

## Beeinflußt die Anwesenheit apoptotischer Follikelzellen während der In-vitro-Reifung die Entwicklungskompetenz von Eizellen?

A. Zeuner<sup>1</sup>, K. Müller<sup>1</sup>, K. Reguszynski<sup>1</sup>, K. Jewgenow<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.

<sup>2</sup>Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin

Ein Teil der im Rahmen der In-vitro-Produktion (IVP) von Rinderembryonen morphologisch als gut und sehr gut eingestuften COCs stammt aus Follikeln mit beginnender Atresie. Apoptose, der genetisch determinierte Zelltod, ist der physiologische Prozeß, der der Follikelatresie zugrunde liegt. In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, daß COCs guter morphologischer Qualität aus Follikeln mit hohem Anteil an Apoptose nach Einzelreifung eine verminderte Entwicklungskompetenz besitzen (Jewgenow et al., 1999, *Theriogenology* 51, 745-756). Nur 5% der Oozyten entwickelten sich zum Blastozystenstadium, und zwar ausschließlich in der Gruppe mit der geringsten Apoptose im zugehörigen Follikel. Die Gruppenreifung erbrachte hingegen 25% Blastozysten als Kontrolle. Offensichtlich sind intrafollikuläre Prozesse, die sich negativ auf die Entwicklungskompetenz der zugehörigen Eizelle auswirken, bei einer Gruppenreifung teilweise reversibel. Die Tatsache, daß sich bei weitem nicht alle morphologisch als tauglich beurteilten Eizellen nach In-vitro-Reifung/In-vitro-Befruchtung (IVM/IVF) zu transfertauglichen Embryonen entwickeln, beeinträchtigt wesentlich die effektivere Nutzung des Verfahrens. Die Embryonenausbeute beläuft sich weltweit auf etwa 10 bis maximal 50% der eingesetzten Eizellen. Darüber hinaus gibt es wesentliche qualitative Unterschiede in der Entwicklung der IVF-Embryonen im Vergleich zu denen im natürlichen Milieu (Annual Conference International Embryo Transfer Society, Jan. 2001). Die physiologische Basis für diese "Entwicklungsgrenzen" ist bisher nicht eindeutig definiert.

Ziel der vorgestellten Untersuchungen war es, den Einfluß externer atretischer Granulosa- und Follikelwandzellen auf die Entwicklungskompetenz von Rindereizellen in vitro zu untersuchen. Dazu wurden aus Schlachtovarien gewonnene COCs nach unserem Standardverfahren in vitro gereift (M199 mit 5% östr. Kuhserum), befruchtet (Spermienselektion per Swim up) und kultiviert (SOF mit 0.8% w/vol BSA). Während der IVM wurden den COCs zunächst Granulosazellen aus leicht oder stark atretischen Follikeln zugesetzt (Tabelle 1). Der Grad der Apoptose wurde an Aliquots dieser Granulosazellen mittels TUNEL-Assay parallel bestimmt.

**Tabelle 1: Entwicklungsparameter der Oozyten nach IVM mit Zusatz von Granulosazellen (GC) unterschiedlicher Apoptoseausprägung im Vergleich zur IVM ohne GC-Zusatz**

Behandlung	% TUNEL-positive GC	Anzahl Oozyten	% Teilung	% Blastozysten	% geschlüpfte Blastozysten
Kontrolle		170	69.2 ± 4.9	26.9 ± 7.4	13.8 ± 5.6
+ hoch apoptot. GC	45.5 ± 6.4	96	63.9 ± 5.2	25.3 ± 5.4	14.9 ± 2.5
+ gering apoptot. GC	4.2 ± 1.5*	98	67.3 ± 3.4	26.2 ± 6.6	17.2 ± 5.5

Durch den Zusatz apoptotischer Granulosazellen während der IVM konnte keine Beeinträchtigung der Teilungs-, Blastozysten und Schlupfrate der eingesetzten Oozyten ausgelöst werden. In einem weiteren Versuch wurden den reifenden COCs Bruchstücke von Follikelwänden leicht oder stark atretischer Follikel zugesetzt (Tabelle 2). Auch der Follikelwandzusatz während der Reifung der COCs induzierte keine Beeinträchtigung der Entwicklungsparameter im Vergleich zur Kontrolle ohne Follikelwandzusatz. Auffällig ist die große Variabilität zwischen den IVF-Durchgängen, die sich durch eine hohe Streuung der Ergebnisse in der Kontrollgruppe manifestiert. Die Versuche wurden in der Phase der BSE-bedingten Umstrukturierungen der Rinderproduktion durchgeführt und deuten auf die starke Heterogenität des angefallenen Schlachtmaterials hin.

**Tabelle 2: Entwicklungsparameter der Oozyten nach IVM mit Zusatz von Follikelwandzellen (FW) guter und schlechter Qualität**

Behandlung	Anzahl Oozyten	% Teilung	% Blastozysten	% geschlüpfte Blastozysten
Kontrolle	166	57.8 ± 13.3	26.0 ± 20.6	12.7 ± 13.9
+ gute FW	87	55.5 ± 25.7	27.0 ± 15.6	14.5 ± 15.0
+ schlechte FW	90	64.4 ± 30.1	30.4 ± 21.9	14.2 ± 13.6

Die Ergebnisse belegen, daß die Anwesenheit externer apoptotischer Granulosa- oder Follikelwandzellen während der Gruppenreifung die quantitative Entwicklungskompetenz der COCs bzw. der enthaltenen Eizellen nicht negativ beeinflußt.

*Wir danken der DFG für die Förderung dieses Projektes (Je 163/2-2).*