

Einfluss des Zeitpunktes der Eizellgewinnung in Relation zum präovulatorischen LH-Anstieg auf die Entwicklungskapazität boviner Oozyten*

C. Wrenzycki¹, P. Humblot², P. Holm³, P. Lonergan⁴, C. Guyader Joly^{2,5}, D. Herrmann¹,
A. Lopes³, D. Rizos⁴, H. Niemann¹ und H. Callesen³

* Gefördert durch die Europäische Union (QLK3-CT1999-00104 - Ex Ovo Omnia,
www.biol.ucl.ac.be/exovoomnia)

¹ Institute for Animal Breeding (FAL), Department of Biotechnology, Mariensee, Germany

² UNCEIA, Département Recherche Développement, Maisons Alfort, France

³ Department of Animal Breeding and Genetics, Danish Institute of Agricultural Sciences, Tjele, Denmark

⁴ Department of Animal Science and Production, University College Dublin, Lyons Research Farm, Newcastle, County Dublin, Ireland

⁵ UNCEIA-UCEAR, Les Vesves, Chateaufvillain, France

Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) aus großen Antralfollikeln (> 6-8 mm) entwickeln sich zu einem signifikant höheren Prozentsatz zu Blastozysten als solche, die aus kleineren Follikeln stammen. Eine höhere Blastozystenrate wird auch durch den Einsatz in vivo gereifter im Vergleich zu in vitro gereiften Oozyten erzielt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Kapazitation und (Prä)Maturation der Oozyte im präovulatorischen Follikel sowohl beim Erwerb der Entwicklungskompetenz der Eizelle als auch für die weitere embryonale Entwicklung eine wichtige Rolle spielen. Ziel unserer Untersuchungen war es, die Qualität und Entwicklungskapazität boviner KOK zu ermitteln, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Follikel- und Oozytenreifung gewonnen wurden.

Die KOK wurden von synchronisierten Tieren nach Superovulation mit FSH zu 4 verschiedenen Zeitpunkten in Relation zur 2. Prostaglandin-Injektion (entsprechend relativ zum präovulatorischen LH-Anstieg) durch Ovum pick-up (OPU) von drei Teams (Team 1: Irland, Team 2: Dänemark, Team 3: Frankreich) gewonnen:

Gruppe 1: 12 Std. vor PG-Gabe (48 Std. vor dem erwarteten LH-Anstieg);

Gruppe 2: 12 Std. nach PG-Gabe (24 Std. vor dem erwarteten LH-Anstieg);

Gruppe 3: 40 Std. nach PG-Gabe (Erwarteter Zeitpunkt des LH-Anstiegs, direkt vor Wiederaufnahme der Meiose);

Gruppe 4: 60 Std. nach PG-Gabe (20 Std. nach dem erwarteten LH-Anstieg, in vivo gereifte Oozyten).

Folgende Parameter wurden untersucht: Gesamtzahl der punktierten Follikel, Gesamtzahl der gewonnenen KOK, Wiederfindungsrate, Gesamtzahl der KOK mit kompaktiertem oder expandiertem Kumulus und Gesamtzahl der denudierten KOK.

Die gewonnenen KOK der Gruppen 1-3 wurden standardisiert für 24 h in TCM199 mit EGF in vitro maturiert. Anschließend wurden die KOK aller Gruppen nach Standardprotokollen in vitro fertilisiert und kultiviert. An Tag 2 (Tag 0 = IVF) wurde die Teilungsrate und an Tag 7/8 die Blastozystenrate bestimmt.

Weiterhin wurde bei entkumulierten Oozyten der Gruppen 1-3 vor und nach IVM und der Gruppe 4 die relative Häufigkeit verschiedener Gentranskripte, die bei der Oozytenreifung eine wichtige Rolle spielen, mittels eines semi-quantitativen RT-PCR-Assays untersucht: Die RNA-Polymerase I (RNA pol I) ist für die Transkription der rRNA-Gene verantwortlich, der Upstream Binding Factor (UBF) fungiert hierbei als Transkriptionsfaktor. Durch die Poly(A)-Polymerase wird der Poly(A)-Schwanz an neu gebildete RNA angehängt. Das

Hitzeschockprotein 70.1 (Hsp) dient als sensitiver Indikator von Stress und unterstützt die Proteinfaltung und -stabilisierung.

Insgesamt konnten von den drei Teams in 252 OPU-Sitzungen bei 106 Färsen oder Kühen 2033 KOK gewonnen werden. Pro Sitzung wurden durchschnittlich zwischen 14 und 24 Follikel punktiert, wobei unabhängig vom Team in den Gruppen 1 und 2 signifikant weniger Follikel punktiert wurden als in den Gruppen 3 und 4. Die Zahl der gewonnenen KOK variierte zwischen 7 und 14. Unabhängig vom Team konnten in den Gruppen 3 und 4 mehr KOK als in den Gruppen 1 und 2 gewonnen werden. Die Wiederfindungsrate lag bei 46-57 %. Die durchschnittliche Zahl an KOK mit einem kompakten Kumulus stieg in den Gruppen 1-3 von 5 auf 8 an und sank in Gruppe 4 auf 4 ab. Der Anteil an KOK mit einem expandierten Kumulus war relativ niedrig in den Gruppen 1-3 (1,4 %, 0,5 %, 5,8 %) und erhöhte sich in Gruppe 4 auf 76,8 %. Der Anteil denudierter KOK war insbesondere in Gruppe 1 erhöht.

Die relative Häufigkeit der Transkripte PolyA, RNA pol1 und UBF war bei Oozyten aus den Gruppen 1-3 ohne nachfolgende In vitro-Maturation (IVM) und Gruppe 4 ähnlich. Hsp-Transkripte zeigten eine signifikante Erniedrigung bei Oozyten der Gruppe 4 im Vergleich zu Oozyten der Gruppen 1-3. Nach IVM der KOK aus den Gruppen 1-3 konnte ein signifikanter Abfall der relativen Häufigkeit an Hsp-Transkripten bei Oozyten aus allen drei Gruppen beobachtet werden. Im Vergleich zu in vivo gereiften Oozyten war der Gehalt an Hsp-Transkripten in in vitro gereiften KOK aus allen 3 Gruppen signifikant erniedrigt. Eine signifikante Erniedrigung der Transkripte für RNAPol1 zeigte sich im Vergleich zu in vivo gereiften Eizellen nur nach IVM der KOK der Gruppe 1. Der relative Gehalt an Poly(A)-Transkripten war bei Oozyten aus allen Gruppen nach IVM im Vergleich zu in vivo gereiften Eizellen ähnlich.

Unabhängig vom Team lag die Teilungsrate bezogen auf die Gesamtzahl der inseminierten Oozyten durchschnittlich bei 81% und die Blastozystenrate bei 42 (Tag 7) bzw. 45% (Tag 8). Der Zeitpunkt der Follikelpunktion beeinflusste die Entwicklung der gewonnenen KOK bis zur Blastozyste an Tag 8 signifikant. Während sich aus KOK der Gruppen 1-3 durchschnittlich 40% bis zur Blastozyste weiterentwickelten, waren dies in Gruppe 4 58%.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich, dass die präovulatorische Phase die Entwicklungskompetenz boviner Eizellen maßgeblich beeinflusst, während die Kapazitations- und Prämaturationsphase weniger bedeutend erscheinen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in vivo gereifte Eizellen das größte Entwicklungspotential besitzen. Weiterhin scheint ein definierter Zeitpunkt der Follikelaspiration die weitere In vitro-Entwicklung der gewonnenen KOK nicht zu beeinflussen.