

Einfluss der G6PDH-Aktivität in bovinen Oozyten vor der IVM auf die embryonale Entwicklungsfähigkeit nach IVF und Kerntransfer

H. Alm, S. Bhojwani, B. Lührke, R. Pöhland, W. Kanitz, H. Torner

Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie, Forschungsinstitut für die Biologie
landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf

Die Grundlage für die In-vitro-Produktion von Rinderembryonen stellt die In-vitro-Reifung (IVM) von bovinen Oozyten dar. Ausgangsmaterial dafür sind sowohl Oozyten aus Ovarien geschlachteter Rinder als auch Oozyten von lebenden Tieren nach ultraschallgestützter transvaginaler Eizellgewinnung. Ein relativ geringer Teil dieser Oozyten entwickelt sich über einen Zeitraum von 8 Tagen zu Blastozysten. Ein Grund dafür ist sicher die Qualität der Oozyten am Beginn der Reifung. Die bisherigen morphologischen Kriterien der Selektion von Cumulus-Oozyten-Komplexen (COK) sind für eine exakte Charakterisierung der Oozytenqualität bislang unzureichend.

Als ein Marker für die Entwicklungskompetenz von Oozyten wurde der Nachweis der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Aktivität (G6PDH) im Ooplasma von bovinen Oozyten vor Wiederaufnahme der Meiose etabliert. Wachsende Oozyten zeigen eine hohe G6PDH-Aktivität; ausgewachsene Oozyten eine verringerte. G6PDH wird in den Oozyten während der Oogenese synthetisiert und ist ein Schlüsselenzym des Pentosephosphatzyklus. Im Pentosephosphatzyklus wird Ribosephosphat für die Nukleotidsynthese freigesetzt. Vor Wiederaufnahme der Meiose ist die G6PDH-Aktivität in den Oozyten stark verringert und zeigt so den Abschluss zytoplasmatischer Ausreifungsprozesse an.

Das Ziel der Untersuchungen war es mittels Vitalfärbung mit Brilliantkresylblau (BCB) vor der IVM den Anteil an entwicklungs kompetenten COK sowohl für die IVP als auch für den Kerntransfer durch Selektion zu erhöhen.

Die COK wurden nach der Gewinnung in 26 µM BCB/PBS-Lösung für 90 Minuten unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Danach erfolgte die In-vitro-Reifung und –Befruchtung der Oozyten. Um auszuschließen, dass die Inkubation der COK über 90 Minuten in PBS die Oozyten beeinträchtigte, wurde eine 2. Kontrollgruppe, in der die Oozyten in PBS ohne BCB inkubiert wurden, mitgeführt. Am Tag 8 nach IVF wurde der Anteil und die Qualität der Blastozysten innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen bestimmt.

Insgesamt wurden für die IVP 993 und für den Kerntransfer 1108 kompakte COK verwendet. Im Durchschnitt aller Experimente waren ca. 58 % der kompakten COK blau angefärbt (BCB+) und 42% hatten die Farbe nicht aufgenommen (BCB-).

Die spezifische G6PDH-Aktivität war etwa 2,5 X höher in nicht angefärbten Oozyten im Vergleich zu denen, die die Farbe aufgenommen hatten, und 50% höher als in den unselektierten Oozyten (Kontrolle).

24 Stunden nach IVM waren keine signifikanten Unterschiede in der Kernreifung zwischen den beiden Kontrollgruppen und den BCB+ Oozyten zu beobachten (77,1, 77,5 und 72,5 % Metaphase II). Eine signifikante Reduzierung der Metaphase II-Rate (58,1 %) wurde in den BCB- Oozyten beobachtet.

Nach der IVF der Oozyten konnten in allen Gruppen (Kontrolle, BCB+, BCB-) während der ersten 48 Stunden keine Unterschiede in der Furchungsrate beobachtet

werden. Signifikante Unterschiede waren erst am Tag 8 p.IVF zu erkennen, an dem das Stadium der Blastozysten erreicht wird. So war der Anteil an Blastozyten (34,1 %) aus den BCB+ selektierten COK höher im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Die Kontrollgruppe unterschied sich ebenfalls signifikant von der Gruppe der BCB-selektierten COK. Die Anzahl der Zellkerne in den Blastozysten war vergleichbar zwischen der Kontroll- und der BCB+ Gruppe. Die wenigen (n=3) erzielten Blastozysten der BCB- Gruppe hatten signifikant weniger Zellkerne.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach Kerntransfer erzielt. Jedoch waren, anders als nach IVF, Unterschiede schon in der Furchungsrate zu beobachten. Diese war signifikant reduziert in der Gruppe der BCB- selektierten COK (51 vs. 73 und 78 %).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Färbung der COK mit BCB und durch die Selektion vor der IVM der Anteil an entwicklungscompetenten COK erhöht werden kann. Oozyten, die den Vitalfarbstoff im Zytoplasma aufnahmen, wiesen eine verringerte G6PDH-Aktivität und eine höhere Entwicklungskompetenz zur Blastozyste auf.