

## 6. Zusammenfassung

### **Untersuchungen zur Aggregation und Aktivität von Mitochondrien im Ooplasma von Cumulus-Oozyten-Komplexen des Rindes während der In-vitro-Reifung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der parallelen Charakterisierung der Aktivität und der Aggregation von Mitochondrien im Ooplasma und der Chromatinkonfiguration boviner Oozyten verschiedener COK-Klassen während der IVM. Ergänzt wurde diese Arbeit durch Untersuchungen zum Auftreten von Apoptose in Oozyten und umgebenden Cumuluszellen definierter COK. Es folgte eine Zuordnung der während der IVM untersuchten Parameter in den verschiedenen COK-Gruppen zu deren weiteren Entwicklungsfähigkeit nach IVM und IVF.

Die Einteilung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) erfolgte zum Zeitpunkt der Gewinnung in 4 Klassen: Klasse I (Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus), Klasse II (Oozyten mit aufgelockertem Cumulus oophorus), Klasse III (Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus), Klasse IV (denudierte Oozyten).

Die Parametererfassung bezüglich der Mitochondrien und der Chromatinkonfiguration an 1473 Oozyten der verschiedenen COK-Klassen erfolgte parallel und zu 7 definierten Zeitpunkten während der IVM (0, 4, 8, 12, 16, 20 und 24 h). Die Untersuchungen zur Apoptoserate in Cumuluszellen verschiedener COK-Klassen erfolgte an 855 COK. Für die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität, als Marker für Apoptose in bovinen Oozyten und Cumuluszellen, wurden 140 COK genutzt. Die Analyse der Entwicklungskompetenz von Oozyten verschiedener COK-Gruppen erfolgte nach IVF von 1104 COK.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Chromatinkonfiguration und der Cumulusmorphologie bei den COK festgestellt werden. Oozyten, die zu Beginn der IVM einen expandierten Cumulus oophorus aufwiesen oder denudiert gewonnen wurden, befanden sich häufig bereits in fortgeschrittenen Stadien der Meiose. Bei den Oozyten der Klasse II konnte bereits nach 4 h IVM ein höherer Anteil an Diakinese-Stadien nachgewiesen und damit eine im Vergleich zu den Oozyten der Klasse I frühere Wiederaufnahme der Meiose beobachtet werden.

Nach 20 h IVM befanden sich vergleichsweise mehr Oozyten der COK-Klassen III (70%) und II (43%) im Stadium der Metaphase II. Bei den COK-Klassen II und III kam es demnach zu einem früheren Auftreten reifer Oozyten im Verlauf der IVM. Während ein hoher Anteil Oozyten der Klasse II zwischen 20 und 24 h in der M II verblieb, erreichten Oozyten der Klasse I erst nach 24 h vergleichbare Anteile.

Die Oozyten mit expandiertem Cumulus oophorus zum Zeitpunkt der Gewinnung zeigten nach Reifungsende einen Rückgang des Anteils reifer Oozyten und vermehrt Degenerations- bzw. Aktivierungsvorgänge. Oozyten der Klasse IV wiesen einen sehr heterogenen Meioseverlauf bei einer hohen Rate an degeneriertem bzw. aktiviertem Chromatin auf.

Das Auftreten verschiedener Zustandsformen der mitochondrialen Aggregation stand in Abhängigkeit von der Reifungszeit, der COK-Klasse und der Chromatinkonfiguration der Oozyten. Im Verlauf der IVM kam es bei den Oozyten der COK-Klassen I und II zu einem Wechsel von einer feinkörnigen zu einer kristallinen Aggregationsstruktur der Mitochondrien. Die Zunahme der kristallinen Aggregationsform trat vor allem zu Zeitpunkten der nukleären Reifung auf, die durch energieverbrauchende Prozesse (MI-Spindelaufbau, Polkörperausstoß) gekennzeichnet sind. Ein deutlicher Anstieg der kristallinen mitochondrialen Aggregationsform wurde bei Oozyten der COK-Klasse II bereits nach 20 h beobachtet.

Bei der Analyse der mitochondrialen Aktivität wurde eine Beziehung zwischen diesem Parameter und den Parametern Reifungszeit, COK-Klasse und Chromatinkonfiguration festgestellt. In der frühen Phase der IVM (0 - 12 h) wurde vor allem in den Oozyten der COK-Klassen I und II ein Anstieg der mitochondrialen Aktivität beobachtet. Die stärksten Steigerungswerte der mitochondrialen Aktivität in der frühen Reifungsphase zeigten die Oozyten der COK-Klasse II. Die höchste mitochondriale Aktivität in Bezug zur Chromatinkonfiguration wurde bei Oozyten im Diplotän, in der Diakinese und in der Metaphase II beobachtet.

Bei der Beurteilung der Apoptoserate der Cumuluszellen der verschiedenen COK-Klassen konnte ein Anstieg der Apoptose im Verlauf der IVM festgestellt werden. Die höchsten Anteile apoptotischer Cumuluszellen wiesen hierbei die COK der Klasse III auf. Während der IVM wurde in den Cumuluszellen aller COK-Klassen aktivierte Caspase-3 nachgewiesen. Die höchste Aktivität war hierbei 12 h nach Reifungsbeginn bei den COK der Klasse III zu verzeichnen. In den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen konnte keine aktive Caspase-3 nachgewiesen werden. Die inaktive Form der Caspase-3 (Procaspase-3) wurde jedoch zu allen Zeitpunkten der IVM in den untersuchten Oozyten festgestellt.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Entwicklungskompetenz der Oozyten aus verschiedenen COK-Klassen konnten hohe Furchungs- und Blastozystenrate unter Verwendung von Oozyten der COK-Klassen I und II beobachtet werden. Die Ergebnisse weisen weiterhin auf eine tendenzielle Überlegenheit bezüglich der Entwicklungskompetenz

von Oozyten der Klasse II hin. Mit den Oozyten der COK-Klasse IV konnten keine Blastozysten erzeugt werden.

Der Status von Nukleus und Mitochondrien bei Oozyten verschiedener COK-Klassen korrelierte mit deren Entwicklungskompetenz. Das Auftreten von MII-Stadien und einer kristallinen mitochondrialen Aggregation bereits nach 20 h IVM sowie die stärkere Dynamik bei der mitochondrialen Aktivität in der frühen Phase der IVM in den Oozyten der Klasse II könnte eine Erklärung für die tendenziell höhere Entwicklungskompetenz dieser Klasse gegenüber den Oozyten der Klasse I sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass Aussagen zur mitochondrialen Aggregation und Aktivität zu definierten Zeitpunkten der IVM geeignete Kriterien zur Feststellung der Oozytenqualität sind.