extrazellulären Kalziums und zu einem intrazellulären Anstieg von Inositoltriphosphat bei den Kumuluszellen. Die Kalziumionen und das Inositoltriphosphat werden direkt über die Gap junctions und indirekt an die Oozyte weitergegeben und führen dort zu Alterationen in der Proteinphosphorylierung

(Hurk R. und Zhao, 2005). Anschließend kommt es durch komplexe Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge in der Oozyte zur Aktivierung des Maturation Promoting Factor (MPF), der letztendlich als zentraler Faktor die Meiose wieder aktiviert. Während der präovulatorischen Follikelreifung sind die Zellverbindungen zwischen den Kumuluszellen und der Oozyte dynamischen Prozessen unterzogen. Solange die Kumuluszellen eine kompakte Anordnung um die Oozyte zeigen, gehen von ihnen eine Vielzahl an Zellprojektionen aus. Diese Projektionen durchdringen die Zona pellucida und stehen über intermediäre Verbindungen in engen Kontakt mit dem Ooplasma. Diese histologischen Verhältnisse wurden in nicht ovulatorischen Follikeln und präovulatorischen Follikeln mit einem Durchmesser von unter 37 mm beschrieben (Grondahl et al., 1995). Für die Eizelle wurde der Zeitabschnitt in der Follikelreifung in dem diese histologischen Verhältnisse vorliegen als Kumuluszellen-abhängige Phase beschrieben. Die Eizelle zeigte in dieser Phase einen Nukleus im Ruhestadium (Grondahl et al., 1995). Zum Zeitpunkt des GVBD in der Oozyte wurden histologischen Umstrukturierungen im Kumulus-Oozyten-Komplex (KOK) festgestellt. Die Kumuluszellen wiesen klare Anzeichen der Expansion auf und deren Zellausläufer hatten sich in den perivitellinen Raum zurückgezogen und damit ihren Kontakt zum Oolemma verloren. Dieser follikuläre Entwicklungsstand wurde für die Oozyte als Entkopplungsphase beschrieben. Diese Phase war außerdem durch eine Vergrößerung des perivitellinen Raumes gekennzeichnet und wurde bei präovulatorischen Follikeln gefunden, die bereits unter dem Einfluss einer ansteigenden LH-Serumkonzentrationen standen. In der sich für die Eizelle anschließenden Kumuluszellen-unabhängigen Phase zeigte der Kumuluszellverband eine komplette Expansion. Dazu hatte sich ein muköses Material zwischen den Kumuluszellen eingelagert. Diese extrazelluläre Matrix besteht aus Hyaluronsäure, Proteoglykanen und Proteinen, die von den Kumuluszellen sezerniert werden. In der Kumuluszellen-unabhängigen Phase ließ sich ein Kontakt zwischen den Zellausläufern der Kumuluszellen und der Oozyte nicht mehr feststellen. Die Oozyten in dieser Phase wiesen ein Chromatin in der MI und MII auf. Die präovulatorischen Follikel, deren Oozyten sich in der Kumuluszellen-unabhängigen Phase befanden, zeigten bereits einen Anstieg der Progesteronkonzentration in der Follikelflüssigkeit (Grondahl et al., 1995). Auch mit einer zunehmenden Atresie eines Follikels lockert sich der Zellverband der Granulosazellen auf (Kenney et al., 1979). Expandierte Kumulus-Oozyten-Komplexe aus subordinanten Follikeln werden daher auch atretischen Follikeln zugeordnet (Hinrichs und Williams, 1997). Der Zusammenhang von Follikelatresie und Kumulusexpansion konnte auch über apoptotische Vorgänge in den Granulosazellen der KOK dargestellt werden. Mit einer Kumulusexpansion war eine Zunahme der Apoptoserate in den Kumuluszellen zu verzeichnen (Pedersen et al., 2003). Mit der Kumulusexpansion im atretischen Follikel einhergehend, verlieren die Kumuluszellen zunehmend ihr Vermögen, die Oozyte in der Prophase der Meiose zu arretieren (Larsen et al., 1987). So lässt es sich erklären, dass bei Oozyten mit einem expandierten Kumulus oophorus, die nicht einem präovulatorischen Follikel entstammten, ebenfalls Kernkonfigurationen gefunden wurden, die eine Wiederaufnahme der Meiose erkennen ließen (Hinrichs und Williams, 1997).

## 2.7 Parameter zur Bestimmung der Eizellqualität

### 2.7.1 Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Oozyten

Die Oozyte nutzt, wie viele andere Zellen auch, Glucose als energiereiches Substrat. Glucose liefert über glykolytische Stoffwechselwege, die auch den Pentosephosphatweg einschließen, Energie für den Aufbau und Erhalt der Zelle. Die Umsatzrate von Glucose im Pentosephosphatstoffwechselweg wird von dem Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH), ein auf dem X-Chromosom kodiertes Enzym, reguliert. Oozyten besitzen die Besonderheit, dass die Aktivität der regulativen G-6-PDH während der Wachstumsphase in Oozyten erhöht ist und anschließend bei auswachsenden Oozyten wieder schrittweise auf ein Basisaktivitätsniveau abfällt (Ishizaki et al., 2009; Mangia und Epstein, 1975). Das Prinzip des Pentosephosphatweges besteht darin, Glukose-6-Phosphat durch Dehydrierung (Oxidation) zur Säure (Glukonsäure-6-Phosphat) und anschließender Decarboxylierung in Pentose-5-Phosphat umzuwandeln. Der dabei entstehende Wasserstoff wird auf  $\text{NADP}^+$  übertragen. Dabei entstehen formal pro Mol Glucose 12 Mol  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ , das vor allem der Steroid- und Fettsäuresynthese dient. Die in dieser Reaktion als Intermediärprodukt gebildete Ribose wird von der Zelle bei der Nukleinsäuresynthese verwendet. Die Enzyme des Pentosephosphatweges sind im Ooplasma lokalisiert. Neben der G-6-PDH, die den Eintritt des Glukose-6-Phosphates in den Pentosephosphatweg reguliert, ist noch die Glukonat-6-Dehydrogenase regulatorisch an diesem Stoffwechselweg beteiligt. Diese Enzyme werden durch hohe Kohlenhydrat- und Insulinkonzentrationen sowie einem hohen  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Verbrauch aktiviert und durch deren niedrige Konzentrationen und Verbrauch gehemmt (Kreutzg, 1994). Die Wachstumsphase der Oozyte ist geprägt von einer hohen Stoffwechselrate, die eine hohe Syntheserate von Proteinen und deren Speicherung beinhaltet (Wassermann, 1988). Dadurch bildet die Oozyte ihre vollständige meiotische Kompetenz und Entwicklungskompetenz aus. Mangia et al. (1975) stellten während der Wachstumsphase von murinen Oozyten eine Aktivitätszunahme der G-6-PDH bis zu einem Durchmesser von 85  $\mu\text{m}$  in den Oozyten fest. Oozyten, die ihr Wachstum beendet hatten, zeigten wieder einen Rückgang in ihrer G-6-PDH-Aktivität (Wassermann, 1988; Mangia und Epstein, 1975). Die Abhängigkeit der G-6-PDH-Aktivität in Oozyten von ihrem Durchmesser wurde auch bereits beim Rind und der Ziege aufgezeigt, wobei die Oozyten mit einer geringeren G-6-PDH-Aktivität einen größeren Durchmesser aufwiesen (Pujol et al., 2004; Rodriguez-Gonzalez et al., 2002; Mangia und Epstein, 1975). Wie Untersuchungen an bovinen, porcinen und caprinen Oozyten zeigten, wird mit dem Ende der Wachstumsphase, zu dem die G-6-PDH-Aktivität wieder abfällt, die Entwicklungskompetenz bei den meisten Oozyten ausgeprägt (Roca et al., 1998; Hyttel et al., 1997; Fair et al., 1995; Crozet et al., 1995). Eine G-6-PDH-Aktivität in Oozyten lässt sich durch Inkubation der KOK zusammen mit dem Vitalfarbstoff Brillant-Cresyl-Blau (BCB), auch unter Kulturbedingungen nachweisen. Bei Untersuchungen an bovinen und caprinen Oozyten wurde gezeigt, dass eine Inkubation der Oozyten zusammen mit dem BCB-Vitalfarbstoff die meiotische Kompetenz, Fertilisation und Entwicklungskompetenz der Oozyten nicht beeinflusst. (Alm et al., 2005; Rodriguez-Gonzalez et al., 2002). Somit ist es möglich, Oozyten mittels BCB-Färbung nach ihrer G-6-PDH-Aktivität zu selektieren und anschließend zur In-vitro-Produktion von Embryonen weiter zu verwenden. Obwohl der biochemische Hintergrund der BCB-Färbung noch nicht in Gänze verstanden ist, gibt es Hinweise, dass der BCB-Farbstoff als Elektronenakzeptor fungiert. Im Elektronenfluss, einer spezifischen



Redoxreaktion des Pentosephosphatweges, wird der ursprünglich blaue Brillant-Cresyl-Farbstoff farblos. Es handelt sich dabei um die Reaktion, in der Glukose-6-Phosphat oxidiert und im gleichen Reaktionsschritt NADP<sup>+</sup> reduziert wird. Dieser Reaktionsschritt befindet sich am Beginn des Pentosephosphatweges und wird durch G-6-PDH katalysiert und reguliert. (Alm et al., 2005). Bovine Oozyten, die während der BCB-Färbung keine Blaufärbung entwickeln (BCB<sup>-</sup>) haben gegenüber Oozyten die nach der Inkubation zusammen mit BCB eine blaue Farbe aufweisen (BCB<sup>+</sup>) und gegenüber der Kontrolle eine signifikant höhere spezifische G-6-PDH-Aktivität (Alm et al., 2005). Untersuchungen an Oozyten der Tierarten Rind (Alm et al., 2005), Ziege (Rodriguez-Gonzalez et al., 2002), Schwein (Ericsson et al., 1993) und Pferd (Mohammadi-Sangcheshmeh 2010; Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2009) zeigten, dass sich die BCB-Färbung dazu eignet, Oozyten zu identifizieren und zu selektieren, die bei der In-vitro-Embryonenerzeugung eine höhere Entwicklungskompetenz aufweisen. Aufgrund der bisher nur sehr ineffizienten In-vitro-Embryonenerzeugung beim Pferd (Choi et al., 2006a; Alm et al., 2001) sind umfangreiche Untersuchungen zum Einfluss der G-6-PDH-Aktivität in equinen Oozyten, bzw. ihres BCB-Färbeverhaltens auf ihre Entwicklungskompetenz in vitro noch nicht verfügbar. Erste Ergebnisse zeigten aber bereits, dass Oozytengruppen mit einem BCB positiven Färbeverhalten (BCB<sup>+</sup>, niedrige G-6-PDH-Aktivität) einen signifikant höheren Anteil Oozyten besaßen, die während der IVM das Meiosestadium der MII erreichten (58,9% vs. 28,1%). Gegenüber der Oozytengruppe mit einem negativen BCB-Färbeverhalten (BCB<sup>-</sup>, hohe G-6-PDH-Aktivität) wurde in der BCB positiven Oozytengruppe zudem ein größerer Anteil Oozyten festgestellt, die eine erste Teilung nach der Fertilisation der Oozyten im MII-Stadium mittels ICSI vollzogen (49,4% vs. 30,6%) und sich anschließend bis zur Blastozyste kultivieren ließen (9,4% vs. 1,6%) (Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2009). In diesem Experiment wurden die Oozyten aus Eierstöcken geschlachteter Stuten durch „Slicing“ und anschließendem „Scraping“ isoliert. Insgesamt zeigten mehr Oozyten ein positives BCB-Färbeverhalten (382 Oozyten BCB<sup>+</sup> vs. 295 Oozyten BCB<sup>-</sup>). Oozyten, die mit der gleichen Gewinnungsmethode bei Ziegen gewonnen wurden, zeigten mit 85,6% BCB<sup>+</sup> und 11% BCB<sup>-</sup> einen signifikant höheren Anteil BCB<sup>+</sup> Oozyten (Katska-Ksiazkiewicz et al., 2007). In molekularbiologischen Untersuchungen an bovinen Oozyten wurde dargestellt, dass die Oozyten mit einem positiven BCB-Färbeverhalten bereits zum Zeitpunkt der Gewinnung einen höheren Anteil phosphorylierter Akt- und MAP Kinase aufwiesen. In BCB positiven Oozyten wurden bei dieser Untersuchung verstärkt Gene exprimiert gefunden, die der Transkriptions- und Zellzyklusregulation sowie der Proteinbiosynthese zuzuordnen sind. Oozyten, die ein negatives BCB-Färbeverhalten aufwiesen, zeigten eine erhöhte Expression von Genen, die mit der ATP-Synthese, dem mitochondrialen Elektronentransport, der Kalziumionenbindung und der Wachstumsfaktorenaktivierung in Verbindung stehen. In dieser Studie war in Oozyten mit einem negativen BCB-Färbeverhalten (BCB<sup>-</sup>) eine höhere mitochondriale Aktivität messbar als in BCB positiven Oozyten (BCB<sup>+</sup>). Zum Zeitpunkt der Oozytengewinnung wurde in der BCB positiven Gruppe ein signifikant höherer Anteil Oozyten im Diakinese-Kernstadium beobachtet, während bei BCB negativen Oozyten gehäuft ein Diplotän mit Nukleolus vorgefunden wurde (Torner et al., 2008). Im Kontrast dazu stellten Egerszegi et al. (2010) bei ihren Untersuchungen an porcinen Oozyten signifikant höhere mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit einer niedrigen Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>+</sup>) fest. Bei den Untersuchungen wiesen die porcinen BCB<sup>+</sup> Oozyten signifikant häufiger einen Kern im Diplotän mit einer fibrillären Struktur auf.

## 2.7.2 Verteilungsmuster von Mitochondrien in Oozyten

Die Verteilung der Mitochondrien in der Oozyte unterliegt während der Eizellreifung dynamischen Veränderungen. Die Wanderung von Mitochondrien zu Orten mit hohem Energieverbrauch in den kritischen Phasen des Zellzyklus ist unabdingbar mit der Maturation der Oozyte, der Ausprägung ihrer Entwicklungskompetenz und der folgenden frühen Embryonalentwicklung verbunden (Ferreira et al., 2009; Sun et al., 2001). Untersuchungen an murinen Oozyten zeigten, dass sich die Wanderung von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli vollzieht. Die Mikrotubuli leiten die Mitochondrien während der Eizellreifung in die Kernregion und zu den Polen des Spindelapparates (Van, 1991). Mitochondrien behalten während der Wanderung in der Oozyte eine Nähe zum glatten ER bei. Dadurch können die Mitochondrien weiterhin durch Interaktion mit dem glatten ER im Kalzium- und Energiehaushalt der Eizelle an der Regulation der Maturation teilnehmen, wie es bereits an murinen, ovinen und humanen Oozyten gezeigt werden konnte (Van et al., 2002; Cran et al., 1980). Das Ausbleiben der Umverteilung der Mitochondrien während der Maturation zeigte zwar keinen Einfluss auf den ATP-Gehalt in der Oozyte, jedoch wurde ein Einfluss auf die kalziumvermittelte Regulation der Eizellaktivierung nachgewiesen (Brevini et al., 2005). An porcinen (Kikuchi et al., 2002) und ovinen Oozyten (Cran et al., 1980) wurde eine mitochondriale Nähe auch zu Lipidvesikeln in der Oozyte aufgezeigt, da die Lipidvesikel in diesen Untersuchungen ein den Mitochondrien ähnliches Verteilungsmuster aufwiesen. Lipidvesikel speichern Triglyzeride und dienen den Mitochondrien als Energiereservoir (Sturmey et al., 2006). Bei der Spezies Pferd wurde bei jüngeren Untersuchungen diese These nicht bestätigt, da nur bei 32% der Oozyten, deren Mitochondrien polar am Spindelapparat anlagen auch Lipidtröpfchen in gleicher Position gefunden wurden (Ambruosi et al., 2009). Zusammenhänge zwischen den dynamischen Veränderungen der mitochondrialen Verteilung während der Maturation und der Entwicklungskompetenz der Oozyte wurden bereits für verschiedene Spezies beschrieben. In Bezug auf die Kernreifungsstadien wurden bei den Spezies Schwein (Sun et al., 2001), Labornager (Van, 1991) und dem Menschen (Wilding et al., 2001) ähnliche Lokalisationen der Mitochondrien in den Oozyten beschrieben. Demnach sind bei Oozyten im GV-Stadium die Mitochondrien homogen in der Cortexregion verteilt, zum GVBD sind sie um den Nukleus konzentriert und nach der Formierung des Spindelapparates zur MI und MII in der Spindelregion und den Spindelpolen angeordnet. Nach erfolgter Fertilisation sind die Mitochondrien um die Vorkerne angeordnet und erneut in der Kortikalregion anzufinden. Die mitochondriale Verteilung wechselt damit von einem homogen Verteilungsmuster in den unreifen Oozyten zu einem heterogenen Verteilungsmuster in reifen Eizellen. Diese Umstrukturierungen verdeutlichen die These, dass die Mitochondrien den energieabhängigen Bereichen in der Oozyte während der Maturation folgen müssen, damit die Oozyte ihre Entwicklungskompetenz erwerben kann (Stojkovic et al., 2001). Die Untersuchungsergebnisse lassen aber auch darauf schließen, dass es speziesspezifische Unterschiede im Verteilungsmuster der Mitochondrien, im besonderen bei der Dauer der Prozesse gibt, die einen direkten Vergleich unter den Spezies erschweren. Für equine Oozyten sind nur wenige Daten zur Lokalisation der Mitochondrien im Verlauf der Maturation verfügbar. Aguilar et al. (2007) beschrieben für die Spezies Pferd jedoch ähnliche mitochondriale Verteilungsmuster während der Maturation. Zu Beginn der IVM beobachteten sie, dass die Mitochondrien zu peripheren Clustern angeordnet und homogen verteilt in der Oozyte waren. Dieses Verteilungsmuster wurde zudem besonders häufig bei Oozyten im GV-Stadium und bei kompakten KOK festgestellt. Nach Abschluss der Reifung war

insbesondere bei den kompakten KOK eine Zunahme des Anteils Oozyten zu beobachten, deren Mitochondrien polar angeordnet waren, eine Verteilung die viele expandierte KOK bereits zu Beginn der IVM aufwiesen. Eine dichte polare Anordnung der Mitochondrien wurde am meisten im Zusammenhang mit der MI und MII beobachtet und jedes zweite ausgeschleuste Polkörperchen beinhaltete dichte Anordnungen von Mitochondrien. Auch Ambruosi et al. (2009) gingen in ihren Untersuchungen zur Verteilung von Lipidtröpfchen in der equinen Oozyte von der These aus, dass bei der Spezies Pferd mit den gleichen mitochondrialen Verteilungsmustern in der Oozyte während der IVM zu rechnen ist, wie sie bei anderen Spezies gefunden wurden. Vergleichende Untersuchungen zur In-vitro- und In-vivo-Maturation, die an Schweineoozyten durchgeführt wurden, zeigten, dass unter In-vitro-Bedingungen die Umverteilung der Mitochondrien in der Oozyte nur unvollständig, verglichen mit einer In-vivo-Maturation, abläuft (Sun et al., 2001). In einer weiteren Untersuchung wurden porcinen Oozyten zudem eine geringere Entwicklungskompetenz nachgewiesen, wenn in ihnen eine kortikale Anordnung der Mitochondrien, die zu Beginn der IVM bestand während der IVM beibehalten wurde (Brevini et al., 2005). Der Einfluss der IVM und besonders der dabei verwendeten Maturationsmedien auf die zytoplasmatische Reifung und die Funktion der Mitochondrien in der Oozyte ist aber auch bei anderen Tierspezies und dem Menschen ständiger Gegenstand der Forschung (Liu et al., 2009).

Bei der Betrachtung von mitochondrialen Verteilungsmustern in Oozyten während der Maturation ist neben der Verteilung der Mitochondrien in den verschiedenen Kompartimenten und Zellorganellen auch deren Abstandsverhältnis zueinander von Interesse. Mitochondrien können sowohl fein disseminiert, als auch zu Clustern aggregiert in Oozyten vorliegen. An porcinen Oozyten, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer hCG-induzierten Follikelreifung gewonnen wurden, wurde gezeigt, dass sich Mitochondrien während der In-vivo-Maturation zu größeren Clustern zusammenfinden (Torner et al., 2004). Bei dieser Untersuchung wurden respiratorisch aktive Mitochondrien mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und deren Verteilung unter einem Epifluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Autoren beobachteten, dass vor einer Maturation die Mitochondrien homogen und feinverteilt in den Oozyten vorlagen. Zehn Stunden nach der hCG-Induktion waren die Mitochondrien ebenfalls homogen verteilt jedoch bereits aggregiert zu einem granulierten Verteilungsmuster angeordnet. Nach 22-stündiger In-vivo-Maturation zeigte sich eine heterogene, granuliert verteilte Verteilung der Mitochondrien in den Oozyten. Wurde die Oozytengewinnung 34 Stunden nach der hCG-Gabe durchgeführt, so wurde vermehrt das granuliert mitochondriale Verteilungsmuster und ein granuliertes Verteilungsmuster mit zusätzlicher Clusterbildung in heterogener Verteilung in den Oozyten vorgefunden. Die Beobachtungen der mitochondrialen Veränderungen im Zusammenhang mit einer Verlängerung der In-vivo-Reifungszeit gingen einher mit einer Zunahme des Anteils KOK mit expandierten Kumuluszellen (beginnend ab der Oozytengewinnung 22 Stunden nach einer hCG-Applikation) und einer stetigen Zunahme des Anteils Oozyten im MII-Stadium der Meiose, der nach 34 Stunden In-vivo-Maturation einen Anteil von 83% bei den Oozyten erreichte. Eine methodisch ähnliche Untersuchung der gleichen Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Dynamik der Mitochondrienaggregation in equinen Oozyten während der IVM (Torner et al., 2007). Die Oozyten wurden bei dieser Untersuchung durch ultraschallgestützte Follikelpunktion gewonnen und zunächst nach morphologischen Kriterien in zwei Kumulus-Oozyten-Komplex-Klassen (kompakt und expandiert) eingeteilt. Zum Zeitpunkt der Gewinnung sowie nach 18, 24 und 32 Stunden in der IVM wurden die Chromatinkonfiguration, der Anteil Oozyten mit mitochondrialer Aggregation und die

mitochondriale Aktivität in den Oozyten ermittelt. Bei diesen Untersuchungen konnte, wie zuvor bei den porcinen Oozyten, eine Umstrukturierung von dem feinen, über das kristalline hin zum granulierten Verteilungsmuster der Mitochondrien im Zuge der Reifungszeit beobachtet werden. Zum Zeitpunkt der Gewinnung und nach 18-stündiger In-vitro-Maturation zeigten Oozyten mit einem kompakten Kumulus überwiegend fein verteilte Mitochondrien, während expandierte KOK zu diesen Untersuchungszeitpunkten bereits in der Mehrzahl das granuliert mitochondriale Verteilungsmuster aufwiesen. Die kompakten KOK befanden sich zu diesen Untersuchungszeitpunkten zum größten Teil im Kernstatus des Diplotän, während die expandierten KOK bereits zur Hälfte das Meiosestadium der MI erreicht hatten. Bei den kompakten KOK änderte sich die Verteilung der Mitochondrien im Zuge der Maturationszeit über ein kristallines hin zu einem granulierten Verteilungsmuster. Nach einer Maturationszeit von 32 Stunden wiesen alle Oozyten dieser KOK-Gruppe das granuliert mitochondriale Verteilungsmuster auf und die gesamten Oozyten dieser Gruppe hatten zu diesem Untersuchungszeitpunkt das MII-Stadium erreicht. Die Gruppe der expandierten KOK zeigte über den gesamten Zeitverlauf der IVM einen hohen Anteil Oozyten mit granuliertem mitochondrialen Verteilungsmuster. Der größere Anteil der Oozyten dieser KOK-Gruppe erreichte gegenüber der Gruppe mit den kompakten KOK bereits nach kürzerer Zeit in der IVM das MII-Stadium. Im Zusammenhang mit einer voranschreitenden Kernreifung wurde eine Zunahme der mitochondrialen Aggregation in den Oozyten beobachtet. In 85,7% der Oozyten, die sich im Kernstadium des Diplotän befanden, war das feine Verteilungsmuster zu beobachten, während Oozyten mit der Kernkonfiguration der MII zu 90,9% eine granuliert Verteilung der Mitochondrien zeigten. Eine Clusterbildung unter den Mitochondriengranula, wie sie bei porcinen Oozyten im Zuge der In-vivo-Maturation gefunden wurde (Torner et al., 2004), konnte bei equinen Oozyten im Verlauf der In-vitro-Maturation nicht beobachtet werden.

Nach der gleichen Methode wurden bovine Oozyten im Verlauf der IVM, in Abhängigkeit von Reifungszeit, Kumulismorphologie und Kernstatus hinsichtlich des Grades der mitochondrialen Aggregation beurteilt (Otzdorff, 2006). Mit einer länger andauernden IVM stieg der Anteil Oozyten, die sich in der MII befanden an. Parallel dazu stieg auch der Anteil Oozyten mit kristallinem Verteilungsmuster der Mitochondrien aufweisen an. Zu allen untersuchten Maturationszeitpunkten und Kernreifungsstadien wiesen in dieser Untersuchung jedoch die meisten Oozyten stets eine feine Verteilung der Mitochondrien im Ooplasma auf. Oozyten, deren Mitochondrien ein granuliertes Verteilungsmuster oder eine weitere Clusterbildung unter den Mitochondriengranula zeigen, wurden bei dieser Untersuchung an bovinen Oozyten nicht beobachtet.

### **2.7.3 Aktivität von Mitochondrien in Oozyten**

Mitochondrien nehmen durch ihre Stoffwechselaktivität, durch die Beeinflussung des Kalziumsignals in Interaktion mit dem endoplasmatischen Retikulum und durch ihre Stoffwechselprodukte, wie aktive Sauerstoffradikale, intermediäre Stoffwechselprodukte und der Produktion von ATP maßgeblich an der Regulation der Eizellentwicklung teil (Dumollard et al., 2007). Der wichtigste Energieträger für die Prozesse der Oozytenmaturation ist ATP, das hauptsächlich durch die ATP-Synthese der eigenen Mitochondrien in Oozyten für die Maturation zur Verfügung gestellt wird (Brevini et al., 2005; Dumollard et al., 2004). Der Gehalt an ATP in Oozyten kann somit einen indirekten Hinweis auf die mitochondriale Aktivität in den Oozyten geben. Untersuchungen an porcinen Oozyten

zeigten, dass der Gehalt an ATP während der IVM signifikant ansteigt (Brevini et al., 2005). Mit einem höheren ATP-Gehalt in Oozyten ist eine höhere Entwicklungskompetenz von Oozyten verbunden, wie durch Untersuchungen an bovinen Oozyten gezeigt werden konnte (Nagano et al., 2006; Stojkovic et al., 2001). In Untersuchungen an Oozyten von Goldhamstern wurde nachgewiesen, dass der ATP-Gehalt einer Oozyte mehr von der Anzahl der Mitochondrien in der Oozyte abhängt, als von der individuellen Aktivität der einzelnen Mitochondrien (Lee et al., 2006). Die Anzahl der Mitochondrien in Eizellen unterliegt während der Maturation dynamischen Veränderungen, deren Verlauf sich in den Veränderungen der ATP-Gehalte in den Oozyten während der Maturation wiederfindet (Lee et al., 2006; Cummins, 2004). Deshalb hat die Anzahl der Mitochondrien in Oozyten einen direkten Einfluss auf ihre Entwicklungskompetenz (El Shourbagy et al., 2006). Um eine Aussage über die Aktivität der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) in den Mitochondrien zu ermöglichen, werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die in Abhängigkeit der oxidativen Aktivität, nur von atmungsaktiven Zellorganellen spezifisch gebunden werden. Über eine photometrische Messung der Fluoreszenzintensität der angefärbten Eizellen kann anschließend ein Rückschluss auf die mitochondriale Aktivität in den Oozyten gezogen werden. Untersuchungen von equinen Oozyten nach verschiedenen Zeitabschnitten während der IVM mit den Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker CMTM Ros Orange ließen eine Abhängigkeit der mitochondrialen Aktivität von der Dauer der IVM, der Kumulusmorphologie und dem Meiosestadium erkennen (Torner et al., 2007). Bei expandierten KOK stieg die Fluoreszenzintensität der Oozyten über den gesamten Zeitraum der IVM von 32 Stunden an, während sie bei kompakten KOK nach 24 Stunden Maturationszeit wieder abnahm. Zum Ende der IVM war die mitochondriale Aktivität (Fluoreszenzintensität) in den Oozyten aus den kompakten KOK signifikant niedriger gegenüber denen aus expandierten KOK. Ebenfalls war für die Oozyten der expandierten KOK eine Steigerung der Fluoreszenzintensität parallel zum fortschreitenden Prozess der Meiose zu beobachten. Während bei den expandierten KOK der höchste Wert für die Fluoreszenzintensität zur MII gemessen wurde, fielen bei den kompakten KOK die Werte bereits ab der AI/II signifikant unter die Fluoreszenzintensität der expandierten KOK im MII-Stadium. Eine Abhängigkeit von den erfassten Aggregationsmustern der Mitochondrien in den Oozyten und ihrer Fluoreszenzintensität wurde nicht festgestellt. Für die Oozyten, die granuliert aggregierte Mitochondrien aufwiesen, wurde jedoch eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität mit der Dauer der IVM beschrieben. Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität in bovinen Oozyten mittels MitoTracker CMTM Ros Orange während der IVM ließen ebenfalls Abhängigkeiten zur IVM-Dauer, Kumulusmorphologie und dem Meiosestadium, jedoch nicht zu den mitochondrialen Aggregationsmustern in den Oozyten erkennen (Otzdorff, 2006). In dieser Untersuchung wurden Oozyten für 0, 4, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden *in vitro* maturiert und anschließend analysiert. Die mitochondriale Aktivität in den bovinen Oozyten stieg in den ersten 12 Stunden der IVM an und fiel dann signifikant ab. In diesen 12 Stunden hatten die meisten Oozyten die MI erreicht. In Bezug auf die Meiosestadien wurden in dieser Arbeit die höchsten mitochondrialen Aktivitäten im GV-Stadium gefunden. Die gemessenen Werte für die mitochondriale Aktivität in den Oozyten fielen zu den Stadien der MI und AI signifikant ab und ließen zur MII einen nicht signifikanten Wiederanstieg erkennen. Bei einer anderen Studie zur mitochondrialen Aktivität in bovinen Oozyten während der IVM, die mit Fluoreszenzfarbstoffen (DIOC 6; Jc-1) durchgeführt wurden, wiesen dagegen unreife Oozyten niedrigere mitochondrialen Aktivitätswerte auf als reife Oozyten (Tarazona et al., 2006). Untersuchungen zur

mitochondrialen Aktivität mittels MitoTracker CMTM Ros Orange Farbstoff im Verlauf der In-vivo-Maturation von porcinen Oozyten zeigten, dass mit einer Verlängerung der Reifungszeit und dem Verlauf der meiotischen Progression die gemessene Fluoreszenzintensivität der Oozyten anstieg (Torner et al., 2004). Parallel dazu erhöhte sich mit der Dauer der In-vivo-Reifung der Anteil Oozyten mit expandierten Kumulus. Die Verteilung der Mitochondrien in den Oozyten wurde mit einer verlängerten Reifungszeit zunehmend heterogen und der Aggregationsgrad der Mitochondrien nahm zu. Die mitochondriale Aktivität ließ daher in dieser Untersuchung eine Abhängigkeit zur mitochondrialen Verteilung und Aggregation erkennen. Niedrigste Werte für die Fluoreszenzintensivität wurden in den porcinen Oozyten mit homogen und fein verteilten Mitochondrien gemessen, die gehäuft zu Beginn der in vivo Maturation zu finden waren. Höchste mitochondriale Aktivitäten wurden in Oozyten mit heterogen verteilten und in Clusterbildung befindlichen Mitochondrien gefunden, die gehäuft zum Ende der Reifungszeit auftraten. Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse der Untersuchungen von Egerszegi et al. (2010). Sie stellen während der IVM von porcinen Oozyten mit zunehmender Reifungsdauer einen signifikanten Rückgang der mitochondrialen Aktivität fest. Die höchsten mitochondrialen Aktivitäten fanden sie in unreifen Oozyten mit einem Kern im Diplotän und ein Bezug der mitochondrialen Aktivität zum Aggregationsmuster der Mitochondrien wurde nicht festgestellt. In einer humanmedizinischen Studie zur mitochondrialen Aktivität in Oozyten, wurden Oozyten von Patientinnen untersucht, denen vor der Oozytengewinnung ein GnRH-Agonist oder Antagonist verabreicht worden war. Die mitochondriale Aktivität wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker CMTM Ros Orange bestimmt. Es zeigten sich in dieser Studie keine Zusammenhänge zwischen der mitochondrialen Aktivität und dem Verteilungsmuster der Mitochondrien in den Oozyten einer Behandlungsgruppe. Ein Vergleich der Werte der mitochondrialen Aktivität zwischen den Gruppen zeigte aber, dass Oozyten mit polaren und in großen Granula angeordneten Mitochondrien eine höhere mitochondriale Aktivität besaßen, wenn sie der Gruppe von Patientinnen entstammten, die zuvor mit einem GnRH-Antagonisten behandelt wurden waren (Dell'acqua et al., 2009).

## 2.7.4 Morphologie des Cumulus oophorus

Bei equinen Kumulus-Oozyten-Komplexen werden morphologisch drei KOK-Klassen unterschieden, bei denen die Kumuluszellen kompakt, oder im expandierten Verband die Oozyte umgeben, sowie KOK, bei denen die Oozyten nur noch von den Zellen der Corona radiata umgeben sind. Der Vergleich von Oozyten mit gleicher Kumulusmorphologie aus verschiedenen Studien wird allerdings dadurch erschwert, dass eine international anerkannte, einheitliche Einteilung der Morphologieklassen nicht besteht. Zum Teil werden in den Untersuchungen Unterklassen bei den kompakten KOK gebildet und besonders die expandierten KOK werden in vielen Studien aufgrund ihres Expansionsgrades nochmals unterteilt (Hinrichs et al., 2007; Grondahl et al., 1995). Zudem muss beim Vergleich der Verteilung von KOK-Morphologieklassen zwischen verschiedenen Studien beachtet werden, dass die Gewinnungsmethoden von KOK einen signifikanten Einfluss auf die Kumulusmorphologie und damit auf die relativen Anteile der Kumulusmorphologieklassen haben. Während bei der Aspiration in vivo 31% kompakte KOK, 19,8% expandierte KOK und 19,8% KOK mit nur wenigen Zelllagen gefunden wurden, zeigte sich beim „Follicle scraping“ eine Zusammensetzung aus 50,7% kompakten, 47,2% expandierten und keinen KOK mit nur wenigen Zelllagen (Alm et al., 1997). Trotzdem wurde vielfach gezeigt, dass sich die

Beurteilung und Klassifizierung der Kumulusemorphologie dazu eignet, Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand von Oozyten und den Herkunftsfollikel zu ziehen (Bezard et al., 1997; Grondahl et al., 1995; Kenney et al., 1979). Eine Expansion der Kumuluszellen steht im Zusammenhang mit der Maturation von präovulatorischen Follikeln (Grondahl et al., 1995) sowie mit der Follikelatresie von kleinen Follikeln (Hinrichs und Williams, 1997). Zwischen den Atresiestadien des Herkunftsfollikels und Vorgängen der Apoptose in den Granulosazellen der KOK besteht eine Korrelation (Pedersen et al., 2003; Dell'acqua et al., 2003). Zusammenhänge des Expansionsgrades des Kumulus oophorus mit der Chromatinkonfiguration der Oozyte (Hinrichs, 1997) und zu Parametern der zytoplasmatischen Reifung der Oozyte konnten ebenfalls aufgezeigt werden (Torner et al., 2007; Grondahl et al., 1995). So lassen sich ultrastrukturelle Unterschiede bei der Chromatinkonfiguration des Diplotäns bei equinen Oozyten beschreiben, die einen Zusammenhang mit der Kumulusemorphologie aufweisen. Bei Oozyten aus expandierten KOK, deren Chromatin ein Diplotänstadium aufwies, lag das Chromatin zu einem hohen Anteil in kondensierter Form im Germinalvesikel vor, während das Chromatin von Oozyten mit einem kompakten Kumulus, im Diplotän häufiger feinfibrillär im Germinalvesikel verteilt vorlag (Hinrichs et al., 1993). Das Stadium des kondensierten Diplotäns gilt als die Kernkonfiguration, in dem equine Oozyten erst die vollständige meiotische Kompetenz besitzen (Hinrichs und Schmidt, 2000; Alm und Hinrichs, 1996). Bei der In-vitro-Maturation von equinen Oozyten wurde gezeigt, dass die Kumulusemorphologie von KOK zum Zeitpunkt ihrer Gewinnung bzw. zum Beginn der IVM einen Einfluss auf die chromosomale Reifung und den Verlauf der ultrastrukturellen und zytoplasmatischen Reifung während der IVM hatte (Hinrichs et al., 2005). In Systemen zur In-vitro-Produktion von Embryonen erreichten Oozyten der expandierten KOK schneller das reife Kernstadium der MII in der IVM als Oozyten der kompakten KOK (Torner et al., 2007) und wiesen nach IVF (Alm et al., 2001) oder ICSI (Mohammadi-Sangcheshmeh 2010; Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2009) eine höhere Entwicklungskompetenz auf. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine beginnende Follikelatresie auch einen positiven Einfluss (Prämaturation) auf die Entwicklungsfähigkeit von equinen Eizellen in In-vitro-Systemen haben könnte (Dell'acqua et al., 2003; Hinrichs, 1997).

## 2.8 In-vivo-Oozytengewinnung bei Stuten

Die Basis für den Erfolg und die zukünftige Weiterentwicklung der In-vitro-Reproduktionstechniken bei Pferden bildet eine zuverlässige Gewinnung und Handhabung von equinen Oozyten (Carnevale und Maclellan, 2006). Im Kontrast zu anderen Spezies könnte bei Pferden die Gewinnung von Oozyten bei lebenden Donoren in Zukunft eine größere Rolle spielen als die In-vitro-Eizellgewinnung an Ovarien, die auf Schlachthöfen entnommen wurden (Galli et al., 2007). Zur gezielten Eizellgewinnung zu bestimmten Zeitpunkten oder von ausgewählten Follikeln finden vier Methoden Anwendung: Zum einen können Ovarien zu definierten Zeitpunkten mittels Hemikastration bei Stuten entnommen und anschließend die Eizellen in vitro am isolierten Ovar gewonnen werden (Rödiger, 2000). Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, das entsprechende Ovar durch einen Flankenschnitt hervorzu lagern und die Follikel unter Sichtkontrolle zu aspirieren (Vogelsang et al., 1988). Weiterhin existiert die Variante, das Ovar zunächst über eine Hand des Untersuchers vom Rektum aus flankennah zu fixieren und mittels einer blind geführten Nadel durch die Flankenmuskulatur des Donors mit der anderen Hand des Untersuchers die

gewünschten Follikel zu aspirieren (Hinrichs et al., 1990). Als Mittel der Wahl für eine gezielte, minimal invasive, wiederholbare und komplikationsfreie Eizellgewinnung bei Stuten wird jedoch von Carnevale und Maclellan (2006), Galli et al. (2007) und Kanitz (2008a) die ultraschallgeleitete transvaginale Follikelaspiration (Ovum Pick Up) gesehen. Sie kann wöchentlich bei Stuten wiederholt werden, ist auch bei azyklischen Stuten anwendbar und wird problemlos von Stuten ohne weitere Nachbehandlungen vertragen. Negative Einflüsse auf die Fruchtbarkeit oder auf eine bestehende Trächtigkeit bestehen nicht (Kanitz et al., 2003; Mari et al., 2005; Franz et al., 2001). Allerdings bleibt die Effektivität dieser In-vivo-Eizellgewinnung, gemessen an der Oozytengewinnungsrate pro Follikel oder der Anzahl der gewonnenen Oozyten pro Ovar, hinter der In-vitro-Eizellgewinnung zurück (Alm et al., 1997).

### **2.8.1 Ultraschallgeleitete transvaginale Follikelaspiration**

Die Eizellgewinnung mittels transvaginaler ultraschallgeleiteter Follikelaspiration wird am stehenden Tier vorgenommen. Vor der Prozedur wird die Spenderstute in einen Stand verbracht, das Rektum ausgeräumt und der Perinealbereich chirurgisch gewaschen. Die Stuten werden für die Follikelaspiration durch  $\alpha$ -2-Agonisten (Xylazin, Detomidin) sediert. Eine zusätzliche Schmerzausschaltung kann mit Butorphanoltartrat vorgenommen werden. Um eine leichte Manipulation des Ovars über das Rektum zu gewährleisten wird zusätzlich eine Darmrelaxierung durch Propanthelinebromid oder N-Butylscopolaminbromid empfohlen (Carnevale und Maclellan, 2006; Kanitz et al., 2000). Zum Einsatz kommen Ultraschallsysteme mit speziellen Punktionssonden, die einen Führungskanal für eine Aspirationskanüle besitzen. Es sind aber auch Systeme erhältlich (siehe dazu auch Abb. 3 im Kapitel 3), bei denen ein stabförmiger Sondenträger spezielle Sonden (Fingertip-Sonden) starr umschließt. Ein langer Führungskanal für die Aspirationskanüle ist dabei im Sondenträger eingearbeitet, welcher direkt neben der Ultraschallsonde endet (Kanitz et al., 1995; Cook et al., 1992). Es werden Ultraschallsonden im Frequenzbereich von 5 MHz (Cook et al., 1992) bis 6,5 MHz (Becker et al., 1997) verwendet. Das Aspirationssystem wird in die craniale Vagina der vorbereiteten Stute eingeführt, das Ovar vom Rektum aus erfasst und so an die abdominale Seite der Scheidenwand herangeführt bis sich das Ovar deutlich im Ultraschallbild darstellt (siehe dazu auch Abb. 4 und 5 im Kapitel 3). Dabei ist auf einen möglichst geringen Keimeintrag in die Vagina zu achten, um die Aspirate nicht zu verunreinigen und Entzündungen vorzubeugen. Dazu sollte das Aspirationssystem zuvor feucht sterilisiert werden. Ein zusätzlicher Schutz kann durch einmal zu verwendende Latexüberzüge erreicht werden. Spezielle Ultraschallsysteme besitzen die Möglichkeit eine Punktionslinie im Ultraschallbild einzublenden, welche den Punktionsweg der Nadel im Gewebe andeutet. Das Ovar wird so positioniert, dass das Zentrum des zu punktierenden Follikels auf der Punktionslinie zu liegen kommt. Dann wird die Punktionsnadel unter ultrasonographischer Sichtkontrolle vorgeschoben, durchsticht die Scheidenwand und das Ovargewebe, bis sich die Nadelspitze im Zentrum des Follikels abbildet (siehe dazu auch Abb. 4 im Kapitel 3). Nun kann der Follikel manuell mit einer angesetzten Spritze oder automatisiert durch ein Pumpsystem aspiriert bzw. gespült werden. Nach dem Zurückziehen der Nadel kann sofort der nächste Follikel aspiriert werden. Die Länge der Nadeln beträgt 50 cm (Bruck et al., 1997) bis 60 cm (Hinrichs und Williams, 1997), wenn sie den gesamten Sondenträger ununterbrochen durchziehen oder 8 cm (Kanitz et al., 2000), wenn die Nadel auf ein bewegliches und wiederverwendbares Röhrchen im Aspirationssystem aufgesetzt wird. Der Durchmesser der verwendeten Nadeln



reicht von 12 G (Carnevale und Maclellan, 2006; Cook et al., 1992) bis 19 G (Kanitz et al., 2000), dieses entspricht einem Außendurchmesser von 2,7 bis 1,1 mm. Dabei können die Nadeln ein oder doppellumig gestaltet sein, je nachdem ob die Follikel nur aspiriert, nach dem Rein-Raus-Prinzip oder unter anhaltendem Flüssigkeitsstrom gespült werden sollen (Cook et al., 1993). Da bei Stuten die Oozyten über die Granulosazellen besonders fest und breit mit der Follikelwand verwachsen sind (Hawley et al., 1995), werden durch den mechanischen Einfluss einer Follikelspülung höhere Oozytengewinnungsraten erzielt als bei der einfachen Aspiration von Follikeln (Cook et al., 1993; Kanitz et al., 1995; Bracher et al., 1993). Als Spülflüssigkeiten werden handelsübliche Embryonenspülmedien oder PBS benutzt, die mit Heparin (10 IU/ml) zur Verhinderung einer Koagulation der Aspirate versetzt sind (Carnevale und Maclellan, 2006). Jedoch werden bei der Follikelaspiration in vivo bei unreifen Follikeln durchschnittlich nur bei 20 bis 25% der aspirierten Follikel die Eizellen gewonnen und auf diese Weise 3-5 Oozyten pro Stute und Aspirations Sitzung erzielt (Kanitz, 2008a; Becker et al., 1997; Bruck et al., 1997). Einige Autoren berichten aber auch von Oozytengewinnungsraten um 50% bei der Aspiration von unreifen Follikeln (Barbacini et al., 2010; Jacobson et al., 2010; Galli et al., 2002). Bei der Aspiration von reifen (präovulatorischen) Follikeln werden hingegen Oozytengewinnungsraten von über 70% regelmäßig erzielt (Hinrichs et al., 2000; Coutinho da Silva et al., 2002). Dazu wird der dominante Follikel ab einem Durchmesser von 30 bis 36 mm durch Applikation von hCG oder GnRH vor der Eizellgewinnung zur Reifung gebracht (Carnevale und Maclellan, 2006; Hinrichs et al., 1990; Cook et al., 1993). Während der Follikelreifung kommt es zu einer Expansion der Granulosazellen wodurch sich die Verbindung der Oozyte zur Follikelwand im Hinblick auf die bevorstehende Ovulation lockert (Grondahl et al., 1995). Die Aspiration des auf diese Weise vorbereiteten Follikels wird im zu erwartendem Ovulationszeitraum, 24 bis 36 Stunden nach der Ovulationsinduktion, durchgeführt. Die Oozytengewinnungsraten (in %) unterschieden sich nicht signifikant von einander, wenn die Aspirationen nach 24 (66%) oder 35 Stunden (73%) erfolgten, oder nach 22 (75%) und 33 Stunden (83%) nach einer hCG-Behandlung vorgenommen wurden (Hinrichs et al., 2000; Coutinho da Silva et al., 2002). Nach der Aspiration von präovulatorischen Follikeln kann mittels Ultraschall eine Gelbkörperentwicklung beobachtet werden und vier von fünf Stuten entwickeln nach sechs Tagen Plasmaprogesteronkonzentrationen, wie sie auch natürlicherweise nach einer Ovulation festgestellt werden können (Bracher et al., 1993).

Neben den oben beschriebenen Einflüssen des Entwicklungsstadiums eines Follikels stellte Kanitz (2008a) in seinen Untersuchungen den Follikeldurchmesser, die Zyklizität und das Zyklusstadium der Donoren, die Stute selbst und das Zeitintervall zwischen den Aspirations Sitzungen als Faktoren fest, die die Ergebnisse der ultraschallgeleiteten transvaginalen Eizellgewinnung bei unreifen Follikeln beeinflussen. Während bei der Aspiration von Follikeln mit einem Durchmesser von unter 10 mm Gewinnungsraten von 38,9% erreicht wurden, sank die Gewinnungsrate signifikant bei Follikeln mit einem Durchmesser von über 30 mm auf 8,3%. Bei Stuten wurden in der azyklischen Saison mit 40,4% signifikant höhere Gewinnungsraten erreicht, als bei Stuten am Zyklustag 5 mit 26,3% oder am Zyklustag 12 mit 12,4%. Auch andere Autoren bestätigen einen signifikanten Einfluss des Zyklusstadiums auf die Oozytengewinnungsraten, die während der Rosse, gegenüber dem Diöstrus, doppelt so hoch sein können (Cook et al., 1993; Franz et al., 2001). Während bei den Untersuchungen von Kanitz (2008a) bei einzelnen Stuten durchschnittlich 26,5 Follikel bei wiederholten Follikelaspirationen gespült werden konnten

und dabei durchschnittlich eine Gewinnungsrate von 26,4% realisiert wurde, konnten bei anderen Donoren durchschnittlich nur 8,6 Follikel aspiriert werden und dabei eine Gewinnungsrate von 10,2% erreicht werden. Kanitz (2008a) erreichte zudem eine signifikant niedrigere Anzahl gewonnener Oozyten pro Aspirationssitzung, wenn das Zeitintervall von einmal pro Zyklus auf durchschnittliche 7 Tage zwischen den Aspirationssitzungen verkürzt wurde. Der Grund dafür bestand in einer signifikant niedrigeren Anzahl aspirierter Follikel bei einem verkürzten Intervall zwischen den Aspirationssitzungen, während die Oozytengewinnungsraten mit 21,4% und 20,7% gleich blieben. Auch Becker et al. (1997) erkannte keinen Einfluss des Zeitintervalls zwischen den Aspirationssitzungen auf die Oozytengewinnungsrate, während Brück et al. (1997) eine Halbierung der Oozytengewinnungsrate bei einer Verkürzung des Intervalls von 23 Tagen auf 6 Tage zwischen den Aspirationssitzungen feststellte.

### **2.8.2 Differenzierung von Follikeln während der ultraschallgeleiteten Follikelaspiration**

Zusätzlich bietet sich bei der Eizellgewinnung durch eine ultraschallgeleitete Follikelaspiration die Möglichkeit einer genaueren Charakterisierung der aspirierten Follikel und deren gezielte Gewinnung an. Vor der Aspiration kann der Durchmesser der Follikel bestimmt werden, die Follikel getrennt nach Größe aspiriert und die Eizellen entsprechend bewertet werden (Kanitz et al., 2000; Kanitz, 2008a). Gastal et al. (2004) konnten über die Dokumentation des Größenwachstums von Follikeln vor der Aspiration, gezielt den dominanten Follikel einer Follikelkohorte zum Zeitpunkt der Deviation aspirieren oder aber das System dazu nutzen, Substanzen zum Zeitpunkt der Deviation gezielt in die nicht dominanten Follikel zu injizieren (Ginther et al., 2008a). Zudem kann im Ultraschallbild die Morphologie des Follikels (sphärisch oder apikal), die Morphologie der Follikelwand (Wandstärke, Echogenität, Serration der Granulosazellschicht) und die Homogenität der Follikelflüssigkeit näher dargestellt werden und die gewonnenen Daten zur Charakterisierung des Entwicklungsstatus eines Follikels vor der Aspiration genutzt werden (Ginther et al., 2007a). Durch die Darstellung des Blutflusses in der Follikelwand mittels Dopplerultrasonographie ist eine Identifikation des präovulatorischen Follikels möglich (Gastal et al., 2006) und im Zusammenhang mit einer ultraschallgeleiteten Follikelaspiration konnte der Einfluss der Vaskularisierung der Follikelwand und damit des Reifungsgrades des präovulatorischen Follikels auf die Eizelleigenschaften beschrieben werden (Ginther et al., 2007a). Parallel zur Eizellgewinnung wird die ultraschallgeleitete Follikelaspiration zur gezielten Probengewinnung von Follikelflüssigkeiten genutzt (Först, 2003). Dabei wird eine genauere Charakterisierung der aspirierten Follikel durch die Bestimmung der Steroidkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit ermöglicht (Collins et al., 1997; Gastal et al., 1999; Belin et al., 2000; Becker et al., 2006). Nach Gastal et al. (2004) können durch eine Follikelaspiration alle auf einem Ovar befindlichen Follikel beseitigt werden. Auf diese Weise konnte Gastal et al. (2004) eine neue homogene Follikelwachstumswelle für weitergehende Untersuchungen induzieren. Andere Autoren geben allerdings zu bedenken, dass sich die Follikel nach der Aspiration wieder mit Follikelflüssigkeit füllen könnten und sich nach kurzer Zeit erneut als intakte Follikel im Ultraschallbild darstellen (Duchamp et al., 1995; Kanitz et al., 2000).

## 3 Material und Methode

### 3.1 Versuchstiere und Versuchszeitraum

Für die Untersuchung wurden 14 Stuten der Rasse „Mecklenburger Warmblut“ aus dem Stutenbestand des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie in Dummerstorf (FBN-Dummerstorf) verwendet. Die Stuten waren vor, im und nach dem Versuchszeitraum klinisch gesund, besaßen ein Körpergewicht von 550 bis 650 Kg und waren zwischen 5 und 20 Jahre alt. In dem Versuchszeitraum wurden die Stuten auf der Weide gehalten, im April und September wurden sie zusätzlich nachts in Pferdeboxen des Pferdestalls des FBN-Dummerstorf aufgestellt und mit Heu und Hafer zugefüttert. Mehrmals in der Woche leisteten die Stuten im Reitbetrieb oder vor der Kutsche mittlere Arbeit. Vor Beginn der Eizellgewinnung wurde bei den Stuten mindestens eine Rosse festgestellt und der physiologische Verlauf der Rosse, Ovulationszeitraum sowie die klinische Geschlechtsgesundheit ultrasonographisch festgestellt. Der tierexperimentelle Teil der Untersuchungen erstreckte sich über den Zeitraum von April bis September 2007. Die Gewinnung von KOK mittels ultraschallgeleiteter transvaginaler Follikelaspiration wurde bei der zuständigen Behörde des Landkreises Doberan (Mecklenburg/Vorpommern) in Form einer Anzeige nach §6 Abs.1 Satz2 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes angemeldet.

### 3.2 Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe

#### 3.2.1 Versuchsaufbau zur Oozytengewinnung und Follikelgruppeneinteilung

Die Eizellen und Follikelflüssigkeiten wurden durch wiederholte ultraschallgestützte transvaginale Follikelaspirationen gewonnen (Kanitz et al., 1995). Für die zytologischen Untersuchungen an den Eizellen war ein Probenumfang von 180 Oozyten vorgesehen. Insgesamt wurden dafür 120 Aspirationssitzungen durchgeführt. Die Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe erfolgte in zwei verschiedenen Typen von Follikelaspirationssitzungen:

- 1. Aspirationstyp:** Aspirationssitzungen, die während einer Rosse durchgeführt wurden (n=43)
- 2. Aspirationstyp:** Aspirationssitzungen, denen eine Ablation aller Follikel (>0,5 cm) vorausging und die bei den neu herangewachsenen Follikelgruppen durchgeführt wurden, noch bevor sich ein dominanter Follikel entwickelt hatte (n=77)

Die Asperate mit den darin enthaltenden KOK, die beim ersten Aspirationstyp („Rosse“) gewonnen wurden, wurden entsprechend ihrer Ursprungsfollikel in die Gruppen „präovulatorische Follikel“ und „subordinante Follikel“ unterschieden, die Asperate und Eizellen die dem zweiten Aspirationstyp entstammten der Gruppe „wachsende Follikel“ zugeordnet.

### 3.2.1.1 Versuchsablauf des ersten Aspirationstyps (während der Rosse), zur Gewinnung von KOK aus präovulatorischen Follikeln und subordinanten Follikelgruppen

Nach dem klinischen und ultraschallunterstützten Feststellen mindestens einer Rosse vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zwei Wochen nach der letzten Rosse erneut klinisch und ultrasonographisch auf Rosseanzeichen untersucht. Die Ultraschalluntersuchungen wurden mit dem Gerät SSD-500 der Firma ALOKA CO, LTD (Tokyo, Japan), ausgestattet mit einem 5 MHz Linearschallkopf (ALOKA, Modell UST-5820-5), durchgeführt. Beim Vorliegen eines Follikels mit einem Mindestdurchmesser von 36 mm sowie einer Faltenlegung des Endometriums aufgrund eines rossebedingten Endometriumödems zu einem „Wagenradmuster“ in der ultrasonographischen Querschnittsaufnahme des Uterus, wurde der Stute eine Dosis von 2500 I.E. hCG (Ovogest®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) intravenös verabreicht. Nach Ablauf von 24-26 Stunden erfolgte eine ultraschallgeleitete Follikelpunktion aller Follikel mit einem Mindestdurchmesser von 5 mm.

Die Asperate wurden entsprechend ihrer Herkunft getrennt. Das Aspirat des Follikels mit dem größten Durchmesser gelangte separiert zur Untersuchung und wurde bei der Auswertung der **präovulatorischen Follikelgruppe** zugeordnet. Beim Vorliegen von zwei gleichgroßen Follikeln wurden die Asperate beider Follikel separat aufgefangen und der Gruppe zugeordnet. Alle weiteren Follikel, die zu diesem Zeitpunkt auf den Ovarien vorhandenen waren, wurden bis zu einer Mindestgröße von 5 mm aspiriert, in Sammelproben für jedes Tier zusammengestellt und bei der Auswertung als **subordinante Follikelgruppe** zusammengefasst. Bei den verschiedenen Stuten wurde der erste Aspirationstyp während der Zuchtsaison ein bis fünf mal durchgeführt.

### 3.2.1.2 Versuchsablauf des zweiten Aspirationstyps (nach vorangegangener Follikelablation), zur Gewinnung von KOK aus wachsenden Follikelgruppen

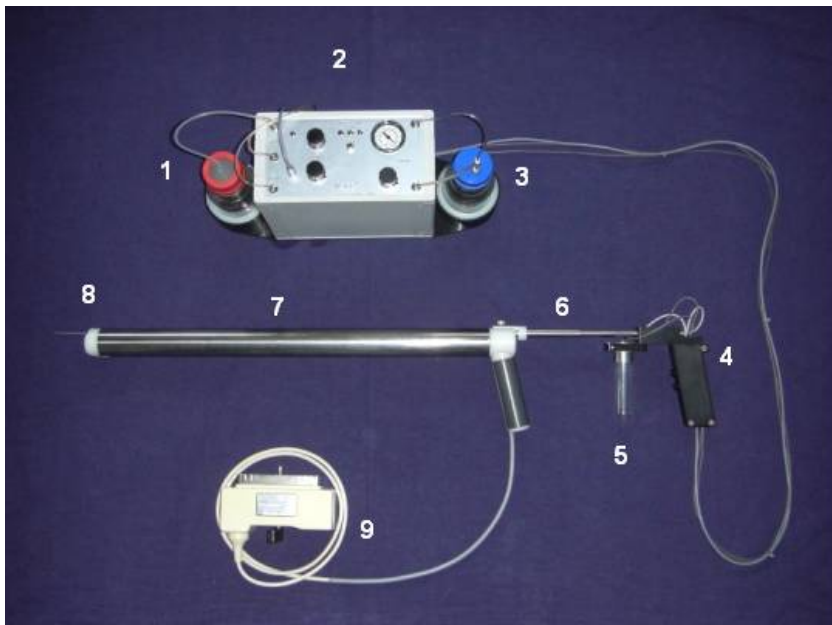
Für diesen Aspirationstyp erfolgten die Aspirationssitzungen auf eine Aspirationssitzung während der Rosse oder auf eine Aspirationssitzung des zweiten Typs. In der vorangegangenen Follikelaspersionsitzung mussten dafür alle Follikel mit einem Follikeldurchmesser von 5 mm aspiriert worden sein (=Follikelablation). Ab dem vierten Tag nach einer Follikelablation wurden die Ovarien täglich transrektal ultrasonographisch untersucht und die vorhandenen Follikel vermessen. Sobald ein Follikel einen Durchmesser von 20 mm aufwies, wurde am selben, oder nachfolgenden Tag eine erneute Follikelablation durchgeführt. Der Zeitraum zwischen zwei Follikelablationen betrug im Mittel 6,8 Tage (Intervall 5-9 Tage). Die dabei gewonnenen Asperate wurden je Tier zu Sammelproben zusammengefasst und bei der Auswertung als **wachsende Follikelgruppe** erfasst. Diesem zweiten Aspirationssitzungstyp wurden die Stuten im Versuchszeitraum zwei bis zehn mal unterzogen.

## 3.2.2 Durchführung der transvaginalen ultraschallgeleiteten Follikelaspiration

### 3.2.2.1 Technische Ausrüstung

Zur Durchführung der transvaginalen ultraschallgeleiteten Follikelaspiration wurde das Aspirationssystem der Firma VETEC GmbH (Rostock, Deutschland) eingesetzt (Abb. 3). Das System ermöglicht, zusammen mit einem Ultraschallgerät, das gezielte Aspirieren und Spülen von Follikeln. Es setzt sich aus einem Träger für den Ultraschallkopf, dem Punktionsnadelträger, einem Bedienelement mit Röhrchen zur Probensammlung sowie einer Druck- und Saugpumpe zusammen.

**Abb.3** : Abbildung des verwendeten Aspirationssystems



- 1: Vorratsgefäß mit Spülmedium
- 2: Pumpengehäuse
- 3: Unterdruckgefäß
- 4: Griffstück am Punktionsnadelträger mit Bedienelementen der Pumpe
- 5: Probenröhrchen
- 6: Punktionsnadelträger mit Aspirations- und Spülkanal
- 7: Träger
- 8: Trägerkopf mit Ultraschallsonde und vorgeschobener Punktionsnadel
- 9: Anschluss zum Ultraschallgerät

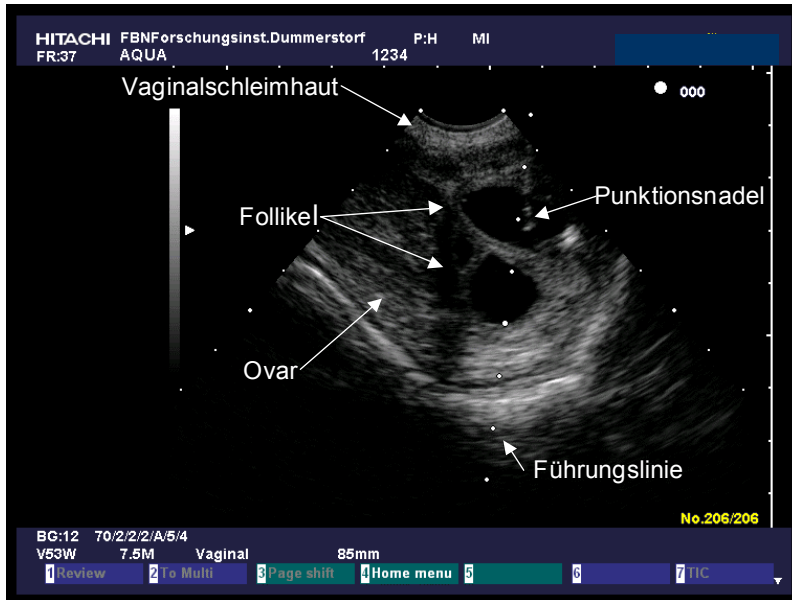
Für die KOK-Gewinnung war das System mit einem 6,5 MHz Sektorschallkopf (Fingertipsonde Modell EUP-F-331, HITACHI Medical Systems GmbH, Norderstedt, Deutschland) am Kopfteil des Trägers ausgestattet. Im Träger ist ein Kanal eingearbeitet, der neben der Ultraschallsonde endet. In diesem Kanal kann ein Punktionsnadelträger vor- und zurück bewegt werden. Der Punktionsnadelträger beinhaltet wiederum einen Aspirations- und Spülkanal. Am Ende des Punktionsnadelträgers laufen der Aspirations- und Spülkanal an einem Luerlockansatz zusammen, an dem eine Punktionsnadel (Acufirm®, E. Kratz Nadelfabrik, Dreieich, Deutschland) aufgesetzt wurde. Die Punktionsnadel hatte eine Länge von 80 mm, einen Außendurchmesser von 1,1 mm und einen Innendurchmesser von 0,8 mm. Die zum Aspirationsystem gehörende Pumpe erzeugt einen regelbaren Unter- und Überdruck von 0,2-0,3 bar und in dieser Systemzusammenstellung eine Flussrate beim Aspirations- und Spülvorgang von 30,1 bis 42,6 ml pro Minute. Bei der Verwendung dieses Systems wurden die Follikel zunächst aspiriert und im gleichen Arbeitsgang im Rein-Raus-Prinzip wiederholt gespült. Zur Errechnung und Darstellung der Ultraschallbilder wurde das Ultraschallgerät EUB-6500 (HITACHI Medical Systems GmbH, Norderstedt, Deutschland) an das Aspirationsystem gekoppelt.

### **3.2.2.2 Vorbereitung der Stuten für die Follikelaspiration**

Zur Follikelaspiration wurden die Stuten in einen Behandlungsstand für Pferde im Tiertechnikum des FBN-Dummerstorf gebracht. Die Follikelaspirationen wurden am stehenden Tier unter Sedierung vorgenommen. Zu Beginn der Aspirations-sitzung wurden die Stuten mit einer individuellen Dosis Detomidin sediert (0,6-1,2 ml Domidine®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland). Mit einem Kombinationspräparat aus Butylscopolamin und Metamizol (25 ml Buscopan comp.®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) erfolgte eine Relaxation des Rektums und eine weitere Schmerzlinderung. Durch diese Vorbehandlung wurde eine leichte Manipulation der Ovarien via Rektum möglich. Nach der Evakuierung des Rektums wurde der äußere Genitalbereich mit Seifenlauge gewaschen und mit 70% Isopropanol (Heiland GmbH, Hamburg, Deutschland) desinfiziert.

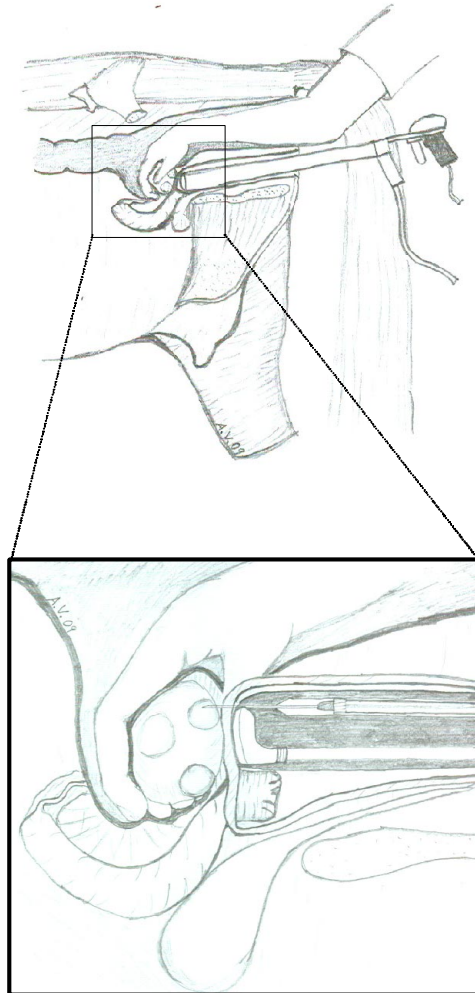
### **3.2.2.3 Durchführung der Follikelaspiration**

Der Trägerkopf des Aspirationsystems wurde vor Beginn jeder Aspirations-sitzung mit einer Ultraschallsondenschutzhülle aus Latex (Einmalmaterial, MAPA GmbH, Zeven, Deutschland) überzogen und mit einem Gleitgel (Gleitgel-Bengen, WDT eG, Hannover-Garbsen, Deutschland) benetzt. Der Träger wurde bei den, wie unter 3.2.2.2. beschrieben, vorbereiteten Stuten mit der Ultraschallsonde zunächst in die Vagina eingebracht und am kranialen Ende der Scheide in der Fornix vaginae platziert. Eine Person ergriff über das Rektum ein Ovar und positionierte es mit leichtem Druck an die abdominale Seite der Scheidenwand vor den Schallkopf (Abb.5). Das Ovar mit den darauf befindlichen Follikeln wurde damit im Ultraschallbild sichtbar und eine zweite Person konnte die Punktionsnadel zusammen mit dem Punktionsnadelträger gezielt vorschieben. Eine eingeblendete Führungslinie auf dem Bildschirm des Ultraschallgerätes zeichnet dazu die zu erwartende Einstichrichtung der Punktionsnadel als Orientierungshilfe vor. Die Nadel durchstach dabei die Scheidenwand und drang in das Ovar und in die darauf befindlichen Follikel ein. Bei dem Vorgang konnte die Position der Nadelspitze im Ultraschallbild verfolgt werden (Abb. 4). Sobald sich die Nadelspitze in der Follikelhöhle befand, wurde mit der Aspiration begonnen.

**Abb.4:** Situationsdarstellung der Follikelaspiration im Ultraschallbild

Die Follikel wurden zunächst mit einem Unterdruck von 0,3 bar aspiriert und anschließend nach dem Rein-Raus-Prinzip drei bis viermal, mit einem Überdruck von 0,3 bar im Spülkanal, gespült und aspiriert. Als Spülmedium wurde ein Embryonenspülmedium mit HEPES-Pufferung und Polyvinylalkohol (Vigro-TM Complete Flush, Bioniche Animal Health USA Inc., Pullman, WA, USA) mit einer Temperatur von 20°C verwendet. Das Spülmedium wurde zusätzlich mit 2 IE Heparin pro ml (Heparin-Natrium 25000 ratiopharm inj.5 ml, Ratiopharm GmbH, Deutschland) angereichert. Nach wiederholter Spülung und abschließender Aspiration eines Follikels wurde die Punktionsnadel wieder vollständig in den Arbeitskanal zurückgezogen und durch Bewegung des Ovars der nächste Follikel auf der Führungslinie im Ultraschallbild in Position gebracht und aspiriert. Nachdem alle Follikel mit einem Mindestdurchmesser von 5 mm auf dem einen Ovar nacheinander aspiriert und gespült waren, wurde das zweite Ovar der gleichen Prozedur unterzogen. Die Aspirate wurden von dem Aspirationssystem in 26 ml Probenröhrchen (Sarstedt, 55.471.004, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Gefüllte Röhrchen wurden während der Aspirationssitzung ausgetauscht, verschlossen und bis zum Ende der Aspirationssitzung der Stute bei Zimmertemperatur gelagert. Die gesamte Aspirationssitzung nahm ca. 30 Minuten in Anspruch.

**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Durchführung einer ultraschallgeleiteten Follikelaspiration bei Stuten



### 3.2.3 Auffinden und Klassifizieren der Kumulus-Oozyten-Komplexe

#### 3.2.3.1 Auffinden der Kumulus-Oozyten-Komplexe in den Aspiraten

Nach Abschluss der Follikelaspiration einer Stute wurden die Aspirate in das Zelllabor des Forschungsbereiches Fortpflanzungsbiologie des FBN-Dummerstorf verbracht. Die gesammelten Aspirate wurden getrennt nach ihrer Follikelherkunft (s.3.2.1.1/2.) auf KOK durchmustert. Dazu wurden die Aspirate mittels eines Analysensiebes mit einer Porengröße



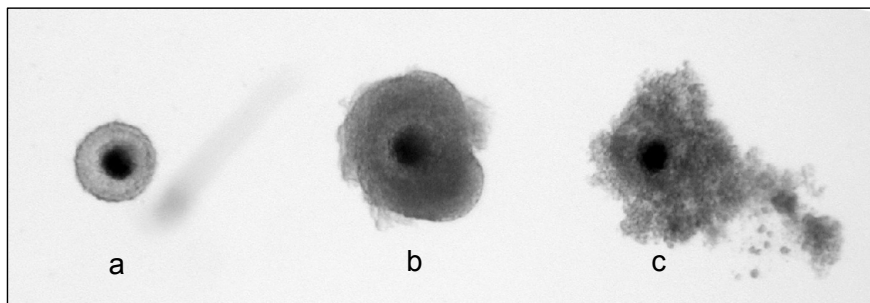
von 50 µm (Analysensieb nach DIN ISO 3310/1, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) zunächst gefiltert. Anschließend erfolgte die Spülung des Filtrückstandes aus dem Sieb mit 10-20 ml Embryonenspülmedium (Vigro-TM Complete Flush, Bioniche Animal Health USA Inc., Pullman, WA, USA) Die Spülflüssigkeit wurde in einer Petrischale aufgefangen und unter einem Stereomikroskop (SMZ 800, Nikon, Japan) bei 15-63facher Vergrößerung durchgemustert. Die aufgefundenen KOK wurden morphologisch beurteilt und nach Follikelgruppe und KOK-Morphologie getrennt in eine 4-Well-Multischale (176742, Nunc, Dänemark) in PBS- Lösung (04-479Q, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) mit 0,3% BSA (A 7888-50G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) verbracht. Bis zur weiteren Behandlung wurden die KOK in einem Brutschrank (Incubator C42, Labotec GmbH, Dillenburg, Deutschland) bei 38,5°C gesammelt und bis zu zwei Stunden gelagert. Die Anzahl und die Morphologie der KOK wurde bei diesem Arbeitsschritt in Abhängigkeit von der Follikelgruppe für jede Stute individuell erfasst.

### 3.2.3.2 Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplex-Morphologie

Die Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden beim Aufsuchen in den Aspiraten unter einem Stereomikroskop (SMZ 800, Nikon, Japan) bei 15-63facher Vergrößerung in drei Morphologieklassen (kompakter KOK; expandierter KOK; Corona radiata) eingeteilt (Torner und Alm, 1995) und nach Morphologieklassen getrennt in eine 4-Well-Multischale mit PBS-Lösung mit 0,3% BSA verbracht.

Die KOK wurden als **kompakter KOK** klassifiziert, wenn deren Oocyte von mehreren Lagen dicht gepackter Kumuluszellen umgeben war. Die kompakten KOK erschienen im nativen Mikroskopbild grau und wiesen als zusätzliches Kriterium eine glatte (der Follikelhöhle zugewandte) Oberfläche und eine entgegengesetzte unregelmäßige Oberfläche (Follikelwand zugewandte) auf (Abb. 6 b). Die KOK wurden als **expandierte KOK** klassifiziert, wenn deren Oocyte von mehreren Lagen Kumuluszellen umgeben waren, dessen Verband sich gelockert hatte. Die KOK erscheinen gegenüber den kompakten KOK heller und weisen allseits eine unregelmäßige Oberfläche auf (Abb. 6 c). Eine dritte Morphologiekategorie bildeten Oozyten, die von ein bis drei Schichten isoprismatischen Kumuluszellen umlagert waren. Sie wurden als „**Corona radiata**“ klassifiziert (Abb. 6 a).

**Abb.6:** Kumulus-Oozyten-Komplex-Morphologie bei Pferden



Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplex-Morphologie:  
a: Corona radiata;                      b: kompakter KOK;                      c: expandierter KOK

### 3.3 Steroidanalysen der Follikelflüssigkeiten

#### 3.3.1 Probennahme

Vor Beginn der Follikelaspirationen wurde der Mindestprobenumfang für eine statistisch repräsentative Stichprobe zur Bestimmung der Steroidkonzentrationen in den Follikelflüssigkeiten festgelegt. Das Risiko erster Art wurde mit 0,05 vorgegeben und der Probenumfang für einen zweiseitigen Test ausgelegt. Als Ausgangswerte für die zu erwartenden Varianzen wurden die Ergebnisse aus der Arbeit von Kenny et al. (1979) verwendet. .

Zur Beprobung gelangte jeweils der erste aspirierte Follikel einer Follikelgruppe in einer Aspirationssitzung. Das Aspirationssystem wurde zuvor mit destilliertem Wasser gespült und der Aspirationskanal mit Druckluft ausgeblasen, sowie eine neue Punktionskanüle und Probenröhrchen angebracht. Wurden die Stuten der Aspirationssitzung während der Rosse unterzogen, so wurde als erstes der präovulatorische Follikel beprobt und nach vollständiger Aspiration und Spülung des Follikels das System wie oben beschrieben gereinigt. Daraufhin wurde in der gleichen Aspirationssitzung der erste aspirierte Follikel der subordinanten Follikelgruppe beprobt. Bevor der beprobte Follikel zum ersten Mal gespült wurde, wurde das Probenröhrchen (Sarstedt, 55.471.004., Nümbrecht, Deutschland) ausgetauscht und die native Follikelflüssigkeit verschlossen bei Raumtemperatur bis zum Ende der Aspirationssitzung gelagert. Anschließend wurde ein Milliliter der nativen Follikelflüssigkeit aus dem Probenröhrchen mit einer Eppendorf-Pipette in ein 1,5 ml -Eppendorfftube (Heiland, 370-465, Hamburg) überführt. Vor jeder Probenentnahme wurde die Pipette (Assipette 1000 µl, WDT eG, Hannover-Garbsen, Deutschland) mit einer neuen 1000 µl Pipettenspitze (Heiland, 370-460, Hamburg) bestückt. Die Proben wurden entsprechend ihrer Follikelherkunft gekennzeichnet und bei -20°C gelagert.

#### 3.3.2 Methoden zur quantitativen Steroidkonzentrationsbestimmung in den Follikelflüssigkeiten

##### 3.3.2.1 Östradiol-17-β (E<sub>2</sub>)

Die Bestimmung der E<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit erfolgte in Doppelbestimmung mit Hilfe eines <sup>3</sup>H-Radioimmunoassay (Blöadow et al., 1988). Es kam ein gereinigter Kaninchen-Antikörper gegen Östradiol-6-CMO-BSA-Konjugat zum Einsatz. Zur B/F-Trennung wurde eine Dextran-Aktivkohle-Suspension eingesetzt. Die Empfindlichkeit des Assays lag bei 2 pg/ml. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag bei 8,5% und der Inter-Variationskoeffizient betrug 12%. Für den Test wurden 5 µl einer Verdünnung verwendet, die zuvor aus 5 µl nativer Follikelflüssigkeit und 195 µl PBS-Lösung erstellt wurde. Stellte sich bei der Auswertung heraus, dass die Nachweishöchstgrenze des Test von 1600 pg Östradiol-17-β überschritten wurde, wurde eine Wiederholung mit 2,5 µl Verdünnung durchgeführt und entsprechend die Konzentration errechnet.

### 3.3.2.2 Progesteron ( $P_4$ )

Die  $P_4$ -Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit wurden mittels eines direkten, kompetitiven  $^3\text{H}$ -Radioimmunoassay gemessen (Blödown et al., 1988). Der Tracer (1,2,6,7- $^3\text{H}$ -Progesteron) wurde von Amersham (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Der Antikörper wurde in Kaninchen durch Immunisierung mit einem 11-Hydroxy-Progesteron-Konjugat erzeugt. In Modifikation der Originalmethode wurde das Antiserum mittels Bindungschromatographie auf Protein A Superose gereinigt. Die Messung erfolgte in einem Flüssigszintillationsspektrometer mit integrierter RIA-Auswertung (Wallac, Finnland). Der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag bei 8,5% und der Inter-Variationskoeffizient betrug 10%. Es wurden Doppelbestimmungen mit 5  $\mu\text{l}$  nativer Follikelflüssigkeit je Probe direkt durchgeführt.

## 3.4 Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

### 3.4.1 Methode zur Bestimmung der G-6-PDH-Aktivität

Die G-6-PDH-Aktivität in den Oozyten wurde über eine Vitalfärbung mit Brillant-Cresyl-Blau (BCB) ermittelt, wie sie für die Spezies Rind bereits etabliert wurde (Alm et al., 2005). Obwohl der biochemische Hintergrund der BCB-Färbemethodik noch nicht in Gänze verstanden ist, wird angenommen, dass der BCB-Farbstoff als Elektronenakzeptor (Oxidationsmittel) fungiert. Der Farbstoff ist blau, die reduzierte Form farblos. Die Reduktion des BCB-Farbstoffes vollzieht sich im Elektronenfluss einer spezifischen Redoxreaktion in der Oozyte. Dabei handelt es sich um die von G-6-PDH katalysierte Oxidation von Glucose-6-Phosphat bei gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NADP}^+$  (Alm et al., 2005). Die Färbemethode lässt keine direkte quantitative Analyse der G-6-PDH-Aktivität zu. Beurteilt wird, ob unter den gegebenen Inkubationsbedingungen und der verwendeten BCB-Konzentration im Färbemedium die G-6-PDH-Aktivität in der Oozyte hoch genug ist, um den in die Oozyte aufgenommenen BCB-Farbstoff vollständig zu reduzieren und damit seinen Farbverlust im Ooplasma herbeizuführen. Mit dieser Färbemethode können die Oozyten aufgrund ihrer G-6-PDH-Aktivität einem G-6-PDH Status durch die BCB-Färbung zugeordnet werden. Oozyten, die während des Färbeverfahrens eine blaue Färbung annehmen, werden dem  $\text{BCB}^+$  Status zugeordnet und besitzen eine niedrige Aktivität der G-6-PDH. Oozyten, die während des Färbeverfahrens farblos bleiben, werden dem BCB Status zugeordnet und besitzen eine höhere Aktivität der G-6-PDH.

### 3.4.2 Durchführung der Brillant-Cresyl-Blau-Färbung

Nach dem Auffinden, Klassifizieren und einer bis zu zweistündigen Lagerung der KOK in PBS-Lösung mit 0,3% BSA im Brutschrank (s. 3.2.3) wurden die KOK getrennt nach ihrer Kumulusmorphologie gruppenweise in 500  $\mu\text{l}$  BCB-Färbemedium verbracht. Das Färbemedium (26  $\mu\text{M}$  BCB-Gebrauchslösung) bestand aus einem Teil BCB-Stammlösung (s. 3.8.1) und neun Teilen PBS-Lösung mit 0,3% BSA. Es wurde kurz vor der Färbung hergestellt. Die KOK wurden für 90 Minuten bei 38,5°C im Brutschrank ohne  $\text{CO}_2$ -Begasung in der BCB-Gebrauchslösung inkubiert.

### **3.4.3 Einteilung der Oozyten nach ihrem G-6-PDH Status aufgrund der BCB-Färbung**

Im direkten Anschluss an die BCB-Färbung wurden die KOK unter einem Stereomikroskop (SMZ 800, Nikon, Japan) bei 15-63facher Vergrößerung beurteilt. Der G-6-PDH Status der Oozyten wurde aufgrund der BCB-Färbung in zwei Kategorien ( $BCB^+$ ;  $BCB^-$ ) eingeteilt. Oozyten von KOK, die keinerlei Blaufärbung nach der Inkubation aufwiesen wurden dem BCB negativen Status ( $BCB^-$  Oozyten; =hohe G-6-PDH-Aktivität) zugeordnet während Oozyten von KOK, die eine geringgradige Violettärbung bis hin zur deutlichen Blaufärbung aufwiesen dem BCB positiven Status ( $BCB^+$  Oozyten; =niedrige G-6-PDH-Aktivität) zugeordnet wurden (Beispiele siehe Kapitel 4.3). Im Anschluss wurden die KOK dreimal in PBS-Lösung mit 0,3% BSA gewaschen.

## **3.5 Färbetechniken zur Bestimmung der Chromatinkonfiguration, sowie der Aktivität und Aggregation der Mitochondrien**

Zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität und Aggregation wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CMTM Ros angewendet. Parallel wurden die Oozyten zur Bestimmung der Chromatinkonfiguration mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 angefärbt und die fixierten Präparate anschließend unter einem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet (Torner et al., 2007).

### **3.5.1 Entfernung des Kumulus oophorus vor dem Färbeprozess**

Nach der BCB-Färbung und dreimaligen Waschen in PBS-Lösung mit 0,3% BSA wurden zunächst die Kumuluszellen vor der Inkubation mit den Farbstoffen von der Oozyte abgelöst. Dazu wurden die Oozyten auf einer Wärmeplatte (HT200, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) in eine auf 38,5°C vorgewärmte Trypsin-Lösung (0,5%) verbracht und die Kumuluszellen durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 100µm Eppendorfpipette (Research®, 3111 000 149, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mechanisch abgelöst. Vereinzelt noch anhaftende Kumuluszellen wurden vorsichtig mit einer dünn ausgezogenen Glaspipette abgelöst. Die Trypsin-Lösung setzte sich aus einem Teil 5%iger Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T 4174, München, Deutschland) und neun Teilen Hanks-Lösung (ohne Kalzium und Magnesium, s.3.8.4) zusammen, die kurz vor dem Ablösen der Kumuluszellen vorbereitet wurde. Anschließend wurden die Oozyten in PBS-Lösung mit 0,3% BSA auf einer Wärmeplatte dreimal gewaschen.

### **3.5.2 Bestimmung der Aktivität und Verteilung der Mitochondrien**

#### **3.5.2.1 Methode der Mitochondriefärbung**

Der verwendete Farbstoff MitoTracker CMTM Ros enthält orange fluoreszierendes Tetramethylrosamin. Es ist zellpermeabel und wird in Abhängigkeit von der oxidativen Aktivität (Membranpotential) von atlungsaktiven Zellorganellen sequestriert. MitoTracker-Farbstoffe besitzen eine thiolreaktive Chloromethyluntereinheit. Ist der Farbstoff im Mitochondrium akkumuliert, reagiert er mit Thiolgruppen an Peptiden und Proteinen zu einem fluoreszierenden Konjugat mit einem Emissionsmaximum bei 576 nm und einem Anregungsmaximum im grünem Lichtspektrum bei 554 nm (Molecular Probes Inc., 1999). Die Konjugation des Farbstoffes über Schwefelbrücken mit Proteinen und Peptiden ermöglicht eine Zellfixation mit aldehydhaltigen Fixierlösungen, da seine Auswaschung durch die Thiolbrücken im Fixierungsprozess verhindert wird.

### 3.5.2.2 Durchführung der Färbung mit MitoTracker Orange CMTM Ross

Zur Anfertigung einer 500 nM MitoTracker-Orange-CMTM-Ros-Färbelösung wurde direkt vor dem Färbeverfahren ein Eppendorftube mit 10 µl Farbstoffstammlösung (s.3.8.2) aufgetaut und 2 µl Stammlösung in 4 ml PBS- Lösung mit 0,3% BSA pipettiert und unter Lichtausschluss bei 37°C im Brutschrank (Incubator C42, Labotec GmbH, Dillenburg, Deutschland) inkubiert. Die denudierten und in PBS-Lösung gewaschenen Oozyten wurden in eine 4-Well-Multischale (176742, Nunc, Dänemark) unter Beibehaltung der KOK-Gruppen in 500 µl Färbemedium verbracht und bei 37°C unter Lichtausschluss für 30 Minuten ohne CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert.

### 3.5.2.3 Fixieren der Oozyten in Paraformaldehyd

Im Anschluss an die Inkubation mit dem MitoTracker-Orange-CMTM-Ros-Farbstoff wurden die Oozyten in 37°C warmer PBS- Lösung mit 0,3% BSA gewaschen und danach sofort in eine 4-Well-Multischale (176742, Nunc, Dänemark) mit je 500 µl vorgewärmter Fixationslösung mit 3% Paraformaldehyd (s. 3.8.5) pro Well verbracht. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte bei Dunkelheit, 37°C und für 15 Minuten.

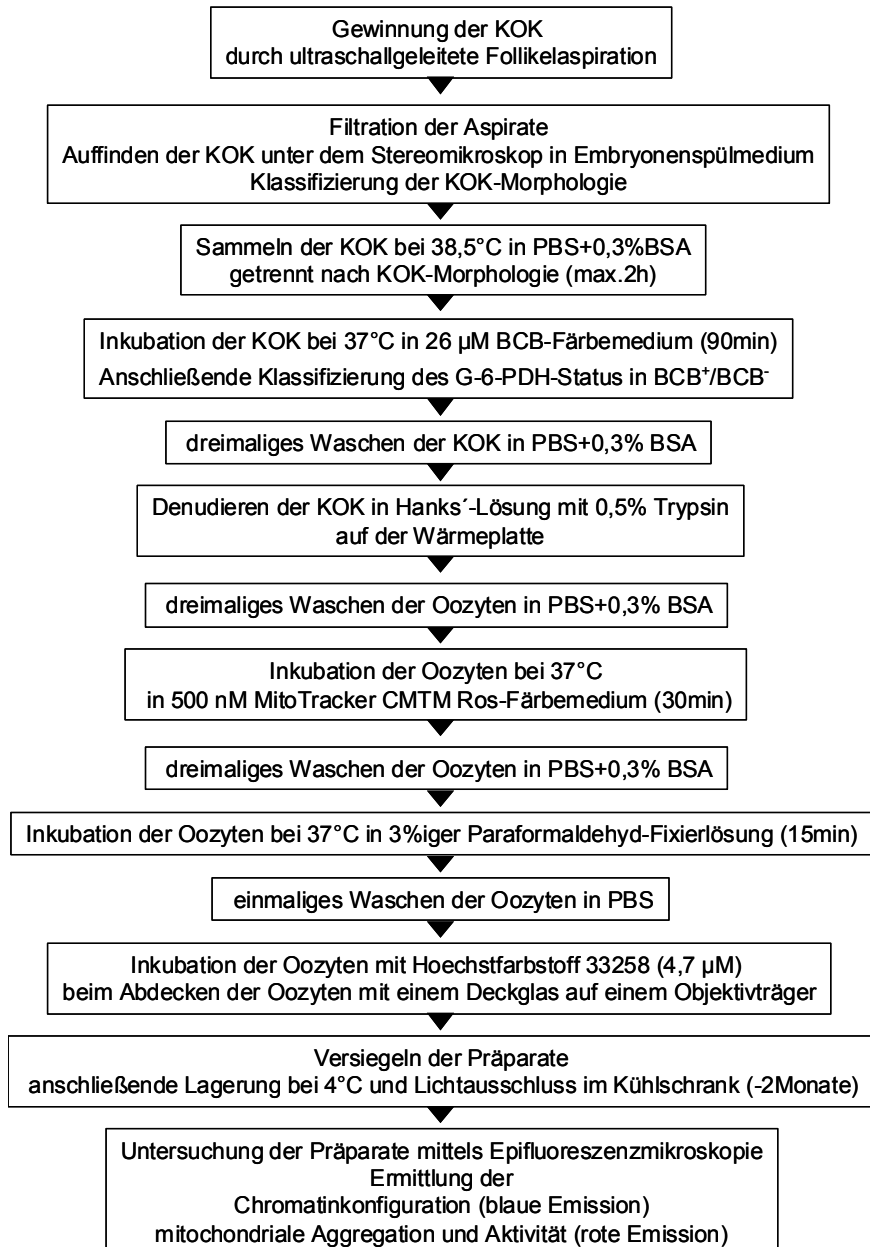
## 3.5.3 Bestimmung der Chromatinkonfiguration

### 3.5.3.1 Methode der Chromatinfärbung

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 enthält bis-Benzimid, das selektiv an doppelsträngige DNA bindet und daher auch bei hohen Konzentrationen wenig Streufluoreszenz durch die Bindung an Proteine oder RNA verursacht. Der Farbstoff bis-Benzimid zeigt bereits in Lösung eine Eigenfluoreszenz. Nach der spezifischen Bindung an Adenin-Tymin-Basenpaare in der DNA erhöht sich sein Fluoreszenzvermögen. Die Fluoreszenz von Hoechst 33258 wird mit ultravioletten Lichtspektren bei einem Anregungsmaximum von ca. 350 nm angeregt und erreicht ein Emissionsmaximum bei 461 nm (Daxhelet et al., 1989). Die Chromatinfärbung mit Hoechst 33258 und eine anschließende Ermittlung der Chromatinkonfiguration mit einem Epifluoreszenzmikroskop lässt gegenüber anderen Farbstoffen eine detailliertere Analyse des Chromatinstatus, besonders der Germinalvesikel-Stadien bei equinen Oozyten zu (Bezard et al., 2002).

### 3.5.3.2 Durchführung der Färbung mit Hoechst 33258

Nach der abgeschlossenen Fixierung wurden die Oozyten mit PBS-Lösung dreimal gewaschen und einzeln mittig auf je ein Objektivträgertglas in einem Tropfen PBS-Lösung aufpipettiert. In nächster Nähe zu dem Mediumtropfen der die Oozyte enthält wurden 6 µl einer 4,7 µM Hoechst-33258-Färbelösung (s.3.8.3), verteilt auf drei Tropfen, auf das Objektivträgertglas (Superfrost®Blau, 2101, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgebracht. Über die vier Tröpfchen wurde vorsichtig ein Abdeckglas (gemäß DIN 58884, H873.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelegt, so dass die Tropfen dabei zusammenfließen. Auf der Unterseite des Objektivträgers wurde die Position der Oozyte eingekreist und die vier Seiten des Deckglases mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Auf dem Objektivträgertglas wurden Datum, Follikelgruppe; KOK-Morphologie und G-6-PDH Status vermerkt. Die Präparate wurden in Dunkelheit bei 4°C im Kühlschrank bis zur mikroskopischen Auswertung gelagert.

**Abb. 7:** Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte der Untersuchungen

### **3.6 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Oozytenpräparate**

Zur Ermittlung der Chromatinkonfiguration sowie der mitochondrialen Aktivität und Aggregation wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Jenalumar, VEB Carl Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Die Untersuchungen erfolgten nacheinander in einem Arbeitsgang am aufgelegten Präparat. Vor den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die fixierten Präparate bei 4°C in Dunkelheit für maximal zwei Monate gesammelt und gelagert. Bei den verschiedenen Terminen, zu denen die Oozyten mikroskopisch untersucht wurden, wurden die Grundeinstellungen am Mikroskop und am photometrischen System nicht verändert. Einflüsse durch die Lagerung und Beschaffenheit der Präparate wurden bereits in Vorversuchen ausgeschlossen (Torner et al., 2007; Torner et al., 2004).

#### **3.6.1 Methode der Fluoreszenzmikroskopie**

Das Grundprinzip der Epifluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass sich Fluoreszenzfarbstoffe bei einer bestimmten Wellenlänge anregen lassen, Licht einer dazu differentiellen Wellenlänge zu emittieren. Aufgrund der Stokesverschiebung kommt es bei der Anregung von fluoreszierenden Stoffen zu einer Wellenlängenschiebung des emittierten Lichtes in den längerwelligen Bereich, so dass sich im selben Strahlengang Anregungs- und Emissionslicht wieder optisch trennen lassen. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberleuchte, die ein breites Lichtspektrum emittiert. Durch spezifische Anregungsfilter wird der zur Anregung dienende Lichtstrahl auf einen Wellenlängenbereich separiert und durch das Objektiv auf das Präparat geleitet. Das emittierte Licht wird durch das Objektiv gesammelt und durch einen Sperrfilter auf das emittierte Wellenlängenspektrum reduziert bevor es zum Okular oder zu einem Photonendetektor gelangt.

#### **3.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Ermittlung der Chromatinkonfiguration und Einteilung der Oozyten in Chromatinkonfigurationsgruppen**

##### **3.6.2.1 Grundeinstellung am Fluoreszenzmikroskop**

Zur Bestimmung der Chromatinkonfiguration wurde der für die Oozytenpräparation verwendete Farbstoff Hoechst 33258 (s. 3.5.2) mit einem ultraviolett Lichtspektrum angeregt, das über einen Erregerfilter und nachgeschalteten dichromatischen Teilerspiegel (410 nm) separiert wurde. Der Farbstoff fluoresziert blau, mit einem Emissionsmaximum bei 461 nm. Zur Beurteilung wurde das Emissionslicht zuerst durch den dichromatischen Teilerspiegel von dem Anregungslichtstrahl separiert und durch einen Langpasssperrfilter Wellenlängen ab 410 nm zur Bildgebung zugelassen. Das Chromatin wurde bei einer 500fachen Vergrößerung beurteilt.

##### **3.6.2.2 Einordnung der Oozyten zu einer Chromatingruppe**

Die Klassifikation der Chromatinkonfiguration in den Oozyten erfolgte in klassisches, differenziertes oder diffuses Diplotän, fibrilläres oder kondensiertes Chromatin im Germinalvesikelstadium (Diplotän), Diakinese, Metaphase I, Anaphase I, Telophase I, Metaphase II, Metaphase II mit Polkörperchen sowie in Pyknose des Nukleus und degeneriertes Chromatin, analog zu Torner et al. (2007) und Hinrichs et al. (1993). Im Kapitel 4.4 sind einige Chromatinkonfigurationen beispielhaft abgebildet. Zur statistischen Auswertung wurden die einzelnen Klassen der Chromatinkonfiguration in den Oozyten zu sieben Gruppen zusammengefasst, die in der Tabelle 1 detailliert dargestellt sind.

**Tab.1:** Gruppeneinteilung der Chromatinkonfiguration

Name der Gruppe	Kurzbezeichnung	Kriterien für die Gruppenzuordnung
Diffuses Diplotän	DD	klassisches und differenziertes sowie diffuses Diplotän im Germinalvesikel
Fibrilläres Diplotän	FD	fibrilläres Diplotän, Fibrilläres Chromatin im Germinalvesikel
Kondensiertes Diplotän	KD	kompaktes, kondensiertes Chromatin im Germinalvesikel
Metaphase I	MI	Diakinese, Metaphase I, Anaphase I
Metaphase II	MII	Telophase I, Metaphase II, Metaphase II mit Polkörperchen
Pyknotisch	Pykn.	Pyknose, pyknotisches oder degeneriertes Chromatin
Ohne	Ohne	kein Zellkern vorhanden

### 3.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Ermittlung der mitochondrialen Aggregation

#### 3.6.3.1 Grundeinstellung am Fluoreszenzmikroskop

Zur Bestimmung der mitochondrialen Aggregation und Aktivität wurde über einen Erregungsfilter und einen dichromatischen Teilerspiegel (540 nm) eine reine Grün-Anregung erzeugt und auf das Oozytenpräparat projiziert. Das Emissionslicht wurde durch den dichromatischen Teilerspiegel bei 540 nm ebenfalls separiert und mittels nachgeschalteten Langpasssperrfilter mit einer Kante bei 570 nm nur das rote Emissionsspektrum zur Messung und Beurteilung der mitochondrialen Aktivität und Aggregation zugelassen.

Die Untersuchungen zu den Mitochondrien in den Oozyten wurden bei einer 500fachen Vergrößerung vorgenommen. Es konnten nur fluoreszierende Mitochondrien beurteilt werden, in denen sich der MitoTracker Orange CMTM Ros Farbstoff aufgrund ihrer respiratorischen Aktivität akkumuliert hatte.

#### 3.6.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der mitochondrialen Aggregationsmuster

Die mitochondriale Aggregation in den Oozyten wurde nach Torner et al. (2007) in zwei verschiedene mitochondriale Aggregationsmuster eingeteilt (Tab. 2). Oozyten wurden dem fein granulierten Aggregationsmuster zugeordnet, wenn deren Mitochondrien feinkörnig aggregiert waren und im fluoreszenzmikroskopischen Bild kleine rotfluoreszierende Farbpunkte zeigten, die wie Staubschleier gleichmäßig im Ooplasma verteilt vorlagen. Oozyten, die dem grob granulierten mitochondrialen Aggregationsmuster zugeordnet wurden, wiesen Mitochondrien in grobkörniger Aggregation auf. Sie zeigten im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine Vielzahl an rotfluoreszierenden Aggregaten (Körnchen, Granula). Im Kapitel 4. 6 sind repräsentative Darstellungen der zwei Aggregationsmuster enthalten.



**Tab. 2:** Einteilung der mitochondrialen Aggregation in den Oozyten

<b>Aggregationsmuster</b>	<b>Merkmale im fluoreszenzmikroskopischen Bild</b>
<b>fein granuliert</b>	Kleine fluoreszierende Farbpunkte erscheinen wie ein Staubschleier gleichmäßig über die Oozyte verteilt
<b>grob granuliert, aggregiert</b>	Im Ooplasma finden sich zahlreiche, körnig erscheinende fluoreszierende Aggregate (Granula) mit unregelmäßigen Formen

### 3.6.4 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der mitochondrialen Aktivität

Zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität in den Oozyten wurden die Grundeinstellungen am Epifluoreszenzmikroskop von der vorhergehenden Ermittlung der mitochondrialen Aggregation unverändert übernommen (s. 3.5.3.4)

Zur Messung der mitochondrialen Aktivität (in  $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ ) wurde das photometrische System P 100 (Nikon) eingesetzt und an das Epifluoreszenzmikroskop Jenalumar adaptiert. Die Oozyte wurde in die Mitte des Sichtfeldes bei 500facher Vergrößerung verbracht und die Messfläche der Größe der Oozyte durch Verschatten der Randbereiche angeglichen. Die Messung erfolgte bei einer Verstärkung von  $500\mu\text{V}$  bei 4-4,3 A. Die gemessene Intensität des photometrisch detektierten Signals wurde sofort in Mikroampere ( $\mu\text{A}$ ) pro Oozyte am Photomultiplier (P 100 Multiplier, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) abgelesen werden. Vor jeder Messung wurde die Hintergrundfluoreszenz bestimmt und ihr Wert (in  $\mu\text{A}$ ) von dem Ergebnis der darauffolgenden Messung der mitochondrialen Aktivität der Oozyte abgezogen.

### 3.7 Statistische Auswertung

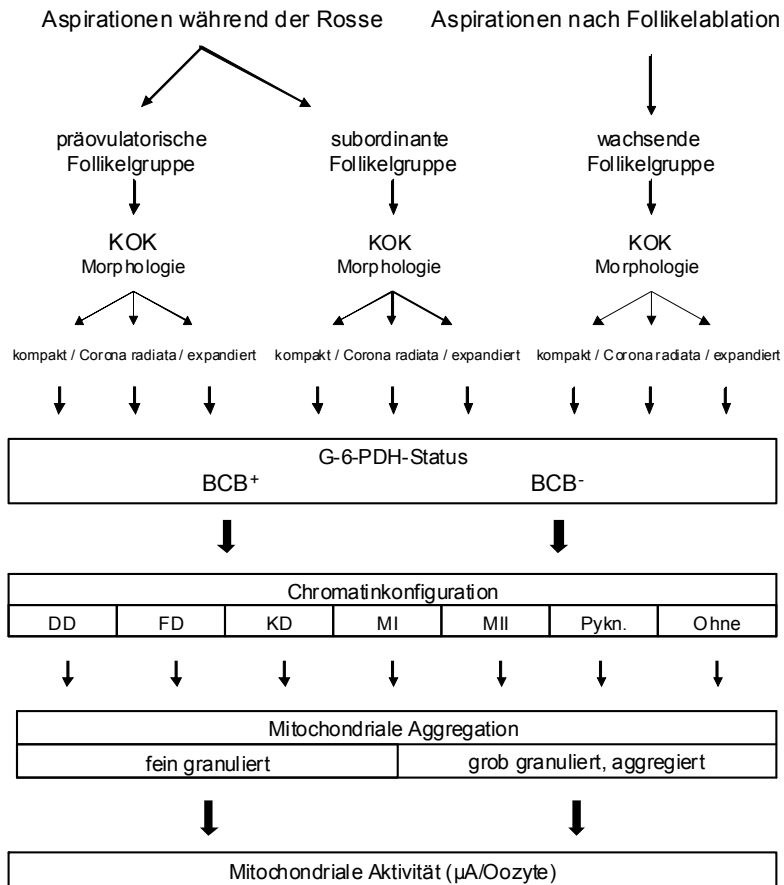
Die statistische Auswertung wurde mit SAS für Windows, Release 9.2 (SAS Institute Inc.2008, 2008) durchgeführt. Statistische Masszahlen und prozentuale Häufigkeiten wurden mit Hilfe der Prozeduren MEANS und FREQ aus SAS/BASE berechnet. Die statistischen Analysen sind von der Verteilung der untersuchten Parameter abhängig. Das war bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Kontinuierliche Parameter (mitochondriale Aktivität, Oozytengewinnungsrate, Steroidgehalte in den Follikelflüssigkeiten) wurden einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen, wobei die GLM-Prozedur aus SAS/STAT zur Anwendung kam. Das Varianzanalysemodell enthielt die Follikelpopulation, KOK-Morphologie, G-6-PDH-Aktivität als  $\text{BCB}^+/\text{BCB}^-$ , Kernkonfiguration und das mitochondriale Aggregationsmuster als Einflussfaktoren sowie deren Wechselwirkungen. Zusätzlich wurden die LS-Mittelwerte und deren Standardfehler für alle Faktoren im Modell geschätzt und paarweise mittels Tukey-Kramer-Test verglichen.

Binomialverteilte Merkmale und Zählmerkmale wurden mit der GENMOD-Prozedur aus SAS/STAT auf der Basis eines verallgemeinerten linearen Modells analysiert. Für die binomial verteilten Parameter (KOK-Morphologie, G-6-PDH-Aktivität als  $\text{BCB}^+/\text{BCB}^-$ , Chromatinkonfiguration, mitochondriale Aggregation) wurde ein logistisches Modell mit den Einflussfaktoren Follikelpopulation, KOK-Morphologie und G-6-PDH-Aktivität als  $\text{BCB}^+/\text{BCB}^-$  verwendet. Zusätzlich wurden die LS-Mittelwerte und deren Standardfehler für alle Faktoren im Modell geschätzt und paarweise mit einem Wald Chi-Quadrat-Test auf statistische Unterschiede geprüft. Für die Zählparameter (Follikelanzahl, Oozytenanzahl) wurde ein Poisson-Modell mit der Follikelpopulation als Einflussfaktor verwendet. Außerdem wurden

die LS-Mittelwerte und deren Standardfehler für alle Faktoren im Modell geschätzt und paarweise mit einem Wald Chi-Quadrat-Test auf statistische Unterschiede geprüft. Die Ergebnisse werden als LS-Mittelwerte (LSM) und deren Standardfehler ( $\pm$ SE) ausgewiesen und dargestellt. Unterschiede mit einem p-Wert, der kleiner als das Risiko erster Art von 0,05 ist, werden als statistisch signifikant angenommen. Statistisch signifikante Unterschiede werden in Tabellen und Abbildungen durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Statistische Tendenzen werden bis zu einem p-Wert  $p \leq 0,12$  durch unterschiedliche Buchstaben in den Abbildungen ausgewiesen.

**Abb. 8:** Übersicht zur Bildung der Untergruppen



### 3.8 Anfertigen der Stammlösungen

#### 3.8.1 Brillant-Cresyl-Blau (260µM)

1,0 mg	Brillant-Cresyl-Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, B-5388, München, Deutschland
10 ml	PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 04-479Q, München, Deutschland
0,04 g	BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A-7888-50G, Deutschland

Die Stammlösung wurde unter Licht- und Luftausschluss bei 4°C im Kühlschrank über den Versuchszeitraum gelagert.

#### 3.8.2 MitoTracker Orange CMTM Ros (1 µM)

50 µg	MitoTracker CMTM Ros	Molecular Probes, M-7510, Eugene, OR, USA
117 µl	DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-2650, München, Deutschland

Portionen von je 10µl Stammlösung wurden in Eppendorftubes bei -20°C unter Lichtabschluss tiefgekühlt über den Versuchszeitraum gelagert.

#### 3.8.3 Hoechst 33258 (4,7 µM)

5 µg	Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, B-1155, München, Deutschland
1,5 ml	Glycerol	Serva Feinbiochemica GmbH, 23175, Heidelberg, Deutschland
0,5 ml	PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 04-479Q, München, Deutschland

Lagerung der Lösung über den Versuchszeitraum bei 4°C und Lichtausschluss.

#### 3.8.4 Hanks-Lösung

1000 ml	Aqua dest.	
9,5 g	Hanks`balanced salts	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, H-4891, München, Deutschland
0,35 g	NaHCO <sub>3</sub>	Riedel-DeHaen AG, 31437, Seeize-Hannover, Deutschland
0,06 g	Penicillin-G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-3032, München, Deutschland

Die Lösung wurde sterilfiltriert (Sterilfilter, TPP, 99500, Schweiz) und bei 4°C gelagert.

#### 3.8.5 Paraformaldehyd-Fixierlösung (3%)

Zur Herstellung einer 3%igen Paraformaldehydfixierlösung wurden 0,3 g Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-6148, München, Deutschland) in 10 ml PBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 04-479Q, München, Deutschland) im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Bis zum Klären der Lösung wurde tropfenweise 10 n Natronlauge (Carl Roth GmbH, K021.1, Karlsruhe, Deutschland) der Lösung zugesetzt und anschließend ein pH-Wert von 7,4 durch hinzufügen von 1n Salzsäure (Carl Roth GmbH, K024.1, Karlsruhe, Deutschland) eingestellt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert und zum Gebrauch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kumulus-Oozyten-Komplex-Gewinnung mittels transvaginaler ultraschallgeleiteter Follikelpunktion

#### 4.1.1 Umfang der durchgeführten Follikelaspirationen

Um eine vergleichbare Anzahl von KOK von den verschiedenen Follikelgruppen für die Untersuchungen zu gewinnen, wurde eine unterschiedliche Anzahl von Follikelaspirationssitzungen und aspirierten Follikeln bei den verschiedenen Follikelgruppen realisiert (Tab. 3).

Insgesamt wurden 178 KOK durch ultraschallgeleitete Follikelaspirationen für die Untersuchungen gewonnen. Dafür wurden 120 Follikelaspirationssitzungen während der Zuchtsaison 2007 durchgeführt und dabei insgesamt 1058 Follikel aspiriert. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, dass zur Gewinnung von KOK aus wachsenden Follikelgruppen ein vergleichsweise größerer experimenteller Aufwand betrieben werden musste.

**Tab. 3:** Übersicht über die Gesamtanzahl durchgeführter Follikelaspirationssitzungen, aspirierter Follikel und gewonnener Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK)

Aspirationssitzungstyp	Aspirationssitzungen (n)	aspirierte Follikel (n)	KOK (n)
Follikelaspiration während der Rosse	43	präovulatorische Follikel	47 2
		subordinante Follikel	387 101
Follikelaspiration folgend auf eine Follikelablation	77	wachsende Follikel	624 75
Summe	120		1058 178

#### 4.1.2 Anzahlen aspirierter Follikel und gewonnener KOK pro Aspirationssitzung

Die Anzahl der aspirierten Follikel, der gewonnenen KOK und die daraus resultierende Gewinnungsrate waren zwischen den verschiedenen Follikelgruppen signifikant unterschiedlich (Tab. 4).

Die KOK-Gewinnungsrate war mit  $4,2 \pm 2,9\%$  bei der präovulatorischen Follikelgruppe geringer als bei den anderen Follikelgruppen. Die Anzahl aspirierter subordinanter Follikel pro Aspirationssitzung war mit  $9,0 \pm 0,5$  Follikeln in der Tendenz höher als die Anzahl aspirierter Follikel pro Aspirationssitzung bei den wachsenden Follikelgruppen mit  $8,1 \pm 0,3$  Follikel ( $p < 0,1$ ). Wird die durchschnittliche Gesamtzahl aspirierter Follikel pro Aspirationssitzung zwischen den zwei Aspirationstypen („während der Rosse“; präovulatorische Follikel und subordinante Follikelgruppe; sowie „nach vorangegangener Follikelablation“; wachsende Follikelgruppe) verglichen, so wurden mit  $10,1 \pm 0,5$  bei dem ersten Aspirationstyp signifikant mehr Follikel aspiriert ( $p < 0,001$ ) als bei dem zweiten Aspirationstyp. Obwohl die Anzahl aspirierter Follikel bei der subordinanten Follikelgruppe nur um einen Follikel höher war, wurden bei dieser Follikelgruppe mit  $2,3 \pm 0,2$  KOK pro

Aspirationssitzung mehr als doppelt so viele KOK pro Aspirationssitzung erzielt, wie bei der wachsenden Follikelgruppe ( $p < 0,01$ ). Die daraus resultierenden KOK-Gewinnungsraten pro Follikel und Sitzung waren deshalb mit durchschnittlichen  $27,8 \pm 2,7\%$  bei der Aspiration von subordinanten Follikelgruppen signifikant höher als bei der Aspiration von wachsenden Follikelgruppen ( $p < 0,01$ ).

**Tab. 4:** Durchschnittliche Anzahl aspirierter Follikel und gewonnener KOK pro Aspirationssitzung in den verschiedenen Follikelgruppen

Follikelgruppe	aspirierte Follikel/Sitzung	gewonnene KOK/Sitzung	KOK-Gewinnungsrate (KOK/Follikel)/Sitzung
	LSM $\pm$ SE (n)	LSM $\pm$ SE (n)	LSM $\pm$ SE (%)
präovulatorische Follikelgruppe	1,1 $\pm$ 0,1	0,04 $\pm$ 0,04	4,2 $\pm$ 2,9
subordinante Follikelgruppe	9,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	27,8 $\pm$ 2,7 <sup>c</sup>
wachsende Follikelgruppe	8,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>	13,1 $\pm$ 2,0 <sup>d</sup>

In Spalten: a:b  $p < 0,1$ ; c:d  $p < 0,01$

#### 4.1.3 KOK-Morphologie

Bei den gewonnenen KOK aus den verschiedenen Follikelgruppen wurden signifikant unterschiedliche Anteile verschiedener Morphologieklassen vorgefunden (Tab. 5).

Die zwei Oozyten, die von präovulatorischen Follikeln gewonnen wurden, waren nur von einer Corona radiata umgeben. Bei den KOK aus der wachsenden Follikelgruppe war der Anteil Oozyten, die einen kompakten Kumulus aufwiesen, mit  $44 \pm 5,7\%$  am größten. Gegenüber einem Anteil von  $26,7 \pm 4,4\%$  kompakter KOK in den subordinanten Follikelgruppen waren sie in der wachsenden Follikelgruppe signifikant häufiger vertreten ( $p < 0,05$ ). Bei den KOK aus der subordinanten Follikelgruppe waren Oozyten, die nur eine Corona radiata aufwiesen, mit einem Anteil von  $45,6 \pm 5,4\%$  am häufigsten vertreten. In der Tendenz waren Oozyten, die nur von Corona-radiata-Zellen umgeben waren, häufiger in der subordinanten Follikelgruppe zu finden als in der wachsenden Follikelgruppe ( $p = 0,06$ ). Der Anteil expandierter KOK in den beiden Follikelgruppen war nicht verschieden.

**Tab. 5:** KOK-Morphologie in Abhängigkeit von der punktierten Follikelgruppe

Follikelgruppe	KOK (n)	Kumulus-Oozyten-Komplex-Morphologie		
		kompakt LSM $\pm$ SE % (n)	expandiert LSM $\pm$ SE % (n)	Corona radiata LSM $\pm$ SE % (n)
präovulatorische Follikelgruppe	2	0	0	100 (2)
wachsende Follikelgruppe	75	44 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup> (33)	24 $\pm$ 5,0 (18)	32 $\pm$ 5,0 <sup>c</sup> (24)
subordinante Follikelgruppe	101	26,7 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup> (27)	27,7 $\pm$ 4,5 (28)	45,6 $\pm$ 5,4 <sup>d</sup> (46)

In Spalten: a:b  $p < 0,05$ ; c:d  $p = 0,06$

## 4.2. Steroidkonzentrationen in den Follikelflüssigkeiten der unterschiedlichen Follikelpopulationen

### 4.2.1 Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$ (E<sub>2</sub>) und Progesteron (P<sub>4</sub>) in den Follikelflüssigkeiten

Die durchschnittlichen Konzentrationen von E<sub>2</sub> in den Follikelflüssigkeiten unterschieden sich signifikant zwischen den verschiedenen Follikelgruppen, während die Konzentrationen von P<sub>4</sub> in der Follikelflüssigkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Follikelgruppen aufwiesen (Tab. 6).

Die durchschnittlichen Konzentrationen von E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> in den Follikelflüssigkeiten wurden durch repräsentative Stichproben von Follikelflüssigkeiten für die verschiedenen Follikelgruppen ermittelt. Die höchste E<sub>2</sub>-Konzentration wurde mit einem Wert von 3909 ng/ml bei einer Probe eines präovulatorischen Follikels gemessen, die niedrigste E<sub>2</sub>-Konzentration wurde in einer Probe eines subordinanten Follikels mit einem Wert von 5,06 ng/ml ermittelt. Mit einer durchschnittlichen P<sub>4</sub>-Konzentration von 43,7  $\pm$  5,1 war auch die P<sub>4</sub>-Konzentration in der präovulatorischen Follikelgruppe am höchsten und die Konzentration dieses Steroids mit einem Wert von 23,8  $\pm$  6,6 ng/ml bei der subordinanten Follikelgruppe am niedrigsten. Signifikante Unterschiede zwischen den P<sub>4</sub>-Konzentrationen der Follikelgruppen wurden nicht festgestellt.

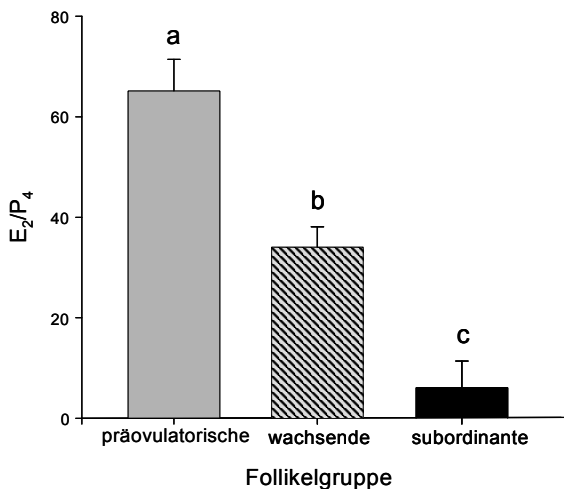
**Tab.6:** Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) und Progesteron (P<sub>4</sub>) in Follikelflüssigkeiten aus Stichproben von den verschiedenen Follikelgruppen

Follikelgruppe	beprobte Follikel (n)	Steroidkonzentrationen	
		Östradiol-17 $\beta$ (E <sub>2</sub> ) LSM $\pm$ SE (ng/ml)	Progesteron (P <sub>4</sub> ) LSM $\pm$ SE (ng/ml)
präovulatorische Follikelgruppe	20	1911,4 $\pm$ 184,5 <sup>a</sup>	43,7 $\pm$ 5,1
wachsende Follikelgruppe	47	885,6 $\pm$ 120,6 <sup>b</sup>	26,6 $\pm$ 5,1
subordinante Follikelgruppe	28	54,4 $\pm$ 155,9 <sup>c</sup>	23,8 $\pm$ 6,6

In Spalten: a:b; a:c; b:c p<0,05

#### 4.2.2 Quotient aus den Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$ (E<sub>2</sub>) und Progesteron (P<sub>4</sub>)

Die Follikelgruppen unterschieden sich untereinander signifikant in ihrem durchschnittlichen Quotienten aus den Konzentrationen von E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> in den Follikelflüssigkeitsproben (Abb.9). Zur besseren Bewertung der Entwicklungsstadien der beprobten Follikel wurde für jede Follikelflüssigkeitsprobe zunächst der Quotient aus der Konzentration von E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> berechnet und anschließend der Mittelwert für die Follikelgruppe gebildet. Die durchschnittlichen Werte des Quotienten aus der Konzentration von E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> in der Follikelflüssigkeit betragen in der präovulatorischen Follikelgruppe 65,1  $\pm$  6,3, in der wachsenden Follikelgruppe 34,0  $\pm$  4,1 und in der subordinanten Follikelgruppe 6,1  $\pm$  5,3. Alle Follikelgruppen unterschieden sich signifikant in ihrem Quotienten aus den Konzentrationen von E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> in der Follikelflüssigkeit voneinander ( $p < 0,001$ ).



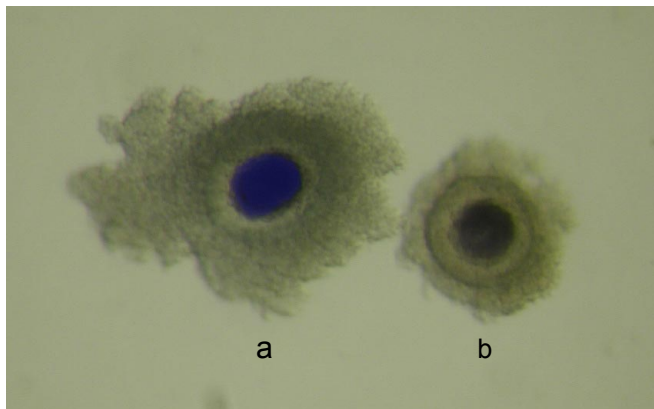
**Abb. 9:**  
Quotient aus den Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) und Progesteron (P<sub>4</sub>) in der Follikelflüssigkeit in Abhängigkeit von der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)

a:b; a:c; b:c  $p < 0,001$

### 4.3 Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in den gewonnenen Oozyten

Mittels einer Brillant-Cresyl-Blau-Färbung (BCB) wurde jede Oozyte einem G-6-PDH Status zugeordnet, der das Aktivitätsniveau dieses Enzyms in der Oozyte widerspiegelt ( $BCB^-$  = hohe Aktivität;  $BCB^+$  = niedrige Aktivität). Sobald nach der Inkubation mit dem Farbstoff auch nur eine leichte Blaufärbung zu erkennen war, wurden die Oozyten der  $BCB^+$  Gruppe zugeordnet (Abb. 10). Bei 153 Oozyten konnten alle untersuchten Parameter zur Oozytenqualität bestimmt werden. In die weiteren statistischen Prüfungen und Darstellungen wurden nur diese 153 Oozyten einbezogen. Insgesamt wurden 51 Oozyten als  $BCB^-$  und 102 Oozyten als  $BCB^+$  beurteilt.

**Abb. 10:** Equine Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status (63x, Brillant-Cresyl-Blau-Färbung)



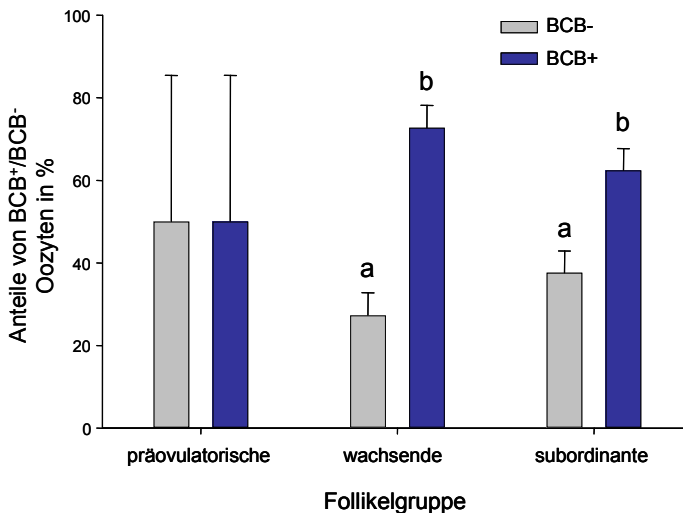
- a: Oozyte mit niedriger G-6-PDH-Aktivität ( $BCB^+$ ) und expandierten Kumuluszellen
- b: Oozyte mit hoher G-6-PDH-Aktivität ( $BCB^-$ ), umgeben von Zellen der Corona radiata



### 4.3.1 G-6-PDH Status in den Oozyten in Abhängigkeit von der Follikelgruppe

Wachsende und subordinante Follikelgruppen unterschieden sich nicht vonander hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status (Abb. 11). In jeder Follikelgruppe wurden KOK mit unterschiedlichen G-6-PDH Status gefunden. Aus präovulatorischen Follikeln wurde eine  $BCB^+$  (= niedrige Aktivität) und eine  $BCB^-$  Oozyte (= hohe Aktivität) gewonnen. Der Anteil  $BCB^+$  Oozyten war sowohl bei der wachsenden als auch bei der subordinanten Follikelgruppe signifikant größer als der Anteil  $BCB^-$  Oozyten ( $p < 0.001$ ). Ein statistisch gesicherter Unterschied der Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status zwischen den Follikelgruppen wurde nicht festgestellt.

**Abb. 11:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status ( $BCB^-$  = hohe Aktivität;  $BCB^+$  = niedrige Aktivität) in Abhängigkeit von der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)

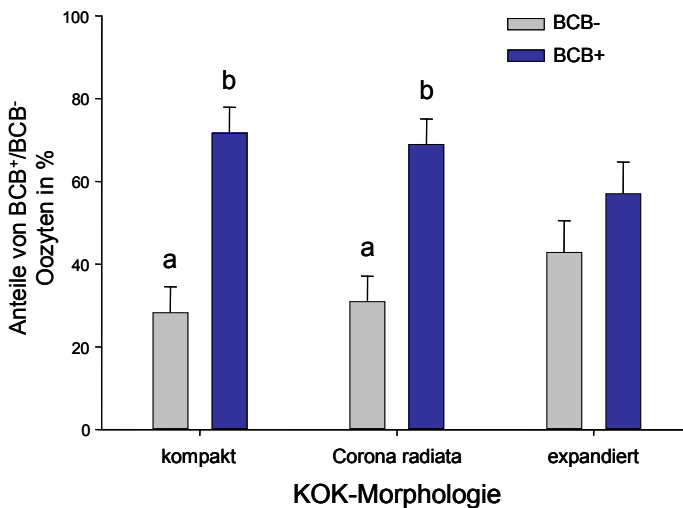


a:b  $p < 0,001$

### 4.3.2 G-6-PDH Status in Abhängigkeit von der Kumulusmorphologie

Differente KOK-Morphologieklassen unterschieden sich hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status nicht signifikant voneinander (Abb. 12). In allen nach der Kumulusmorphologie getrennten KOK-Gruppen wurden Oozyten mit unterschiedlichen G-6-PDH Status gefunden. Der Anteil  $BCB^+$  Oozyten war mit  $71,7 \pm 6,2\%$  bei den kompakten KOK und  $69 \pm 6,1\%$  bei den Corona radiata Oozyten signifikant höher als der Anteil  $BCB^-$  Oozyten ( $p < 0,0001$ ). Bei der Gruppe der expandierten KOK war der Anteil  $BCB^+$  Oozyten in Höhe von  $57,1 \pm 7,6\%$  ( $n=24$ ) größer als der Anteil  $BCB^-$  Oozyten ( $n=18$ ), jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status zwischen den verschiedenen Kumulusmorphologieklassen festgestellt.

**Abb. 12:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status ( $BCB^-$  = hohe Aktivität;  $BCB^+$  = niedrige Aktivität) in Abhängigkeit vom Kumuluszustand (LSM  $\pm$  SE)



a:b  $p < 0,0001$

#### 4.3.3.1 G-6-PDH Status der Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulusemorphologie und der Follikelgruppe

Bei der Betrachtung der Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status in Abhängigkeit von der Kumulusemorphologie und der Follikelgruppe zeigte sich, dass nur Oozyten mit expandiertem Kumulus aus der subordinanten Follikelgruppe keinen signifikant höheren Anteil BCB<sup>+</sup> Oozyten aufwiesen (Tab. 7).

Wie in Tabelle 7 dargestellt, war der Anteil BCB<sup>+</sup> Oozyten (BCB<sup>+</sup> = niedrige G-6-PDH Aktivität) in den drei verschiedenen Kumulusemorphologieklassen bei den KOK der wachsenden Follikelgruppe zwei bis dreimal höher als der Anteil BCB<sup>-</sup> Oozyten (BCB<sup>-</sup> = hohe G-6-PDH Aktivität). Die KOK der verschiedenen Kumulusemorphologieklassen der wachsenden Follikelgruppe wiesen eine sehr ähnliche Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status auf, wobei der Anteil BCB<sup>+</sup> Oozyten in jeder Kumulusemorphologiekategorie signifikant größer war ( $p < 0,01$ ). Bei der Betrachtung der KOK-Klassen der subordinanten Follikelgruppe hinsichtlich ihres G-6-PDH Status, zeigte sich

**Tab. 7:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status (BCB<sup>-</sup> = hohe Aktivität; BCB<sup>+</sup> = niedrige Aktivität) in Abhängigkeit von der Kumulusemorphologie und der Follikelgruppe

		G-6-PDH Status der Oozyten			
		BCB <sup>-</sup>		BCB <sup>+</sup>	
Kumulusemorphologie	Oozyten	Anteil LSM ± SE	Oozyten	Anteil LSM ± SE	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
wachsende Follikelgruppe	kompakt	7	24,1 ± 8,0 <sup>a</sup>	22	75,9 ± 8,0 <sup>b</sup>
	Corona radiata	6	31,6 ± 10,7 <sup>a</sup>	13	68,4 ± 10,7 <sup>b</sup>
	expandiert	5	27,8 ± 10,6 <sup>a</sup>	13	72,2 ± 10,6 <sup>b</sup>

In Zeilen: a:b  $p < 0,01$

		G-6-PDH Status der Oozyten			
		BCB <sup>-</sup>		BCB <sup>+</sup>	
Kumulusemorphologie	Oozyten	Anteil LSM ± SE	Oozyten	Anteil LSM ± SE	
	(n)	(%)	(n)	(%)	
subordinante Follikelgruppe	kompakt	8	33,3 ± 9,6 <sup>a</sup>	16	66,7 ± 9,6 <sup>b</sup>
	Corona radiata	11	29,7 ± 7,5 <sup>a,c</sup>	26	70,3 ± 7,5 <sup>b,c</sup>
	expandiert	13	54,2 ± 10,2 <sup>d</sup>	11	45,8 ± 10,2 <sup>d</sup>

In Zeilen: a:b  $p < 0,05$ ; in Spalte: c:d  $p = 0,06$

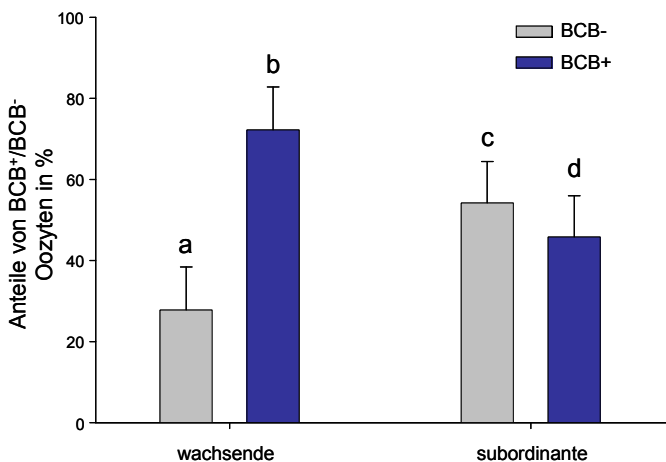
analog zu der wachsenden Follikelgruppe ein signifikant größerer Anteil BCB<sup>+</sup> Oozyten nur bei der kompakten und Corona radiata KOK-Klasse ( $p < 0,05$ ). Bei dem Vergleich der Häufigkeitsverteilungen von Oozyten mit unterschiedlichen G-6-PDH Status zwischen den verschiedenen Kumulusmorphologieklassen innerhalb der subordinanten Follikelgruppe zeigte sich, dass der Anteil BCB<sup>-</sup> Oozyten bei expandierten KOK, gegenüber den Oozyten, die nur eine Corona radiata besaßen, in dieser Follikelgruppe tendenziell größer war ( $p = 0,06$ ).

#### 4.3.3.2 G-6-PDH Status von Oozyten mit expandiertem Kumulus in Abhängigkeit von der Follikelgruppe

Expandierte KOK der subordinanten Follikelgruppe enthielten tendenziell mehr Oozyten mit einem BCB<sup>-</sup> Status als expandierte KOK der wachsenden Follikelgruppe ( $p < 0,1$ ).

Bei der Gegenüberstellung der Häufigkeitsverteilungen von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status der gleichen Kumulusmorphologiekategorie, die jedoch aus verschiedenen Follikelgruppen gewonnen wurden, zeigte sich nur bei den expandierten KOK ein tendenzieller Einfluss der follikulären Herkunft.

**Abb.13:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit expandiertem Kumulus und unterschiedlichem G-6-PDH Status (BCB<sup>-</sup> = hohe Aktivität; BCB<sup>+</sup> = niedrige Aktivität) in Abhängigkeit von der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)

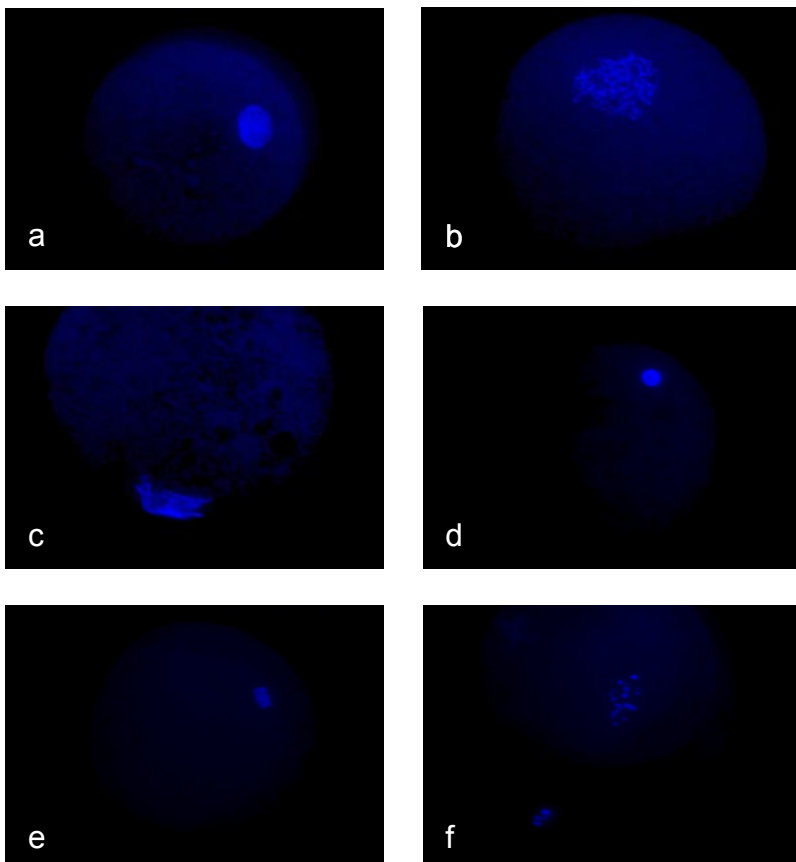


a:b  $p < 0,01$  (innerhalb der Follikelgruppe); a:c; b:d  $p < 0,1$  (zwischen Follikelgruppen)

#### 4.4 Untersuchungen zur Chromatinkonfiguration der Oozyten

Die Chromatinkonfigurationen wurden nach einer Färbung mit Hoechst 33258 bestimmt. Die Färbung ermöglichte es, das Chromatin im Diplotän in ein diffuses/klassisches Diplotän (DD), fibrilläres Diplotän (FD) und kondensiertes Diplotän (KD) zu unterscheiden. Meiosestadien nach dem GVBD wurden von der Diakinese bis zur Anaphase I unter der Gruppe Metaphase I (MI) und fortgeschrittene Meiosestadien ab der Telophase I bis zur Metaphase II unter der Gruppe Metaphase II (MII) zusammengefasst. Weiterhin wurden Oozyten mit pyknotischem oder degeneriertem Chromatin (Pykn.) sowie Oozyten die keinen Zellkern beinhalteten (Ohne) als eigenständige Chromatinkonfigurationsgruppen erfasst. Den Auswertungen und Darstellungen liegt eine Anzahl von 153 Oozyten zugrunde, in denen alle untersuchten Parameter bestimmt werden konnten.

**Abb. 14 :** Chromatinkonfigurationen in equinen Oozyten (400x, Hoechst 33258)



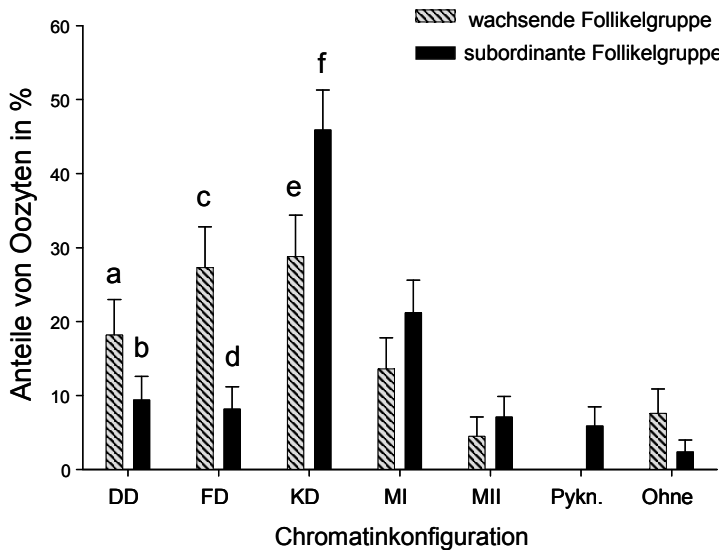
a: diffuses Diplotän; b: klassisches Diplotän; c: fibrilläres Diplotän; d: kondensiertes Diplotän; e: Metaphase I; f: Metaphase II

#### 4.4.1 Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Follikelgruppe

Eine Abhängigkeit der Chromatinkonfigurationen der Oozyten zu ihrer folliculären Herkunft wurde nur bei den verschiedenen Konfigurationen des Diplotän bei den untersuchten Oozyten beobachtet. Während das fibrilläre Diplotän signifikant häufiger in Oozyten von wachsenden Follikelpopulationen auftrat, wurde die kondensierte Form des Diplotän signifikant häufiger bei Oozyten aus subordinanten Follikeln gefunden (Abb. 15).

Mit Ausnahme von Oozyten mit pyknotischen Chromatin (Pykn.) waren Oozyten aller Chromatinkonfigurationen sowohl in den wachsenden als auch in den subordinanten Follikelgruppen zu finden. Oozyten mit pyknotischem Chromatin wurden nur bei der subordinanten Follikelgruppe bestimmt.

**Abb. 15:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)



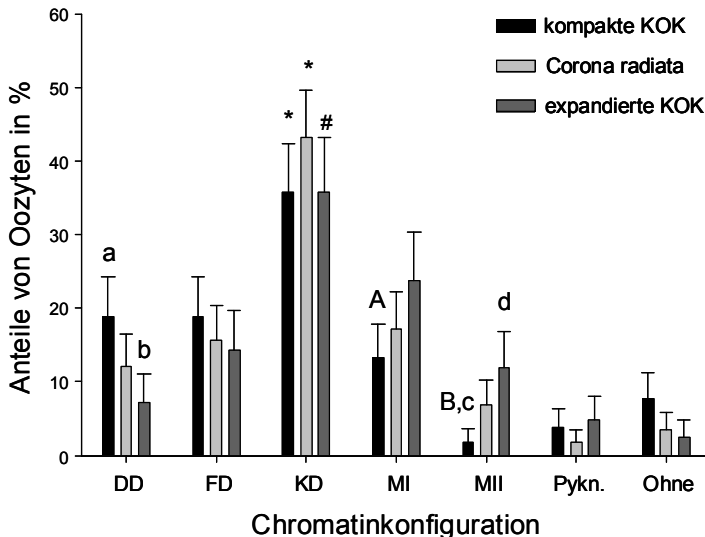
a:b  $p=0,11$ ; c:d; e:f  $p<0,05$  (zwischen Follikelgruppen)

#### 4.4.2 Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Kumulussmorphologie

Unabhängig von der KOK-Morphologie wurden Oozyten mit einem kondensierten Diplotän am häufigsten gefunden. Abhängigkeiten der Chromatinkonfiguration der Oozyten von ihrer Kumulussmorphologie traten beim diffusen Diplotän, das tendenziell häufiger in kompakten KOK gefunden wurde und bei den Chromatinkonfigurationen der Metaphase-II-Gruppe auf, die signifikant häufiger in Oozyten von expandierten KOK gefunden wurden ( $p < 0,05$ ; Abb. 16).

Die verschiedenen Gruppen von Chromatinkonfigurationen wurden von Oozyten aller Kumulussmorphologieklassen besetzt. Bei den drei verschiedenen KOK-Morphologieklassen waren jeweils die Oozyten, deren Kern ein kondensiertes Diplotän (KD) aufwies, mit einem Anteil von  $35,8 \pm 6,6\%$  bei den kompakten, von  $43,1 \pm 6,5\%$  bei den Oozyten mit einer Corona radiata und von  $35,7 \pm 7,4\%$  bei den expandierten KOK am häufigsten vertreten ( $p < 0,05$ ). Innerhalb der KOK-Morphologieklassen fanden sich bei den kompakten KOK signifikant mehr Oozyten in der MI-Gruppe gegenüber der MII-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 16:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Kumulussmorphologie (LSM  $\pm$  SE)



a:b  $p = 0,1$ ; c:d  $p < 0,05$  (innerhalb der Chromatinkonfigurationen)

A:B  $p < 0,05$  (zwischen den Chromatinkonfigurationen)

\* zu allen anderen Chromatinkonfigurationen mit gleicher Kumulussmorphologie  $p < 0,05$

# zu allen anderen Chromatinkonfigurationen mit gleicher Kumulussmorphologie mit Ausnahme zur MI  $p < 0,05$

#### **4.4.3 Chromatinkonfiguration der Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulismorphologie und der Follikelgruppe**

Die Abhängigkeiten der Chromatinkonfiguration der Oozyten von ihrer folliculären Herkunft und von ihrer Kumulismorphologie, wie unter 4.4.1 und 4.4.2 dargestellt, lassen sich bei der gemeinschaftlichen Betrachtung der Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von Kumulismorphologie und Follikelgruppe differenzierter wiederfinden (Tab. 8). Allerdings waren signifikante Unterschiede mit den quantitativ geringer werdenden Untergruppen oftmals nicht mehr gegeben.

Deutlich wird bei dieser gemeinschaftlichen Darstellung, dass besonders bei den expandierten und Corona radiata KOK, das fibrilläre Diplotän (FD) signifikant häufiger bei Oozyten von wachsenden Follikelgruppen zu finden war ( $p < 0,05$ ). Außerdem zeigte sich der Anteil der Oozyten mit kondensiertem Diplotän (KD) weiterhin als der signifikant größte Anteil unter den Oozyten aus den subordinanten Follikelgruppen. Zusätzlich wird hier sichtbar, dass der Anteil Oozyten mit KD bei kompakten KOK in der subordinanten Follikelgruppe signifikant größer war als bei kompakten KOK aus wachsenden Follikelgruppen. Chromatinkonfigurationen der Gruppe MI waren bei den Corona radiata KOK aus subordinanten Follikelgruppen gegenüber den anderen Chromatinkonfigurationen, mit einer Ausnahme gegenüber dem KD, in dieser Untergruppe signifikant häufiger vertreten ( $p < 0,05$ ). In Oozyten von expandierten KOK aus subordinanten Follikelgruppen waren Chromatinkonfigurationen der Gruppe MI signifikant häufiger vertreten als die Chromatinkonfigurationen des diffusen oder fibrillären Diplotäns. Kompakte KOK, die sich der MII Gruppe zuordnen ließen, waren in der wachsenden Follikelgruppe signifikant weniger vertreten als die Chromatinkonfigurationen in dieser Untergruppe ( $p < 0,05$ ). Bei kompakten KOK aus subordinanten Follikelgruppen wurde keine Chromatinkonfiguration der MII gefunden.



**Tab. 8:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit vom Kumuluszustand und der Follikelgruppe (n=153)

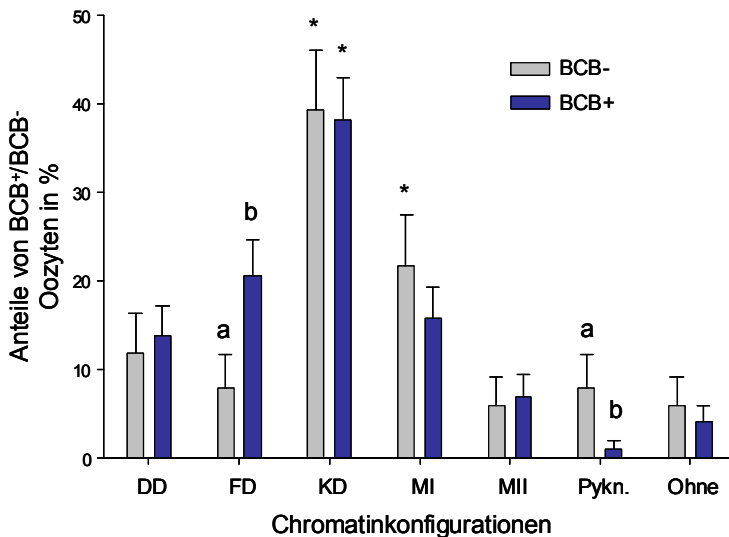
Follikelgruppe	Kumulus-Morphologie	Oozyten (n)	Chromatinkonfiguration							
			DD	FD	KD	MI	MII	Pykn.	Ohne	
			LSM ± SE (%)							
präovulatorische Follikelgruppe	Corona radiata	2	0	0	50±35,4	0	50±35,4	0	0	0
	kompakt	29	20,7 ± 7,5 <sup>a</sup>	20,7 ± 7,5 <sup>a</sup>	24,1 ± 7,9 <sup>a,e</sup>	20,7 ± 7,5 <sup>a</sup>	3,4 ± 3,4 <sup>b</sup>	0	10,3 ± 5,7	
	Corona radiata	19	21,1 ± 9,6	36,8±11,1 <sup>a,e</sup>	36,8 ± 11,1 <sup>a</sup>	0	0	0	5,2 ± 5,2 <sup>b</sup>	
wachsende Follikelgruppe	expandiert	18	11,1 ± 7,4	27,8 ± 10,6 <sup>g</sup>	27,8 ± 10,6	16,7 ± 8,8	11,1 ± 7,4	0	5,6 ± 5,4	
	kompakt	24	16,7 ± 7,6 <sup>a</sup>	16,7 ± 7,6 <sup>a</sup>	50 ± 10,2 <sup>b,f</sup>	4,2 ± 4,1 <sup>a,e</sup>	0	8,3 ± 5,6 <sup>a</sup>	4,2 ± 4,1 <sup>a</sup>	
	Corona radiata	37	8,1 ± 4,5 <sup>a,c</sup>	5,4 ± 3,7 <sup>a,c,f</sup>	45,9 ± 8,2 <sup>b</sup>	27,1 ± 7,3 <sup>d,f</sup>	8,1 ± 4,5 <sup>a,c</sup>	2,7 ± 2,7 <sup>a,c</sup>	2,7 ± 2,7 <sup>a,c</sup>	
subordinante Follikelgruppe	expandiert	24	4,2 ± 4,1 <sup>a,c</sup>	4,2 ± 4,1 <sup>a,c,h</sup>	41,7 ± 10,1 <sup>b</sup>	29,2 ± 9,3 <sup>d,f</sup>	12,5 ± 6,8 <sup>a</sup>	8,3 ± 5,6 <sup>a</sup>	0	

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

#### 4.4.4 Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit vom G-6-PDH Status

Unter den BCB<sup>+</sup> Oozyten (niedrige G-6-PDH Aktivität) war der Anteil Oozyten mit einem fibrillären Diplotän signifikant größer und der Anteil Oozyten mit einem pyknotischen Chromatin signifikant kleiner als unter den BCB<sup>-</sup> Oozyten (hohe G-6-PDH Aktivität, Abb. 17). In den beiden Gruppen von Oozyten mit unterschiedlichen G-6-PDH Status waren alle verwendeten Chromatinkonfigurationen vertreten. Sowohl bei den BCB<sup>-</sup> als auch bei den BCB<sup>+</sup> Oozyten stellten die Oozyten mit einem kondensierten Diplotän (KD) mit  $39,2 \pm 6,8\%$  und  $38,2 \pm 4,8\%$  den gegenüber aller anderen Chromatinkonfigurationsgruppen signifikant größten Anteil ( $p < 0,05$ ). Auch der zweitgrößte Anteil unter den BCB<sup>-</sup> Oozyten, Oozyten der MI-Gruppe mit einem Anteil von  $21,6 \pm 5,8\%$ , grenzte sich signifikant gegen die anderen Chromatinkonfigurationsgruppen innerhalb der BCB<sup>-</sup> Gruppe ab ( $p < 0,05$ ). Den zweitgrößten Anteil unter den BCB<sup>+</sup> Oozyten stellten die Oozyten mit einem fibrillären Diplotän (FD), der sich aber von den Anteilen der BCB<sup>+</sup> Oozyten mit diffusen Diplotän (DD) oder der MI-Chromatinkonfigurationsgruppe nicht signifikant unterschied ( $p > 0,05$ ). Der Anteil BCB<sup>+</sup> Oozyten mit einem FD an den BCB<sup>-</sup> Oozyten war mit  $20,6 \pm 4,0\%$  aber signifikant größer als der Anteil BCB<sup>-</sup> Oozyten in Höhe von  $7,8 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,05$ ). Der Anteil Oozyten, deren Chromatin pyknotisch war, war hingegen mit  $7,8 \pm 3,8\%$  in der Gruppe der BCB<sup>-</sup> Oozyten signifikant höher als ihr Anteil unter den BCB<sup>+</sup> Oozyten, der  $1,0 \pm 1,0\%$  betrug ( $p < 0,05$ ).

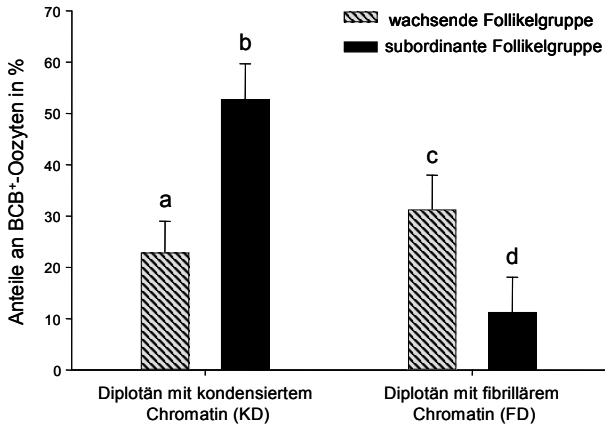
**Abb. 17:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit vom G-6-PDH Status (BCB<sup>-</sup> = hohe Aktivität; BCB<sup>+</sup> = niedrige Aktivität; LSM  $\pm$  SE



a:b  $p < 0,05$  (innerhalb der Chromatinkonfigurationen)

\* zu allen anderen Chromatinkonfigurationen mit gleichem G-6-PDH Status  $p < 0,05$

Bei der Betrachtung der Verteilung von Oozyten gleicher Chromatinkonfiguration und G-6-PDH-Aktivität unter zusätzlicher Beachtung der Follikelgruppe, zeigten sich in der Gruppe der BCB<sup>+</sup> Oozyten erneut die unter Kapitel 4.4.1 beschriebenen signifikanten Abhängigkeiten zur folliculären Herkunft (Abb. 18;  $p < 0,05$ ).

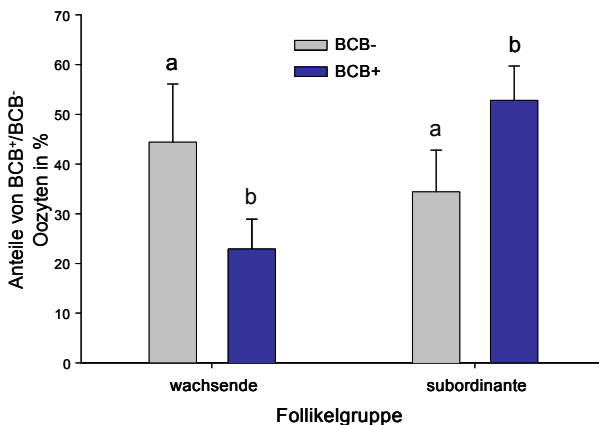


**Abb. 18:**

Häufigkeitsverteilung von BCB<sup>+</sup> Oozyten (niedrige G-6-PDH-Aktivität) mit unterschiedlicher Diplotänkonfiguration in Abhängigkeit von der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)

a:b  $p < 0,01$ ; c:d  $p < 0,05$

Wurden Oozyten, die aus der gleichen Follikelgruppe stammten, auf die Verteilung des G-6-PDH-Status untersucht, so zeigte sich eine Besonderheit nur bei den Oozyten mit kondensiertem Diplotän (Abb. 19). Aus der Abb. 17 ist ersichtlich, dass Oozyten mit kondensiertem Diplotän (KD) zu gleichen Anteilen aus BCB<sup>+</sup> und BCB<sup>-</sup> Oozyten bestanden. Das Einbeziehen der folliculären Herkunft erbrachte, dass unter den Oozyten aus der



**Abb. 19:**

Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit kondensiertem Diplotän in Abhängigkeit von ihrer G-6-PDH-Aktivität und der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)

a:b  $p < 0,1$

wachsenden Follikelgruppe die BCB<sup>-</sup> Oozyten mit einem Anteil von  $44,4 \pm 11,7\%$  tendenziell häufiger ein KD enthielten als die BCB<sup>+</sup> Oozyten, die nur einen Anteil von  $22,9 \pm 6,0\%$  aufwiesen ( $p < 0,1$ ). Im Kontrast dazu fand sich bei den Oozyten aus der subordinanten Follikelgruppe ein KD tendenziell häufiger bei den BCB<sup>+</sup> Oozyten ( $p = 0,1$ ; Abb. 19).

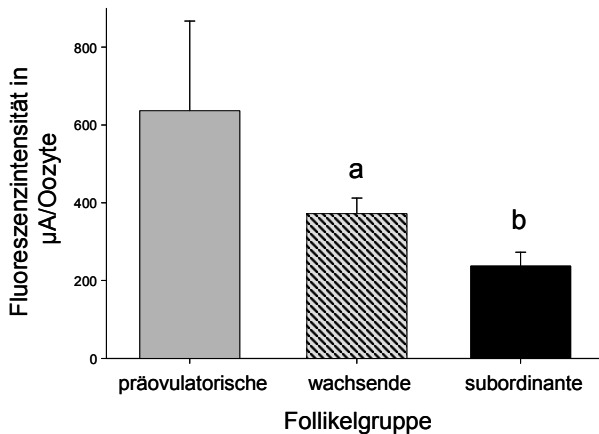
## 4.5 Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität in den gewonnenen Oozyten

Ingesamt wurden 153 Oozyten für die Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität verwendet.

### 4.5.1 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit zur Follikelgruppe

Bei den Untersuchungen wurde eine signifikante Abhängigkeit der mitochondrialen Aktivität in den Oozyten von ihrer follikulären Herkunft festgestellt (Abb. 20).

In den Untersuchungen zeigte sich eine große Spannweite der gemessenen mitochondrialen Aktivitäten in den Oozyten. Mit einer mittleren Fluoreszenzintensivität von  $372 \pm 40,2 \mu\text{A}$  lagen die ermittelten mitochondrialen Aktivitäten in Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen ( $n=66$ ) signifikant höher als in Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen ( $n=85$ ), die im Mittel eine Fluoreszenzintensivität von  $337 \pm 35,4 \mu\text{A}$  aufwiesen ( $p<0,05$ ).



**Abb. 20:**

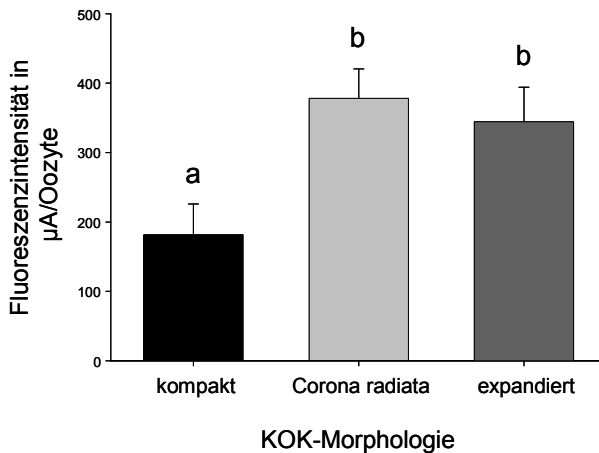
Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit zur Follikelgruppe

a:b  $p<0,05$

#### 4.5.2 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulismorphologie

Die gemessenen Werte der mitochondrialen Aktivitäten in den Oozyten wiesen eine signifikante Abhängigkeit von der Kumulismorphologie der Oozyten auf (Abb. 21).

Bei den Messungen der mitochondrialen Aktivitäten in den Oozyten zeigte sich eine breite Streuung der Werte für die Fluoreszenzintensitäten der Oozyten. In den drei verschiedenen Kumulismorphologieklassen wurden jeweils Höchstwerte von 1025  $\mu\text{A}$  gemessen. Gleichzeitig wurden in zahlreichen Oozyten aller Kumulismorphologieklassen Werte von unter 50  $\mu\text{A}$  für die Fluoreszenzintensität/Oozyte ermittelt. Im Mittel war die mitochondriale Aktivität in den Oozyten mit kompakten Kumuluszellen gegenüber der mitochondrialen Aktivität in Oozyten, die nur eine Corona radiata oder expandierte Kumuluszellen besaßen, signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ).



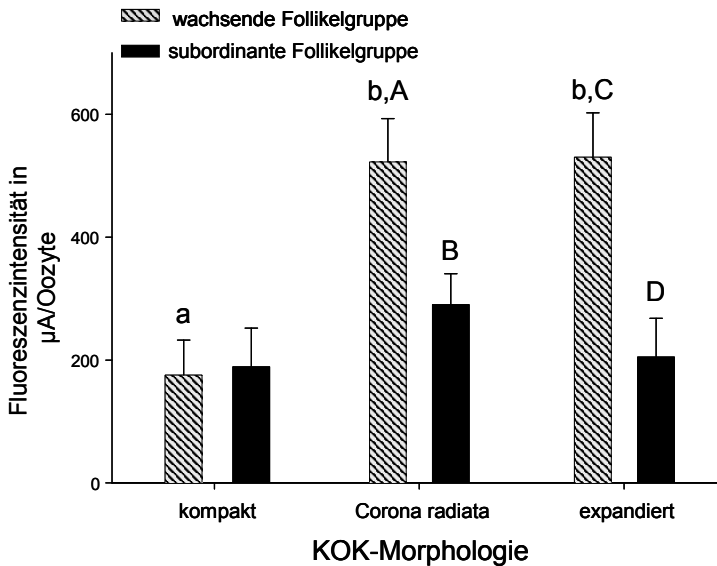
**Abb. 21:**  
Mitochondriale Aktivitäten  
in Oozyten in  
Abhängigkeit vom  
Kumuluszustand  
(LSM  $\pm$  SE)

a:b  $p < 0,05$

#### 4.5.3 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulismorphologie und der Follikelgruppe

Die mitochondriale Aktivität in den Oozyten aus der wachsenden Follikelgruppe war abhängig von ihrer Kumulismorphologie, während sie in den Oozyten aus der subordinanten Follikelgruppe ein gleichmäßig niedriges Aktivitätsniveau aufwies (Abb. 22). Sowohl bei Oozyten aus subordinanten als auch aus wachsenden Follikelgruppen wurde die niedrigste Fluoreszenzintensität bei Oozyten mit kompaktem Kumulus gemessen. Bei Oozyten von wachsenden Follikelgruppen, mit Corona radiata oder expandiertem Kumulus, waren die mittlere Fluoreszenzintensität gegenüber der von den Oozyten mit kompaktem Kumulus signifikant höher ( $p < 0,001$ ). Im Kontrast dazu blieb die mitochondriale Aktivität in Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen die nur eine Corona radiata oder einem expandierten Kumulus aufwiesen, mit einem mittleren Wert von  $289,9 \pm 50,5 \mu\text{A}$  und  $205,1 \pm 62,7 \mu\text{A}$ , auf einem zu den Oozyten der kompakten KOK vergleichbar niedrigen Aktivitätsniveau. Beim Vergleich der mitochondrialen Aktivitäten von Oozyten mit gleicher Kumulismorphologie, aber unterschiedlicher Follikelgruppe, konnte eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität in Oozyten mit einem expandierten Kumulus ( $p < 0,05$ ) und eine tendenziell höhere mitochondriale Aktivität in Corona radiata Oozyten verzeichnet werden ( $p = 0,11$ ), wenn sie aus einer wachsenden Follikelgruppe aspiriert wurden.

**Abb. 22:** Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der KOK-Morphologie und der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)



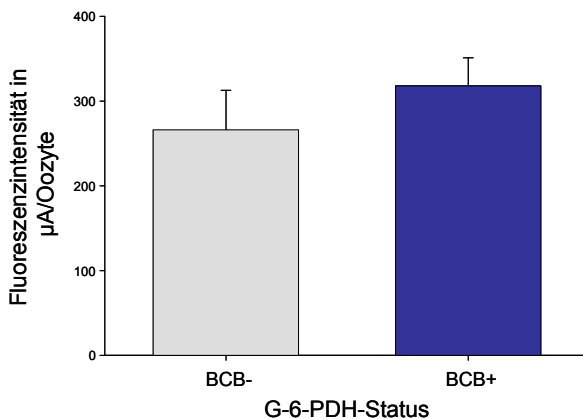
a:b  $p < 0,001$  (zwischen den KOK-Morphologiegruppen)

A:B  $p = 0,11$ ; C:D  $p < 0,05$  (innerhalb der KOK-Morphologiegruppen)

#### 4.5.4 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von ihrer G-6-PDH-Aktivität

Die mitochondrialen Aktivitäten waren in Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status nicht signifikant verschieden (Abb. 23).

Bei den 51 Oozyten, die eine hohe G-6-PDH-Aktivität aufwiesen (BCB<sup>-</sup>), wurde eine mittlere Fluoreszenzintensität von  $266,1 \pm 46,7 \mu\text{A}$  ermittelt. Bei den 102 Oozyten, die eine niedrige G-6-PDH-Aktivität aufwiesen (BCB<sup>+</sup>), wurde mit einem mittleren Wert von  $318,1 \pm 37,0 \mu\text{A}$  eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität festgestellt, die sich aber nicht signifikant von der Fluoreszenzintensität der BCB<sup>-</sup> Oozyten unterschied.



**Abb. 23:** Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von ihrer G-6-PDH-Aktivität (BCB<sup>-</sup> = hoch; BCB<sup>+</sup> = niedrig; LSM  $\pm$  SE)

#### 4.5.5 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration

Eine signifikante Abhängigkeit der mitochondrialen Aktivität in Oozyten von der Chromatinkonfiguration wurde bei den untersuchten Oozyten nicht festgestellt (Tab. 9).

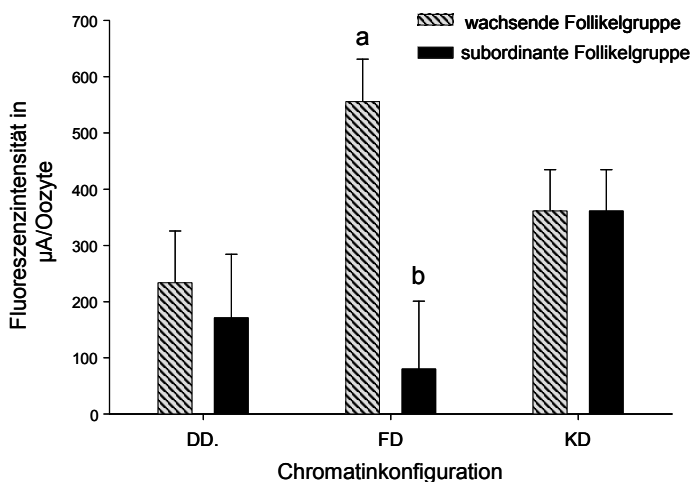
Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten waren im Mittel bei Oozyten mit fibrillärem Diplotän (FD) und bei Oozyten, die der Chromatinkonfigurationsgruppe Metaphase II (MII) zugeordnet worden waren, am höchsten. Es erschien trotzdem sinnvoll eine tiefergehende Auswertung der mitochondrialen Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlichen Diplotänkonfigurationen vorzunehmen. Die Ergebnisse sind im nächsten Kapitel dargestellt.

**Tab. 9:** Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration

Chromatinkonfiguration		Oozyten (n)	Mitochondriale Aktivität LSM ± SE ( $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ )
Diffuses Diplotän	(DD)	20	208,6 ± 73,7
Fibrilläres Diplotän	(FD)	25	423,4 ± 65,9
Kondensiertes Diplotän	(KD)	59	297,4 ± 42,9
Metaphase I	(MI)	27	294,5 ± 63,4
Metaphase II	(MII)	10	411,6 ± 104,2
Pyknotisches Chromatin	(Pykn.)	5	69,4 ± 147,3
Ohne Chromatin	(Ohne)	7	185,6 ± 124,5

#### 4.5.6 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlicher Diplotänkonfiguration in Abhängigkeit von der Follikelgruppe

Zwischen Oozyten aus wachsenden und subordinanten Follikelgruppen, deren Kerne eine der verschiedenen Konfigurationen des Diplotäns aufwiesen, waren keine signifikanten Unterschiede bei ihren mitochondrialen Aktivitäten feststellbar. Allerdings war die mitochondriale Aktivität in Oozyten mit einem fibrillären Diplotän in der Tendenz höher, wenn die Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen stammten ( $p < 0,1$ ; Abb. 24).

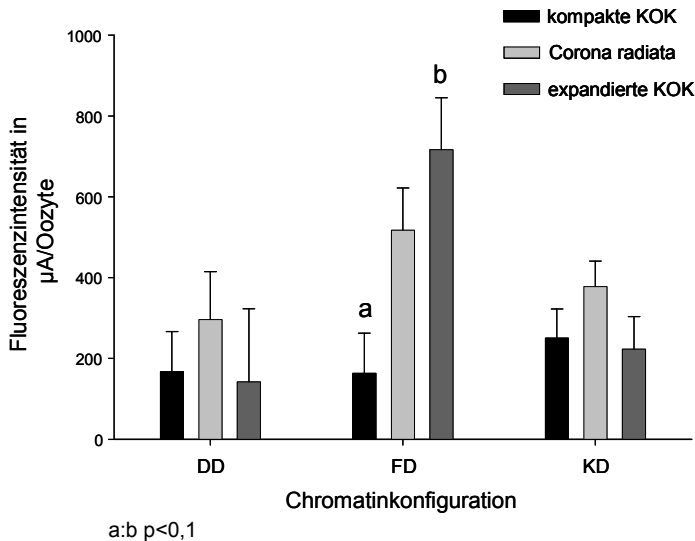
**Abb. 24:** Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlicher Diplotänkonfiguration in Abhängigkeit von der Follikelgruppe (LSM ± SE)a:b  $p < 0,1$



#### 4.5.7 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlicher Diplotänkonfiguration in Abhängigkeit von der Kumulismorphologie

Zwischen Oozyten mit verschiedenen Kumulismorphologien, deren Kerne eine der drei Konfigurationen des Diplotäns aufwiesen, waren keine signifikanten Unterschiede bei den mittleren mitochondrialen Aktivitäten in den Oozyten feststellbar. Allerdings war die mitochondriale Aktivität in Oozyten mit fibrillärem Diplotän in der Tendenz höher, wenn die Oozyten von einem expandierten, anstelle eines kompakten Kumulus umgeben waren (Abb. 25).

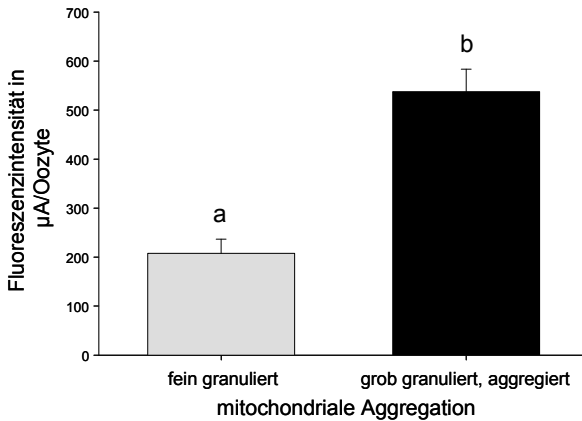
**Abb. 25:** Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlicher Diplotänkonfiguration in Abhängigkeit vom Kumuluszustand (LSM  $\pm$  SE)



#### 4.5.8 Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit vom mitochondrialen Aggregationsmuster

Bei den Untersuchungen wurde eine signifikante Abhängigkeit der mitochondrialen Aktivität in den Oozyten von deren mitochondrialen Aggregationsmuster festgestellt (Abb. 26).

Mit einer mittleren Fluoreszenzintensität/Oozyte von  $538,0 \pm 28,5 \mu\text{A}$  war in Oozyten, deren Mitochondrien ein grob granuliertes, aggregiertes Verteilungsmuster aufwiesen ( $n=43$ ), die mitochondriale Aktivität signifikant höher ( $p < 0,0001$ ) als in Oozyten, deren Mitochondrien ein fein granuliertes Verteilungsmuster aufwiesen ( $n=110$ ).



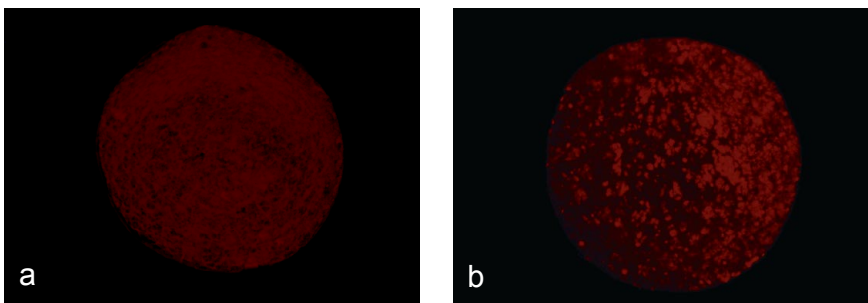
**Abb. 26:**  
Mitochondriale Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von ihrem mitochondrialen Aggregationsmuster (LSM  $\pm$  SE)

a:b  $p < 0,0001$

#### 4.6 Untersuchungen zur mitochondrialen Aggregation in den gewonnenen Oozyten

Für die Untersuchungen wurden bei 153 Oozyten nach einer Färbung mit MitoTracker CMTM Ros das Verteilungsmuster der Mitochondrien beurteilt. Dabei wurde zwischen Oozyten mit fein granulierten Mitochondrien (Abb. 27 a) und Oozyten mit grob granulierten, aggregierten Mitochondrien (Abb. 27 b) unterschieden.

**Abb. 27:** Mitochondriale Aggregationsmuster in equinen Oozyten (250x, MitoTracker Orange CMTM Ros, M-7510 Färbung)



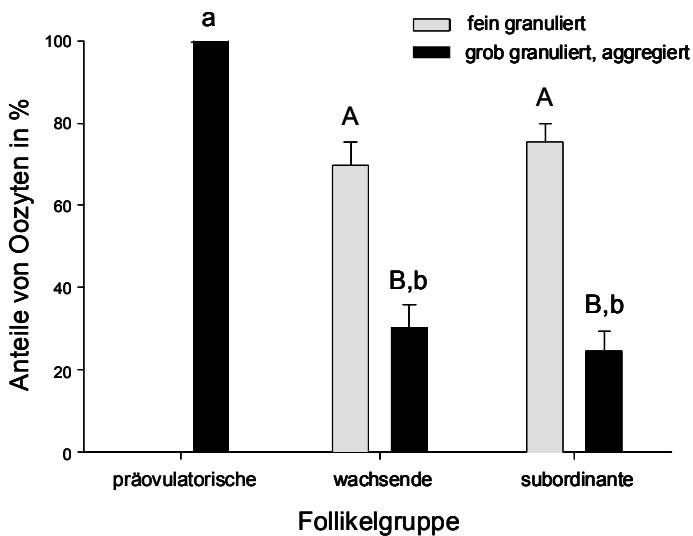
- a: Fein granuliertes mitochondriales Aggregationsmuster in equiner Oozyte, von einem kompakten Kumulus-Oozyten-Komplex aus einer wachsenden Follikelpopulation
- b: Grob granuliertes, aggregiertes mitochondriales Aggregationsmuster in equiner Oozyte, mit nur Corona radiata Zellen aus einem präovulatorischen Follikel

#### 4.6.1 Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit von der Follikelgruppe

Die Oozyten aus präovulatorischen Follikeln wiesen ein grob granuliertes, aggregiertes mitochondriales Verteilungsmuster auf. Unter den Oozyten aus wachsenden und unter den Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen befanden sich sowohl Oozyten mit fein granulierten als auch mit grob granulierten mitochondrialen Verteilungsmustern (Abb. 28).

Signifikant häufiger wurden in wachsenden und subordinanten Follikelgruppen Oozyten gefunden, deren Mitochondrien ein fein granuliertes Verteilungsmuster aufwiesen ( $p < 0,0001$ ).

**Abb. 28:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher mitochondrialer Aggregation in Abhängigkeit von der Follikelgruppe (LSM  $\pm$  SE)



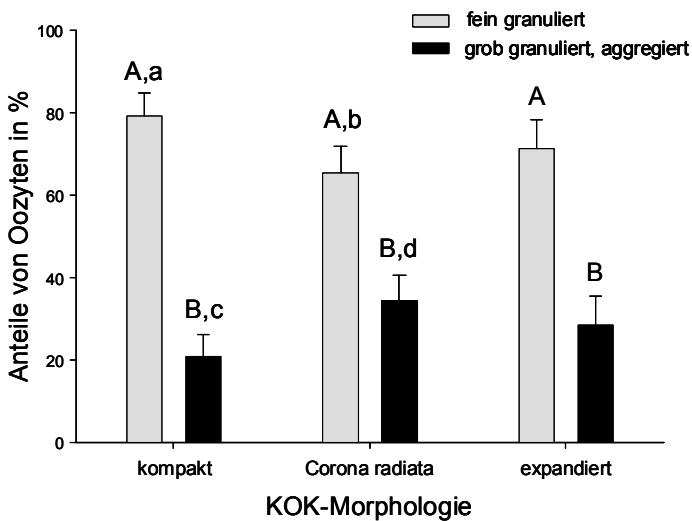
a:b  $p < 0,05$  (zwischen den Follikelgruppen)

A:B  $p < 0,001$  (innerhalb der Follikelgruppen)

#### 4.6.2 Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit von der Kumulusemorphologie

Oozyten mit verschiedenen Kumulusemorphologien unterschieden sich nicht signifikant in ihren Anteilen unterschiedlicher mitochondrialer Aggregationsmuster von einander (Abb. 29). In den drei verschiedenen KOK-Morphologieklassen ließen sich jeweils signifikant größere Anteile Oozyten finden, deren Mitochondrien in fein granulierter Verteilung vorlagen ( $p < 0,001$ ). Der Anteil Oozyten mit Mitochondrien in fein granulierter Verteilungsform war doppelt bis dreifach höher. Oozyten von kompakten KOK zeigten mit einem Anteil von  $79,2 \pm 5,6\%$  tendenziell häufiger eine fein granulierte mitochondriale Aggregation als Oozyten, die nur eine Corona radiata besaßen ( $p < 0,11$ ). Von ihnen wiesen  $65,5 \pm 6,3\%$  ein fein granuliertes Aggregationsmuster auf.

**Abb. 29:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher mitochondrialer Aggregation in Abhängigkeit vom Kumulusezustand (LSM  $\pm$  SE)



A:B  $p < 0,001$  (innerhalb der KOK-Morphologiegruppen)

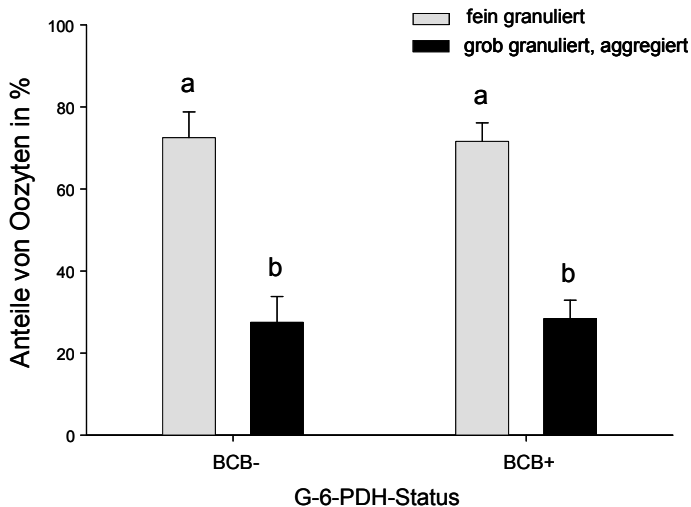
a:b; c:d  $p = 0,11$  (zwischen den KOK-Morphologiegruppen)

#### 4.6.3 Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit von dem G-6-PDH Status der Oozyten

Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PD-Status unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich ihrer mitochondrialen Aggregationsmuster (Abb. 30).

Sowohl unter Oozyten mit einer hohen Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>-</sup>, n=51) als auch unter Oozyten mit einer niedrigen Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>+</sup>, n=102) wurden signifikant größere Anteile Oozyten mit Mitochondrien in fein granulierter Aggregation gefunden ( $p < 0,0001$ ). Der Anteil Oozyten mit einer fein granulierten mitochondrialen Aggregation betrug unter den BCB<sup>-</sup> Oozyten  $72,5 \pm 6,3\%$  und unter den BCB<sup>+</sup> Oozyten  $71,6 \pm 4,5\%$ .

**Abb. 30:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher mitochondrialer Aggregation in Abhängigkeit von ihrer G-6-PDH-Aktivität (BCB<sup>-</sup>= hoch; BCB<sup>+</sup>= niedrig; LSM  $\pm$  SE)



a:b  $p < 0,0001$

#### 4.6.4 Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit zu ihrem G-6-PDH Status und der Kumulusemorphologie

Bei Oozyten mit einer hohen Aktivität der G-6-PDH war die Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlichem mitochondrialen Aggregationsmuster signifikant von der Morphologie des Kumulus der Oozyten abhängig. Innerhalb der Oozytengruppe mit niedriger G-6-PDH-Aktivität (BCB<sup>-</sup>) konnte keine Beziehung zwischen Kumulusemorphologie und der mitochondrialen Aggregationszustand festgestellt werden. (Tab. 10).

Mit der Ausnahme von Oozyten, die eine hohe Aktivität der G-6-PDH aufwiesen (BCB<sup>+</sup>) und nur eine Corona radiata besaßen, wurden bei einer Untergliederung der Oozyten nach ihrem G-6-PDH Status und der Kumulusemorphologie in allen Untergruppen signifikant größere Anteile Oozyten mit Mitochondrien in fein granulierter Aggregationsform gefunden ( $p < 0,01$ ). Innerhalb der Gruppe von Oozyten mit einer hohen Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>+</sup>), war der Anteil Oozyten, die ein grob granuliertes, aggregiertes Verteilungsmuster ihrer Mitochondrien aufwiesen, bei den Oozyten aus kompakten KOK signifikant kleiner als bei Oozyten mit gleichem G-6-PDH Status, die nur eine Corona radiata besaßen ( $p < 0,05$ ). Ihr Anteil war tendenziell geringer gegenüber den Oozyten von expandierten KOK, die ebenfalls eine hohe Aktivität der G-6-PDH aufwiesen ( $p = 0,12$ ). Zudem war der Anteil Oozyten mit grob granulierten, aggregierten Mitochondrien tendenziell bei den Oozyten mit einem kompakten Kumulus geringer, wenn sie eine hohe G-6-PDH-Aktivität (BCB<sup>+</sup>) aufwiesen ( $p = 0,11$ ).

**Tab. 10:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher mitochondrialer Aggregation in Abhängigkeit zu ihrem G-6-PDH Status und der Kumulusemorphologie

G-6-PDH Status	Kumulus-Morphologie	mitochondriale Aggregation LSM ± SE (%)	
		fein granuliert	grob granuliert, aggregiert
BCB <sup>-</sup>	kompakt	93,3 ± 6,4 <sup>a</sup>	6,7 ± 6,4 <sup>a</sup>
	Corona radiata	55,6 ± 11,7 <sup>b</sup>	44,4 ± 11,7 <sup>b</sup>
BCB <sup>+</sup>	expandiert	72,2 ± 10,6 <sup>c</sup>	27,8 ± 10,6 <sup>c</sup>
	kompakt	73,7 ± 7,1 <sup>d</sup>	26,3 ± 7,1 <sup>d</sup>
BCB <sup>+</sup>	Corona radiata	70,0 ± 7,3	30,0 ± 7,3
	expandiert	70,8 ± 9,3	29,2 ± 9,3

In Spalten: a:b  $p < 0,05$ ; a:c  $p = 0,12$ ; a:d  $p = 0,11$

#### 4.6.5 Mitochondriale Aggregation in Oozyten in Abhängigkeit zur Chromatinkonfiguration

Außer in Oozyten, die keinen Kern besaßen, wurden bei allen verschiedenen Chromatinkonfigurationsgruppen sowohl Oozyten mit fein granulierten als auch Oozyten mit grob granulierten, aggregierten Mitochondrien vorgefunden. Während bei der Chromatinkonfigurationsgruppe MII die Anteile Oozyten mit fein granulierten und grob granulierten, aggregierten Mitochondrien identisch waren, wurden bei den übrigen Chromatinkonfigurationsgruppen signifikant größere Anteile Oozyten mit fein granulierter mitochondrialer Aggregation vorgefunden ( $p < 0,05$ ). Mitochondrien von Oozyten, die kein Chromatin besaßen, lagen ausnahmslos im fein granulierten Aggregationsmuster im Ooplasma vor. Oozyten, die der Chromatinkonfigurationsgruppe MII zugeordnet wurden, besaßen gegenüber den Oozyten ohne Chromatin einen signifikant kleineren Anteil Oozyten mit einem fein granulierten mitochondrialen Aggregationsmuster ( $p < 0,05$ ). In der Tendenz wiesen auch Oozyten mit einem fibrillären Diplotän ( $p < 0,1$ ) und einem kondensierten Diplotän ( $p = 0,11$ ) sowie Oozyten, die der Chromatinkonfigurationsgruppe MI zugeordnet wurden ( $p = 0,11$ ), gegenüber den Oozyten ohne Chromatin einen kleineren Anteil Oozyten mit einem fein granulierten mitochondrialen Aggregationsmuster auf.

**Tab. 11:** Häufigkeitsverteilung von Oozyten mit unterschiedlicher mitochondrialer Aggregation in Abhängigkeit zur Chromatinkonfiguration

Chromatinkonfiguration		mitochondriale Aggregation LSM $\pm$ SE (%)	
		fein granuliert	grob granuliert, aggregiert
Diffuses Diplotän	(DD)	75,0 $\pm$ 9,7	25,0 $\pm$ 9,7
Fibrilläres Diplotän	(FD)	68,0 $\pm$ 9,3 <sup>a</sup>	32,0 $\pm$ 9,3
Kondensiertes Diplotän	(KD)	72,8 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	27,2 $\pm$ 5,8
Metaphase I	(MI)	70,4 $\pm$ 8,8 <sup>c</sup>	29,6 $\pm$ 8,8
Metaphase II	(MII)	50,0 $\pm$ 15,8 <sup>d</sup>	50,0 $\pm$ 15,8
Pyknotisches Chromatin	(Pykn.)	80,0 $\pm$ 17,9	20,0 $\pm$ 17,9
Ohne Chromatin	(Ohne)	100,0 $\pm$ 0,0 <sup>e</sup>	0,0 $\pm$ 0,0

a:e  $p < 0,1$ ; b:e, c:e  $p = 0,11$ ; d:e  $p < 0,05$

## 5 Diskussion

### 5.1 Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen mittels transvaginaler ultraschallgeleiteter Follikelaspiration aus entwicklungsphysiologisch differenten Follikelpopulationen

#### 5.1.1 Experimentelles Design

Ziel des tierexperimentellen Designs war es, durch wiederholte transvaginale Follikelpunktionen Eizellen zu gewinnen, die aus verschiedenen, definierten physiologischen Entwicklungsstadien von Follikelpopulationen stammen sollten. Durch morphologische Untersuchungen der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) und Erhebungen von chromosomalen und zytoplasmatischen Parametern der Eizellqualität an den gewonnenen Oozyten sollte insbesondere der Einfluss der folliculären Herkunft auf die Eigenschaften von Oozyten näher beschrieben werden. Dazu wurde davon ausgegangen, dass bei Stuten während einer Rosse ein bis zwei präovulatorische Rossefollikel von mindestens 35 mm ausgebildet werden (Hohenhaus und Bostedt, 1992), in denen sich 24 Stunden nach dem Verabreichen eines LH-Rezeptoragonisten (hCG) eine Eizelle am Ende der präovulatorischen Follikelreifung befindet (Ginther et al., 2007a). Weiterhin wurde für die Versuchsplanung angenommen, dass zum Zeitpunkt der Rosse neben dem präovulatorischen Follikel eine subordinante Follikelgruppe vorhanden ist, deren Follikel regressiv sind (Pederson, 2000) und sich größtenteils in einem unterschiedlich stark ausgeprägten Stadium der Atresie befinden (Watson et al., 2002b; Belin et al., 2000; Gerard und Monget, 1998). Zur Erstellung einer dritten Follikelgruppe in einem frühen Entwicklungsstadium, wurde davon ausgegangen, dass sich durch die Aspiration aller Follikel mit einer Mindestgröße von 5 mm (Follikelablation) eine neue Follikelwelle induzieren lässt (Ginther et al., 2008b; Gastal et al., 2004; Gastal et al., 2000), die bis zur Ausprägung der Dominanz eines Follikels in der neu herangewachsenen Follikelgruppe, hauptsächlich wachsende, vitale Follikel enthält (Kanitz et al., 2000; Gastal et al., 1997). Ein equiner Follikel erwirbt die Dominanz über eine neu heranwachsende Follikelkohorte in dem Zeitraum, in dem er einen Durchmesser von ca. 23 mm als erster erreicht (Ginther et al., 2008a; Gastal et al., 1997). Die Ergebnisse, insbesondere die Untersuchungen zur KOK-Morphologie und zu den Steroidgehalten in den Follikelflüssigkeiten, konnten das experimentelle Design zur gezielten Gewinnung von Oozyten aus unterschiedlichen folliculären Herkünften bestätigen.

#### 5.1.2 Steroidanalysen der Follikelflüssigkeiten

Um eine genauere Charakterisierung des Entwicklungsstadiums der Follikel der verschiedenen Follikelgruppen vornehmen zu können, wurden repräsentative Stichproben von Follikelflüssigkeiten der zunächst klinisch definierten Follikelgruppen gezogen. Anschließend wurden sie auf ihre Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) und Progesteron (P<sub>4</sub>) hin untersucht. Die Konzentration von E<sub>2</sub> war im Mittel mit 1911,4  $\pm$  184,4 ng/ml in der Follikelflüssigkeit von präovulatorischen Follikeln gegenüber den anderen Follikelgruppen signifikant am höchsten. Der Quotient aus Östradiol-17 $\beta$  und Progesteron zeigte, dass die präovulatorischen Follikel mit einem Wert von 65,1  $\pm$  6,3 ein Steroidverhältnis zu starken Gunsten des Östradiols aufwiesen. Damit wiesen diese Follikel ähnliche Steroidgehalte auf, wie sie für präovulatorische Follikel bei Stuten als charakteristisch beschrieben werden (Fürst, 2003; Collins et al., 1997; Watson und Hinrichs, 1988). Die Progesteronkonzentration



in der Follikelflüssigkeit war jedoch niedriger als bei Collins et al. (1997) beschrieben. Collins et al. (1997) charakterisierten Follikel sehr kurz vor der Ovulation, in denen die Granulosazellen bereits zunehmend Progesteron produzieren. Eine sehr hohe Progesteronsynthese war jedoch 24 Stunden nach einer hCG-Gabe noch nicht zu erwarten, da die meisten Ovulationen erst in einem Zeitintervall von 30 bis 48 Stunden nach einer hCG-Injektion stattfinden (Gastal et al., 2006). Ebenfalls erreichte die mittlere E<sub>2</sub>-Konzentration der präovulatorischen Follikel bei den eigenen Untersuchungen nicht die Höhe der beschriebenen Konzentrationen von Collins et al. (1997). Wie die eigenen Untersuchungen zeigten, konnte die klinische Bestimmung des präovulatorischen Follikels hauptsächlich aufgrund der Größe nicht als zuverlässig gelten. Aus diesem Grund gingen auch die Steroidkonzentrationen von einigen Follikeln mit in die Mittelwertberechnung ein, die klinisch als präovulatorisch beurteilt wurden, jedoch nicht die für präovulatorische Follikel typischen hohen Steroidgehalte aufwiesen. Das könnte ein Grund dafür gewesen sein, dass die mittlere E<sub>2</sub>-Konzentration geringer ausfiel als bei Collins et al. beschrieben. Hohenhaus et al (1992) zeigte, dass im Falle einer Doppelfollikelentwicklung zur Rosse nur die Hälfte der co-dominanten Follikel die ovulatorische Kompetenz erlangt und zur Ovulation kommen. Eine sichere Vorausbestimmung des Ovulationsfollikels schien auch diesen Autoren dabei klinisch nicht möglich. Neuere Untersuchungen zeigten, dass mit einer Verlaufsuntersuchung der Durchblutung der Follikel mittels Dopplersonographie nach einer hCG-Gabe eine exakte Vorausbestimmung des präovulatorischen Follikels möglich ist (Ginther et al., 2007a). Auf diese Weise sollte eine genauere Klassifizierung von präovulatorischen Follikel in zukünftigen Studien möglich sein.

Die gemessenen Steroidgehalte in den Follikelflüssigkeitsproben von wachsenden Follikelgruppen entsprachen den für wachsende, vitale Follikel in der Literatur beschriebenen Steroidkonzentrationen (Becker et al., 2006; Belin et al., 2000; Collins et al., 1997; Kenney et al., 1979). Das Verhältnis aus den Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$  und Progesteron zeigte, dass die wachsenden Follikel ein charakteristisches Steroidverhältnis zu Gunsten des Östradiol-17 $\beta$  aufwiesen. Von den 47 beprobten Follikeln zeigte nur ein Follikel ein Steroidmuster, das dem in subordinanten Follikelgruppen vorgefundenen ähnlich war. Im Gegensatz zu den weiter unten besprochenen inhomogenen Ergebnissen bei der KOK-Morphologie, ließe sich durch die Ergebnisse der Steroidbestimmungen vermuten, dass die wachsende Follikelgruppe sehr homogen war und fast ausschließlich vitale Follikel enthielt.

In den Follikelflüssigkeiten von subordinanten Follikeln wurden gegenüber den anderen Follikelgruppen die signifikant niedrigsten Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$  und die niedrigsten Konzentrationen für Progesteron bestimmt. Auch der Quotient aus den Konzentrationen von Östradiol-17 $\beta$  und Progesteron war in dieser Gruppe signifikant niedriger als bei den anderen Follikelgruppen. Damit wiesen die subordinanten Follikel Steroidkonzentrationen und Verhältnisse auf, wie sie in der Literatur den atretischen Follikeln zugeordnet werden (Watson et al., 2002b; Rödiger, 2000; Belin et al., 2000; Gerard und Monget, 1998; Kenney et al., 1979). Eine Reduktion der Steroidkonzentrationen in den Follikelflüssigkeiten, im besonderem der Östradiolkonzentrationen, bei subordinanten Follikel im periovulatorischen Zeitraum wird als offensichtliches Zeichen ihrer Atresie gewertet (Belin et al., 2000). Bei ihnen ist die Expression der Schlüsselenzyme der Steroidogenese (Aromatase, 3 $\beta$ -HSD, 450<sup>SCC</sup>) in den Granulosazellen abgesenkt. Von den 28 beprobten subordinanten Follikeln zeigten nur zwei Steroidgehalte, die auf einen vitalen Follikel hinwiesen. Damit wurde durch das Ergebnis der Steroidanalyse bei den subordinanten

Follikelgruppen bestätigt, dass die subordinanten Follikelgruppen zum Zeitpunkt der Rosse hauptsächlich aus Follikeln in verschiedenen Stadien der Atresie bestehen (Watson et al., 2002b; Rödiger, 2000; Belin et al., 2000; Gerard und Monget, 1998).

### 5.1.3 Gewinnung von Kumulus-Oozyten-Komplexen

Die Anzahl aspirierter Follikel pro Sitzung und Tier war bei der Aspiration von wachsenden Follikelgruppen gegenüber subordinanten Follikelgruppen tendenziell geringer ( $8,1 \pm 0,3$  gegenüber  $9,0 \pm 0,5$ ). Die Anzahlen an aspirierten Follikeln pro Tier und Sitzung waren etwas höher oder vergleichbar mit den Ergebnissen, die bei kurzen gegenüber langen Intervallen zwischen den Aspirationssitzungen von Bruck et al. (1997) bei Norweger Ponys ( $6,2 \pm 1,5$ ; gegenüber  $9,4 \pm 2,1$ ) und von Galli et al. (2007) bei Haflinger Ponys ( $6,6$ ; gegenüber  $10,6$ ) erzielt worden sind. Sie sind jedoch niedriger als in den Studien von Kanitz et al. (2000) an Mecklenburger Warmblut Stuten unter Verwendung der identischen Technik ( $10,8 \pm 1,06$  gegenüber  $15,3 \pm 1,29$ ). Unter Berücksichtigung der tierindividuellen, rasseindividuellen und versuchsbedingten Einflüsse, ist die Gesamtanzahl von aspirierten Follikeln pro Tier und Aspirationssitzung mit den Ergebnissen der anderen Studien vergleichbar.

Gegenüber anderen KOK-Gewinnungsmethoden *in vitro* sind bei ultraschallgeleiteten transvaginalen Follikelaspirationen geringere KOK-Gewinnungsraten *in vivo* zu erwarten (Alm et al., 1997). Die geringeren KOK-Gewinnungsraten bei der Anwendung der Follikelpunktion, speziell bei Pferden gegenüber anderen Haustierrassen, wird mit einer festen und breiten Verbindung der Oocyte über den Kumulus zur Follikelwand erklärt (Hawley et al., 1995). Trotzdem bleibt die transvaginale Follikelaspiration auch bei der Spezies Pferd die momentan zuverlässigste und zugleich minimal invasive Methode zur wiederholten und gezielten Gewinnung von unreifen Oozyten (Galli et al., 2007). Bei Anwendung der transvaginalen Follikelpunktion wurden niedrigste KOK-Gewinnungsraten von 10,4% bei Einzeltieren beschrieben (Kanitz et al., 2000) und bis zu 48% bei Stutengruppen erreicht (Galli et al., 2007). In den eigenen Untersuchungen wurden bei den Aspirationen von wachsenden und subordinanten Follikelgruppen durchaus mit anderen Arbeitsgruppen vergleichbare KOK-Gewinnungsraten erzielt (Kanitz et al., 2000), auch wenn direkte Vergleiche der eigenen Ergebnisse aufgrund der differentiellen Technik und Versuchschemata nicht immer vollständig möglich sind.

Die KOK-Gewinnungsrate war mit  $27,8 \pm 2,7\%$  in den eigenen Untersuchungen signifikant höher bei der Aspiration von subordinanten Follikelgruppen als von wachsenden Follikelgruppen, in denen eine mittlere KOK-Gewinnungsrate von  $13,1 \pm 2,0\%$  erreicht wurde. Kanitz et al. (2000) erreichten eine durchschnittliche KOK-Gewinnungsrate von 22,1% unter Verwendung der gleichen Technik wie in der vorliegenden Arbeit. Sie stellten keinen Unterschied bei der KOK-Gewinnungsrate fest, wenn die Follikelaspirationen einmal pro Zyklus, nach erfolgter Ovulation oder in einem Intervall von 4-12 Tagen vorgenommen wurden. Hingegen beobachteten Brück et al. (1997) auch eine signifikant niedrigere KOK-Gewinnungsrate in Höhe von 18,4% bei einem kurzen Intervall von 6 Tagen zwischen den Follikelaspirationen im Vergleich zu einer KOK-Gewinnungsrate von 35,8% bei einem langen Intervall von 23 Tagen zwischen den Aspirationssitzungen. Bei der vorliegenden Untersuchung betrug das Intervall zwischen einer Follikelablation und der Aspiration der wachsenden Follikelgruppe, bevor sich ein dominanter Follikel entwickelt hatte, durchschnittlich 6,8 Tage. Gastal et al. (2004) stellten ebenfalls fest, dass das Intervall zwischen einer Follikelablation und der Herausbildung eines dominanten Follikels aus der

Follikelkohorte 6,5 Tage beträgt. Nach dem Erscheinen eines dominanten Follikels auf einem Ovar, sowie einige Tage nach erfolgter Ovulation, ist mit einer Mischpopulation aus vitalen und atretischen Follikeln auf den Ovarien zu rechnen (Rödiger und Bostedt, 2004; Belin et al., 2000). Da bei den Untersuchungen von Kanitz et al. (2000) ein Intervall von bis zu 12 Tagen zwischen den in kürzeren Zeitintervallen aufeinander folgenden Follikelaspirationen zugelassen wurde, kann vermutet werden, dass in diesen Follikelpunkten auch Mischpopulationen aus atretischen und vitalen Follikeln bei den Follikelaspirationen aspiriert wurden. Deshalb könnte sich in den Untersuchungen von Kanitz et al. (2000) kein signifikanter Unterschied zu der Gewinnungsrate bei einem länger gewählten Zeitintervall ergeben haben. Bei dem kurzen 6 Tage Intervall von Brück et al (1997) könnten dagegen ebenfalls mehr wachsende, vitale Follikel gegenüber dem länger gewählten Zeitintervall aspiriert worden sein, womit die Ähnlichkeit der Untersuchungsergebnisse von Brück et al. (1997) mit den eigenen Ergebnissen und eine bessere Vergleichbarkeit zu erklären wäre. Die verschiedenen KOK-Gewinnungsraten bei den wachsenden und subordinanten Follikelgruppen könnten als Hinweis gewertet werden, dass sich mehr vitale Follikel in der wachsenden Follikelgruppe und mehr atretische Follikel in der subordinanten Follikelgruppe befunden haben. Da es mit beginnender Atresie eines Follikels zur Expansion des Kumulus oophorus kommt (Hinrichs und Williams, 1997) und damit verbunden sich die Verbindung des KOK zur Follikelwand lockert, könnten die Gewinnungsraten bei wachsenden, vitalen Follikeln niedriger sein als bei subordinanten, atretischen Follikeln. Auch andere Untersucher erreichten die signifikant höchsten Oozytengewinnungsraten bei den Follikelaspirationen im Zyklusstadium des Östrus (Cook et al., 1993, Franz et al., 2001), in dem die subordinanten Follikel alle als atretisch gewertet werden können (Watson et al., 2002b; Belin et al., 2000; Gerard und Monget, 1998). Brück et al. (1997) vermuteten ebenfalls einen höheren Anteil atretischer Follikel auf einem Ovar als Grund für das Zustandekommen von hohen KOK-Gewinnungsraten. Jedoch wurde unter Laborbedingungen diese These nicht belegt, da sich kein Unterschied in der KOK-Gewinnungsrate bei der Aspiration von atretischen und vitalen Follikeln *in vitro* zeigte (Hinrichs, 1991). Es muss aber beachtet werden, dass die Bedingungen einer Follikelaspiration *in vivo* und *in vitro* nicht unbedingt vergleichbar sind (Alm et al., 1997). In den Untersuchungen stellte sich heraus, dass für die KOK-Gewinnung aus wachsenden Follikelgruppen annähernd doppelt so viele Aspirationssitzungen durchgeführt und eine annähernd doppelte Anzahl Follikeln aspiriert werden musste, um eine vergleichbare Anzahl KOK aus wachsenden Follikelgruppen zu gewinnen (Tab. 3). Die signifikant höhere Anzahl gewonnener KOK pro Tier und Sitzung bei der Aspiration von subordinanten Follikelgruppen ist eindeutig auf die mehr als zweifach höhere KOK-Gewinnungsrate in dieser Gruppe gegenüber der wachsenden Follikelgruppe zurückzuführen. Zwar war auch die Anzahl an aspirierten Follikeln pro Tier und Sitzung bei den subordinanten Follikelgruppen tendenziell höher als bei den wachsenden Follikelgruppen, jedoch bestand die Differenz in nur einem Follikel (9,0 vs. 8,1). Deshalb kann die Follikeldifferenz nicht als vollständige Ursache für die differente Anzahl gewonnener KOK zwischen den Gruppen angesehen werden. Auch Brück et al. (1997) sehen in einer erhöhten KOK-Gewinnungsrate den Grund für eine höhere Anzahl KOK pro Aspirationssitzung bei längeren Intervallen zwischen Aspirationssitzungen. Zur Gewinnung von Oozyten aus präovulatorischen Follikeln wird empfohlen, Stuten zuvor hCG zu verabreichen, wenn der dominante Follikel eine Größe von 33-36 mm aufweist und eine Aspiration des Follikels 24-36 Stunden nach der Gabe durchzuführen (Carnevale und Maclellan, 2006). Bei diesem Vorgehen werden höhere KOK-Gewinnungsraten bei reifen

Follikeln erreicht, als bei unreifen Follikeln (Hinrichs et al., 1990). Wurden KOK-Gewinnungsraten (in %) nach Aspirationen präovulatorischer Follikel verglichen, die 24 Stunden (66%) und 35 Stunden (73%) nach einer hCG-Gabe durchgeführt wurden, ergab sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Gewinnungsraten (Coutinho da Silva et al., 2002). Hinrichs et al. (2000), die Zeitspannen von 22 Stunden (75%) und 33 Stunden (82%) zwischen den hCG-Gaben und den Aspirationen von präovulatorischen Follikeln wählten, stellten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den erreichten KOK-Gewinnungsraten fest. Die transvaginalen Aspirationen von 47 präovulatorischen Follikeln 24 Stunden nach einer Injektion von 2500 IE hCG resultierten bei den eigenen Untersuchungen in nur zwei KOK (Gewinnungsrate von  $4,2 \pm 2,9\%$ ). Der Grund für die geringe Gewinnungsrate ist in der verwendeten Technik zu sehen. Als wesentlich erscheint, dass in Studien, die KOK-Gewinnungsraten von 70-80% bei präovulatorischen Follikeln erreichten, ausnahmslos Systeme und Kanülen mit einem größeren Durchmesser von 12-16 Gauge verwendet wurden (Ginther et al., 2007a; Hinrichs et al., 1990). Zusätzliche technische Modifikationen der KOK-Gewinnung auf der Basis von großlumigen Kanülen führten bei verschiedenen Untersuchern zu keiner weiteren Maximierung der Gewinnungsraten (Ginther et al., 2007a; Scott et al., 2001; Hinrichs et al., 1990). Damit scheint der geringe Durchmesser der verwendeten Aspirationskanüle der Haupteinflussfaktor für die niedrigeren KOK-Gewinnungsraten bei präovulatorischen Follikeln in den eigenen Untersuchungen zu sein.

Ein biologischer Einflussfaktor auf die KOK-Gewinnungsrate könnte sich bei den eigenen Arbeiten auch dadurch ergeben haben, dass bei den Stuten bis zu fünf mal wiederholt in der Zuchtsaison ein präovulatorischer Follikel nach einer hCG-Gabe aspiriert wurde. Durch Studien wurde gezeigt, dass die KOK-Gewinnungsrate von präovulatorischen Follikeln bei hCG-naiven Stuten nach den ersten hCG-Gaben mit 69,5% signifikant höher war als die KOK-Gewinnungsrate bei Stuten, die bereits wiederholt eine hCG-Gabe erhalten hatten. Bei ihnen wurde eine KOK-Gewinnungsrate von 15,7% erreicht (Hylan et al., 2002). Die Autoren zeigten einen fehlenden stimulativen Effekt auf den präovulatorischen Follikel bei der wiederholten hCG-Gabe als Grund für die niedrigen KOK-Gewinnungsraten auf. Als biologischer Einflussfaktor wird eine Antikörperbildung gegen hCG bei der wiederholten Anwendung vermutet. Ergänzend zeigten neuere Untersuchungen einen negativen Einfluss von hCG-Antikörpern im Blut von Stuten auf die hCG induzierte Follikel- und Eizellreifung (Siddiqui et al., 2009).

#### **5.1.4 Kumulismorphologie der gewonnenen Oozyten**

Die Morphologie von KOK ist mit der funktionalen Entwicklung der Follikel verbunden. Mit der Atresie eines Follikels ist eine zunehmende Expansion der Kumuluszellen zu beobachten (Hinrichs und Williams, 1997; Kenney et al., 1979). Kompakte KOK hingegen werden vitalen und dominanten Follikeln zugeordnet (Rödiger, 2000; Kanitz et al., 2000) und mit der präovulatorischen Reifung eines Follikels kommt es vor der Ovulation zu einer Expansion der Kumuluszellen (Grondahl et al., 1995). Einen weiteren Einfluss auf die Kumulismorphologie und das Verhältnis der verschiedenen KOK-Morphologieklassen zueinander hat die Gewinnungsmethode. Wird beim Auskratzen von Follikeln (Scraping) ein ausgeglichenes Verhältnis von kompakten und expandierten KOK bei Ovarien unbekannter Herkunft vorgefunden (Alm und Hinrichs, 1996), so nimmt der Anteil expandierter KOK bei der Aspiration der Follikel in vitro gegenüber den kompakten KOK ab und es werden zunehmend auch Oozyten gewonnen, die nur von Zellen der Corona radiata oder unvollständigem

Kumulus umgeben sind (Torner und Alm, 1995; Hinrichs, 1991). Die Autoren gingen davon aus, dass die KOK-Gewinnungsraten *in vitro* bei den verschiedenen funktionalen Entwicklungsstadien der Follikel gleich sind und dass die KOK-Morphologie keine Beziehung zur Gewinnungsrate besitzt. Die kompakten KOK stellten in den eigenen Untersuchungen mit  $44,0 \pm 5,7\%$  die häufigste KOK-Morphologiekategorie bei den KOK aus den wachsenden Follikelgruppen dar. Ihr Anteil war gegenüber dem Anteil kompakter KOK aus subordinanten Follikelgruppen signifikant höher. Bei den Untersuchungen von Kanitz et al. (2000) wurden bei aufeinander folgenden Follikelaspirationen im Zeitabstand von 4-12 Tagen 51,9% kompakte KOK gefunden. Der Anteil kompakter KOK ist in den eigenen Untersuchungen damit etwas niedriger, jedoch durchaus in vergleichbaren Proportionen aufgetreten und als Hinweis auf einen höheren Anteil vitaler, wachsender Follikeln in dieser Follikelgruppe zu werten. Unter den KOK aus der wachsenden Follikelgruppe befand sich aber auch ein Anteil von  $32,0 \pm 5,0\%$  expandierter KOK. Da Rödiger (2000) zeigen konnte, dass dominante, vitale Follikeln nur kompakte KOK enthalten, ist zu vermuten, dass sich unter den Follikeln der wachsenden Follikelgruppen auch bereits Follikel in Atresie befanden. Zum einem kann vermutet werden, dass sich vor der Ausprägung der Dominanz eines Follikels in einer wachsenden Follikelkohorte bereits frühzeitig einige Follikel in Atresie übergehen (Gastal et al., 2004). Zum anderen wurden expandierte KOK auch bei einem Zeitintervall von 2 (Duchamp et al., 1995) oder 4 Tagen (Kanitz et al., 2000) zwischen wiederholten Follikelaspirationen gefunden. Die Autoren vermuten, dass nicht alle Follikel auf dem Ovar durch eine Aspiration dauerhaft beseitigt werden, sich einige Follikel wieder mit Flüssigkeit füllen und erneut im Ultraschallbild darstellen. Beide Quellen und die eigenen Ergebnisse legen nahe, dass es nicht möglich ist, durch eine Follikelablation aller Follikel auf dem Stutenovar eine neue Population aus wachsenden Follikeln zu induzieren, die ausschließlich aus vitalen Follikeln besteht. Auf jeden Fall ist es aber möglich eine neue Follikelwelle zu induzieren, die in der Mehrzahl aus vitalen Follikeln besteht. Eine genauere Charakterisierung der follikulären Herkunft könnte *in vitro* durch weitere endokrinologische und histologische Untersuchungen jedes einzelnen Follikels gewährleistet werden. Bei den KOK der subordinanten Follikelgruppe waren Oozyten, die nur von den Zellen der Corona radiata umgeben waren, mit einem Anteil von  $45,6 \pm 5,4\%$  am häufigsten vertreten. Dieser Wert war gegenüber dem Anteil dieser Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen tendenziell höher. Die Oozyten, die nur von den Zellen der Corona radiata umgeben waren, lassen sich aufgrund des fehlenden Kumulus nicht eindeutig zuordnen und bilden daher eine eigenständige Morphologiekategorie (Torner und Alm, 1995). Beim Ausschaben von Follikeln, welches die Kumuluszellen schont, wird ein ausgeglichenes Verhältnis von kompakten und expandierten KOK erzielt (Alm und Hinrichs, 1996). Bei der Aspiration von Follikeln *in vitro* nimmt hingegen der Anteil expandierter KOK ab und es werden stattdessen zunehmend Oozyten gewonnen, die nur von den Zellen der Corona radiata umgeben sind. Der Anteil kompakter KOK bleibt dagegen unverändert (Torner und Alm, 1995; Hinrichs, 1991). Es liegt nahe, dass die Corona radiata KOK-Morphologie, durch die mechanische Einwirkung bei der Follikelaspiration entsteht und sich diese KOK-Morphologiekategorie hauptsächlich aus der Gruppe der expandierten KOK generiert, bei denen der Kumuluszellverband bereits gelockert ist. Die eigenen Untersuchungen der Oozyten konnten speziell bei der Untersuchung der Kernkonfiguration, der mitochondrialen Aktivität und der mitochondrialen Aggregation zeigen, dass Oozyten mit einem expandierten Kumulus und Oozyten, die nur eine Corona radiata besaßen, in den gemessenen Parametern nicht differierten, sich aber beide signifikant von den Oozyten mit kompaktem Kumulus unterschieden. Zudem wurden

aus präovulatorischen Follikeln nur Corona radiata Oozyten gewonnen, obwohl nur expandierte KOK aus diesen Follikeln erwartet werden (Grondahl et al., 1995). Deshalb kann vermutet werden, dass die Oozyten mit expandiertem Kumulus und Oozyten die nur eine Corona radiata aufwiesen einer physiologisch gleichen Gruppe angehören. In den einzelnen Kapiteln zu den Qualitätsparametern der Eizellen wird auf diesen Aspekt genauer eingegangen und gezeigt, dass sich die Oozyten mit nur Corona radiata sogar als Oozyten auffassen lassen, die vielleicht einem Follikel in fortgeschrittener Atresie entstammen könnten. Werden Oozyten, die nur eine Corona radiata besaßen und expandierte KOK zu einer Gruppe zusammengefasst, so ist ihr Anteil mit  $73,3 \pm 4,4\%$  unter den KOK aus subordinanten Follikeln signifikant größer als ihr Anteil unter den KOK aus wachsenden Follikelgruppen mit  $56 \pm 5,0\%$  ( $p < 0,05$ ). Damit ergibt sich ein weiterer Hinweis auf einen hohen Anteil atretischer Follikel in den subordinanten Follikeln. Rödiger (2000) fand einen Anteil von 71% expandierter KOK in histologisch nachweislich atretischen Follikeln. Da auch bei Rödiger (2000) kompakte KOK aus histologisch atretischen Follikeln isoliert wurden, ist anzunehmen, dass sich KOK in frühen Stadien der Follikelatresie noch morphologisch als kompakt darstellen können.

## 5.2 Untersuchungen zur Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in den gewonnenen Oozyten

Die Oozyten wurden nach einer Brillant-Cresyl-Blau-Färbung einem G-6-PDH-Aktivitätsstatus zugeordnet. Wie bereits an bovinen Oozyten gezeigt wurde, ist es durch diese Färbemethode möglich, Oozyten mit unterschiedlicher Aktivität der G-6-PDH zu selektieren. Oozyten mit einer niedrigen Aktivität der G-6-PDH zeigen demnach eine Blaufärbung (BCB<sup>+</sup>) während in Oozyten mit einer hohen Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>-</sup>) der Farbstoff in eine farblose Form überführt wird (Alm et al., 2005). Von den 153 ausgewerteten Oozyten wurden 51 dem BCB<sup>-</sup> Status (=hohe G-6-PDH-Aktivität) und 102 Oozyten dem BCB<sup>+</sup> Status zugeordnet. Bei der Färbung von Stutenoozyten mit Brillant-Cresyl-Blau sind die Farbunterschiede nicht so kräftig und eindeutig ausgeprägt wie bei bovinen Oozyten. Die BCB<sup>+</sup> Oozyten zeigten häufig nur eine leichte Färbung. Dennoch ermöglichte es diese Färbetechnik, auch equine Oozyten von Tertiärfollikeln in zwei verschiedene Gruppen einzuteilen. Es finden sich keine Untersuchungen, ob die BCB-Färbung in gleichem Maße mit der G-6-PDH-Aktivität in Oozyten der Spezies Pferd korreliert ist und ob ein Färbeprotokoll wie es beim Rind (Alm et al., 2005) oder Ziege (Rodriguez-Gonzalez et al., 2002) angewendet wird, einer Modifikation bedarf. Bei den eigenen Untersuchungen konnten Oozyten mit unterschiedlichem BCB-Färbeverhalten bei den einzelnen BCB-Färbedurchgängen identifiziert werden. Zudem zeigten erste Veröffentlichungen, dass equine Oozyten mit unterschiedlichem BCB-Färbeverhalten unterschiedliche Entwicklungskompetenzen in vitro besitzen (Mohammadi-Sangcheshmeh, 2010; Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2009). Es lässt sich somit vermuten, dass die bereits an anderen Spezies überprüfte Färbemethodik zur Bestimmung der G-6-PDH Aktivität auf die Spezies Pferd übertragbar ist.

Eine hohe Aktivität der G-6-PDH in Oozyten wurde bei verschiedenen Spezies für Oozyten beschrieben, die sich in der Wachstumsphase befinden. Die Wachstumsphase der Oozyte ist geprägt durch eine hohe Stoffwechselrate, die eine hohe Syntheserate von Proteinen und deren Speicherung beinhaltet (Wassarmann, 1988), damit die Oozyte ihre meiotische Kompetenz und ihre Entwicklungskompetenz entwickeln kann. Oozyten, die ihr Wachstum beendet haben zeigen einen Rückgang der G-6-PDH-Aktivität (Wassarmann, 1988;

Mangia und Epstein, 1975). Untersuchungen an bovinen, porcinen und caprinen Oozyten konnten zeigen, dass mit dem Beenden der Wachstumsphase die meisten Oozyten ihre Entwicklungskompetenz ausbilden (Roca et al., 1998; Hyttel et al., 1997; Crozet et al., 1995; Fair et al., 1995). Auch an der Spezies Pferd konnte gezeigt werden, dass sich die BCB-Färbung dazu eignet, Oozyten zu identifizieren und zu selektieren, die in der In-vitro-Embryonenerzeugung eine höhere Entwicklungskompetenz aufweisen (Mohammadi-Sangcheshmeh, 2010; Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2009).

Mohammadi-Sangcheshmeh (2010) fand bei seinen Untersuchungen an equinen Oozyten signifikante Beziehungen der G-6-PDH-Aktivität in den Oozyten von ihrer Kumulusmorphologie. In seinen Untersuchungen befand sich unter den Oozyten mit einem expandierten Kumulus ein signifikant höherer Anteil BCB<sup>+</sup> Oozyten (67,9 %), während unter den Oozyten mit einem kompakten Kumulus die BCB<sup>-</sup> Oozyten (55,1 %) signifikant häufiger vertreten waren. Bei den eigenen Untersuchungen konnten hingegen keine Beziehungen zwischen Oozyten mit unterschiedlicher G-6-PDH-Aktivität und der Kumulusmorphologie oder der folliculären Herkunft nachgewiesen werden. Es wurden stets signifikant mehr Oozyten dem BCB<sup>+</sup> Status zugeordnet. Ihr Anteil unter den Oozyten der verschiedenen Kumulusmorphologieklassen oder der verschiedenen folliculären Herkünften betrug jeweils etwa 65-75%. Mohammadi-Sangcheshmeh et al. (2009) fanden bei ihren Untersuchungen insgesamt unter 687 durch „slicing und scaping“ in vitro gewonnen Oozyten 382 BCB<sup>+</sup> Oozyten und 295 BCB<sup>-</sup> Oozyten. Bei der von ihnen dabei angewendeten Gewinnungsmethode können Oozyten auch aus sehr kleinen Follikeln gewonnen werden, so dass sich die BCB<sup>-</sup> Oozyten in diesen Untersuchungen durchaus in der Wachstumsphase befunden haben könnten. Für die eigenen Untersuchungen wurden die Oozyten allerdings durch ultraschallgeleitete Follikelaspirationen von Tertiärfollikeln in vivo gewonnen, von denen die kleinsten einen Durchmesser von 5 mm aufwiesen, die meisten jedoch einen Durchmesser von über 10 mm hatten. Da die Wachstumsphase von Oozyten mit der Entwicklung eines Follikels vom sekundären zum frühen tertiären Follikel abgeschlossen wird (Liebig, 2004; Rüsse und Sinowatz, 1991), lässt sich das Vorkommen der zahlreichen BCB<sup>-</sup> Oozyten bei den eigenen Untersuchungen deshalb nicht mehr allein durch eine höhere G-6-PDH-Aktivität in Oozyten in der Wachstumsphase erklären. Ein möglicher Erklärungsansatz findet sich bei der Betrachtung der Verteilung von Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH-Status in Abhängigkeit von ihrer Kumulusmorphologie und Follikelgruppe (Tab. 7 u. Abb. 13). Nur Oozytengruppen, die einen expandierten Kumulus besaßen und zudem aus subordinanten Follikelgruppen stammten, zeigten ein ausgeglichenes Verhältnis von BCB<sup>+</sup> und BCB<sup>-</sup> Oozyten, während Oozytengruppen einer anderen Kumulusmorphologiekategorie oder einer anderen folliculären Herkunft stets signifikant mehr BCB<sup>+</sup> Oozyten beinhalteten. In der Tendenz finden sich mehr BCB<sup>-</sup> Oozyten unter den expandierten KOK der subordinanten Follikelgruppen als unter den expandierten KOK der wachsenden Follikelgruppen. Sowohl der expandierte Kumulus als auch die Herkunft aus einem subordinanten Follikel sprechen dafür, dass diese Oozyten atretischen Prozessen im Follikel unterlagen (Watson et al., 2002b; Belin et al., 2000; Gerard und Monget, 1998; Hinrichs und Williams, 1997). Oozyten mit einem expandierten Kumulus aus den subordinanten Follikelgruppen besaßen ergänzend dazu in den eigenen Untersuchungen eine signifikant niedrigere mitochondriale Aktivität als Oozyten mit einem expandierten Kumulus aus den wachsenden Follikelgruppen. Oozyten mit pyknotischem Chromatin wurden nur in Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen gefunden. Unter den Oozyten mit pyknotischem Chromatin befanden sich signifikant mehr BCB<sup>-</sup> Oozyten. Diese eigenen

Ergebnisse könnten ergänzend als Hinweis gewertet werden, dass BCB<sup>-</sup> Oozyten eine Beziehung zu atretischen Follikeln haben könnten. Daraus abgeleitet kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine hohe G-6-PDH-Aktivität nicht nur während der Wachstumsphase in Oozyten auftritt, sondern auch ein Zusammenhang mit degenerativen Prozessen in Oozyten bestehen könnte. Eine verminderte Entwicklungskompetenz ließe sich bei einem Teil der BCB<sup>-</sup> Oozyten auch auf diese Weise erklären.

Die Degeneration von Zellen steht im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen. Bei den meisten Apoptosekaskaden kommt es zur Depolarisation der mitochondrialen Membranen, auch in Oozyten (Bras et al., 2005). Dabei werden radikale Sauerstoffspezies (ROS), wie zum Beispiel Wasserstoffperoxyd und Stickstoffmonoxyd (Orrenius, 2007) aus den Mitochondrien in der Zelle freigesetzt. Die Zelle muss nun über alternative Stoffwechselwege die toxischen ROS abbauen an denen keine Mitochondrien beteiligt sind. Eine Möglichkeit dazu bietet sich über energieverbrauchende Enzymsysteme, wie zum Beispiel der Glutathionperoxidasen (Sun et al., 2005): Diese Enzymsysteme sind in der Lage unter Verbrauch von NADPH+H<sup>+</sup> ROS abzubauen. NADPH+H<sup>+</sup> wird dabei von der Glutathionreduktase verbraucht, um die reduzierte Form von Glutathion (GSH) nach einer Oxidation durch ROS wieder als Antioxidans in der Zelle zu generieren. NADPH+H<sup>+</sup> wird hauptsächlich durch den Pentosephosphatweg in der Zelle bereitgestellt. Die G-6-PDH des Pentosephosphatweges wird nun wiederum durch einem hohen NADPH+H<sup>+</sup>-Verbrauch aktiviert (Kreutzling, 1994). Damit stellt die G-6-PDH eine Möglichkeit für Oozyten dar, die energieverbrauchenden Prozesse zur Neutralisierung der ROS zu stützen, da die Mitochondrien diese Energie nicht mehr liefern können. Um diese Hypothese zu prüfen, müssten sich Untersuchungen anschließen, die die Beziehungen zwischen mitochondrialen Stoffwechselleistungen, apoptotischen Vorgängen, Vorkommen von ROS und den genannten Enzymsystemen in equinen Oozyten aus atretischen Follikeln näher untersuchen. Jüngere Untersuchungen zu den Beziehungen zwischen der G-6-PDH-Aktivität in ovinen Oozyten und den Apoptosegraden ihrer Kumuluszellen konnten die oben dargestellte Hypothese zu den Zusammenhängen bereits untermauern (Ortega-Camarillo et al., 2009). Das häufige Vorkommen von BCB<sup>-</sup> Oozyten in tertiären Follikeln der wachsenden Follikelgruppen bleibt weiterhin unklar. Es kann aber vermutet werden, dass es bereits zur Entkopplung von Eizellreifung und Follikelreifung kommen kann, noch bevor sich klinisch die Deviation eines dominanten Follikels in einer wachsenden Follikelkohorte feststellen lässt oder makroskopisch Anzeichen einer Follikelatresie bei den gewonnenen KOK zu erkennen sind (Ortega-Camarillo et al., 2009).

Im Gegensatz zu dieser Hypothese steht, dass bei den eigenen Untersuchungen die mitochondriale Aktivität zwischen BCB<sup>+</sup> und BCB<sup>-</sup> Oozyten nicht signifikant verschieden war. Bei apoptotischen Vorgängen in den BCB<sup>-</sup> Oozyten aus tertiären Follikeln wäre mit einer Depolarisation der mitochondrialen Membranen und damit einhergehend mit einem reduziertem mitochondrialen Stoffwechsel zu rechnen (Wang et al., 2009; Bras et al., 2005). Passend dazu wurden durch Egerszegi et al. (2010) bei porcinen Oozyten aus antralen Follikel auch signifikant geringere mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit einer hohen Aktivität der G-6-PDH beschrieben. Allerdings ist bei einer Oozytengewinnung aus kleineren Follikeln mit Oozyten zu rechnen, die einen BCB<sup>-</sup> Status aufweisen, weil sie sich noch in der Wachstumsphase befinden. Diese müssten im Kontrast dazu einen höheren Stoffwechsel aufgrund vermehrter Proteinbiosynthese in den Oozyten aufweisen (Torner et al., 2008; Wassarmann, 1988). Der mittlere Wert der mitochondrialen Aktivität in BCB<sup>-</sup> Oozyten der eigenen Untersuchungen könnte sich daher aus einer Mischpopulation von wachsenden und



degenerativen BCB<sup>+</sup> Oozyten ergeben haben und sich deshalb dem Mittelwert der BCB<sup>+</sup> Oozyten angeglichen haben. Diese Fragestellung war jedoch in der vorliegenden Untersuchung aufgrund des geringen Stichprobenumfangs statistisch nicht mehr auswertbar.

### 5.3 Untersuchungen zur Chromatinkonfiguration der gewonnenen Oozyten

Die Gewinnung von Oozyten aus unreifen Follikeln resultiert nach Carnevale und Mecclan (2006) in KOK mit unterschiedlichen Kumulismorphologien, deren Oozyten ein unreifes Chromatin besitzen. Als unreif wird das Chromatin im intakten Germinalvesikel verstanden. Mit der Kondensation des Chromatins zum Diakinesestadium am Ende der Prophase I, der Auflösung der Kernmembran und der Ausbildung des Spindelapparates vollzieht sich der Germinal-Vesikel-Break-Down (GVBD) in Oozyten (Grondahl et al., 1995) und die Meiose gilt als wieder aufgenommen (Gordon, 2003). Bei der Aspiration von Follikeln aus wachsenden Follikelgruppen wurden nach diesen Definitionen bei den eigenen Untersuchungen 74,3% unreife Oozyten und 18,1% Oozyten die eine Wiederaufnahme der Meiose zeigten, gewonnen. Aus den Aspirationen von subordinanten Follikeln resultierten zu 63,5% unreife und zu 28,3% Oozyten nach einer Wiederaufnahme der Meiose (Abb. 15). Rödiger (2000) fand in vitalen, dominanten Follikeln keine Oozyten, die bereits eine Wiederaufnahme der Meiose aufwiesen und Hinrichs und Williams (1997) fanden unter 33 Oozyten aus vitalen Follikeln nur eine, die eine Wiederaufnahme der Meiose zeigte. Bei Untersuchungen von Oozyten mit kompakten Kumuluszellen wurden von anderen Untersuchern nur sporadisch Oozyten zum Zeitpunkt der Gewinnung festgestellt, die eine Wiederaufnahme der Meiose erkennen ließen (Torner et al., 2007; Hinrichs et al., 2005; Aguilar et al., 2001; Hinrichs und Schmidt, 2000; Hinrichs und Williams, 1997). Bei den eigenen Untersuchungen wurden bei 24,1% der Oozyten mit kompaktem Kumulus ein Chromatinstadium nach der Wiederaufnahme der Meiose vorgefunden, selbst wenn diese aus wachsenden Follikeln entstammten. Andere Untersuchungen, in denen Oozyten von kompakten KOK aus undefinierten Follikelpopulationen nach einer In-vitro-Gewinnung untersucht wurden oder in denen Oozyten von kompakten KOK nach einer Gewinnung durch wiederholte ultraschallgeleitete Follikelaspirationen untersucht wurden, führten zu ähnlichen Befunden bei der Chromatinkonfiguration der gewonnenen Oozyten wie bei der vorliegenden Untersuchung (Kanitz et al., 2000; Torner und Alm, 1995). Es wurde beschrieben, dass es bei Oozyten bereits zu Veränderungen der Kernkonfigurationen kommen kann, wenn sich eine Zeitverzögerung zwischen Schlachtung und der KOK-Gewinnung und Bearbeitung im Labor von mehr als 1,5 Stunden ergibt (Hinrichs et al., 2005; Love et al., 2002). Da sich bei den eigenen Arbeiten ein Zeitintervall von bis zu 4 Stunden zwischen der Follikelaspiration und der Fixierung der Oozyten ergeben konnte (Abb. 7), wäre ein häufigeres Vorkommen von den Meiosestadien kurz nach dem GVBD (wie sie unter der Chromatinkonfigurationsgruppe MI zusammengefasst wurden) in den eigenen Untersuchungen gegenüber den weiter oben beschriebenen Studien denkbar. Das Vorkommen von Chromatinkonfigurationen einer weiter vorgeschrittenen Meiose bei Oozyten von kompakten KOK aus wachsenden Follikelgruppen, wie sie in den eigenen Ergebnissen unter der Gruppe MII zusammengefasst wurden, lassen sich auf diese Weise aber nicht erklären. Daher ist anzunehmen, dass die wachsenden Follikelgruppen, induziert durch vorangegangene Follikelablationen, nicht ausschließlich aus vitalen Follikeln

bestanden. Der Verlust der meiotischen Arretierung könnte einerseits bereits durch erste atretische Entwicklungen in wachsenden Follikelpopulationen verursacht werden, die auftreten könnten noch bevor ein dominanter Follikel in Erscheinung tritt und eine Atesie durch eine Kumulusexpansion sichtbar wird (Pedersen et al., 2004). Andererseits wurden Oozyten, die eine Wiederaufnahme der Meiose zeigten und sogar einen expandierenden Kumulus aufwiesen, auch schon bei sehr kurzen Zeitintervallen zwischen wiederholten Follikelaspirationen gefunden (Duchamp et al., 1995; Kanitz et al., 2000). Die Autoren schlossen daraus, dass durch eine Follikelaspiration nicht alle Follikel beseitigt werden konnten. Einige Follikel könnten sich wieder mit Flüssigkeit gefüllt haben und erneut bei einer der folgenden KOK-Gewinnungen aspiriert worden sein.

Das signifikant häufigere Auftreten von Oozyten der Chromatinkonfigurationsgruppe MII unter den expandierten gegenüber den kompakten KOK (Abb. 16) zeigt, wie eine Expansion der Kumuluszellen aufgrund einer Follikelatresie zum Fortschreiten der Meiose führt (Hinrichs und Williams, 1997). Bei den eigenen Untersuchungen wurden zudem in Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen auch Chromatinkonfigurationen der MI-Gruppe signifikant häufiger unter den Oozyten mit einem expandierten Kumulus als unter denen mit einem kompakten Kumulus gefunden (Tab. 8). Dadurch wird eine Verbindung zwischen der Wiederaufnahme der Meiose, der Kumulusexpansion und der Follikelatresie bei den eigenen Arbeiten zusätzlich bestätigt, wie sie von Watson et al. (2002b) beschrieben wurde. Oozyten mit degeneriertem Chromatin wurden nur bei der Aspiration von subordinanten Follikelgruppen gewonnen. Dadurch wird das gehäufte Vorkommen von atretischen Follikel in dieser Follikelpopulation nochmals verdeutlicht. Allerdings wurden bei den eigenen in vivo gewonnenen Oozyten nicht so häufig Oozyten mit degeneriertem Chromatin beobachtet, wie sie bei einer Oozytengewinnung an post mortem entnommenen Ovarien berichtet wurden (Aguilar et al., 2001; Torner und Alm, 1995).

In equinen Oozyten können verschiedene Chromatinkonfigurationen vor dem GVBD (Chromatin im Diplotän) unterschieden werden (Hinrichs et al., 2005). Die physiologische Funktion der verschiedenen Diplotänkonfigurationen bereitet nach wie vor Schwierigkeiten und ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Unterschieden werden die differenten Diplotänkonfigurationen aufgrund des Kondensationsgrades des Chromatins. Nach einer Färbung mit Höchst 33258 werden Chromatinkonfigurationen im Germinalvesikel beschrieben, die von nicht verdichteten, gleichmäßig fluoreszierenden, fibrillären Strukturen (fluorescent nucleus, FN) bis hin zu einem stark kondensierten Chromatin im Germinalvesikel (tightly condensed chromatin, TCC) in verschiedenen Abstufungen und Zwischenstufen reichen (Hinrichs et al., 2005; Rödiger, 2000; Kanitz et al., 2000; Hinrichs und Williams, 1997). Der FN wird im Zusammenhang mit vitalen Follikeln und einer kompakten Kumulusmorphologie der Oozyten gesehen, während das kondensierte Chromatin in Zusammenhang mit atretischen Follikeln und einer Kumulusexpansion gesehen wird (Hinrichs et al., 2005; Hinrichs und Williams, 1997). Eine höhere meiotische Kompetenz und Entwicklungskompetenz wird bei equinen Oozyten den expandierten KOK zugeordnet (Hinrichs et al., 2005; Alm et al., 2001). Daraus ergab sich die Hypothese, dass bei Stutenoozyten die kondensierte Chromatinkonfiguration eine notwendige Weiterentwicklung des Oozytenchromatins zum Erlangen der meiotischen Kompetenz vor dem GVBD darstellt, die durch atretische Vorgänge im Follikel, die prämaturotativ wirken sollen, positiv beeinflusst werden (Hinrichs, 1997).

Eine einheitliche Nomenklatur der verschiedenen Diplotänkonfigurationen hat sich bisher international nicht durchgesetzt. Selbst in gleichen Arbeitsgruppen unterliegt die Einteilung

der Konfigurationen des Chromatins im GV stetigen Neuordnungen. Eine Vergleichbarkeit der publizierten Ergebnisse ist damit nur bedingt gegeben. Besonders die in der Literatur beschriebenen kondensierten Chromatinstrukturen sind nicht eindeutig von einem frühen Diakinesestadium oder einer frühen Pyknose des Kerns abgegrenzt worden (Hinrichs und Williams, 1997). In Anlehnung an die Arbeiten von Hinrichs et al. (2005, 1997) wurden Oozyten in einem Diplotänstadium bei den eigenen Arbeiten in ein diffuses Diplotän (DD), fibrilläres Diplotän (FD) und kondensiertes Diplotän (KD) unterteilt. Ein diffuses Diplotän (DD) wurde tendenziell häufiger in Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen beobachtet. Zudem war ein DD tendenziell häufiger in Oozyten mit kompaktem als in Oozyten mit expandiertem Kumulus zu finden. Die mitochondriale Aktivität in Oozyten mit einem DD war im Vergleich zu denen mit anderen Chromatinkonfigurationen relativ gering. Die mitochondrialen Aktivitäten unterschieden sich nicht zwischen Oozyten im DD-Stadium mit unterschiedlichen follikulären Herkünften oder Kumulusmorphologien. Insgesamt kann deshalb gefolgert werden, dass es sich um ein Ruhestadium des Diplotäns handelt, das vitalen Follikeln ohne morphologische Anzeichen von Follikelatresie zugeordnet werden kann. Hinrichs et al. (2005) charakterisierten einen diffus fluoreszierenden Nukleus als Zeichen der Degeneration, der sich erst als Artefakt bei der in vitro Maturation bildet. Das DD der eigenen Untersuchungen entspricht morphologisch nicht der von Hinrichs et al. (2005) beschriebenen Konfiguration, sondern eher der zuvor von den gleichen Autoren beschriebenen Konfiguration des „fluorescent nucleus“ (Hinrichs und Williams, 1997c), die ebenfalls signifikant häufiger bei Oozyten der kompakten KOK vorlag. Beim Erkennen von fibrillären Strukturen im Germinalvesikel, die eine beginnende leichte Kondensation des Chromatins erkennen ließen, wurde die Oozyte der fibrillären Diplotänkonfiguration (FD) zugeordnet. Oozyten mit einem FD wurden signifikant häufiger in Oozyten der wachsenden Follikelgruppen gefunden (Abb. 15), jedoch nicht einer Kumulusmorphologiegruppe zugeordnet. Erst die Unterteilung der Oozyten nach Kumulusmorphologie und follikulärer Herkunft zeigte, dass Oozyten, die nur eine Corona radiata oder einen expandierten Kumulus besaßen, signifikant häufiger das FD aufwiesen, wenn sie aus der wachsenden Follikelgruppe stammten. Geht man davon aus, dass in den expandierten KOK aus den wachsenden Follikelgruppen ein kürzerer prämaturotiver Einfluss auf die Oozyten eingewirkt hatte als in expandierten KOK aus subordinanten Follikelgruppen, so ließe sich schlussfolgern, dass es sich um ein Chromatinstadium am Beginn der meiotischen Reifung in vivo handelt. Analog zu Untersuchungen an porcinen Oozyten (Egerszegi et al., 2010) wiesen auch bei den eigenen Untersuchungen equine Oozyten mit einem FD signifikant häufiger eine niedrige Aktivität der G-6-PDH auf. Dieses weist darauf hin, dass es sich um Oozyten handeln könnte, die ihr Wachstum bereits beendet haben, jedoch noch keine meiotische Kompetenz besitzen. Denn bei equinen Oozyten mit einem fibrillären Diplotän wurde bereits dargestellt, dass diese nur eine geringe meiotische Kompetenz in der In-vitro-Maturation zeigen (Hinrichs et al., 2005). Am Ende der Wachstumsphase wurden dagegen für andere Spezies die Ausprägung der meiotischen und der Entwicklungskompetenz beschrieben (Roca et al., 1998; Hyttel et al., 1997; Fair et al., 1995; Crozet et al., 1995). Es könnte damit sein, dass sich bei equinen Oozyten die meiotische Kompetenz erst nach und nicht mit dem Ende der Wachstumsphase der Oozyte, durch weitere ultrastrukturelle Umstrukturierungen des Chromatins zum KD im Germinalvesikel, ausbildet. Andererseits könnte ein Chromatin im FD auch bei Pferden durchaus bereits entwicklungscompetent sein, jedoch in seiner aktivierten Form zu fragil um sich in den z. B. von Hinrichs et al. (2005) für equine Oozyten genutzten IVM-Systemen zu entwickeln. Denn

bei den Untersuchungen von Egerszegi et al. (2010) an porcinen Oozyten wirkte sich ein höherer Anteil Oozyten mit einem FD am Beginn der IVM positiv auf die Blastozystenrate nach der IVF aus. In zukünftigen Untersuchungen von Oozyten mit einem FD, welche die In-vitro-Maturation mit einschließen, könnte dieser Fragestellung genauer nachgegangen werden. Oozyten mit einem FD aus wachsenden Follikelgruppen hatten gegenüber Oozyten mit einem FD aus subordinanten Follikelgruppen tendenziell höhere mitochondriale Aktivitäten (Abb. 24), sowie auch Oozyten im FD-Stadium mit expandiertem Kumulus (Abb. 25). Diese Ergebnisse weisen erneut darauf hin, dass es sich bei dem FD um eine frühe, aktivierte Form des Diplotän aus unreifen Follikeln handeln könnte, die den Übergang zum entwicklungs-kompetenten kondensierten Diplotän darstellt. Bei Untersuchungen an porcinen Oozyten wiesen Oozyten mit einer fibrillären Chromatinstruktur zum Zeitpunkt der Gewinnung ebenfalls eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität gegenüber anderen Diplotän- oder Meiosestadien auf. Die Autoren gehen davon aus, dass eine hohe mitochondriale Aktivität für den bevorstehenden, energieintensiven GVBD notwendig ist (Egerszegi et al., 2010). Eine parallel zur chromosomalen Aktivierung benötigte mitochondriale Aktivierung der Oozyten könnte durch frühe atretische, prämaturot wirkende Prozesse in den Follikeln stattgefunden haben (Hinrichs et al., 2005; Hinrichs, 1997). Besonders für expandierte KOK sind Beziehungen zu atretischen Prozessen in Follikeln beschrieben worden (Dell'aquila et al., 2003; Watson et al., 2002b; Hinrichs und Williams, 1997). Werden Oozyten mit einer fibrillären Struktur des Diplotän in eine in vitro Maturation verbracht, geht ihr Chromatin in eine Degeneration mit Dekondensation über (Hinrichs et al., 2005; Pedersen et al., 2004). Bei sofort fixierten Oozyten, nach unverzüglicher Gewinnung der Oozyten post mortem, trat diese Form der Degeneration in vivo jedoch nicht auf. Die Autoren sahen in diesen Studien ein fibrilläres Diplotän allerdings nur bei Oozyten mit kompaktem Kumulus, während sich bei den eigenen Untersuchungen keine Beziehung des FD zu einer Kumulusmorphologie ergab.

Unreife equine Oozyten, die ein kondensiertes Diplotän (KD) aufweisen, gelten nach derzeitigem Wissensstand als entwicklungs-kompetent (Hinrichs et al., 2005; Hinrichs und Williams, 1997). Das KD wird vermehrt in Oozyten vorgefunden, die einen expandierten Kumulus haben (Hinrichs et al., 2005) und atretischen Follikeln entstammen (Hinrichs und Williams, 1997). Daraus ergab sich die Hypothese, dass sich atretische Vorgänge im Follikel positiv auf die Entwicklungskompetenz von equinen Oozyten auswirken (Hinrichs, 1997). Auch bei den eigenen Untersuchungen wurden Oozyten mit einem KD signifikant häufiger in subordinanten, atretischen Follikelgruppen gefunden als in wachsenden Follikelgruppen. Hingegen wurde kein Einfluss der Kumulusmorphologie auf das Vorkommen vom KD in den Oozyten beobachtet. Aber Oozyten mit kompaktem Kumulus enthielten signifikant häufiger ein KD, wenn sie aus subordinanten (atretischen) Follikelgruppen entstammten anstatt aus wachsenden Follikelgruppen (50% vs. 24,1%). Innerhalb der wachsenden oder subordinanten Follikelgruppen war die Häufigkeit des KD zwischen den verschiedenen Kumulusmorphologien hingegen wieder gleich (Tab. 8). Ein prämaturotiver Effekt, der das Vorkommen vom KD in den Oozyten begünstigt, könnte also im subordinanten, atretischen Follikel schön früh auftreten, noch bevor der Kumulus oophorus eine Expansion im Zuge einer Atresie des Follikels zeigt. Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass sich durch nur wenige Stunden Wartezeit zwischen der Gewinnung von Ovarien und der Oozytengewinnung, die meiotische und die Entwicklungskompetenz der Oozyten gegenüber sofort gewonnenen Oozyten innerhalb einer KOK-Morphologiegruppe steigern lässt

(Hinrichs et al., 2005). Damit wurde verdeutlicht, wie früh und schnell ein atretischer, prämaturner Effekt von absterbendem Gewebe ausgehen kann.

Das KD stellte sowohl unter den Oozyten mit einer hohen Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>-</sup>) als auch bei den Oozyten mit einer niedrigen Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>+</sup>) die häufigste vorkommende Chromatinkonfiguration dar. Die Oozyten mit einem KD bestanden aus nahezu gleichen Anteilen von Oozyten mit hoher oder niedriger G-6-PDH-Aktivität (Abb. 17). Hieran zeigt sich, dass Oozyten mit der entwicklungs kompetenten Kernkonfiguration des KD sehr unterschiedliche zytoplasmatische Eigenschaften oder Reifungsstadien aufweisen können. Unter den BCB<sup>+</sup> Oozyten von subordinanten Follikelgruppen fanden sich signifikant häufiger Oozyten mit einem KD als unter den BCB<sup>-</sup> Oozyten der wachsenden Follikelgruppe (Abb. 18). Daraus ergibt sich erneut, wie weiter oben bereits beschrieben, ein Hinweis, dass sich bei equinen Oozyten die meiotische Kompetenz erst nach und nicht mit dem Ende der Wachstumsphase der Oozyte ausbilden könnte. Während Oozyten mit einem KD aus subordinanten Follikelgruppen tendenziell häufiger eine niedrige G-6-PDH-Aktivität aufwiesen, zeigen Oozyten mit einem KD aus wachsenden Follikelgruppen im Kontrast dazu tendenziell häufiger eine hohe G-6-PDH-Aktivität (Abb. 19). Insgesamt wird dabei deutlich, dass es bereits in frühen follikulären Entwicklungsstadien zu Entkopplungen zwischen der Kernreifung und der zytoplasmatischen Reifung kommen kann. Wenn bei einer Oozyte, die Kernreifung einsetzt, noch bevor das Wachstum der Oozyte abgeschlossen ist (BCB<sup>-</sup>), könnte sich daraus ein negativer Einfluss auf die weitere zytoplasmatische Reifung und auch auf die Weiterentwicklung des Follikels ergeben. Zum anderen deuten die häufig vorgefundenen hohen Aktivitäten der G-6-PDH in den Oozyten mit einem KD, die aus einer subordinanten Follikelgruppe entstammten, auf ein bereits zu weit fortgeschrittenes Stadium der Follikelatresie hin (Ortega-Camarillo et al., 2009), in dessen Milieu sich das Chromatin nicht weiter entwickeln konnte.

Bei den eigenen Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität konnte gezeigt werden, dass Oozyten mit gleicher Kumulushomologie aufgrund einer unterschiedlichen follikulären Herkunft signifikant unterschiedliche zytoplasmatische Qualitäten aufweisen können. Oozyten mit einem KD, die eine gleiche Kumulushomologie aufweisen, jedoch aus unterschiedlich entwickelten Follikelpopulationen stammen, sollten daher nicht als gleich bewertet werden. Allerdings wurden zwischen den Mittelwerten der mitochondrialen Aktivitäten von Oozyten mit einem KD keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Follikelgruppen oder KOK-Morphologien aufgezeigt.

Zusammenfassend kann für die Chromatinkonfiguration des kondensierten Diplotäns festgestellt werden, dass dieses schon in Oozyten vorkommen kann, die noch ein unreifes Zytoplasma aufweisen aber auch in Oozyten, in deren Zytoplasma bereits degenerative Prozesse stattfinden. Während sich durch eine verlängerte Reifungszeit von Oozyten mit kompaktem Kumulus *in vitro* die Entwicklungskompetenz auf das Niveau von Oozyten mit expandiertem Kumulus erhöhen lässt, erbringt eine verlängerte oder verkürzte Reifung keinen Vorteil für die Entwicklungskompetenz der Oozyten mit einem expandierten Kumulus. Diese besitzen schon vor der IVM einen hohen Anteil Oozyten mit einem KD (Hinrichs et al., 2005). Das KD könnte deshalb insbesondere bei den Oozyten mit expandiertem Kumulus, die zusätzlich aus subordinanten, atretischen Follikelgruppen stammen, eine Chromatinkonfiguration darstellen, die auch degenerativen Oozyten zugeordnet werden kann. Besonders das in der Literatur beschriebene stark kondensierte Chromatin (tightly condensed chromatin, TCC) könnte daher auch als Übergang zwischen dem entwicklungs kompetenten KD und einer beginnenden Pyknose diskutiert werden. Diese

Oozyten könnten eine Population darstellen, die ein vermeintlich entwicklungs kompetentes Chromatin aufweist (KD), welches aber zu einer Oozyte gehört, die unter keinen Umständen mehr eine Entwicklungs kompetenz in vitro besitzt. Oozyten mit einem KD und einem kompaktem Kumulus hingegen könnten durch eine verlängerte Reifungszeit die zytoplasmatische Reifung in vitro noch abschließen.

Bei der In-vitro-Embryonenerzeugung können nach der In-vitro-Maturation hohe Kernreifungsraten bei equinen Oozyten erreicht werden, während die Blastozystenentwicklungsraten der befruchteten MII-Stadien niedrig bleiben (Hinrichs et al., 2005). Als Begründung lässt sich nach den eigenen Untersuchungen eine zum Teil irreversibel divergierende zytoplasmatische und chromosomale Reifung bereits in frühen Follikelentwicklungsstadien vermuten, die es Oozyten nicht mehr erlaubt während der IVM die vollständige Entwicklungs kompetenz zu entwickeln. Um diese Hypothese endgültig zu klären, sollte die Entwicklungs kompetenz der Oozyten unter Beachtung ihrer follikulären Herkunft untersucht werden. Zudem erscheinen weitergehende Untersuchungen sinnvoll, die degenerative oder apoptotische Prozesse in Oozyten und ihren Kumuluszellen im Zusammenhang mit den verschiedenen Diplotänstadien genauer charakterisieren.

## **5.4 Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität in den gewonnenen Oozyten**

Ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der zytoplasmatischen Reifung ist die mitochondriale Aktivität. Mitochondrien nehmen durch ihre Stoffwechselaktivität, durch die Beeinflussung des Kalziumsignals in Interaktion mit dem endoplasmatischen Retikulum und durch ihre Stoffwechselprodukte, wie aktive Sauerstoffradikale, intermediäre Stoffwechselprodukte und der Produktion von ATP maßgeblich an der Regulation der Eizellentwicklung teil (Dumollard et al., 2007). Mitochondrienfunktionen stehen aber auch im Zusammenhang mit apoptotischen Vorgängen, bei denen es zur Depolarisation der mitochondrialen Membranen in der Oozyte kommt (Bras et al., 2005). Der wichtigste Energieträger für die Prozesse der Oozytenmaturation ist ATP, das hauptsächlich durch die ATP-Synthese der Mitochondrien in der Oozyte durch oxidative Phosphorylierung für die Maturation zur Verfügung gestellt wird (Brevini et al., 2005; Dumollard et al., 2004). Ergebnisse aus der Humanmedizin und aus Arbeiten an bovinen Oozyten legen nahe, dass eine hohe mitochondriale Respiration, gemessen durch den ATP-Gehalt in der Oozyte, stark positiv mit der Embryonenentwicklungsrate korreliert ist (Wilding et al., 2001; Stojkovic et al., 2001). Fruchtbarkeitsprobleme aufgrund von geringen mitochondrialen Aktivitäten in Oozyten stellen in der Humanmedizin ein eigenständiges Krankheitsbild da, das hauptsächlich älteren Patientinnen zugeordnet (Wilding et al., 2001) und in den meisten Fällen auf Defekte der maternalen mitochondrialen DNA (mtDNA) zurückgeführt wird (St John et al., 2004).

Für die eigenen Untersuchungen wurde die mitochondriale Aktivität durch eine photometrische Messmethode bestimmt, wie sie bereits bei porcinen (Torner et al., 2004), bovinen (Otzdorff, 2006) und equinen (Torner et al., 2007) Oozyten angewendet wurde. Zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität wurden die Oozyten unter Kulturbedingungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CMTM Ros (Tetramethylrosamin) vital inkubiert. Der Farbstoff bindet in Abhängigkeit von der oxidativen Aktivität, proportional zur Höhe des Membranpotentials, nur in respiratorisch aktiven Mitochondrien. Durch die Messung der Intensität des Emissionslichts werden anschließend Rückschlüsse auf die mitochondriale Aktivität gezogen. Die Methode beinhaltet daher keine direkte Bestimmung

der mitochondrialen Aktivität. Die Ergebnisse, die mit dieser Methode in der Vergangenheit erarbeitet wurden, korrelieren aber positiv mit den Ergebnissen anderer Autoren, welche die mitochondriale Gesamtleistung direkt durch die Messung des ATP-Gehaltes in Oozyten während der IVM bestimmt haben (Brevini et al., 2005; Stojkovic et al., 2001). Die Höhe der mitochondrialen Gesamtleistung in Oozyten wird zum einem durch die respiratorische Leistung des einzelnen Mitochondriums bestimmt, zum anderen additiv auch durch die Anzahl von Mitochondrien in der Oozyte (Lee et al., 2006). Die Entwicklungskompetenz von Oozyten ist deswegen auch mit einer hohen Anzahl von Mitochondrien in den Oozyten verbunden (El Shourbagy et al., 2006). Um die Gesamtleistung der Mitochondrien in einer Oozyte besser darstellen und vergleichen zu können, werden daher ATP-Gehalte oder gemessene Fluoreszenzintensitäten der Mitochondrien pro Oozyte angegeben (Torner et al., 2008; Tarazona et al., 2006; Torner et al., 2004; Stojkovic et al., 2001).

Bei den eigenen Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität, gemessen an der Fluoreszenzintensität pro Oozyte, zeigten Oozyten mit expandiertem Kumulus und Oozyten, die nur eine Corona radiata besaßen eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität als Oozyten mit kompaktem Kumulus. In diesem Ergebnis deutet sich erneut eine Ähnlichkeit von Oozyten der expandierten KOK und Oozyten, die nur einer Corona radiata besaßen an. Bei den Arbeiten von Torner et al. (2007) wurden in equinen Oozyten mit expandierten Kumulus auch höhere mitochondriale Aktivitäten bereits zum Zeitpunkt der Gewinnung vorgefunden als in den Oozyten der kompakten KOK, jedoch unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander. Eine anschließende IVM in diesen Arbeiten zeigte, dass in Oozyten von expandierten KOK die mitochondriale Aktivität während der IVM stetig ansteigt, während sie zum Ende der IVM bei Oozyten der kompakten KOK wieder abfällt. Nach 32 Stunden IVM unterschieden sich die beiden Oozytengruppen signifikant in ihrer mitochondrialen Aktivität. Mit einer ansteigenden mitochondrialen Aktivität war in den Arbeiten von Torner et al. (2007) eine zunehmende Kernreifung der Oozyten in der IVM feststellbar. Eine hohe mitochondriale Aktivität zum Zeitpunkt der Gewinnung könnte daher ein wichtiges zytoplasmatisches Qualitätskriterium für eine erfolgreiche weitere Reifung sein. Die Kumulusexpansion steht allerdings auch im Zusammenhang mit atretischen Vorgängen im Ursprungsfollikel. Da jedoch unreife Oozyten mit expandiertem Kumulus häufiger die Entwicklungsfähigkeit zur Blastozyste *in vitro* besitzen, wird vermutet, dass eine Atresie des Ursprungsfollikels einen prämaturationen Effekt auf Oozyten ausübt, der sich vorteilhaft auf die Kernreifung und Ausbildung der meiotischen Kompetenz *in vitro* auswirkt (Hinrichs, 1997). Auch die eigenen Ergebnisse zu den Beziehungen zwischen der mitochondrialen Aktivität und der Kumulusexpansion legen nahe, dass sich atretische Prozesse im Ursprungsfollikel positiv auf die zytoplasmatische Reifung von Oozyten zum Zeitpunkt der Gewinnung auswirken könnten. Durch verlängerte Reifungszeiten *in vitro* erlangten Oozyten von kompakten KOK eine den Oozyten von expandierten KOK ähnliche Entwicklungskompetenz (Hinrichs et al., 2005), so dass vermutet werden kann, dass Unterschiede in der zytoplasmatischen Reifung teilweise während der IVM noch kompensiert werden können.

Bei Arbeiten an porcinen Oozyten wurden ebenfalls höhere mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit expandierten Kumulus gefunden (Torner et al., 2004). Es handelt sich jedoch um Oozyten aus präovulatorischen Follikeln, deren Kumulusexpansion und Reifung *in vivo* durch hCG induziert wurde und nicht um Oozyten aus unreifen Follikeln, die eine Kumulusexpansion aufgrund atretischer Prozesse im Follikel zeigten. Auch bei den eigenen Untersuchungen ergab sich die höchste mitochondriale Aktivität bei den Oozyten, die aus

präovulatorischen Follikeln 24 Stunden nach einer hCG-Gabe, gewonnen wurden. Damit lässt sich ableiten, dass eine hohe mitochondriale Aktivität in Oozyten zum Zeitpunkt der Ovulation auch bei der Spezies Pferd zu den notwendigen Charakteristika einer in vivo gereiften Oozyte gehört, um die nachfolgenden energieverbrauchenden Prozesse der Fertilisation, Vorkernbildung und ersten Teilungen bewältigen zu können.

In ihrer Gesamtheit wiesen Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen bei den eigenen Untersuchungen eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität auf als Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen (Abb. 20). Auf den ersten Blick könnten damit Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen generell eine höhere Eignung für In-vitro-Techniken haben. In den wachsenden Follikelgruppen befanden sich aber auch signifikant häufiger Oozyten mit der Chromatinkonfiguration des fibrillären Diplotäns, in denen die höchste mittlere mitochondriale Aktivität bestimmt wurde (Tab. 9). Dieses führte zu der Annahme, dass es sich beim fibrillären Diplotän um eine aktivierte Chromatinstruktur handelt, die sich noch in der Entwicklung zur meiotisch kompetenten kondensierten Diplotänkonfiguration befindet (Kapitel 5.2). Durch andere Arbeitsgruppen wurde aber gezeigt, dass es sich beim fibrillären Chromatin um eine sehr fragile Kernkonfiguration handelt, deren Oozyten in der IVM noch keine meiotische Kompetenz besitzen und die größtenteils während der IVM degeneriert (Hinrichs et al., 2005). Die relativ niedrigen mittleren mitochondrialen Aktivitäten in den Oozyten aus den subordinanten Follikelgruppen hingegen könnten sich auch daraus ergeben haben, dass sich unter ihnen signifikant häufiger Oozyten mit einem kondensierten Diplotän und pyknotischen Kernen befanden. Bei den Oozyten mit pyknotischen Kernen wurden die niedrigsten Werte für die mitochondriale Aktivität bestimmt und auch in den Oozyten mit einem kondensierten Diplotän wurde eine relativ niedrige mittlere mitochondriale Aktivität gemessen. Dabei gilt das kondensierte Diplotän als die entwicklungskompetente Chromatinstruktur (Hinrichs et al., 2005; Hinrichs und Williams, 1997).

Die Betrachtung der mitochondrialen Aktivitäten in Oozyten in Abhängigkeit von ihrer follikulären Herkunft unter zusätzlicher Beachtung ihrer Kumulusmorphologie brachten weitere Aufschlüsse. In Oozyten mit kompakter Kumulusmorphologie ist eine niedrige mitochondriale Aktivität, unabhängig von der follikulären Herkunft zu beobachten. Bei Oozyten mit expandiertem Kumulus und in Oozyten, die nur einer Corona radiata hatten, war die mitochondriale Aktivität gegenüber Oozyten der kompakten KOK nur signifikant höher, wenn sie aus einer wachsenden Follikelgruppe stammten (Abb. 22). Die mitochondrialen Aktivitäten in Oozyten der subordinanten Follikelgruppen blieben hingegen unabhängig von der Kumulusmorphologie auf einem niedrigen Niveau. Daraus resultiert, dass die mitochondriale Aktivität in Oozyten mit expandiertem Kumulus signifikant und in Oozyten mit Corona radiata tendenziell höher war, wenn diese aus einer wachsenden, statt aus einer subordinanten Follikelgruppe stammten (Abb. 22). Hier zeigte sich erneut, dass die Oozyten der expandierten KOK und die Oozyten mit Corona radiata zu einer physiologisch gleichen Gruppe gehören könnten. Oozyten mit einem kompakten Kumulus können unabhängig von der follikulären Herkunft als wenig stoffwechselaktiv betrachtet werden. Die zytoplasmatische Qualität von Oozyten der expandierten KOK oder der Corona-radiata-Oozyten ist dagegen bei einer unterschiedlichen follikulären Herkunft der KOK nicht gleich. Das Wissen über den Entwicklungsstand der Ursprungsfollikelpopulation könnte bei Oozyten mit diesen KOK-Morphologien daher ein weiteres wichtiges Kriterium zur Abschätzung der Oozytenqualität darstellen. Die Expansion des Kumulus im unreifen Follikel im Zusammenhang mit einer Follikelatresie, soll einen positiven, prä maturativen Effekt, auf die Oozyte und ihre Entwicklungscompetenz haben (Hinrichs, 1997). Diese Hypothese könnte



nach den vorliegenden Ergebnissen nur für Oozyten der expandierten KOK aus wachsenden Follikelgruppen zutreffen. Bei diesen Follikelgruppen könnten atretische Prozesse erst kurzfristig auf die Oozyte eingewirkt haben, die chromosomale und zytoplasmatische Reifung aktiviert und in eine entwicklungs kompetente Konfiguration durch prämaturotative Effekte gebracht haben. Hingegen waren die Oozyten der expandierten KOK aus subordinanten Follikelgruppen bereits ab der Zyklusmitte unterschiedlich langen Zeitintervallen und vielfach sicherlich fortgeschrittenen Stadien der Follikelatresie ausgesetzt (Ginther et al., 2006b; Pedersen et al., 2004; Watson et al., 2002b). Zum Zeitpunkt der Rosse könnten die Oozyten aus subordinanten, atretischen Follikeln bereits den Zeitpunkt, in dem chromosomale und zytoplasmatische Reifung zusammen einen entwicklungs kompetenten Zustand der Oozyte bildeten, überschritten haben. Das Ooplasma könnte sich damit bereits irreversibel auf die bevorstehende Degeneration über eine Apoptose eingestellt haben. Die meisten apoptotischen Prozesse sind mit der Depolarisation der mitochondrialen Membranen und einem niedrigen mitochondrialen Stoffwechsel in der Oozyte verbunden (Bras et al., 2005), womit sich die niedrige mitochondriale Aktivität in den Oozyten mit expandiertem Kumulus aus subordinanten Follikelgruppen erklären ließe. Letztendlich kann diese Hypothese nur durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden, die Apoptosekaskaden in den Oozyten im Zusammenhang mit ihrer Entwicklungskompetenz darstellen.

Die Beziehung der Chromatinkonfigurationen zur mitochondrialen Aktivität wurde im Kapitel 5.2 bereits besprochen. Dennoch sollen hier die Beziehungen der mitochondrialen Aktivitäten zwischen den Chromatinkonfigurationen noch einmal vergleichend diskutiert werden. Bei den eigenen Arbeiten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren mitochondrialen Aktivitäten in Oozyten mit unterschiedlichen Kernkonfigurationen gefunden. Die höchsten Mittelwerte ergaben sich für Oozyten mit einem fibrillären Diplotän und der Chromatinkonfigurationsgruppe Metaphase II. Bei bovinen Oozyten wurden während einer IVM auch höhere mitochondriale Aktivitäten in Oozyten mit diesen Chromatinkonfigurationen vorgefunden (Otzdorff, 2006) und auch bei Untersuchungen an porcinen Oozyten wiesen Oozyten mit einem fibrillären Diplotän die höchsten mitochondrialen Aktivitäten auf (Egerszegi et al., 2010). Die Autorin Otzdorff (2006) diskutierte in ihrer Arbeit über bovine Oozyten eine Parallele der mitochondrialen Aktivität zur Aktivität des Maturation Promoting Factor (MPF) während der Meiose. Der MPF wird durch komplexe Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge in Oozyten aktiviert und ist der zentrale Faktor zur Wiederaufnahme der Meiose (Hurk und Zhao, 2005). Die Aktivierung des MPFs wird hauptsächlich durch die MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) bestimmt, die von einer ausreichenden ATP-Synthese der Mitochondrien abhängig ist (Fan und Sun, 2004). Untersuchungen an equinen Oozyten während der IVM zeigten, dass Oozyten mit expandiertem Kumulus bereits zum Zeitpunkt der Gewinnung höhere MAPK-Aktivitäten aufwiesen als Oozyten mit einem kompakten Kumulus und der Phosphorylierungsgrad der MAPK mit einer Aktivierung des Chromatins korreliert war (Alm et al., 2004). Damit könnte sich eine Verbindung zwischen den höheren mitochondrialen Aktivitäten und dem häufigeren Auftreten von fortgeschrittenen Meiosestadien bei den Oozyten mit einem expandierten Kumulus bei den eigenen Arbeiten ergeben. Auch Torner et al. (2004, 2007) sahen bei In-vivo-Reifungen von porcinen und bei In-vitro-Reifungen von equinen Oozyten zeitliche Zusammenhänge zwischen der Kumulusexpansion, einer steten Zunahme der mitochondrialen Aktivität und einer Reifung des Chromatins. Die Ergebnisse der eigenen Arbeiten sind mit diesen Ergebnissen nicht vollständig vergleichbar, da hier die Reifung der KOK durch verschiedene Faktoren, wie der

Follikelatresie, zu unterschiedlichen, unbekanntem Zeitpunkten vor der Oozytengewinnung begonnen hatte. Daraus könnte sich dann auch die hohe Streuung der gemessenen Werte der Fluoreszenzintensität der Oozyten mit einer gleichen Kernkonfiguration ergeben haben. Denn während bei einigen Oozyten noch eine mitochondriale Aktivierung passend zu den energieintensiven Schritten der Meiose bestand (GVBD und Polkörperausschleusung), war bei anderen Oozyten bereits eine Entkopplung der chromosomalen und zytoplasmatischen Reifung eingetreten, je nachdem wie lange und intensiv atretische, prämatürnde Einflüsse auf die Oozyte gewirkt hatten. Eine Degeneration der Oozyten folgt dann, wenn aufgrund fehlender weiterer Reifungssignale zum richtigen Zeitpunkt, Kernreifung und zytoplasmatische Reifung im zunehmend atretisch werdenden Follikel nicht mehr in Kongruenz gehalten werden können. Oozyten, die bereits ein pyknotisches Chromatin aufwiesen, hatten die deutlich geringsten Fluoreszenzintensitäten pro Oozyte, da es im Zusammenhang mit apoptotischen Vorgängen zur Depolarisation der mitochondrialen Membranen und einem Rückgang der Stoffwechselaktivität in den Oozyten kommt (Bras et al., 2005).

## 5.5 Untersuchungen zur mitochondrialen Aggregation in den gewonnenen Oozyten

Die Wanderung von Mitochondrien entlang von Zellorganellen während des Zellzyklus ist mit der Maturation von Oozyten, der Ausprägung ihrer Entwicklungskompetenz und der nachfolgenden frühen Embryonalentwicklung verbunden (Ferreira et al., 2009; Sun et al., 2001). Ein Ausbleiben der Umverteilungen der Mitochondrien während der Maturation zeigte zwar keinen Einfluss auf den ATP-Gehalt in Oozyten, jedoch wurde ein Einfluss auf die kalziumvermittelte Regulation der Eizellaktivierung nachgewiesen (Brevini et al., 2005). Neben der Beschreibung der räumlichen Lokalisation der Mitochondrien im Bezug auf andere Zellorganellen wurden auch verschiedene Aggregationsmuster von Mitochondrien in Oozyten beobachtet. Torner et al. (2007, 2004) beschreiben mitochondriale Aggregationsmuster in Oozyten, die von einer feinen Verteilung der Mitochondrien im gesamten Ooplasm, über die Bildung von kristallinen Aggregaten, bis hin zur Aggregation der Mitochondrien zu groben Granula reichen, die sich zu Clustern in den Oozyten zusammenfinden. In ihren Arbeiten sahen Torner et al. (2007, 2004) eine Zunahme von Oozyten mit einem grobkörnigen mitochondrialen Aggregationsmuster bei einer Verlängerung der Reifungszeit bei porcinen Oozyten *in vivo* und bei equinen Oozyten in der IVM. Auch in bovinen Oozyten wurden Veränderungen der mitochondrialen Aggregationsmuster während der IVM beschrieben. Der Anteil Oozyten mit kristallinem mitochondrialen Aggregationsmuster nimmt zu, während der Anteil Oozyten mit feinem Aggregationsmuster mit einer andauernden IVM abnimmt (Otzdorff, 2006). Die eigenen *In-vivo*-Untersuchungen stützen die Vermutung der erwähnten Studien, dass eine zunehmende Aggregation der Mitochondrien zu einer physiologischen Eizellreifung bei der Spezies Pferd gehört. Bei den Oozyten aus präovulatorischen Follikeln, die 24 Stunden nach einer hCG-Gabe gewonnen wurden, fanden sich ausschließlich Oozyten mit grobkörnigem Aggregationsmuster. Bereits die geringen Anzahlen der untersuchten Oozyten zeigten, dass das grobkörnige Aggregationsmuster signifikant häufiger in Oozyten aus präovulatorischen Follikel zu finden war als in Oozyten aus wachsenden oder subordinanten Follikelgruppen. Torner et al. (2004) fanden in dominanten Follikeln von Sauen, die noch vor einem LH-Signal gewonnen wurden, keine Oozyten, die eine kristalline oder grobkörnige mitochondriale

Aggregation aufwiesen. Bei den eigenen Untersuchungen wurden sowohl in Oozyten der wachsenden als auch der subordinanten Follikelgruppen zu je einem Drittel Oozyten vorgefunden, die bereits grobkörnig aggregierte Mitochondrien aufwiesen. Es ergibt sich hier ein Hinweis, dass es bereits in frühen, unreifen Follikelentwicklungsstadien zu zytoplasmatischen Reifungsprozessen in equinen Oozyten kommt. Zum einen hatten die mitochondrialen Umstrukturierungen bereits in Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen begonnen, noch bevor klinisch die Dominanzentwicklung eines Follikels festzustellen war. Zum anderem zeigte sich, dass Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen nicht alle die notwendigen zytoplasmatischen mitochondrialen Reifungsvorgänge aufgrund prämaturn wirkenden Einflüssen im atretischen Follikel durchlaufen, die zu der Reifung einer entwicklungs-kompetenten Oozyte gehören könnten. Torner et al. (2004) beschreiben die Formung von mitochondrialen Clustern aus den grobkörnig aggregierten Mitochondrien im letzten Abschnitt der in vivo Maturation (32 Stunden nach hCG) bei porcinen Oozyten. Bei den eigenen Untersuchungen wurde in keiner Oozyte eine Clusterbildung der Mitochondriengranula beobachtet. Es könnte sein, dass der Zeitintervall nach der hCG-Gabe bis zur Oozytengewinnung mit 24 Stunden zu kurz gewählt war, um diese Form beobachten zu können. Es wäre aber auch möglich, dass diese Form bei der Spezies Pferd nicht auftritt, denn auch bei der IVM von equinen Oozyten konnte keine Clusterbildung beobachtet werden (Torner et al., 2007).

In Oozyten aller KOK-Morphologieklassen konnten in den eigenen Untersuchungen sowohl fein granuliert als auch grob granuliert, aggregierte mitochondriale Aggregationsmuster nachgewiesen werden. In der Tendenz enthielten Oozyten mit einem kompakten Kumulus seltener grob granuliert, aggregierte Mitochondrien als Oozyten, die nur eine Corona radiata besaßen. Oozyten mit expandiertem Kumulus unterschieden sich nicht in der Häufigkeit des Vorkommens der verschiedenen mitochondrialen Aggregationsmuster von den anderen KOK-Morphologieklassen (Abb. 29). Bei Untersuchungen an equinen Oozyten, aus tertiären Follikeln, wurde in den Oozyten der kompakten KOK ausschließlich ein feines mitochondriales Verteilungsmuster zum Zeitpunkt der Gewinnung vorgefunden, während Oozyten der expandierten KOK zu diesem Zeitpunkt ausschließlich kristallin oder grobkörnig aggregierte Mitochondrien aufwiesen (Torner et al., 2007). Torner et al. (2004) fanden bei porcinen Oozyten aus unreifen, dominanten Follikeln sowohl bei den Oozyten der kompakten als auch der aufgelockerten KOK nur Oozyten mit einem feinen mitochondrialen Verteilungsmuster. Bereits 10 Stunden nach einer hCG-induzierten Follikelreifung bei den Sauen beobachteten Torner et al. (2004) die Bildung von grobkörnig aggregierten mitochondrialen Verteilungsmustern in den gewonnenen Oozyten. Bei einer Arbeit an bovinen Oozyten (Otzdorff, 2006), bei der die Oozyten post mortem gewonnen wurden, zeigten sich ähnliche Häufigkeiten von Oozyten mit unterschiedlichem mitochondrialen Verteilungsmuster in den verschiedenen Kumulusmorphologieklassen zum Zeitpunkt der Gewinnung wie bei den eigenen Arbeiten. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine Abhängigkeit der Apoptoserate der Granulosazellen von der Kumulusmorphologie aufgezeigt. Eine Aggregation der Mitochondrien in Oozyten aus tertiären equinen Follikeln könnte sich daher durch apoptotische Signale von den Granulosazellen (Otzdorff, 2006) innerhalb weniger Stunden in den Oozyten ereignen (Torner et al., 2004), während sich eine sichtbare Veränderung der Kumulusmorphologie in atretischen Follikeln langsamer vollzieht. Da Torner et al. (2004) zeigten, dass in porcinen Oozyten die mitochondriale Aggregation in dominanten Follikel erst aufgrund eines Signals über den LH-Rezeptor kurz vor der Ovulation vollzogen wird, bleibt fraglich, ob die beobachteten grob granulierten

mitochondrialen Aggregationsmuster in den Oozyten von unreifen Follikeln bei den eigenen Arbeiten als positiv zu werten sind. Sie könnten als ein Zeichen für eine positive zytoplasmatische Prämaturation in einigen Oozyten gelten, aber auch als Zeichen dafür, dass bei anderen Oozyten präovulatorische zytoplasmatische Reifungsprozesse zu früh stattgefunden haben und es darauf hin aufgrund des Ausbleibens weiterer Reifungssignale zu einer Entkopplung der verschiedenen Reifungsprozesse in den Oozyten gekommen ist.

Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status unterschieden sich nicht in ihren mitochondrialen Aggregationsmustern. Es waren jeweils signifikant mehr Oozyten mit fein granulierten Mitochondrien nachzuweisen. Eine zusätzliche Unterteilung der Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status nach ihrer Kumulusmorphologie zeigte, dass BCB<sup>-</sup> Oozyten (=hohe G-6-PDH-Aktivität) mit kompaktem Kumulus signifikant häufiger Mitochondrien in fein granulierter Verteilung aufwiesen als BCB<sup>+</sup> Oozyten, die nur eine Corona radiata besaßen (Tab. 10). Dieses Ergebnis stimmt Untersuchungen an porcinen Oozyten überein (Egerszegi et al., 2010). Sowohl der kompakte Kumulus der Oozyten als auch ihre hohe G-6-PDH-Aktivität (BCB<sup>-</sup>) sprechen dafür, dass es sich um unreife Oozyten handelt, mit denen das hier gehäuft auftretende feine Aggregationsmuster in Verbindung steht. Hingegen könnte die hohe Aktivität der G-6-PDH (BCB<sup>+</sup>) in Oozyten mit nur einer Corona radiata oder einem expandierten Kumulus bereits auf degenerative Prozesse hinweisen (Ortega-Camarillo et al., 2009), wie es bereits im Kapitel zur G-6-PDH-Aktivität in den Oozyten diskutiert wurde. Das in diesen Oozyten gehäuft vorkommende grob aggregierte mitochondriale Aggregationsmuster zeigt, dass zytoplasmatische Reifungsprozesse in diesen Oozyten bereits stattgefunden hatten. In ihnen könnte der Zeitabschnitt, in dem eine folliculäre Prämaturation einen positiven aktivierenden Einfluss auf das Zusammenwirken von zytoplasmatischen und chromosomalen Reifungsprozesse hat, bereits verstrichen sein. Zur weiteren Aufklärung dieser Fragestellung sollten Oozyten mit unterschiedlichem G-6-PDH Status, getrennt nach ihrer Kumulusmorphologie einer IVM mit anschließender Befruchtung und Kultivierung unterzogen werden.

Die Anteile Oozyten mit unterschiedlichen mitochondrialen Aggregationsmustern unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Oozyten mit verschiedenen Kernkonfigurationen. Oozyten mit einem fein granulierten mitochondrialen Aggregationsmuster wurden jeweils signifikant häufiger vorgefunden (Tab. 11). Eine Ausnahme bildeten die Oozyten der Metaphase-II-Gruppe (MII), in denen zu gleichen Anteilen fein und grob granuliert Aggregationsmuster der Mitochondrien nachgewiesen wurden. Die Oozyten der MII unterschieden sich dabei aber nicht signifikant in der Verteilung ihrer mitochondrialen Aggregationsmuster von den Oozyten anderer Chromatinkonfigurationen. Nach einer IVM von equinen Oozyten war beobachtet worden, dass Oozyten im Diplotän zu 85,7% fein und Oozyten mit einer MII zu 90,9% grob granuliert, aggregierte Mitochondrien aufwiesen (Torner et al., 2007). Otdorff (2006) stellte während der IVM von bovinen Oozyten eine signifikante Abnahme des feinen und eine Zunahme des kristallinen Aggregationsmusters in Oozyten, parallel zu ihrer meiotischen Reifung, fest. Auch bei der in vivo Maturation von porcinen Oozyten wurde, parallel zur Zunahme des Anteils chromosomal reifer Oozyten (MII), eine Zunahme der Oozyten mit einem grob granulierten mitochondrialen Aggregationsmuster beobachtet (Torner et al., 2004). An den eigenen Ergebnissen lässt sich daher bei der Betrachtung der mitochondrialen Aggregationsmuster in Abhängigkeit vom Meiosestadium eine Inhomogenität zwischen der zytoplasmatischen Reifung und der Kernreifung bei Oozyten aus unreifen Follikeln erkennen. Denn in einem relativ großen Anteil der Oozyten in einem

Diplotänstadium hatte sich schon eine mitochondriale Aggregation vollzogen, während sie bei einem relativ großen Anteil der reifen Oozyten (MII) noch nicht stattgefunden hatte. Trotzdem ist auch aus den eigenen Ergebnissen zu erkennen, dass in equinen Oozyten mit einer voranschreitenden Meiose die Aggregation der Mitochondrien *in vivo* zunimmt.

Bei den eigenen Arbeiten wurde eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität (Fluoreszenzintensität/Oozyte) in Oozyten mit grob granulierten, aggregierten Mitochondrien gemessen als in Oozyten mit einem fein granulierten mitochondrialen Aggregationsmuster. Torner et al. (2007) und Otdorff (2006) sahen keine Unterschiede der mitochondrialen Aktivität in equinen oder bovinen Oozyten mit unterschiedlichen mitochondrialen Aggregationsmuster während einer IVM. Hingegen wurden während der *in vivo* Maturation von porcinen Oozyten ebenfalls signifikante Zunahmen der mitochondrialen Aktivitäten in den Oozyten parallel zur zunehmenden Aggregation der Mitochondrien bis zur Endphase der Reifung festgestellt (Torner et al., 2004). Im Gegensatz dazu sahen Tarazona et al. (2006) eine feine Verteilung der Mitochondrien bei reifen bovinen Oozyten nach einer IVM. Sie konnten keine Beziehungen zwischen dem ATP-Gehalt der Oozyten und der mitochondrialen Verteilung feststellen. Andere Autoren sahen eine hohe mitochondriale Aktivität *in vitro* eher zum Zeitpunkt des GVBD, zu dem die Mitochondrien noch in der Mehrzahl feinkörnig aggregiert in den Oozyten vorlagen (Otdorff 2006). Doch bei den eigenen Untersuchungen ergaben sich, insbesondere bei der Betrachtung der Oozyten aus präovulatorischen Follikeln, bereits Hinweise darauf, dass eine zunehmende mitochondriale Aggregation im Zusammenhang mit einer Zunahme der mitochondrialen Aktivität Merkmale einer physiologischen Eizellreifung bei Pferden darstellen.

Bei den eigenen Untersuchungen wurden in den Oozyten die keinen Kern aufwiesen ausschließlich fein granuliert mitochondriale Aggregationsmuster vorgefunden. In ihnen war das fein granuliert mitochondriale Aggregationsmuster signifikant häufiger zu finden als bei den Oozyten der MII-Gruppe und tendenziell häufiger als bei Oozyten der MI-Gruppe und den Oozyten mit einem kondensierten oder fibrillären Diplotän. Untersuchungen an murinen Oozyten zeigten, dass sich die Wanderung von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli vollzieht. Die Mikrotubuli leiten die Mitochondrien während der Eizellreifung in die Kernregion und zu den Polen des Spindelapparates (Van, 1991). Die Ergebnisse der eigenen Arbeiten unterstützen diese Beobachtungen in sofern, dass es bei Oozyten ohne Kern nicht zu einer Organisation der Zellorganellen und Filamente kommen kann und somit auch nicht zu einer Organisation der mitochondrialen Verteilung. Auch bei den Oozyten mit einem pyknotischen Chromatin wurde in den eigenen Arbeiten ein hoher Anteil Oozyten mit fein granuliert aggregierten Mitochondrien vorgefunden. Es ist auch hierbei zu erkennen, dass durch das Fehlen von Strukturen, die aufgrund der Kernreifung entstehen (Spindelapparat), oder bei diesen Oozyten entstanden waren und bereits wieder abgebaut wurden, eine feine Verteilung der Mitochondrien in den Oozyten erhalten blieb oder sich im Zuge der Degeneration der Mikrofilamente wieder ergab. Es wird dadurch ersichtlich, dass die Kernreifung und die zytoplasmatische Reifung eng regulativ miteinander verbunden sind und eine Entkopplung der beiden Reifungsprozesse nicht zu einer adäquaten, autonomen Reifung der einzelnen Kompartimente in den Oozyten führt.

## 5.6 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass zum Zeitpunkt der Rosse neben einem reifen, präovulatorischen Follikel, eine subordinante Follikelgruppe vorhanden ist, die hauptsächlich aus atretischen Follikeln besteht. Neu herangewachsene Follikelgruppen bestehen hingegen bis kurz vor dem Erscheinen eines dominanten Follikels hauptsächlich aus vitalen Follikeln. Atretische Prozesse in subordinanten Follikeln führen dazu, dass die Oozytengewinnungsrate ansteigt, der Anteil Oozyten mit einem expandierten Kumulus oder nur mit einer Corona radiata größer wird und die gewonnenen Oozyten häufiger ein kondensiertes Chromatin im Diplotänstadium aufweisen. Bei der Follikelaspilation heranwachsender, vitaler Follikelgruppen werden dagegen niedrigere Oozytengewinnungsraten und erhöhte Anteile Oozyten mit einem kompakten Kumulus und im Chromatinstadium des fibrillären Diplotäns erreicht. Damit führt die Aspiration von subordinanten Follikelgruppen, oberflächlich betrachtet, effektiver zu einer großen Anzahl von bereits angereiften Oozyten mit den Eigenschaften, die in der Literatur als positiv für eine Verwendung zur In-vitro-Embryonenproduktion beschrieben werden.

Aber auch bei der Oozytengewinnung von heranwachsenden Follikelgruppen lassen sich zahlreich expandierte Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) finden und das kondensierte Diplotän stellt auch unter den Oozyten von heranwachsenden Follikelgruppen die am häufigsten vorkommende Chromatinkonfiguration dar. Diese Eigenschaften weisen darauf hin, dass es auch bereits in vitalen, wachsenden Follikeln zu einer initialen Eizellreifung kommt, die auf früh beginnende atretische Prozesse in den Follikeln zurückgeführt werden könnte. Die Dauer und die Intensität, mit der atretische Prozesse auf Eizellen einwirken, entscheiden letztendlich darüber, ob sich eine Follikelatresie, wie von anderen Autoren vermutet, positiv auf die Entwicklungskompetenz der gewonnenen Oozyten auswirkt.

Bei den Untersuchungen wurde festgestellt, dass es sowohl in frühen als auch in späten folliculären Entwicklungsstadien zu einer Entkopplung der chromosomalen und zytoplasmatischen Reifung in Oozyten kommen kann. Eine Entkopplung dürfte mit einem Verlust der Entwicklungskompetenz der Oocyte und eventuell auch mit dem Verlust der Entwicklungsfähigkeit des umgebenden Follikels verbunden sein. Besonders in Follikeln mit ausgeprägter, bereits lang andauernder Atresie könnte der divergierende Prozess zwischen chromosomaler und zytoplasmatischer Reifung bereits irreversibel in den Oozyten vorangeschritten sein. Oozyten mit der gleichen Chromatinkonfiguration oder Kumulusmorphologie können daher, bei unterschiedlicher folliculärer Herkunft, im Bezug auf ihre Entwicklungskompetenz nicht als gleichwertig betrachtet werden.

Verdeutlicht wurde dieses bei den eigenen Untersuchungen durch die Beurteilung der zytoplasmatischen Reifung anhand der mitochondrialen Aktivität und Aggregation. Hohe mitochondriale Aktivitäten fanden sich insbesondere bei Oozyten der expandierten KOK aus wachsenden Follikelgruppen, während Oozyten der expandierten KOK aus subordinanten Follikelgruppen signifikant niedrigere mitochondriale Aktivitäten aufwiesen. Eine beginnende Follikelatresie, sichtbar an der Kumulusexpansion, führte bei Oozyten aus den wachsenden Follikelgruppen zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen Reifung sowie zu einer frühen chromosomalen Reifung im Germinalvesikel. Dadurch könnte sich ein positiver Einfluss auf die Entwicklungskompetenz der Oozyten ergeben, denn eine hohe mitochondriale Aktivität benötigen Eizellen um den steigenden Bedarf an Energie während der Prozesse der Meiose, der molekularen Reifung und der Fertilisation zu decken. Die Aktivierung der Eizellreifung in den atretischen Follikeln der subordinanten Follikelgruppen liegt dagegen schon länger zurück, die Energie ist verbraucht und die Eizellen sind bereits in degenerative, apoptotische

Zellprozesse eingetreten, die mit einem Verlust der Entwicklungskompetenz einhergehen dürften.

Im Zusammenhang mit der mitochondrialen Aktivierung kommt es zur Aggregation der Mitochondrien in den Oozyten. Die eigenen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die mitochondriale Aggregation, verbunden mit einer Erhöhung der mitochondrialen Aktivität und dem Erreichen der Metaphase II, physiologisch zu den finalen Reifungsprozessen in equinen Oozyten kurz vor der Ovulation gehört. Das Vorkommen von aggregierten Mitochondrien in Oozyten mit niedrigen mitochondrialen Aktivitäten und frühen Meiosestadien zeigt demgegenüber, dass zu jedem Zeitpunkt eine Entkopplung der zytoplasmatischen und chromosomalen Reifung erfolgen kann.

Die Anteile Oozyten mit einer hohen bzw. niedrigen Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) waren in den verschiedenen Follikelgruppen gleich. Speziell bei den Untersuchungen der Chromatinkonfiguration der Oozyten ergaben sich Hinweise, dass eine hohe G-6-PDH-Aktivität in Oozyten aus vitalen Follikeln im Zusammenhang mit einer noch nicht abgeschlossenen Eizellentwicklung steht, während bei Oozyten aus atretischen Follikeln sich eine hohe Enzymaktivität aus degenerativen, apoptotischen Prozessen ableiten könnte. Beide Ursachen der hohen G-6-PDH-Aktivität führen jedoch zu einer verminderten Entwicklungskompetenz der Oozyten *in vitro*.

Da sich Oozyten der expandierten KOK und Oozyten, die nur von einer Corona radiata umgeben waren, in ihren zytoplasmatischen und chromosomalen Eigenschaften nicht von einander unterschieden, sich aber signifikante Unterschiede zu den kompakten KOK ergaben, sollten diese Oozyten zu einer Oozytengruppe mit ähnlichem Entwicklungsstatus zusammengefasst werden. Die Corona-radiata-Oozyten könnten sich hauptsächlich aus zuvor expandierten KOK nach Abrasion der oberen Zellschichten durch mechanische Einflüsse bei der Follikelaspiration generiert haben. Dieses wird sicherlich bei expandierten Kumuli, durch die bereits gelockerten Zellverbindungen leichter und somit häufiger erfolgen, als bei kompakten Kumuli.

Da der Entwicklungsstatus einer Follikelpopulation chromosomale und zytoplasmatische Eigenschaften von den darin enthaltenen Oozyten signifikant beeinflusst, kann die Information über den Entwicklungsstatus einer Follikelgruppe als weiterer Parameter zur Abschätzung der equinen Oozytenqualität und zu deren Beeinflussung dienen. Eine Oozytengewinnung von subordinanten Follikeln während der Rosse dürfte aufgrund der bereits lang anhaltenden atretischen Einflüsse, vermehrt zu nicht mehr entwicklungscompetenten Eizellen führen. Eine wiederholte Eizellgewinnung in sehr kurzen Zeitabständen würde dagegen Eizellen generieren, die ihre vollständige Entwicklungskompetenz noch nicht ausgebildet haben.

Eine Eizellgewinnung im Zeitraum der Deviation des dominanten Follikels erscheint geeignet um eine hohe Anzahl entwicklungscompetenter Oozyten zu erlangen. Um die positiven Einflüsse einer beginnenden Follikelatresie auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten optimaler auszunutzen, könnte sich eine Oozytengewinnung nach der Deviation des dominanten Follikels als ratsamer erweisen als kurz zuvor. Erst eine Prüfung der tatsächlichen Entwicklungskompetenz der Oozyten nach der Etablierung zuverlässiger Verfahren zur *In-vitro*-Embryonenproduktion bei Pferden wird diese Fragestellung endgültig klären können.

## 6 Zusammenfassung

### Untersuchungen zur Eizellqualität in differenten Follikelpopulationen bei Stuten

Ziel des tierexperimentellen Designs war es Eizellen in vivo zu gewinnen, die verschiedenen, definierten physiologischen Entwicklungsstadien von Follikelpopulationen zugeordnet werden konnten. Durch die parallele Bestimmung mehrerer Parameter der Eizellqualität an jeder einzelnen Eizelle, sollten Zusammenhänge in vivo zwischen chromosomalen und zytoplasmatischen Reifungsprozessen in den Oozyten untersucht werden. Insbesondere sollte dabei die folliculäre Herkunft als Einflussfaktor auf die Eigenschaften von Oozyten näher beschrieben werden.

Die Oozytengewinnung erfolgte durch wiederholte transvaginale ultraschallgeleitete Follikelpunktionen, die in 120 Follikelpunktionssitzungen an 14 Mecklenburger Warmblutstuten während einer Zuchtseason vorgenommen wurden. Die Eizellgewinnung erfolgte zunächst bei rossigen Stuten, denen 24 Stunden zuvor ein hCG-Präparat appliziert worden war. Die Follikelaspirate wurden getrennt nach präovulatorischen Follikeln und subordinanten Follikeln gesammelt. Nachdem alle sichtbaren Follikel während der Rosse aspiriert worden waren, wurden die Stuten einer zweiten Follikelaspiration unterzogen, noch bevor sich in der neu herangewachsenen Follikelpopulation ein dominanter Follikel entwickelt hatte. Zur genaueren Charakterisierung der verschiedenen Follikelgruppen erfolgten stichprobenartig Analysen der Östradiol-17 $\beta$ - und Progesteronkonzentrationen in den Follikelflüssigkeiten. Die Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) wurden nach der Gewinnung unter einem Stereomikroskop morphologisch beurteilt und mit Brillant-Cresyl-Blau (BCB) unter Kulturbedingungen zur Bestimmung der Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) inkubiert. Anschließend wurden die denudierten Oozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CMTM Ros zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität und Aggregation vital inkubiert und nach einer Fixierung in Paraformaldehyd mit Hoechst 33258 zur Bestimmung der Chromatinkonfiguration parallel gefärbt. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgte unter einem Epifluoreszenzmikroskop mit zusätzlichem Photometer.

Insgesamt wurden 1058 Follikel aspiriert und dabei 178 KOK gewonnen. Es entfielen 75 Oozyten auf die wachsende Follikelgruppe, 101 Oozyten auf die subordinante Follikelgruppe und zwei Oozyten konnten aus präovulatorischen Follikeln gewonnen werden.

Die Oozytengewinnungsrate pro Aspirationssitzung war bei der Aspiration von wachsenden Follikelgruppen signifikant niedriger als bei der Aspiration von subordinanten Follikelgruppen ( $p < 0,01$ ). Eine zuverlässige Gewinnung von Oozyten aus präovulatorischen Follikeln wurde mit der angewandten Technik in dieser Untersuchung nicht realisiert.

Kompakte KOK wurden signifikant häufiger aus wachsenden Follikelgruppen ( $p < 0,05$ ) und Oozyten, die nur die Corona radiata aufwiesen tendenziell häufiger aus den subordinanten Follikelgruppen ( $p = 0,06$ ) gewonnen.

Die Östradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen waren mit  $1911,4 \pm 184,5$  ng/ml in präovulatorischen Follikeln, mit  $885,6 \pm 120,6$  ng/ml in Follikeln der wachsenden und mit  $54,4 \pm 155,9$  ng/ml in Follikeln der subordinanten Follikelgruppe zwischen den Follikelgruppen signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ).

Insgesamt wurde mittels der BCB-Färbung in einem Drittel der Oozyten eine hohe G-6-PDH-Aktivität festgestellt. Es wurden keine signifikanten Einflüsse der Follikelgruppen, der KOK-Morphologie, des mitochondrialen Aggregationsmusters oder der mitochondrialen Aktivität auf die Verteilung von Oozyten mit unterschiedlicher G-6-PDH-Aktivität beobachtet.



Oozyten, deren Kern sich im fibrillären Diplotänstadium befand, wiesen einen signifikant größeren Anteil Oozyten mit einer niedrigen G-6-PDH-Aktivität und Oozyten mit pyknotischen Chromatin einen signifikant größeren Anteil Oozyten mit einer hohen G-6-PDH-Aktivität auf ( $p < 0,05$ ).

Bei der Untersuchung der Chromatinkonfigurationen konnte gezeigt werden, dass wachsende Follikelpopulationen signifikant höhere Anteile Oozyten im fibrillären Diplotänstadium enthalten, während Oozyten aus subordinanten Follikelpopulationen gehäuft ein kondensiertes Diplotän aufwiesen ( $p < 0,05$ ). Oozyten, deren Chromatin pyknotisch war, fanden sich nur in subordinanten Follikelgruppen. Oozyten mit einem expandierten Kumulus waren signifikant häufiger bereits zur Metaphase II gereift als Oozyten mit einem kompaktem Kumulus ( $p < 0,05$ ).

In Oozyten aus wachsenden Follikelgruppen wurden signifikant höhere Werte (Fluoreszenzintensität/Oozyte) der mitochondrialen Aktivität gemessen als in Oozyten aus subordinanten Follikelgruppen ( $p < 0,05$ ). Oozyten, die nur eine Corona radiata aufwiesen und Oozyten der expandierten KOK zeigten ebenfalls signifikant höhere Werte der mitochondrialen Aktivität als Oozyten mit kompaktem Kumulus ( $p < 0,05$ ). Ein signifikanter Einfluss der Chromatinkonfiguration auf die mitochondriale Aktivität wurde nicht beobachtet. Insgesamt zeigten 28,1% der untersuchten Oozyten ein grobgranuliertes mitochondriales Aggregationsmuster und 71,8% ein fein granuliertes Aggregationsmuster. Oozyten aus präovulatorischen Follikeln wiesen signifikant häufiger ein grobgranuliertes mitochondriales Aggregationsmuster auf als Oozyten aus wachsenden oder subordinanten Follikelgruppen ( $p < 0,05$ ). Oozyten, die keinen Kern aufwiesen, besaßen alle ein fein granuliertes Aggregationsmuster. Oozyten mit grob granulierten Mitochondrien zeigten eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität als Oozyten mit fein granulierten Mitochondrien ( $p < 0,0001$ ).

Die Untersuchungsergebnisse zeigten deutlich, dass in subordinanten Follikelgruppen hauptsächlich atretische und in den wachsenden Follikelgruppen zum größten Teil vitale Follikel enthalten waren. Aufgrund der Ergebnisse kann angenommen werden, dass es bereits in unreifen Follikeln zu einer Entkopplung zwischen der chromosomalen und zytoplasmatischen Reifung in Oozyten kommen kann. Besonders in stark atretischen Follikeln könnte dieser Prozess bereits irreversibel fortgeschritten sein. Oozyten mit der gleichen Chromatinkonfiguration oder Kumulismorphologie sollten daher bei unterschiedlicher folliculärer Herkunft hinsichtlich ihrer Entwicklungskompetenz in vitro nicht als gleichwertig betrachtet werden. Weiterführend sollte daher die Entwicklungskompetenz der Oozyten in Abhängigkeit zu ihrer folliculären Herkunft untersucht werden. Da die folliculäre Herkunft chromosomale und zytoplasmatische Eigenschaften von equinen Oozyten signifikant beeinflusst, kann das Wissen über die folliculäre Herkunft einer Oozyte als weiterer Parameter zur Abschätzung der Oozytenqualität dienen. Die erzielten Ergebnisse können in Zukunft dazu beitragen In-vitro-Systeme der Eizellreifung zu optimieren und die Oozytengewinnung auf eine möglichst hohe Anzahl entwicklungscompetenter Oozyten zu orientieren.

## 7 Summary

### **Studies on oocyte quality of different follicle populations in mares**

The aim of the experimental design was to recover oocytes *in vivo*, which could be assigned to follicle populations in different physiologic developmental stages. By a parallel determination of several parameters of oocyte quality for every single oocyte, links between chromosomal and cytoplasmic maturation processes *in vivo* should be investigated. Especially the impact of the follicular origin on the characteristics of oocytes should be described in detail.

Oocyte recovery was done by repeated transvaginal ultrasound guided follicle aspiration in 14 Mecklenburger Warmblood mares, which underwent 120 follicle aspiration sessions during one breeding season. Follicle aspiration sessions were performed first during the heat of the mare, 24 hours after they had received hCG. The aspirates of the preovulatory follicles and the subordinate follicle populations were collected separately. After the ablation of all visible follicles of the mare, a second follicle aspiration session was done just before a dominant follicle had developed in the newly grown progressive follicle population. To characterise the follicle populations more closely random samples of follicle fluid from the different follicle populations were taken simultaneously and analysed for their oestradiol and progesterone content. Immediately after recovery the cumulus-oocytes-complexes (COCs) were divided in groups depending on their cumulus morphology under a stereomicroscope and incubated under culture conditions with brilliant cresyl blue (BCB), to evaluate the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) enzyme. The denuded oocytes were then incubated with the Mito Tracker Orange CMTM Ros vital stain to measure the mitochondrial activity and aggregation. Following a fixation with paraformaldehyde the oocytes were also subjected to Hoechst 33258 stain to detect the chromatin configuration. Later on, the evaluation of the fluorescent stains was done by using an epifluorescence microscope which was connected to a photometric system.

Altogether, 1058 follicles were aspirated and 178 COCs were recovered. Out of these, 66 oocytes belonged to growing follicle populations, 101 to subordinate follicle populations and two oocytes were recovered from preovulatory follicles.

The oocyte recovery rate per aspiration session was significantly lower for the aspiration of growing follicle populations than for subordinate follicle populations ( $p < 0.01$ ). A reliable recovery of oocytes from preovulatory follicles was not realised with the applied technique in this study.

Significantly more oocytes with compact cumuli were found in the progressive follicle population ( $p < 0.05$ ), whereas the subordinate follicle population tended to contain more oocytes, which were only covered by corona radiata cells ( $p = 0.06$ ).

The oestradiol concentrations showed a level of  $1911.7 \pm 185.5$  ng/ml in preovulatory follicles,  $885.6 \pm 120.6$  ng/ml in growing and  $54.4 \pm 155.9$  ng/ml in subordinate follicle populations indicating significant differences between the follicular fluid samples of the different follicle populations ( $p < 0.05$ ).

By the measurement with BCB stain, altogether one third of the recovered oocytes showed a high G-6-PDH activity. No significant impacts of the follicle population of origin, the cumulus morphology, the mitochondrial aggregation patterns or the mitochondrial activity of the oocytes were observed on the distribution patterns of oocytes with different G-6-PDH activity. While oocytes with the chromatin configuration of a fibrillar diplotene showed a significantly

higher amount of oocytes with a low G-6-PDH activity, oocytes with pycnotic chromatin had a significantly higher number of oocytes with a high G-6-PDH activity ( $p < 0.05$ ).

The evaluation of the chromatin configuration showed that follicles of growing follicle populations contained significantly higher proportions of oocytes with a fibrillar diplotene, while subordinate follicle populations had higher proportions of oocytes with a condensed diplotene ( $p < 0.05$ ). Oocytes with a pycnotic chromatin were found in subordinate follicle populations only. Moreover, significantly more oocytes with expanded cumulus cells were already progressed to the metaphase II stage of meiosis than oocytes with a compact cumulus ( $p < 0.05$ ).

The mitochondrial activity (fluorescence intensity/oocyte) was significantly increased in oocytes of growing follicle populations as compared to oocytes from subordinate follicle populations ( $p < 0.05$ ). Higher levels of mitochondrial activity were found also in oocytes with an expanded cumulus and in oocytes with only corona radiata cells than in the oocytes with a compact cumulus ( $p < 0.05$ ). A significant impact of the chromatin configuration of the oocytes on the mitochondrial activity was not observed.

In total, 28.1% of the oocytes showed a granulated mitochondrial aggregation pattern and 71.8% a fine aggregation pattern of the mitochondria. Oocytes from preovulatory follicles had significantly more often a granulated mitochondrial aggregation pattern than oocytes from growing or subordinate follicle populations ( $p < 0.05$ ). In oocytes without a nucleus, only the fine mitochondrial aggregation pattern was found. The mitochondrial activity was significantly higher in oocytes which showed mitochondria in granulated aggregation pattern than in oocytes with fine mitochondrial aggregation pattern ( $P < 0.0001$ ).

The results of this study show clearly that subordinate follicle populations consisted mainly of atretic follicles while the growing follicle population consisted of a greater number of viable follicles. Based on the results it could be supposed that already in immature follicles chromosomal and cytoplasmic maturation processes of the enclosed oocytes can be teased apart. Especially in follicles with progressed atresia this deviation process could have already reached an irreversible stage. Therefore, oocytes with the same chromatin configuration or the same cumulus morphology but with a different follicular origin should not be taken as having the same developmental competence. In continuing studies the developmental competence of oocytes should be checked in dependence of their follicular origin. Because of the significant impact of the follicular origin on chromosomal and cytoplasmic characteristics of equine oocytes, the knowledge about the follicular origin of an oocyte can be used as a parameter to assess the quality of an oocyte. The results can contribute to optimize in vitro oocyte maturation systems and should be helpful to design oocyte-recovery treatments in vivo, which results in highest numbers of developmental competent oocytes.

## 8 Zitierte Literatur

- Aarle P, Aguer D, Baars J, Callen A (1999). Physiologie der Fortpflanzung bei Säugetieren. In: Kompendium der Fortpflanzung bei Tieren; Herausgeber: Broers P, Intervet International B. V., pp. 1-12.
- Abel W (1984). Erhebung und Auswertung fruchtbarkeitsrelevanter Daten und Befunde bei Traber- und Warmblutstuten auf einer Pferdebesamungsstation während der Zuchtsaison 1983, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Aguilar JJ, Woods GL, Miragaya MH, Olsen LM, Vanderwall DK (2001). Effect of homologous preovulatory follicular fluid on in vitro maturation of equine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology* 56(5):745-758.
- Akufo E, Phelps DA, Tibbitts FD, Foote WD (1988). Influence of follicular components on oocyte meiosis in vitro. *Theriogenology* 30(3):643-648.
- Albertini DF (1992). Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutat Res* 296(1-2):57-68.
- Alberts B, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson D (1990). Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage, Verlag: VCH, Weinheim; Basel, pp. 951
- Allen WR (2009). Historical and modern aspects of equine embryo transfer. Proceedings of the 25th scientific meeting of the A.E.T.E., Poznan, Association Europeenne de Transfert Embryonnaire, pp. 7-41.
- Alm H, Torner H (1994). In vitro maturation of horse oocytes. *Theriogenology* 42(2):345-349.
- Alm H, Hinrichs K (1996). Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *J Reprod Fertil* 107(2):215-220.
- Alm H, Torner H, Kanitz W, Becker F, Hinrichs K (1997). Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes. *Equine Vet J Suppl*(25):47-50.
- Alm H, Torner H, Blottner S, Nuernberg G, Kanitz W (2001). Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 56(5):817-829.
- Alm H, Torner H, Tomek W, Mlodawska W, Okolski A, Kanitz W (2004). MAP Kinase and AKT activities in equine oocytes depending on cumulus morphology during maturation in vitro. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 13, pp. 17-19.
- Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W (2005). Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63(8):2194-2205.
- Ambruosi B, Lacalandra GM, Iorga AI, De ST, Mugnier S, Matarrese R (2009). Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology* 71(7):1093-1104.
- Amsterdam A, Rotmensch S (1987). Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr Rev* 8(3):309-337.

- Barbacini S, Colleoni S, Duchi R, Neil D, Lazzari G., Galli C (2010). An Update of Results Obtainable with Ovum Pick Up (OPU), Intracytoplasmic Sperm Injektion (ICSI) and Embryo Culture (IVC) in Equine Reproduktion. In: LBH: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress Herausgeber: Vervuert I, Aschenbach J, Gäbel G, Dauschies A; Verlag: Leipziger Universitätsverlag GmbH, Leipzig pp. 304-307.
- Barritt JA, Kokot M, Cohen J, Steuerwald N, Brenner CA (2002). Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reprod Biomed Online* 4(3):243-247.
- Becker F, Kanitz W, Alm H (1997). Investigation of repeated follicular aspiration in mares. *Reprod Domest Anim* 32:36.
- Becker F, Kurth J, Schneider F, Nurnberg G, Heinrich H, Kanitz W (2006). Measurement of redox potential and steroid concentrations in the follicular fluid of growing and regressing follicles of mares. *Acta Vet Hung* 54(1):95-105.
- Beg MA, Ginther OJ (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132(3):365-377.
- Belin F, Goudet G, Duchamp G, Gerard N (2000). Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biol Reprod* 62(5):1335-1343.
- Bergfelt DR, Ginther OJ (1985). Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology* 24(1):99-108.
- Bergfelt DR, Ginther OJ (1993). Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 39(4):781-796.
- Bergfelt DR, Gastal EL, Ginther OJ (2001). Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. *Biol Reprod* 65(2):426-432.
- Betteridge KJ (2000). Comparative aspects of equine embryonic development. *Anim Reprod Sci* 60-61:691-702.
- Bezard J, Mekarska A, Goudet G, Duchamp G, Palmer E (1997). Timing of in vivo maturation of equine preovulatory oocytes and competence for in vitro maturation of immature oocytes collected simultaneously. *Equine Vet J Suppl*(25):33-37.
- Bezard J, Bogh IB, Duchamp G, Hyttel P, Greve T (2002). Comparative evaluation of nuclear morphology of equine oocytes aspirated in vivo and stained with Hoechst and orcein. *Cells Tissues Organs* 170(4):228-236.
- Blödow G, Götze M, Kitzig M, Brussow KP, Duschinski U (1988). Radioimmunologische Steroidhormonbestimmung in der Follikelflüssigkeit bei Rind und Schwein. *Isotopenpraxis* 24:151-155.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 66(1):38-43.
- Bogh IB, Hoier R, Synnestevedt B, Greve T (2000). Steroid concentrations in follicular fluid aspirated repeatedly from transitional and cyclic mares. *Theriogenology* 54(6):877-888.
- Bracher V, Parlevliet J, Fazeli A, Pieterse M, oss P (1993). Repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in the mare. *Equine Vet J Suppl* 15:75-78.

- Bras M, Queenan B, Susin SA (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 70(2):231-239.
- Brevini TA, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F (2005). Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biol Reprod* 72(5):1218-1223.
- Bruck I, Synnestevedt B, Greve T (1997). Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology* 47(6):1157-1167.
- Brunet S, Maro B (2005). Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction* 130(6):801-811.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43(4):543-547.
- Busch W, Klug E (1999). Fortpflanzungsstörungen bei der Stute und Krankheiten der weiblichen Geschlechtsorgane. In: Handbuch Pferdepraxis; Herausgeber: Dietz, Huskamp, Verlag: F. Enke, Stuttgart, pp. 567-599.
- Carnevale EM, Maclellan LJ (2006). Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22(3):843-856.
- Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K (2006a). Blastocyst development in equine oocytes with low meiotic competence after suppression of meiosis with roscovitine prior to in vitro maturation. *Zygote* 14(1):1-8.
- Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K (2006b). Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 66(4):955-963.
- Colgan DF, Murthy KG, Prives C, Manley JL (1996). Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature* 384(6606):282-285.
- Collins A, Palmer E, Bezard J, Burke J, Duchamp G, Buckley T (1997). A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle. *Equine Vet J Suppl*(25):12-16.
- Cook N, Squires EL, Cook V, Jasko D (1992). Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes: preliminary results. *J Equine Vet Sci* 12:204-207.
- Cook N, Squires EL, Ray B, Jasko D (1993). Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Vet J Suppl* 3:80-81.
- Coutinho da Silva MA, Carnevale EM, Maclellan LJ, Seidel GE, Jr., Squires EL (2002). Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. *J Anim Sci* 80(5):1275-1279.
- Cran DG, Moor RM, Hay MF (1980). Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J Reprod Fertil* 59(1):125-132.
- Crozet N, hmed-Ali M, Dubos MP (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fertil* 103(2):293-298.
- Cummins JM (2004). The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115 Suppl 1:S23-S29.

- Daxhelet GA, Coene MM, Hoet PP, Cocito CG (1989). Spectrofluorometry of dyes with DNAs of different base composition and conformation. *Anal Biochem* 179(2):401-403.
- Deansley R (1975). Germ cell development and the meiotic prophase in the fetal horse ovary. *J. Reprod. Fert.*, pp. 547-552.
- Dell'Aquila ME, Albrizio M, Maritato F, Minoia P, Hinrichs K (2003). Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. *Biol Reprod* 68(6):2065-2072.
- Dell'aquila ME, Ambruosi B, De ST, Cho YS (2009). Mitochondrial distribution and activity in human mature oocytes: gonadotropin-releasing hormone agonist versus antagonist for pituitary down-regulation. *Fertil Steril* 91(1):249-255.
- Donadeu FX, Ginther OJ (2001). Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. *Reproduction* 121(6):897-903.
- Donadeu FX, Ginther OJ (2003). Interactions of follicular factors and season in the regulation of circulating concentrations of gonadotrophins in mares. *Reproduction* 125(5):743-750.
- Donadeu FX, Watson ED (2007). Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Anim Reprod Sci* 100(3-4):225-242.
- Donadeu FX, Pedersen HG (2008). Follicle development in mares. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2:224-231.
- Driancourt M (1979). Follicular kinetics in the mare ovary. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 19:1443-1453.
- Driancourt MA, Paris A, Roux C, Mariana JC, Palmer E (1982). Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reprod Nutr. Dev.* 22 (6), pp. 1035-1047.
- Duchamp G, Bezar J, Palmer E (1995). Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimetres in mares. *Biol Reprod Monograph Series* 1:82-88.
- Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M, Carroll J (2004). Sperm-triggered [Ca<sup>2+</sup>] oscillations and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development* 131(13):3057-3067.
- Dumollard R, Duchen M, Carroll J (2007). The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 77:21-49.
- Edwards RG (1965). Maturation in Vitro of Mouse Sheep Cow Pig Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. *Nature* 208(5008):349.
- Egerszegi I, Alm H, Ratky J, Heleil B, Brussow KP, Torner H (2010). Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod Fertil Dev* 22(5):830-838.
- El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, St John JC (2006). Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction* 131(2):233-245.
- Eppig JJ (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation. In: The ovary. Adashi, Leug, editors. New York: Raven Press, Ltd.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2890-2894.

- Ericsson SA, Boice ML, Funahashi H, Day BN (1993). Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* 39(1):214.
- Fair T, Hyttel P, Greve T (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42(4):437-442.
- Fan HY, Sun QY (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 70(3):535-547.
- Fay JE, Douglas RH (1987). Changes in thecal and granulosa cell LH and FSH receptor content associated with follicular fluid and peripheral plasma gonadotrophin and steroid hormone concentrations in preovulatory follicles of mares. *J Reprod Fertil Suppl* 35:169-181.
- Ferin M (1998). Ovarian cycle, mammals. In: Encyclopedia of reproduction. Verlag: Academic Press, San Diego und London, pp. 547-552.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71(5):836-848.
- Först S (2003). Beitrag zur Diagnostik und Therapie persistierender anovulatorischer Ovar-Follikel beim Pferd . Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Fortune JE, Rivera GM, Yang MY (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 82-83:109-126.
- Franz LC, Squires EL, O'Donovan B, Scott TJ, Carnevale EM (2001). Collection and in vitro maturation of equine oocytes from estrus, diestrus and pregnant mares. *J Equine Vet Sci* 1:26-32.
- Franz LC, Choi YH, Squires EL, Seidel GE, Jr., Hinrichs K (2003). Effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction* 125(5):693-700.
- Fulka J, Jr., First NL, Moor RM (1998). Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 4(1):41-49.
- Gabrielli BG, Roy LM, Maller JL (1993). Requirement for Cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science* 259(5102):1766-1769.
- Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G (2002). Frozen-thawed embryos produced by Ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 58:705-708.
- Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G (2007). Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 98(1-2):39-55.
- Galli C, Lazzari G (2008). The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2:1-7.
- Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Ginther OJ (1997). Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol Reprod* 57(6):1320-1327.
- Gastal EL, Gastal MO, Wiltbank MC, Ginther OJ (1999). Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biol Reprod* 61(1):31-39.



- Gastal EL, Gastal MO, Nogueira GP, Bergfelt DR, Ginther OJ (2000). Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. *Theriogenology* 53(4):925-940.
- Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ (2004). Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction* 128(4):417-422.
- Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ (2006). Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* 131(4):699-709.
- Gavin AC, Schorderet-Slatkine S (1997). Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 46(3):383-391.
- Gerard N, Monget P (1998). Intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels in equine ovarian follicles during preovulatory maturation and regression. *Biol Reprod* 58(6):1508-1514.
- Ginther OJ (1979). *Reproductive Biology of the mare*. Ann Arbor, Michigan: McNaughton and Gunn Inc.
- Ginther OJ (1992). *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. 2nd edn; Equiservices Publishing Cross Plains, WI, USA
- Ginther OJ, Bergfelt DR (1992). Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. *Theriogenology* 38(5):807-821.
- Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR (2003a). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 78(3-4):239-257.
- Ginther OJ, Woods BG, Meira C, Beg MA, Bergfelt DR (2003b). Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. *Reproduction* 126(5):653-660.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA (2004a). Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. *Biol Reprod* 70(5):1374-1379.
- Ginther O, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO (2004b). Follicle dynamics and selection in mares. *Anim Reprod* 1:45-63.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Baerwald AR, Pierson RA (2004c). Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biol Reprod* 71(4):1195-1201.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA (2005). In vivo effects of pregnancy-associated plasma protein-A, activin-A and vascular endothelial growth factor on other follicular-fluid factors during follicle deviation in mares. *Reproduction* 129(4):489-496.
- Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR, Beg MA (2006a). Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim Reprod Sci* 95(1-2):144-150.
- Ginther OJ, Utt M, Beg M (2006b). Follicle deviation and diurnal variation in circulating hormone concentrations in mares. *Biol Reprod Sci* 10.1016/j.anireprosci.2006.08.025.

- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Siddiqui MA, Beg MA (2007a). Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. *Biol Reprod* 77(2):202-208.
- Ginther OJ, Utt MD, Beg MA (2007b). Follicle deviation and diurnal variation in circulating hormone concentrations in mares. *Anim Reprod Sci* 100(1-2):197-203.
- Ginther OJ, Utt MD, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO (2007c). Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. *Biol Reprod* 77(3):543-550.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA (2008a). Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. *Anim Reprod Sci* 105(3-4):417-423.
- Ginther OJ, Jacob JC, Gastal MO, Gastal EL, Beg MA (2008b). Follicle and systemic hormone interrelationships during spontaneous and ablation-induced ovulatory waves in mares. *Anim Reprod Sci* 106(1-2):181-187.
- Gordon I (2003). Laboratory Production of Cattle Embryos. 2. Auflage, CABI Publishing.
- Goudet G, Bezaud J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E (1997). Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol Reprod* 57(2):232-245.
- Goudet G, Belin F, Bezaud J, Gerard N (1998). Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Mol Hum Reprod* 4(6):563-570.
- Goudet G, Belin F, Bezaud J, Gerard N (1999). Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, alpha-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol Reprod* 60(5):1120-1127.
- Gougeon A, Testart J (1986). Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 78(2):389-401.
- Granot I, Dekel N (1994). Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone. *J Biol Chem* 269(48):30502-30509.
- Grondahl C, Hyttel P, Grondahl ML, Eriksen T, Gotfredsen P, Greve T (1995). Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Mol Reprod Dev* 42(1):94-105.
- Hawley LR, Enders AC, Hinrichs K (1995). Comparison of Equine and Bovine Oocyte-Cumulus Morphology within the Ovarian Follicle. *Biol Reprod Mono* 1:243-252.
- Herbert M, Lévassieur M, Homer H, Yallop K, Murdoch A, McDougall A (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nat Cell Biol* 5(11):1023-1025.
- Hinrichs K, Kenney DF, Kenney RM (1990). Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* 34(1):107-112.
- Hinrichs K (1991). The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology* 36(2):157-168.
- Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG (1993). In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod* 48(2):363-370.

- Hinrichs K (1997). Cumulus expansion, chromatin configuration and meiotic competence in horse oocytes: a new hypothesis. *Equine Vet J Suppl*(25):43-46.
- Hinrichs K, Williams KA (1997). Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod* 57(2):377-384.
- Hinrichs K, Betschart R.W., McCue P (2000). Effect of timing of follicle aspiration on pregnancy rates after oocyte transfer in mares. *J Reprod Fertil Suppl* 56:493-499.
- Hinrichs K, Schmidt AL (2000). Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. *Biol Reprod* 62(5):1402-1408.
- Hinrichs K, Choi YH, Love LB, Varner DD, Love CC, Walckenaer BE (2005). Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol Reprod* 72(5):1142-1150.
- Hinrichs K, Choi YH, Walckenaer BE, Varner DD, Hartman DL (2007). In vitro-produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology* 68(4):521-529.
- Hohenhaus MU, Bostedt H (1992). Zur Doppelovulation bei Stuten. *Tierarztl Prax* 20:405-409.
- Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW (1972). Estrous cycle and ovulation in the mare. *J Am Vet Med Assoc* 161(11):1367-1374.
- Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW (1975). The oestrous cycle of the mare. *J Reprod Fertil Suppl*(23):161-166.
- Hurk R., Zhao J (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63(6):1717-1751.
- Hylan D, Klumpp A, Sansinena M, LaCaze RJ, Paccamonti D, Denniston R (2002). Oocyte production from naive- and chronically-aspirated mares. *Theriogenology* 58(2-4):739-741.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47(1):23-32.
- Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H (2001). Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 122(1):21-30.
- Imboden I, Janett F, Burger D, Crowe MA, Hassig M, Thun R (2006). Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology* 66(8):1866-1875.
- Ishizaki C, Watanabe H, Bhuiyan MM, Fukui Y (2009). Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. *Theriogenology* 72(1):72-80.
- Jacobson C C; Choi Y H; Hayden S S; Hinrichs K (2010). Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 73(8):1116-1126.

- Kanitz W, Becker F, Alm H, Torner H (1995). Ultrasound-guided follicle aspiration in mares. *Biology of Reproduction Monograph Series* 1:225-231.
- Kanitz W, Alm H, Becker F, Nuernberg G, Kurth J, Hinrichs K (2000). Repeated follicle aspiration in mares: consequences for follicle growth and oocyte quality. *J Reprod Fertil Suppl* 56:463-472.
- Kanitz W, Becker F, Alm H, Torner H, Nuernberg G (2003). Ovum pick up in horses: Results and consequences for follicular growth and oocyte quality. *Pferdeheilkunde* 19:670-674.
- Kanitz W (2008a). In-vitro-Embryonenerzeugung bei Pferden: Stand und Perspektiven. *Züchtungskunde* 80:485-490.
- Kanitz W (2008b). Embryotransfer und assoziierte Techniken. In: Reproduktionsmedizin beim Pferd: Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe. Aurich C, editor. Parey.
- Karki S, Holzbaur EL (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* 11(1):45-53.
- Katska-Ksiazkiewicz L, Opiela J, Rynska B (2007). Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 68(5):736-744.
- Kenney RM, Condon W, Ganjam VK, Channing C (1979). Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their state of viability or atresia. *J Reprod Fertil Suppl*(27):163-171.
- Kikuchi K, Ekwall H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H (2002). Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote* 10(4):355-366.
- Kim NH, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park SP, Lim JH (2000). The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* 8(1):25-32.
- Koskinen E, Kuntsi H, Lindeberg H, Katila T (1989). Predicting ovulation in the mare on the basis of follicular growth and serum oestrone sulphate and progesterone levels. *Zentralbl Veterinarmed A* 36(4):299-304.
- Kreutzling T (1994). Biochemie; Verlag: Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm und Freiburg, pp. 142-145
- Landim-Alvarenga F, Rubin M, Maclellan LJ, Squires EL (2002). Reorganisation of the cytoskeleton and chromatin in horse oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 58(2-4):697-700.
- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD (1987). Differential modulation of rat follicle cell gap junction populations at ovulation. *Dev Biol* 122(1):61-71.
- Lee ST, Oh SJ, Lee EJ, Han HJ, Lim JM (2006). Adenosine triphosphate synthesis, mitochondrial number and activity, and pyruvate uptake in oocytes after gonadotropin injections. *Fertil Steril* 86(4 Suppl):1164-1169.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL (1987). Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 36(2):376-383.

- Leichthammer F, Baunack E, Brem G (1990). Behavior of living primordial germ cells of livestock in vitro. *Theriogenology* 33(6):1221-1230.
- Li X, Morris LH, Allen WR (2001). Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 121(6):925-932.
- Liebig H-G (2004). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Auflage, Verlag: Schattauer, Stuttgart pp. 293-300.
- Liu S, Li Y, Gao X, Yan JH, Chen ZJ (2009). Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertil Steril*.
- Love CC, Love LB, Varner DD, Hinrichs K (2002). Effect of holding at room temperature on initial chromatin configuration and in vitro maturation rate of equine oocytes. *Theriogenology* 57(8):1973-1979.
- Mangia F, Epstein CJ (1975). Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Dev Biol* 45(2):211-220.
- Mari G, Barbara M, Eleonora I, Stefano B (2005). Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. *Anim Reprod Sci* 88(3-4):299-308.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A.(2010). Developmental competence of equine oocytes after ICSI: Implications on technical, morphological and cellular aspects, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn
- Mohammadi-Sangcheshmeh A, Held E, Rings F, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M (2009). Prediction of horse oocyte quality: Morphological and cellular aspects., Proceedings der 36. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d), pp. 19-20.
- Molecular Probes Inc. (1999). MitoTracker and MitoFluor Mitochondrion-Selektive Probes; [www.probes.com](http://www.probes.com)
- Mosimann W, Kohler T (1990). Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Verlag: Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R (2000). Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod* 15 Suppl 2:129-147.
- Murray A, Hunt T (1993). The Cell Cycle. Oxford University Press, Oxford, UK
- Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y (2006). ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 14(4):299-304.
- Orrenius S (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 39(2-3):443-455.
- Ortega-Camarillo C, Gonzalez-Gonzalez A, Vergara-Onofre M, Gonzalez-Padilla E, Valos-Rodriguez A, Gutierrez-Rodriguez ME (2009). Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. *Reproduction* 137(6):979-986.

- Otzdorff C (2006). Untersuchungen zur Aggregation und Aktivität von Mitochondrien im Ooplasma von Cumulus-Oozyten-Komplexen des Rindes während der In-vitro-Reifung, Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Pederson HG (2000). Follicular Growth and Atresia in the mare; PhD-Thesis, University of Edinburgh
- Pederson HG , Berrocal B, Thomson S, Watson E (2002). Gonadotropic control of follicular growth in the mare. *Theriogenology* 58(2-4): 465-468.
- Pedersen HG, Watson ED, Telfer EE (2003). Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation. *Reproduction* 125(3):417-423.
- Pedersen HG, Watson ED, Telfer EE (2004). Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *Theriogenology* 62(3-4):468-480.
- Petten JL (1933). Beitrag zur Kenntnis der Entwicklung des Pferdeovariums. *Z. Anat. Entw.-Gesch.*, pp. 338-383.
- Piquette GN, Tilly JL, Prichard LE, Simon C, Polan ML (1994). Detection of apoptosis in human and rat ovarian follicles. *J Soc Gynecol Investig* 1(4):297-301.
- Pujol M, Lopez-Bejar M, Paramio MT (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61(4):735-744.
- Roca J, Martinez E, Vazquez JM, Lucas X (1998). Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fertil Dev* 10(6):479-485.
- Rödiger K (2000). Morphofunktionelle Untersuchungen an Ovarfollikeln der Stute im Verlauf des Östrus; Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Rödiger K, Bostedt H (2004). Die Follikeldynamik und deren endokrine Steuerung bei der Stute im Verlauf des Östrus. *Tierärztliche Praxis* 32(6):350-356.
- Rodriguez KF, Farin CE (2004). Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev* 16(1-2):55-67.
- Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Velilla E, Paramio MT (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57(5):1397-1409.
- Roy LM, Haccard O, Izumi T, Lattes BG, Lewellyn AL, Maller JL (1996). Mos proto-oncogene function during oocyte maturation in *Xenopus*. *Oncogene* 12(10):2203-2211.
- Rüsse I, Sinowatz F (1991). Lehrbuch der Embryologie der Haustiere; Verlag: Paul Parey, Berlin und Hamburg
- SAS/STAT 9.2 User's Guide (computer program) (2008). Cary, NC.
- Schnorr B, Kressin M (2006). Embryologie der Haustiere; 5.Aufl.; Verlag: F. Enke, Stuttgart
- Schoevers EJ, Kidson A, Verheijden JH, Bevers MM (2003). Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes in vitro. *Theriogenology* 59(9):2017-2028.

- Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires EL (2001). Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro, or within oviducts of mares. *Theriogenology* 55(3):705-715.
- Shim C, Lee SG, Song WK, Lee CS, Lee KK, Kim K (1997). Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 48(2):185-193.
- Shoubridge EA, Wai T (2007). Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Curr Top Dev Biol* 77:87-111.
- Siddiqui MA, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ (2009). Effect of HCG in the presence of HCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and oocyte in mares. *Reprod Domest Anim* 44(3):474-479.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL (1989). Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40(6):1257-1263.
- Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S (1992). Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 37(1):39-57.
- Sirard MA (2001). Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55(6):1241-1254.
- Sirois J, Ball BA, Fortune J (1989). Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the oestrus cycle and after hemiovariectomy in mares. *Equine Vet J* 8 (Suppl.):43-48.
- Sirois J, Kimmich TL, Fortune JE (1990). Developmental changes in steroidogenesis by equine preovulatory follicles: effects of equine LH, FSH, and CG. *Endocrinology* 127(5):2423-2430.
- Sirois J, Kimmich TL, Fortune JE (1991). Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. *Endocrinology* 128(2):1159-1166.
- St John JC, Lloyd R, El SS (2004). The potential risks of abnormal transmission of mtDNA through assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 8(1):34-44.
- Steffen W, Karki S, Vaughan KT, Vallee RB, Holzbaur EL, Weiss DG (1997). The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 8(10):2077-2088.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 64(3):904-909.
- Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ (2006). Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reprod.* 132(6):829-837.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT (2001). Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 122(1):155-163.
- Sun QY (2003). Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 61(4):342-348.

- Sun Y, Mu Y, Ma S, Gong P, Yan G, Liu J (2005). The molecular mechanism of protecting cells against oxidative stress by 2-selenium-bridged beta-cyclodextrin with glutathione peroxidase activity. *Biochim Biophys Acta* 1743(3):199-204.
- Tarazona AM, Rodríguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M (2006). Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim* 41(1):5-11.
- Thach RE (1992). Cap recap: the involvement of eIF-4F in regulating gene expression. *Cell* 68(2):177-180.
- Tomek W, Torner H, Kanitz W (2002). Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Domest Anim* 37(2):86-91.
- Torner H, Alm H (1995). Meiotic configuration of horse oocytes in relation to the morphology of the cumulus-oocyte-complex. *Biology of Reproduction Monograph Series 1, Equine Reproduction* 6:253-259.
- Torner H, Brussow KP, Alm H, Ratky J, Pohland R, Tuchscherer A (2004). Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 61(9):1675-1689.
- Torner H, Alm H, Kanitz W, Goellnitz K, Becker F, Poehland R (2007). Effect of initial cumulus morphology on meiotic dynamic and status of mitochondria in horse oocytes during IVM. *Reprod Domest Anim* 42(2):176-183.
- Torner H, Ghanem N, Ambros C, Holker M, Tomek W, Phatsara C (2008). Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction* 135(2):197-212.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G (2001). Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 121(1):51-75.
- Van BJ (1991). Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11):5031-5035.
- Van BJ, Davis P, Mathwig V, Alexander S (2002). Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod* 17(2):393-406.
- Van BJ (2004). Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 128(3):269-280.
- Vogelsang MM, Kreider JL, Bowen MJ, Potter GD, Forrest DW, Kraemer DC (1988). Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology* 29(5):1007-1018.
- Vozzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P (2001). Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction* 122(4):619-628.
- Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM (2009). Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B* 10(7):483-492.
- Wassarmann M (1988). The physiology of reproduction. Verl.: Raven Press, New York, USA



Watson ED, Hinrichs K (1988). Changes in the concentrations of steroids and prostaglandin F in preovulatory follicles of mares after administration of hCG *J Reprod Fertil* 84(2):557-561.

Watson ED, Heald M, Tsigos A, Leask R, Steele M, Groome NP (2002a). Plasma FSH, inhibin A and inhibin isoforms containing pro- and -alphaC during winter anoestrus, spring transition and the breeding season in mares. *Reproduction* 123(4):535-542.

Watson ED, Thomassen R, Steele M, Heald M, Leask R, Groome NP (2002b). Concentrations of inhibin, progesterone and oestradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. *Anim Reprod Sci* 74(1-2):55-67.

Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J (2001). The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol* 209:117-206.

Wilding M, Dale B, Marino M, Di ML, Alviggi C, Pisaturo ML (2001). Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 16(5):909-917.

Winston NJ (1997). Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and the first mitotic cell division in mouse oocytes. *Biol Cell* 89(3):211-219.

Ye J, Campbell KH, Craigon J, Luck MR (2005). Dynamic changes in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig oocytes in vitro by follicle-stimulating hormone and cycloheximide. *Biol Reprod* 72(2):399-406.

## 9 Publikationen

### Artikel

Vernunft, A.; Alm, H.; Brüssow, K.-P.; Kanitz, W. (2008). Ultraschallgeleitete Eizellgewinnung bei landwirtschaftlichen Nutztieren als Grundlage für In-vitro-Reproduktionstechniken. *Rekasan Journal* 15 (29/30): 146-149

Vernunft, A.; Alm, H.; Kanitz, W.; Torner H. (2010). Equine oocyte quality depending on original follicle population. *Pferdeheilkunde* 29 (1-2): 54-58

### Vorträge

Vernunft, A.; Alm, H.; Kanitz, W.; Torner H. (2008). Eizellqualität in differenten Follikelpopulationen der Stute. 35. AET-d-Tagung; 19.-20.06.2008 in Dipperezh-Friesenhausen; Tagungsband der 35. Jahrestagung der AG Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d): (35) 12

Vernunft, A.; Alm, H.; Kanitz, W.; Torner H. (2009). Eizellqualität in differenten Follikelpopulationen der Stute. Institutskolloquium am FBN-Dummerstorf, 30.04.09 in Dummerstorf

Vernunft, A.; (2009). Eizellqualität in differenten Follikelpopulationen der Stute. Tag des Doktoranden am FBN-Dummerstorf, 14.05.09 in Dummerstorf

Vernunft, A.; Alm, H.; Kanitz, W.; Torner H. (2010). Influence of follicle populations on equine oocyte quality. 5th Leipzig Expertworkshop on Equine Reproductive Medicine, 22.01.10 in Leipzig

Vernunft, A.; Alm, H.; Kanitz, W.; Torner H. (2010). Influence of follicle populations on equine oocyte quality. 6<sup>th</sup> International Conference on Equine Reproductive Medicine (ICERM), 23.01.10 in Leipzig; Leipziger Blaue Hefte: Proceedings 5. Leipziger Tierärztekongress Band 1: 321

Vernunft, A.; Alm, H.; Tuchscherer, A.; Kanitz, W. (2010). Saisonale Abhängigkeit der Qualität von Stutenoozyten und deren meiotische Kompetenz in vitro. 37. AET-d-Tagung; 08.-09.07. 2010 in Bonn; Tagungsband der 37. Jahrestagung der AG Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d): (37) 11

### Poster

Vernunft, A.; Alm, H.; Kanitz, W.; Torner H. (2009). Equine oocyte quality of different follicle populations. 42. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 26.-27.02.09 in Leipzig; *Reprod Domest Anim* 44 (s1): 38

Vernunft, A.; Alm, H.; Kanitz, W.; Torner H. (2010). Influence of different follicle populations upon quality of equine oocytes. 25eme Colloque Scientifique de Association Europeenne de Transfert Embryonnaire, 11.-12.09.09 in Poznan, Polen; *Proc. 25th Ann. Meeting A.E.T.E.*: 262

## 10 Danksagung

Meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. W. Kanitz und Herrn PD. Dr. H. Torner möchte ich für die Überlassung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie in Dummerstorf danken. Bei Herrn Prof. Dr. Kanitz möchte ich mich besonders für seine Anregungen und seine fachliche Unterstützung beim klinisch-experimentellen Teil der Arbeit sowie für seine Bereitschaft, die Arbeit an der Freien Universität Berlin zu vertreten, bedanken. Herrn PD. Dr. Torner danke ich für sein wertvolles Mitwirken bei der Auswertung der Oozyten-Präparate und die Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse. Sein großes Engagement für die Thematik hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich mich für die jederzeit offene und freundliche Diskussion, für die konstruktive Unterstützung bei der Abfassung der Dissertation und für die gewährte Hilfe, Teile meiner Arbeit national und international vorstellen zu können, sehr herzlich bei meinen beiden Mentoren bedanken.

Ein großer Dank gilt Frau R. Hantel und Herrn Dr. J. Kurth, die mir bei der Oozytengewinnung zur Seite standen.

Eine große Unterstützung erhielt ich durch Frau Dr. H. Alm, Frau M. Friedrich, Frau B. Drawert und Frau C. Meyer bei den umfangreichen Arbeiten im Zelllabor. Frau Dr. H. Alm möchte ich zusätzlich für die vielfach geleistete Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik und die fortwährende nette Zusammenarbeit danken.

Bei Herrn Dr. A. Tuchscherer vom Forschungsbereich Genetik und Biometrie des Leibniz-Institutes für Nutztierbiologie bedanke ich mich für die große Hilfe bei den statistischen Analysen des Datenmaterials.

Herr E. Prüter und die Lehrlinge im institutseigenen Pferdestall unterstützten mich hervorragend beim Umgang mit den Stuten.

Meinem Mit-Doktoranden Guido Stürmer danke ich ganz herzlich für das wunderbare Arbeitsklima und für die gemeinsame Bewältigung so mancher "Problemchen" im Alltag.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe "Klinische Fortpflanzungsbiologie" im Besonderen, aber auch den vielen weiteren Kollegen des Forschungsbereiches möchte ich für das tolle Arbeitsklima und die vielen kleinen Hilfen und Anregungen bei technischen, bürokratischen sowie fachlichen Angelegenheiten danken.

Zum Abschluss möchte ich meiner Familie danken, dass sie mir meinen Werdegang ermöglicht und mich bei meinen Arbeiten stets unterstützt und ermutigt hat.

## 11 Selbstständigkeitsversicherung

Hiermit bestätige ich,

dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Dummerstorf, den 02.12.2010

A. Vernunft



**ISBN 978-3-86345-028-1**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**  
**35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375**  
**e-mail: [info@dvf.net](mailto:info@dvf.net) · Homepage: <http://www.dvf.de>**