

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der Chromatinkonfiguration sowie die Veränderungen der respiratorischen Aktivität und Aggregation von Mitochondrien in bovinen Oozyten während der IVM untersucht. Zusätzlich wurden apoptotische Veränderungen in Oozyten und Cumuluszellen analysiert.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf dem Vergleich der untersuchten Parameter bei Oozyten von 4 verschiedenen COK-Klassen.

### 5.1. Untersuchungen zu nukleären Veränderungen

Der Ablauf der nukleären Reifung ist in seinen Grundzügen bei allen Wirbeltieren ähnlich. Als „Kernreife“ wird das Erreichen des Metaphase-Stadiums der zweiten meiotischen Teilung definiert (TROUNSON et al. 1977). Die Wiederaufnahme der Meiose, die Meiosekinetik und die Qualität der Chromatinstruktur sind wichtige Parameter für die Beurteilung der Oozytenqualität, des Fortschrittes der Maturation und der Kulturbedingungen eines IVM-Systems.

Die Kernreifung ist ein sehr komplexer Vorgang. Die Bestimmung der Chromatinkonfiguration stellt einen leicht zugänglichen Parameter für die Beurteilung der Kompetenz von Oozyten dar. Es bleibt jedoch zu beachten, dass die ausschließliche Beurteilung der nukleären Reifung (Erreichen des MII-Stadiums) für die Feststellung der Entwicklungskompetenz einer Oozyte nicht ausreicht. Die Vorgänge der zytoplasmatischen Reifung tragen ebenfalls zur Ausbildung der Entwicklungskompetenz bei.

Über die Terminierung der Meiose beim Rind liegen zahlreiche Arbeiten vor (MOTLIK et al. 1978; SÜSS, WÜTHRICH 1985; SÜSS et al. 1988; SIRARD et al. 1989; DOMINKO, FIRST 1997). Die Kinetik der Meiose in verschiedenen COK-Klassen wird dagegen nur in wenigen Arbeiten behandelt (Rind: DE LOOS et al. 1992; MAYES, SIRARD 2001; Schwein: TORNER et al. 1998).

Bei WEHREND und MEINECKE (1999) wird die Dauer des Germinalvesikelstadiums in vitro bei bovinen Oozyten mit ca. 8,5 Stunden beschrieben. Die Zeitdauer bis zum GVBD wird beim Rind mit 6-8 Stunden (MOTLIK et al. 1978; GREVE et al. 1983; SIRARD et al. 1989) bzw. 3-12 h (HYTTEL et al. 1989) angegeben. WEHREND und MEINECKE (1999) beobachteten das Diakinesestadium über eine Dauer von 1,2 h. Das Stadium der Metaphase I nimmt mit 8 h (WEHREND, MEINECKE 1999) bzw. ca. 10-15 Stunden (SIRARD et al.

1989; TORNER et al. 2001) einen längeren Zeitraum ein. Die Stadien der Anaphase I und Telophase I werden mit 1,6 h bzw. 1,9 h (WEHREND, MEINECKE 1999) relativ schnell durchlaufen (SÜSS, WÜTHRICH 1985; SÜSS et al. 1988). Die gesamte Dauer der Reifungszeit in vitro bis zum Erreichen der Metaphase II beim Rind wird in der Literatur mit 18 bis 48 h angegeben. (18 h: KING et al. 1986; 20 h: SÜSS, WÜTHRICH 1985; 24 h: HUNTER 1980, SHAMSUDDIN et al. 1993, MONAGHAN et al. 1993, ENRIGHT et al. 2000, 2000b; 26-28 h: SHEA et al. 1976; 48 h: GREVE et al. 1983).

In der vorliegenden Untersuchung konnte zum Zeitpunkt der Gewinnung der höchste Anteil an Diplotänstadien (intakter GV) bei Oozyten mit kompaktem und aufgelockertem Cumulus oophorus nachgewiesen werden (Tab. 12 und 13). Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchung von MAYES, SIRARD (2001) unterstützt. Sie beobachteten zum Zeitpunkt  $t_0$  88% der Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus und 70% der Oozyten mit bereits expandiertem Cumulus im GV-Stadium. In der Untersuchung von DE LOOS et al. (1989) wurden nach der Gewinnung, unabhängig von ihrer COK-Morphologie, ausschließlich Oozyten im GV-Stadium beobachtet. Allerdings wird in dieser Arbeit eine unterschiedliche Morphologie des GV in den unterschiedlichen COK-Klassen beschrieben. SÜSS und WÜTHRICH 1985 sowie SÜSS et al. 1988 untersuchten die meiotischen Abläufe in Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus und beschreiben ein völliges Fehlen bzw. ein reduziertes Auftreten des GV bei allen Oozyten zum Zeitpunkt der Gewinnung. In dieser Arbeit erfolgte jedoch eine Anfärbung der Oozyten mit der Färbung nach GIEMSA, die die Kernmembran nicht anfärbt. Die Beurteilung wurde in dieser Arbeit daher über die Morphologie des Chromatins vorgenommen. Als Erklärung für das geringe Auftreten eines GV nach der Isolierung aus dem Follikel wird die mögliche Zerstörung der Kernmembran durch die hypotone Behandlung der Oozyten sowie die Fixation angegeben.

Nach 4 h IVM (Abb. 7) konnte in der vorgelegten Arbeit eine höhere Diakineserate bei den Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus im Vergleich zu den Oozyten mit kompaktem bzw. aufgelockertem Cumulus nachgewiesen werden. Dies zeigt ein früheres Auftreten des GVBD und damit eine frühere Wiederaufnahme der Meiose in Oozyten mit expandiertem Cumulus. Dieses Ergebnis wird ebenfalls durch die Arbeit von MAYES, SIRARD (2001) bestätigt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Korrelation besteht zwischen der COK-Morphologie und dem Vorliegen eines GV bzw. dem Auftreten des GVBD. Oozyten, die zum Zeitpunkt der Gewinnung bereits einen expandierten Cumulus aufweisen, starten früher mit der Wiederaufnahme der Meiose. Eine mögliche Erklärung liegt in der Auftrennung der Verbindungen zwischen den einzelnen Cumuluszellen und zwischen den Cumuluszellen und der Oozyte. Der Austausch von Substanzen, die sich hemmend auf den Fortschritt der Meiose auswirken, wird somit verringert. MAYES und SIRARD (2001) begründen das frühere

---

Eintreten in die Meiose von Oozyten mit expandiertem Cumulus mit der folliculären Herkunft dieser Oozyten. Demnach stammen diese Oozyten vor allem aus Follikeln mit atretischen Veränderungen. In diesen Follikeln ist die Kontrolle der meiotischen Arretierung durch die Vorgänge der Atresie gestört. Hinweise für eine bessere meiotische Kompetenz von Oozyten mit expandiertem Cumulus finden sich in Untersuchungen an humanen und equinen Oozyten (LEFEVRE et al. 1987; HINRICHS 1997; HINRICHS, WILLIAMS 1997).

Unterschiede in Bezug auf die Wiederaufnahme der Meiose bei unterschiedlichen COK-Klassen wurden von TORNER et al. (1998) auch unter in vivo Bedingungen in porcinen Oozyten nachgewiesen.

In der vorgelegten Untersuchung befanden sich nach 12 h IVM ca. 80% der Oozyten der COK-Klassen I-III in der MI (Tab. 12-14, Abb. 8). Das Auftreten der MI nach 12 h IVM wurde in den meisten Untersuchungen bei bovinen Oozyten nachgewiesen (WU et al. 1997).

Die Stadien der Anaphase I und der Telophase I wurden in der vorgelegten Arbeit nur zu geringen Prozentsätzen nachgewiesen. Dies ist zu erklären durch die bereits beschriebene kurze Dauer dieser Phasen während der Kernreifung.

Nach 20 h IVM (Abb. 9) befanden sich bereits 70% der Oozyten der Klasse III und 43% der Klasse II in der Metaphase II. Im Vergleich dazu wurden bei den Oozyten der Klassen I nur ca. 16% MII-Stadien nachgewiesen. Mit Zunahme der Cumulusexpansion können demnach bereits zu früheren Reifungszeitpunkten reife Oozyten beobachtet werden. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen beim Rind und bei anderen Spezies bestätigt (HINRICHS 1997; MAYES, SIRARD 2001; TORNER et al. 2003).

Zum Ende der IVM bei 24 h (Abb. 10) konnten bei den Oozyten der Klassen I und II ähnliche Anteile an MII-Stadien nachgewiesen werden. Interessant ist jedoch hierbei, dass die Oozyten der Klasse II diese Anteile schon bei 20 h aufwiesen und bis zum Ende der Reifung eine weitere Dynamik erkennen lassen. Die Entwicklung der Oozyten der Klasse I bis zum Stadium der Reife vollzieht sich dagegen langsamer und später. Bei den Oozyten der Klasse III konnte nach 24 h bereits ein Rückgang der MII-Stadien verzeichnet werden. Dieser Rückgang der MII-Stadien wurde begleitet durch einen Anstieg von Aktivierungs- und Degenerationsvorgängen. Ein höherer Anteil an degeneriertem Chromatin am Reifungsende in Oozyten, die zum Zeitpunkt der Gewinnung bereits einen expandierten Cumulus oophorus aufwiesen, wurde ebenfalls in der Untersuchung von DE LOOS et al. (1989) nachgewiesen. Das frühere Erreichen des MII-Stadiums in den Oozyten der Klasse II spricht für eine stärkere und termingerechtere Dynamik des Polkörperausstoßes (Übergang TI-MII) bei dieser Klasse. Weiterhin ist bei Oozyten dieser Klasse von 20 bis 24 h IVM ein weiterer

Meiosefortschritt bis zur MII möglich ohne das gleichzeitige Auftreten von aktivierten bzw. degenerierten Chromatinstrukturen. Die Oozyten der Klasse I benötigen im Vergleich dazu eine längere Reifungszeit bis zum Auftreten eines hohen Anteils an MII-Stadien.

SÜSS et al. (1989) wiesen in ihrer Untersuchung an kompakten COK ebenfalls den höchsten Anteil an MII-Stadien nach 20-24 h IVM nach.

Bei den zum Zeitpunkt der Gewinnung denudierten Oozyten (Tab. 15) konnte ein sehr heterogenes Bild im Ablauf der Kernreifung nachgewiesen werden. Diese Oozyten zeigen zu verschiedenen Zeitpunkten der IVM den höchsten Anteil an degeneriertem Chromatin bzw. aktiviertem Chromatin. Diese Beobachtung wird von TORNER et al. (1998) bei Untersuchungen an porcinen, in vivo gereiften Oozyten bestätigt.

## **5.2. Untersuchungen zu mitochondrialen Veränderungen**

Neben der nukleären Reifung spielt vor allem die zytoplasmatische Reifung eine wichtige Rolle für das Erlangen der Entwicklungskompetenz einer Oozyte. Die zytoplasmatische Reifung ist ein sehr komplexer Prozess, der durch zahlreiche Veränderungen und Umstrukturierungen im Bereich der Organellen und der Proteinsynthese gekennzeichnet ist. Die bedeutende Rolle der Mitochondrien während der zytoplasmatischen Reifung gilt bei verschiedenen Spezies als gesichert (Rind: STOJKOVIC et al. 2001; Schwein: SUN et al. 2001, TORNER et al. 2004; Pferd: TORNER et al. 2003; Mensch: WILDING et al. 2001, CUMMINS 2004; Maus: NISHI et al. 2003; Schaf: O'BRIEN et al. 1996; Ziege: VELILLA et al. 2006). Diese Organellen stellen damit einen interessanten Aspekt bei der Aufklärung neuer Parameter für die Eizellqualität dar.

Die Mitochondrien erfüllen im Stoffwechsel der Oozyte eine wichtige Funktion durch die Bereitstellung von ATP für die energieverbrauchenden Prozesse während der Maturation, der Fertilisation und der frühen embryonalen Entwicklung (VAN BLERKOM, RUNNER 1984; CALARCO 1995; VAN BLERKOM et al. 1995). Weiterhin besitzen die Mitochondrien im zellulären Stoffwechsel eine Bedeutung als Ca-Speicher und bei der Auslösung der Apoptose. Die Reifung und die Umverteilung der Mitochondrien sowie eine fortschreitende metabolische Aktivität sind notwendige Vorgänge während der zytoplasmatischen Reifung der Oozyte (STOJKOVIC et al. 2001; WILDING et al. 2001; TORNER et al. 2003, 2004; VAN BLERKOM 2004).

Aufgrund dieser wichtigen Funktion sind die Mitochondrien interessant für Untersuchungen, die zum Ziel haben, neue Parameter für die Bestimmung der Oozytenqualität zu definieren. Informationen über die Charakteristik von Mitochondrien sind dazu geeignet, die komplexen

---

Vorgänge der Eizellreifung und der frühen embryonalen Entwicklung beim Rind besser zu verstehen.

Eine wichtige Frage im Bereich der In-vitro-Produktion bei allen Spezies bleibt weiterhin, warum vielen Oozyten die Kompetenz für eine Entwicklung bis zur Blastozyste fehlt. Es liegen Hinweise vor, dass Schäden und Dysfunktionen im Bereich der Mitochondrien verantwortlich für eine schlechte Entwicklungskompetenz von Oozyten sein könnten. Für Untersuchungen auf diesem Gebiet gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen liegen Untersuchungen auf der Ebene des mitochondrialen Genoms von Oozyten und Embryonen vor (Mensch: BRENNER et al. 1998, CUMMINS 1998, BARRITT et al. 1999; Schwein: EL SHOURBAGY et al. 2006). Andere Arbeiten wählen einen zellphysiologischen Ansatz durch die Untersuchung der Morphologie, der Verteilung und/oder der Aktivität von Mitochondrien.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der Reifungszeit, der Chromatinkonfiguration und der COK-Klasse auf die mitochondrialen Parameter „Aktivität“ und „Aggregation“ untersucht werden. Die Erhebung der drei Parameter „Chromatinkonfiguration“, „mitochondriale Aggregation“ und „mitochondriale Aktivität“ konnten aufgrund der verwendeten Parallelfärbung an jeweils derselben Oozyte bestimmt werden.

### **5.2.1. Untersuchungen zur mitochondrialen Aggregation**

Zur Umverteilung und Ansammlung von Mitochondrien im Ooplasma liegen bereits Untersuchungen bei verschiedenen Spezies vor. Es fehlen jedoch Untersuchungen über das Verhalten von Mitochondrien in bovinen Oozyten bei verschiedenen COK-Klassen und zu verschiedenen Zeitpunkten der In-vitro-Maturation. Die Mehrzahl der vorhandenen Arbeiten beurteilt die Ansammlung der Mitochondrien unter dem Gesichtspunkt der räumlichen Lokalisation bezogen auf verschiedene zelluläre Strukturen (VAN BLERKOM, RUNNER 1991; CALARCO 1995; MOTTA et al. 2000; SUN et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Aggregationsverhalten der Mitochondrien in den Oozyten untersucht und über die Begriffe „feinkörnig“, „grobkörnig“ und „kristallin“ (Abb. 11) definiert. Das Vergleichen der Ergebnisse der vorgelegten Arbeit mit den Ergebnissen in der vorhandenen Literatur ist aufgrund der unterschiedlichen Versuchsansätze und Definitionen nur bedingt möglich. Zu beachten bleibt weiterhin, dass sich viele Arbeiten mit den Gegebenheiten in vivo beschäftigen oder vor allem auf die Gegebenheiten in Zygoten und frühen Embryonalstadien fokussieren.

Die unterschiedlichen Studien kommen zu der gemeinsamen Aussage, dass die Verteilung der Mitochondrien in den Oozyten bei den verschiedenen Spezies dynamischen Veränderungen unterliegt (STOJKOVIC et al. 2001; WILDING et al. 2001; TORNER et al. 2004). Dies können die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung bestätigen. Das feinkörnige Verteilungsmuster ist über die gesamte Reifungszeit (Tab. 16) und bei den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen (Tab. 17) dominant. Bemerkenswert sind jedoch die nachgewiesene Abnahme dieses Musters während der IVM und die parallel dazu beobachtete Zunahme der kristallinen Aggregationsform (Tab. 19, 20). Während der IVM kommt es demnach zu einem Wechsel von einer feinkörnigen zu einer kristallinen Aggregationsform. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass sich das kristalline Aggregationsmuster aus dem feinkörnigen Aggregationsmuster im Verlauf der IVM entwickelt.

Der Wechsel der mitochondrialen Aggregation zeigte eine Abhängigkeit von der COK-Klasse und der Chromatinkonfiguration. Ausschließlich bei Oozyten der Klassen I und II ist der Wechsel der Aggregationsform signifikant nachweisbar (Tab. 19, 20). Es ist auffällig, dass die Oozyten der Klasse II bereits nach 20 h IVM einen signifikant höheren Anteil an kristalliner Aggregationsstruktur aufweisen als die Oozyten der Klasse I. In Bezug auf die Chromatinkonfiguration (Abb. 12) konnte eine Zunahme der kristallinen Aggregationsform synchron zum Verlauf der Meiose beobachtet werden. Das feinkörnige mitochondriale Aggregationsmuster zeigte parallel dazu eine Abnahme mit dem Fortschreiten der Meiose. Hervorzuheben ist hierbei, dass eine Zunahme der prozentualen Anteile der kristallinen Form der mitochondrialen Aggregation vor allem im Bereich der Übergänge von der Metaphase I zur Anaphase I sowie im Bereich des Überganges Telophase I zu Metaphase II beobachtet werden konnte. Diese Bereiche der nukleären Reifung sind durch energieverbrauchende Prozesse (Bereitstellung des Spindelapparates, Polkörperausstoß) gekennzeichnet. Die einzelnen Anstiege der prozentualen Häufigkeiten in diesen Bereichen waren nicht signifikant, aber sie führen in ihrer Gesamtheit zum signifikanten Anstieg während der gesamten nukleären Reifung.

Die grobkörnige Aggregationsform zeigt keine Abhängigkeit von der Reifungszeit (Tab. 18), der Chromatinkonfiguration (Abb. 12) und den verschiedenen COK-Klassen. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass dieses Muster keine Bedeutung für die Beurteilung der Entwicklungskompetenz hat und möglicherweise bei einer Stagnierung der Reifung auftritt.

Die Unterschiede zwischen den COK-Klassen beim Rind bestätigen die Ergebnisse der Arbeit von STOJKOVIC et al. (2001). Sie konnten eine Abhängigkeit der Verteilung der Mitochondrien und des ATP-Gehaltes in Oozyten von der Morphologie des Cumulus

oophorus nachweisen. TARAZONA et al. (2006) wiesen eine unterschiedliche Verteilung der Mitochondrien in reifen und unreifen bovinen Oozyten nach. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus verwendet. Der Wechsel des mitochondrialen Aggregationsmusters während der IVM konnte von TORNER et al. (2003) auch bei equinen Oozyten festgestellt werden. In dieser Untersuchung wurde ebenfalls ein Wechsel der Aggregationsform im Verlauf der IVM beobachtet. In dieser Arbeit wurde ein Wechsel von einer feinkörnigen mitochondrialen Aggregation zu einer Aggregation der Mitochondrien in Form von Clustern beobachtet. Die Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe (TORNER et al. 2004) an porcinen Oozyten bestätigt das Auftreten eines Aggregationswechsels unter in vivo Verhältnissen. Anstelle der feinen Aggregation in kristallinen Strukturen gegen Ende der IVM in bovinen Oozyten, spielt beim Pferd und beim Schwein eine Anordnung in Clustern eine Rolle. Diese konnte beim Rind nicht beobachtet werden.

Über eine Assoziation der Mitochondrien im Ooplasma maturer humaner Oozyten mit Vesikeln und dem glatten endoplasmatischen Retikulum berichten SATHANANTHAN et al. (1997, 2000). Diese Verbindungen zwischen Mitochondrien und glattem endoplasmatischem Retikulum könnten eine Rolle spielen bei der Bildung eines Energiereservoirs vor der Befruchtung.

Die Ergebnisse dieser Studien lassen den Schluss zu, dass Oozyten mit einer kristallinen mitochondrialen Aggregation am Ende der IVM entwicklungscompetenter sein könnten. Das feinkörnige Aggregationsmuster zu Beginn der Reifung spricht für ein undifferenziertes Auftreten der Mitochondrien. Die kristalline Aggregationsform zum Ende der Reifung könnte ein Hinweis auf eine Differenzierung der Mitochondrien sein und auf die Ansammlung von Mitochondrien an bestimmten zellulären Strukturen (z.B. glattes endoplasmatisches Retikulum), die einen höheren Energiebedarf am Ende der Reifung besitzen. Diese Annahme wird durch die Aussage von DUMOLLARD et al. (2003), dass die ATP-Produktion der Mitochondrien abhängig ist vom Bedarf der Zelle und somit dynamischen Schwankungen unterworfen ist, gestützt. Eine Umverteilung und lokale Ansammlung der Mitochondrien in der Oozyte zeigt demnach den unterschiedlichen ATP-Bedarf der verschiedenen Regionen an.

Eine lokale, kurzzeitige Aufregulation der mitochondrialen Respiration ist sinnvoll, um den unterschiedlichen Energiebedarf bestimmter Zellregionen zu decken ohne die Notwendigkeit die Gesamtheit der Mitochondrienpopulation zu aktivieren (VAN BLERKOM 2004).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass Oozyten der COK-Klassen I und II während der IVM eine signifikante Zunahme an kristallinen Aggregationsformen ihrer Mitochondrien zu verzeichnen haben und dass dieser Prozess bei Oozyten der Klasse II bereits nach 20 h manifest ist.

### **5.2.2. Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität**

Die mitochondriale Aktivität gilt als Parameter für den Metabolismus einer Oozyte (TORNER et al. 2004). Über die Änderungen der respiratorischen Aktivität in Oozyten liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor (Rind: STOJKOVIC et al. 2001, TARAZONA et al. 2006; Schwein: TORNER et al. 2004; Pferd: TORNER et al. 2003; Maus: VAN BLERKOM et al. 1995; Frosch: WILDING et al. 2001; Mensch: WILDING et al. 2001). Es liegen keine Untersuchungen über das Verhalten der respiratorischen Aktivität in Mitochondrien boviner Oozyten unterschiedlicher COK-Klassen bei unterschiedlichen Zeitpunkten der IVM in Beziehung zur vorhandenen Chromatinkonfiguration und der mitochondrialen Aggregation vor.

Bovine Oozyten weisen nach einer Reifung in vitro einen signifikanten Anstieg des durchschnittlichen ATP-Gehaltes/Oozyte auf. Es liegen Hinweise vor, dass sich der ATP-Gehalt bei Oozyten mit verschiedener Cumulummorphologie unterscheidet (STOJKOVIC et al. 2001). Dies lässt den Schluss zu, dass die respiratorische Aktivität beteiligt ist an der unterschiedlichen Entwicklungskompetenz von Oozyten. Studien an Oozyten anderer Spezies unterstützen diese Hypothese (Mensch: WILDING et al. 2001; Schaf: O'BRIEN et al. 1996; Nager: BAVISTER, SQUIRRELL 2000).

In den Untersuchungen von TORNER et al. (2004) an in vivo gereiften Oozyten des Schweines konnte eine Abhängigkeit zwischen der Reifungszeit und der respiratorischen Aktivität der Mitochondrien festgestellt werden. Innerhalb dieser Untersuchung konnte auch ein Einfluss der mitochondrialen Verteilung auf die mitochondriale Aktivität nachgewiesen werden. Die höchsten Werte mitochondrialer Aktivität wurden hierbei in Oozyten mit grobkörniger Aggregation und bei einer Anordnung der Mitochondrien in Form von Clustern beobachtet. Dies kann für in vitro gereifte bovine Oozyten nicht bestätigt werden. In der vorgelegten Arbeit besaß die mitochondriale Aggregationsform in der Gesamtheit betrachtet keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität. Innerhalb der verschiedenen Reifungszeitpunkte finden sich jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Aggregationsformen. Die Oozyten mit einem grobkörnigen Aggregationsmuster zeigen über die Reifung einen sehr schwankenden Verlauf in ihrer mitochondrialen Aktivität. Bei den Oozyten mit einer kristallinen mitochondrialen Aggregation lässt sich der Anstieg der mitochondrialen Aktivität bereits in einer früheren Reifungsphase beobachten als bei Oozyten mit feinkörniger Aggregation. Die Oozyten mit kristalliner mitochondrialer Struktur könnten dadurch einen „Energievorsprung“ erlangen. In diesen Oozyten wird zu einem früheren Zeitpunkt mit der Produktion und damit auch mit der Speicherung von ATP

begonnen und diese Energie steht bei Bedarf schneller zur Verfügung. Dies könnte einen Vorteil für das Erlangen der Entwicklungskompetenz dieser Oozyten bedeuten.

In der vorliegenden Untersuchung zeigen die Oozyten zu Beginn der IVM hohe mitochondriale Aktivitäten (Abb. 13). Die Oozyten der Klasse I wiesen zu Beginn der Reifung die höchsten Aktivitätswerte aller Klassen auf (Abb. 15). Dies könnte auf eine stärkere spontane meiotische Aktivierung nach der Gewinnung bei dieser Klasse hinweisen. Das Maximum der mitochondrialen Aktivität konnte bei den Oozyten der Klassen I-II bei 12 h beobachtet werden (Abb. 15). Das Erreichen dieses Maximalwertes war jedoch am deutlichsten bei den Oozyten der Klasse II. Bei den Oozyten der Klasse III fand sich im Verlauf der IVM kein dynamischer Ablauf der mitochondrialen Aktivität wie bei den Klassen I und II. Die Oozyten der Klasse IV zeigten zu Beginn der Reifung erhöhte mitochondriale Aktivitäten. Im Verlauf der IVM kam es bei dieser Klasse jedoch nicht zu einer dynamischen Hoch- und Runterregulation, sondern lediglich zu einem Abfall der mitochondrialen Aktivität. Da die Mitochondrien über die oxidative Phosphorylierung neben ATP auch Sauerstoffradikale produzieren, ist eine Up- bzw. Down-Regulation der mitochondrialen Aktivität jedoch notwendig.

Bei der Betrachtung der Aktivität in Beziehung zur Chromatinkonfiguration (Abb. 17) ist eine hohe Aktivität bei Oozyten in den frühen Stadien des Diplotän bzw. der Diakinese festzustellen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von TARAZONA et al. (2006), die bei unreifen bovinen Oozyten nur geringe mitochondriale Aktivitäten nachweisen konnten. Die Messung der mitochondrialen Aktivität erfolgte in dieser Arbeit jedoch subjektiv über Vergleiche mit der Aktivität reifer Oozyten, und war auf den Beginn und das Ende der IVM ohne Bezug auf das Kernstadium beschränkt. Eine hohe mitochondriale Aktivität in der Anfangsphase der Reifung weist auf einen erhöhten Energiebedarf in dieser Phase hin. Diese Energie wird z.B. für die Wiederaufnahme der Meiose, den GVBD, die Bildung des Spindelapparates und für den Ablauf biochemischer Prozesse (Proteinsynthese) in der Oocyte benötigt. Zum Zeitpunkt des GVBD konnten TOMEK et al. (2002) einen Anstieg der Translation in bovinen Oozyten nachweisen.

Eine ausreichende mitochondriale Aktivität lässt nicht nur auf einen erhöhten Energiebedarf in dieser Phase der Reifung schließen, sondern ermöglicht eventuell auch eine Anhäufung von ATP für nachfolgende energieverbrauchende Prozesse. Die hohen mitochondrialen Aktivitäten in den Stadien des Diplotän und der Diakinese könnten demnach die benötigte Energie für die Vorgänge der Metaphase I produzieren. Diese Phase der Reifung zeichnet sich neben der Formierung des Spindelapparates auch durch eine Zunahme der Aktivität von

Kinasen aus. Die Aktivierung der Kinasen erfolgt über Phosphorylierungs- und Deposphorylierungsreaktionen. Für die Reifung sind vor allem die Histon H1 Kinase (MPF, maturation promoting factor) und die MAPK von Bedeutung. Die Histon H1 Kinase zeigt die größte Aktivität in der Phase der MI und der MII (WEHREND, MEINECKE 1998; STOJKOVIC et al. 1999; TORNER et al. 2001; FAN, SUN 2004). In der Anaphase und der Telophase wurde in den verschiedenen Arbeiten ein Abfall der Aktivität dieser Kinase nachgewiesen. Der MPF spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des GVBD, der Chromatinkondensation und für den Übergang der Anaphase I zur Metaphase II. Der Verlauf der Aktivität der Histon H1 Kinase ähnelt dem in der vorgelegten Arbeit beobachteten Verlauf der mitochondrialen Aktivität in den verschiedenen Meiosestadien.

Nach einem Abfall der Aktivität in der Metaphase I und der Anaphase I konnte in der vorgelegten Untersuchung ein Anstieg der Aktivität bis zum Erreichen der Metaphase II beobachtet werden. Auch in dieser Phase der Reifung lässt sich ein erhöhter Energiebedarf erklären. In diesem Abschnitt wird Energie zur erneuten Wiederaufnahme der Meiose und als Vorbereitung auf die bevorstehende Befruchtung benötigt.

Der Anstieg der mitochondrialen Aktivität während der Reifung wird von Studien an porcinen Oozyten (in vivo, TORNER et al. 2004) und equinen Oozyten (TORNER et al. 2003) bestätigt. Bei equinen Oozyten (TORNER et al. 2003) besitzt die Cumulusmorphologie zum Zeitpunkt der Gewinnung einen Einfluss auf die gemessene mitochondriale Aktivität nach der IVM. Die höchste mitochondriale Aktivität wurde bei dieser Untersuchung bei Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus nachgewiesen und die niedrigsten Aktivitätswerte wurden in Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus ermittelt. Dies stimmt überein mit der besseren Entwicklungskompetenz von equinen Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus und von Oozyten, die ausschließlich von der Corona radiata umgeben sind.

Insgesamt kann bei der Betrachtung des Parameters mitochondriale Aktivität festgestellt werden, dass Oozyten der COK-Klasse I und II einer stärkeren Dynamik während der IVM unterliegen. Oozyten der COK-Klasse II weisen in der 1.Phase der IVM (0-12 h) die stärksten Steigerungswerte der mitochondrialen Aktivität bei allen untersuchten COK-Gruppen auf.

Die vorgelegte Untersuchung konnte zeigen, dass die Veränderungen der Chromatinkonfiguration und der Verlauf der IVM von Änderungen der mitochondrialen Aktivität und der mitochondrialen Aggregationsform begleitet werden. Weiterhin liegt eine signifikante Beziehung zwischen den mitochondrialen Parametern und der Cumulusmorphologie von Cumulus-Oozyten-Komplexen zum Zeitpunkt der Gewinnung vor.

### 5.3. Untersuchungen zu apoptotischen Veränderungen

#### *Apoptose in Cumuluszellen*

Während der gesamten Wachstums- und Entwicklungsphase der Oozyte besteht eine enge Beziehung zwischen der Oozyte und den umgebenden Cumuluszellen. Diese beeinflussen durch unterschiedliche Syntheseleistungen und über ihre komplexe Ausstattung mit Rezeptoren entscheidend die Koordinierung der Reifungsvorgänge in der Oozyte. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass apoptotische Veränderungen in den Cumuluszellen auch Einfluss auf die Oozyte und ihre Entwicklungsfähigkeit nehmen.

Apoptotische Veränderungen spielen im Verlauf der folliculären Atresie, bei der Rekrutierung und Selektion von Oozyten eine entscheidende Rolle und werden in Thekazellen, Granulosazellen, Cumuluszellen und Oozyten nachgewiesen. In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen, die einen Anstieg der Apoptoserate in Cumuluszellkernen während der IVM bei verschiedenen Spezies nachweisen konnten (Mensch: DE LOS SANTOS et al. 2000; Rind: ALM et al. 2000; IKEDA et al. 2003; KÖLLE et al. 2003). Es finden sich nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Apoptoserate von Cumuluszellkernen während der IVM bei verschiedenen COK-Klassen beschäftigen.

In der vorliegenden Untersuchung konnten die Literaturangaben über einen Anstieg der Apoptoserate während der In-vitro-Reifung bestätigt werden (Tab. 23, Abb. 18). In den Kernen expandierter Cumuluszellen (Klasse III) konnte ein signifikant höherer Apoptoseindex nachgewiesen werden (Abb. 19 und 20). Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchungen von ZEUNER et al. (2003) bestätigt.

In zahlreichen Untersuchungen (PEREZ, TILLY 1997; OOSTERHUIS et al. 1998; HOST et al. 2000, 2002; LEE et al. 2001; MIKKELSEN et al. 2001; MOFFAT et al. 2002; ALISCH et al. 2003; CORN et al. 2005) wird ein negativer Einfluss einer erhöhten Apoptoserate in den Cumuluszellkernen auf die Befruchtungsfähigkeit der korrespondierenden Oozyte beschrieben. Der höhere Apoptoseindex, der für die IVF weniger geeigneten Oozyten der Klasse III bestätigt diese Angaben.

Die hohen Apoptoseraten bei den Cumuluszellkernen der Klassen III im Anschluss an die Gewinnung könnten als ein Artefakt interpretiert werden. Die expandierten Cumuluszellen wurden direkt nach der Gewinnung separiert und unterlagen keiner weiteren Behandlung. Durch die fehlenden methodischen Schritte, die vor und nach einer IVM folgen würden (Umsetzen, Waschschritte, Einwirkungen des Reifungsmediums, etc.) gingen mitunter auch

bereits apoptotische Cumuluszellen der äußeren Zelllagen in die Untersuchung mit ein, die sich bei der Manipulation während der IVM vom Zellverband lösen würden.

### *Bestimmung von Caspase-3 im Ooplasma*

Die Ursache für die schlechte Entwicklungsfähigkeit einiger Oozyten unter in vitro Bedingungen ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich daher mit der Definierung neuer Parameter für die Oozytenqualität.

Eine mögliche Ursache für eine geringere Entwicklungsfähigkeit könnte darin begründet sein, dass die Oozyten schlechterer Qualität bereits apoptotisch sind (YUAN et al. 2004). TAKASE et al. (1995) und FUJINO et al. (1996) konnten apoptotische Veränderungen in reifen Mäuseoozyten feststellen.

Die Aktivierung von Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3) ist das Schlüsselereignis bei der Induzierung apoptotischer Vorgänge durch unterschiedliche proapoptotische Stimuli und eignet sich daher sehr gut als Marker für apoptotische Prozesse.

Es liegen nur wenige Untersuchungen zur Aktivität von Caspasen in Oozyten und Cumuluszellen vor. Die vorhandenen Untersuchungen verwenden des Weiteren verschiedene experimentelle Ansätze, so dass ein Vergleich der unterschiedlichen Ergebnisse schwierig ist.

YUAN et al. (2004) untersuchten an einzelnen bovinen Oozyten und an Cumuluszellen das Vorkommen von caspasespezifischer mRNA (Caspase-1, -3, -6, -7, -8) sowie das Vorliegen aktiver Caspasemoleküle im Anschluss an die Gewinnung. In dieser Untersuchung wurde keine caspasespezifische mRNA nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchung von BOONE und TSANG (1998). Aktive Caspasemoleküle wurden dagegen häufig in Cumuluszellen nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit kann dieses Ergebnis bestätigt werden. Aktive Caspase-3 (cleaved-Caspase-3) konnte in Cumuluszellen im Anschluss an die Gewinnung sowie während der IVM beobachtet werden. Die höchste Aktivität wiesen die Cumuluszellen der Klasse III (expandierter Cumulus oophorus) zum Zeitpunkt 12 h auf. Der Nachweis einer aktiven Caspase-3 lässt auf ein bereits ablaufendes Apoptoseprogramm schließen. Die fortgeschrittene Apoptose in Cumuluszellen aus einem expandiertem Cumuluszellverband ist auf den progressiven Reifungszustand zurückzuführen. Der Nachweis aktiver Caspasemoleküle in Cumuluszellen bestätigt die Ergebnisse der Untersuchung von ZEUNER et al. (2003).

In einzelnen bovinen Oozyten konnten YUAN et al. (2004) nur eine geringgradige Transkription von Caspase-3-mRNA nachweisen. Bei EXLEY et al. (1999) wird eine hohe

Transkription beschrieben. In dieser Untersuchung wurden jedoch gepoolte Oozyten verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnte zu den einzelnen Zeitpunkten der IVM keine aktive Caspase-3 in bovinen Oozyten nachgewiesen werden (Abb. 22 und 23). Die inaktive Form der Caspase-3 (Procaspase-3) konnte hingegen zu allen Zeitpunkten der IVM nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse der Untersuchungen von YUAN et al. (2004). PEREZ et al. (1989) wiesen aktive Caspase in fragmentierten Oozyten, jedoch nicht in „gesunden“ Oozyten nach. Andere Untersuchungen unterstützen dieses Ergebnis und führten zu der Annahme, dass unbefruchtete Oozyten durch Apoptose und nicht durch Nekrose zugrunde gehen (TAKASE et al. 1995; FUJINO et al. 1996; PEREZ, TILLY 1997; PEREZ et al. 1997; EXLEY et al. 1999; PEREZ et al. 1999).

Die Mehrzahl der Informationen über die Caspaseaktivität resultiert aus Untersuchungen an Mäuseoozyten. YUAN et al. (2004) begründen auf die Abwesenheit von aktiven Caspasmolekülen in Oozyten die Annahme, dass die Apoptose kein Grund für die reduzierte Kompetenz einiger Oozyten darstellt. Der Nachweis von caspasespezifischer mRNA lässt nicht den Schluss zu, dass auch aktives Protein vorhanden sein muss. Es wird daher ein System zur Blockierung apoptotischer Abläufe in Oozyten postuliert (YUAN et al. 2004; PAPANDILE et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich die Procaspase der Oozyten von der nachgewiesenen Procaspase in den Cumuluszellen im Hinblick auf das Molekulargewicht unterscheidet. Es könnte sich bei der Procaspase in den Oozyten um eine Variation des Moleküls in den Cumuluszellen handeln (Abb. 22). Dies stellt einen interessanten Aspekt für weiterführende Untersuchungen dar.

Die Verwendung von vollständigen Cumulus-Oozyten-Komplexen (Abb. 23) in der vorliegenden Arbeit erfolgte, da es bei der Verwendung der trypsinisierten Cumuluszellen nach der Zentrifugation vereinzelt zu Zellverlusten kam. Um die bisherigen Ergebnisse bei der Caspase-3-Aktivität in Cumuluszellen zu bestätigen und zu kontrollieren, wurden komplette COK für eine anschließende Versuchsreihe verwendet. Die beobachtete Aktivität der cleaved-Caspase-3 in vollständigen COK kann auf die Cumuluszellen zurückgeführt werden, da bei den vorherigen Versuchsreihen gezeigt werden konnte, dass keine aktive Caspase-3 in Oozyten vorhanden war. Es ist denkbar, dass die Aktivität von Caspase-3 erst zu einem späteren Zeitpunkt in alternden Oozyten zunimmt.

PAPANDILE et al. 2004 untersuchten die Aktivität von Caspase-3, -8 und -9 in superovulierten Oozyten, ovulierten Oozyten und in Zygoten der Maus. Die Aktivität von Caspase-8 und -9 (Initiator-Caspase) konnte in dieser Studie in allen untersuchten Stadien nachgewiesen werden. Dies weist auf den Beginn eines apoptotischen Geschehens hin. Für

weiterführende Arbeiten wäre eine Untersuchung dieser Initiator-Caspasen im Verlauf der IVM bei bovinen COK interessant. Der Nachweis ist jedoch schwierig. PAPANDILE et al. (2004) vermuten, dass die Aktivität von Caspase-3 in Oozyten zunimmt, die zu einem ungünstigen bzw. verspäteten Zeitpunkt befruchtet wurden. Apoptotische Vorgänge könnten somit an embryonalen Verlusten nach IVF beteiligt sein und Inhibitoren der Initiator-Caspasen könnten Anwendung finden, um die Zeitspanne zu verlängern, in der eine Fertilisation der Oozyte erfolgen kann.

#### **5.4. Beziehung zwischen mitochondrialen Parametern und Parametern der Apoptose**

Die Mitochondrien sind maßgeblich an apoptotischen Abläufen beteiligt. Veränderungen im Bereich der Mitochondrien könnten daher auch den Grad der Apoptose beeinflussen. TORNER et al. (2003) konnten in ihren Untersuchungen an in vivo gereiften porcinen Oozyten einen Zusammenhang feststellen zwischen dem Anstieg der mitochondrialen Aktivität und der Zunahme der Apoptose in den Cumuluszellen. Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung der Mitochondrien in der Oozyte ein Auslöser sein könnte für apoptotische Veränderungen in den umgebenden Cumuluszellen. Die Cumuluszellen besitzen zumindest am Beginn der finalen Oozytenreifung über Zellfortsätze einen starken Kontakt zur Oozyte (DE LOOS et al. 1991). In diesen Zellfortsätzen wurden in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Mitochondrien nachgewiesen. Ein Transport von apoptoseauslösenden Molekülen (z.B. Caspase) durch Mitochondrien des Ooplasmas über diese Zellfortsätze könnte daher für die Auslösung von apoptotischen Veränderungen in den Cumuluszellen verantwortlich sein. Ziel dieser Arbeit war es unter anderem die Beziehung zwischen den ermittelten mitochondrialen Parametern und den apoptotischen Parametern zu untersuchen.

In der vorgelegten Arbeit konnte ein tendenzieller Anstieg der mitochondrialen Aktivität in den Oozyten sowie ein Anstieg der Apoptose in den Cumuluszellen während der IVM nur bei COK der Klasse III beobachtet werden. Ein Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der Caspaseaktivität in den Oozyten konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine zunehmende Aktivität der Caspase-3 wiesen lediglich die Cumuluszellen im Verlauf der IVM auf. Eine Auslösung der Apoptose in den Cumuluszellen durch Caspasemoleküle der Oozyte ist somit durch die eigenen Untersuchungen nicht belegbar.

## **5.5. Zuordnung der untersuchten Qualitätsparametern zur Entwicklungskompetenz von bovinen Oozyten**

Die vorgelegte Arbeit befasst sich mit der Aufklärung neuer Parameter zur Bestimmung der Eizellqualität und nutzt dazu verschiedene COK-Klassen. Um die ermittelten Ergebnisse der Untersuchung detaillierter interpretieren zu können, war es sinnvoll, die Entwicklungskompetenz der definierten COK-Klassen unter den vorliegenden Laborbedingungen zu bestimmen. Als Maß für die Entwicklungskompetenz der Oozyten der einzelnen Klassen wurde die Blastozystenrate herangezogen.

Die Beurteilung der Entwicklungskompetenz von Oozyten bzw. die Effektivität eines IVP-Systems wird von vielen Arbeitsgruppen über die Bestimmung der Blastozystenrate und damit über die morphologische Beurteilung der Blastozysten vorgenommen (CAROLAN et al. 1994). Der Vorteil dieser Beurteilung liegt in der nicht invasiven Methodik sowie der schnellen und einfachen Durchführbarkeit. Eine detaillierte Qualitätsbeurteilung kann über die Bestimmung der Zellzahl von Blastozysten über eine invasive Differentialfärbung erfolgen (MORI et al. 2002).

Die durchschnittliche Blastozystenrate, die durch IVP beim Rind erzielt wird, liegt zurzeit bei ca. 20-40% (HAWK, WALL 1994; HANSEN, BLOCK 2004) und wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Besonders die entsprechenden Kulturbedingungen eines Labors können auf das Ergebnis einer IVP Einfluss nehmen (PEREIRA et al. 2005). In vivo erreichen über 70% der gereiften und befruchteten Oozyten das Blastozystenstadium (RIZOS et al. 2002).

Die morphologische Klassifizierung von Oozyten nach der Gewinnung stellt einen gesicherten Parameter für die Qualitätsbeurteilung von Oozyten dar und ist unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet sinnvoll. Bei Versuchsansätzen und Fragestellungen, die Oozyten mit hoher Entwicklungskompetenz benötigen (z.B. Kerntransfer, Kryokonservierung), ist eine gezielte und sichere Auswahl der Oozyten zum Zeitpunkt der Gewinnung notwendig. Die Methode der Klassifizierung sollte dabei möglichst nicht invasiv sein und die Lebensfähigkeit der Oozyten nicht beeinflussen.

In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass eine Korrelation besteht zwischen der Morphologie des gewonnenen Cumulus-Oozyten-Komplexes und der meiotischen Kompetenz sowie der Entwicklungskompetenz der Oocyte (LEIBFRIED, FIRST 1979; HAZELEGER et al. 1992, 1995). Die Klassifizierung von Cumulus-Oozyten-Komplexen erfolgt in der Regel anhand der Morphologie (Dichte und Kompaktheit) des Cumulus

oophorus, des Erscheinungsbildes des Ooplasmas (Farbe, Homogenität) sowie der Größe der Oozyte (HAZELEGER et al. 1992, 1995). Die Anzahl der eingeteilten Klassen variiert in der Literatur von 3 Klassen (SHIOYA et al. 1988; MADISON et al. 1992), 4 Klassen (LEIBFRIED, FIRST 1979; DE LOOS 1989, 1992; TORNER et al. 2003), 5 Klassen (YANG, LU 1990) bis zu 9 Klassen (HAZELEGER et al. 1992, 1995). Die verschiedenen Studien konnten nachweisen, dass die Reifungs-, Befruchtungs- und Entwicklungskompetenz in Oozyten, die zum Zeitpunkt der Gewinnung von einem mehrlagigen, kompakten Cumulus oophorus umgeben sind, höher ist, als bei Oozyten mit wenigen Cumuluszelllagen, expandiertem Cumulus bzw. bei denudierten Oozyten (SHIOYA et al. 1988; HAZELEGER, STUBBINGS 1990; YANG, LU 1990; HAWK, WALL 1994).

Es gilt als gesichert, dass die Oozyten mit kompaktem Cumulus die höchste Entwicklungskompetenz aufweisen. In den meisten Studien, die sich mit der IVP bzw. mit weiterführenden Biotechniken beim Rind (z.B. Klonierung, Kryokonservierung) beschäftigen finden daher nur diese Klassen Verwendung (RHO et al. 2002; BHOJWANI et al. 2005). In einigen Bereichen der IVP (z.B. Oozytengewinnung durch Ovum pick up) ist eine Nutzung von Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus jedoch notwendig, da diese hierbei am häufigsten gewonnen werden. Auch in den IVP-Programmen der Zuchtorganisationen finden alle COK-Klassen Verwendung, um eine möglichst große Ausbeute an Blastozysten zu erzielen. Untersuchungen an unterschiedlichen COK-Klassen, die dazu beitragen könnten, dass auch bei diesen Klassen die Entwicklungskompetenz gesteigert werden kann, besitzen daher eine Bedeutung im Rahmen der IVP beim Rind.

In der vorliegenden Untersuchung konnte die höhere Entwicklungskompetenz der Oozyten der Klassen I und II durch die ermittelten signifikant höheren Blastozystenraten bestätigt werden. Die erzielten Blastozystenraten liegen in dem Prozentbereich der von den meisten Arbeitsgruppen erzielt wird. Bei der Betrachtung der absoluten Zahlen weisen die Oozyten der Klasse II höhere Blastozystenraten auf im Vergleich zu den Oozyten der Klasse I. Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (BLONDIN, SIRARD 1995; RUBIO POMAR et al. 2004). Die Tatsache, dass auch mit Oozyten der Klasse III Blastozysten erzeugt wurden, bestätigt die Bedeutung der Berücksichtigung dieser COK-Klasse. Mit denudierten Oozyten konnten keine Blastozysten produziert werden. Dieses Ergebnis wird durch frühere Studien unterstützt (SHIOYA et al. 1987; FUKUI 1990; YANG, LU 1990; HAZELEGER et al. 1995).

Bei Betrachtung der Ergebnisse der untersuchten nukleären und mitochondrialen Parameter gibt es Befunde, die die nachgewiesenen unterschiedlichen Entwicklungskompetenzen der Oozyten der verschiedenen Klassen auf zellbiologischem Niveau begründen.

Die Oozyten der Klasse II zeigten in entscheidenden Phasen der Meiose (Übergang Diakinese-MI-AI, Übergang TI-MII) eine deutliche Dynamik im Durchlaufen dieser Prozesse. Demgegenüber befanden sich noch ca. 50% der Oozyten der Klasse I nach 20 h IVM weiterhin im Stadium der MI. Der Polkörperausstoß und damit das Erreichen der MII erfolgte bei Oozyten der Klasse II zeitgerechter (MII nach 24 h) und früher als bei den Oozyten der Klasse I. Dies könnte einen Vorsprung im Erlangen der Entwicklungskompetenz bedeuten und damit die nachgewiesenen besseren Blastozystenrate dieser Oozyten erklären. Das Auftreten von Aktivierungs- und Degenerationsvorgängen während der IVM bei den Oozyten der Klasse III gibt eine Erklärung für deren schlechtere Entwicklungskompetenz. Zum Zeitpunkt der Gewinnung befanden sich Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus bereits in einem fortgeschritteneren Stadium der Reifung. Es ist anzunehmen, dass diese Klasse das optimale Stadium zum Zeitpunkt der Fertilisation nach 24 h IVM bereits überschritten hat. Die denudierten Oozyten zeigten ein sehr heterogenes Bild im Bezug auf die Chromatinkonfiguration während der IVM. Ein dynamischer Verlauf konnte zu keiner Zeit der IVM nachgewiesen werden. Dagegen konnten degenerierte Oozyten in dieser Klasse schon in frühen Reifungsphasen beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen vorheriger Untersuchungen und schließen eine Verwendung von denudierten Oozyten für den Einsatz von In-vitro-Techniken aus.

Die Beobachtungen im Rahmen der Untersuchung der mitochondrialen Parameter belegen ebenfalls die nachgewiesenen unterschiedlichen Entwicklungskompetenzen der verschiedenen Klassen. Die entwicklungs kompetenteren Oozyten der Klasse II zeigten vermehrt und zu früheren Zeitpunkten das Auftreten einer kristallinen Aggregationsstruktur der Mitochondrien. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Umverteilung der Mitochondrien hin zu einer kristallinen Aggregationsform für das Erreichen der Entwicklungskompetenz von Bedeutung ist. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei den entwicklungs kompetenten Oozyten der Klasse I und II während der IVM ein dynamischer Wechsel von einer feinkörnigen mitochondrialen Aggregation zu einer kristallinen Aggregation stattfindet. Dieser Wechsel der Aggregationsform konnte bei Oozyten der entwicklungsinkompetenteren Klassen III und IV nicht nachgewiesen werden. Vorherige Untersuchungen bei verschiedenen Spezies geben Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem Wechsel des mitochondrialen Aggregationsmusters während der IVM und der Entwicklungskompetenz von Oozyten (TORNER et al. 2003; TORNER et al. 2004). Die zunehmende Aggregation der Mitochondrien weist auf einen erhöhten Energiebedarf in verschiedenen Regionen einer Zelle hin (MARGINEANTU et al. 2002). Das Fehlen einer mitochondrialen Umverteilung kann auf Störungen im Bereich des Zytoskelett zurückgeführt werden (BREVINI et al. 2005).

Die Verläufe der mitochondrialen Aktivität bei den verschiedenen COK-Klassen lassen ebenfalls eine Beziehung zur späteren Entwicklungskompetenz der Oozyten erkennen. Die Fähigkeit zur Anpassung der respiratorischen Aktivität im Verlauf der IVM findet sich nur bei den Oozyten der entwicklungs kompetenteren Klassen I und II. Oozyten der COK-Klasse II weisen gerade in der 1. Phase der IVM (0 – 12 h), die zeitlich mit Prozessen der Translation und des GVBD zusammenfällt, die stärksten Steigungswerte in der mitochondrialen Aktivität bei allen untersuchten COK-Gruppen auf. Keine Dynamik im Verlauf der Kernreifung konnte bei den Oozyten der Klasse III nachgewiesen werden. Die Oozyten der Klasse IV zeigten im Verlauf der IVM sogar einen Abfall der mitochondrialen Aktivität. Die Korrelation zwischen einer hohen respiratorischen Aktivität der Mitochondrien im Verlauf der IVM und einer höheren Entwicklungskompetenz bei bovinen Oozyten wurde von STOJKOVIC et al. (2001) beschrieben. In verschiedenen Untersuchungen wurde die Abhängigkeit unterschiedlicher Abläufe der Maturation von der Energiebereitstellung über ATP nachgewiesen. Zum einen ist hier der Ablauf der Kernreifung und das Erlangen der meiotischen Kompetenz zu nennen (DE VANTERY et al. 1997; PICTON et al. 1998). Dies erklärt die, in der vorliegenden Arbeit, beobachteten dynamischen Verläufe der mitochondrialen Aktivität während der Meiose und das synchrone Auftreten der kristallinen Verteilungsform mit dem Meioseverlauf. Weiterhin besteht ein ATP-Bedarf für die Abläufe der zytoplasmatischen Reifung (PICTON et al. 1998), für die Umstrukturierungen des Zytoskeletts (VAN BLERKOM et al. 2000) sowie für die Ansammlung von mRNA während der Maturation (PICTON et al. 1998; TROUNSON et al. 2001). Die frühere Aktivitätssteigerung der Oozyten mit kristallinem Aggregationsmuster stellt einen weiteren Hinweis auf die bessere Entwicklungskompetenz dieser Oozyten dar.

Die Untersuchung von EL SHOURBAGY et al. (2006) bestätigt den Einfluss der Mitochondrien auf die Entwicklungskompetenz von Oozyten. In dieser Arbeit konnte in porcinen Oozyten mit verminderter Entwicklungskompetenz (wachsende Oozyten) eine verminderte Anzahl Mitochondrien und ein verringerter Anteil mtDNA nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass für eine erfolgreiche Befruchtung und eine erfolgreiche frühe embryonale Entwicklung ein bestimmter Anteil an Mitochondrien und damit ein bestimmter Anteil an respiratorischer Aktivität notwendig sind. Einen Einfluss von einer reduzierten Anzahl an mtDNA-Kopien in der Oozyte auf die Gegebenheiten in dem entstehenden Embryo konnte beim Schwein und beim Menschen nachgewiesen werden (LIN et al. 2004; EL SHOURBAGY et al. 2006).

In der Humanmedizin spielen die Mitochondrien bei der Suche nach der Ursache für unzureichende IVF-Ergebnisse und schlechte Implantationsraten nach assistierter Reproduktion (ART) eine große Rolle. WILDING et al. (2001b) konnte in Oozyten älterer

Frauen eine reduzierte mitochondriale Aktivität nachweisen. Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass eine Oozyte mit reduzierter mitochondrialer Aktivität nicht die Kompetenz zur Bildung eines vitalen Embryos besitzt (BARTMANN et al. 2004). Einen Zusammenhang zwischen schlechten Befruchtungsergebnissen und Störungen der oxidativen Phosphorylierung konnte bei humanen Oozyten durch HSIEH et al. (2001) beobachtet werden.

Ein interessanter Aspekt weiterführender Untersuchungen könnte in der Verbesserung der Blastozystenrate der unterschiedlichen COK-Klassen (Klasse I, II, III) durch Veränderungen der Reifungszeit liegen. Der unterschiedliche Reifungszustand der verschiedenen COK-Klassen zum Zeitpunkt der Gewinnung würde durch individuelle Reifungs- und Befruchtungszeit Berücksichtigung finden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Beziehung zwischen der Chromatinkonfiguration, der mitochondrialen Aggregation und Aktivität sowie der Cumulusmorphologie zum Zeitpunkt der Gewinnung und der Entwicklungskompetenz von bovinen Oozyten nachgewiesen werden konnte. Oozyten mit nachgewiesener höherer Entwicklungskompetenz (COK-Klasse I und II) zeigten zum Ende der IVM einen Anstieg im Anteil von Mitochondrien mit kristalliner Aggregationsform und weisen in der 1. Phase der IVM (0 - 12 h) eine höhere respiratorische Aktivität auf. Das bereits nach 20 h IVM nachgewiesene frühzeitigere Auftreten von Oozyten der COK-Klasse II mit MII und einer kristallinen Aggregationsform der Mitochondrien, sowie deren stärkere Dynamik im Anstieg der mitochondrialen Aktivität zwischen 0 und 12 h IVM, könnten die Ursache für deren tendenzielle Überlegenheit gegenüber Oozyten der COK-Klasse I sein.