# Aus der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München Leitung: Prof. Dr. U. Matis

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. J. Braun und Prof. Dr. F. Sinowatz

# Untersuchungen zur Oozytenreifung beim Hund

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sandra Elisabeth Wallner
aus
München

München 2007

# Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

"Der Hund ist die merkwürdigste, vollendetste und nützlichste Eroberung, welche der Mensch jemals gemacht hat"

George de Cuvier (1769-1832)

1 EII	NLEITUNG	8
2 LI	TERATUR	9
2.1	Fortpflanzungsphysiologie der Hündin	ę
2.1.1	Zyklusstadien	Ş
2.1.2	Ovulation, Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung in vivo	10
2.2	Morphologie des Ovars	12
2.2.1	Makroskopie	12
2.2.2	Mikroskopie	12
2.3	Follikulogenese und Oogenese	15
2.3.1	Definition	15
2.3.2	Follikelentstehung und Follikelstadien	15
2.3.3	Regulationsmechanismen der Follikelentwicklung	20
2.3.4	Wiederaufnahme der Meiose	21
2.3	3.4.1 Meiotische Arretierung	22
2.3	3.4.2 Kernreifung	22
2.3	3.4.3 Zytoplasmatische Reifung	23
2.4	In-vitro-Reifung (IVM) von caninen Oozyten	26
2.4.1	Einfluss der Hündinnen	26
2.4.2	Reifungsraten	27
2.4.3	Kulturmedium	28
2.4.4	Kulturbedingungen	29
2.4.5	Kokultursysteme zur In-vitro-Reifung	30
3 M	ATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Untersuchungen am Ovar	32
3.1.1	Untersuchungsmaterial	32

	3.1.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	34
	3.1.3	Immunhistochemie (IHC)	34
	3.1.3	3.1 Protokolle	35
	3.1.3	Vorbehandlungen, Kontrollschnitte und Gegenfärbungen	38
	3.1.4	Dokumentation und Auswertung	40
3.	2 U	ntersuchungen an caninen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung	41
	3.2.1	Untersuchungsmaterial	41
	3.2.2	Oozytengewinnung und Umgang mit den Zellen	43
	3.2.3	In-vitro-Reifung (IVM)	44
	3.2.4	Fixierung der Oozyten	45
	3.2.5	Beurteilung der nativen Oozyten	45
	3.2.6	Kernfärbungen	45
	3.2.7	Immunfluoreszenz (IF)	46
	3.2.8	Glykohistochemische Färbungen	47
	3.2.9	Präparation für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	48
	3.2.10	Dokumentation und Auswertung	49
3.	3 Tı	ransmissionselektronenmikroskopie (TEM)	50
	3.3.1	Vorbereitung der Ovarien	50
	3.3.2	Vorbereitung der Oozyten	50
	3.3.3	Weitere Verarbeitung	50
	3.3.4	Dokumentation und Auswertung	51
4	ERO	SEBNISSE	52
4.	1 U	ntersuchungen am Ovar	52
	4.1.1	Hämatoxylin Eosin (HE)-Färbung	52
	4.1.2	Morphometrische Untersuchungen	58
	4.1.3	Nachweis des Östrogenrezeptors $\alpha$ (ER $\alpha$ )	63
	4.1.4	Nachweis des Östrogenrezeptors $\beta$ (ER $\beta$ )	70
	4.1.5	Nachweis von Ki-67	73

4.1.6	Nachweis der Matrix Metalloproteinase (MMP) -1, -2, und -14 sowie des Tiss	sue Inhibitor of
Matrix	Metalloproteinase (TIMP) -2	75
4.1.7	Ultrastruktur der Primordial-, Primär-, Sekundär-, und Tertiärfollikel	86
4.2 l	Intersuchungen an caninen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung	112
4.2.1	Einflussfaktoren auf die Anzahl gewinnbarer Oozyten	112
4.2.2	Größenparameter der gewonnen Oozyten	118
4.2.3	Nativbeurteilung caniner Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung	121
4.2.4	Kernbeurteilung	127
4.2.5	Nachweis von α-Tubulin	131
4.2.6	Nachweis von Connexin 43	134
4.2.7	Nachweis des Zona pellucida Glykoproteins 3β (ZP3β)	135
4.2.8	Bindungsstellen von Triticum vulgare Agglutinin (WGA) und Glycine max Ag	glutinin (SBA)
		137
4.2.9	Ultrastruktur von caninen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung	140
5 DIS	KUSSION	158
5.1 (	Dozytenreifung im Ovar	158
5.1.1	Morphologische Aspekte des Follikelwachstums im Ovar	158
5.1.2	Immunhistochemische Untersuchungen am Hundeovar	165
5.2	Canine Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung	172
5.2.1	Einflussfaktoren auf die Anzahl gewinnbarer caniner Oozyten	172
5.2.2	Größenverhältnisse durch Slicing gewonnener caniner Oozyten	174
5.2.3	Morphologische Aspekte der Oozytenreifung in vitro	176
5.2.4	Beurteilung der Kernreifung in vitro	181
5.2.5	Immun- und glykohistochemische Aspekte der Oozytenreifung in vitro	183
6 ZU	SAMMENFASSUNG	190
7 <b>9</b> 11	MMARY	103

8	LITERATURÜBERSICHT	194
9	ANHANG	215
9.1	Bilderverzeichnis	215
9.2	Tabellenverzeichnis	220
9.3	Abkürzungsverzeichnis	221
9.4	Verwendete Lösungen und Medien	225
9.5	Danksagung	232
9.6	Lebenslauf	233

# 1 Einleitung

Die Hündin unterscheidet sich in ihrem Reproduktionsgeschehen grundlegend von anderen Haussäugetieren. Trotzdem, oder vielleicht gerade deshalb, sind die Erkenntnisse darüber relativ gering und unvollständig. Ein Zyklusintervall dauert bei der Hündin in der Regel mehrere Monate und ist damit außergewöhnlich lang; die Luteinisierung der Follikelepithelzellen und somit der Anstieg der Progesteronkonzentration beginnen bereits vor der Ovulation. Zudem werden canine Oozyten als primäre Oozyten ovuliert und vollenden die erste Reifeteilung im Eileiter.

Im Gegensatz zum Rind, bei dem die Reifung und Befruchtung von Oozyten und damit die Produktion von Embryonen in vitro kaum mehr Probleme bereitet, liefert bereits die In-vitro-Reifung beim Hund keine befriedigenden Ergebnisse. Trotz vieler Bemühungen sind die Kernreifungsraten selten höher als 20%. Die Ursache dafür ist bis heute nicht geklärt, es wird allerdings vermutet, dass sowohl die spezielle Reproduktionsphysiologie der Hündin als auch inadäquate Reifungsbedingungen in vitro dafür verantwortlich sind. Aus diesem Grund ist es unmöglich mittels In-vitro-Techniken zuverlässig canine Embryonen zu produzieren. Sie werden daher meist aufwändig durch Spülung von Uteri trächtiger Hündinnen gewonnen und finden dann zum Beispiel in der Stammzellforschung Verwendung.

Methoden der assistierten Reproduktion erlangen zunehmend an Bedeutung bei der Erhaltungszucht gefährdeter Wildcaniden, bei der Entwicklung nicht-hormoneller Kontrazeptiva, sowie in der modernen Hundezucht. Vor kurzem gelang es, neben dem Rüden "Snuppy", auch drei Hündinnen zu klonen (Jang et al., 2006). Dies gelang jedoch nur, weil in vivo gereifte Oozyten verwendet wurden, die anschließend in eine Empfängerhündin übertragen werden konnten.

Ebenso ist über die genauen Vorgänge der intraovariellen Oozytenreifung bei der Hündin noch nicht viel bekannt. Es ist nach wie vor unklar in wie weit sich die Reifung der Oozyten in den Follikeln der Hündin von der anderer Tierarten unterscheidet, und, ob hier bereits Merkmale für die Reifungsinsuffizienz der Oozyten in vitro zu finden sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, Reifungsvorgänge von caninen Oozyten sowohl ex vivo am Ovar, als auch an aus Hundeovarien gewonnenen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung anhand morphologischer Kriterien mittels licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden zu charakterisieren.

# 2 Literatur

# 2.1 Fortpflanzungsphysiologie der Hündin

#### 2.1.1 Zyklusstadien

Der Zyklus der Hündin unterscheidet sich deutlich von dem anderer Tierarten. Auffällig ist die lange Zeit der ovariellen Ruhe, die dazu führt, dass ein Zyklusintervall sieben bis acht Monate dauert. Es kann in vier verschiedene Abschnitte eingeteilt werden: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Anöstrus (Feldman and Nelson, 1996). Der Sexualzyklus wird über Hypothalamus, Hypophyse und Ovar gesteuert. Die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus bewirkt die Bildung, Speicherung und Ausschüttung von LH und FSH aus dem Hypophysenvorderlappen. LH und FSH sind am Follikelwachstum und an der Bildung von Androgen und Östrogen im Ovar beteiligt (Meinecke, 2000).

Als Anöstrus wird die zwei bis sieben Monate lange Phase bezeichnet, in der keine äußeren Anzeichen ovarieller Aktivität erkennbar sind und die Hündin somit nicht für Rüden interessant ist (Concannon et al., 1989). Es werden nur geringe Hormonmengen produziert. Im Verlauf des Anöstrus zeigen die Prolaktin- und Wachstumshormonkonzentration sowie die Werte von FSH und LH kurze wellenförmige Anstiege (Kooistra and Okkens, 2001b; Kooistra et al., 1999) aufgrund derer ständig kleinere Follikel angebildet werden. Durch diese Follikelbildung und der damit verbundenen Östrogenproduktion kommt es zu regelmäßigen Schwankungen der Östrogenkonzentration. Die gebildeten Follikel reifen allerdings nicht aus (Feldman and Nelson, 1996).

Der Auslöser für den Beginn des nächsten Zyklusstadiums, dem Proöstrus, ist bis jetzt nicht genau geklärt. Gegen Ende des Anöstrus können Veränderungen einiger Hormone, wie FSH/LH, beobachtet werden, die als mögliche Ursache diskutiert werden (Kooistra and Okkens, 2001a). Klinisch beginnt der Proöstrus mit dem Einsetzen der Vaginalblutung. Er dauert durchschnittlich eine Woche (3-17 Tage) und führt zu verstärktem Follikelwachstum. Aufgrund der sich entwickelnden Follikel werden hohe Mengen an Östradiol gebildet, die das klinische Bild im Proöstrus beherrschen (Concannon et al., 1989; Feldman and Nelson, 1996; Wildt et al., 1979).

Dem Proöstrus folgt der Östrus, der zwischen drei und 21 Tagen (durchschnittlich sieben Tage) dauert. Das wichtigste Verhaltensmerkmal dieses Zyklusabschnittes ist die Duldung des Aufspringens des Rüden und damit die Ermöglichung einer Bedeckung (Concannon et al., 1989; Holst and Phemister, 1971). Nachdem unmittelbar vor der Ovulation sehr hohe Östrogenkonzentrationen erreicht werden, beginnen sie kurz darauf deutlich zu sinken, um

schließlich wieder auf Werte unterhalb der Ausgangskonzentration abzufallen (Badinand et al., 1993; Concannon et al., 1975; Wildt et al., 1979). Am Ende des Proöstrus steigt zuerst FSH (FSH-Peak) und dann auch LH (LH-Peak) auf Höchstwerte an (De Gier et al., 2006). Der LH-Peak stellt den Auslöser für die Ovulation dar, die innerhalb der nächsten 24 bis 48 Stunden erfolgt (Concannon et al., 1975; Hayer et al., 1993; Phemister et al., 1973). Eine Besonderheit bei der Hündin stellt die präovulatorisch beginnende Luteinisierung der Granulosazellen dar, durch die die Progesteronkonzentration bereits während des LH-Anstiegs deutlich ansteigt (Badinand et al., 1993; De Gier et al., 2006).

Der Beginn des Metöstrus ist durch die Ablehnung des Rüden geprägt (Concannon et al., 1989; Feldman and Nelson, 1996). Durch fortschreitende Luteinisierung der Follikelzellen bilden sich in den Follikelhöhlen die Gelbkörper, die große Mengen an Progesteron produzieren (Concannon et al., 1975; Concannon et al., 1989; Wildt et al., 1979). Der Metöstrus dauert, unabhängig von einer eventuellen Gravidität, etwa 60 Tage und endet mit Abfall der Progesteronkonzentration auf Basalkonzentrationen am Ende der Lutealphase (Concannon et al., 1989; Feldman and Nelson, 1996). FSH und LH zeigen kurze pulsatile Anstiege ähnlich denen im Anöstrus (Kooistra et al., 1999). Während des Metöstrus können hohe Prolaktin- (Kooistra and Okkens, 2001b; Reimers et al., 1978) und, bei der trächtigen Hündin, hohe Relaxinwerte gemessen werden (Steinetz et al., 1987).

### 2.1.2 Ovulation, Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung in vivo

Bei der Hündin erfolgt die Ovulation spontan. Kurz vor der Ovulation löst sich die Oozyte von der Follikelwand. Sie befindet sich dann meist frei schwimmend im tiefer gelegenen Anteil des Graafschen Follikels und entweicht im Verlauf der Ovulation zusammen mit der farblosen Follikelflüssigkeit. Abhängig von Rasse und Alter der Hündin schwankt die Anzahl an ovulierten Follikeln zwischen drei und acht (Anderson and Simpson, 1973). Da die Follikel und Corpora lutea auf den Ovarien stets ungefähr das gleiche Entwicklungsstadium aufweisen, wird davon ausgegangen, dass alle Follikel simultan innerhalb von 24 Stunden zur Ovulation kommen (Anderson and Simpson, 1973; Evans and Cole, 1931; Holst and Phemister, 1971; Phemister et al., 1973). Frisch ovulierte canine Oozyten weisen eine Größe von 80-135 µm (ohne Zona pellucida) auf (Anderson and Simpson, 1973; Holst and Phemister, 1971; Reynaud et al., 2005). Dies entspricht etwa der Größe von Oozyten anderer Tierarten. Kurz nach der Ovulation sind die Oozyten von zwei bis drei dichten Granulosazellschichten umgeben, die sie während ihres Aufenthaltes im Eileiter und während der Befruchtung langsam verlieren (Holst and Phemister, 1971; Reynaud et al., 2005).

Hundeoozyten verbleiben mit fünf bis 10 Tagen im Vergleich zu anderen Tierarten (3-4 Tage) ungewöhnlich lange Zeit im Eileiter. Kurz nach der Ovulation werden die ersten Oozyten im oberen und mittleren Bereich des Eileiters gefunden. Sie benötigen weitere drei bis acht Tage, bis sie ins mittlere bis untere Drittel des Eileiters gelangen, wo im Falle einer Befruchtung die weitere Entwicklung der Embryonen stattfindet (Anderson and Simpson, 1973; Evans and Cole, 1931; Holst and Phemister, 1971; Phemister et al., 1973).

Die Oozyten der Hündin werden als primäre Oozyten ovuliert. Die Wiederaufnahme der Meiose und die Polkörperchenbildung erfolgen im Eileiter (Holst and Phemister, 1971; Reynaud et al., 2005; Tsutsui, 1989). Frühestens zwei Tage nach der Ovulation können die ersten Oozyten in der Metaphase II (MII) beobachtet werden. Die Befruchtung der Oozyten findet jedoch meist erst vier Tage nach der Ovulation statt (Reynaud et al., 2005; Tsutsui, 1989), wodurch die Fortführung der in der MII-Stufe arretierten Oozyten bewirkt wird (Rüsse and Sinowatz, 1998). Eine Spermienpenetration in unreife Oozyten ist extrem selten. Die zeitliche Diskrepanz zwischen dem Auftreten von MII-Stadien und der Befruchtung zeigt, dass die Oozyten anscheinend noch einige Zeit im Eileiter benötigen, bevor sie befruchtet werden können.

Bereits kurze Zeit nach der Befruchtung sind Vorkernbildung sowie die ersten Zellteilungen nachweisbar (Reynaud et al., 2005). Einen Tag später können unter den Embryonen acht bis 16-Zellstadien und Morulae (16-23 Zeller) beobachtet werden. Die Embryonen erreichen den Uterus etwa acht Tage nach der Ovulation im 16- bis 32-Zell-Stadium (Anderson, 1927) oder als Blastozyste (Holst and Phemister, 1971; Renton et al., 1991; Reynaud et al., 2005).

# 2.2 Morphologie des Ovars

#### 2.2.1 Makroskopie

Die Ovarien der Hündin liegen in der Bauchhöhle auf Höhe des dritten und vierten Lendenwirbels in unmittelbarer Nähe zum kaudalen Nierenpol (Frewein and Vollmerhaus, 1994; Nickel et al., 2004). Sie sind meist länglich bis oval, leicht abgeplattet und weisen bei einer mittelgroßen Hündin Abmessungen von etwa 12 x 8 x 6 mm auf. Je nach Funktionszustand des Ovars (Follikel oder Gelbkörper) ist die Oberfläche flach oder feinhöckrig. Zwischen einzelnen Hündinnen können jedoch große individuelle Unterschiede sowohl in der Form als auch in der Größe bestehen (Frewein and Vollmerhaus, 1994).

Durch das Eierstockgekröse (Mesovarium) werden die Ovarien mit der dorsalen Bauchwand verbunden. Es enthält Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße, die für die Versorgung des Ovars verantwortlich sind. Zum Bandapparat gehört neben dem kranialen Keimdrüsenband (Lig. suspensorium ovarii), das das Ovar nach kranial am Zwerchfell befestigt, auch das kaudale Keimdrüsenband (Lig. ovarium proprium), durch das das Ovar mit der Uterushornspitze verbunden ist. Die Ovarien selber werden von der Eierstocktasche (Bursa ovarica) bedeckt, in dessen Randfalte die Eileiter (Tubae uterinae) verlaufen. Bei der Hündin ist die Eierstocktasche stark mit Fettgewebe durchsetzt und umschließt einen, im Vergleich zum Ovar, großen Raum, der nur eine schmale Öffnung zur Peritonealhöhle aufweist (Frewein and Vollmerhaus, 1994; Nickel et al., 2004).

#### 2.2.2 Mikroskopie

Das Hundeovar zeigt einen ähnlichen Aufbau wie die Ovarien anderer Tierarten (Tesoriero, 1981). An der Oberfläche wird das Ovar vom Keimdrüsenepithel (Epithelium superficiale ovarii) bedeckt. Es stellt einen modifizierten Peritonealüberzug dar, der aus kubischen bis abgeplatteten Zellen besteht (Frewein and Vollmerhaus, 1994; Heigl, 1998; Mosimann and Kohler, 1990).

Unmittelbar unter dem Oberflächenepithel, im Randbereich des Ovars, liegen Stromazellen und oberflächenparallel verlaufende kollagene Fasern, die die Tunica albuginea, eine schwach ausgebildete Organkapsel, bilden. Am Ovar selbst können das zentral gelegene Mark (Zona vasculosa) und die peripher gelegene Rinde (Zona parenchymatosa) unterschieden werden (Frewein and Vollmerhaus, 1994; Mosimann and Kohler, 1990; Nickel et al., 2004).

Das Mark (Medulla ovarii) enthält ein Netzwerk aus lockerem Bindegewebe mit vielen elastischen Fasern, stark gewundenen und plexusbildenden Arterien, Venen, Lymphgefäßen

sowie Nervenfasern, die das Ovar am Ovar-Hilus erreichen (Frewein and Vollmerhaus, 1994; Mosimann and Kohler, 1990; Tesoriero, 1981). Neben Gelbkörpern in verschiedenen Entwicklungsstufen (Anderson and Simpson, 1973; Tesoriero, 1981) befindet sich im Mark auch das Rete ovarii, ein Hohlraumsystem mit einschichtig hochprismatischer oder kubischer Epithelauskleidung, das ein aus der embryologischen Gonadenentwicklung übrig gebliebenes Homologon des Rete testis darstellt (Mosimann and Kohler, 1990).

Essentieller Bestandteil des Ovars sind die Follikel, die in der Ovarrinde (Cortex ovarii) liegen. Als wichtigste Funktionsgebilde liegen sie zwischen zellreichem Bindegewebe (spinozelluläres Stroma), das in Wirbeln und fischzugartigen Mustern angeordnet ist (Heigl, 1998; Mosimann and Kohler, 1990; Tesoriero, 1981). Primordial-, Primär- und frühe Sekundärfollikel befinden sich dabei in der Randregion, während weiter entwickelte Follikel in tieferen Regionen der Ovarrinde lokalisiert sind (Tesoriero, 1981).

Vor allem bei jungen Hündinnen können kleine Gangsysteme in der Tunica albuginea nachgewiesen werden, die durch Einwärtsproliferation des Oberflächenepithels entstehen (Anderson and Simpson, 1973; Heigl, 1998). Davon können große Einstülpungen des Oberflächenepithels unterschieden werden, die vor allem im Metöstrus auftreten und tiefer in das Ovarstroma reichen. Die Menge und Komplexität dieser Gänge steigt mit zunehmendem Alter der Hündin an (Anderson and Simpson, 1973).

Eine Besonderheit im Ovar der Hündin besteht im häufigen Auftreten von mehreren Oozyten in einem Follikel (polyovulatorische Follikel). Obwohl polyovulatorische Follikel in allen Stadien der Follikelreifung nachgewiesen werden können (Heigl, 1998; McDougall et al., 1997) treten sie hauptsächlich in wachsenden Follikeln bei jüngeren Hündinnen auf (Telfer and Gosden, 1987). Die meisten polyovulatorischen Follikel enthalten zwei bis vier Oozyten (Heigl, 1998; McDougall et al., 1997), in einem Fall wurden in einem Follikel einer präpubertalen Hündin aber schon bis zu 17 Oozyten gefunden (McDougall et al., 1997).

In allen Stadien der Follikelreifung kann die Degeneration von Follikeln nachgewiesen werden (Anderson and Simpson, 1973; Heigl, 1998). Sie erfolgt hauptsächlich bei der Bildung der Primordialfollikel kurz nach der Geburt (Schotterer, 1928), zwischen der Pubertät und der ersten Läufigkeit, sowie nach großen hormonellen Veränderungen wie der Trächtigkeit (Anderson and Simpson, 1973; Mosimann and Kohler, 1990). In frühen Follikelstadien zeigen sich Anzeichen für Degeneration hauptsächlich an der Oozyte. Diese schrumpft, das Zytoplasma und der Kern färben sich zunehmend dunkel. In wachsenden Follikeln sind entweder die Oozyte oder die Granulosazellen zuerst vom Zelluntergang betroffen. Das Zytoplasma färbt sich ungleich, wird später vakuolisiert und flockig, die Oozyte schrumpft und der Kern verlagert sich an den Rand. Zu den Kernveränderungen zählen

unter anderem Chromatolysis, Verklumpung des Chromatins sowie Einfaltung der Kernmembran (Anderson and Simpson, 1973). Von den Granulosazellen verbleiben meist nur einige pyknotische Kerne oder Chromatinfragmente (Anderson and Simpson, 1973; Telfer and Gosden, 1987). Veränderungen an der Zona pellucida zeigen sich in ungleicher Dicke (Anderson and Simpson, 1973; Mosimann and Kohler, 1990; Tesoriero, 1981). Im Gegensatz zu den kleinen Follikeln, bei denen erste Anzeichen der Atresie zuerst in der Oozyte nachgewiesen werden können, beginnen die Veränderungen in Tertiärfollikeln zuerst in der wandständigen Granulosa. Auf die Abnahme und Zersetzung von Granulosazellen folgen die Schrumpfung und der Kollaps des Follikels sowie Kernveränderungen an der Oozyte. Die gesamte Zelle erscheint vakuolisiert und schwillt an. Gleichzeitig verdickt sich die Zona pellucida. Einige der Granulosazellen persistieren, vermehren sich und bilden gerade oder gewundene Stränge im Ovarstroma (Anderson and Simpson, 1973).

# 2.3 Follikulogenese und Oogenese

#### 2.3.1 Definition

Unter Oogenese versteht man die Vermehrung und Ausbildung der Keimzellen von der Primordialkeimzelle bis zur befruchtungsfähigen Oozyte. Sie beinhaltet die beiden Reifeteilungen der Meiose und endet mit der Bildung einer reifen Oozyte sowie drei Polkörperchen (Frewein and Vollmerhaus, 1994). Gleichzeitig mit dem Wachstum der Oozyte kommt es zu Wachstums- und Differenzierungsvorgängen der Follikelzellen (Follikulogenese). Sie führt zur Bildung von Primär-, Sekundär-, und Tertiärfollikeln (Drummond, 2005). Der Gesamtfollikelbestand kann somit in eine ruhende (Primordialfollikel) und eine wachsende Follikelpopulation (Primär-, Sekundär-, und Tertiärfollikel) eingeteilt werden (Eppig, 2001).

Ein Schema zur Follikulogenese findet sich in Bild 1. Die Größenverhältnisse bei caninen Follikeln sind in Tab. 1 zusammengefasst.

#### 2.3.2 Follikelentstehung und Follikelstadien

Der Ursprung der Primordialkeimzellen (Oogonien) liegt frühembryonal in undifferenzierten Epiblastzellen, die in das Entoderm des Dottersackes wandern, proliferieren und schließlich über den primitiven Darm und das dorsale Mesenterium in die Anlage des Ovars (Keimleiste) einwandern (Anderson et al., 2000; Chuva de Sousa Lopes et al., 2004; Freeman, 2003; Lawson et al., 1999). Nachdem diese Primordialkeimzellen in den Keimleisten angekommen sind, beginnen sie sich zu differenzieren und zu teilen (Wartenberg et al., 1998), um danach durch unvollständige Teilung über Interzellularbrücken miteinander verbunden zu bleiben und damit die Keimballen (Ovogonien) zu bilden (Rüsse and Sinowatz, 1998). Diese beginnen mit einer tierartlich festgelegten Anzahl an mitotischen Teilungen und treten dann in die Prophase der ersten Reifeteilung (Meiose I) ein (Wartenberg et al., 1998). Sie durchlaufen die einzelnen Abschnitte der Prophase (Leptotän, Zygotän, Pachytän) und verharren im Diplotänstadium, in welchem sie als primäre Ovozyten in Primordialfollikeln bis zur Reifung der befruchtungsfähigen Oozyte gespeichert werden (Rüsse and Sinowatz, 1998). Der Beginn des Eintritts in die Prophase der Meiose I läuft in tierartlich unterschiedlichen Zeiträumen ab. Im Gegensatz zum Rind und zum Menschen, bei denen bereits zum Zeitpunkt der Geburt alle Primordialfollikel im Ovar vorliegen, sind bei der Hündin erst im Alter von 17 Tagen nach der Geburt fast alle Oogonien verschwunden und in die Prophase der Meiose I eingetreten (Anderson and Simpson, 1973). Die Anzahl an Oozyten nimmt in dieser Zeit rasch zu. Im Ovar der Hündin wird die höchste Oozytenanzahl mit etwa 700000 kurz nach der Geburt erreicht. Bis zur Pubertät ist ein Teil der Keimzellen

jedoch vom Zelluntergang betroffen, so dass sich ihre Anzahl bis zum Beginn der Geschlechtsreife auf 350000 reduziert (Schotterer, 1928).

Tab. 1 Größenverhältnisse bei caninen Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien

Entwicklungsstadium der Follikel	Durchmesser der Follikel	Durchmesser der Oozyten (ohne ZP)	Durchmesser des GV	Dicke der ZP	Literatur	
Primordialfollikel	ca. 45 µm	25-38 µm	15-23 µm	0 μm	(Anderson and Simpson, 1973; Barber et al., 2000; Telfer and Gosden, 1987)	
Primärfollikel	ca. 50 µm	30-35 μm	k.A.	1-4 µm	(Anderson and Simpson, 1973; Barber et al., 2000; Telfer and Gosden, 1987)	
Sekundärfollikel	ca. 150 µm	35-110 μm	k.A.	ca. 7 µm	(Barber et al., 2000; Telfer and Gosden, 1987)	
Tertiärfollikel	350-1000 μm	ca. 100 µm	ca. 40 µm	5-10 μm	(Anderson and Simpson, 1973; Barber et al., 2000)	
Graafscher Follikel	3-5 mm	127-135 µm	k.A.	k.A.	(Anderson and Simpson, 1973)	

GV = "germinal vesicle", ZP = Zona pellucida, k.A. = keine Angaben

Primordialfollikel liegen bei Fleischfressern einzeln oder gruppenweise in der Ovarrinde unmittelbar unter dem Keimdrüsenepithel (Anderson and Simpson, 1973; Heigl, 1998; Telfer and Gosden, 1987). Die Oozyten der Primordialfollikel sind rund oder oval und werden von einem Follikelepithel umgeben, das in diesem Stadium aus einer Lage mit wenigen, abgeplatteten Follikelzellen besteht. Der Kern der Oozyten ist groß, liegt zentral und enthält ein bis zwei Nukleoli (Tesoriero, 1981). Im Zytoplasma (Ooplasma) findet sich eine geringe Anzahl an Organellen. Auffällig sind vor allem Mitochondrien, vesikuläre Elemente, glattes endoplasmatisches Retikulum sowie kleine Golgi-Körperchen (Lucci et al., 2001; Rüsse, 1978; Tesoriero, 1981; Van Wezel and Rodgers, 1996; Zamboni, 1974). Die Oozytenoberfläche bildet vereinzelte Mikrovilli, sowie einige desmosomenähnliche Verbindungen zu den umgebenden Follikelzellen aus (Van Wezel and Rodgers, 1996;

Zamboni, 1974). Primordialfollikel weisen eine deutliche Basalmembran auf, die fest mit dem umgebenden Stroma verbunden ist (Anderson and Simpson, 1973).

Primärfollikel sind durch die wachsende Oozyte und die beginnende Mitose der Follikelzellen gekennzeichnet. Dadurch wird das Follikelepithel einschichtig-isoprismatisch und bildet einen durchgehenden Ring um die Oozyte (Anderson and Simpson, 1973; Lucci et al., 2001; Zamboni, 1974). Bei der Hündin entstehen die ersten Primärfollikel im Ovar mit Beginn der fünften Lebenswoche (Frewein and Vollmerhaus, 1994). Die Ultrastruktur der Oozyten ähnelt der der Zellen in Primordialfollikeln. So stellt sich das Zytoplasma immer noch relativ organellenarm dar (Lucci et al., 2001). Ab einem Oozytendurchmesser von 60 µm beginnt sich die Zona pellucida als feine, körnige Substanz nahe der Oozytenoberfläche und zwischen den Follikelzellen zu bilden (Anderson and Simpson, 1973; Tesoriero, 1984). Dadurch entwickeln die Granulosazellen Fortsätze, die durch die Zona pellucida zur Oozyte reichen und in bulbus- bis scheibenförmigen Erweiterungen an der Oozytenoberfläche enden (Rüsse, 1978; Tesoriero, 1981; Zamboni, 1974). An den Kontaktstellen der Fortsätze zur Plasmamembran der Oozyte bilden sich Mikrovilli, "gap junctions", "intermediate junctions", sowie Desmosomen aus (Lucci et al., 2001; Macchiarelli et al., 1992; Rüsse, 1978; Zamboni, 1974).

Wird das Follikelepithel durch zahlreiche Mitosen mehrschichtig, so spricht man vom Sekundärfollikel (Frewein and Vollmerhaus, 1994; Lucci et al., 2001). Die ersten Follikel in diesem Entwicklungsstadium sind bei der Hündin ab der 15. Lebenswoche nachweisbar (Frewein and Vollmerhaus, 1994). Mit der Entwicklung zum Sekundärfollikel nimmt der Follikeldurchmesser deutlich zu und die Follikel werden tiefer in die Rinde des Ovars verlagert (Heigl, 1998; Tesoriero, 1981). Die Epithelzellen, die den Follikel umgeben, werden dabei polyedrisch und zytoplasmaärmer, erscheinen dadurch dunkler, und werden ab diesem Stadium als Stratum granulosum (Granulosa) bezeichnet (Mosimann and Kohler, 1990). Der Kern der Oozyten liegt nun exzentrisch (Lucci et al., 2001; Zamboni, 1974). Wachsende Oozyten von Hund und Maus sind durch die starke Vermehrung von Mitochondrien im Ooplasma gekennzeichnet. Die Zellen enthalten zudem vermehrt Stränge oder Lamellen an glattem endoplasmatischem Retikulum (Tesoriero, 1981; Wassarman and Josefowicz, 1978). Auffälliger Bestandteil der Hundeoozyte ist das Auftreten von Lipiddotterkörperchen im Zytoplasma der Oozyte, deren Menge mit zunehmender Reifung stetig zunimmt (Tesoriero, 1981; Tesoriero, 1982). Ausgehend von Golgi-Komplexen bilden sich bei Rind, Schaf, Hund und Affe kleine Golgi-Körperchen, die im späten Sekundärfollikel an der Bildung von kortikalen Granula beteiligt sind (Rüsse, 1978; Tesoriero, 1981; Zamboni, 1974). Im weiteren Verlauf des Wachstums nimmt die innerste Schicht der Granulosazellen hochprismatische Form an und bildet so die strahlenförmige Corona radiata. Der Follikel ist

deutlich durch die Basalmembran vom zirkulär angeordneten Stromagewebe abgegrenzt und die Zona pellucida zeigt sich als schmaler Ring um die Oozyte (Heigl, 1998). Im Gegensatz zu Beobachtungen bei der Ziege (Lucci et al., 2001), können beim Hund in diesem Entwicklungsstadium die Theka externa und interna noch nicht voneinander unterschieden werden (Heigl, 1998).

Die Ausbildung von Tertiärfollikeln (antrale Follikel) beginnt bei der Hündin im Alter von etwa sechs Monaten (Anderson and Simpson, 1973; Frewein and Vollmerhaus, 1994). Tertiärfollikel sind durch die Ausbildung eines flüssigkeitsgefüllten Hohlraumes (Antrum folliculi) gekennzeichnet, der durch die Vereinigung von flüssigkeitsgefüllten Spalten zwischen den Follikelzellen entsteht und mit Liquor folliculi angefüllt ist (Anderson and Simpson, 1973; Tesoriero, 1981; Zamboni, 1974). Die Oozyte des Tertiärfollikels liegt im Cumulus oophorus, einem Granulosazellhaufen, der von der wandständigen Granulosazellschicht mehr oder weniger abgesetzt ist und ins Antrum folliculi vorragt (Heigl, 1998; Mosimann and Kohler, 1990). Durch diesen Schritt werden die Follikelzellen in zwei Gruppen aufgeteilt, in die Zellen des Cumulus oophorus und in die Zellen der den Follikel auskleidenden Granulosa (Zamboni, 1974). Zu diesem Zeitpunkt ist die Oozyte stark gewachsen, die Zona pellucida ist deutlich verdickt (Anderson and Simpson, 1973) und die Zytoplasmaausläufer der Corona radiata-Zellen durch die Zona pellucida zur Oozyte sind gut zu erkennen (Heigl, 1998). In der Wand der Follikel lassen sich die der Basalmembran aufliegenden hochprismatischen Basalzellen von den dem Antrum zugewandten polygonalen Intermediärzellen unterscheiden (Heigl, 1998). Die Stromazellen, die den Follikel umgeben, bilden eine ausgeprägte bindegewebige Hüllschicht (Theka folliculi), an der eine innere Schicht (Theka interna) und eine äußere Schicht (Theka externa) unterschieden werden können (Frewein and Vollmerhaus, 1994). Im Gegensatz zur Theka interna, die epitheloide Zellen aufweist, enthält die Theka externa vor allem kollagene Fasern und Fibrozyten (Heigl, 1998). Die Theka interna ist an der Steroidhormonsynthese beteiligt, die Theka externa verankert den Follikel mit ihren konzentrisch angeordneten Fibroblasten und kollagenen Fasern im Rindenstroma (Frewein and Vollmerhaus, 1994).

Sprungreife Tertiärfollikel entwickeln sich von der Pubertät an und werden kurz vor der Ovulation als Graafsche Follikel bezeichnet (Frewein and Vollmerhaus, 1994; Mosimann and Kohler, 1990). Durch starke Blutgefäßbildung und gleichzeitige Permeabilitätserhöhung nimmt der Umfang des Follikels durch Druckerhöhung im Inneren stark zu und die wandständige Granulosazellschicht wird relativ schmal (Mosimann and Kohler, 1990). Im Gegensatz zur Theka interna ist die Theka externa schwach entwickelt (Anderson and Simpson, 1973; Heigl, 1998).

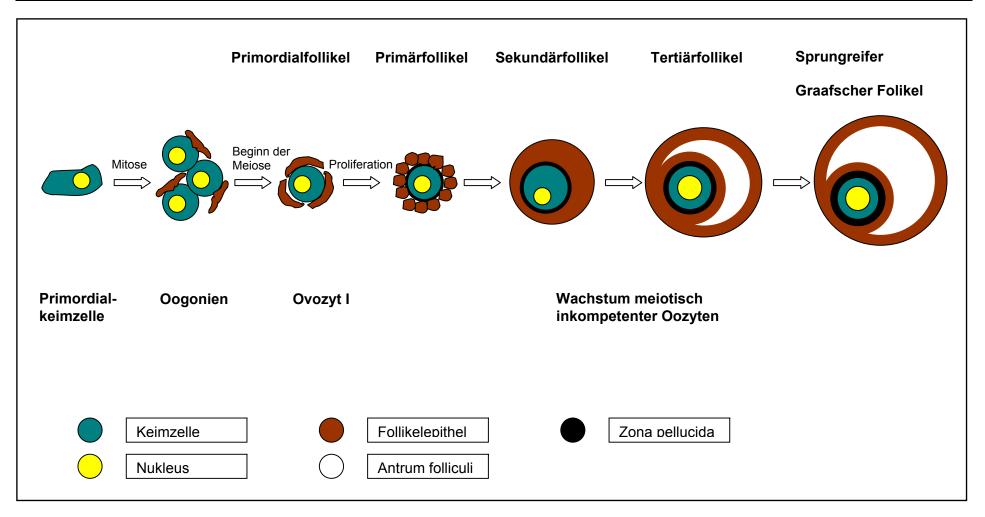


Bild 1 Follikulogenese und Oogenese, schematisch, Entwicklung von der Primordialkeimzelle bis zum sprungreifen Graafschen Follikel, nach Picton et al., 1998

Die Keimzellen vermehren sich zunächst durch mitotische Teilungen, um dann in die Prophase der Meiose einzutreten und bei der Hündin bis kurz nach der Ovulation in dieser arretiert zu bleiben. Der Follikel und die Oozyte sind durch Größenwachstum geprägt. Ab dem Primärfollikel bildet sich die Zona pellucida. Die Bildung des Antrums charakterisiert die Bildung des Tertiärfollikels.

#### 2.3.3 Regulationsmechanismen der Follikelentwicklung

An der Regulation der Follikelentwicklung sind sowohl endokrine als auch para-/autokrine Mechanismen beteiligt. Die Oozyte und die Granulosazellen spielen dabei eine wichtige Rolle. Sowohl die Oozyte als auch die Granulosazellen produzieren Stoffe die für Wachstum und Differenzierung notwendig sind und sich gegenseitig regulieren und beeinflussen. Der Stoffaustausch erfolgt dabei hauptsächlich über Zell-Zell-Verbindungen wie "gap junctions" oder Desmosomen.

Es zeigte sich, dass Primordialfollikel, die näher am Zentrum des Ovars liegen, zuerst zu wachsen beginnen (Durlinger et al., 2002). Ursache hierfür könnte die bessere Blutgefäßversorgung in zentraleren Bereichen und die damit gewährleistete bessere Nährstoffversorgung der Keimzellen sein. Da wachsende Follikel mit zunehmender Größe und Ausbildung der Theka folliculi besser mit Blutgefäßen versorgt werden, wird der Vaskularisation eine wichtige Rolle bei der Nährstoff- und Hormonversorgung der reifenden Follikel eingeräumt (Shimizu, 2006). Es wird auch die Bedeutung der Innervation sowie die Wirkung von Neurotransmittern und Neurotropinen auf die Follikelentwicklung diskutiert (Barboni et al., 2002; D`Albora et al., 2002; Dissen et al., 2002).

Bereits in der Phase der Primordialkeimzellbildung können Mitglieder der TGF-β-Familie im Follikel nachgewiesen werden. Die TGF-β-Familie enthält verschiede Faktoren (Inhibin, Aktivin, BMP, GDF, AMH, TGFβ) die für die Proliferation und die Differenzierung des Gewebes notwendig sind und eine wichtige Rolle bei der Bildung, Wanderung, Aktivierung und weiteren Follikelentwicklung spielen (Findlay et al., 2002; Van den Hurk and Zhao, 2005). Neben dem Protein-Tyrosin Kinase Rezeptor Kit und seinem Liganden (Kit Ligand, KL) (Horie et al., 1991; Pesce et al., 1997; Reynaud et al., 2001) ist auch FIGα (Huntriss et al., 2002; Liang et al., 1997; Soyal et al., 2000), ein oozytenspezifischer Transkriptionsfaktor, essentiell an der Bildung und Entwicklung von Follikeln beteiligt. Die vollständige Follikelentwicklung ist jedoch von einer Vielzahl an weiteren Faktoren abhängig (siehe Rev. (Van den Hurk and Zhao, 2005))

Die Bildung der Primordialfollikel, die Aktivierung und das frühe Follikelwachstum erfolgt unabhängig von den Gonadotropinen FSH und LH. Erst ab der Stufe der Sekundärfollikel werden die Follikel sensibel für die Wirkungen dieser beiden Hormone (Kumar, 2005). Die endokrine Steuerung der Follikelreifung erfolgt dann über die Granulosa- und Thekazellen. Die Granulosazellen weisen FSH-Rezeptoren, die Thekazellen LH-Rezeptoren auf. LH aus dem Hypophysenvorderlappen stimuliert in den Thekazellen die Synthese von Androgenen, die in den Granulosazellen, FSH-vermittelt, zu Östrogen aromatisiert werden (Drummond, 2006; Van den Hurk and Zhao, 2005).

Obwohl bei Mäusen und Pavianen eine essentielle Rolle von Östrogen bei der Bildung der Primordialfollikel nachgewiesen wurde, ist Östrogen bis zur Stufe der Sekundärfollikel eher von untergeordneter Rolle (Britt et al., 2004; Zachos et al., 2002). Mit der Sensibilisierung der Sekundärfollikel für FSH und LH steigt die Östrogenkonzentration erstmals im späten Sekundärfollikel auffällig an, um die höchsten Konzentrationen in Tertiärfollikeln zu erreichen (Drummond, 2006). Das gebildete Östrogen fördert die Differenzierung und das Follikelwachstum sowie die Ausbildung von LH-Rezeptoren an den Granulosazellen in der späten Follikelphase (Burns et al., 2001; Drummond, 2006). Während des LH-Peaks binden die freigesetzten großen Mengen an LH an die Rezeptoren der Granulosa- und Thekazellen und führen so über die Aktivierung von Enzymsystemen zur Luteinisierung der Zellen und der Induktion der Ovulation (Meinecke, 2000).

Die Bildung von Progesteronrezeptoren in den Granulosazellen wird durch den präovulatorischen LH-Peak induziert. Progesteron führt auf diesem Wege zur Hemmung der Granulosazellproliferation und damit zur Verringerung der Östrogenproduktion in den Granulosazellen (Drummond, 2006).

Aktivin, Inhibin und Follistatin werden zunehmend in den Granulosazellen von reifenden Follikeln gebildet und sind in erheblichem Maße an der Regulation der Follikelentwicklung beteiligt (Findlay, 1993; Li et al., 1997). Aktivin gehört dabei zu den Stimulatoren des Wachstums, der Differenzierung und der Aufrechterhaltung des Follikelstatus (Burns et al., 2001; Drummond, 2006; Findlay, 1993; Liu et al., 1998b), während Inhibin (Findlay, 1993) und Follistatin (Findlay, 1993; Li et al., 1997; Otsuka et al., 2001) die Follikelentwicklung hemmen.

Die Ovulation wird vor allem durch Prostaglandine gesteuert, deren Anstieg durch den LH-Peak induziert wird (Sirois et al., 2004) und die von den interstitiellen Zellen unter Beteiligung der Oozyte gebildet werden (Eppig, 2001). Neben Prostaglandinen trägt das Neurotropin NGF zur Ovulationskaskade bei (Dissen et al., 2002). Eine Rolle von Progesteron im Ablauf der Ovulation der Oozyte und bei der Luteinisierung der Granulosazellen wurde beschrieben (Drummond, 2006).

#### 2.3.4 Wiederaufnahme der Meiose

Die Reifung der Oozyte kann in die zytoplasmatische Reifung und die Kernreifung unterteilt werden. Im Gegensatz zum Rind, bei dem die Vorgänge der Oozytenreifung genau untersucht wurden, sind die Kenntnisse über die Oozytenreifung des Hundes gering. Beim Rind und beim Menschen konnten Reifungsvorgänge nachgewiesen werden, die in vivo und in vitro ähnlich waren (Hyttel et al., 1986; Kruip et al., 1983; Sundström et al., 1985).

#### 2.3.4.1 Meiotische Arretierung

Hundeoozyten sind bis über die Ovulation hinaus im Diplotän der Meiose I arretiert. Als Ursachen für diese so genannte meiotische Arretierung werden verschiedenen Faktoren vermutet, die die Fortführung der Meiose hemmen.

Es wird davon ausgegangen, dass hohe cAMP-Konzentrationen für die meiotische Arretierung verantwortlich sind (Luvoni and Chigioni, 2006). Durch den LH-Peak erfolgt zunächst ein Anstieg von cAMP in den Granulosazellen, welches in der Lage ist, verschiedene Enzymsysteme zu aktivieren, die die Oozyten in der meiotischen Ruhephase verharren lassen (Su et al., 2003). Kurz bevor die Meiose wieder aufgenommen wird, erfolgt die Unterbrechung der "gap junctions" zwischen Cumuluszellen und Oozyten durch die Bildung des perivitellinen Spaltes. Dadurch wird die cAMP Versorgung durch die Cumuluszellen unterbrochen (Sela-Abramovich et al., 2005). Das folgende Absinken der cAMP Konzentration in den Oozyten führt zur Inaktivierung der cAMP-abhängigen Protein Kinase A, reduziert die hemmenden Eigenschaften von Purinen auf die Beibehaltung der meiotischen Arretierung und ermöglicht die Bildung von reifungsfördernden Faktoren wie dem MPF (maturation promoting factor) (Picton et al., 1998).

#### 2.3.4.2 Kernreifung

Der Nachweis des Kernreifestadiums gestaltet sich bei Hundeoozyten aufgrund des stark lipidhaltigen Zytoplasmas schwierig. Ohne Färbung der DNA ist es fast unmöglich den Zustand des Kernes zu beurteilen (Reynaud et al., 2005). Routinemäßig werden die Färbung mit Aceto-Orcein (Hewitt and England, 1997; Hewitt et al., 1998; Hishinuma et al., 2004; Luvoni et al., 2003) sowie mit Fluoreszenzfarbstoffen wie zum Beispiel Propidiumjodid oder Hoechst (Hewitt et al., 1998; Oh et al., 2005; Otoi et al., 2004; Saint-Dizier et al., 2001) durchgeführt. Daneben wurden auch molekularbiologische Methoden eingesetzt (Nickson et al., 1993). Beim Hund befinden sich die Kerne der Oozyten kurz nach der Ovulation im Keimbläschenstadium ("germinal vesicle"-Stadium, GV) (Reynaud et al., 2005). Der Kern liegt in den meisten Oozyten peripher (Anderson and Simpson, 1973; Holst and Phemister, 1971; Reynaud et al., 2005), die Kernmembran ist ausgebreitet und umschließt einen relativ großen Raum von 20 µm (Reynaud et al., 2005; Saint-Dizier et al., 2004). Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen beim Rind und beim Menschen überein, bei denen die Kerne der unreifen Oozyten als GV mit mehr oder weniger wellenförmiger Membran peripher im Zytoplasma liegen (Fair et al., 1996; Kruip et al., 1983; Sundström et al., 1985). Der Kern der frisch ovulierten Hundeoozyte enthält meist ein bis zwei Nukleoli (Saint-Dizier et al., 2004). Mit Beginn der Wiederaufnahme der Meiose bildet sich im Bereich des kondensierten Chromatins ein Tubulin-Netzwerk, dessen Aufgabe es ist die korrekte

Aneinanderlagerung der Chromosomen während der Meiose zu gewährleisten (Stryer, 1999). Die Auflösung der Kernmembran ("germinal vesicle breakdown", GVBD) ist das erste Anzeichen für die beginnende Fortführung der Meiose. In diesem Stadium bildet sich ein deutliches Netzwerk an Mikrotubuli im gesamten Zytoplasma, es entsteht aber auch eine sternförmige Ansammlung im Bereich des kondensierten Chromatins (Saint-Dizier et al., 2004). Mit dem Eintritt in die Metaphase I (MI) zeigt sich beim Rind deutliche Chromatinkondensation in der Oozyte (Hyttel et al., 1986; Kruip et al., 1983). Es folgt die Trennung der homologen Chromosomen, die Bildung des ersten Polkörperchens und kurz darauf, unter Auslassung der Interphase, der Eintritt in die zweite Reifeteilung der Meiose (MII). In diesem Stadium verharrt die Oozyte, bis die weitere Entwicklung durch das Eindringen eines Spermiums induziert wird (Rüsse and Sinowatz, 1998). Um das Chromatin und um das Polkörperchen bildet sich eine weitere Spindel aus einheitlich ausgerichteten Mikrotubuli (Saint-Dizier et al., 2004; Szöllösi et al., 1986). Die beiden Schwesterchromatiden werden jeweils getrennt und bilden so zwei weitere Polkörperchen (Rüsse and Sinowatz, 1998).

#### 2.3.4.3 Zytoplasmatische Reifung

Die Induktion der Wiederaufnahme der Meiose erfolgt über eine Enzymkaskade an der verschiedene Kinasen beteiligt sind, deren Anstieg als Indikator für die Reifung angesehen wird (Bodart et al., 2005; Lefebvre et al., 2002). Die Bedeutung dieses Enzymsystems wurde erstmals von Ferell (1991) in Xenopusoozyten nachgewiesen. Eines der Schlüsselenzyme stellt dabei die MAPK (mitogen-activated protein kinase) dar. Die Aktivierung dieses Enzyms erfolgt durch zweifache Phosphorylierung und wird durch eine Kaskade verschiedener Kinasen und Signalmolekülen induziert. Dadurch werden Signale vermittelt, die intrazellulär Einfluss auf Zellzyklus und Zellproliferation besitzen. Zu den weiteren essentiellen Kinasen, die an der Reifung der Oozyten beteiligt sind, gehört der MPF (maturation promoting factor), der aus zwei Untereinheiten, p34CDC2 und Cyclin B, besteht (Sun et al., 1999). Inzwischen wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung der MAPK in den Cumuluszellen und nicht in der Oozyte für die Auslösung des GVBD verantwortlich ist (Liang et al., 2005; Sela-Abramovich et al., 2005; Su et al., 2003). Untersuchungen bei verschiedenen Tierarten zeigen, dass die einzelnen Kinasen der Enzymkaskade von einander abhängen, sich gegenseitig beeinflussen (Josefsberg et al., 2003; Marangos and Carroll, 2004; Ohashi et al., 2003; Takakura et al., 2005) und, dass Defekte der Substrate des Kinaseweges zu Spindeldefekten, Fehlern bei der Kondensierung des Chromatins (Bodart et al., 2005; Fan et al., 2003; Lefebvre et al., 2002; Ohashi et al., 2003) sowie einer erhöhten Parthenogeneserate führen (Josefsberg et al., 2003; Takakura et al., 2005).

Im GV-Stadium kann im Kern nur die nicht-phosphorylierte und damit inaktive Form der MAPK nachgewiesen werden (Villa-Diaz and Miyano, 2004). Ein deutliche Anstieg der MAPK-Aktivität findet in Schweineoozyten erstmals während des GVBDs statt (Liang et al., 2005; Villa-Diaz and Miyano, 2004). Die Aktivierung erfolgt ein bis drei Stunden nach Beginn des GVBDs. Ähnlich der MAPK ist die MPF Konzentration im GV gering. Sie steigt ebenfalls nach Beginn des GVBD an und erreicht Höchstwerte in der MI und MII. Im Gegensatz zu MAPK, die nach dem GVBD gleich bleibend hohe Werte zeigt, sinkt die MPF-Aktivität zwischen MI und MII kurz ab (Sun et al., 1999). Die gleich bleibende Aktivität der MAPK während MI und MII weist auf ihre Bedeutung für den Übergang von MI zu MII hin (Villa-Diaz and Miyano, 2004). In der einzigen Studie, die beim Hund bis jetzt zu diesem Thema durchgeführt wurde zeigte der MPF und die MAPK ähnliche Werte wie bei anderen Tierarten, mit niedrigen Werten im GV und GVBD sowie signifikant erhöhten Werten bei MI-II. Die Vermittlungssignale werden beim Hund ebenso auf eine Substratphosphorylierung zurückgeführt (Saint-Dizier et al., 2004).

Im weiteren Verlauf der Oozytenreifung erfolgen charakteristische Umorganisationen des Zytoplasmas. Im GV der reifen Rinder- und Menschenoozyte sind die Mitochondrien ungeordnet in der Oozyte verteilt, sie bilden aber in der Peripherie der Zelle kleine Gruppen. Kortikale Granula sammeln sich am Rand der Oozyte in Aggregaten (Kruip et al., 1983; Sundström et al., 1985), finden sich aber auch im Zytoplasma verteilt (Sundström et al., 1985). Die Fortsätze der Cumuluszellen durch die Zona pellucida bilden zahlreiche "gap junctions" an den Kontaktstellen mit der Oozyte (Kruip et al., 1983). Zum Zeitpunkt des GVBD beginnt sich der Perivitellinspalt als "flockiges" Material zu bilden. Dadurch kommt es zum Kontaktverlust zwischen Cumuluszellen und Oozyte und zu einer deutlichen Reduktion der "gap junctions" (Hyttel et al., 1986; Kruip et al., 1983). Die Mitochondrien beginnen sich einzeln am Rand des Zytoplasmas zu verteilen, wo sie später Gruppen bilden und sich dann mit Fetttröpfchen und Teilen des glatten endoplasmatischen Retikulums zusammen lagern. Gleichzeitig mit der Kondensierung des Chromatins (MI) erfolgt eine Neugruppierung von Mitochondrien, Fett und glattem endoplasmatischem Retikulum. Die Fetttröpfchen werden größer und zahlreicher. Kortikale Granula bilden Gruppen, die nun näher an der Plasmamembran liegen (Kruip et al., 1983). Mit Ausschleusung des ersten Polkörperchens (MII) verteilen sich die Mitochondrien und die meisten anderen Zellorganellen wieder ins Zentrum der Zelle (Kruip et al., 1983; Szöllösi et al., 1986). Die relativ organellenfreie kortikale Region enthält nun kortikale Granula direkt im Anschluss an die Plasmamembran (Hyttel et al., 1986; Kruip et al., 1983; Szöllösi et al., 1986). Die Anhäufung von glattem endoplasmatischem Retikulum wird von Kruip et al. (1983) als eines der späteren Anzeichen der Reifung angesehen. Kortikale Granula werden nach der Befruchtung freigesetzt und

besitzen eine Bedeutung bei der Verhinderung der Polyspermie (Hyttel et al., 1989; Szöllösi et al., 1986).

Die Wiederaufnahme der Meiose kann neben dem ultrastrukturellen Nachweis auch über biochemische Parameter charakterisiert werden. Beim Menschen wurde von El Mouatassim (1999) eine reifestadienspezifische Expression bestimmter Gene beschrieben, die für verschiedene Enzymsysteme verantwortlich sind. Viele dieser Enzyme sind am Schutz der Zelle vor oxidativen Schäden beteiligt. So kann ein Anstieg der Markerenzyme Cu-Zn-Superoxid-Dismutase, der Glutathion-Peroxidase und der Mn-Superoxid-Dismutase als Indikator für die zytoplasmatische Reifung gesehen werden. Hierbei gibt es allerdings speziesspezifische Unterschiede (Maus-Mensch) (El Mouatassim et al., 1999). Eine erhöhte Glutathion-Konzentration (Luvoni and Chigioni, 2006) sowie ein Anstieg der Glykolyse und der Oxidation von Glukose, Glutamin, Palmitat und Laktat (Spindler et al., 2000) in der Oozyte können bei der Katze gleichzeitig mit der Wiederaufnahme der Meiose beobachtet werden und sind somit ebenfalls adäquates Mittel um die zytoplasmatische Reifung darzustellen.

# 2.4 In-vitro-Reifung (IVM) von caninen Oozyten

In vivo reift die Hundeoozyte sowohl im Follikel als auch im Eileiter (Holst and Phemister, 1971). Für die IVM werden in der Regel unreife Oozyten aus Ovarien von Hündinnen in verschiedenen Zyklusstadien gewonnen, die routinemäßig in der tierärztlichen Praxis ovariohysterektomiert wurden. Ziel der IVM ist es deshalb möglichst optimale Kulturbedingungen zu schaffen, in denen die Oozyten sowohl die zytoplasmatische Reifung als auch die Kernreifung fortführen können. Beides ist wichtige Voraussetzung für die spätere Befruchtung und Embryonalentwicklung.

#### 2.4.1 Einfluss der Hündinnen

Das Alter der Hündinnen ist ein entscheidender Faktor für die Anzahl an Oozyten, die von einem Tier gewonnen werden können. Die Anzahl gewinnbarer Oozyten sinkt mit zunehmendem Alter der Hündin deutlich. So können von einer geschlechtsreifen jungen Hündin bis zu 300 Oozyten gewonnen werden (Cui et al., 2006; Rodrigues and Rodrigues, 2003a; Ström-Holst et al., 2001; Theiss, 1997), während von Hündinnen über 13 Jahren nur noch durchschnittlich sieben Zellen gewonnen werden konnten (Theiss, 1997). In der Untersuchung von Rocha et al. (2006) an 10 Hündinnen verschiedenen Alters konnten von Tieren über neun Jahren jedoch, im Gegensatz zu anderen Studien, wieder deutlich mehr Oozyten pro Hündin gewonnen werden. Diese wiesen jedoch eine schlechtere Qualität auf. Oozyten von präpubertalen, sowie von Hündinnen über sechs Jahren werden generell als für die IVM ungeeignet eingestuft, da Erstere oft degeneriert und kleiner sind sowie einen unvollständigen Cumulus oophorus besitzen (Durrant et al., 1998; Nickson et al., 1993; Theiss, 1997) und Letztere schlechtere Reifungsraten bis zur MII aufweisen (Hewitt and England, 1998a).

Wie bei der Maus von Wassarman und Josefowicz (1978) beschrieben, zeigt sich auch bei in vitro gereiften Hundeoozyten, dass die Reifungsraten signifikant von der Oozytengröße abhängen. Der Durchmesser der gewonnen Oozyten (ohne Zona pellucida) liegt zwischen 70,0  $\mu$ m und 154,0  $\mu$ m und variiert sowohl bei einer Hündin als auch zwischen den einzelnen Hündinnen enorm (Fujii et al., 2000; Otoi et al., 2000a; Otoi et al., 2001; Theiss, 1997). Reifungsversuche mit Oozyten > 120  $\mu$ m (Otoi et al., 2000a; Otoi et al., 2001), > 110  $\mu$ m (Theiss, 1997) bzw. > 100  $\mu$ m (Hewitt and England, 1998a) führten zu deutlich höheren Reifungsraten im Vergleich zu kleineren Oozyten. Otoi et al. (2000a) erreichten MII Raten von 21,5% bei Oozyten > 120  $\mu$ m im Gegensatz zu 0% bei Oozyten < 100  $\mu$ m.

Der Einfluss des Zyklusstadiums der Hündin auf die Anzahl an gewonnenen Oozyten und die meiotische Kompetenz solcher Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen

Untersuchungen zeigte das Zyklusstadium weder Einfluss auf die gewonnene Oozytenanzahl noch auf die Fähigkeit zur Wiederaufnahme oder Fortführung der Meiose (Hewitt and England, 1997; Lee et al., 2007a; Rodrigues et al., 2004; Rodrigues and Rodrigues, 2003a; Songsasen and Wildt, 2005; Ström-Holst et al., 2001; Theiss, 1997). In anderen Untersuchungen konnten dagegen die meisten Oozyten von Hündinnen aus dem Anöstrus (Fujii et al., 2000; Nickson et al., 1993; Theiss, 1997) oder aus dem Proöstrus bzw. Östrus (Cui et al., 2006; Luvoni et al., 2001) gewonnen werden. Oozyten von Hündinnen während oder kurz nach der Läufigkeit zeigten höhere Reifungsraten als solche aus dem Pro- oder Anöstrus (Jin et al., 2006; Kim et al., 2005; Luvoni et al., 2001; Oh et al., 2005; Otoi et al., 2002; Willingham-Rocky et al., 2003; Yamada et al., 1992). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass aus Ovarien im Östrus mehr für die IVM geeignete Oozyten gewonnen werden können, da sie eine größere Anzahl an Follikeln über 2 mm aufweisen und die Oozyten im Durchschnitt größer sind als solche aus anderen Zyklusstadien (Cui et al., 2006; Lee et al., 2007a; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2001; Songsasen and Wildt, 2005). In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass intakte Oozyten mit homogenem Zytoplasma und mindestens zwei vollständigen Cumuluszelllagen sowie Oozyten mit einem Durchmesser von mehr als 100 µm eine erhöhte Fähigkeit besitzen die Meiose wieder aufzunehmen (Hewitt and England, 1998a; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Otoi et al., 2001; Theiss, 1997).

#### 2.4.2 Reifungsraten

Im Vergleich zu anderen Spezies werden bei der IVM von Hundeoozyten deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt (Farstad, 2000). Worauf dies zurückzuführen ist, ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Die GVBD-Raten von Hundeoozyten nach IVM schwanken je nach Studie und IVM-Zeit beträchtlich zwischen 0% (Yamada et al., 1992; Yamada et al., 1993) und 82,7% (Oh et al., 2005). Durchschnittswerte liegen um die 30%. Ebenso stark schwanken die Werte bezüglich der Reifung bis zur MII. Der mittlere Wert liegt bei 10%, wobei die Bandbreite von 0% (Kim et al., 2005; Oh et al., 2005; Rodrigues and Rodrigues, 2003b; Rota and Cabianca, 2004) bis 43,4% (De los Reyes et al., 2005) sehr groß ist. Nur in wenigen Studien wurden MII-Werte von bis zu 80% gefunden, wenn Oozyten aus Follikeln >2 mm verwendet wurden (Songsasen and Wildt, 2005; Songsasen et al., 2002). Der Anteil an degenerierte Oozyten ist nach IVM zum Teil sehr hoch und schwankt zwischen 0% (Fujii et al., 2000; Songsasen et al., 2002) und 70% (Rodrigues et al., 2004; Rodrigues and Rodrigues, 2003b). Durchschnittswerte liegen hier bei 25%. Die Variabilität bei den Reifungsund Degenerationsraten ist wahrscheinlich auf die Qualität des Ausgangsmaterials, sowie auf unterschiedliche Kultur-, Färbe- und Bewertungsmethoden zurückzuführen.

#### 2.4.3 Kulturmedium

Für die In-vitro-Kultur von Hundeoozyten wird meist Tissue Culture Medium (TCM) - 199 verwendet (De los Reyes et al., 2005; Kim et al., 2005; Otoi et al., 2004; Rota and Cabianca, 2004; Songsasen et al., 2003). Daneben wurden auch Kulturversuche in F-12 Ham's medium/Dulbecco's modified Eagle's medium (Bolamba et al., 2006), North Carolina State University 37 Medium (Cui et al., 2006; Jin et al., 2006), Connaught Medical Research Labs (CMRL) 1066 Medium (Songsasen et al., 2002), Krebs-Ringer-Bikarbonat Medium (Yamada et al., 1992; Yamada et al., 1993) und künstlicher Eileiterflüssigkeit (SOF) (Bolamba et al., 2002; Hewitt and England, 1999b; Rota and Cabianca, 2004) durchgeführt. Während für CMRL im Vergleich zu TCM deutlich schlechtere Reifungsraten erreicht werden konnten (nach 48h IVM: CMRL 0% MII; TCM 7,7% MII) (Songsasen et al., 2002) zeigte sich bei einem Vergleich von SOF mit TCM keine signifikanten Unterschiede (Hewitt and England, 1999b; Rota and Cabianca, 2004). Weitere vergleichende Studien gibt es nicht.

Zum jeweiligen Grundmedium wurden in verschiedenen Studien Hormone, Wachstumsfaktoren sowie unterschiedliche Proteinquellen zugesetzt. Bei der Kultivierung von Hundeoozyten konnten durch den Zusatz von Serum einer läufigen Hündin positive Auswirkungen auf die Reifung nachgewiesen werden (bis zu 16% MII vs. bis 4% MII in der Kontrolle) (Oh et al., 2005; Otoi et al., 1999; Rodrigues and Rodrigues, 2003b). Im Gegensatz dazu gibt es für den Zusatz von "reinem" Progesteron und/oder Östrogen in der Literatur widersprüchliche Angaben (Hewitt and England, 1997; Kim et al., 2005; Rodrigues et al., 2004; Willingham-Rocky et al., 2003). Als Proteinquelle dienen meist BSA (0,3-4%) oder FKS (5-20%). BSA sowie hohe Konzentrationen an FKS führen zu einer Erhöhung der Wiederaufnahme bzw. Fortführung der Meiose. Es werden GVBD-Raten von bis zu 40% und MII-Raten von bis zu 36% gefunden (Hewitt et al., 1998; Rodrigues and Rodrigues, 2003b). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass ein derartiger Proteinzusatz für die Reifung von Hundeoozyten nicht zwangsläufig notwendig zu sein scheint (Bolamba et al., 2002; Songsasen et al., 2002).

Die Zugabe der Gonadotropine FSH und/oder LH (Bolamba et al., 2006; Hewitt and England, 1999a; Rodrigues and Rodrigues, 2003b), von β-Mercaptoethanol (Songsasen et al., 2002), Hyaluron (Rodrigues et al., 2006) oder Insulin-Transferrin-Selenium (Rota and Cabianca, 2004), sowie der Zusatz verschiedener Wachstumsfaktoren (EGF, pST, bGH, hST) (Bolamba et al., 2006; Hewitt and England, 1999b; Rodrigues et al., 2006; Rota and Cabianca, 2004; Songsasen et al., 2002; Willingham-Rocky et al., 2002) erwies sich dagegen als ungeeignet um die Reifung caniner Oozyten zu unterstützen. Der Versuch die Kernreifung mit Dibutyryl-cAMP (Songsasen et al., 2003; Willingham-Rocky et al., 2003) oder Roscovitine (Songsasen et al., 2003) vor der IVM zu hemmen und somit eine vollständige

zytoplasmatische Reifung zu ermöglichen, führte ebenfalls zu keinen positiven Auswirkungen.

In neueren Studien wurde auch das schrittweise Umsetzen der Oozyten nach Inkubation mit eCG (Songsasen et al., 2003), hCG (De los Reyes et al., 2005) bzw. hMG und hCG (Otoi et al., 2006) in hormonloses Medium (MII-Raten bis 43,4%) beschrieben.

# 2.4.4 Kulturbedingungen

Canine Oozyten werden meist in einem Brutschrank bei einer Temperatur zwischen 37°C und 39°C bei 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte kultiviert. Um ein Verdunsten des Kulturmediums und damit eine Konzentrationserhöhung der Inhaltsstoffe zu verhindern wird das Kulturmedium in manchen Untersuchungen mit Öl überschichtet. Bei der IVM von Hundeoozyten werden in einem Volumen von 10 µl bis 500 µl pro Kultureinheit zwischen einer und 30 Oozyten kultiviert (Bolamba et al., 2006; De los Reyes et al., 2005; Kim et al., 2005; Luvoni et al., 2001; Oh et al., 2005; Saint-Dizier et al., 2004; Willingham-Rocky et al., 2003). Vergleichsstudien gibt es kaum, jedoch lassen ähnliche IVM-Ergebnisse vermuten, dass ein Effekt nur gering ist. Es konnten jedoch Auswirkungen des Zell-Medium-Verhältnisses auf die Reifungsraten festgestellt werden (Otoi et al., 2002). Negative Auswirkungen einer kulturbedingten erhöhten Sauerstoffkonzentration und die daraus folgenden Störungen im Zellstoffwechsel und damit der Fähigkeit zur Reifung (Guérin et al., 2001) konnten in der einzigen bis jetzt zu diesem Thema durchgeführten Studie beim Hund (5% bzw. 20% CO<sub>2</sub>) nicht bestätigt werden (Songsasen et al., 2002).

Die IVM-Kulturzeiten unterscheiden sich in den einzelnen Studien enorm. Die höchsten GVBD-Raten werden nach 48 Stunden erreicht (Cui et al., 2006; Fujii et al., 2000; Hewitt and England, 1999a; Otoi et al., 2004; Saint-Dizier et al., 2001). Bezogen auf die MII-Rate zeigen sich die höchsten Werte nach 72 Stunden Kultur. Dies ist ein Tag länger als sie in vivo benötigen, was eventuell darauf hinweist, dass die Oozyten unreif gewonnen werden und/oder inadäquate Reifungsbedingungen bestehen. In nur wenigen Studien wird eine längere Kultur beschrieben, die sich allerdings nur selten positiv auf die MII-Raten auswirkte (positiv: (De los Reyes et al., 2005; Fujii et al., 2000); negativ: (Cui et al., 2006; De los Reyes et al., 2005; Otoi et al., 2004; Yamada et al., 1993)). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich eine verlängerte IVM-Zeit bei Oozyten aus dem Anöstrus vorteilhaft ist, da solche Oozyten den GVBD und die MII später erreichen, als Oozyten aus anderen Zyklusstadien (Vannucchi et al., 2006). Ab einer Kulturdauer von 72 Stunden werden parthenogenetisch aktivierte Oozyten gefunden (Otoi et al., 2004; Saint-Dizier et al., 2004). Nach dieser Reifungszeit nimmt auch der Anteil an degenerierten Oozyten signifikant zu (Bogliolo et al., 2002; Bolamba et al., 1998; Hatoya et al., 2006; Vannucchi et al., 2006).

#### 2.4.5 Kokultursysteme zur In-vitro-Reifung

Da die Oozyten bei der Hündin sehr lange im Eileiter verbleiben und erst dort die Meiose fortsetzen wird dem Eileitermilieu eine essentielle Rolle bei der Reifung caniner Oozyten beigemessen. In letzter Zeit wurden Zellkulturstudien der isolierten Oozyten mit caninen Eileiterepithelzellen durchgeführt, in denen positive Effekte auf die Reifung gezeigt werden konnten (Bogliolo et al., 2002; Vannucchi et al., 2006). Die GVBD-Raten betrugen bis zu 60% und die MII-Raten bis zu 16% (Bogliolo et al., 2002).

Viel versprechende Ergebnisse konnten auch durch die Kultur von Hundeoozyten in isolierten, geschlossenen oder eröffneten Eileitern von Hündinnen erzielt werden. So wurden die besten Ergebnisse in geschlossenen Eileitern mit GVBD-Raten von 63,8% und Stadien zwischen MI und MII von bis zu 31,9% erreicht (Luvoni et al., 2003). Um den Besonderheiten der Hundeoozyten gerecht zu werden wurden verlängerte Kulturzeiten in Two-step-Kulturen beschrieben, bei denen verschiedene Kultursysteme kombiniert werden, wie zum Beispiel die Kultur im Eileiter mit anschließender Tröpfchenkultur. Diese führten zu höheren Reifungsraten und einer geringeren Anzahl an degenerierten Oozyten (Luvoni and Chigioni, 2006).

Ähnliche positive Resultate zeigt die Kokultur caniner Oozyten mit MEF oder CEF (mouse/canine embryonic fibroblasts) (MII-Rate: 11-13% verglichen zur Kontrollgruppe 5%) (Hatoya et al., 2006), die Kokultur caniner Oozyten mit bovinen Cumuluszellen (Otoi et al., 2000b), die Kultur in ganzen Follikeln (Bolamba et al., 1998; Bolamba et al., 2002) sowie die Einbettung in Kollagengel mit anschließender Kultur (Otoi et al., 2006).

Um sauerstoffbedingte Zellschäden während der IVM zu reduzieren wurden von Lee et al. (2007b) Versuche unternommen canine Oozyten gemeinsam mit MEF transgener Mäuse zu kultivieren, die die EC-SOD (extracellular superoxide dismutase) überexprimieren. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Reifungsraten.

# 3 Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden Ovarien von Hündinnen nach Kastration zum einen der histologischen Untersuchung zugeführt, als auch Oozyten aus Ovarien gewonnen, in vitro gereift und untersucht. Gewinnung, Reifung und Fixierung der caninen Oozyten sowie Fixierung der Ovarien wurden im IVF-Labor der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München durchgeführt. Färbung, Mikroskopie und Auswertung von Oozyten und Ovarien fanden am Lehrstuhl für Tieranatomie II der LMU München statt.

Die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen wird im Anhang erläutert.

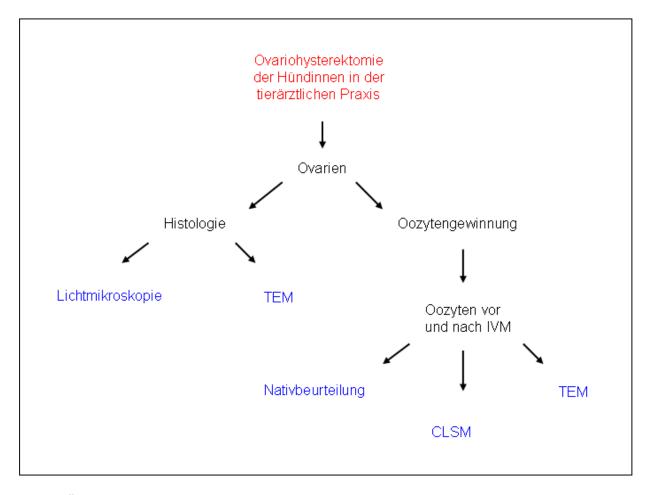


Bild 2 Überblick über die Verwendung der Hundeovarien für die verschiedenen Versuche IVM = In-vitro-Reifung, CLSM = Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie,

TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

# 3.1 Untersuchungen am Ovar

### 3.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen am Hundeovar wurden die Ovarien von 15 Hündinnen verwendet, die in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München sowie in drei Münchener Tierarztpraxen ovariohysterektomiert wurden. Soweit bekannt wurden Angaben über Alter, Rasse und letzte Läufigkeit protokolliert. Alle Hündinnen waren zum Zeitpunkt der Kastration geschlechtsgesund.

Die Organe wurden unmittelbar nach der Kastration bei Raumtemperatur ins Labor gebracht und dort vom anhängenden Bindegewebe befreit. Der Reproduktionsstatus wurde aufgrund des Vorberichts durch die Tierärzte, sowie, insbesondere bei Hündinnen ohne entsprechenden Vorbericht, zusätzlich aufgrund des Vorhandenseins von Follikeln oder Corpora lutea auf der Oberfläche der Ovarien (Tab. 2) eingeteilt. Zeigten sich Widersprüche zwischen Vorbericht und Ovarbefund, so wurde die Einteilung aufgrund des Ovarbefundes durchgeführt. Einen Überblick über die verwendeten Hündinnen sowie die Fixierung des Gewebes zeigt Tab. 3.

Tab. 2 Einteilung der einzelnen Reproduktionsstatus von Hündinnen aufgrund des Vorberichts und der Beschaffenheit der Ovaroberfläche

Reproduktions- status Vorbericht		Ovarbefund	Literatur (Ovarbefund)	
Follikelphase	Hündinnen mit klinischen Anzeichen der Läufigkeit	Ovargewebe mit einem oder mehreren Follikel 1-10 mm	Anderson and Simpson, 1973 Hewitt et al., 1998	
Lutealphase	Läufigkeit vor nicht mehr als 2 Monaten	Ovargewebe mit einem oder mehreren deutlichen Corpora lutea		
Anöstrus	Läufigkeit vor mehr als 2 Monaten, keine klinischen Anzeichen der nächsten Läufigkeit	Ovargewebe mit Follikeln < 1 mm, keine deutlichen Corpora lutea	Otoi et al., 2002	
Präpubertal	Hündinnen vor der ersten Läufigkeit	Ovargewebe ohne Follikel > 1 mm und ohne Corpora lutea		
Trächtig	Hündinnen mit nachgewiesener Trächtigkeit	Ovargewebe mit ein oder mehreren deutlichen Corpora lutea		

Von sieben der Hündinnen wurden die Ovarien, nach Teilung in zwei Hälften, sofort in Bouin`scher Lösung für 24 Stunden fixiert. Nach dieser Zeit wurden die Proben mehrfach in 70%igem Alkohol gewaschen und so bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Von einem

Hund wurde ein Stück des Uterus als Positivkontrolle wie oben beschrieben in Bouin`scher Lösung fixiert. Das Ovar eines anderen Hundes wurde zur Hälfte in Bouin, zur Hälfte in PFA fixiert. Diese Probe, sowie die Ovarien von acht weiteren Hündinnen wurden halbiert und für 24 Stunden in eine 4%ige PFA-Lösung gegeben, dann für 24 Stunden in PBS gewaschen und anschließend in 70%igen Alkohol überführt, der mehrfach gewechselt wurde.

Alle Präparate wurden in einem Einbettungsautomaten (Shandon Duplex Processor, Fa. Reichert-Jung, Wien) über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Paraplast® (Roth, Karlsruhe) infiltriert. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines Histostat-Tissue-Embedding-Centers (Fa. Reichert-Jung, Wien) in Paraffinblöcke ausgegossen. Von jedem Paraffinblock wurden mittels eines Rotationsmikrotoms (Fa. Leitz) Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf unbeschichtete (Menzel-Gläser®, Braunschweig) und beschichtete (SuperFrost Ultra Plus®, Menzel-Gläser®, Braunschweig) Objektträger aufgezogen.

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Hundeovarien, Paraformaldehyd (PFA) 4% und Bouin (B) fixiert

Nr.	Rasse	Alter	Reproduktionsstatus	Fixierung
1	West Highland Terrier	8 Monate	Präpubertal	В
2	DSH-Mischling	1 Jahr	Lutealphase	В
3	Briard-Mischling	2 Jahre	Follikelphase	В
4	Beagle	1 Jahr 4 Monate	Anöstrus	В
5	DSH-Mischling	1 Jahr 3 Monate	Anöstrus	В
6	Beagle	9 Monate	Trächtig 10.Tag	B und PFA
7	Mischling	11 Monate	Trächtig 14.Tag	В
8	King Charles Spaniel	1 Jahr	Anöstrus	PFA
9	DSH- Mischling	1 Jahr 6 Monate	Lutealphase	PFA
10	Beagle	1 Jahr	Anöstrus	PFA
11	Pudel-Pointer	1 Jahr	Anöstrus	PFA
12	Chow-Chow	2 Jahre	Lutealphase	PFA
13	Labrador	7 Jahre	Anöstrus	PFA
14	DSH	1 Jahr	Lutealphase	PFA
15	Riesenschnauzer	1 Jahr	Lutealphase	PFA

# 3.1.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Zur Übersicht wurde zunächst je ein Schnitt mit der HE-Färbung gefärbt. Dazu wurde das Protokoll nach Romeis (1989) verwendet. Bei der HE-Färbung zeigen sich Zellkerne und saurer Schleim blau, während alles andere in verschiedenen Rottönen erscheint.

# 3.1.3 Immunhistochemie (IHC)

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die in Tab. 4 aufgelisteten Antikörper verwendet.

Tab. 4 Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen

Primär-AK gegen	Firma	Verd.	Sekundär-AK	Firma	Verd.	Methode
ERα polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (H-184): sc-7207	1:400	Schwein Anti- Kaninchen IgG (F(ab`)2) biot.	Dako, Hamburg	1:300	ABC
ERβ polyklonal	ABR Affinity BioReagents, USA (PA1-311)	1:1000- 1:140	Schwein Anti- Kaninchen IgG (F(ab`)2) biot.	Dako, Hamburg	1:200	ABC
Ki-67	Dako, Hamburg (M7240) Clone MIB-1	1:50	Kaninchen Anti- Maus IgG APAAP Mouse monoclonal Komplex	Dako, Hamburg Dako, Hamburg	1:25	АРААР
monoklonal					1:50	
MMP-1	Lab Vision, Kalifornien, USA	1:100	Schwein Anti- Kaninchen IgG (F(ab`)2) biot.	Dako, Hamburg	1:300	ABC
MMP-2 monoklonal	Lab Vision, Kalifornien, USA	1:100	Kaninchen Anti- Maus IgG (F(ab`)2) biot.	Dako, Hamburg	1:300	ABC
MMP-14 polyklonal	Lab Vision, Kalifornien, USA	1:100	Schwein Anti- Kaninchen IgG (F(ab`)2) biot.	Dako, Hamburg	1:300	ABC
TIMP-2 polyklonal	Lab Vision, Kalifornien, USA	1:100	Schwein Anti- Kaninchen IgG (F(ab`)2) biot.	Dako, Hamburg	1:300	ABC

#### 3.1.3.1 Protokolle

#### ABC-Methode

Die Methode beruht auf der Bindungsfähigkeit von Avidin zu Biotin. Der Sekundärantikörper ist mit Biotin konjugiert und somit in der Lage Avidin zu binden. Das gebundene Avidin ist wiederum in der Lage weiteres Biotin zu binden. Die Reaktion wird mittels des Enzyms Meerrettich-Peroxidase dargestellt, das an Biotinmoleküle gebunden ist und zusammen mit dem Chromogen Diaminobenzidine (DAB) sowie  $H_2O_2$  eine braune Färbung ergibt. Die ausgelöste Kettenreaktion erhöht die Sensitivität der Methode. Meist werden kommerziell erhältliche Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe (ABC) verwendet (Romeis, 1989).

#### Protokoll

- 1. Schnitte entparaffinieren bis A.dest
- 2. 3 x 5 Minuten in PBS waschen
- 3. Vorbehandlung je nach Antikörper (s.u.)
- 4. 3 x 5 Minuten in PBS waschen
- 5. Endogene Peroxidase in Hydrogenperoxidlösung hemmen, Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur
- 6. 10 min unter fließendem Leitungswasser waschen
- 7. 3 x 5 Minuten in PBS waschen
- 8. 2-3 Tropfen "Protein-Block Serum Free" (Fa. Dako, Hamburg) auf jeden Schnitt tropfen, Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- Aufpipettieren von 100 μl Primärantikörper-Lösung (AK verdünnt in "Antibody Diluent" (Fa. Dako, Hamburg)) pro Schnitt; Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
- 10. Am nächsten Morgen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- 11. 3 x 5 Minuten in PBS waschen
- 12. Aufpipettieren von 100 µl Sekundärantikörper-Lösung (in PBS) pro Schnitt; Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 13. 3 x 5 Minuten in PBS waschen

- 14. 2 3 Tropfen HRP-Komplex (Strept ABComplex HRP, Fa. Dako, Hamburg) pro Schnitt; Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- 15. 3 x 5 Minuten in PBS waschen
- Aufpipettieren von 100 μl DAB-Hydrogenperoxid-Lösung pro Schnitt; Inkubation für 8
   Minuten bei Raumtemperatur
- 17. 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser waschen
- 18. evtl. 5 Sekunden mit Hämalaun gegenfärben
- 19. 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser waschen
- 20. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
- 21. Eindeckeln der Präparate mit Eukitt® (Fa. Riedel-de-Haen AG)

Die Negativkontrollen wurden jeweils durch Ersatz des Primärantikörpers mit "Antibody Diluent" (Fa. Dako, Hamburg) durchgeführt.

#### APAAP-Methode

Bei der APAAP-Methode wird der Primärantikörper durch einen unkonjugierten Brücken bildenden Antikörper mit einem weiteren, gegen ein Markerenzym (z.B. alkalische Phosphatase (AP)) gerichteten Antikörper, gebunden. Dabei stammt der primäre sowie der gegen die AP gerichtete Antikörper von der gleichen Spezies (z.B. Maus), während der Brücken bildende Antikörper gegen Immunglobuline dieser Spezies gerichtet (z.B. Kaninchen anti-Maus) ist. Antikörper und Markerenzym werden als APAAP (alkalische-Phosphatase-Anti-alkalische-Phosphatase)-Komplex zugegeben. Die Sensitivität der Methode kann durch die Wiederholung der Inkubationsschritte erhöht werden. Die Aktivität der AP wird mittels Fast Red (Naphthol-AS-MX) als rote Farbreaktion dargestellt (Romeis, 1989).

#### Protokoll

- 1. Schnitte entparaffinieren bis A. dest
- 2. 2 x 5 Minuten in A. dest waschen
- 3. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen

- Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle (Fa. Moulinex, 750 W) in Dakopuffer (pH 6,1, DakoCytomation Target Retrieval Solution, Fa. Dako, Hamburg); 2 x 10 Minuten
- 5. 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- 6. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- 7. Aufpipettieren von 100 µl Primär-Antikörper-Lösung Ki-67 (1:50) pro Schnitt; Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 8. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- Aufpipettieren von 100 μl Rabbit-anti Mouse IgG (1:25) pro Schnitt; Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 10. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- 11. Aufpipettieren von 100 μl APAAP Mouse Monoclonal Komplex (1:50) pro Schnitt; Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 12. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- 13. Aufpipettieren von 100 μl Rabbit-anti Mouse IgG (1:25) pro Schnitt; Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 14. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- Aufpipettieren von 100 μl APAAP Mouse Monoclonal Komplex (Fa. Dako, Hamburg)
   (1:50) pro Schnitt; Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 16. 2 x 5 Minuten in Tris-Puffer waschen
- 17. Aufpipettieren von 100 μl Fast Red-Lösung (Fa. Sigma, Deisenhofen) pro Schnitt, Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur
- 18. Kurz in Tris-Puffer spülen
- 19. 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser waschen
- 20. Mit Kaisers Gelatine (Fa. Merck, Darmstadt) eindeckeln

Die Negativkontrolle wurde durch Ersatz des Primärantikörpers mit "Antibody Diluent" (Fa. Dako, Hamburg) durchgeführt.

#### 3.1.3.2 Vorbehandlungen, Kontrollschnitte und Gegenfärbungen

# Nachweis des Östrogenrezeptors a (ERa)

Für den Nachweis von ERα wurden die Schnitte zunächst mit unterschiedlichen Vorbehandlungen in der Mikrowelle behandelt und dann nach der ABC-Methode gefärbt.

Mikrowellenbehandlung (Fa. Moulinex, 750 W)

- Mikrowelle 3 x 10 Minuten Citrat-Puffer pH 6,0, verdampfte Flüssigkeit wurde jeweils ersetzt
- Mikrowelle 3 x 10 Minuten Dako-Puffer pH 6,1 (DakoCytomation Target Retrieval Solution, Fa. Dako, Hamburg), verdampfte Flüssigkeit wurde jeweils ersetzt
- Nach der Mikrowellenbehandlung 20 Minuten bei Raumtemperatur auskühlen lassen

Positivkontrolle: Uterus vom Hund und Euter vom Rind (jeweils B-fixiert)

Alle Proben wurden für fünf Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt (Protokoll Schritt 18 und 19).

# Nachweis des Östrogenrezeptors \( \beta \) (ER\( \beta \))

Für den Nachweis von ERβ wurde zunächst versucht die optimale Antikörperkonzentration für die Färbung der Hundeovarien zu bestimmen. Dazu wurden je ein Bouin- und PFA-fixierter Schnitt mit fünf verschiedenen Primärantikörperkonzentrationen (Tab. 5) getestet, und die Färbung dann mit der optimalen Konzentration mit den restlichen Schnitten wiederholt.

Tab. 5 Verwendete Konzentrationen des Antikörpers gegen ERβ

Konz. Nr.	Verdünnung	Endkonzentration
1	1:1000	1 µg/ml
2	1:500	2 μg/ml
3	1:300	3,33 µg/ml
4	1:200	5 μg/ml
5	1:140	7,1 μg/ml

Positivkontrolle: Uterus und Prostata vom Hund (B-fixiert) und Ovar der

Katze (B- und Formalin fixiert)

Die Vorbehandlung bestand in einer 2 x 10 minütigen Behandlung in Citrat-Puffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (Fa. Moulinex, 750 W). Verdampfte Flüssigkeit wurde jeweils ersetzt.

Alle Proben wurden für fünf Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt (Protokoll Schritt 18 und 19).

#### Nachweis von Ki-67

Zur Darstellung der Zellproliferation mittels Ki-67 wurde die APAAP-Methode nach oben beschriebenem Protokoll verwendet. Die Zellteilung wurde mittels Fast Red dargestellt.

Positivkontrolle: Hoden vom Rind (B-fixiert)

Keines der Präparate wurde gegengefärbt.

Nachweis der Matrix Metalloproteinase (MMP) -1, -2, und -14 sowie des Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases (TIMP) -2

Es wurde je ein Bouin-fixierter Schnitt mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert.

Die Vorbehandlung bestand in einer 2 x 10 minütigen Behandlung mit Citrat-Puffer (pH 6,0) in der Mikrowelle (Fa. Moulinex, 750 Watt). Verdampfte Flüssigkeit wurde jeweils ersetzt.

Positivkontrolle: nicht durchgeführt

Keines der Präparate wurde gegengefärbt.

# 3.1.4 Dokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation der immunhistochemischen Untersuchungen wurde ein Leitz Aristoplan (Fa. Leitz, Wetzlar) Mikroskop verwendet, an das eine Canon Powershot A95 Kamera angebracht wurde.

Für die Größenmessung von Oozyten wurden von fünf Hündinnen zunächst digitale Bilder von Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln mit 32-facher Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurden mindestens fünf und höchstens 10 Follikel in den einzelnen Entwicklungsstadien pro Hündin ausgemessen. Es wurden nur Follikel bei denen die Oozyte im Zentrum angeschnitten wurde mit einbezogen. Dann wurden der Durchmesser der Oozyte, der Durchmesser des "germinal vesicle" und die Dicke der Zona pellucida mit Hilfe des Programmes WCIF ImageJ (Rasband, W.S.) gemessen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programmes SPSS 14.0 für Windows. Signifikante Veränderungen zwischen den Mittelwerten zweier Variablen wurden mittels des t-Tests berechnet. Zur Prüfung des Vorliegens einer Korrelation zwischen den Werten wurde der Test nach Spearman (zweiseitig) angewendet.

Die Beurteilung der Intensität der Immunreaktion beim Nachweis der Östrogenrezeptoren und bei MMP/TIMP erfolgte nach folgendem Schema:

keine positive Immunreaktion unklare Immunreaktion ±
schwache Immunreaktion +
deutliche Immunreaktion +++

# 3.2 Untersuchungen an caninen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung

### 3.2.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen an caninen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung wurden Ovarien von 61 Hündinnen verwendet, die in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München sowie in drei Münchner Tierarztpraxen ovariohysterektomiert wurden. Von den Tierärzten wurden Informationen bezüglich der Rasse, des Alters und der letzten Läufigkeit der Hündinnen eingeholt. Die Zeit zwischen Entnahme der Ovarien und der Gewinnung der Oozyten im Labor wurde protokolliert.

Zusätzlich zum Vorbericht wurden die gewonnenen Ovarien aufgrund ihrer Funktionsgebilde (Tab. 2) einem Reproduktionsstatus zugeordnet.

Die Hündinnen stammten aus verschiedenen Rassen und waren zwischen vier Monaten und 12,5 Jahren (150 Monate) alt, wobei fast 80% der Hündinnen zum Zeitpunkt der Kastration unter zwei Jahren alt waren. Alle kastrierten Hündinnen waren bezüglich ihres Reproduktionstraktes gesund. Indikation zur Ovariohysterektomie war meist die Ausschaltung des Geschlechtstriebes und die Verhinderung der unkontrollierten Fortpflanzung.

Die Ovarien wurden unmittelbar nach der Ovariohysterektomie mit einer Schere vom Uterus abgesetzt, sofort in ein 50 ml Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) mit einer sterilen Aufbewahrungslösung gegeben und darin bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur (ca. 20°C) aufbewahrt. Im Labor wurden die Bursa ovarica und das umgebende Bindegewebe vorsichtig entfernt und das Ovar am Ovarhilus mittels einer Klemme fixiert. Die Ovaroberfläche wurde sofort mit warmer steriler Slicinglösung befeuchtet.

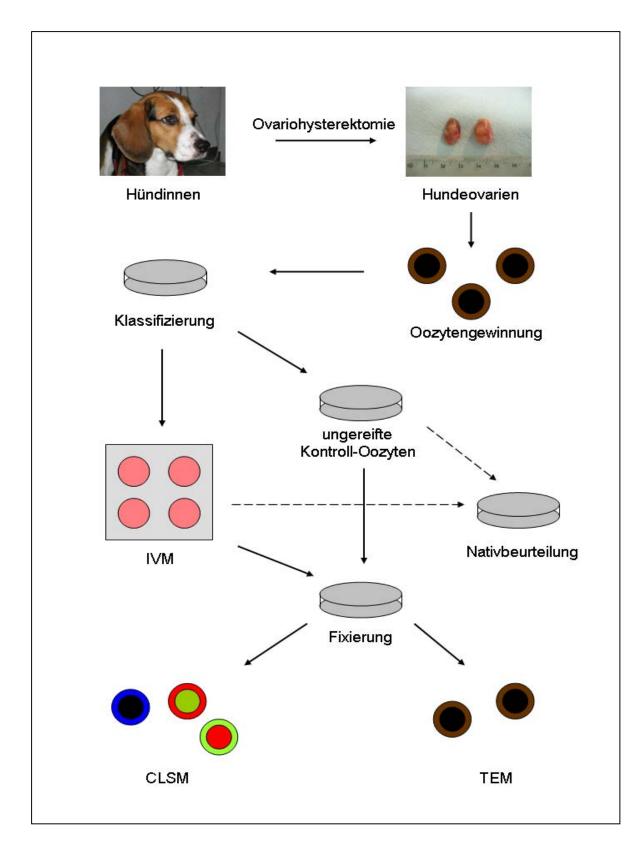


Bild 3 Überblick über die Verwendung der gewonnenen Hundeoozyten in den Versuchen

IVM = In-vitro-Reifung, CLSM = konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

### 3.2.2 Oozytengewinnung und Umgang mit den Zellen

### Slicing

Mit Hilfe einer Skalpellklinge (Fa. Bayha, Tuttlingen) wurde jedes Ovar an der Oberfläche leicht eingeritzt (Slicing) und die Oozyten von beiden Ovarien einer Hündin mit 15 ml 38,5°C warmer Slicinglösung in eine sterile, große, an der Bodenfläche gerasterte Petrischale (Ø 85 mm, Fa. Nunc, Wiesbaden) gespült. Die Petrischale wurde sofort auf einen auf 37°C vorgewärmten Objekttisch (Fa. Wild, Heerbrugg) verbracht.

### Transport der Oozyten von einer Schale zur nächsten

Die In-vitro-Reifung sowie die Fixierung und Färbung der Oozyten wurden in 4-Well-Schalen (4-Well-Multischalen, Fa. Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Die Oozyten wurden mit einem Transferpettor (5 µl) und sterilen Glaskapillaren (beides Fa. Brand, Wertheim) unter einer Stereolupe (Fa. Wild, Heerbrugg) von einem Well zum nächsten transportiert.

### Vorbereitungen und Arbeiten mit den Oozyten während der IVM

Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor mindestens vier Stunden im Brutschrank (Fa. Heraeus) äquilibriert, steril filtriert (Spritzenvorsatzfilter, Porengröße 0,2 µm, Fa. Whatman/Schleicher & Schuell, Dassel) und bei einer Temperatur von 38,5°C verwendet. Während der gesamten Arbeit wurden die Petrischälchen mit den Oozyten auf einem 37°C warmen Objekttisch (Fa. Wild, Heerbrugg) gehalten, um ein Auskühlen der Oozyten zu verhindern.

### **Klassifizierung**

Die Oozyten wurden aus der großen Petrischale (Ø 85 mm, Fa. Nunc, Wiesbaden) in eine kleine Petrischale (Ø 35 mm, Fa. Nunc, Wiesbaden) umgesetzt, die zuvor mit 2 ml 38,5°C warmen Slicingmedium befüllt worden war.

Hier fand die Klassifizierung der gewonnenen Oozyten statt, die nach den Kriterien von Theiss (1997) durchgeführt wurde.

Tab. 6 Klassifizierung von ungereiften Hundeoozyten nach Theiss (1997)

Kategorie	Morphologische Kriterien
А	Homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, mindestens zwei intakte Cumuluszelllagen
В	Homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, Cumuluszelllagen nicht intakt
С	Homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, keine Cumuluszellen
D	Inhomogenes oder helles Ooplasma und/oder defekte Ooplasmamembran und/oder nur Oozytenbruchstücke

Für die weiteren Untersuchungen wurden nur Oozyten mit und ohne Cumulus oophorus der Kategorie A, B und C verwendet.

# 3.2.3 In-vitro-Reifung (IVM)

Nach Entnahme einiger Oozyten aus allen drei Klassen für die Null Stunden Kontrolle aus der ersten Waschschale wurden die Oozyten zweimal in kleine Petrischälchen (Ø 35 mm, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit je 2 ml 38,5°C warmen IVM-Medium ohne Hormone umgesetzt.

In der letzten Petrischale wurden die Oozyten unabhängig von ihrer Klasse in vier gleich große Gruppen aufgeteilt und in eine Kulturschale (4-Well-Multischalen, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit je 400 µl IVM-Medium und 0,5 IU bLH sowie 0,5 IU bFSH gebracht. Darin wurden sie einmal gewaschen bis sie in die endgültige Kulturschale mit je 400 µl IVM-Medium pro Well und den gleichen Hormonen gesetzt wurden.

Die Gruppengröße betrug pro IVM-Well, je nach dem, wie viele Oozyten von einer Hündin gewonnen werden konnten, zwischen 10 und 20 Oozyten. Für die IVM wurde die 4-Well-Schale (4-Well-Multischalen, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit den Oozyten in einen Brutschrank (Fa. Heraeus) gestellt, in dem eine Atmosphäre von 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> sowie gesättigte Luftfeuchtigkeit herrscht.

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden jeweils Oozyten aus allen Klassen aus den Wells genommen, nativ beurteilt und dokumentiert oder für die entsprechenden Färbungen fixiert.

### 3.2.4 Fixierung der Oozyten

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Oozyten in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurden sie einmal für fünf Minuten in 400 µl PBS/PVP/ABM-Lösung gewaschen und dann für eine Stunde in 400 µl 4%iger Paraformaldehyd- Lösung bei Raumtemperatur belassen. Im Anschluss daran wurden die Oozyten zweimal je fünf Minuten in 400 µl PBS/PVP/ABM gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in einem Eppendorf-Cup in 800 µl PBS/PVP/ABM bei 4°C aufbewahrt.

### 3.2.5 Beurteilung der nativen Oozyten

Um die Morphologie von nativen Oozyten darzustellen wurden die Oozyten mancher Hündinnen direkt nach der Gewinnung bzw. nach der jeweiligen Kulturzeit ein mal in einem mit 400 µl 38,5°C warmen PBS gefüllten Well einer 4-Well-Schale (4-Well-Multischalen, Fa. Nunc, Wiesbaden) gewaschen, in den nächsten Well in weitere 400 µl PBS umgesetzt und so unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena) bei verschiedenen Vergrößerungen (40x – 400x) beurteilt. Um Veränderungen in der Morphologie aufgrund des Temperaturunterschiedes so gering wie möglich zu halten betrug die Zeit zum fotografieren höchstens 20 Minuten. Die Oozyten wurden danach für keine weiteren Versuche oder Färbungen verwendet.

# 3.2.6 Kernfärbungen

Die Chromatinkonfiguration in den Kernen der Oozyten wurde mittels Fluoreszenzfärbung dargestellt. Dazu wurden die Oozyten nach 0, 24, 48 und 72 Stunden IVM einer DNA/RNA-Färbung unterzogen. Die Kernreifungsergebnisse von Oozyten nach Immunfluoreszenzfärbung wurden dabei ebenfalls berücksichtigt.

Die Anfärbung der DNA und RNA erfolgte mittels Propidiumjodid (PI, Fa. Sigma, Deisenhofen) sowie der DNA mit Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA) oder einer Kombination aus beiden Farbstoffen.

#### Protokoll

- Fixierte Oozyten mittels Pasteurpipette (150 mm, Fa. VWR) mitsamt Medium aus dem Eppendorf-Cup pipettieren und in einer kleinen Petrischale sammeln
- 2. Oozyten in einen Well einer 4-Well-Schale (4-Well-Multischalen, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 500 µl Permeabilisierungs-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren

- 3. Oozyten 2 x 5 Minuten in 500 µl/Well PBS/PVP/ABM waschen
- Oozyten in 500 μl Hoechst 33342-Lösung (20 μg/ml) und/oder 500 μl PI-Lösung (50 μg/ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 5. Ab jetzt Oozyten möglichst dunkel halten
- 6. Gefärbte Oozyten 2 x 5 Minuten in 500 µl/Well PBS/PVP/ABM waschen
- 7. Aufbringen der Oozyten auf einen Objektträger (s.u.)

# 3.2.7 Immunfluoreszenz (IF)

Tab. 7 Überblick über die verwendeten Antikörper für die IF bei Oozyten

Primär-AK gegen	Firma	Verd.	Sekundär-AK	Firma	Verd.	Methode
Zona pellucida Glykoprotein 3β	Tieranatomie II, Nr. 776	1:200	Kaninchen Anti- Huhn IgG (H+L) FITC-markiert	Invitrogen, Karlsruhe (61-3111)	1:100	IF
Connexin 43 monoklonal	BD Biosciences, USA (610061)	1:200 Kaninchen Anti- Maus IgG, Kaninchen F (ab`)² FITC-markiert		Dako, Hamburg	1:100	IF
α-Tubulin polyklonal			Ziege Anti- Kaninchen IgG (H+L) FITC-markiert	Vector Laboratories, Kalifornien, USA (FI-1000)	1:100	IF

### Protokoll

- Fixierte Oozyten mittels Pasteurpipette (150 mm, Fa. VWR, Darmstadt) mitsamt Medium aus dem Eppendorf-Cup pipettieren und in einer kleinen Petrischale sammeln
- 2. Oozyten in einen Well einer 4-Well-Schale (4-Well-Multischalen, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 500 µl Permeabilisierungs-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
- 3. 2 x 5 Minuten in PBS/PVP/ABM waschen
- 4. Zellen in einige Tropfen "Protein Block Serum- Free" (Dako, Hamburg) geben; Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer

- 5. Inkubation mit Primärantikörper-Lösung (in "Antibody Diluent" (Fa. Dako, Hamburg) verdünnt), über Nacht bei 4°C in einer feuchter Kammer
- 6. 2 x 5 Minuten in PBS/PVP/ABM waschen
- 7. Inkubation mit Sekundärantikörper (in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 8. Ab jetzt Oozyten möglichst dunkel halten
- 9. 2 x 5 Minuten in PBS/PVP/ABM waschen
- 10. Oozyten in 500 μl Hoechst 33342-Lösung (20 μg/ml) und/oder 500 μl PI-Lösung (50 μg/ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 11. 2 x 5 Minuten in PBS/PVP/ABM waschen
- 12. Aufbringen der Oozyten auf einen Objektträger (s.u.)

Die Negativkontrollen wurden jeweils durch Ersatz des Primärantikörpers mit "Antibody Diluent" (Fa. Dako, Hamburg) durchgeführt.

# 3.2.8 Glykohistochemische Färbungen

Für den Nachweis von Zuckerstrukturen in den COCs wurden die beiden Lektine WGA und SBA verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugiert waren (Tab. 8) (Vector Lab, USA, FLK-2100).

Tab. 8 Überblick über die verwendeten FITC-markierten Lektine zur Färbung der Oozyten

Lektin	Abk.	Ursprung	Zuckerspezifität	Hemmung durch		
Triticum vulgare Agglutinin	WGA	Weizenkeim	GlcNAc(β1-4GlcNAc) <sub>1-2</sub> ,NeuNAc	GlcNAc		
Glycine max Agglutinin	SBA	Sojabohne	α-D-GalNAc, β-D-GalNAc	GalNAc		

GlcNAc = N-Acetylglukosamin, NeuNAc = N-Acetylneuraminsäure, GalNAc = N-Acetylgalaktosamin

#### Protokoll

- Fixierte Oozyten mittels Pasteurpipette (150 mm, Fa. VWR, Darmstadt) mitsamt Medium aus dem Eppendorf-Cup pipettieren und in einer kleinen Petrischale sammeln
- Oozyten in einen Well einer 4-Well-Schale (4-Well-Multischalen, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 500 µl Permeabilisierungs-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geben
- 3. 2 x 5 Minuten in PBS/PVP/ABM waschen
- Inkubation der Oozyten mit einem FITC- markierten Lektin (in PBS) (10 μg/ml, siehe Tab. 8) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C
- 5. 2 x 5 Minuten in PBS/PVP/ABM waschen
- 6. Oozyten in 500 μl Hoechst 33342-Lösung (20 μg/ml) und/oder 500 μl PI-Lösung (50 μg/ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 7. 2 x 5 Minuten in PBS/PVP waschen
- 8. Aufbringen der Oozyten auf einen Objektträger (s.u.)

Die Negativkontrolle wurde durch vorherige Inkubation des Lektins mit dem jeweils korrespondierenden Zucker durchgeführt.

# 3.2.9 Präparation für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die gefärbten Oozyten auf einen Objektträger verbracht, mit Einbettmedium überschichtet (Gel mount, Fa.Biozol) und mit einem Deckglas abgedeckt. Bis zum Aushärten des Mediums wurden die Objektträger für etwa eine Stunde im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Aufgrund der durch das Deckglas verursachten Abplattung der Oozyten wurde als Abstandhalter eine gelochte Klebefolie verwendet. Auf ein großes Deckglas wurde ein ausreichend großes Stück der selbstklebenden Folie geklebt. Die gefärbten Oozyten wurden in Vectashield Einbettmedium (Fa. Vector Laboratories, USA) gewaschen und dann einzeln mittels Pipette in jede Vertiefung gegeben, so dass diese vollständig mit Medium befüllt waren. Ein kleines Deckglas wurde dann vorsichtig auf die Folie mit den Löchern gegeben, damit die Oozyten nicht aus den Vertiefungen schwimmen. Das Deckgläschen wurde mit klarem Nagellack an den Rändern befestigt. War der Nagellack ausgetrocknet, so wurde die

Konstruktion umgedreht auf einen Objektträger montiert, der vorher an den Ecken mit Fixogum (Fa. Marabu) beschichtet worden war. Die Oozyten waren so direkt zugänglich.

# 3.2.10 Dokumentation und Auswertung

Die Nativbeurteilung der Oozyten wurde an einem Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena) durchgeführt. Zur Dokumentation diente ein Digitalaufsatz, der mit einer Canon Powershot A95 Kamera verbunden war.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (LSM 510 meta, Fa. Zeiss, Jena) angefertigt. Es wurde versucht bei jeder Oozyte den Kern darzustellen. Bei den Immunfluoreszenz- und Lektinuntersuchungen wurden jeweils mindestens 20 Oozyten begutachtet und dann repräsentative Unterschiede zwischen den Oozyten dokumentiert.

Das Reifestadium der Kerne wurde nach folgendem Schema beurteilt:

GV	Unterschiedlich stark kondensiertes Chromatin in deutlich rund abgegrenzten Bereich ("germinal vesicle") im Ooplasma sichtbar						
GVBD-MI	Kein "germinal vesicle" mehr sichtbar, Chromatin deutlich kondensiert in Zentrum oder am Rand der Oozyte, kein Polkörperchen nachweisbar						
МІІ	Kein "germinal vesicle" sichtbar, deutlich kondensiertes Chromatin am Rand der Oozyte, Polkörperchen nachweisbar						
Nicht beurteilbar	Kein "germinal vesicle" sichtbar, kein Chromatin nachweisbar, degeneriert oder Kern aufgrund technischer Probleme nicht auswertbar						

Die Messung des Durchmessers der Oozyten, des Durchmessers des "germinal vesicle" und der Dicke der Zona pellucida erfolgte mit Hilfe des Zeiss LSM Image Browsers. Der Durchmesser der Oozyte und der Durchmesser des "germinal vesicle" wurden mittels je zwei Werten bestimmt. Die Dicke der Zona pellucida wurde an vier Stellen gemessen. Aus diesen Werten wurde jeweils der Mittelwert für jede Oozyte bestimmt. Insgesamt wurden von 53 mit Platzhalter auf Objektträger verbrachte Oozyten die Werte bestimmt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programmes SPSS 14.0 für Windows. Signifikante Veränderungen zwischen den Mittelwerten zweier Variablen wurden mittels des t-Tests berechnet. Zur Prüfung des Vorliegens einer Korrelation zwischen den Werten wurde der Test nach Spearman (zweiseitig) angewendet.

# 3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

### 3.3.1 Vorbereitung der Ovarien

Es wurden Ovarien von einem Beagle (10 Monate, trächtig), einer Englische Bulldogge (18 Monate, Anöstrus) und einem Deutscher Schäferhund (11 Jahre, Anöstrus) untersucht. Die Einteilung des Reproduktionsstatus erfolgte aufgrund des Vorberichts und des Ovarbefundes (Tab. 2). Die Ovarien wurden unmittelbar nach der Kastration in kleine Stücke mit einem Millimeter Kantenlänge geschnitten und über Nacht im Kühlschrank in Karnovsky-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Proben viermal je 15 Minuten in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen und in 1,5%igem Kaliumferrocyanid und 1%igem Osmiumtetroxid für zwei Stunden im Dunkeln bei 4°C kontrastiert. Danach erfolgten drei weitere 20 minütige Waschvorgänge in 0,1 M Cacodylat-Puffer und die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

# 3.3.2 Vorbereitung der Oozyten

Für die Untersuchungen wurden Oozyten von Hündinnen ohne Reifung wie auch solche, die 24, 72 und 90 Stunden gereift waren, verwendet und entsprechend fixiert (Zellgewinnung, IVM, siehe Punkt 3.2). Von drei anöstrischen Hündinnen im Alter zwischen 12 und 22 Monaten wurden je zwei Oozyten direkt nach der Gewinnung, von zwei Hündinnen jeweils zwei weitere Oozyten nach 72 Stunden und vier Oozyten von einer Hündin nach 90 Stunden Reifungszeit untersucht. Die Oozyten wurden direkt nach der Gewinnung kurz in Cacodylat-Puffer geschwenkt und dann in Karnovsky-Lösung für 24 Stunden im Kühlschrank fixiert. Sie wurden dann in einen Tropfen Cacodylat mit 20% BSA verbracht, der mit 25% Glutaraldehyd versetzt wurde, was zur Polymerisierung des BSA führt. Es entsteht ein Pellet, in dem die Oozyten eingeschlossen sind. Mit 1,5%igem Kaliumferrocyanid und 1%igem Osmiumtetroxid erfolgte die Kontrastierung im Dunkeln bei 4°C. Nach Waschvorgängen in Cacodylat-Puffer wurde das Pellet dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

#### 3.3.3 Weitere Verarbeitung

Es folgte die schrittweise Einbettung in Epon [2 x 15 Minuten Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt), 1 Stunde Propylenoxid-Epon (Kunstharz)-Gemisch (2:1); über Nacht Propylenoxid-Epon (Kunstharz)-Gemisch (1:1); 30 Minuten reines Epon (Fa. Polysciences, Eppelheim)]. Danach wurden die Proben in Gelatinekapseln (Fa. Plannet, Wetzlar) in Epon eingebettet und bei 60°C über 24 Stunden polymerisiert.

Zur Übersicht wurden am Ultramikrotom (Ultracut E, Fa. Reichert-Jung, Wien) 1 µm dicke Semidünn-Schnitte angefertigt, mit Methylen-Blau (Fa. Sigma, Deisenhofen) gefärbt und beurteilt.

Die Blöcke für die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden ultradünn (60 nm) geschnitten, auf Kupfergrids (Fa. SSI, Sciencs Services, München) aufgezogen und mit gesättigtem 2%igem Uranylacetat und mit der Bleicitratlösung nach Reynolds für fünf Minuten nachkontrastiert.

### 3.3.4 Dokumentation und Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop (EM Zeiss 902, Fa. Zeiss, Oberkochen). Als Filmmaterial dienten Maco ort 25c-Filme (Fa. Maco Photo Products, Hamburg).

Von den Ovarien wurden Aufnahmen von Follikeln in verschiedenen Reifestadien vom Primordialfollikel bis zum Tertiärfollikel angefertigt und ausgewertet. Die Oozyten oder COCs wurden sowohl vor als auch nach IVM beurteilt.

Die Messung der Dicke der Zona pellucida erfolgte mittels des Programmes WCIF ImageJ (Rasband, W.S.).

# 4 Ergebnisse

# 4.1 Untersuchungen am Ovar

# 4.1.1 Hämatoxylin Eosin (HE)-Färbung

An den Ovarien können ein peripher liegender Rindenbereich von einem zentral liegenden Markbereich unterschieden werden, die von Hündin zu Hündin individuell und zyklusabhängig unterschiedlich deutlich voneinander abgegrenzt werden können. Während die beiden Bereiche bei Hündinnen im Anöstrus gut darstellbar sind erscheint die Rindenschicht bei Tieren in der Lutealphase aufgrund der Größe der Gelbkörper stark an den Rand gedrängt und reduziert (Bild 4). Das Ovarstroma ist zellreich, enthält viele elastische Fasern und ist vor allem im Rindenbereich wirbelförmig angeordnet.



Bild 4 Ovar Hund, HE-Färbung,  $SB = 500 \ \mu m$ 

Rinden- (OR) und Markbereich (OM) mit Follikeln in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Die Oberfläche der Ovarien wird von einem einschichtigen Epithel überzogen, das aus flachen bis kubischen Zellen besteht. Die Zellen besitzen nur einen geringen Zytoplasmasaum und erscheinen deshalb sehr dunkel. Bei einigen der Ovarien zeigt sich eine fixationsbedingte Ablösung des Epithels. Direkt unter dem Oberflächenepithel ist eine von Hündin zu Hündin unterschiedlich deutlich ausgeprägte Bindegewebsschicht, die Tunica albuginea, zu erkennen. Sie besteht aus vielen elastischen Fasern sowie Fibrozyten, die parallel zur Ovaroberfläche angeordnet sind. In diese Schicht reichen bei allen Hündinnen an einigen Stellen Einstülpungen des Oberflächenepithels vor, die kurze Gangsysteme bilden und von Tier zu Tier unterschiedlich deutlich ausgeprägt erscheinen. Im Bereich dieser

kleinen Gänge sind die Fasern der Tunica albuginea unregelmäßig angeordnet. Die Gangsysteme werden von iso- bis hochprismatischen Epithelzellen ausgekleidet, welche deutlich größer sind als jene des Epithels an der Oberfläche des Ovars. Sie besitzen große runde häufig basal liegende Kerne (Bild 5).

Bei Hündinnen in der Lutealphase sowie bei Hündinnen nach mehreren Läufigkeiten finden sich tiefe Einschnürungen der Oberfläche, die mit Oberflächenepithel ausgekleidet sind und mehrere Millimeter tief in das Ovargewebe reichen. Auch diese bilden zum Teil kleine Gangsysteme ähnlich denen an der Oberfläche aus.

In der Rindenzone der Ovarien, unmittelbar unter dem Oberflächenepithel, ist eine große Anzahl an Primordialfollikeln zu erkennen, die meist eng beieinander liegen und so zum Teil nestartige Oozytenansammlungen bilden. Ihre Oozyten werden von wenigen sehr flachen Follikelepithelzellen umgeben. Die Oozyten der Primordialfollikel sind rund oder oval und weisen einen mittleren Durchmesser von 26,1  $\mu$ m ( $\pm$  3,2  $\mu$ m, Spannweite 18,0  $\mu$ m - 33,5  $\mu$ m) auf. Sie enthalten einen großen, meist peripher liegenden Kern mit ein bis zwei Nukleoli, der durchschnittlich 15,6  $\mu$ m ( $\pm$  2,5  $\mu$ m, Spannweite 10,0  $\mu$ m – 23,0  $\mu$ m) groß ist. Das Chromatin ist in diesem Follikelstadium nur wenig kondensiert (Bild 6).

Primärfollikel sind durch ein einschichtig isoprismatisches Follikelepithel gekennzeichnet. Die wachsenden Follikel enthalten Oozyten, deren Kern zentral oder peripher im Zytoplasma liegt. Sie weisen nun im Mittel einen Durchmesser von 31,5  $\mu$ m ( $\pm$  6,2  $\mu$ m, Spannweite 20,0  $\mu$ m - 45,5  $\mu$ m) auf. Der "germinal vesicle" ist im Vergleich zum Primordialfollikel nur gering auf einen mittleren Durchmesser von 17,1  $\mu$ m ( $\pm$  2,7  $\mu$ m, Spannweite 11,0  $\mu$ m - 21,5  $\mu$ m) angewachsen. Das Wachstum zum Primärfollikel beginnt zuerst bei Follikeln, die näher zum Mark hin liegen. An den häufig zu beobachtenden Zwischenstadien zwischen Primordial- und Primärfollikel zeigt sich, dass das Wachstum der Follikelepithelzellen an einem Pol beginnt und dem Follikel damit ein ungleichmäßiges Aussehen verleiht. Insgesamt kann das Stadium des Primärfollikels verhältnismäßig selten dargestellt werden und stellt seinerseits nur ein kurzes Übergangsstadium dar. Die Follikel sind durch eine deutliche Basalmembran vom umgebenden Stromagewebe getrennt (Bild 6 und Bild 7)

Die Entwicklung zum Sekundärfollikel erfolgt ebenfalls ungleichmäßig und ist wiederum an einem der Follikelpole deutlicher ausgeprägt (Bild 7). Sekundärfollikel sind nochmals stärker zum Zentrum des Ovars hin verlagert, besitzen eine runde bis längliche Form und weisen mehrere dichte Schichten an Follikelepithelzellen (Granulosazellen) auf. Die Zona pellucida zeigt sich erstmals deutlich und ist bei einigen der Sekundärfollikel als schmaler bis deutlicher rosafarbener Ring um die Oozyte erkennbar. Ihre Dicke nimmt mit zunehmender Follikelentwicklung stetig zu. Durchschnittlich kann im Sekundärfollikel eine Zona pellucida

Dicke von 1,8 μm (± 2,0 μm, Spannweite 0,0 μm – 8,0 μm) festgestellt werden. Gleichzeitig mit der Bildung der Zona pellucida beginnen die Granulosazellen Fortsätze zur Oozyte auszubilden. Die Oozyten sind deutlich gewachsen und weisen meist einen zentral gelegenen Kern mit ein bis zwei Nukleoli auf. In den untersuchten Hundeovarien können in Sekundärfollikeln Oozyten mit einer Größe von 26,5 μm bis 96,5 μm festgestellt werden. Das arithmetische Mittel liegt bei 62,3 μm (± 19,0 μm). In diesem Entwicklungsstadium steigt die Größe des "germinal vesicle" auf durchschnittlich 22,1 μm (± 4,6 μm, Spannweite 13,0 μm – 32,0 μm) an. Bereits im Sekundärfollikel beginnen die wandständigen Granulosazellen hochprismatische Form anzunehmen und die die Oozyte unmittelbar umgebenden Zellen die Corona radiata zu bilden. Der Follikel wird durch eine deutliche Basalmembran vom umgebenden Stroma abgegrenzt. Stromazellen in unmittelbarer Nähe zum Follikel beginnen sich parallel anzuordnen und somit eine deutliche Hülle, die Theka folliculi, zu bilden (Bild 8).

Tertiärfollikel zeigen sich in den Ovarien aller Hündinnen unabhängig vom Reproduktionsstatus. Charakteristisch für die Tertiärfollikel zeigt sich die Ausbildung des Antrum folliculi. Bei einer Hündin, die noch nicht läufig gewesen war, zeigen sich jedoch lediglich einige frühe Tertiärfollikel, die durch geringe Antrumgröße gekennzeichnet sind. Zwischen den Granulosazellen bilden sich flüssigkeitsgefüllte Spalten, die die Granulosazellen auseinander drängen und die Oozyte mitsamt den umgebenden Granulosazellen vom Rest isolieren. Mit zunehmender Bildung von Liquor folliculi und der Vergrößerung des Antrum folliculi entsteht der Cumulus oophorus, ein Granulosazellhaufen, durch den die Oozyte mit der wandständigen Granulosa verbunden ist. In der den Follikel auskleidenden Granulosazellschicht können die der Basalmembran direkt anliegenden hochprismatischen Basalzellen von den restlichen polygonalen Intermediärzellen unterschieden werden. Follikel und Oozyten sind in diesem Entwicklungsstadium nochmals deutlich gewachsen und liegen tiefer im Zentrum des Ovars. Die Messung des Oozytendurchmessers von Oozyten in Tertiärfollikeln ergibt einen durchschnittlichen Oozytendurchmesser von 96,0 µm (± 21,3 µm). Dabei weist die kleinste Oozyte einen Durchmesser von 61,5 μm und die größte einen Wert von 161,5 μm auf. Im zentral liegenden Kern der Oozyten kann nur gering kondensiertem Chromatin nachgewiesen werden (Bild 9). Der "germinal vesicle" dieser Oozyten ist im Mittel 30 μm (± 5,7 μm, Spannweite 19,5 μm – 42,0 µm) groß. Im Bereich der Zona pellucida lassen sich deutlich die Fortsätze der Cumuluszellen zur Oozyte nachweisen, deren Zellkörper nur eine undeutliche Corona radiata bilden. Gleichzeitig mit dem Wachstum der Oozyten wird auch die Zona pellucida zunehmend dicker. So beträgt der Mittelwert der Dicke der Zona pellucida in Tertiärfollikeln 13,35 μm (± 6,3 μm, Spannweite 3,5 μm - 27,5 μm). Die Follikel werden von einer deutlichen

Basalmembran und einer schwach ausgebildeten Theka folliculi umgeben (Bild 9 und Bild 10).

Große Tertiärfollikel (Graafsche Follikel) können nur bei der Hündin in der Follikelphase nachgewiesen werden. Aufgrund der starken Größenzunahme des Antrum folliculi sind die Follikel deutlich gewachsen und nehmen in diesem Entwicklungsstadium einen Großteil des Ovars ein. Die wandständige Granulosa ist mehrschichtig. Am umgebenden Stroma kann die Theka interna (epitheloide Zellen) und die Theka externa (längs verlaufende Fasern) unterschieden werden (Bild 11).

Häufig weisen die Ovarien der Hündinnen polyovulatorische Follikel auf. Erst ab dem Stadium des Sekundärfollikels können diese jedoch aufgrund der Granulosazellen und Basalmembran, die mehrere Oozyten umgeben eindeutig als solche identifiziert werden (Bild 12). Die Häufigkeit im Auftreten dieser Follikelart unterliegt individuellen Unterschieden zwischen den einzelnen Hündinnen, wobei keine Abhängigkeit vom Alter der Hündin festgestellt werden kann.

In den Ovarien aller Hündinnen zeigen sich granulosazellgefüllte Stränge, Blutgefäße sowie degenerierte Follikel. Mit Ausnahme der Hündin vor der ersten Läufigkeit, können bei allen Hündinnen Corpora lutea in verschiedenen Entwicklungsstadien dargestellt werden.

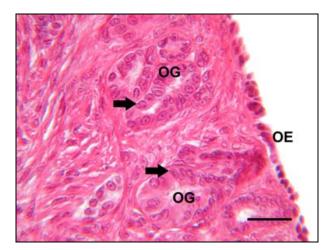


Bild 5 Oberfläche des Ovars, HE-Färbung, SB = 50 μm

Das Oberflächenepithel (OE) bildet deutliche Gänge (OG), die mit großen Zellen mit oft basal liegenden Kernen (dicke Pfeile) ausgekleidet sind.

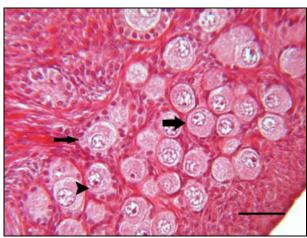


Bild 6 Rindenbereich des Ovars, HE-Färbung,  $SB = 75 \mu m$ 

In der Rinde des Ovars zeigen sich zahlreiche Primordial- (dicker Pfeil) und Primärfollikel (dünner Pfeil), sowie Übergangsformen (Pfeilspitze).

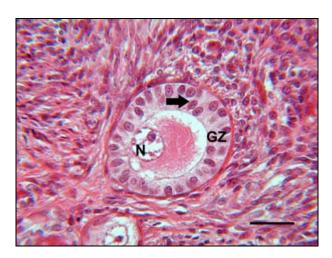


Bild 7 Früher Sekundärfollikel, HE-Färbung, SB = 50 μm

Follikel am Übergang vom Primär- zum Sekundärfollikel. Der Kern (N) liegt peripher und das Follikelepithel (Granulosazellen, GZ) wird mehrschichtig (dicker Pfeil).

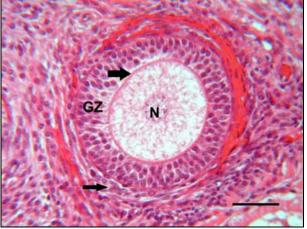


Bild 8 Sekundärfollikel, HE-Färbung, SB = 75 µm

Im Sekundärfollikel zeigen sich ein zentral liegender Kern (N) und eine mehrschichtige Granulosazellschicht (GZ). Die Zona pellucida (dicker Pfeil) ist deutlich zu erkennen. Die Theka folliculi (dünner Pfeil) beginnt sich auszubilden.

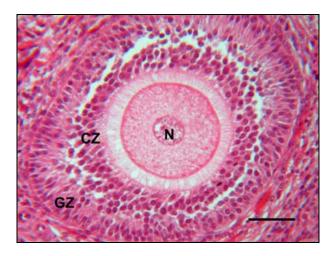


Bild 9 Früher Tertiärfollikel, HE-Färbung, SB = 75 µm

Die Cumuluszellen (CZ) und die Granulosazellen (GZ) werden durch die Bildung des Antrums getrennt. N = Kern der Oozyte

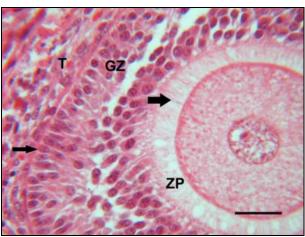


Bild 10 Gleicher Follikel wie in Bild 9, SB =  $50 \mu m$ 

Die Fortsätze der Cumuluszellen (dicker Pfeil) durch die Zona pellucida (ZP) sind deutlich zu erkennen. Die Zellen der wandständigen Granulosa (GZ) weisen basal liegende Kerne (dünner Pfeil) auf. T = Theka folliculi

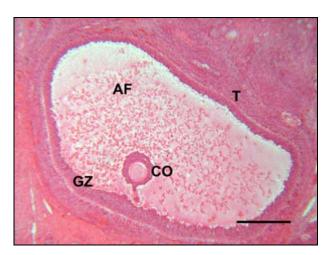


Bild 11 Reifer Tertiärfollikel, HE-Färbung,  $SB = 500 \mu m$ 

Der Cumulus oophorus (CO) ist deutlich von den wandständigen Granulosazellen (GZ) abgesetzt, das Antrum folliculi (AF) ist stark vergrößert. Die Theka folliculi (T) trennt den Follikel vom umgebenden Stromagewebe



Bild 12 Polyovulatorische Sekundärfollikel, HE-Färbung, SB = 75 μm

Mehrere Oozyten liegen zwischen dichten Granulosazelllagen (GZ).

# 4.1.2 Morphometrische Untersuchungen

Insgesamt wurden bei fünf Hündinnen die Durchmesser der Oozyten (ohne Zona pellucida) und des "germinal vesicle", sowie die Dicke der Zona pellucida von mindestens fünf und höchstens 10 Follikeln jeder Entwicklungsstufe bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9 Überblick über die Größenverhältnisse der Oozyten in Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien

	Entwicklungsstadium der Follikel		yten a pellucida)	"germina	l vesicle"	Zona pellucida		
	Anzahl	Spannweite (μm)	Arithmeth. Mittel ± SD (μm)	Spannweite (μm)	Arithmeth. Mittel ± SD (μm)	Spannweite (μm)	Arithmeth. Mittel ± SD (μm)	
PROF	48	18,0 - 33,5	26,1 ± 3,20	10,0 - 23,0	15,6 ± 2,47	-	-	
PRIM	42	20,0 - 45,5	31,5 ± 6,15	11,0 - 21,5	17,1 ± 2,69	-	-	
SF	39	26,5 - 96,5	62,3 ± 19,04	13,0 - 32,0	22,1 ± 4,61	0,0 - 8,0	1,8 ± 2,02	
TF	30	61,5 - 161,5	96,0 ± 21,34	19,5 - 42,0	30,0 ± 5,67	3,5 - 27,5	13,4 ± 6,27	

PROF = Primordialfollikel, PRIM = Primärfollikel, SF = Sekundärfollikel, TF = Tertiärfollikel, SD = Standardabweichung

Aufgrund des t-Tests berechnet sich eine hochgradig signifikante Veränderung des Oozytendurchmessers und des Durchmessers des "germinal vesicle" zwischen Primär- und Sekundärfollikel sowie zwischen Sekundär- und Tertiärfollikel (p < 0,001).

Die Dicke der Zona pellucida konnte nur bei Sekundär- und Tertiärfollikeln gemessen werden. Die Veränderung ihrer Dicke zwischen den beiden Follikelstadien ist, berechnet nach den t-Test, hochgradig signifikant (p < 0,001).

### Veränderung des Durchmessers des "germinal vesicle"

Mittels des Tests nach Spearman kann zwischen dem Durchmesser der Oozyte und dem Durchmesser des "germinal vesicle" eine hochgradig signifikant positive Korrelation berechnet werden (p < 0,01, r = 0,863) (Bild 13). Diese Korrelation findet sich bei Follikeln in allen Entwicklungsstadien (p < 0,01,  $r_{PROF}$  = 0,455,  $r_{PRIM}$  = 0,609,  $r_{SF}$  = 0,708,  $r_{TF}$  = 0,640) (Bild 14).

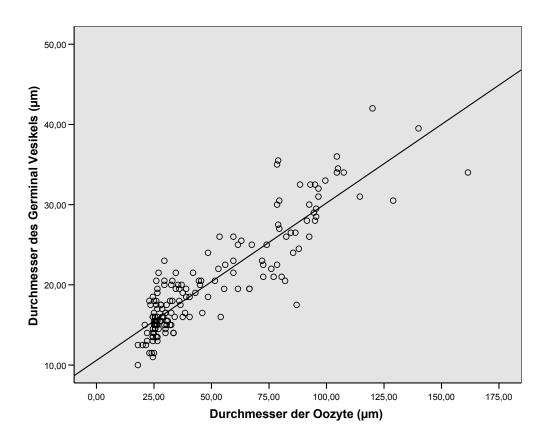


Bild 13 Abhängigkeit des Durchmessers des "germinal vesicle" vom Durchmesser der Oozyte (n = 159)

Der Durchmesser des "germinal vesicle" steigt mit zunehmender Größe der Oozyte an.

Die Korrelation zwischen dem Durchmesser der Oozyte und dem Durchmesser des "germinal vesicle" ist hochgradig signifikant (nach Spearman, zweiseitig, p < 0.01, r = 0.863).

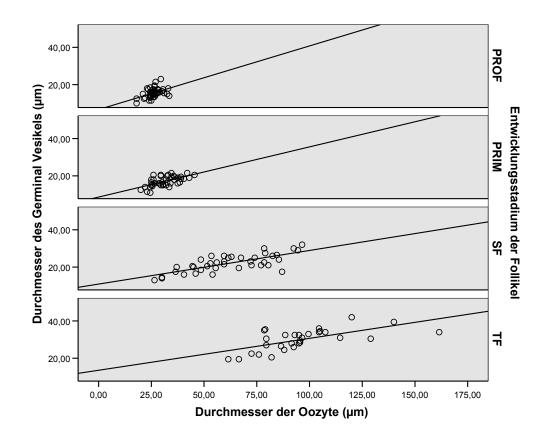


Bild 14 Abhängigkeit des Durchmessers des "germinal vesicle" vom Durchmesser der Oozyte in Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien ( $n_{PROF}$  = 48,  $n_{PRIM}$  = 42,  $n_{SF}$  = 39,  $n_{TF}$  = 30)

Der Durchmesser des "germinal vesicle" steigt in allen Follikelstadien gleichzeitig mit dem Durchmesser der Oozyte an.

Die Korrelationen zwischen dem Durchmesser der Oozyte und dem Durchmesser des "germinal vesicle" sind in allen Follikelstadien hochgradig signifikant (nach Spearman, zweiseitig, p < 0,01,  $r_{PROF}$  = 0,455,  $r_{PRIM}$  = 0,609,  $r_{SF}$  = 0,708,  $r_{TF}$  = 0,640).

PROF = Primordialfollikel, PRIM = Primärfollikel, SF = Sekundärfollikel, TF = Tertiärfollikel

#### Veränderung der Dicke der Zona pellucida

Die Berechnung der Korrelation zwischen dem Oozytendurchmesser und der Dicke der Zona pellucida zeigt ebenfalls eine hochgradig signifikant positive Korrelation (nach Spearman, p < 0,01, r = 0,739) (Bild 15). Diese zeigt sich jedoch nur, wenn das Entwicklungsstadium des Follikels unberücksichtigt bleibt. Die getrennte Berechnung der Werte zwischen Sekundärund Tertiärfollikel ergibt, dass die Korrelation im Sekundärfollikel besteht (nach Spearman, p < 0,01, r = 0,727), im Tertiärfollikel jedoch nicht mehr nachweisbar ist (nach Spearman, für p < 0,05). Ab einem Oozytendurchmesser von etwa 75  $\mu$ m beginnen die einzelnen Werte der Zona pellucida Dicke im Tertiärfollikel unabhängig vom Durchmesser der Oozyte zu streuen (Bild 16).

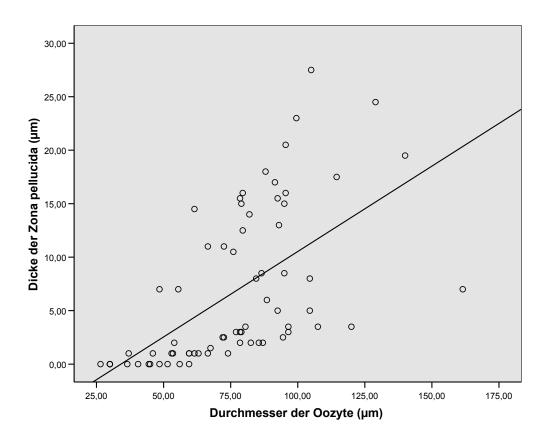


Bild 15 Abhängigkeit der Dicke der Zona pellucida vom Durchmesser der Oozyte in Sekundärund Tertiärfollikeln (n = 159)

Die Dicke der Zona pellucida steigt mit zunehmendem Oozytendurchmesser an.

Die Korrelation zwischen dem Durchmesser der Oozyte und der Dicke der Zona pellucida ist hochgradig signifikant (nach Spearman, zweiseitig, p < 0.01, r = 0.739).

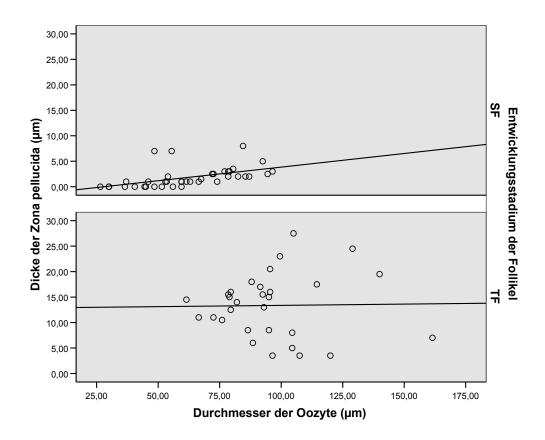


Bild 16 Abhängigkeit der Dicke der Zona pellucida vom Durchmesser der Oozyte in Sekundärund Tertiärfollikeln ( $n_{SF}$  = 39,  $n_{TF}$  = 30)

Ein Zusammenhang zwischen der Dicke der Zona pellucida und dem Durchmesser der Oozyte kann nur im Sekundärfollikel nachgewiesen werden. Im Tertiärfollikel zeigt sich eine große Streuung der Werte ab einem Oozytendurchmesser von etwa 75 µm.

Im Sekundärfollikel ist die Korrelation zwischen dem Durchmesser der Oozyte und der Dicke der Zona pellucida hochgradig signifikant (nach Spearman, zweiseitig, p < 0,01, r = 0,727).

SF = Sekundärfollikel, TF = Tertiärfollikel

# 4.1.3 Nachweis des Östrogenrezeptors α (ERα)

Der immunhistochemische Nachweis des Ostrogenrezeptors α mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen humanes ERα zeigt am Hundeovar eine deutliche Abhängigkeit der Intensität der Immunreaktion von der jeweiligen Fixierung.

In den Bouin-fixierten Präparaten können keine ERα-positiven Zellen bei Oozyten, Follikelzellen, Corpora lutea oder im Stroma nachgewiesen werden. Lediglich im Zytoplasma der Zellen des Oberflächenepithels und in dem der Zellen seiner Gangsysteme kann eine geringe positive Immunreaktion mit ERα dargestellt werden. Trotz Vorbehandlung der Präparate mit verschiedenen Methoden (Mikrowelle Citrat-Puffer oder DAKO-Puffer), kann bei dieser Fixierung keine Änderung in der Intensität der Immunreaktion am Hundeovar erzielt werden, obwohl in der Positivkontrolle (Uterus vom Hund und Euter vom Rind) stets eine starke spezifische positive Reaktion zu beobachten ist.

Anders zeigen sich die Resultate der PFA-fixierten Paraffinschnitte, bei denen eine gering bis deutlich positive Immunreaktion mit dem ERα-Antikörper erzielt werden kann. Die Präparate von zwei der Hündinnen konnten nicht ausgewertet werden, die der anderen Hündinnen zeigen eine individuell unterschiedlich intensive Immunreaktion. Eine Abhängigkeit vom Reproduktionsstatus der Hündin kann jedoch nicht festgestellt werden. Unterschiedlich intensive Ergebnisse der Immunfärbung können durch die Vorbehandlung der Präparate in der Mikrowelle mit Citrat-Puffer oder mit DAKO-Puffer erreicht werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 10 und Tab. 11.

Nach Vorbehandlung der PFA-fixierten Schnitte mit Citrat-Puffer kann ERα bei fünf der sieben Hündinnen in den Follikelepithel- und Granulosazellen in Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien nachgewiesen werden (Bild 17). Die ERα positiven Zellen zeigen dabei hauptsächlich eine nukleäre, in geringeren Maße auch eine zytoplasmatische Reaktion.

Die Zellen des Follikelepithels in Primordialfollikeln reagieren mit dem ERα-Antikörper schwach positiv (Bild 19). Im Verlauf des Follikelwachstums vom Primär- zum Sekundär- und Tertiärfollikel nimmt die Menge an immunreaktivem ERα in den Zellen des Follikelepithels stetig zu (Bild 20 und Bild 21). Ab der Entwicklungsstufe des Sekundärfollikels können Unterschiede in der Intensität der Immunreaktion zwischen den einzelnen Granulosa- und Cumuluszellen eines Follikels beobachtet werden (Bild 20 und Bild 23), wobei eine stärkere Bindung des Antikörpers bei Granulosazellen im Bereich der Basalmembran zu finden ist (Bild 20).

Im Ooplasma zeigt der Antikörper gegen ERα eine schwache Bindung bei Oozyten aus Follikeln vom Primordial- bis zum Stadium des frühen Sekundärfollikels (Bild 19). Dagegen

weist der Kern der Oozyten in Follikeln aller Entwicklungsstadien keinerlei positive Immunreaktion auf ERα auf (Bild 19, Bild 20 und Bild 23).

Bei Tertiärfollikeln kann im Bereich der Theka folliculi eine positive Antwort auf den ERα-Antikörper dargestellt werden. Es reagieren jedoch nur die Zellen der Theka interna, nicht aber die Zellen der Theka externa, schwach bis deutlich ERα-positiv (Bild 22).

Im Stromagewebe kann in einigen Regionen des Ovars ebenfalls eine schwach bis deutlich positive Immunreaktion mancher Fibrozyten mit dem Antikörper beobachtet werden (Bild 18). Daneben kann ERα in den Luteinzellen des Corpus luteum, in den Strängen persistierender Granulosazellen, sowie in den Follikelepithelzellen von degenerierenden Follikeln nachgewiesen werden.

Bei allen untersuchten Hündinnen gelingt der immunhistochemische Nachweis von ERα in den Kernen der Zellen des Oberflächenepithels sowie in den Kernen der Zellen der Gangsysteme (Bild 17 und Bild 18), wobei im Oberflächenepithel meist nur einige der Zellen eine positive Immunreaktion aufweisen. Die positiven Zellen zeigen stets eine sehr deutliche Reaktion.

In Zellen, in denen der Kern oder das Zytoplasma positiv auf ERα reagieren, zeigt sich gleichzeitig eine unterschiedlich intensive positive Immunreaktion der Nukleoli der jeweiligen Zellen. Im Gegensatz zum Kern und Ooplasma der Oozyten, in dem keine oder nur eine schwache positive Immunreaktion dargestellt werden kann, ist dies auch in den Nukleoli von Oozyten aller Follikelstadien zu beobachten (Bild 19, Bild 20 und Bild 23).

Ähnliche Ergebnisse können durch Vorbehandlung der PFA-fixierten Präparate mit DAKO-Puffer erzielt werden. Positive Immunreaktionen auf ERα zeigen sich in den gleichen Zellen wie nach der Vorbehandlung mit Citrat-Puffer, die Intensität der Reaktion in den Kernen und im Zytoplasmas positiver Zellen ist jedoch deutlich schwächer. Ausnahme hiervon stellt das Oberflächenepithel und die Gangsysteme dar, die stets sehr deutlich positiv auf ERα reagieren. Auffälligstes Merkmal ist die sehr deutliche Immunreaktion der Nukleoli mit dem ERα-Antikörper bei gleichzeitig fehlender oder sehr schwacher immunpositiver Reaktion des Kernes (Bild 24, Bild 25 und Bild 26).

Tab. 10 Immunhistochemischer Nachweis von ERα nach Vorbehandlung mit Citrat-Puffer

	Paratia El		Follikelepithelzellen								07/00	070	
Hündin	Fix	RS	PROF	PRIM	SF	TF	interna	OP	Nukleoli	CL	OE/OG	GZS	Stroma
1	В	Präpubertal	-	-	-	-	-	-	-	keine	OE + OG ±	-	-
2	В	Lutealphase	-	-	-	-	-	-	-	-	OE + OG +	-	-
3	В	Follikelphase	-	-	-	-	-	-	-	-	OE - OG ±	-	-
4	В	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	-	OE ± OG +	-	-
5	В	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	-	OE ± OG +	-	-
6a	В	Trächtig 10.Tag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	В	Trächtig 14.Tag	-	-	-	-	-	-	-	-	OE + OG ++	-	+ manche
6b	PFA	Trächtig 10.Tag	+	++	++	++	+	++	+++	+	OE + OG ++	+	+ manche
8	PFA	Anöstrus	-	-	-	+	+	-	-	keine	OE ++ OG +++	±	-
9	PFA	Lutealphase	+	+	++	++	++	+ nur kleine	-	±	OE +++ OG +++	+	-
10	PFA	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	keine	OE +++ OG +++	-	+++ manche
11	PFA	Anöstrus	-	+	++	++	+	+ nur kleine	+	keine	OE +++ OG +++	+	-
13	PFA	Anöstrus	-	±	+	++	+	+ nur kleine	+	keine	OE +++ OG +++	+	±
15	PFA	Lutealphase	-	-	-	-	-	-	+	-	OE +++ OG +++	-	-
	kontrolle	B	Uterus H Euter R		utlich positive I	mmunreakt		e der Epithelze					•

<sup>-</sup> keine positive Immunreaktion

+ schwach

+++ sehr deutlich

Fix = Fixierung, B = Bouin, PFA = Paraformaldehyd, RS = Reproduktionsstatus, PROF = Primordialfollikel, PRIM = Primärfollikel, SF = Sekundärfollikel, TF = Tertiärfollikel, OP = Ooplasma, CL = Corpus luteum, OE = Oberflächenepithel, OG = Gänge des Oberflächenepithels, GZS = Granulosazellstränge

<sup>±</sup> unklar

<sup>++</sup> deutlich

Tab. 11 Immunhistochemischer Nachweis von ERα nach Vorbehandlung mit DAKO-Puffer

Hündin Fix	RS	Follikelepithelzellen				Theka	ОР	Nukleoli	CL	OE/OG	GZS	Stroma	
		PROF	PRIM	SF	TF	interna		Nukieoli		OL/OG	GZS	Strollia	
6 8-15	PFA	untersch.	±	±	±	±	±	± nur kleine	+++	±	OE ++ OG +++	±	-
1-7	В	untersch.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positiv	kontrolle	В	Uterus Hu Euter Rir	1 1 1	1 I lautlich nacitiva immunication der Karna der Enithalzallan								

<sup>-</sup> keine positive Immunreaktion

± unklar

+ schwach

++ deutlich

+++ sehr deutlich

Fix = Fixierung, B = Bouin, PFA = Paraformaldehyd, RS = Reproduktionsstatus, untersch. = unterschiedlich, PROF = Primordialfollikel, PRIM = Primärfollikel, SF = Sekundärfollikel, TF = Tertiärfollikel, OP = Ooplasma, CL = Corpus luteum, OE = Oberflächenepithel, OG = Gänge des Oberflächenepithels, GZS = Granulosazellstränge

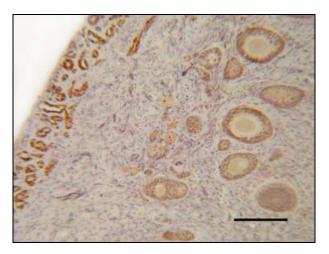


Bild 17 Rindenbereich des Ovars,  $IHC\text{-Nachweis von ER}\alpha\text{, Citrat-Puffer,}$   $SB=250~\mu m$ 

Follikel in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie die Gänge des Oberflächenepithels reagieren deutlich immunpositiv.

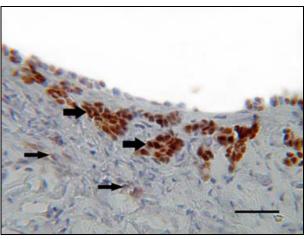


Bild 18 Oberfläche des Ovars, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 50  $\mu m$ 

Es zeigt sich eine sehr deutlich positive Immunreaktion der Gänge des Oberflächenepithels (dicke Pfeile) sowie eine schwach positive Immunreaktion in einigen Stromazellen (dünne Pfeile).

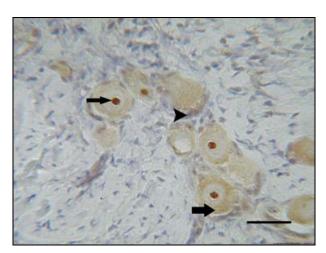


Bild 19 Primordialfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 50  $\mu$ m

Das Ooplasma (dicker Pfeil), die Nukleoli (dünner Pfeil) und das Follikelepithel (Pfeilkopf) zeigen eine unterschiedlich deutliche positive Immunreaktion.

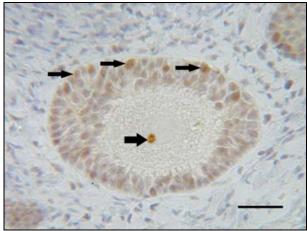


Bild 20 Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von  $ER\alpha,\, Citrat\text{-Puffer},\, SB = 50\; \mu m$ 

ERα kann in unterschiedlich deutlicher Immunreaktion in den Kernen der Granulosazellen vor allem basal (dünne Pfeile), sowie deutlich in den Nukleoli (dicker Pfeil) nachgewiesen werden.



Bild 21 Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 250  $\mu$ m

Im Tertiärfollikel reagieren die Granulosazellen (GZ) und die Theka folliculi (T) deutlich positiv auf  $\text{ER}\alpha.$ 

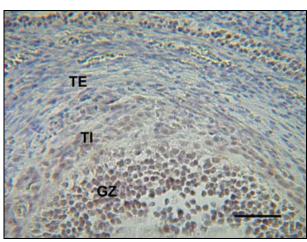


Bild 22 Gleicher Follikel wie in Bild 21, Citrat-Puffer, SB = 75  $\mu$ m

Die Granulosazellen (GZ) und die Theka interna (TI) reagieren deutlich immunpositiv. In der Theka externa (TE) ist keine positive Immunreaktion zu beobachten.

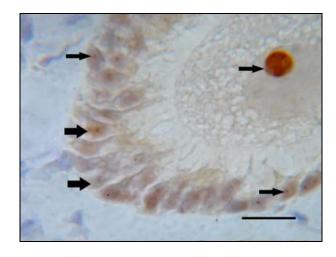


Bild 23 COC eines Tertiärfollikels,  $IHC\text{-Nachweis von ER}\alpha\text{, Citrat-Puffer,}$   $SB=25~\mu\text{m}$ 

Unterschiedlich deutliche Immunreaktion der Cumuluszellen (dicker Pfeil) einer COC. Die Nukleoli reagieren deutlich positiv auf  $\text{ER}\alpha$  (dünne Pfeile).

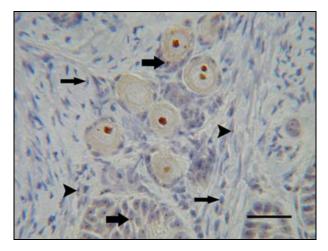


Bild 24 Primordialfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , DAKO-Puffer, SB = 50  $\mu$ m

Sehr deutlich positive Immunreaktion der Nukleoli des Follikelepithels (dicke Pfeile), sowie einiger Stromazellen (Pfeilkopf). Daneben finden sich auch immunnegative Stromazellen (dünne Pfeile).

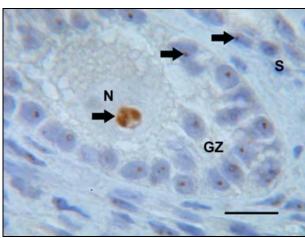


Bild 25 Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , DAKO-Puffer, SB = 25  $\mu$ m

Die Nukleoli im Kern der Oozyte (N), in den Granulosazellen (GZ) und in einigen Zellen des Stromas (S) zeigen eine sehr deutlich positive Immunreaktion (Pfeile).

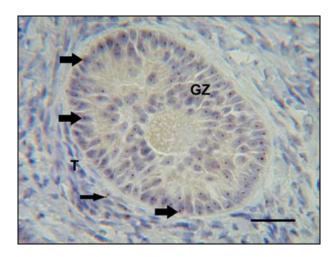


Bild 26 Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , DAKO-Puffer, SB = 50  $\mu$ m

Nukleoli in den Kernen der Granulosazellen (dicke Pfeile, GZ) und in den Zellen der Theka folliculi (dünner Pfeil, T) reagieren deutlich immunpositiv auf ER $\alpha$ .

# 4.1.4 Nachweis des Östrogenrezeptors $\beta$ (ER $\beta$ )

Für den immunhistochemischen Nachweis von ER $\beta$  im Hundeovar wurde ein polyklonaler Primärantikörper verwendet, dessen optimale Konzentration zunächst in einem Vorversuch getestet wurde (1  $\mu$ g/ml – 7,1  $\mu$ g/ml).

Ähnlich den Ergebnissen beim Nachweis von ERα, kann auch bei ERβ eine deutliche Abhängigkeit der Intensität der Immunreaktion von der Fixierung des Gewebes festgestellt werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich in Tab. 12.

Bei den Bouin-fixierten Proben kann bei Verwendung einer ER $\beta$ -Antikörperkonzentration zwischen 1 µg/ml und 7,1 µg/ml keine Bindung an das Gewebe des Hundeovars beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 2 µg/ml zeigt sich bei Präparaten mit dieser Fixierung jedoch eine unspezifische Reaktion in den Erythrozyten und im Plasma. In der verwendeten Positivkontrolle (Prostata Hund) ist bei allen verwendeten Konzentrationen des Antikörpers eine spezifische, deutlich positive Reaktion auf ER $\beta$  zu beobachten.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den PFA-fixierten Proben eine spezifische Bindung des ERβ-Antikörpers ab einer Konzentration von 33,3 μg/ml bei Hündinnen, die ein Corpus luteum in Bildung besitzen. ERβ kann bei solchen Tieren in den Follikelepithelzellen von Primordial- bis Tertiärfollikeln (Bild 27), in den Granulosazellsträngen, in den Zellen des Oberflächenepithels und seiner Gangsysteme, wie auch in den Lutein- und sonstigen Zellen des Corpus luteums nachgewiesen werden. Die Intensität der Immunreaktion ist meist schwach und von Zelle zu Zelle verschieden, aber spezifisch. Positiv reagiert dabei sowohl der Kern als auch das Zytoplasma der Zellen. Die Luteinzellen weisen in den Randbereichen des Corpus luteums stets eine deutlichere Immunreaktion mit dem Antikörper auf als solche, die im Zentrum liegen (Bild 29).

Bei älteren Corpora lutea können keine ERβ-positiven Zellen nachgewiesen werden. Dies ändert sich bei Hündinnen im Anöstrus, die nur noch Corpora lutea in Rückbildung aufweisen. Die Immunreaktion in den degenerierenden Luteinzellen fällt dann deutlich positiv aus (Bild 28).

Tab. 12Immunhistochemischer Nachweis von ERβ

ndin Fix	De		Follike	lepithel		Theka	OP	Nuklaali	CI	OE/OG	GZS	Stroma
1 12	No	PROF	PRIM	SF	TF	interna	OF .	Nukleon	OL .			
PFA	Trächtig 10.Tag	±	±	±	±	-	-	-	± bis + Bildung	OE ± OG ±	±	-
PFA	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	+ bis ++ RB	-	-	-
PFA	Lutealphase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PFA	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	+ bis ++ RB	ı	1	-
PFA	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PFA	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	+ bis ++ RB	-	-	-
PFA	Lutealphase	±	±	±	±	±	-	-	± bis + Bildung	OE ± OG ±	±	+ manche
PFA	Lutealphase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
В		In keinem der in Bouin fixierten Präparate kann ERβ Antigen nachgewiesen werden										
kontrolle	PFA	PFA Prostata Hund Deutlich positive Immunreaktion										
	PFA PFA PFA PFA PFA B sontrolle	PFA Trächtig 10.Tag  PFA Anöstrus  PFA Lutealphase  PFA Anöstrus  PFA Anöstrus  PFA Anöstrus  PFA Lutealphase  PFA Lutealphase  B	PFA Trächtig 10.Tag ±  PFA Anöstrus -  PFA Lutealphase -  PFA Anöstrus -  PFA Anöstrus -  PFA Anöstrus -  PFA Lutealphase ±  PFA Lutealphase -  B  Controlle PFA Prostata H	Fix         RS         PROF         PRIM           PFA         Trächtig 10.Tag         ±         ±           PFA         Anöstrus         -         -           PFA         Lutealphase         -         -           PFA         Anöstrus         -         -           PFA         Anöstrus         -         -           PFA         Lutealphase         ±         ±           PFA         Lutealphase         -         -           B         In ke           controlle         PFA         Prostata Hund         Deur	PROF         PRIM         SF           PFA         Trächtig 10.Tag         ±         ±         ±           PFA         Anöstrus         -         -         -           PFA         Lutealphase         -         -         -           PFA         Anöstrus         -         -         -           PFA         Anöstrus         -         -         -           PFA         Lutealphase         ±         ±         ±           PFA         Lutealphase         -         -         -           B         In keinem der in Exontrolle           Roontrolle         PFA         Prostata Hund         Deutlich positive	Fix         RS         PROF         PRIM         SF         TF           PFA         Trächtig 10.Tag         ±	Fix         RS         PROF         PRIM         SF         TF         Internal	Fix         RS         PROF         PRIM         SF         TF         Internal internal internal internal         OP internal internal internal internal           PFA         Trächtig 10.Tag         ±         ±         ±         ±         ±         ± </td <td>Fix         RS         PROF         PRIM         SF         TF         Internal internal internal         OP Nukleoli internal           PFA         Trächtig 10.Tag         ±         ±         ±         ±         ±         -</td> <td>  PROF   PRIM   SF   TF   Internal   OP   Nukleoli   CL    </td> <td>Fix         RS         PROF         PRIM         SF         TF         internal interna</td> <td>  Fix   RS   PROF   PRIM   SF   TF   Interna   OP   Nukleoli   CL   OE/OG   GZS    </td>	Fix         RS         PROF         PRIM         SF         TF         Internal internal internal         OP Nukleoli internal           PFA         Trächtig 10.Tag         ±         ±         ±         ±         ±         -	PROF   PRIM   SF   TF   Internal   OP   Nukleoli   CL	Fix         RS         PROF         PRIM         SF         TF         internal interna	Fix   RS   PROF   PRIM   SF   TF   Interna   OP   Nukleoli   CL   OE/OG   GZS

<sup>-</sup> keine positive Immunreaktion

Fix = Fixierung, B = Bouin, PFA = Paraformaldehyd, RS = Reproduktionsstatus, PROF = Primordialfollikel, PRIM = Primärfollikel, SF = Sekundärfollikel, TF = Tertiärfollikel, OP = Ooplasma, CL = Corpus luteum, RB = Rückbildung, OE = Oberflächenepithel, OG = Gänge des Oberflächenepithels, GZS = Granulosazellstränge

<sup>±</sup> unklar +

<sup>+</sup> schwach

<sup>++</sup> deutlich

<sup>+++</sup> sehr deutlich

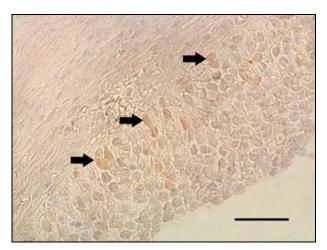


Bild 27 Granulosazellen eines Tertiärfollikels,  $IHC\text{-Nachweis von ER}\beta,\,SB=25\,\mu\text{m}$ 

In den Granulosazellen finden sich wenige schwach ER $\beta$ -positive Zellen (Pfeile).

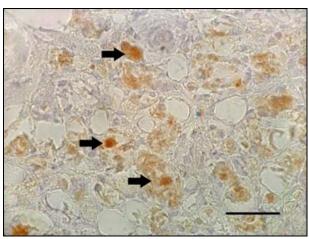


Bild 28 Corpus luteum in Rückbildung,  $IHC\text{-Nachweis von ER}\beta,\,SB=25\,\mu\text{m}$ 

Schwach bis deutlich positive Immunreaktion in den Luteinzellen eines Corpus luteum in Rückbildung (Pfeile).

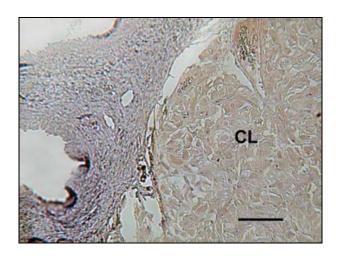


Bild 29 Corpus luteum in Bildung,  $IHC\text{-Nachweis von ER}\beta,\,SB=100\;\mu\text{m}$ 

In den Lutein- und den sonstigen Zellen des Corpus luteum (CL) zeigt sich vor allem im Randbereich eine schwach positive Immunreaktion.

## 4.1.5 Nachweis von Ki-67

Der Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 mit dem MIB-1 Antikörper gelang nur bei den PFA-fixierten Präparaten. In den Bouin-fixierten Hundeovarien kann keine positive Immunreaktion dargestellt werden, obwohl die Positivkontrollen (Hoden und Karzinom) deutlich positive Zellen zeigen.

Positive Zellen zeigen eine schwach bis deutlich rosarote Färbung im Bereich des Kernes.

Zellproliferation kann mittels des MIB-1-Antikörpers vom Primär- bis zum Tertiärfollikel in den Follikelepithel- und den Granulosazellen nachgewiesen werden. Im Follikelepithel der Primärfollikel finden sich selten mitotisch aktive Zellen, die Anzahl solcher nimmt mit zunehmendem Wachstum und der Entwicklung zum Sekundärfollikel deutlich zu. Dabei zeigt sich, dass Mitosen in den Granulosazellen von Sekundärfollikeln gleichmäßig über den Follikel verteilt sind (Bild 30), während der Bildung des Tertiärfollikels jedoch ausschließlich in den sich bildenden Cumuluszellen, nicht aber in der wandständigen Granulosa, zu finden sind (Bild 31 und Bild 32). Ab dem Entwicklungsstadium des Tertiärfollikels können immunpositive Zellen sowohl in der wandständigen Granulosa, als auch im Cumulus oophorus beobachtet werden (Bild 33).

Follikelepithelzellen in Primordialfollikeln zeigen keine nachweisbare Reaktion mit dem Antikörper.

Vereinzelte Ki-67 positiv reagierende Zellen finden sich unter den Zellen der Theka folliculi, den Fibrozyten des Stromas (Bild 30), den Luteinzellen der Corpora lutea, den Endothelzellen von Blutgefäßen sowie im Oberflächenepithel und auch unter den Epithelzellen der Gänge des Oberflächenepithels.

Aufgrund der geringen Anzahl an auswertbaren Follikeln wurde auf die Auszählung pro Gesamtzellzahl und damit auf eine statistische Auswertung verzichtet

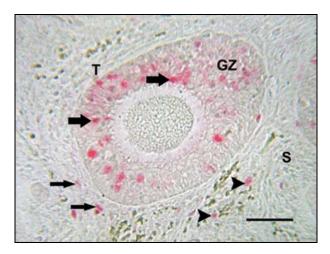


Bild 30 Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67, SB = 75 μm

Zellproliferation zeigt sich in den Granulosazellen (GZ, dicke Pfeile), der Theka folliculi (T, dünne Pfeile) und in den Fibrozyten des Stromas (S, Pfeilkopf).



Bild 31 Früher Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67, SB = 75 μm

Während der Bildung des Tertiärfollikels proliferieren hauptsächlich die Cumuluszellen (CZ). GZ = Granulosazellen

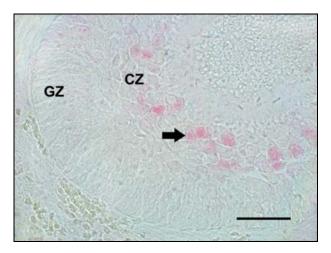


Bild 32 Früher Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67, SB = 25  $\mu$ m

Deutlich positive Immunreaktion in den Cumulus-(CZ, Pfeil), nicht aber in den Granulosazellen (GZ).

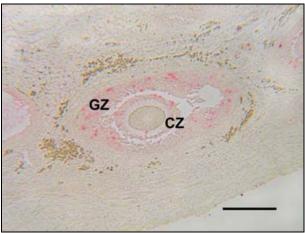


Bild 33 Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67,  $SB = 250 \mu m$ 

In Tertiärfollikeln kann die Zellproliferation wieder in Cumulus- (CZ) und Granulosazellen (GZ) nachgewiesen werden.

# 4.1.6 Nachweis der Matrix Metalloproteinase (MMP) -1, -2, und -14 sowie des Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase (TIMP) -2

Im Ovar der Hündin konnten sowohl MMP-1, MMP-2, MMP-14 als auch TIMP-2 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Intensität der Immunreaktion zeigt bei den verschiedenen Hündinnen jedoch gewisse Unterschiede. Ein Überblick über die Verteilung der nachgewiesenen MMPs und TIMP bei den einzelnen Hündinnen gibt Tab. 13.

#### Nachweis von MMP-1

Der Nachweis von MMP-1 gelingt in verschiedenen Zellen des Hundeovars. Eine Reaktion mit dem Antikörper findet dabei hauptsächlich im Zytoplasma, in geringerer Intensität aber auch im Kern der immunpositiven Zellen statt. Schwach bis deutlich positiv zeigt sich die Immunreaktion in den Follikelepithel- und Granulosazellen von Follikeln in allen Entwicklungsstadien (Bild 34 bis Bild 37), die Intensität der Reaktion in diesen Zellen verändert sich jedoch mit zunehmendem Follikelwachstum vom Primordial- bis zum Tertiärfollikel nicht. Das Zytoplasma der Oozyten zeigt stets eine gleichmäßige positive Reaktion auf MMP-1 (Bild 35, Bild 36 und Bild 37). In den Oozyten von kleineren Follikeln (Primordial- bis frühe Sekundärfollikel) weist das Chromatin und die Kernmembran eine deutlich positive Reaktion mit dem MMP-1-Antikörper auf, die bei weiter entwickelten Follikeln nicht mehr nachzuweisen ist (Bild 35 und Bild 36). Deutlich MMP-1-positive Zellen zeigen sich ebenfalls in der Theka interna (Bild 37), in den Luteinzellen des Corpus luteums, im Oberflächenepithel und seinen Gängen vor allem im apikalen Bereich (Bild 38), in den Granulosazellsträngen sowie in Stromazellen. Bereiche der extrazellulären Matrix weisen eine schwach positive Immunreaktion auf. Das Endothel und die Muskulatur der Blutgefäße reagiert stets deutlich positiv auf den verwendeten Antikörper (Bild 39).

## Nachweis von MMP-2

Eine positive Immunreaktion mit dem Antikörper gegen MMP-2 kann nur in wenigen Zellen des Hundeovars nachgewiesen werden. Schwach bis deutlich positiv reagieren lediglich Zellen des Oberflächenepithels, Epithelzellen dessen Gangsystems, einige Fibrozyten des Stromas sowie Zellen des Endothels der Blutgefäße. Eine Bindung des Antikörpers kann dabei im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass nur einige der Zellen dieser Gewebe positiv mit dem MMP-2-Antikörper reagieren und, dass deutliche individuelle Unterschiede zwischen den Hündinnen im Auftreten solch positiver Areale bestehen (Bild 40, Bild 41 und Bild 42).

## Nachweis von MMP-14

MMP-14, ein membrangebundenes MMP, kann in den Ovarien aller untersuchten Hündinnen immunhistochemisch nachgewiesen werden. MMP-14 positiv reagierende Zellen weisen ein zytoplasmatisches sowie ein geringeres nukleäres Signal auf. Der für die Untersuchungen verwendete polyklonale MMP-14-Antikörper zeigt eine unterschiedlich intensive positive Reaktion mit dem Antigen in den Follikelepithel- und Granulosazellen von Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien. Dabei zeigt sich eine Zunahme der Intensität der Reaktion mit MMP-14 mit zunehmendem Follikelwachstum, so dass in Tertiärfollikeln die deutlichste Immunfärbung zu verzeichnen ist. Während MMP-14 bis zur Stufe des Sekundärfollikels relativ gleichmäßig im Zytoplasma und Kern aller Follikelepithel- und Granulosazellen verteilt ist (Bild 43 und Bild 44), kann ab dem Stadium des Tertiärfollikels eine deutliche Ansammlung von MMP-14 im Zytoplasma dieser Zellen dargestellt werden. Die einzelnen positiv reagierenden Zellen weisen dabei unterschiedlich intensive Immunreaktionen auf (Bild 45 und Bild 46). Ebenso zeigt sich, dass die dem Antrum zugewandten Zellen der Granulosa sowie die Zellen des Cumulus oophorus vor allem in großen Tertiärfollikeln eine deutlichere Immunreaktion als weiter an der Basalmembran liegende Zellen aufweisen (Bild 47 und Bild 48). In den Oozyten selbst kann eine vom Entwicklungsstadium unabhängige, schwache zytoplasmatische Bindung des Antikörpers nachgewiesen werden. Bei drei der Hündinnen zeigt sich eine deutlich positive Immunreaktion der Oozytenmembran. Die Zellen der Theka folliculi, die Luteinzellen der Corpora lutea, das Oberflächenepithel und seine Gänge (Bild 49), die Zellen der Granulosazellstränge, Anteile der extrazellulären Matrix sowie die Epithel- und Muskelzellen der Blutgefäße reagieren ebenso schwach bis deutlich immunpositiv auf MMP-14. Verglichen mit MMP-1 kann MMP-14 stärker auch in den Zellen des Stromas nachgewiesen werden.

### Nachweis von TIMP-2

Die Expression von TIMP-2 variiert von Hündin zu Hündin deutlich und stärker als die der untersuchten MMPs. Bei vier der Hündinnen zeigt sich eine zunehmend intensiver werdende Immunreaktion der Follikelepithel- und Granulosazellen mit fortschreitender Follikelentwicklung. Während TIMP-2 bei diesen Hündinnen in den Follikelepithelzellen von Primordialfollikeln meist gar nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden kann (Bild 50), zeigen die Zellen von reiferen Follikeln intensivere Immunreaktionen. TIMP-2-Antigen kann dabei vor allem im Zytoplasma, in geringer Menge aber auch in den Kernen von positiv reagierenden Zellen nachgewiesen werden (Bild 51 und Bild 52). In den Ovarien der anderen untersuchten Hündinnen können keine Unterschiede in der Intensität der Immunreaktion

zwischen den einzelnen Follikelstadien festgestellt werden. Positive Zellen zeigen bei diesen Tieren meist nur eine schwache TIMP-2-positive Reaktion (Bild 53). Das Zytoplasma der Oozyten reagiert bei den einzelnen Hündinnen unterschiedlich deutlich mit dem verwendeten Antikörper. Zusätzlich findet sich eine unterschiedliche Immunreaktion des Ooplasmas bei Oozyten aller Entwicklungsstadien (Bild 50 bis Bild 53). In den Tertiärfollikeln mancher Hündinnen kann bei einigen Oozyten eine deutliche Bindung des TIMP-2-Antikörpers am Rand des Ooplasmas beobachtet werden (Bild 53). Eine Reaktion mit dem Antikörper zeigt sich auch bei manchen Oozyten an der Kernmembran von Primordial- bis frühen Sekundärfollikel. Die Luteinzellen des Corpus luteum, die Zellen des Oberflächenepithels und dessen Gangsystemen, die Zellen der Granulosazellstränge, die Fibrozyten im Stroma, Anteile der extrazellulären Matrix sowie die Epithel- und Muskelzellen der Blutgefäße reagieren schwach bis deutlich positiv auf TIMP-2.

Tab. 13 Immunhistochemischer Nachweis von MMP-1, MMP-2, MMP-14 und TIMP-2

AK gegen	Hündin	RS	Follikelepithelzellen				Theka	0.5	Kern			05/00	676	01	BG
			PROF	PRIM	SF	TF	folliculi	OP	Oozyte	MB	CL	OE/OG	GZS	Stroma	BG
MMP-1	1	Präpubertal	+	+	+	+	+	+	+ kleine	+	keine	OE + OG +	+	++	+++
	2	Lutealphase	++	++	++	++	+	++	++ kleine	+++	++	OE + OG +	++	+	+++
	3	Follikelphase	-	+	+	+	+	+ große	++ kleine	++	+	OE ++ OG ++	-	-	+
	4	Anöstrus	++	++	++	++	++	++ kleine	+	++	-	OE ++ OG +	++	+	++
	5	Anöstrus	+	+	+	++	+	++ kleine	+ kleine	+	+++	OE +++ OG +++	+	++	+++
	6	Trächtig 10.Tag	+	++	++	++	+	+	+	+	+	keine	++	+	++
	7	Trächtig 14.Tag	-	+	+	+	-	+	+ kleine	±	-	OE kein OG ++	+	++	++
MMP-2	1	Präpubertal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	Lutealphase	-	-	-	-	-	-	-	-	+ RB	-	-	-	+ manche
	3	Follikelphase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OE ± OG ±	-	-	-
	4	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OE ± OG ±	-	-	+ manche
	5	Anöstrus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OE - OG ±	-	++ manche	++ manche
	6	Trächtig 10.Tag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OE - OG +++	ı	++ manche	-
	7	Trächtig 14.Tag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OE +++ OG +	-	+++ manche	-

Hündin	RS	Follikelepithelzellen				Theka		Kern		01	05/06	070		
		PROF	PRIM	SF	TF	folliculi	ОР	Oozyte	МВ	CL	OE/OG	GZS	Stroma	BG
1	Präpubertal	+	+	++	++	+	+	±	±	keine	OE +++ OG +	++	++	+++
2	Lutealphase	+	++	++	++	++	++	±	+	+	OE +++ OG+++	++	++	+++
3	Follikelphase	-	-	++	+++	++	+ große	±	+	++	OE +++ OG +++	++	++	+++
4	Anöstrus	+	++	++	++	+	+	±	+	±	OE +++ OG ++	++	++	++
5	Anöstrus	+	+	++	++	++	+	±	-	++	OE +++ OG ++	++	++	+++
6	Trächtig 10.Tag	+	++	++	+++	+	+	±	±	++	OE +++ OG ++	++	++ manche	++
7	Trächtig 14.Tag	+	++	++	++	++	+	±	±	+	OE + OG +	++	++	++
1	Präpubertal	-	±	+	+	±	+	±	+	keine	OE +++ OG +	+	+ manche	+
2	Lutealphase	-	±	+	+	±	+	± kleine	-	++	OE + OG ±	+	±	++
3	Follikelphase	-	±	±	±	-	-	-	+	±	OE + OG +	±	±	±
4	Anöstrus	+	+	++	++	+	+ große	±	+	++	OE ++ OG +	+	+	++
5	Anöstrus	±	±	±	±	±	+	-	±	+	OE ++ OG ±	-	±	±
6	Trächtig 10.Tag	±	+	+	++	+	++	± kleine	+	+	OE ++ OG +	+	+	+
7	Trächtig 14.Tag	±	±	±	±	±	±	-	-	±	OE ± OG ±	±	±	±
	1 2 3 4 5 6 7	1 Präpubertal 2 Lutealphase 3 Follikelphase 4 Anöstrus 5 Anöstrus 6 Trächtig 10.Tag 7 Trächtig 14.Tag 1 Präpubertal 2 Lutealphase 3 Follikelphase 4 Anöstrus 5 Anöstrus 6 Trächtig 10.Tag 7 Trächtig 11 Präpubertal 12 Lutealphase 13 Follikelphase 14 Anöstrus 15 Anöstrus 16 Trächtig 10.Tag 17 Trächtig 10.Tag 17 Trächtig	1         Präpubertal         +           2         Lutealphase         +           3         Follikelphase         -           4         Anöstrus         +           5         Anöstrus         +           6         Trächtig 10.Tag         +           7         Trächtig 14.Tag         +           1         Präpubertal         -           2         Lutealphase         -           3         Follikelphase         -           4         Anöstrus         +           5         Anöstrus         ±           6         Trächtig 10.Tag         ±           7         Trächtig 14.Tag         ±	Hündin         RS         PROF         PRIM           1         Präpubertal         +         +           2         Lutealphase         +         ++           3         Follikelphase         -         -           4         Anöstrus         +         ++           5         Anöstrus         +         +           6         Trächtig 10.Tag         +         ++           7         Trächtig 14.Tag         -         ±           4         Anöstrus         -         ±           4         Anöstrus         +         +           5         Anöstrus         ±         ±           6         Trächtig 10.Tag         ±         +           7         Trächtig 14.Tag         ±         ±	Hündin         RS         PROF         PRIM         SF           1         Präpubertal         +         +         ++           2         Lutealphase         +         ++         ++           3         Follikelphase         -         -         ++           4         Anöstrus         +         ++         ++           5         Anöstrus         +         ++         ++           6         Trächtig 14.Tag         +         ++         ++           7         Trächtig 10.Tag         +         ++         ++           2         Lutealphase         -         ±         +           3         Follikelphase         -         ±         ±           4         Anöstrus         +         +         ++           5         Anöstrus         ±         ±         ±           6         Trächtig 10.Tag         ±         +         +           7         Trächtig 14.Tag         ±         ±         ±	Hündin         RS         PROF         PRIM         SF         TF           1         Präpubertal         +         +         ++	Name	No	Note	Name	Hündin         RS         PROF         PRIM         SF         TF         folliculi         OP         Oozyte         MB         CL           1         Prāpubertal         +         +         +         ++         ++         ++         +         +         +         ++<	Name	Hündin   RS   PROF   PRIM   SF   TF   Foliculi   Präpubertal   +	Hündin   RS

<sup>-</sup> keine positive Immunreaktion

AK = Antikörper, MMP = Matrix Metalloproteinase, TIMP = Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase, RS = Reproduktionsstatus, PROF = Primordialfollikel, PRIM = Primärfollikel, SF = Sekundärfollikel, TF = Tertiärfollikel, OP = Opplasma, MB = Membranen, CL = Corpus luteum, RB = Rückbildung, OE = Oberflächenepithel, OG = Gänge des Oberflächenepithels, GZS = Granulosazellstränge, BG = Blutgefäße

<sup>±</sup> unklar

<sup>+</sup> schwach

<sup>++</sup> deutlich

<sup>+++</sup> sehr deutlich

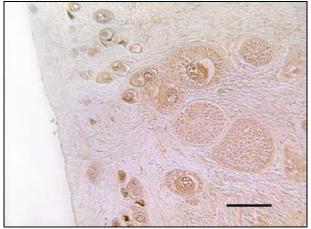


Bild 34 Rindenbereich des Ovars, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 100 μm

Bild 35 Primordialfollikel, IHC-Nachweis von MMP-1, SB =  $50 \mu m$ 

Überblick über die Ovarrinde mit immunpositiv reagierenden Follikeln in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Schwach positive Immunreaktion im Zytoplasma der Oozyten (dicke Pfeile), sowie in den Follikelepithelzellen. Die Kernmembran und das Chromatin reagieren deutlich positiv (dünne Pfeile).



Bild 36 Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 10  $\mu$ m

Deutlich positive Immunreaktion der Kernmembran (Pfeil) sowie des Chromatins im Kern (N).

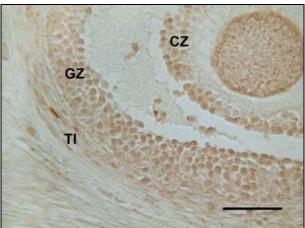


Bild 37 Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-1, SB =  $50 \mu m$ 

Die Cumuluszellen (CZ), die Granulosazellen (GZ) und die Zellen der Theka interna (TI) reagieren gleichmäßig positiv auf MMP-1.

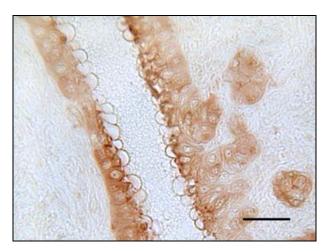


Bild 38 Tiefer Gang des Oberflächenepithels, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 25  $\mu$ m

Im Zytoplasma der Zellen zeigt sich eine deutlich positive Reaktion auf MMP-1. Positiv ist v.a. der apikale Bereich.

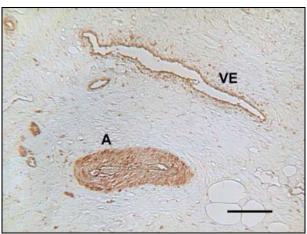


Bild 39 Blutgefäße, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 100  $\mu m$ 

Das Endothel von Arterien (A) und Venen (VE), sowie deren Muskelschicht reagieren deutlich positiv auf den MMP-1-Antikörper.

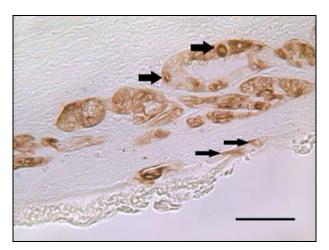


Bild 40 Oberfläche des Ovars, IHC-Nachweis von MMP-2, SB = 50 μm

Unterschiedlich deutliche Immunreaktion in den Zellen der Gänge des Oberflächenepithels (dicke Pfeile) sowie in vereinzelten Zellen des Oberflächenepithels (dünne Pfeile).

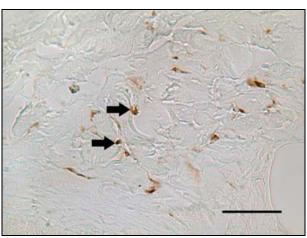


Bild 41 Ovarstroma, IHC-Nachweis von MMP-2,  $SB = 50 \mu m$ 

Einige Fibrozyten im Stroma reagieren deutlich immunpositiv auf MMP-2 (Pfeile).

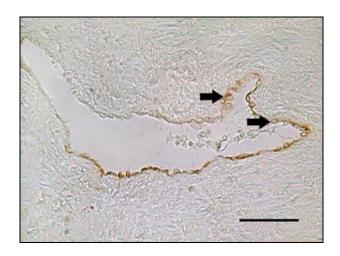


Bild 42 Blutgefäß, IHC-Nachweis von MMP-2,  ${\sf SB} = {\sf 50}~\mu{\sf m}$ 

Deutlich positive Reaktion auf MMP-2 im Endothel einer Vene (Pfeile).

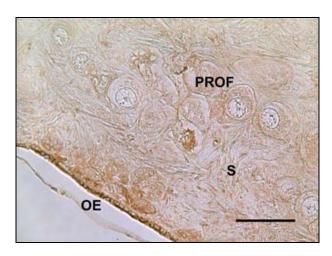


Bild 43 Rindenbereich des Ovars,  $IHC\text{-Nachweis von MMP-14, SB} = 50 \ \mu m$ 

Es zeigt sich eine schwache Immunreaktion in Primordialfollikeln (PROF) und Stroma (S). Deutlich kann MMP-14 im Oberflächenepithel (OE) nachgewiesen werden.

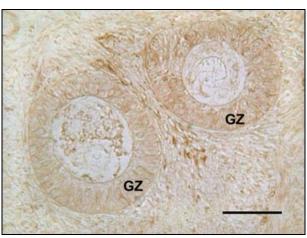


Bild 44 Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 μm

Die Granulosazellen (GZ) zeigen eine deutlich positive Immunreaktion.

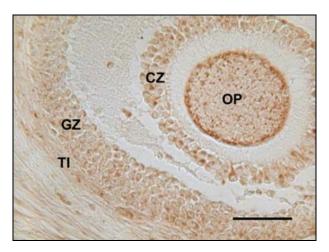


Bild 45 Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 μm

In den Cumuluszellen (CZ), den Granulosazellen (GZ) und in der Theka interna (TI) zeigt sich eine unterschiedlich intensive Reaktion der einzelnen Zellen mit dem Antikörper. OP = Ooplasma

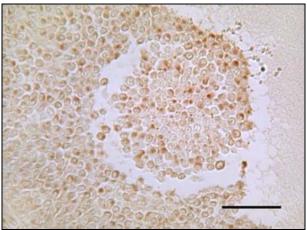


Bild 46 Cumulus oophorus, IHC-Nachweis  $von \; \text{MMP-14, SB} = 50 \; \mu m$ 

Mit zunehmender Größe der Follikel wird die unterschiedliche Intensität der Immunreaktion im Zytoplasma einiger Zellen deutlicher.

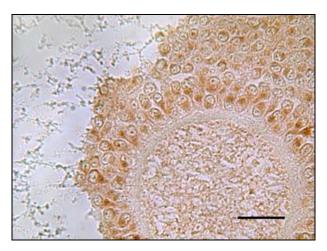


Bild 47 COC eines Tertiärfollikels,  $IHC\text{-Nachweis von MMP-14, SB} = 25~\mu\text{m}$ 

Deutliche Ansammlung von MMP-14 im Zytoplasma der Cumuluszellen einer COC.

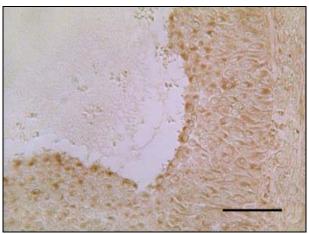


Bild 48 Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 µm

MMP-14-positive Granulosazellen finden sich vor allem antrumseitig.

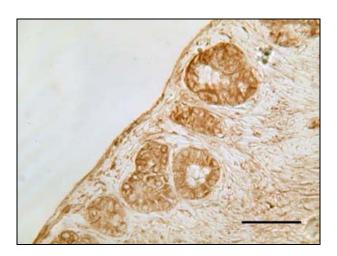


Bild 49 Oberfläche des Ovars, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50  $\mu m$ 

Die Epithelzellen der Gangsysteme des Oberflächenepithels zeigen eine deutliche zytoplasmatische Reaktion auf MMP-14

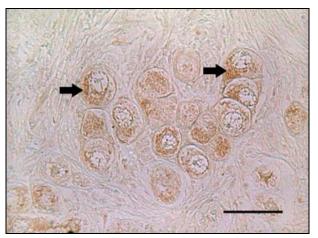


Bild 50 Primordialfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB =  $50 \mu m$ 

Das Zytoplasma kleiner Follikel zeigt eine deutlich positive Immunreaktion (Pfeile). Die Follikelepithelzellen sind schwach TIMP-2 positiv.

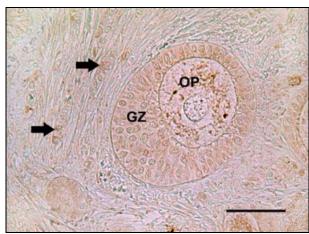


Bild 51 Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB = 50  $\mu$ m

Die Granulosazellen (GZ). das Ooplasma (OP) und die Zellen des Stromas (Pfeile), zeigen eine schwach positive Reaktion mit TIMP-2.

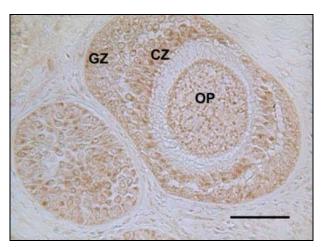


Bild 52 Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB = 50 μm

Im Zytoplasma der Cumulus- (CZ) und Granulosazellen (GZ) sowie im Ooplasma (OP) zeigt sich eine deutliche immunpositive Reaktion.

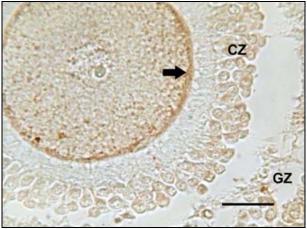


Bild 53 Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB = 25 μm

Eine andere Hündin als in Bild 52 zeigt eine schwache Immunreaktion in Cumulus- (CZ) und Granulosazellen (GZ). Es bildet sich ein deutlicher immunpositiver Ring am Rand des Ooplasmas (Pfeil).

# 4.1.7 Ultrastruktur der Primordial-, Primär-, Sekundär-, und Tertiärfollikel

## Ultrastruktur der Primordialfollikel

Die Oozyten in Primordialfollikeln sind rund bis oval. Sie besitzen einen großen, runden oder ovalen, peripher liegenden Kern, der von einer leicht wellenförmig verlaufenden Kernmembran umgeben wird. Der Kern weist einen sehr hohen Anteil an Euchromatin auf, wobei vereinzelte heterochromatische Bereiche nachzuweisen sind. Im Zentrum des Kernes kann bei einigen Oozyten ein Nukleolus dargestellt werden (Bild 55).

Das Zytoplasma der Oozyten ist relativ organellenarm. Die wenigen vorhandenen Zellorganellen sind dabei im gesamten Zytoplasma verteilt. Es finden sich vor allem runde und längliche Mitochondrien, von denen einige unvollständige lamelläre Cristae im Randbereich enthalten. Zudem zeigen sich im Ooplasma vereinzelte Zisternen an glattem endoplasmatischem Retikulum an denen teilweise Mitochondrien angelagert sind. In wenigen Fällen sind kleine Lipiddotterkörperchen sowie Vakuolen zu erkennen (Bild 54 und Bild 55). Vereinzelt zeigen sich Ribosomen sowie raues endoplasmatisches Retikulum.

In Primordialfollikeln werden die Oozyten von zwei bis drei flachen Follikelepithelzellen umgeben. Die Plasmamembranen von Oozyte und Follikelepithelzellen liegen glatt aneinander ohne erkennbare Kontakte auszubilden. An einigen wenigen Stellen bildet die Oozytenmembran begrenzte Bereiche mit kurzen Mikrovilli an den sonst glatt und parallel verlaufenden Membranen aus (Bild 54 und Bild 55).

Die Follikelepithelzellen enthalten sehr flache Kerne und einen schmalen Zytoplasmasaum. In den Kernen zeigt sich das Chromatin vor allem im Bereich der Kernmembran deutlich stärker kondensiert (Heterochromatin) als im Kern der Oozyte. Nukleoli können nicht dargestellt werden. Das Zytoplasma der Follikelepithelzellen enthält wenige Zellorganellen, darunter vor allem runde oder längliche Mitochondrien sowie kurzes endoplasmatisches Retikulum vom glatten und rauen Typ (Bild 56). Zudem zeigen sich vereinzelte Ribosomen, Golgi-Apparat, Lipidtröpfchen und kleine Vesikel.

Die einzelnen Primordialfollikel sind von Stromagewebe umgeben, das vor allem parallel zur Follikeloberfläche liegende kollagene Fasern sowie Fibroblasten, enthält (Bild 54 und Bild 56).

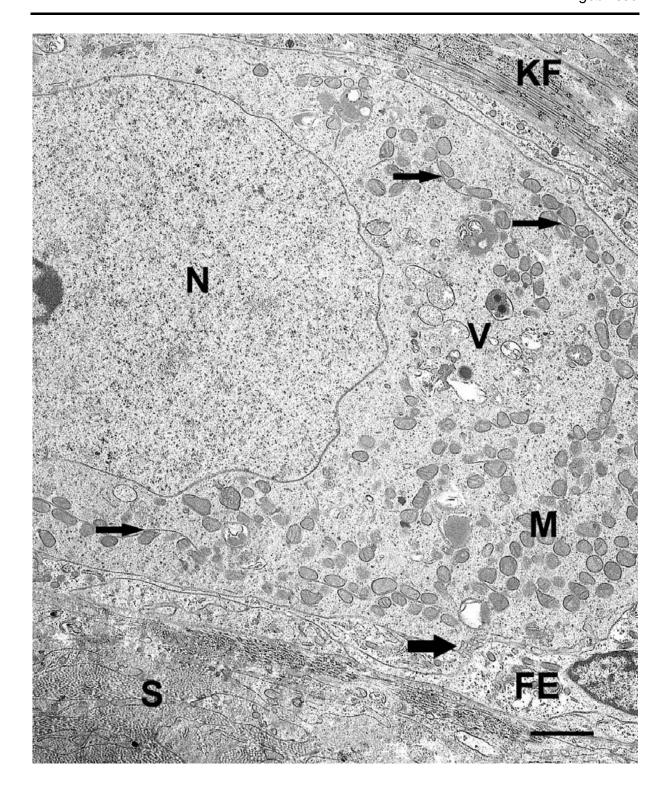


Bild 54 Primordialfollikel, SB = 2  $\mu$ m

Im Ooplasma sind viele runde oder längliche Mitochondrien (M) zu erkennen. Einige Mitochondrien lagern sich an lange Stränge glatten endoplasmatischen Retikulums an (dünne Pfeile). Vereinzelt finden sich kleine Mikrovillinester (dicker Pfeil). N = Nukleus, V = Vesikel, FE = Follikelepithel, S = Stroma, KF = Kollagene Fasern

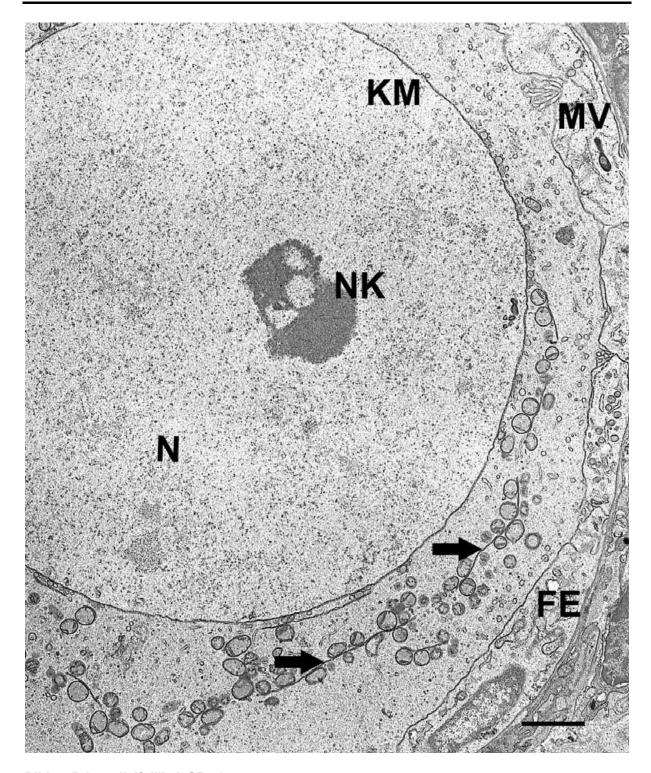


Bild 55 Primordialfollikel, SB=  $2 \mu m$ 

Im Ooplasma findet sich glattes endoplasmatisches Retikulum mit daran angelagerten Mitochondrien mit vereinzelten lamellären Cristae (Pfeile). NK = Nukleolus, N = Nukleus, KM = Kernmembran, MV = Mikrovilli, FE = Follikelepithel

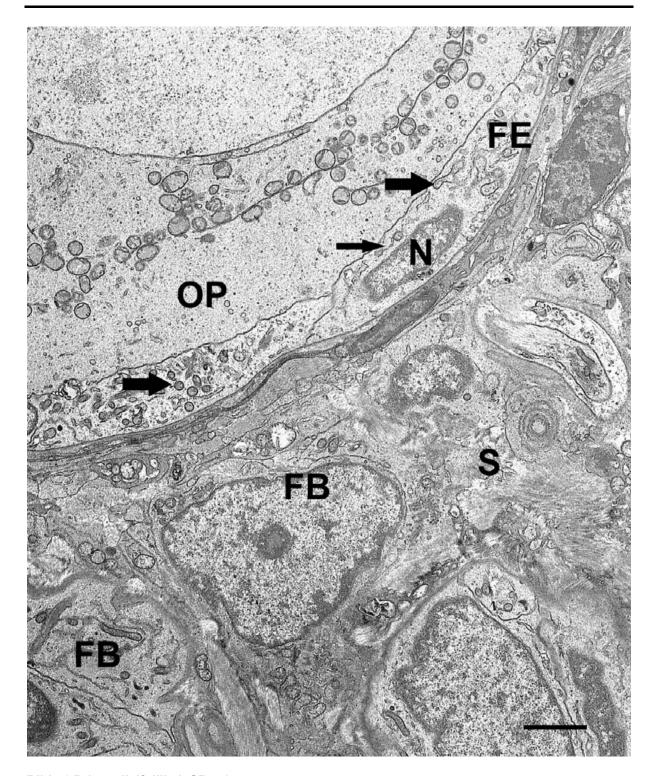


Bild 56 Primordialfollikel, SB = 2  $\mu$ m

In den Zellen des Follikelepithels (FE) finden sich runde bis längliche Mitochondrien (dicke Pfeile) sowie raues und glattes endoplasmatisches Retikulum (dünner Pfeil). Das Stromagewebe (S) enthält zahlreiche Fibroblasten (FB). OP = Ooplasma, N = Kern einer Follikelepithelzelle

# Ultrastruktur der Primärfollikel

Primärfollikel enthalten eine runde Oozyte, die einen großen runden, zentral liegenden Kern aufweist. Der Kern wird durch eine glatt verlaufende Kernmembran begrenzt und stellt sich stark euchromatisch dar. Es finden sich jedoch auch einige wenige heterochromatische Bereiche sowie bei einigen der Oozyten ein großer runder meist zentral gelegener Nukleolus (Bild 57).

Verglichen mit den Verhältnissen im Primordialfollikel kann in den Oozyten der Primärfollikel eine deutliche Zunahme an Zellorganellen beobachtet werden. Das Ooplasma enthält in diesem Entwicklungsstadium vor allem Mitochondrien und glattes endoplasmatisches Retikulum. Dabei können längliche Mitochondrien mit dichten lamellenförmigen Cristae von runden Mitochondrien ohne Cristae unterschieden werden. Ähnlich den Primordialfollikeln zeigen sich auch im Primärfollikel Mitochondrien, deren Cristae am Rand lokalisiert sind und so einen zentralen "Hohlraum" bilden. Das glatte endoplasmatische Retikulum besteht aus deutlich dilatierten Zisternen und kommt in deutlich größerer Menge und Ausprägung vor. Häufig sind Mitochondrien an die Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums angelagert oder werden von diesen parallel eingefasst. Der so entstandene Komplex ist in einem kernnahen Bereich des Ooplasmas oder, in einigen wenigen Fällen, aber auch direkt an der Kernmembran lokalisiert (Bild 57 und Bild 58). In der Peripherie des Ooplasmas beginnen sich Golgi-Apparat und eine Vielzahl an unregelmäßig begrenzten Vesikeln unterschiedlicher Elektronendichte sowie Lipiddotterkörperchen auszubilden (Bild 57, Bild 58 und Bild 59). Moderate Mengen an (Poly-) Ribosomen sowie vereinzeltes raues endoplasmatisches Retikulum können im gesamten Ooplasma dargestellt werden.

An der Ooplasmamembran zeigen sich vermehrt abgegrenzte Areale aus kurzen, dicken Mikrovilli (Bild 57) sowie, in den Bereichen, in denen die Membranen glatt aneinander liegen, desmosomenähnliche Verdichtungen (Bild 58).

Das die Oozyte umgebende Follikelepithel besteht aus einer Schicht flach bis isoprismatischer Follikelepithelzellen, die stets einen großen runden oder ovalen Kern besitzen. Im Nukleoplasma stellt sich das Heterochromatin als elektronendichte Areale vor allem im Bereich der Kernmembran dar, während es im Zentrum eher euchromatischer Natur ist. Das Zytoplasma der Follikelepithelzellen erscheint relativ arm an Zellorganellen. Im Gegensatz zu den Mitochondrien der Oozyte, weisen die der Follikelepithelzellen hauptsächlich eine längliche, schlangenförmige Gestalt auf und besitzen deutliche lamelläre Cristae. Die Zisternen des vorwiegend rauen endoplasmatischen Retikulums dieser Zellen sind kurz, deutlich dilatiert und treten nur selten in Kontakt mit Mitochondrien auf (Bild 59). Vereinzelt finden sich kleine Vesikel sowie freie Ribosomen.

Der Primärfollikel wird durch eine deutlich ausgebildete Basallamina vom umliegenden Stromagewebe (kollagene Fasern, Fibroblasten) abgegrenzt (Bild 59).

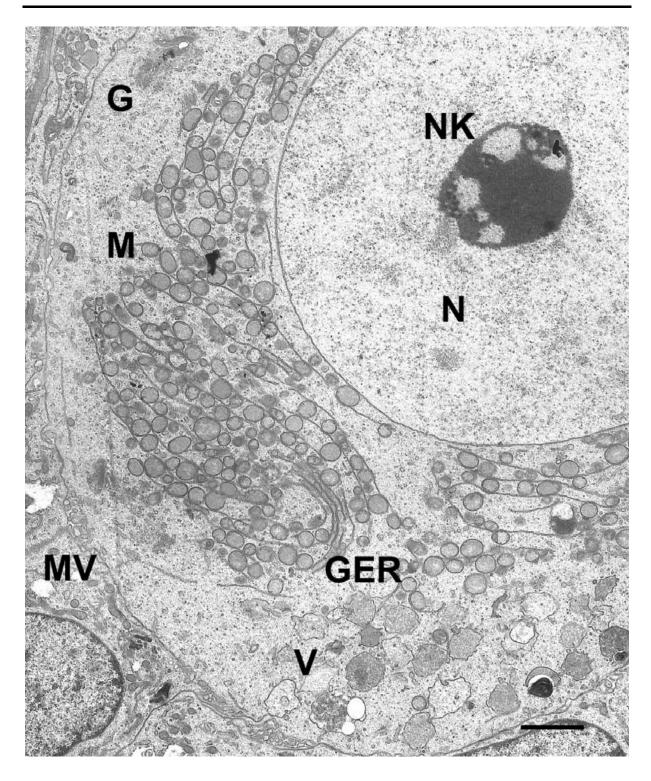


Bild 57 Primärfollikel, SB = 2 μm

Im Ooplasma ist eine deutliche Zunahme an Komplexen aus Mitochondrien (M) und glattem endoplasmatischem Retikulum (GER) im Gegensatz zum Primärfollikel zu beobachten. An der Ooplasmamembran bilden sich vermehrt Mikrovilliareale (MV) aus. Im Ooplasma lassen sich zahlreiche unterschiedlich elektronendichte Vesikel (V) nachweisen. G = Golgi-Apparat, N = Nukleus, NK = Nukleolus

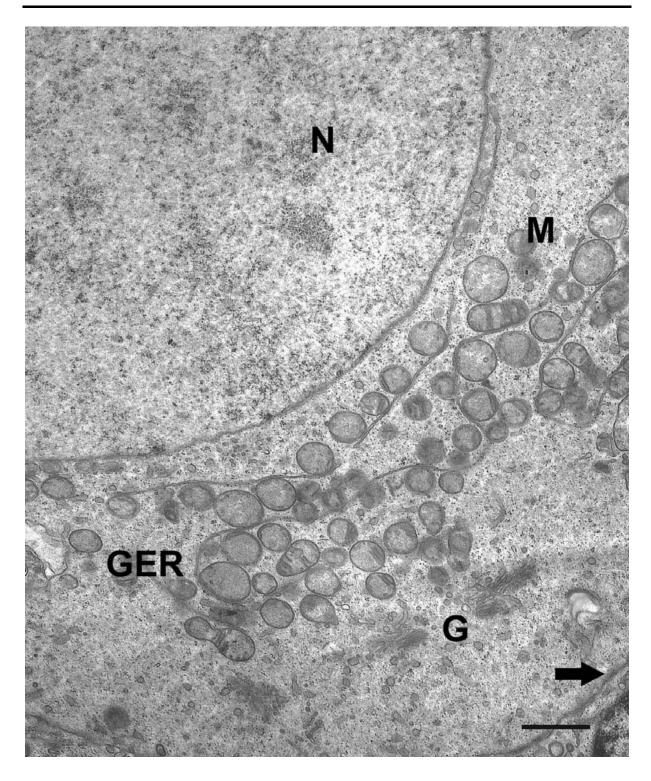
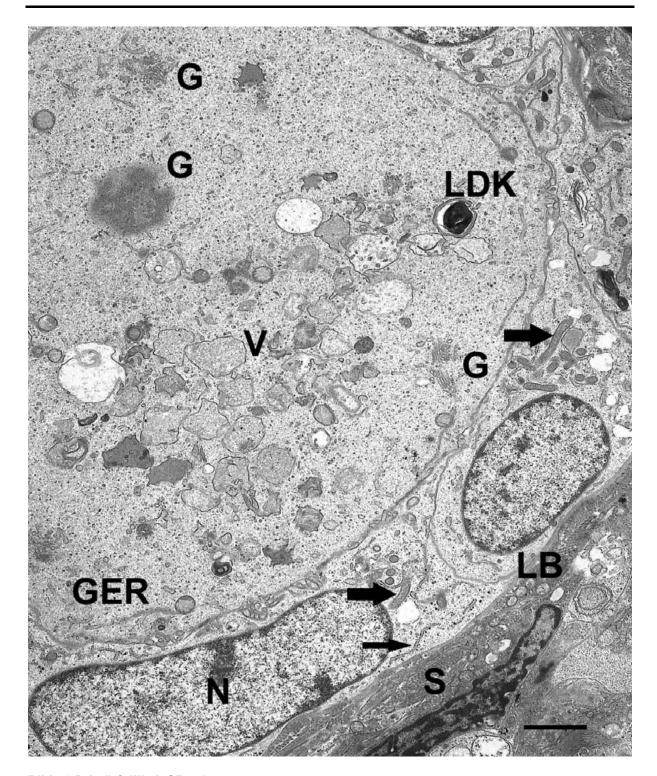


Bild 58 Primärfollikel, SB = 1  $\mu$ m

Runde bis längliche Mitochondrien (M) mit unterschiedlich deutlich ausgeprägten Cristae liegen zwischen gering dilatierten Zisternen an glattem endoplasmatischem Retikulum (GER). In der Peripherie des Ooplasmas zeigen sich Bereiche mit Golgi-Apparat (G). Im Bereich der Membranen zeigen sich desmosomenähnliche Verbindungen (Pfeil). N = Nukleus



# Bild 59 Primärfollikel, SB = 2 $\mu$ m

In den Randbereichen des Ooplasmas können unterschiedliche Vesikel (V), Lipiddotterkörperchen (LDK), Golgi-Apparat (G) und glattes endoplasmatisches Retikulum (GER) nachgewiesen werden. Die Follikelepithelzellen enthalten einen großen runden oder länglichen Kern (N), lange schlangenförmige Mitochondrien (dicke Pfeile) sowie kurzes raues endoplasmatisches Retikulum (dünner Pfeil). Der Follikel wird durch eine gut ausgebildete Basallamina (LB) vom umgebenden Stromagewebe (S) getrennt.

## Ultrastruktur der Sekundärfollikel

Im Sekundärfollikel kann eine runde Oozyte dargestellt werden. Der Kern der Oozyten wurde in keinem der untersuchten Sekundärfollikel angeschnitten und kann deshalb nicht beurteilt werden.

Das Zytoplasma der Oozyte weist vor allem im Zentrum große Gruppen an ovoiden Mitochondrien auf, die nur wenige undeutlich ausgebildete Cristae besitzen (Bild 61). Daneben finden sich auch Oozyten deren Mitochondrien länglich und sehr gut mit Cristae ausgestattet sind. Die Zisternen des glatten endoplasmatischen Retikulums sind kurz und deutlich dilatiert. Raues endoplasmatisches Retikulum kann nur in wenigen Fällen dargestellt werden, freie Ribosomen kommen vermehrt in Form vom Polyribosomen vor. Im Gegensatz zu der im Primärfollikel beobachteten starken Zusammenlagerung von Mitochondrien und glattem endoplasmatischen Retikulum ist die Komplexbildung zwischen den beiden Zellorganellen im Sekundärfollikel nicht mehr so deutlich ausgeprägt und kann nur noch in wenigen Fällen nachgewiesen werden kann. Vereinzelt zeigen sich im Ooplasma Golgi-Apparat, sowie Ansammlungen an Vakuolen und Lipiddotterkörperchen (Bild 62).

Im Sekundärfollikel bildet die Oozytenmembran an mehreren Stellen deutlich ausgeprägte "Mikrovillinester", die weit zwischen die anliegenden Granulosazellen reichen (Bild 62, Bild 63 und Bild 64) und in deren unmittelbaren Umgebung eine mittelgradig elektronendichte Matrix, die sich bildende Zona pellucida, erkennbar ist (Bild 63). An den Stellen, an denen die beiden Plasmamembranen aneinander grenzen bilden sich bulbusförmige Fortsätze der Granulosazellen aus, die "gap junctions" mit der Oozyte bilden (Bild 62).

Das Entwicklungsstadium des Sekundärfollikels ist durch das aufgrund zahlreicher Mitosen mehrschichtig gewordene Follikelepithel geprägt. Bereits in diesem Stadium beginnt die Differenzierung der Granulosazellen in unterschiedliche Schichten. Da in den untersuchten Follikeln noch keine vollständige Zona pellucida zu erkennen ist, kann die Corona radiata noch nicht eindeutig dargestellt werden. Die die Oozyte umgebenden Granulosazellen sind vielgestaltig und unterschiedlich elektronendicht. Sie sind von isoprismatischer Form und enthalten unregelmäßig geformte Kerne, die zahlreiche unterschiedlich tiefe Einziehungen aufweisen. Häufig sind U-förmige Zellkerne zu sehen (Bild 60 und Bild 64). Nukleoli kommen in den Kernen der Granulosazellen nur sehr selten vor. An der Kernmembran zeigen sich einige heterochromatische Bereiche, wobei im restlichen Nukleoplasma vorwiegend Euchromatin zu finden ist (Bild 64). Das Zytoplasma der Follikelzellen enthält große Mengen langer gewundener Mitochondrien mit deutlichen Cristae, vereinzelte Vakuolen sowie Golgi-Apparat (Bild 64). Im Gegensatz zum Ooplasma können im Zytoplasma der Granulosazellen von Zelle zu Zelle unterschiedlich große Mengen an einzeln, in Gruppen organisierten oder

in Reihen angeordneten Ribosomen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Das endoplasmatische Retikulum kann fast ausschließlich dem rauen Typ zugeordnet werden. Granulosazellen mit höherer Elektronendichte scheinen dabei auch größere Mengen an Ribosomen aufzuweisen (Bild 63).

Im Bereich der basalen Granulosazellen kann bei älteren Sekundärfollikeln der Beginn der Formveränderung von der isoprismatischen zur hochprismatischen Zellform beobachtet werden (Bild 60).

Sekundärfollikel werden von einer deutlich ausgebildeten Basallamina umgeben, die den Follikel vom umgebenden Bindegewebe trennt. Es finden sich vorwiegend kollagene Fasern sowie Fibroblasten. Die Theka folliculi hat sich in den untersuchten Follikeln noch nicht ausgebildet (Bild 64).

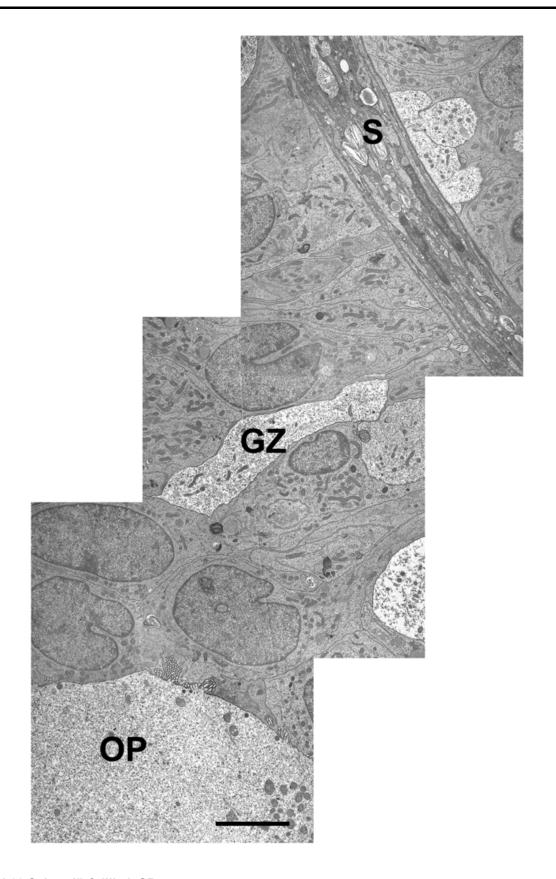


Bild 60 Sekundärfollikel, SB =  $5 \mu m$ 

Überblick über Ooplasma (OP), mehrschichtig gewordenes Follikelepithel (Granulosazellen (GZ)) und angrenzendes Stroma (S). Die basal liegenden Granulosazellen beginnen hochprismatische Form anzunehmen.

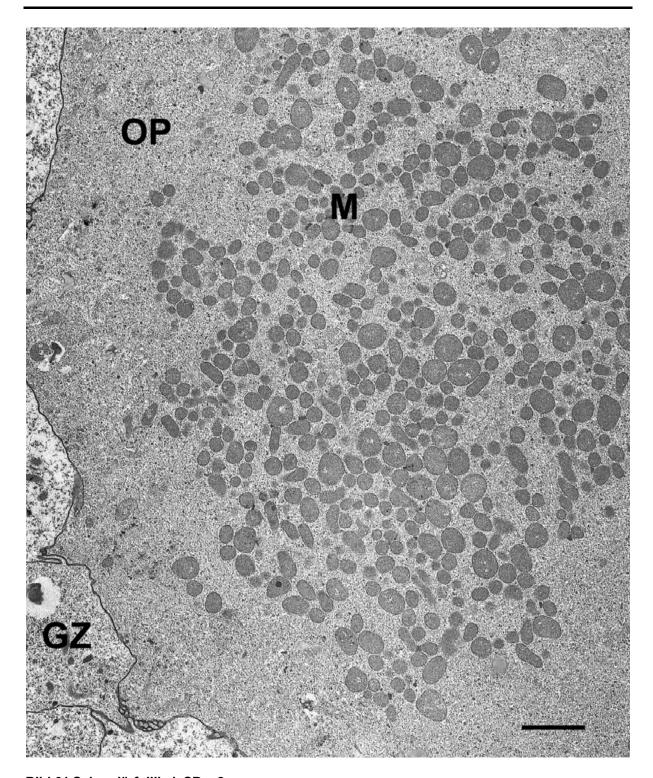


Bild 61 Sekundärfollikel, SB = 2  $\mu$ m

Im Ooplasma (OP) können viele ovoide Mitochondrien (M) dargestellt werden, die nur wenige Cristae aufweisen. GZ = Granulosazellen

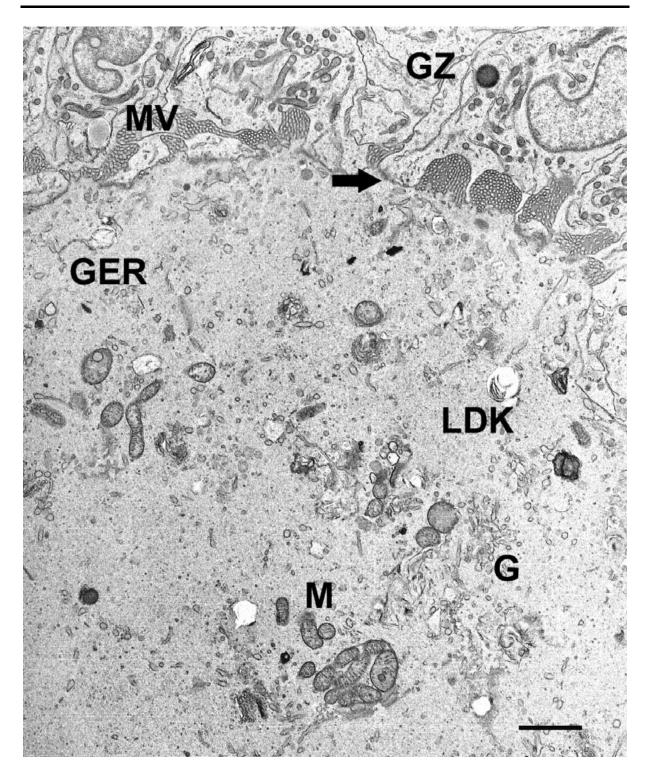


Bild 62 Peripherie eines Sekundärfollikels, SB = 2  $\mu$ m

Das Zytoplasma in der Peripherie der Oozyte ist relativ organellenarm. Es zeigen sich vereinzelte Mitochondrien (M), glattes endoplasmatisches Retikulum (GER), kleine Vesikel und Lipiddotterkörperchen (LDK) sowie Golgi-Apparat (G). Die Oozyte bildet deutliche "Mikrovillinester" (MV) aus. Die Granulosazellen (GZ) beginnen bulbusförmige Fortsätze zur Oozyte auszubilden (Pfeil).

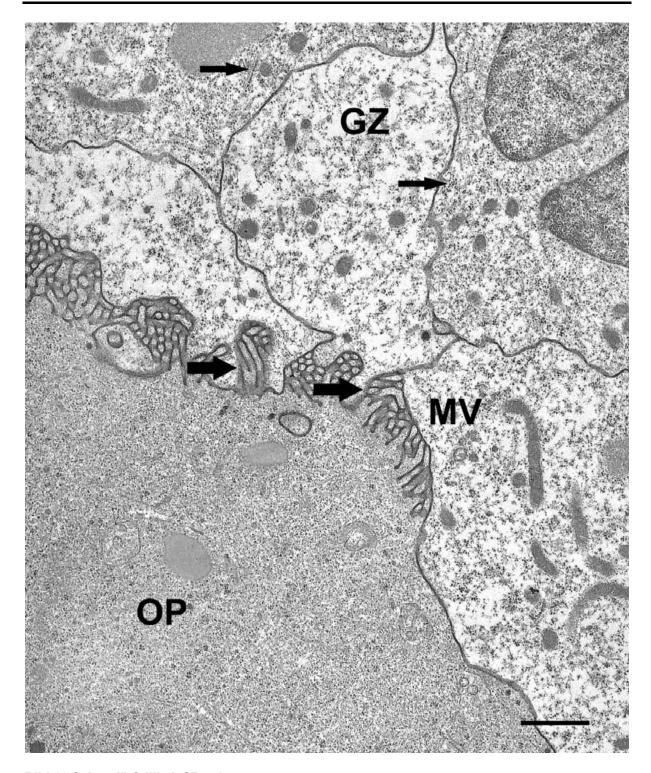


Bild 63 Sekundärfollikel, SB = 1  $\mu$ m

Im Bereich der Mikrovilli (MV) ist die Bildung der Zona pellucida als mittelgradig elektronendichte Substanz (dicke Pfeile) zu erkennen. Die Granulosazellen (GZ) weisen von Zelle zu Zelle unterschiedliche Mengen an Ribosomen auf (dünne Pfeile). OP = Ooplasma

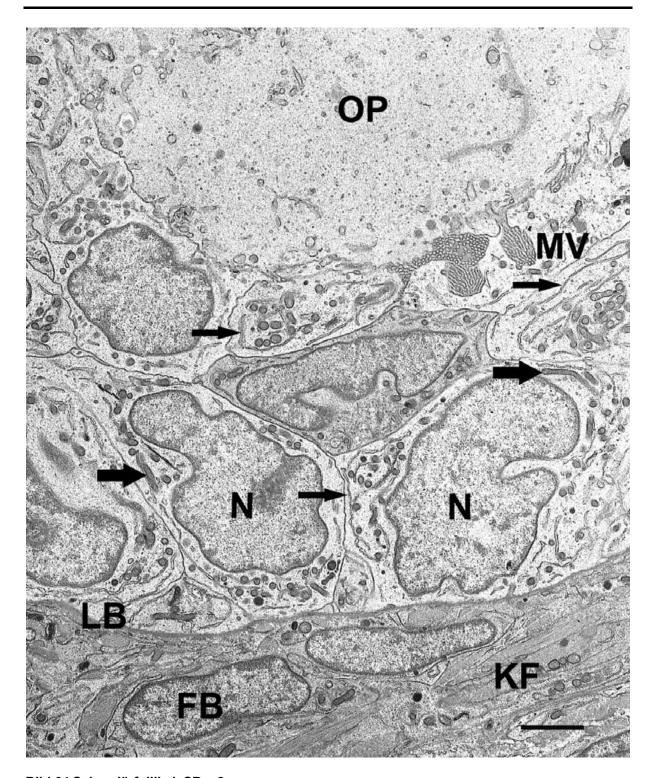


Bild 64 Sekundärfollikel, SB =  $2 \mu m$ 

Die Granulosazellen sind unterschiedlich elektronendicht und enthalten unregelmäßig geformte Kerne (N). Im Zytoplasma zeigen sich große gewundene Mitochondrien (dicke Pfeile) und lange Stränge an vorwiegend rauem endoplasmatischem Retikulum (dünne Pfeile). OP = Ooplasma, MV = Mikrovilli, LB = Lamina basalis, FB = Fibroblast, KF = Kollagene Fasern

### Ultrastruktur der Tertiärfollikel

Die Oozyten in Tertiärfollikeln sind rund. Sie besitzen einen euchromatischen Kern, der von der Kernmembran unregelmäßig begrenzt wird. Ein Nukleolus kann nicht dargestellt werden (Bild 66).

Im Ooplasma zeigt sich in diesem Entwicklungsstadium eine deutliche Aufteilung der Zellorganellen in Gruppen. So bilden die zahlreich vorhandenen Mitochondrien Ansammlungen, die neben größeren organellenfreien Bereichen im gesamten Zytoplasma der Oozyte verteilt sind. Die Mitochondrien besitzen eine runde oder ovale Form und weisen meist deutliche Cristae auf. Einzelne, kurze dilatierte Zisternen an glattem endoplasmatischem Retikulum können zwischen diesen Gruppen an Mitochondrien nachgewiesen werden. In einigen Fällen erfolgt die bei jüngeren Follikeln oft gesehene Komplexbildung zwischen glattem endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien. Im Stadium des Tertiärfollikels kann erstmals eine deutliche Zunahme der Lipiddotterkörperchen-Menge im Zytoplasma der Oozyte festgestellt werden. Zwischen Mitochondrien, glattem endoplasmatischem Retikulum und Lipiddotterkörperchen zeigt sich manchmal die Bildung von Komplexen der Organellen untereinander. Im Randbereich der Oozyte, in unmittelbarer Nähe zur Ooplasmamembran, sowie selten auch mitten im Ooplasma, befinden sich einige kortikale Granula und unterschiedlich deutlich ausgeprägter Golgi-Apparat und zahlreiche Vesikel (Bild 66, Bild 67 und Bild 68). Neben freien (Poly-) Ribosomen zeigt sich selten raues endoplasmatisches Retikulum.

Im Tertiärfollikel wird die Oozyte von einer deutlich ausgebildeten Zona pellucida umgeben. Die Ooplasmamembran verläuft unregelmäßig und bildet zahlreiche kurze, aufrecht stehende Mikrovilli, die in die Zona pellucida hineinreichen und um die Fortsätze der Cumuluszellen fassen. Die Zona pellucida selbst erscheint als homogene mittelgradig elektronendichte Substanz, die sich den Fortsätzen der Follikelepithelzellen in ihrer Form anpasst und dabei weit zwischen die einzelnen Zellen reicht (Bild 67 und Bild 68).

Die Zellen des Cumulus oophorus bilden deutliche Fortsätze aus, die sowohl zwischen die anderen Cumuluszellen, als auch zur Oozyte ziehen. Dabei bilden sie an der Kontaktstelle zur Oozyte Verdickungen aus, die unter anderem Zellorganellen wie Ribosomen, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum besitzen. Unmittelbar an der Membran finden sich vor allem unterschiedlich elektronendichte Vesikel. An der Kontaktstelle der Membranen von Oozyte und Cumuluszellfortsätzen zeigen sich desmosomenähnliche Verbindungen (Bild 67 und Bild 68).

Aufgrund der Elektronendichte des Zytoplasmas lassen sich in der Granulosazellschicht im Bereich des Cumulus oophorus zwei Bereiche unterteilen. Die äußere, der Basalmembran

anliegende Zellschicht erscheint weniger elektronendicht und lässt sich der den Follikel auskleidenden Granulosa zuordnen. Im Gegensatz dazu zeigt sich das Zytoplasma der Granulosazellen, die die Oozyte umgeben, deutlich elektronendichter. Diese Zellschicht entspricht den Zellen des Cumulus oophorus. Eine weitergehende Einteilung kann über die Lage der Granulosazellen erfolgen. So können die direkt an der Basalmembran liegenden Zellen (Basalzellen) von den das Lumen begrenzenden Zellen unterschieden werden. Zwischen diesen beiden Schichten befinden sich die Intermediärzellen, die den Großteil der Granulosa und des Cumulus oophorus bilden. Die Oozyte wird unmittelbar von den so genannten Corona radiata-Zellen umgeben (Bild 65). Die dem Lumen zugewandten Granulosazellen wurden in den untersuchten Tertiärfollikeln nicht angeschnitten und können somit nicht beurteilt werden.

Die Cumuluszellen sind von isoprismatischer Form und enthalten einen großen runden Kern, dessen Kernmembran bei einigen Zellen leichte Einziehungen aufweist. Im Nukleoplasma sind zahlreiche heterochromatische Bereiche dicht an der Kernmembran oder als gleichmäßig verteilte kleine Zentren im Kern lokalisiert. Bei einigen der Zellen des Cumulus oophorus können ein oder zwei kleine Nukleoli dargestellt werden, die von Heterochromatin umgeben sind und durch dieses manchmal in Kontakt zur Kernmembran stehen. Das Zytoplasma enthält, in Menge und Ausprägung je nach Zelle unterschiedlich, viele runde oder lange schlangenförmige Mitochondrien mit relativ gut ausgebildeten Cristae vom lamellären Typ. Daneben zeigen sich stark dilatierte Zisternen an vorwiegend rauem endoplasmatischem Retikulum, das zum Teil andere Zellorganellen wie z.B. Mitochondrien umgibt. Ribosomen, auch in Form von Polyribosomen, kommen ebenfalls in großer Menge vor. Die Corona radiata-Zellen unterscheiden sich von den sonstigen Zellen des Cumulus oophorus durch die Ausbildung von Fortsätzen durch die Zona pellucida zur Oozyte, ihre hochprismatische Form, sowie das Auftreten von Vesikeln unterschiedlicher Größe und Elektronendichte im Zytoplasma. Letztere zeigen sich besonders häufig in den Fortsätzen, die zur Oozyte ziehen (Bild 69).

In der Übergangszone zwischen Cumulus- und Granulosazellen zeigen sich große Ansammlungen an (Poly-) Ribosomen. In diesem Bereich kann auch die Bildung weiter Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (glatter und rauer Typ) sowohl bei einigen Zellen des Cumulus oophorus als auch in deutlichen Mengen in den Zellen der angrenzenden Granulosa beobachtet werden (Bild 70).

Die Morphologie und Organellenausstattung der Granulosazellen entspricht im Wesentlichen der der Cumuluszellen. Verglichen mit den Cumuluszellen erscheinen die Granulosazellen jedoch weniger elektronendicht und verhältnismäßig zytoplasmareich (Ausnahme: Basalzellen). Die Zellform ist iso- bis hochprismatisch. Im Bereich zwischen den Basalzellen

und den restlichen Granulosazellen entsteht so bei einigen Follikeln ein "kernfreier" Abschnitt. Die Kerne weisen deutlichere heterochromatische Bereiche auf als die der Cumuluszellen (Bild 70 und Bild 71).

Die Basalzellen sind iso- oder hochprismatisch und grenzen direkt an die den Follikel umgebende Basalmembran. Die Kerne dieser Zellen liegen im basalen Bereich. In den Basalzellen findet sich ein hohes Kern-Plasma-Verhältnis. Das endoplasmatische Retikulum ist bei diesen Zellen zwar noch gut ausgebildet, jedoch nicht mehr so deutlich dilatiert wie in den anderen Granulosazellen. Ribosomen scheinen nicht mehr so häufig auf zu treten (Bild 71).

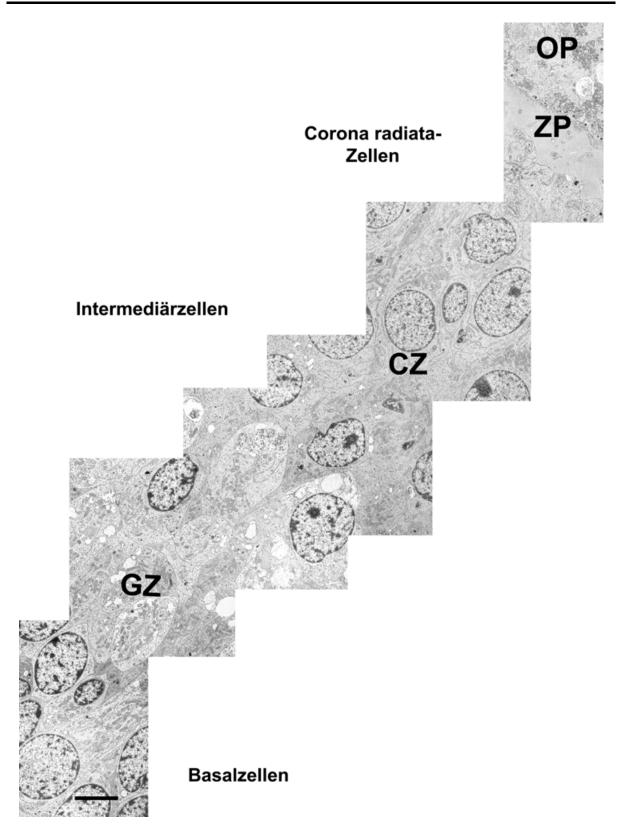


Bild 65 Überblick über die Follikelwand im Bereich des Cumulus oophorus eines Tertiärfollikels, SB =  $5 \mu m$ 

Direkt an der Basalmembran des Follikels liegen die Basalzellen. Die Corona radiata-Zellen stehen in direktem Kontakt zur Oozyte. Dazwischen liegen die Intermediärzellen, die den Großteil der Granulosa- (GZ) und der Cumuluszellen (CZ) bilden. OP = Ooplasma, ZP = Zona pellucida, CZ = Cumuluszellen

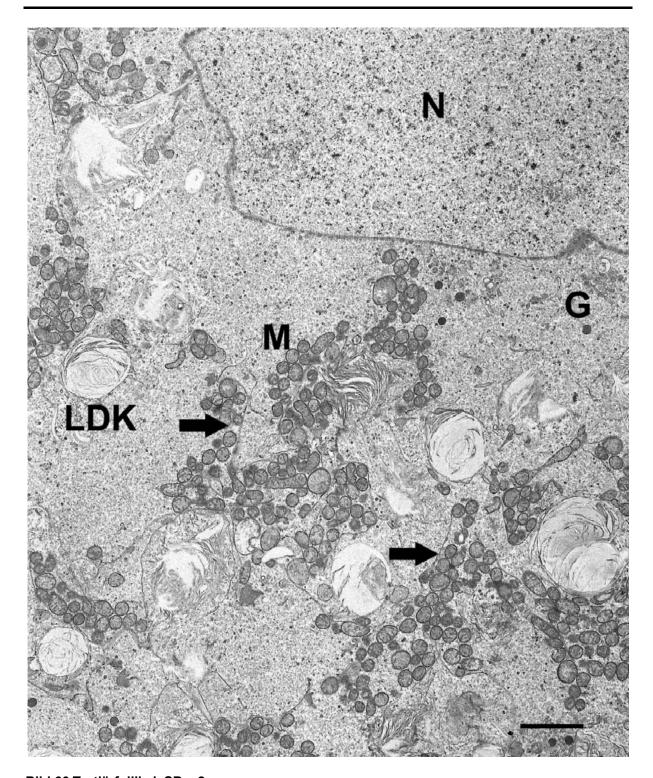


Bild 66 Tertiärfollikel, SB = 2  $\mu$ m

Im Ooplasma befinden sich gruppenweise Mitochondrien (M) unterschiedlicher Größe, die zum Teil an kürzeren Strängen an glattem endoplasmatischem Retikulums (Pfeile) lokalisiert sind. Lipiddotterkörperchen (LDK) und Golgi-Apparat (G) finden sich vereinzelt. N = Nukleus

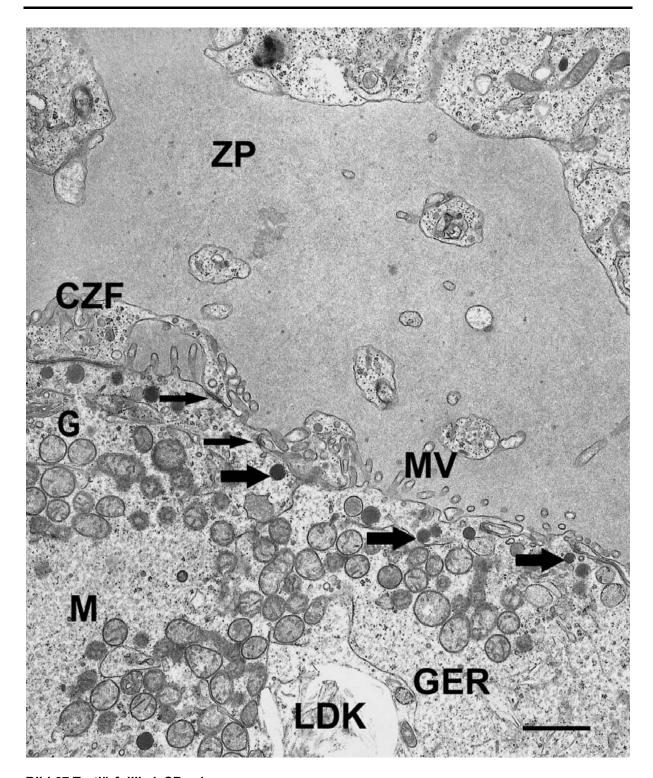


Bild 67 Tertiärfollikel, SB = 1  $\mu$ m

Im Randbereich des Tertiärfollikels haben sich kortikale Granula (dicke Pfeile) gebildet. An den Kontaktstellen zwischen den Fortsätzen der Cumuluszellen (CZF) und der Ooplasmamembran bilden sich desmosomenähnliche Verbindungen (dünne Pfeile) aus. ZP = Zona pellucida, MV = Mikrovilli, G = Golgi-Apparat, M = Mitochondrien, GER = glattes endoplasmatisches Retikulum, LDK = Lipiddotterkörperchen

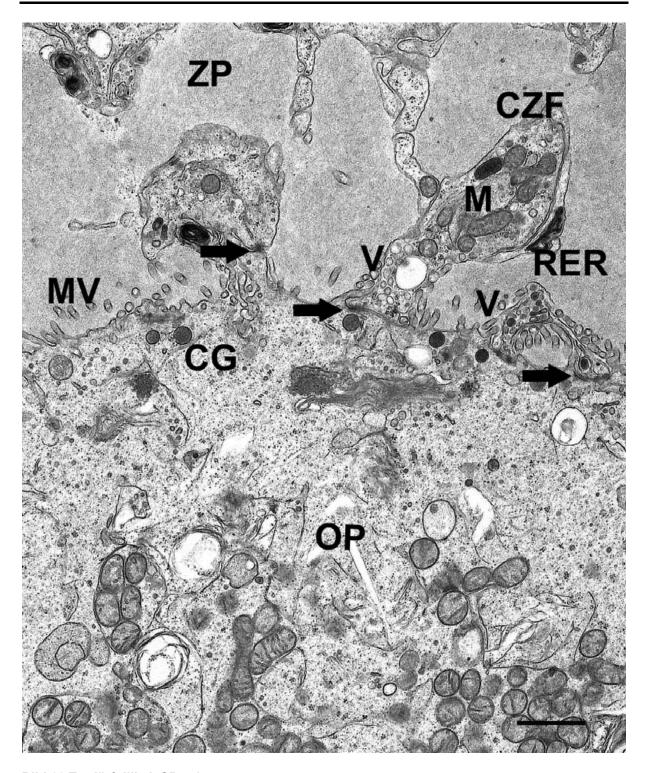


Bild 68 Tertiärfollikel, SB = 1 µm

Die Cumuluszellfortsätze (CZF) enthalten Ribosomen, Mitochondrien (M) und raues endoplasmatisches Retikulum (RER). Im Bereich der Kontaktstelle zur Oozyte sammeln sich Vakuolen (V) unterschiedlicher Größe und Elektronendichte. An den beiden Membranen bilden sich desmosomenähnliche Verbindungen (Pfeile) aus. ZP = Zona pellucida, MV = Mikrovilli, CG = kortikale Granula, OP = Ooplasma

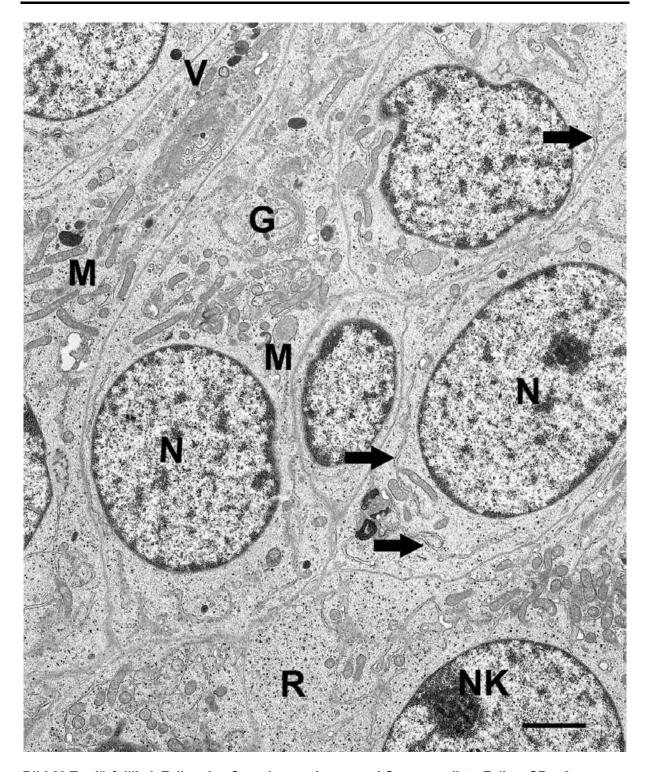


Bild 69 Tertiärfollikel, Zellen des Cumulus oophorus und Corona radiata-Zellen, SB = 2  $\mu$ m

Die Cumuluszellen enthalten einen großen runden Kern, eine große Anzahl an langen schlangenförmigen Mitochondrien (M), (Poly-) Ribosomen (R) und Golgi-Apparat (G). Das raue endoplasmatische Retikulum (Pfeile) ist deutlich dilatiert und lang. In den Fortsätzen zur Oozyte lassen sich unterschiedlich große und elektronendichte Vesikel (V) darstellen. N = Nukleus, NK = Nukleolus

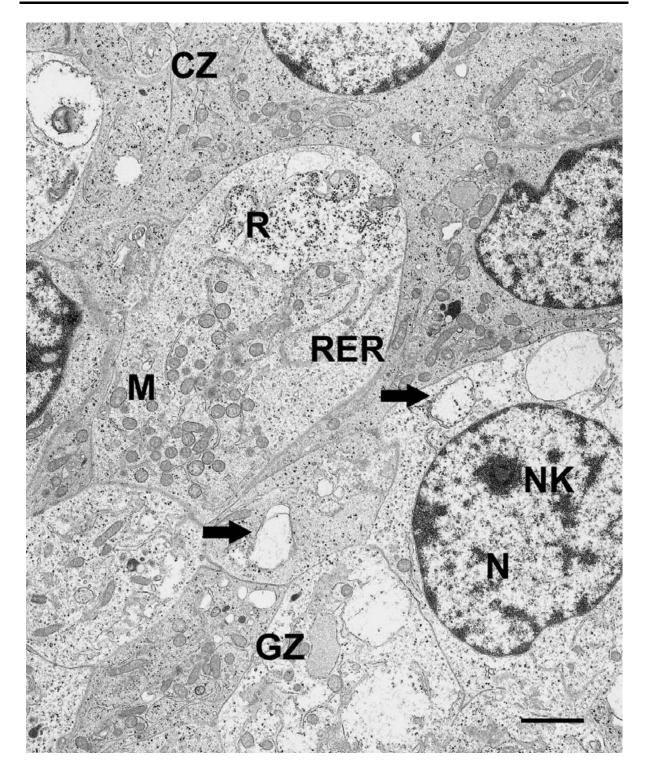


Bild 70 Tertiärfollikel, Übergangszone zwischen Cumulus oophorus und Granulosazellen (Intermediärzellen), SB =  $2 \mu m$ 

In einem Übergangsbereich grenzen die Granulosazellen (GZ) direkt an die Cumuluszellen (CZ). Die Zellen enthalten runde und längliche Mitochondrien (M) sowie eine Vielzahl an (Poly-) Ribosomen (R). Das überwiegend raue endoplasmatische Retikulum (RER) bildet vor allem in den Granulosazellen neben langen Strängen auch weite Zisternen (Pfeile). N = Nukleus, NK = Nukleolus

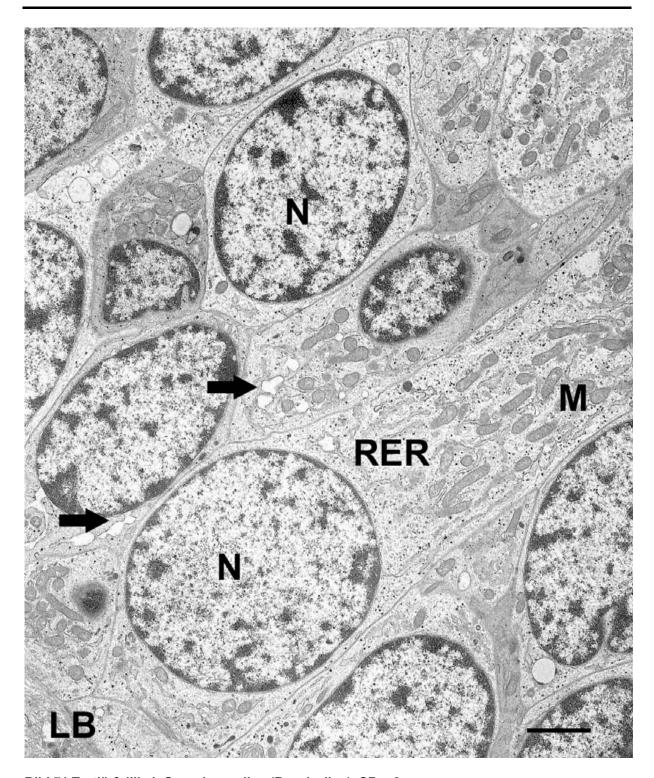


Bild 71 Tertiärfollikel, Granulosazellen (Basalzellen), SB =  $2 \mu m$ 

Die basal liegenden Granulosazellen besitzen große runde Kerne (N), lange Mitochondrien mit lamellären Cristae (M) sowie unterschiedlich stark dilatierte Zisternen an endoplasmatischem Retikulum vom meist rauen Typ (Pfeile, RER). LB = Lamina basalis

# 4.2 Untersuchungen an caninen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung

# 4.2.1 Einflussfaktoren auf die Anzahl gewinnbarer Oozyten

Durch Slicing konnten aus beiden Ovarien von insgesamt 61 kastrierten Hündinnen 4605 Oozyten gewonnen werden. Von einer Hündin gelang es somit durchschnittlich 75,5 Oozyten (± 46,17 Oozyten) zu isolieren. Die Spannweite der Oozytenanzahl pro Hündin lag zwischen 0 und 230 Oozyten und war damit sehr groß. Es zeigte sich, dass die Anzahl an Oozyten großen individuellen Schwankungen unterliegt.

#### Alter der Hündinnen

Die 61 untersuchten Hündinnen waren zwischen 4 Monaten und 12,5 Jahren (150 Monaten) alt, wobei fast 80% aller Hündinnen zum Zeitpunkt der Kastration 24 Monate oder jünger waren. Im Mittel betrug das Alter der Hündinnen 24,7 Monaten (± 25,37 Monate).

Die höchste Anzahl an Oozyten konnte mit 230 Oozyten aus den Ovarien einer 12 Monate alten Hündin, die geringste (0 Oozyten) bei je einem sechs und einem 60 Monate alten Tier gewonnen werden. Die Auswertung ergibt, dass die Spannweite der Oozytenanzahl sehr groß und deutlich von individuellen Begebenheiten geprägt ist. Insgesamt kann eine deutliche Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl vom Alter der Hündin festgestellt werden. Die Anzahl der gewonnenen Oozyten pro Hündin ist signifikant negativ mit dem Alter der Hündin korreliert (nach Spearman, p < 0.05, r = -0.258) (Bild 72).

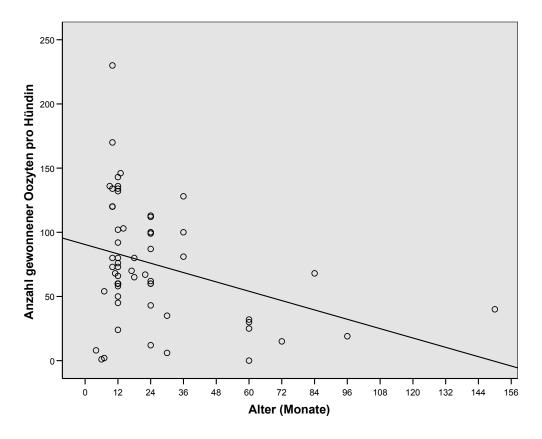


Bild 72 Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl pro Hündin vom Alter der jeweiligen Hündin (n = 61)

Die Anzahl an gewonnenen Oozyten pro Hündin sinkt mit zunehmendem Alter der Hündin.

Die Korrelation zwischen Alter und gewonnener Oozytenanzahl ist signifikant (nach Spearman, zweiseitig, p < 0.05, r = -0.258).

Aufgrund des Alters können die einzelnen Hündinnen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. So zeigen sich Unterschiede in der gewonnenen Oozytenanzahl zwischen Hündinnen von 0 bis 9 Monaten, von 10 bis 36 Monaten und von Hündinnen über 36 Monaten. Von Hündinnen zwischen 0 und 9 Monaten (Altersgruppe 1, n = 4) konnten im Mittel 16 Oozyten (± 25 Oozyten), von Hündinnen zwischen 10 und 36 Monaten (Altersgruppe 2, n = 49) 88 Oozyten (± 42 Oozyten) und von Hündinnen über 36 Monaten durchschnittlich (Altersgruppe 3, n = 8) 29 Oozyten (± 20 Oozyten) gewonnen werden. Die Unterschiede in der gewonnenen Oozytenanzahl zwischen Altersgruppe 1 und 2 sowie zwischen Altersgruppe 2 und 3 sind hochgradig signifikant (nach t-Test, p < 0,01) (Bild 73).

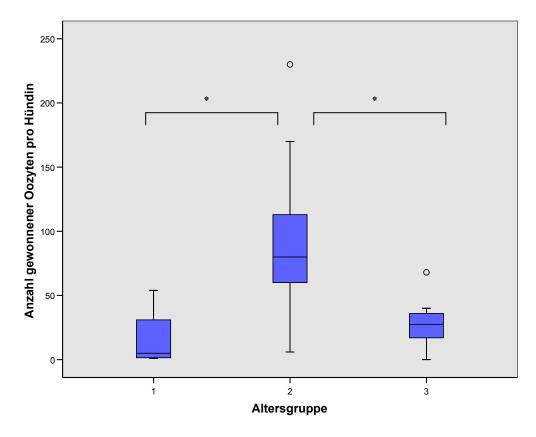


Bild 73 Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl von der Altersgruppe der Hündin Altersgruppe: 1 = 0-9 Monate (n = 4), 2 = 10-36 Monate (n = 49), 3 = über 36 Monate (n = 8)

Die Unterschiede zwischen Altersgruppe 1 und 2 sowie zwischen Altersgruppe 2 und 3 sind hochgradig signifikant (  $^*$  ) (nach t-Test, p < 0,01).

Boxplot- Diagramm: Interquantile (blaue Box), Medianwert, Ausreißer (o), Spannweite der Verteilung

### Reproduktionsstatus der Hündinnen

Zum Zeitpunkt der Kastration befanden sich die Hündinnen in unterschiedlichen Reproduktionsstadien. Aufgrund des Vorberichtes und des Ovarbefundes können die Hündinnen folgenden Status zugeordnet werden: Vor der ersten Läufigkeit, Anöstrus, Follikelphase, Lutealphase und trächtig. 76% aller untersuchten Hündinnen befanden sich im Anöstrus. Die höchste Oozytenanzahl wurde von einer Hündin im Anöstrus (230 Oozyten), die geringste jeweils bei einer Hündin vor der ersten Läufigkeit sowie einer Hündin in der Lutealphase (keine gewonnenen Oozyten) gewonnen. Die Streuung der Werte ist bei allen Stadien sehr groß und zeigt deutliche individuelle Unterschiede. Von Hündinnen vor der ersten Läufigkeit (n = 5) konnten durchschnittlich 40 Oozyten (± 57 Oozyten), von Hündinnen im Anöstrus im Mittel 83 Oozyten (± 45 Oozyten) (n = 41) gewonnen werden. In der Follikelphase befand sich nur eine der untersuchten Hündinnen. Von ihr konnten insgesamt

40 Oozyten isoliert werden, während in der Lutealphase (n = 9) durchschnittlich 68 Oozyten (± 43 Oozyten) und während der Trächtigkeit (n = 5) 70 Oozyten (± 46 Oozyten) gewonnen werden konnten. Die Anzahl an gewonnenen Oozyten ist zwischen den einzelnen Reproduktionsstadien nicht statistisch signifikant unterschiedlich (nach t-Test, für p < 0,05) (Bild 74).

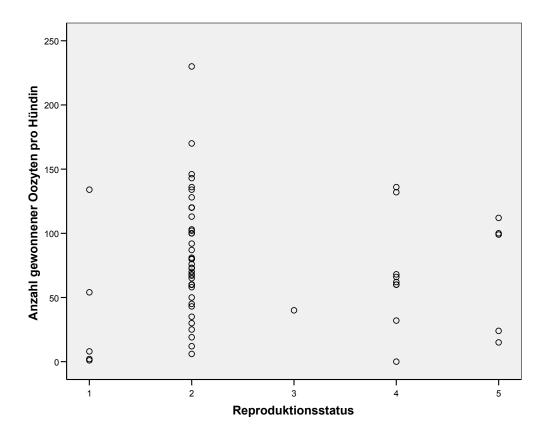


Bild 74 Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl vom Reproduktionsstatus der Hündin Reproduktionsstatus: 1 = Vor der ersten Läufigkeit (n = 5), 2 = Anöstrus (n = 41), 3 = Follikelphase (n = 1), 4 = Lutealphase (n = 9), 5 = Trächtig (n = 5)

Die Anzahl an gewonnenen Oozyten pro Hündin verändert sich mit dem Reproduktionsstatus nicht (nach t-Test, für p < 0.05).

#### Rasse der Hündinnen

Unter den 61 untersuchten Hündinnen befanden sich 7 Terrier, 6 Beagle, 5 DSH, 5 Retriever, 4 Dackel, 2 Border Collies, je ein Beanceron, Berner-Sennen-Hund, Boxer, Bulldogge, Dalmatiner und Pudel, sowie 26 Mischlinge. In die Beurteilung der gewonnenen Oozytenanzahl pro Rasse wurden nur Rassen berücksichtigt, von denen mindestes 5 Tiere

untersucht wurden. Alle anderen wurden als "Sonstige" zusammengefasst. Da eine deutliche Alterstendenz bei einigen der Rassen zu beobachten war, wurden nur Hündinnen zwischen 10 und 36 Monaten in die Auswertung miteinbezogen. Von Mischlingen (n = 21) wurden durchschnittlich 83 Oozyten ( $\pm$  35 Oozyten), von Terriern (n = 6) 81 Oozyten ( $\pm$  21 Oozyten), von Beagles (N = 5) 96 Oozyten ( $\pm$  16 Oozyten), von Retrievern (n = 5) 110 Oozyten ( $\pm$  73 Oozyten) und von "Sonstigen" (n = 12) 87 Oozyten ( $\pm$  53 Oozyten) gewonnen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Hunderassen nachgewiesen werden (nach t-Test, für p < 0,05) (Bild 75).

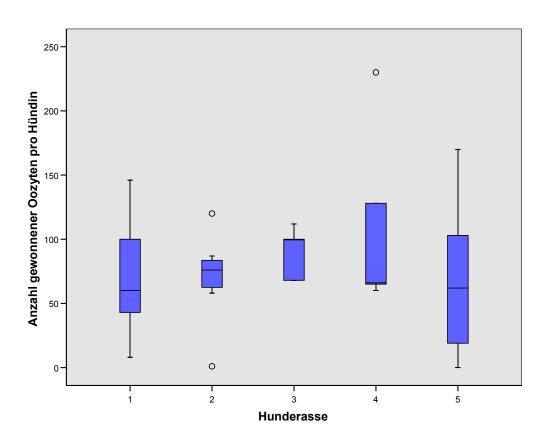


Bild 75 Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl von der Hunderasse von Hündinnen im Alter von 10 bis 36 Monaten

Rasse: 1 = Mischling (n = 21), 2 = Terrier (n = 6), 3 = Beagle (n = 5), 4 = Retriever (n = 5), 5 = Sonstige (n = 12)

Die Hunderasse hat keinen statistischen Einfluss auf die Anzahl gewonnener Oozyten pro Hündin (nach t-Test, für p < 0,05).

Boxplot- Diagramm: Interquantile (blaue Box), Medianwert, Ausreißer (o), Spannweite der Verteilung

### Transportzeit der Ovarien

Die Transportzeit der Ovarien zwischen der Entnahme der Ovarien während der Kastration der Hündin bis zum Beginn der Gewinnung der Oozyten im Labor betrug zwischen 15 Minuten und sieben Stunden (420 Minuten). Durchschnittlich betrug die Zeit, die verstrich, gute zwei Stunden [Arithmeth. Mittel 133,8 Minuten (± 97,3 Minuten)]. Es zeigt sich, dass die Anzahl an gewonnenen Oozyten pro Hündin nicht signifikant abhängig von der Transportdauer der Ovarien ist (nach Spearman, für p < 0,05), auch wenn eine Tendenz zu weniger gewonnnen Oozyten nach einer Transportdauer von 240 Minuten zu beobachten ist (Bild 76).

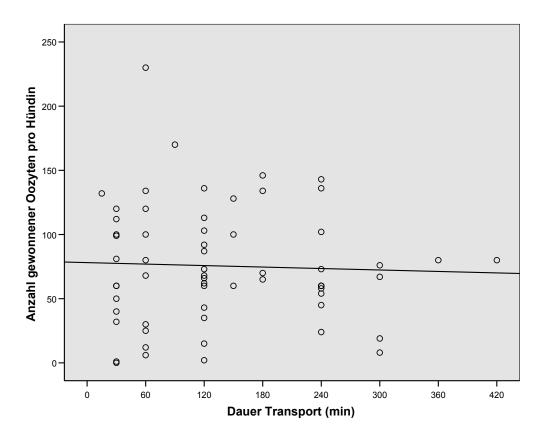


Bild 76 Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl von der Transportdauer der Ovarien zwischen Ovarentnahme und Beginn der Oozytengewinnung im Labor (n = 61)

Die Anzahl an gewonnenen Oozyten pro Hündin verändert sich mit zunehmender Transportdauer der Ovarien nicht (nach Spearman, zweiseitig, für p < 0,05).

# 4.2.2 Größenparameter der gewonnen Oozyten

An 53 unmittelbar nach der Gewinnung in 4% PFA fixierten Oozyten wurden mittels des LSM Image Browsers der Durchmesser der Oozyte (ohne Zona pellucida), der Durchmesser des "germinal vesicle" sowie die Dicke der Zona pellucida gemessen. Dabei wurden nur Oozyten gemessen, deren dreidimensionale Form aufgrund der Verwendung eines Platzhalters bei der Fixierung auf Objektträger erhalten werden konnte. Die Oozyten weisen einen mittleren Durchmesser von 109  $\mu$ m ( $\pm$  15  $\mu$ m), der "germinal vesicle" von 30  $\mu$ m ( $\pm$  5  $\mu$ m) und die Zona pellucida eine Dicke von 15  $\mu$ m ( $\pm$  3  $\mu$ m) auf (Tab. 14).

Tab. 14 Größenparameter von frisch gewonnenen Oozyten der Kategorie A bis C (n = 53)

	Durchmesser der Oozyte (µm)	Durchmesser des "germinal vesicle" (µm)	Dicke der Zona pellucida (µm)	
Spannweite	43,4 - 127,3	15,2 - 39,5	6,7 - 21,6	
Arithmeth. Mittel ± SD	108,7 ± 14,99	30,3 ± 5,22	15,3 ± 3,47	

Arithmeth. = arithmetisch, SD = Standardabweichung

Die Untersuchungen des Oozyten- und "germinal vesicle" -Durchmessers zeigen, dass der Durchmesser des "germinal vesicle" mit zunehmendem Durchmesser der Oozyten ansteigt. Die beiden Werte zeigen eine positive hochgradig signifikante Korrelation (nach Spearman, p < 0.01, r = 0.459) (Bild 77).

Im Gegensatz dazu kann kein Zusammenhang zwischen dem Durchmesser der Oozyten und der Dicke der Zona pellucida nachgewiesen werden (nach Spearman, für p < 0,05) (Bild 78).

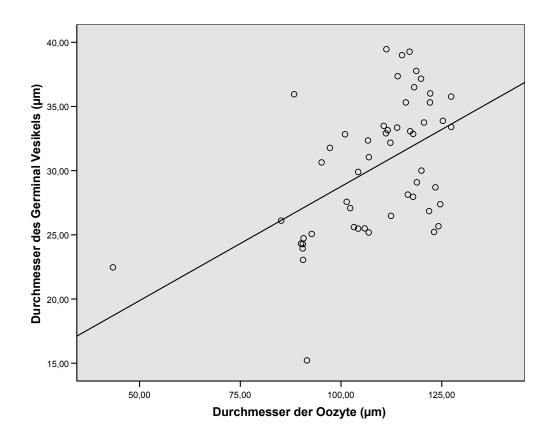


Bild 77 Abhängigkeit des Durchmessers des "germinal vesicle" vom Durchmesser der Oozyte bei frisch gewonnen in PFA fixierten caninen Oozyten (n = 53)

Der Durchmesser des "germinal vesicle" steigt mit zunehmendem Durchmesser der Oozyten an.

Die Korrelation zwischen dem Durchmesser der Oozyten und dem Durchmesser des "germinal vesicle" ist hochgradig signifikant (nach Spearman, zweiseitig, p < 0.01, r = 0.459).

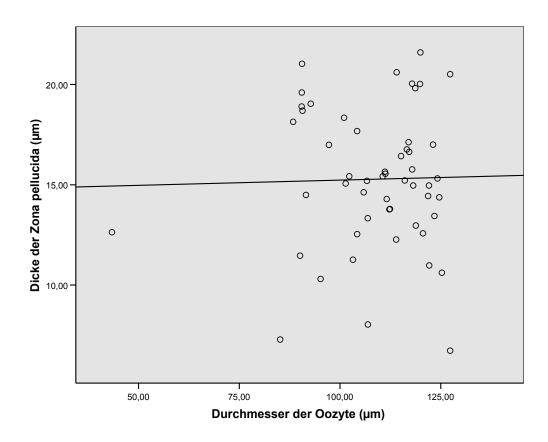


Bild 78 Abhängigkeit der Dicke der Zona pellucida vom Durchmesser der Oozyte in frisch gewonnen in PFA fixierten caninen Oozyten (n= 53)

Es kann kein Zusammenhang zwischen der Dicke der Zona pellucida und dem Durchmesser der Oozyte nachgewiesen werden (nach Spearman, zweiseitig, für p < 0.05).

# 4.2.3 Nativbeurteilung caniner Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung

#### Beurteilung der Oozyten vor IVM

Die caninen Oozyten wurden durch Slicing der Ovarien mit einer Skalpellklinge gewonnen und unmittelbar danach unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena) bei verschiedenen Vergrößerungen (40x – 400x) beurteilt. Dabei zeigt sich, dass die Oozyten sehr große morphologische Unterschiede aufweisen. So können sowohl intakte Oozyten mit vollständigem oder unvollständigem Cumulus oophorus, Oozyten mit defekter Zona pellucida, als auch Oozytenbruchstücke isoliert werden. Die Oozyten weisen bereits bei geringer Vergrößerung deutlich erkennbare Größenunterschiede auf (Bild 79).

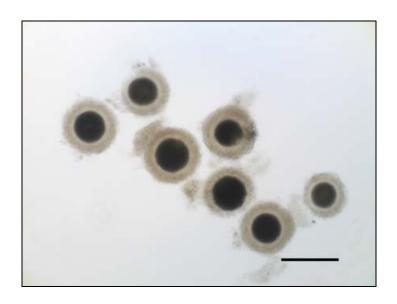


Bild 79 Frisch gewonnene canine Oozyten, SB = 200 µm

Es zeigen sich Oozyten unterschiedlicher Größe mit vollständigem oder unvollständigem Cumulus oophorus.

Die Klassifizierung der frisch gewonnen Oozyten erfolgte nach der Einteilung von Theiss (1997) (Tab. 15). Von den 4605 gewonnenen Oozyten konnten demnach 48,1% (2215 Oozyten) der Kategorie A, 14,7% (677 Oozyten) der Kategorie B sowie 11,4% (523 Oozyten) der Kategorie C zugeordnet werden. 25,8% der Oozyten (1190 Oozyten) waren defekt oder zeigten ein inhomogenes Zytoplasma (Kategorie D).

Die Aufteilung der Oozyten in diese vier Kategorien war unabhängig von Alter, Rasse und Reproduktionsstatus der Hündin, sowie von der Transportzeit der Ovarien von der Entnahme in der tierärztlichen Praxis bis zur Oozytengewinnung im Labor.

Tab. 15 Klassifizierung der gewonnenen Oozyten nach den Kriterien von Theiss (1997)

Kategorie	Morphologische Kriterien	Anzahl	Anteil (%)	
Α	Homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, mindestens zwei intakte Cumuluszelllagen	2215	48,1	
В	Homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, Cumuluszelllagen nicht intakt	677	14,7	
С	Homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, keine Cumuluszellen	523	11,4	
D	Inhomogenes oder helles Ooplasma und/oder defekte Ooplasmamembran und/oder nur Oozytenbruchstücke	1190	25,8	
Gesamt		4605	100	

In intakten COCs mit mehreren vollständigen Cumuluszelllagen (Kategorie A) erscheinen die Cumuluszellen kompakt und eng mit der Oozyte verbunden. Solche COCs weisen in der Regel ein dunkles, homogenes Zytoplasma auf. Die Lage des "germinal vesicle" kann bei vielen Oozyten im Zentrum oder mit leicht exzentrischer Lage als heller Fleck identifiziert werden (Bild 80). Bei intakten COCs ist eine genaue Beurteilung des Zytoplasmas aufgrund der Cumuluszellen nicht möglich. Die Zona pellucida schimmert jedoch als heller Ring am Rand der Oozyte durch die dichten Cumuluszelllagen (Bild 81).

Eine Beurteilung von Zytoplasma sowie von Zona pellucida kann nur bei Oozyten mit unvollständigem oder fehlendem Cumulus oophorus durchgeführt werden (Kategorie B und C) (Bild 82 und Bild 83). Bei diesen Oozyten zeigt sich das Zytoplasma meist dunkel und homogen. Der "germinal vesicle" kann auch bei vielen dieser Zellen als zentraler heller Fleck identifiziert werden. Deutlich kann die Zona pellucida beurteilt werden, die eine radiär gestreifte Struktur aufweist (Bild 83). Der Bruch der Zona pellucida führt zum Austritt von Zytoplasmamaterial (Kategorie D) (Bild 84).

Unter den Oozyten mit unvollständigen oder fehlenden Cumuluszelllagen treten häufig degenerierte Zellen in verschiedenen Stadien auf. Neben Oozyten mit hellem, granuliertem oder vakuoliertem Zytoplasma finden sich auch stärker degenerierte, dunkle, geschrumpfte Oozyten von flacher, runder oder ovaler Gestalt. Letztere zeigen zusätzlich Veränderungen wie ein inhomogenes Zytoplasma oder auch eine ungleichmäßige oder fehlende Zona pellucida (Kategorie D) (Bild 84 und Bild 85). In seltenen Fällen wurden gesamte, noch von der Basalmembran umschlossene Follikel gewonnen (Bild 86). Eine genauere Beurteilung der COCs ist in diesen Fällen nicht möglich.

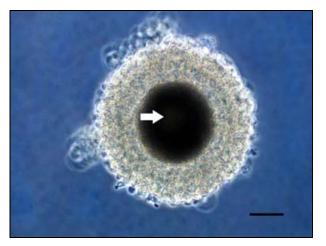


Bild 80 Frisch gewonnene COC der Kategorie A, SB = 50 μm

Die Oozyte besitzt mehrere intakte Cumuluszelllagen und ein helles Zentrum (dicker Pfeil).

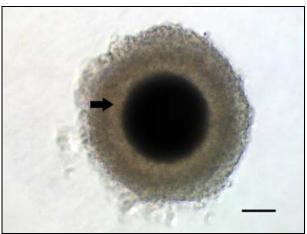


Bild 81 Frisch gewonnene COC der Kategorie A, SB = 50 μm

Die Zona pellucida (Pfeil) scheint deutlich durch die dichten Cumuluszelllagen.

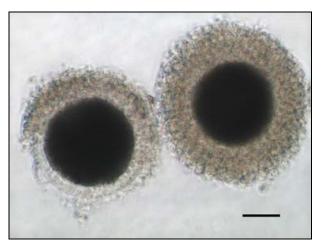


Bild 82 Frisch gewonnene COCs, SB = 50  $\mu m$ 

Intakte COC (Kategorie A) und COC mit unvollständigen Cumuluszelllagen (Kategorie B).

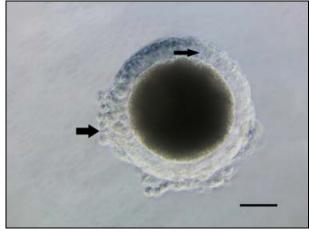


Bild 83 Frisch gewonnene Oozyte der Kategorie C, SB = 50 µm

Oozyte mit vereinzelten Cumuluszellen (dicker Pfeil) sowie sichtbarer Radiärstruktur der Zona pellucida (dünner Pfeil).

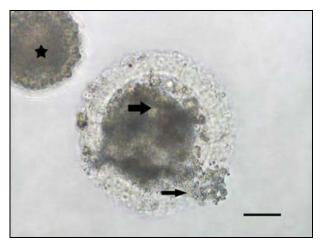


Bild 84 Frisch gewonnene Oozyte der Kategorie D, SB = 50 μm

Der Bruch der Zona pellucida führt zum Austritt von Zytoplasmamaterial (dünner Pfeil) und zu einem vakuoliertem inhomogenem Zytoplasma (dicker Pfeil). Degenerierte Oozyte (Stern).

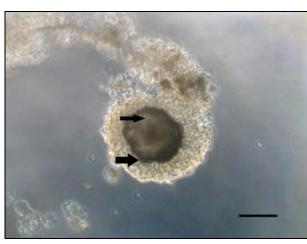


Bild 85 Frisch gewonnene Oozyte der Kategorie D, SB = 100 μm

Die Oozyte zeigt deutliche Anzeichen an Degeneration [Oozyte unrund, fehlende Zona pellucida (dicker Pfeil), inhomogenes Zytoplasma (dünner Pfeil)].

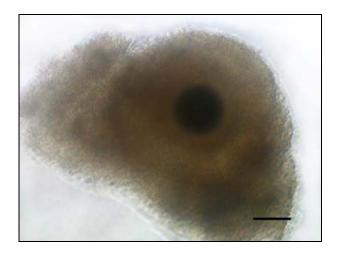


Bild 86 Frisch gewonnener Follikel,  $SB = 100 \ \mu m$  Eine Beurteilung der COC ist nicht möglich.

### Beurteilung der Oozyten nach IVM

Für die Versuche nach In-vitro-Reifung wurden nur Oozyten mit und ohne Cumulus oophorus mit homogenem dunklem Zytoplasma (Kategorie A-C) verwendet. Von 36 der Hündinnen wurden insgesamt 1175 Oozyten der Kategorie A-C zwischen 24 und 72 Stunden in IVM-Kulturmedium gereift. Ein Teil der Oozyten wurde nach verschiedenen IVM-Zeiten in eine Schale mit PBS umgesetzt und dann unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena) beurteilt. Auch nach unterschiedlichen Reifungszeiten können an den Oozyten jedoch nur geringe Veränderungen in der Morphologie festgestellt werden.

Das Zytoplasma der meisten Oozyten unterscheidet sich kaum von dem der ungereiften Oozyten. Es ist dunkel und homogen, die Zona pellucida schimmert als heller Ring durch den Cumulus oophorus (Bild 87). Im Gegensatz zu den ungereiften Oozyten weisen viele der gereiften Oozyten eine große Anzahl an runden Vesikel auf, die sich am Rand des Ooplasmas zeigen und damit zu einer Aufhellung am Rand des Ooplasmas führen. Der "germinal vesicle" kann allerdings nur mehr bei manchen der Oozyten als heller Fleck im Zentrum der Zelle nachgewiesen werden (Bild 88).

Lediglich bei den Oozyten einer Hündin können mittels Nativbeurteilung deutliche Anzeichen einer Kernreifung dargestellt werden. Die Oozyten bilden einen deutlichen Perivitellinspalt, sowie zwei Polkörperchen aus (Bild 89).

Bei den meisten Oozyten ändert sich die Morphologie der Cumuluszellen kaum. Bei wenigen der COCs kann Cumulusexpansion festgestellt werden, die sich meist nur in einer geringen Vermehrung der Cumuluszellen erkennen lässt (Bild 90). Die Cumuluszellen sind meist lose mit der Oozyte verbunden und lassen sich ab einer Kulturzeit von 24 Stunden leicht mechanisch entfernen. In geringerem Umfang finden sich Oozyten, bei denen sich der Cumulus oophorus auch nach längerer Reifungszeit nicht entfernen lässt.

Die Zona pellucida zeigt sich radiär gestreift (Bild 88 und Bild 89).

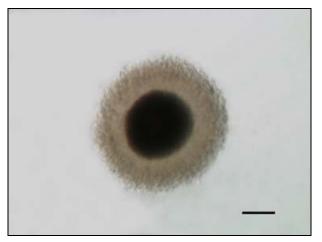


Bild 87 COC nach 24 Stunden IVM, SB = 50  $\mu$ m

Die Oozyte ist nach einer Reifungszeit von 24 Stunden von einer dichten Cumuluszellschicht umgeben. Die Zona pellucida scheint als heller Ring durch den Cumulus oophorus.

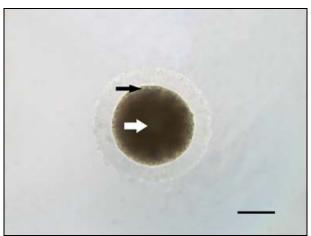


Bild 88 Oozyte nach 72 Stunden IVM,  $SB = 50 \ \mu m$ 

Der "germinal vesicle" ist als heller Fleck im Zentrum der Oozyte sichtbar (dicker Pfeil). Im Randbereich des Ooplasmas zeigen sich vermehrt kleine Vakuolen (dünner Pfeil).

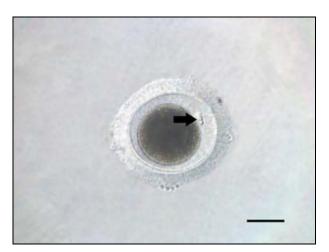


Bild 89 Oozyte nach 72 Stunden IVM,  $SB = 50 \ \mu m$ 

Gereifte Oozyte nach Bildung von zwei Polkörperchen (Pfeil).

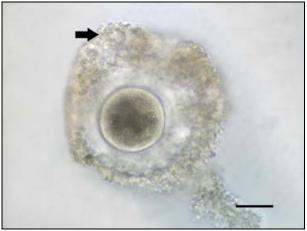


Bild 90 COC nach 72 Stunden IVM, SB = 50 μm

Der Cumulus oophorus zeigt geringgradige Expansion (Pfeil).

# 4.2.4 Kernbeurteilung

# Kernbeurteilung von Oozyten vor IVM

Insgesamt wurden 119 Oozyten der Kategorie A bis C direkt nach der Gewinnung in 4% PFA fixiert, mit Kernfarbstoffen (Propidiumjodid und/oder Hoechst 33342) gefärbt und der Zustand des Kernes und des Chromatins mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Propidiumjodid zeigt dabei stets eine deutliche Färbung des Nukleolus, während Hoechst 33342 vor allem die Chromosomen anfärbt. Die Kerne der Cumuluszellen färben sich stets sehr deutlich mit beiden Kernfarbstoffen (Bild 91).

Der Zustand des Kernes konnte jedoch nur bei 75% (89 Oozyten) aller Oozyten beurteilt werden. Bei den verbleibenden 25% (30 Oozyten) konnten die Bilder des Kernes aufgrund technischer Schwierigkeiten oder völlig fehlender Kerndarstellung nicht ausgewertet werden (Tab. 17). Bei allen beurteilbaren Oozyten kann der Kern dem "germinal vesicle" (GV)-Stadium zugeordnet werden, bei dem sich der GV deutlich rund abgrenzt und entweder zentral oder leicht peripher im Ooplasma liegt. Auffällig ist, dass das Chromatin der einzelnen Zellen unterschiedlich stark kondensiert erscheint und Oozyten sowohl mit keinem, einem oder zwei Nukleoli dargestellt werden können. Bei 69% (82 Oozyten) der Oozyten sind ein bis zwei Nukleoli sowie kaum bis deutlich kondensiertes Chromatin im Kern nachweisbar, während 6% (7 Oozyten) der Oozyten keine Nukleoli und stark bis sehr stark kondensiertes Chromatin im "germinal vesicle" aufweisen (Bild 91 bis Bild 94) (Tab. 16).

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Oozytenkategorien A bis C können nicht nachgewiesen werden (nach t-Test, für p < 0,05).

Tab. 16Klassifizierung der Chromatinkonfigurationen im "germinal vesicle" von ungereiften caninen Oozyten

Kategorie	Beurteilung	Anzahl	Anteil (%)
Α	Chromatin kaum bis deutlich kondensiert, 1-2 Nukleoli darstellbar	82	68,91
В	Chromatin stark bis sehr stark kondensiert, in Hufeisenform, rund oder als Klumpen im "germinal vesicle", kein Nukleolus darstellbar	7	5,88
Nicht beurt	Nicht beurteilbar		25,21
Gesamt		119	100

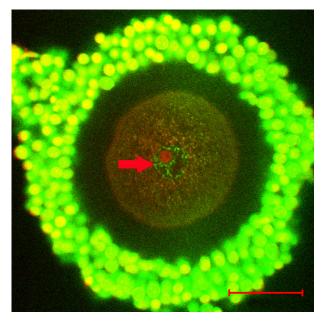


Bild 91 COC, ungereift, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm

GV-Stadium der Kategorie A. Der GV ist deutlich im Zentrum der Oozyte zu erkennen (Pfeil). Die Kerne der Cumuluszellen färben sich deutlich mit beiden Kernfarbstoffen.

gelb = Überlagerung von PI und Hoechst 33342

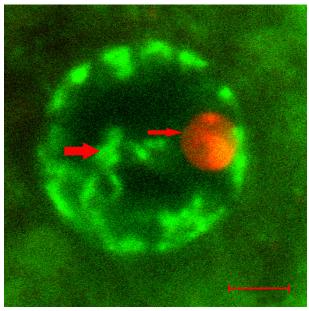


Bild 92 "Germinal vesicle", PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 20 μm

GV der Kategorie A. Im GV können einzelne Chromosomen (dicker Pfeil) sowie der Nukleolus (dünner Pfeil) deutlich dargestellt werden.

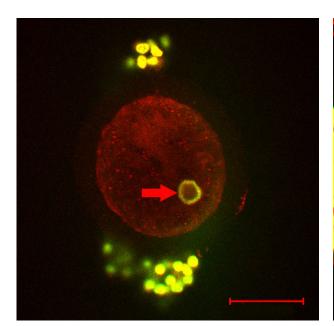


Bild 93 Oozyte, ungereift, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm

GV-Stadium der Kategorie B. Das Chromatin lagert sich ringförmig an den peripher liegenden GV (Pfeil). Nukleoli können nicht dargestellt werden.

gelb = Überlagerung von PI und Hoechst 33342

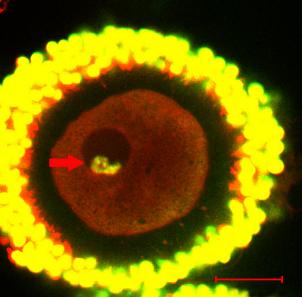


Bild 94 COC, ungereift, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm

GV-Stadium der Kategorie B. Das Chromatin liegt klumpenförmig im deutlich abgegrenzten GV (Pfeil). Es können keine Nukleoli dargestellt werden.

gelb = Überlagerung von PI und Hoechst 33342

### Kernbeurteilung von Oozyten nach IVM

Von 1175 unterschiedlich lange in Kulturmedium gereiften caninen Oozyten der Kategorie A bis C wurden 620 Oozyten in 4% PFA fixiert. Von diesen wurden wiederum 68 Oozyten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach verschiedenen Reifungszeiten auf Kernreifung hin dokumentiert (Tab. 17).

Propidiumjodid und Hoechst 33342 zeigen das gleiche Färbeverhalten wie in den ungereiften COCs.

Dabei zeigt sich, dass das "germinal vesicle" (GV)-Stadium auch nach 48 und 72 Stunden IVM noch bei einigen Oozyten nachgewiesen werden kann (Bild 95). Jedoch kann bereits nach einer Kulturzeit von 24 Stunden bei manchen Oozyten eine beginnende Chromatinkondensation bei gleichzeitig fehlender GV-Darstellung beobachtet werden. Nach 72 Stunden Aufenthalt in Kulturmedium zeigen mehrere Oozyten diese Kondensation des Chromatins sowie eine Verlagerung von Kernmaterial in die Peripherie der Zelle (Bild 96 und Bild 97). Die Stufe der Metaphase II kann frühestens nach 72 Stunden IVM und nur bei einer der Oozyten dargestellt werden. Im Perivitellinspalt können zwei Polkörperchen und im Ooplasma stark kondensiertes peripher gelegenes Chromatin nachgewiesen werden (Bild 98).

Aufgrund der geringen Oozytenanzahl wurde auf eine Auswertung der Reifungsraten anhand der einzelnen Kategorien sowie eine statistische Auswertung verzichtet.

Tab. 17 Überblick über die Kernreifestadien nach 0 bis 72 Stunden IVM (Anzahl)

IVM (h)	Fixiert	Davon mit CLSM untersucht		Nicht		
			GV	GVBD-MI	MII	beurteilbar
0	817	119	89	0	0	30
24	200	15	3	2	0	10
48	136	16	8	0	0	8
72	284	37	8	15	1	13
Gesamt	1437	187	108	17	1	61

IVM = In-vitro-Reifung, h = Stunden, CLSM = konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie,

GV = "germinal vesicle", GVBD = "germinal vesicle breakdown", MI = Metaphase I, MII = Metaphase II

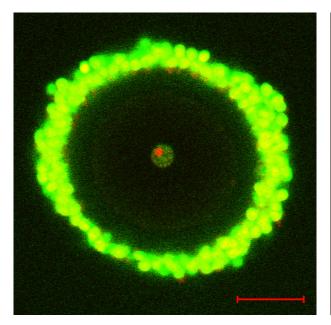


Bild 95 COC nach 48 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm

Der Kern befindet sich im "germinal vesicle"-Stadium.

gelb = Überlagerung von PI und Hoechst 33342

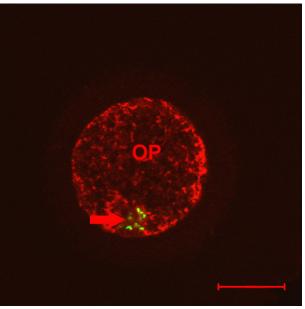


Bild 96 Oozyte nach 72 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm

GVBD-MI-Stadium. Kondensation des Chromatins und Verlagerung an den Rand, deutliche Ansammlung an PI im Ooplasma (OP).

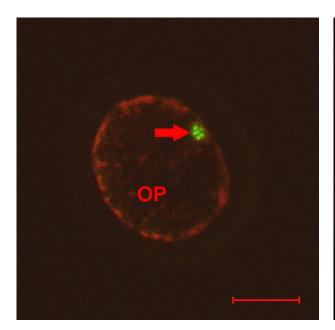


Bild 97 Oozyte nach 72 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm

MI-Stadium. Starke periphere Chromatinkondensation (Pfeil) im Ooplasma (OP) ohne nachweisbares Polkörperchen.

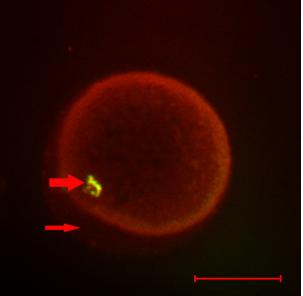


Bild 98 Oozyte nach 72 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50  $\mu$ m

MII-Stadium. Peripher kondensiertes Chromatin (dicker Pfeil) und deutlicher Perivitellinspalt (dünner Pfeil) bei einer Oozyte nach Polkörperbildung (nicht im Bild). gelb = Überlagerung von PI und Hoechst 33342

#### 4.2.5 Nachweis von α-Tubulin

Für die Darstellung der Mikrotubuli der Oozyte wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen humanes α-Tubulin durchgeführt.

In ungereiften caninen COCs kann eine geringe positive Immunreaktion mit dem verwendeten Antikörper im Zytoplasma der Oozyte und im Zytoplasma der Zellen des Cumulus oophorus beobachtet werden. Schwach positiv reagieren dabei vor allem die Bereiche am Rand des Ooplasmas. Im Bereich des "germinal vesicle" zeigt sich ebenfalls eine schwache Bindung des Antikörpers (Bild 99).

Anders erscheint die Reaktion mit dem  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper bei zwischen 24 und 72 Stunden in IVM-Medium kultivierten Oozyten. Das Ooplasma von Oozyten, bei denen gleichzeitig eine Chromatinkondensation dargestellt werden kann, reagiert im Randbereich deutlich immunpositiv auf  $\alpha$ -Tubulin. Jedoch kann im Bereich des sich kondensierenden Chromatins keine Bindung des Antikörpers beobachtet werden (Bild 100).

Nach 72 Stunden Kulturzeit kann bei einer Oozyte die Bildung von zwei Polkörperchen nachgewiesen werden. In diesen, sowie im Randbereich des Zytoplasmas der Oozyte zeigt sich eine deutlich positive Immunreaktion mit den Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Bild 101). Um das an den Rand verlagerte Chromatin zeigt sich ein schwach  $\alpha$ -Tubulin-positiv reagierender Ring (Bild 102).

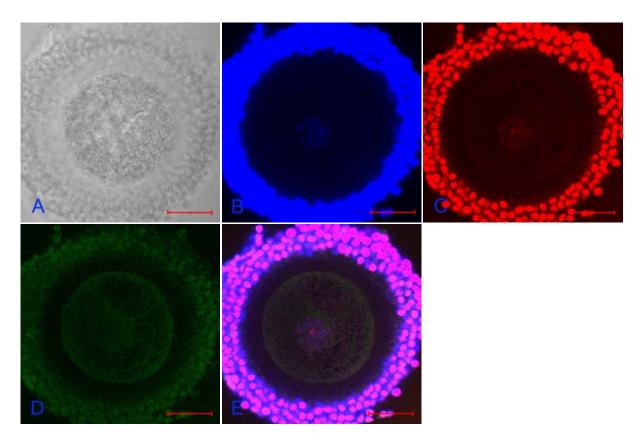


Bild 99 COC, ungereift, IF-Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin, SB = 50  $\mu$ m

COC im GV-Stadium. In der Oozyte und in den Zellen des Cumulus oophorus zeigt sich eine schwach positive Reaktion im Randbereich. Der Bereich des "germinal vesicle" reagiert schwach immunpositiv.

A = Durchlicht, B = Hoechst 33342 (blau), C = PI (rot), D =  $\alpha$ -Tubulin-FITC (grün), E = B + C + D

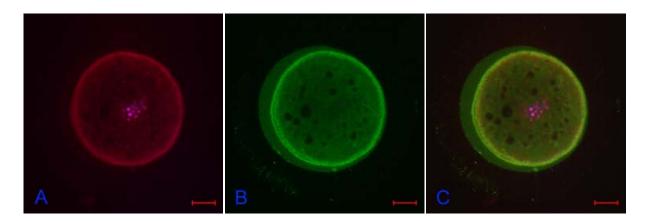


Bild 100 Oozyte nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin, SB = 20  $\mu$ m

Oozyte im GVBD-MI-Stadium. Zentral liegendes mittelgradig kondensiertes Chromatin. Ansammlung von  $\alpha$ -Tubulin im Randbereich der Oozyte.

A = Iila = PI (rot) und Hoechst 33342 (blau), B =  $\alpha$ -Tubulin-FITC (grün), C = A + B

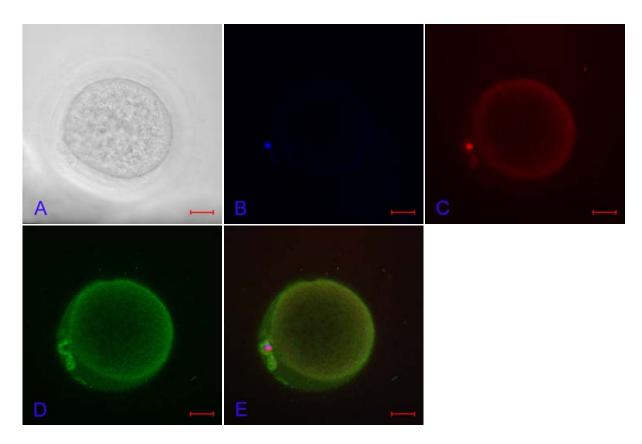


Bild 101 Oozyte nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin, SB = 20  $\mu$ m

Oozyte im MII-Stadium. In den beiden Polkörperchen sowie im Randbereich der Oozyte kann ein deutliches Tubulinnetzwerk nachgewiesen werden.

A = Durchlicht, B = Hoechst 33342 (blau), C = PI (rot), D =  $\alpha$ -Tubulin-FITC (grün), E = B + C + D

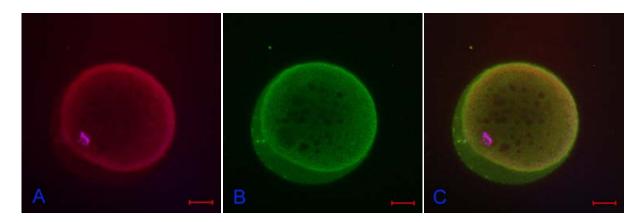


Bild 102 Gleiche Oozyte wie in Bild 101, IF-Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin, SB = 20  $\mu$ m

Oozyte im MII-Stadium. Um das stark kondensierte und an den Rand der Oozyte verlagerte Chromatin sowie im Randbereich des Ooplasmas zeigt sich eine deutliche Immunreaktion auf  $\alpha$ -Tubulin.

A = Iila = PI (rot) und Hoechst 33342 (blau), B =  $\alpha$ -Tubulin-FITC (grün), C = A + B

# 4.2.6 Nachweis von Connexin 43

Die "gap junctions" des Cumulus oophorus wurden mittels eines Antikörpers gegen Connexin 43 dargestellt. Connexin 43 zeigt sich in einer deutlich positiven Immunreaktion im Bereich des Cumulus oophorus sowohl bei Oozyten vor als auch nach IVM. Eine statistische Auswertung war nicht möglich, jedoch scheinen gereifte Oozyten geringere Mengen an nachweisbarem Connexin 43 aufzuweisen (Bild 103 und Bild 104).

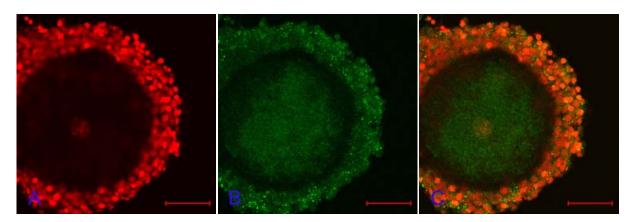


Bild 103 COC, ungereift, IF-Nachweis von Connexin 43, SB = 50 μm

Oozyte im GV-Stadium. Connexin 43 ist deutlich in den Cumuluszellen der Oozyte nachzuweisen.

A = PI (rot), B = Connexin 43 (grün), C = A + B

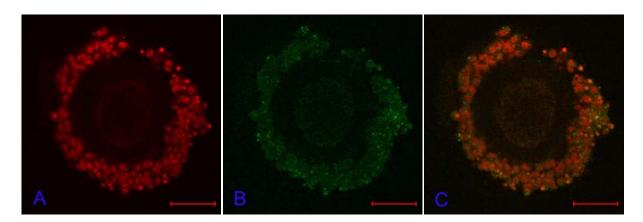


Bild 104 COC nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von Connexin 43, SB = 50  $\mu$ m Connexin43 ist deutlich in den Cumuluszellen der Oozyte nachzuweisen.

A = PI (rot), B = Connexin 43 (grün), C = A + B

# 4.2.7 Nachweis des Zona pellucida Glykoproteins 3β (ZP3β)

Der Immunfluoreszenznachweis des Zona pellucida Glykoproteins  $3\beta$  gelingt bei caninen COCs sowohl in der Oozyte als auch in den Zellen des Cumulus oophorus. Eine positive Immunreaktion auf ZP3 $\beta$  kann dabei insbesondere im Zytoplasma beider Zellarten nachgewiesen werden (Bild 105).

Insbesondere in ungereiften COCs stellen sich das Zytoplasma und die Fortsätze der Cumuluszellen durch die Zona pellucida deutlich positiv dar. In der Oozyte zeigt sich eine ZP3β-positive Immunreaktion im Randbereich, in geringerer Intensität aber auch im Zentrum der Zelle. In Bereichen, in denen die Cumuluszellfortsätze mit der Ooplasmamembran der Oozyte in Verbindung stehen kann eine lokal stärkere Reaktion mit dem Antikörper beobachtet werden (Bild 106 und Bild 107).

Nach In-vitro-Reifung scheint sich ZP3β stärker im Zytoplasma der Oozyte zu verteilen. Der ZP3β-positive Bereich am Rand der Oozyten ist schlechter zu erkennen. Deutlich kann ZP3β aber nach wie vor im Zytoplasma der Cumuluszellen nachgewiesen werden. Jedoch zeigen die Fortsätze der Cumuluszellen durch die Zona pellucida verglichen mit den ungereiften Oozyten eine deutlich schwächere Reaktion mit dem Antikörper (Bild 108 und Bild 109).

Die Cumuluszellen weisen nach IVM deutliche Vakuolenbildung auf (Bild 109).

Die Zona pellucida selbst reagiert, unabhängig von der Kulturzeit, stets sehr schwach oder gar nicht mit dem verwendeten Antikörper auf ZP3β (Bild 105 und Bild 108).

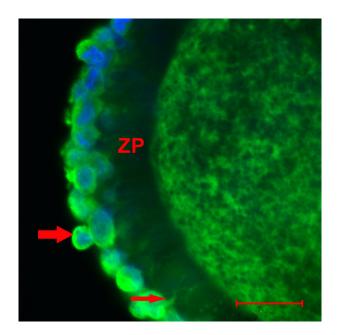


Bild 105 Oozyte, ungereift, IF-Nachweis von ZP3 $\beta$  (grün), Hoechst 33342 (blau), SB = 20  $\mu$ m

Deutlich positive Immunreaktion im Zytoplasma der Cumuluszellen (dicker Pfeil) und deren Fortsätze (dünner Pfeil) durch die Zona pellucida (ZP). Die Zona pellucida (ZP) selbst zeigt nur eine sehr schwache ZP3β-positive Reaktion.

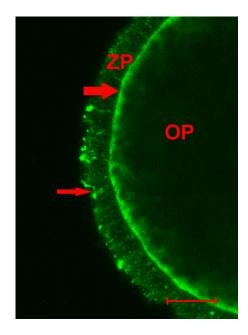


Bild 106 Oozyte, ungereift, IF-Nachweis von ZP3β (grün), SB = 20 μm

Deutlich ZP3β-positive Immunreaktion am Rand des Ooplasmas (OP) (dicker Pfeil) und in den Fortsätzen der Cumuluszellen durch die Zona pellucida (ZP) (dünner Pfeil).

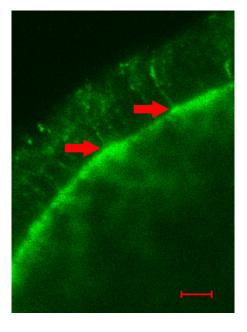


Bild 107 Oozyte, ungereift, IF-Nachweis von ZP3β (grün), SB = 5 μm

Im Bereich, in dem die Cumuluszellfortsätze an der Ooplasmamembran der Oozyte enden, zeigt sich eine deutliche Ansammlung an ZP3β-positivem Material (Pfeile).

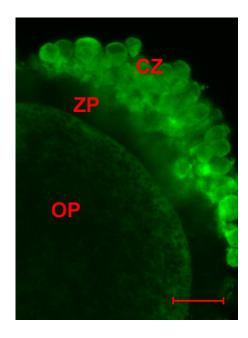


Bild 108 Oozyte nach 24 Stunden IVM, IF-Nachweis von ZP3 $\beta$  (grün), SB = 20  $\mu$ m

Das Zytoplasma der Cumuluszellen (CZ) weist eine deutlich positive, das Ooplasma (OP) eine schwache und die Zona pellucida (ZP) keine positive Reaktion mit dem ZP3β-Antikörper auf.

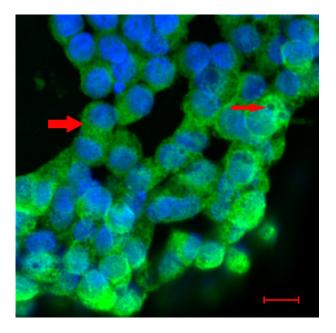


Bild 109 Cumuluszellen nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von ZP3 $\beta$  (grün), Hoechst 33342 (blau), SB = 10  $\mu$ m

Eine Bindung des Antikörpers ist im Zytoplasma der Cumuluszellen nachweisbar (dicker Pfeil). Das Zytoplasma weist deutliche Vakuolenbildung auf (dünner Pfeil).

# 4.2.8 Bindungsstellen von *Triticum vulgare Agglutinin* (WGA) und *Glycine max Agglutinin* (SBA)

# Bindungsstellen von WGA

Die Inkubation von ungereiften caninen Oozyten mit dem Lektin WGA führt zu einer deutlichen, gleichmäßigen Fluoreszenz der gesamten Zona pellucida, die bei einigen Zellen im Bereich der Ooplasmamembran leicht abgeschwächt erscheint und eine undeutliche Grenze zum Ooplasma bildet. Im Ooplasma kann stets eine sehr geringe Fluoreszenz nachgewiesen werden. Das Zytoplasma der Cumuluszellen reagiert stets negativ auf WGA.

Dieses Bindungsverhalten von WGA verändert sich auch nach unterschiedlichen Zeiten der In-vitro-Kultur nicht (Bild 110, Bild 111 und Bild 112).

#### Bindungsstellen von SBA

Das Lektin SBA zeigt eine deutliche Bindung an die Zona pellucida des Hundes. So können bei den Oozyten vier verschiedene Schichten als unterschiedlich deutlich fluoreszierende Ringe innerhalb der Zona pellucida unterschieden werden. Die innen liegende Schicht der Zona, die in direktem Kontakt zur Ooplasmamembran steht, zeigt dabei stets die intensivste Fluoreszenz mit SBA. Daran schließt sich eine schwächer reagierende Schicht an, auf die eine nur sehr gering SBA-positive Schicht folgt. Am äußersten Rand der Zona pellucida befindet sich erneut eine schwächer fluoreszierende Schicht. Die Abschnitte der Zona pellucida, die zwischen den Cumuluszellen liegen zeigen ebenfalls nur eine schwache Reaktion. Die innerste Schicht ist dabei bei allen untersuchten Oozyten deutlich zu erkennen, während die anderen bei einigen Oozyten nicht zu unterscheiden sind. Eine geringe Bindung mit SBA weist das Zytoplasma der Cumuluszellen auf (Bild 113 und Bild 114).

Die Verteilung der Fluoreszenz im Bereich der Zona pellucida zeigt nach verschiedenen Kulturzeiten keine Veränderung (Bild 115 und Bild 116).

Sowohl vor als auch nach IVM reagieren kleine positive Granula im Zytoplasma von manchen Oozyten deutlich positiv mit SBA (Bild 114 und Bild 115). In einigen Oozyten kann nach Kultur in Reifungsmedium eine Zunahme der Fluoreszenz in den Cumuluszellen beobachtet werden (Bild 115 und Bild 116).

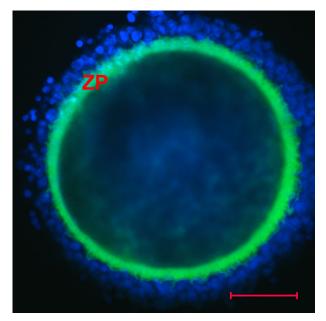


Bild 110 COC, ungereift, WGA (grün), Hoechst 33342 (blau), SB = 50 μm

Es zeigt sich eine gleichmäßige Fluoreszenz der gesamten Zona pellucida (ZP) nach Inkubation mit WGA.

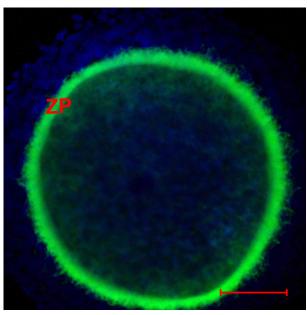


Bild 111 COC nach 24 Stunden IVM, WGA (grün), Hoechst 33342 (blau), SB = 50 μm

Die Reaktion der Zona pellucida (ZP) auf WGA-FITC verändert sich nach IVM nicht.

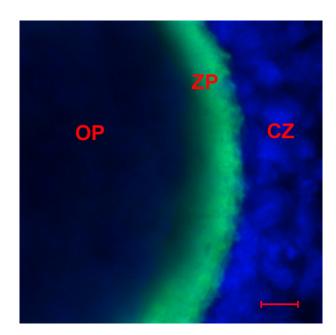


Bild 112 Zona pellucida nach 72 Stunden IVM, WGA (grün), Hoechst 33342 (blau), SB = 10 μm

Die Zona pellucida (ZP) zeigt in den inneren Bereichen eine schwächere Fluoreszenz als am äußeren Rand.

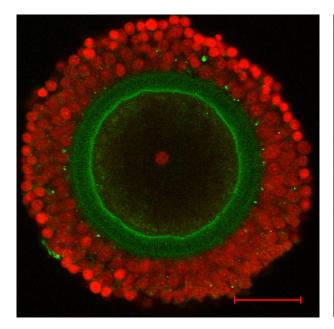


Bild 113 COC, ungereift, SBA (grün), PI (rot), SB= 50 μm

Unterschiedlich intensive Fluoreszenz der Zona pellucida. Es bilden sich vier unterschiedlich stark fluoreszierende Schichten.

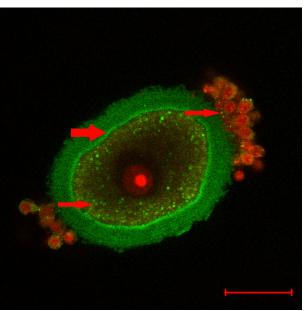


Bild 114 Oozyte, ungereift, SBA (grün), PI (rot), SB= 50 μm

Deutliche Bindung von SBA an die innerste Schicht der Zona pellucida (dicker Pfeil) sowie an kleine Granula (dünne Pfeile) im Ooplasma und in den Cumuluszellen. Schwach positiv zeigt sich das Zytoplasma der Cumuluszellen.

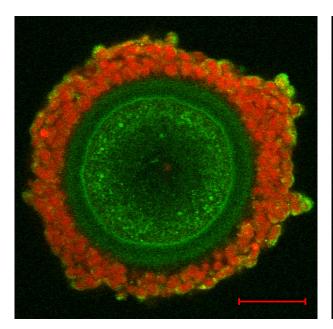


Bild 115 COC nach 72 Stunden IVM, SBA (grün), PI (rot), SB = 50 μm

Die Bindung von SBA an der Zona pellucida hat sich nicht verändert. Es zeigen sich deutlich positive Granula im Ooplasma sowie eine vermehrte SBA-Bindung im Zytoplasma der Cumuluszellen.

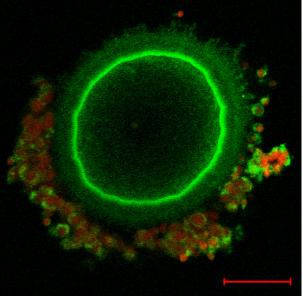


Bild 116 Oozyte nach 72 Stunden IVM, SBA (grün), PI (rot), SB = 50 μm

Die innerste Schicht der Zona pellucida zeigt eine sehr deutliche Reaktion mit SBA, wie auch das Zytoplasma der Cumuluszellen.

# 4.2.9 Ultrastruktur von caninen Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung

#### Ultrastruktur der Oozyten vor IVM

Von drei Hündinnen im Alter zwischen 12 und 22 Monaten wurden insgesamt sechs Oozyten direkt nach der Gewinnung fixiert und untersucht. Alle Hündinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Kastration im Anöstrus. Die Oozyten wurden durch Slicing der Ovarien gewonnen und dann aus der Gesamtmenge aller Kategorie A-C Oozyten zufällig ausgewählt.

Alle untersuchten ungereiften Oozyten entsprechen dem Reifestadium eines Tertiärfollikels. Dabei zeigt sich, dass alle Oozyten einen ähnlichen Reifungszustand besitzen und nur wenige ultrastrukturell nachweisbare Unterschiede zeigen. Eine Übersicht über Ultrastruktur der einzelnen untersuchten ungereiften Oozyten gibt Tab. 18.

Die Oozyten weisen einen zentral liegenden euchromatischer Kern auf, der durch eine unterschiedlich stark gefaltete Kernmembran begrenzt wird (Bild 118 und Bild 117). In allen Oozyten, bei denen der Kern dargestellt werden konnte, zeigt sich ein runder Nukleolus, der eine große Anzahl an unterschiedlich großen Vakuolen aufweist (Bild 117).

Im Zytoplasma der Oozyten ist eine Vielzahl an ovoiden oder länglichen Mitochondrien mit lamellären Cristae zu beobachten, wobei die ovoiden wesentlich zahlreicher vorkommen als die länglichen. Erstere weisen dabei meist nur unvollständige oder gar keine Cristae auf, während diese bei Letzteren zumeist gut ausgebildet sind. Die Lage der Mitochondrien unterscheidet sich bei den einzelnen Oozyten geringfügig. Bei allen sechs untersuchten Oozyten lässt sich die Bildung von Gruppen an Mitochondrien beobachten, die jedoch von Hündin zu Hündin unterschiedlich deutlich zu erkennen sind. Dabei finden sich zum einen Oozyten, die Mitochondrien gruppenweise im Ooplasma aufweisen, und solche, bei denen diese, neben Ansammlungen im Ooplasma, hauptsächlich im Bereich der Ooplasmamembran zu finden sind (Bild 118 und Bild 117). Zusätzlich finden sich bei allen Oozyten kurze dilatierte Zisternen an glattem endoplasmatischem Retikulum im Ooplasma (Bild 119 und Bild 120). Raues endoplasmatisches Retikulum und Ribosomen können nur sehr selten dargestellt werden. Ähnlich den Verhältnissen in den Oozyten in Tertiärfollikeln zeigen auch die durch Slicing gewonnenen Oozyten unterschiedlich große Mengen an Lipiddotterkörperchen, es scheinen jedoch, verglichen mit den Oozyten in den Follikeln, wesentlich mehr Lipiddotterkörperchen vor zu kommen (Bild 118 und Bild 117). Sie liegen meist zentral, sind entweder gleichmäßig verteilt, oder bilden Gruppen im Zytoplasma, die häufig in Kontakt mit glattem endoplasmatischen Retikulum oder Mitochondrien stehen (Bild

119). Bei den beiden Oozyten von Hündin 3 zeigen sich deutlich weniger Lipiddotterkörperchen als bei den Oozyten der anderen beiden Tiere. Insbesondere bei den Oozyten von Hündin 3 aber auch bei einer der Oozyten von Hündin 1 kann eine deutliche Komplexbildung zwischen den Organellen neben der Bildung von organellenfreien Bereichen im Ooplasma beobachtet werden. Golgi-Apparat kann nicht bei allen Oozyten dargestellt werden. Das Zellorganell zeigt sich bei zwei der Oozyten als kleine Stapel, die zentral und peripher im Zytoplasma der Oozyte liegen. Bei zwei weiteren Oozyten findet sich Golgi-Apparat ausschließlich peripher im Bereich der Ooplasmamembran (Bild 119). Bei drei der untersuchten Oozyten können vereinzelte kortikale Granula unmittelbar unter der Ooplasmamembran dargestellt werden (Bild 120).

Alle Oozyten besitzen zumeist kurze aufrecht stehende Mikrovilli, die in eine unterschiedlich dicke Zona pellucida (8  $\mu$ m -13  $\mu$ m) eingebettet sind (Bild 119 und Bild 120). Die Zona pellucida wird bei allen Oozyten von schmalen Fortsätzen der Cumuluszellen durchdrungen, die zum Teil an der Ooplasmamembran enden (Bild 118 und Bild 121).

Nur eine Oozyte wurde mit umgebenden Cumuluszellen untersucht, die deutliche Fortsätze durch die Zona pellucida zur Ooplasmamembran bilden. Die Zellen sind unregelmäßig geformt und weisen undeutlich zu erkennende Mitochondrien, z.T. deutlich dilatiertes endoplasmatisches Retikulum, sowie unterschiedlich elektronendichte Vesikel auf. Ribosomen zeigen sich selten. Das Chromatin erscheint wesentlich elektronenschwächer als in den Kernen der COCs in Tertiärfollikeln. Nukleoli sind nicht deutlich darstellbar, jedoch finden sich elektronendichtere Bereiche im Zentrum des Kernes (Bild 121).

Obwohl alle Oozyten kleine Vesikel in unterschiedlicher Größe aufweisen, zeigen sich in keiner der Oozyten deutliche Anzeichen für Degeneration, wie übermäßige Vakuolenbildung oder Auflösung von Zellorganellen.

Tab. 18Ultrastrukturelle Besonderheiten von durch Slicing gewonnenen caninen Oozyten vor In-vitro-Reifung

		Hündin 1		Hü	Hündin 2		Hündin 3	
		Oozyte 1	Oozyte 2	Oozyte 3	Oozyte 4	Oozyte 5	Oozyte 6	
V.	Lage	zentral	-	zentral	zentral	-	-	
	Chromatin- kondensation	schwach	-	schwach	mäßig	-	-	
Kern	Membran	stark gefaltet	-	wellenförmig	wellenförmig	-	-	
	Nukleolus	groß, rund, viele Vakuolen	-	-	groß, rund, viele Vakuolen	-	-	
LDK	Menge	viel	viel	viel	viel	mäßig	mäßig	
LDK	Lage	v.a. zentral	zentral	v.a. zentral	zentral	in Gruppen	in Gruppen	
	Form	rund bis länglich	rund bis länglich	rund bis länglich	rund bis länglich	rund und länglich	rund und länglich	
Mitochondrien	Cristae	wenig	wenig	mittel	wenig	deutlich	deutlich	
Mitochondrien	Lage	in Gruppen, zentral und peripher	in Gruppen, v.a. peripher	in Gruppen, v.a.	in Gruppen, zentral und peripher	in Gruppen, v.a.	in Gruppen, v.a. peripher	
Golgi-Apparat	Lage	zentral und peripher	-	zentral und peripher	-	v.a. peripher	v.a. peripher	
	Menge	wenig	wenig	wenig	wenig	wenig	wenig	
GER	Form	kurz, dilatiert	kurz, dilatiert	kurz, dilatiert	kurz, dilatiert	kurz, dilatiert	kurz, dilatiert	
	Lage	mit LDK und M	mit LDK und M	mit LDK und M	mit LDK und M	mit LDK und M	mit LDK und M	
	Menge	mittel	mittel	mittel	mittel	mittel	mittel	
MV	Länge	lang, dünn	kurz	kurz	kurz	kurz	kurz	
	Stellung	aufrecht	aufrecht	aufrecht	aufrecht	aufrecht	aufrecht	
CG		+	-	-	-	+	+	
ZP	Dicke (µm)	8	10	12	13	12	10	
Cumuluszellen		-	-	-	-	-	+	
Besonderheiten		organellenfreie Areale	viele peripher liegende M	viele peripher liegende M		organellenfreie Areale	organellenfreie Areale	

<sup>-</sup> nicht beurteilbar

LDK = Lipiddotterkörperchen, GER = glattes endoplasmatisches Retikulum, MV = Mikrovilli, CG = kortikale Granula, ZP = Zona pellucida, M = Mitochondrien

<sup>+</sup> vorhanden

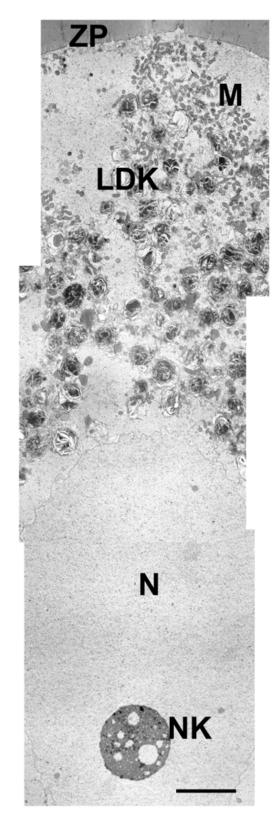


Bild 117 Überblick über Oozyte 1, ungereift, SB = 5 μm

Mitochondrien (M) und Lipiddotterkörperchen (LDK) bilden deutliche Gruppen neben organellenfreien Bereichen im Ooplasma. ZP = Zona pellucida, N = Nukleus, NK = Nukleolus

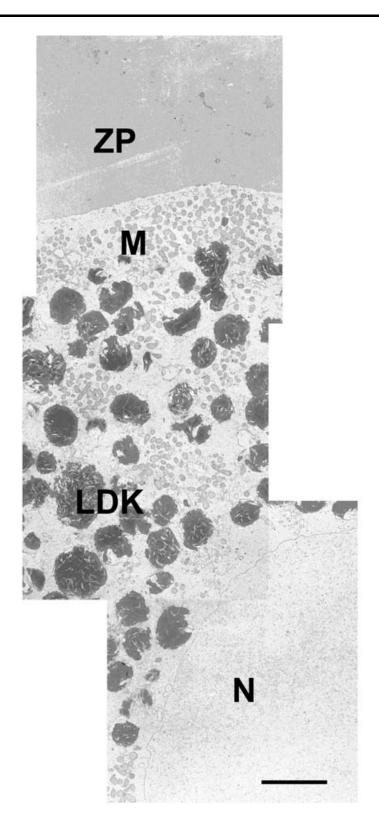


Bild 118 Überblick über Oozyte 3, ungereift, SB = 5 μm

Es zeigt sich eine deutliche Ansammlung an Mitochondrien (M) im Bereich der Ooplasmamembran, aber auch als Gruppen zwischen zahlreichen Lipiddotterkörperchen (LDK). ZP = Zona pellucida, N = Nukleus

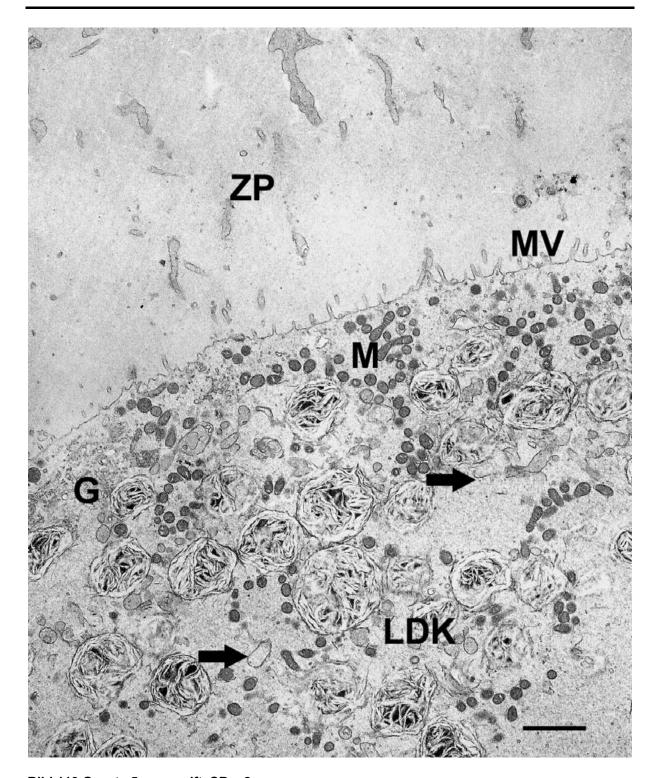


Bild 119 Oozyte 5, ungereift, SB =  $2 \mu m$ 

Im Randbereich des Ooplasmas können runde und längliche Mitochondrien (M), Golgi-Apparat (G) und Lipiddotterkörperchen (LDK) nachgewiesen werden. Das glatte endoplasmatische Retikulum ist kurz und tritt meist in Verbindung mit LDK auf (Pfeile). Die Oozytenoberfläche bildet zahlreiche kurze aufrecht stehende Mikrovilli (MV) aus. ZP = Zona pellucida

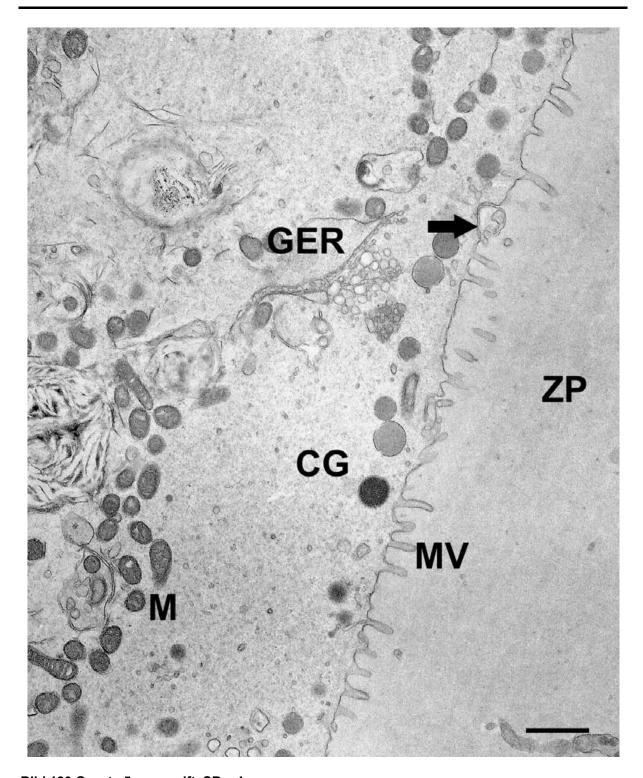


Bild 120 Oozyte 5, ungereift, SB = 1  $\mu$ m

Am Rand der Oozyte zeigen sich kortikale Granula (CG), Mitochondrien (M) und glattes endoplasmatisches Retikulum (GER). Selten finden sich Kontaktstellen der Cumuluszellfortsätze mit der Ooplasmamembran (Pfeil). ZP = Zona pellucida, MV = Mikrovilli

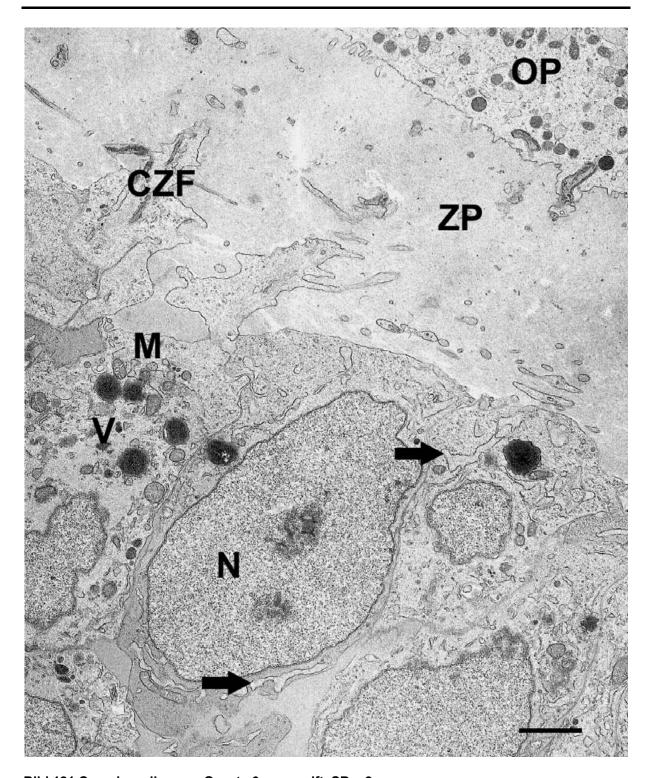


Bild 121 Cumuluszellen von Oozyte 6, ungereift, SB = 2  $\mu$ m

Die Cumuluszellen erscheinen unregelmäßig geformt. Im Zytoplasma zeigen sich vereinzelte Mitochondrien (M), unterschiedlich elektronendichte Vesikel (V) sowie deutlich dilatierte Zisternen an glattem und rauem endoplasmatischem Retikulum (Pfeile). OP = Ooplasma, ZP = Zona pellucida, CZF = Cumuluszellfortsatz, N = Kern einer Cumuluszelle

#### Ultrastruktur der Oozyten nach IVM

In die Untersuchung der Ultrastruktur von Oozyten nach IVM wurden Oozyten nach 24 Stunden IVM sowie solche nach 72 und 90 Stunden IVM mit einbezogen. Insgesamt wurden vier Oozyten von zwei Hunden nach 24 Stunden, vier Oozyten von zwei Hunden nach 72 Stunden und vier Oozyten von einer Hündin nach 90 Stunden IVM untersucht.

Es zeigt sich, dass unter den 72 und 90 Stunden gereiften Oozyten nur degenerierten Oozyten zu finden sind, die durch Vakuolenbildung, den Verlust an Mikrovilli und die Auflösung von Zellorganellen charakterisiert sind (Bild 128). Im Gegensatz dazu können alle Oozyten nach 24 Stunden IVM ausgewertet werden. Eine Übersicht über die ultrastrukturellen Besonderheiten der einzelnen Oozyten nach 24 Stunden IVM zeigt Tab. 19.

Die Kernstruktur kann nur bei einer der Oozyten beurteilt werden. Bei dieser Oozyte kann die Verlagerung des Kernes in die Peripherie der Zelle beobachtet werden. In diesem, von einer stark unregelmäßig gefalteten Membran umgebenen, abgeflachten Kern, kann kein kondensiertes Chromatin nachgewiesen werden. Die Kernmembran zeigt deutliche Poren, aber noch keine Anzeichen der Auflösung. Ein Nukleolus kann nicht beobachtet werden (Bild 122).

Bei dieser Oozyte können nahe der Kernmembran zwei größere sowie vereinzelte kleine Stapel von "Annulate lamellae" beobachtet werden. Zum einen ein größerer Stapel mit 19 Lamellen, der eine Ausdehnung von 2,2 µm (Höhe) mal 5 µm (Breite) besitzt, und zum anderen ein kleinerer Stapel mit 15 Lamellen mit einer Höhe von 2,4 µm und einer Breite von 2,1 µm. Im Bereich der "Annulate lamellae" sind, vor allem in der Umgebung des kleineren Stapels, eine Vielzahl schwach elektronendichter Vesikel zu beobachten (Bild 122 und Bild 124).

Auffällig zeigt sich im Zytoplasma aller Oozyten eine starke Zubildung von Mitochondrien und Lipiddottermaterial, die fast die gesamte Oozyte bis auf einen schmalen Rand im Bereich der Ooplasmamembran, vollständig ausfüllen. Dabei finden sich unter den Mitochondrien vermehrt längliche, die deutlichere Cristae aufweisen als die der ungereiften Vergleichsoozyten (Bild 123). Insgesamt können in diesen Oozyten nur geringe Mengen an glattem endoplasmatischem Retikulum sowie vereinzelter Golgi-Apparat nachgewiesen werden, die dann meist im Randbereich der Oozyte auftreten. Zwei der untersuchten Oozyten weisen kortikale Granula im Bereich der Ooplasmamembran auf (Bild 125). Ribosomen sind selten. Bei zwei der Oozyten kann die Bildung unterschiedlich großer Vesikel im Ooplasma unter der Zellmembran beobachtet werden (Bild 125 und Bild 126).

Die Ooplasmamembran bildet eine von Oozyte zu Oozyte unterschiedlich dichte Menge an Mikrovilli, wobei zwei der Oozyten deutlich weniger Mikrovilli aufweisen als die anderen beiden oder die ungereiften Zellen (Bild 125 und Bild 126).

Die Zona pellucida hat eine Dicke von 8 μm bis 14 μm und erscheint als mittelgradig elektronendichte homogene Substanz, die nach IVM nicht mehr so oft von Cumuluszellfortsätzen durchdrungen wird.

Unter den vier untersuchten Oozyten wurden zwei als vollständige COCs untersucht und erlauben deshalb auch die Beurteilung der Zellen des Cumulus oophorus. Diese erscheinen geschrumpft, die Zell- und die Kernmembran erscheinen sehr unregelmäßig. In einigen der Cumuluszellen können Mitochondrien, glattes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Felder nachgewiesen werden, die jedoch deutlich dilatiert sind. Die Mitochondrien sind schwach elektronendicht und besitzen unvollständige Cristae. Der Kern zeigt sich wenig elektronendicht und homogen. Im Zentrum zeigen sich vereinzelte elektronendichtere Bereiche (Bild 127).

Tab. 19Ultrastrukturelle Besonderheiten von caninen Oozyten nach 24 Stunden In-vitro-Reifung

		Hündin 1		Hündin 2	
		Oozyte 1	Oozyte 2	Oozyte 3	Oozyte 4
Kern	Lage	-	-	-	peripher
	Chromatin- kondensation	-	-	-	schwach
	Membran	-	-	-	eingefaltet
	Nukleolus	-	-	-	-
LDK	Menge	sehr viel	sehr viel	sehr viel	sehr viel
	Lage	überall	überall	überall	überall
Mitochondrien	Form	rund bis länglich	rund bis länglich	rund bis länglich	rund bis länglich
	Cristae	mittel	mittel	mittel	mittel
	Lage	überall zwischen LDK	überall zwischen LDK	überall zwischen LDK	überall zwischen LDK
Golgi-Apparat	Lage	peripher	peripher	zentral und peripher	peripher
	Menge	sehr wenig	sehr wenig	sehr wenig	wenig
GER	Form	kurz, dilatiert	kurz, dilatiert	kurz, dilatiert	kurz und länger, z.T. dilatiert
	Lage	mit LDK und M			
MV	Menge	viele	viele	sehr wenige	sehr wenige
	Länge	kurz	kurz	sehr kurz	sehr kurz
	Stellung	aufrecht oder liegend	aufrecht oder liegend	aufrecht oder liegend	aufrecht oder liegend
CG		-	-	+	+
ZP	Dicke (μm)	8	14	10	13
Cumuluszellen		+	+	-	-
Besonderheiten					"Annulate lamellae"

<sup>-</sup> nicht beurteilbar + vorhanden

LDK = Lipiddotterkörperchen, GER = glattes endoplasmatisches Retikulum, MV = Mikrovilli, CG = kortikale Granula, ZP = Zona pellucida, M = Mitochondrien

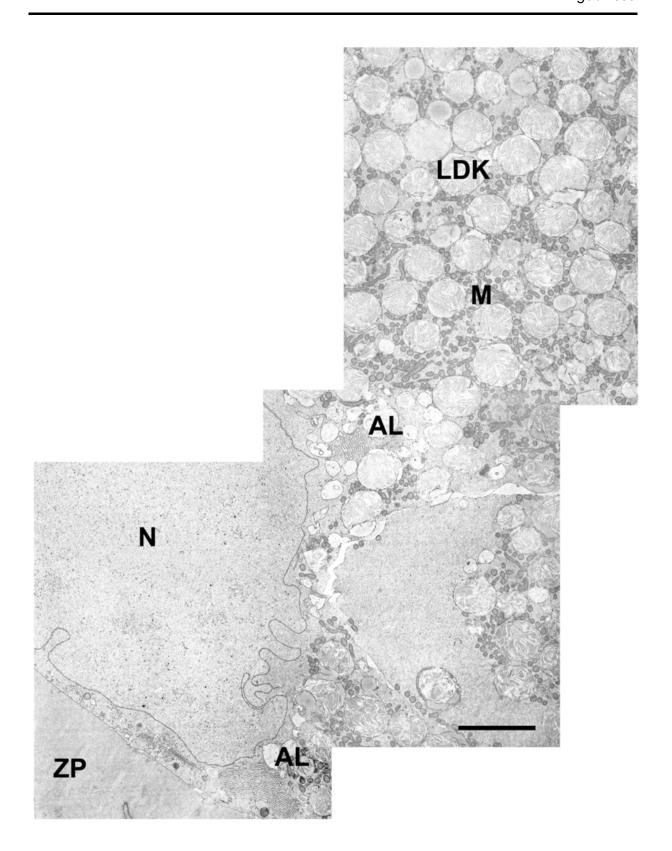


Bild 122 Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 5 µm

Der Nukleus (N) ist in die Oozytenperipherie verlagert und weist eine unregelmäßig gefaltete Membran auf. Im Ooplasma ist eine deutlich Zunahme an Lipiddotterkörperchen (LDK) sowie an Mitochondrien (M) zu beobachten. Im Bereich des Kernes finden sich Stapel an "Annulate lamellae" (AL).

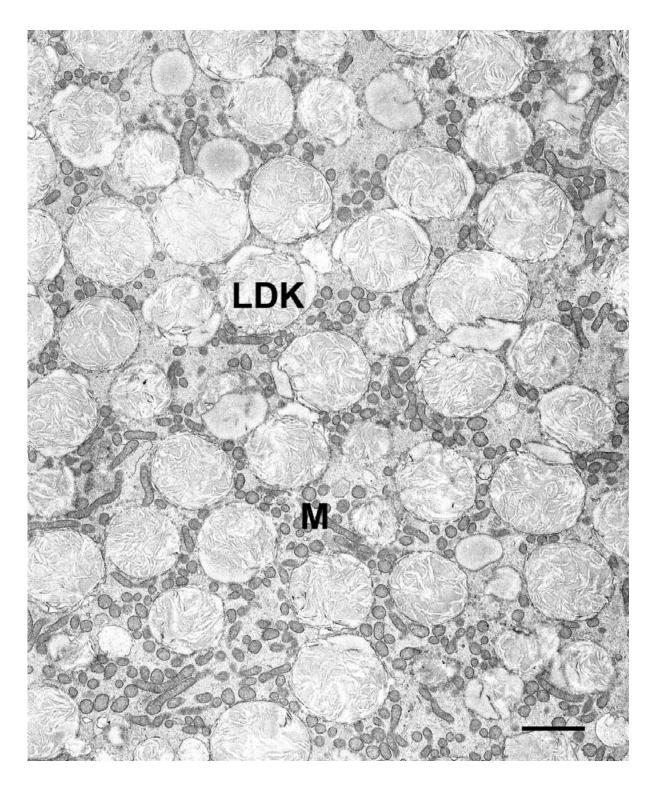


Bild 123 Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 2  $\mu$ m

Im Ooplasma zeigen sich große Mengen an Lipiddotterkörperchen (LDK) sowie runde und längliche Mitochondrien (M) mit deutlichen Cristae.

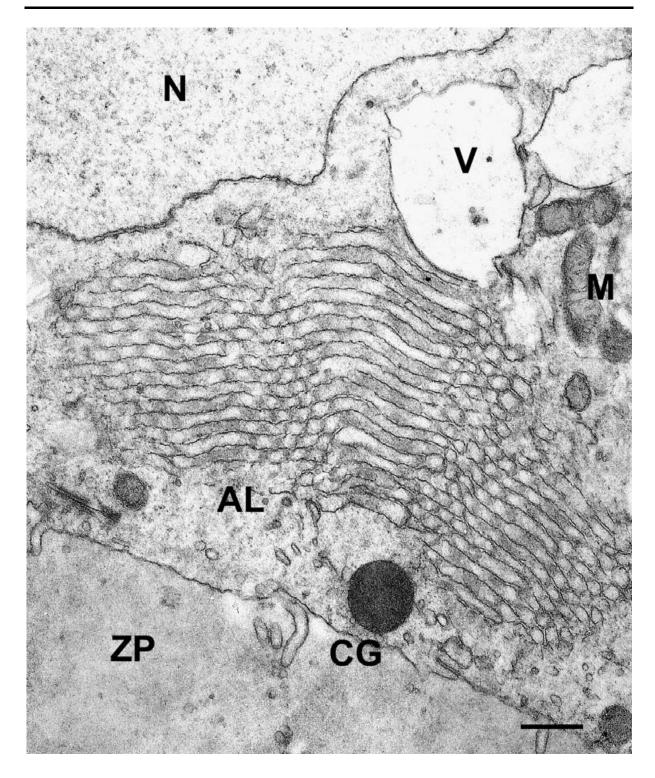


Bild 124 Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 500 nm

"Annulate lamellae" (AL) erscheinen als Membranstapel im Kernbereich (N). V = Vakuolen, M = Mitochondrien, CG = kortikales Granulum, ZP = Zona pellucida

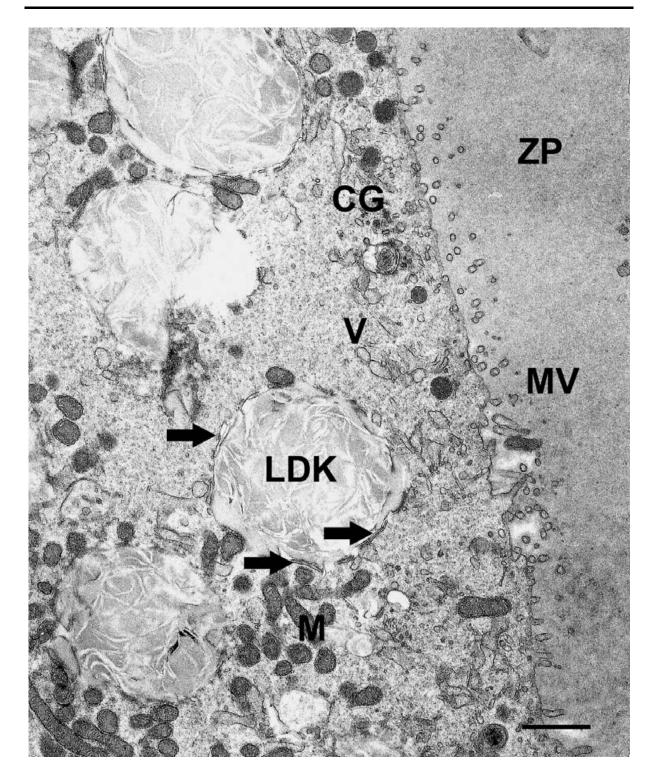


Bild 125 Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 1  $\mu$ m

Im Randbereich der Oozyte zeigen sich kortikale Granula (CG), Vesikel (V), Mitochondrien (M) und Lipiddotterkörperchen (LDK). Glattes endoplasmatisches Retikulum tritt als kurze dilatierte Stränge im Bereich der LDK auf (Pfeile). Die Ooplasmamembran bildet zahlreiche Mikrovilli (MV). ZP = Zona pellucida

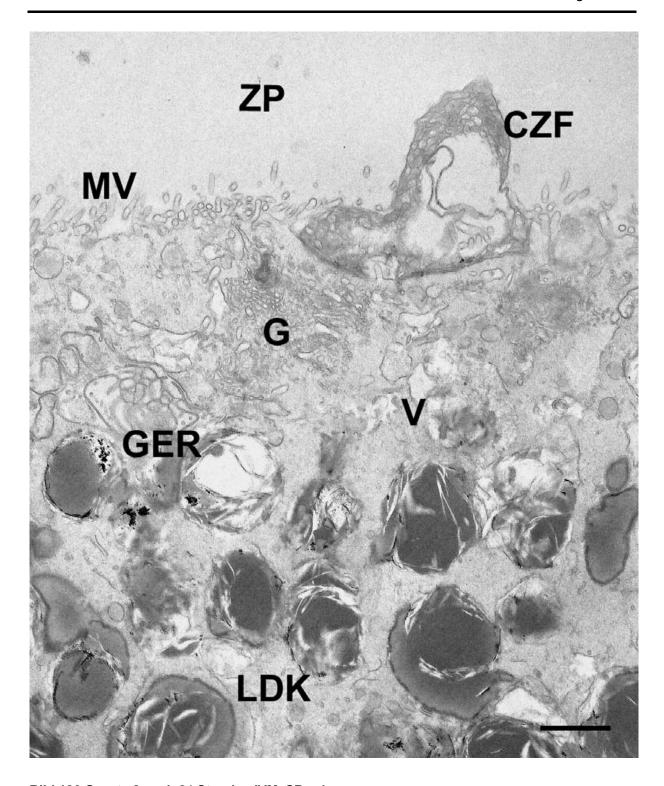


Bild 126 Oozyte 2 nach 24 Stunden IVM, SB = 1  $\mu$ m

Im Randbereich des Ooplasmas zeigen sich große Golgi-Felder (G), Vesikel (V) und Lipiddotterkörperchen (LDK). Mikrovilli (MV) sind zahlreich vorhanden. ZP = Zona pellucida, CZF = Cumuluszellfortsatz, GER = glattes endoplasmatisches Retikulum

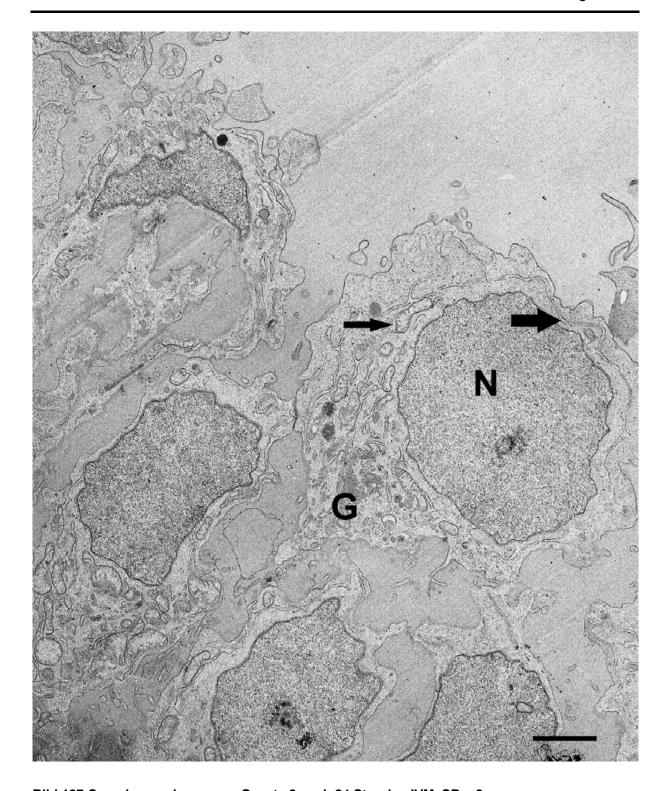


Bild 127 Cumulus oophorus von Oozyte 2 nach 24 Stunden IVM, SB =  $2 \mu m$ 

Die Cumuluszellen erscheinen geschrumpft. Der Kern (N) weist eine unregelmäßige Membran auf. Im Zytoplasma können Golgi-Apparat (G), Mitochondrien (dünner Pfeil) sowie lange dilatierte Stränge an glattem endoplasmatischem Retikulum (dicker Pfeil) dargestellt werden, die zum Teil in Auflösung begriffen sind.

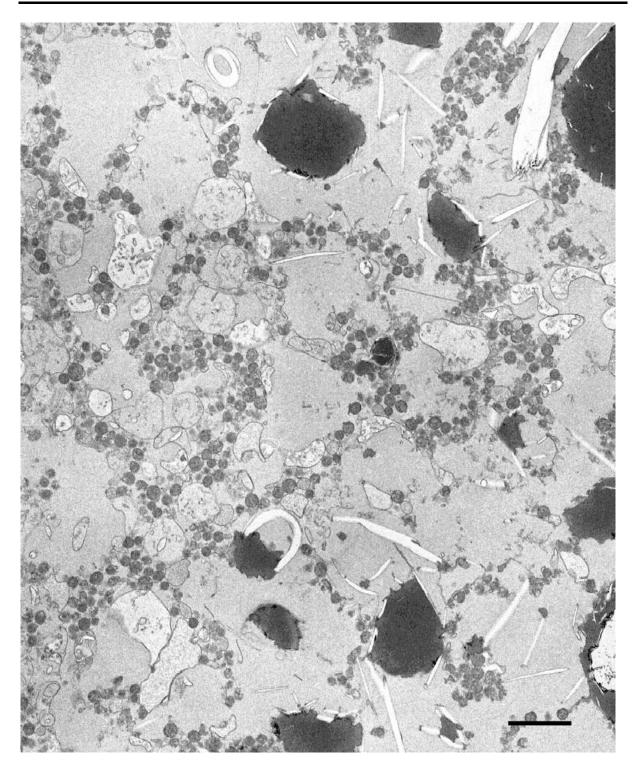


Bild 128 Oozyte nach 90 Stunden IVM, SB =  $2 \mu m$ 

Im Ooplasma der Oozyte zeigen sich deutliche Anzeichen von Degeneration, wie starke Vakuolenbildung sowie die Auflösung von Zellorganellen.

### 5 Diskussion

Während über die Reifungsvorgänge von Oozyten in vivo und in vitro bei anderen Tierarten bereits viel bekannt ist, liegen darüber bei der Hündin nur unzureichende Informationen vor. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Reifungsvorgänge von caninen Oozyten ex vivo am Ovar, als auch an Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung morphologisch charakterisiert.

## 5.1 Oozytenreifung im Ovar

### 5.1.1 Morphologische Aspekte des Follikelwachstums im Ovar

Die Oberfläche des Ovars wird von einem einschichtigen flach bis kubischen Epithel gebildet. Auffällig sind bei den Ovarien der Hündinnen deutliche Gangbildungen des Oberflächenepithels, deren Zellen sich morphologisch von denen des Oberflächenepithels unterscheiden, sowie tiefe, mit Oberflächenepithel ausgekleidete Einschnitte im Ovarstroma. Diese Epithelzellen sind iso- bis hochprimatisch und deutlich größer als die des Oberflächenepithels. Sie weisen große, meist basal liegende Kerne auf. Von Anderson und Simpson (1973) wurden diese Gänge am Ovar der Hündin hauptsächlich bei sehr jungen Hündinnen vom zweiten Lebensmonat bis zum Beginn der Pubertät beschrieben. In meinen Untersuchungen konnten sie bei allen Hündinnen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, nachgewiesen werden. Von den 15 untersuchten Hündinnen war jedoch nur ein Tier über zwei Jahren alt, was dies eventuell erklären könnte. Die Bedeutung des Oberflächenepithels und der Gangsysteme für die Funktion des Ovars ist bis jetzt unklar, eine Beteiligung an Follikulogenese und Oogenese wird jedoch diskutiert. Von Bukovsky et al. (1995) wurde eine mögliche Beteiligung des Oberflächenepithels an der Follikelbildung im adulten Ovar des Menschen beschrieben. Neuere Studien zeigen, dass das humane Oberflächenepithel am Hormonstoffwechsel und an der Ovarphysiologie beteiligt ist, indem Wachstumsfaktoren und Steroide sezerniert und Gonadotropin- und Steroidhormonrezeptoren exprimiert werden (Okamura and Katabuchi, 2005).

Lichtmikroskopisch lässt sich an den untersuchten Ovarien eine von Hündin zu Hündin unterschiedlich deutliche periphere Rinden- von einer zentralen Markzone unterscheiden. Im Rindenbereich der Ovarien aller Hündinnen liegen zahlreiche Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel. Primordialfollikel befinden sich dabei nahe der Ovaroberfläche, während spätere Follikelstadien deutlich tiefer in Richtung zum Zentrum des Ovars verlagert sind.

Der Beginn des Follikelwachstums deutet sich mit der Formveränderung der Follikelepithelzellen an. Sie werden zunächst isoprismatisch (Primärfollikel), teilen sich dann

häufig und bilden eine mehrschichtige Lage um die Oozyte (Sekundärfollikel). Mit Bildung des Antrum folliculi entstehen die Tertiärfollikel.

Die Oozyten wachsen während der Follikelentwicklung zunehmend und stetig an. So wiesen die Oozyten (ohne Zona pellucida) in Primordialfollikeln einen Durchmesser von durchschnittlich 26,1 µm (± 3,2 µm), im Primärfollikel von 31,5 µm (± 6,2 µm) und im Sekundärfollikel von 62,3 µm (± 19,0 µm) auf. Im Tertiärfollikel wuchsen die Oozyten weiter auf durchschnittlich 96,0 μm (± 21,34 μm) an. Statistisch signifikante Größenveränderungen zeigen sich jedoch erst ab dem Primärfollikel. Diese Werte stimmen mit den Größenangaben überein, die von Anderson und Simpson (1973) und Telfer und Gosden (1987) bereits in früheren Studien an Hundeovarien gemacht wurden. Auffällig ist, dass Tertiärfollikel ab einem Oozytendurchmesser von 62 µm gebildet werden, die Oozyte im größten Sekundärfollikel jedoch noch eine Größe von 97 µm aufweist und somit eine relativ große Spannweite des Größenbereichs entsteht, in dem sowohl Sekundär- als auch Tertiärfollikel nachzuweisen sind. Dies kann durch die Schnittebene in der der Follikel angeschnitten wurde stark beeinflusst werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Oozytenmessungen liegen für den Durchmesser des "germinal vesicle" bei der Hündin bis jetzt nur unzureichende Informationen vor. Bei den Messungen in meinen Untersuchungen betrug der mittlere Durchmesser im Primordialfollikel 15,6 μm (± 2,5 μm). Mit Aktivierung des Follikels und dem Wachstum zu Primärfollikel verändert sich der Durchmesser zunächst kaum (17,1 μm ± 2,7 μm), zeigt dann jedoch mit 22,1 μm (± 4,6 μm) im Sekundärfollikel und mit 30,0 μm (± 5,7 μm) im Tertiärfollikel eine signifikante Vergrößerung. Verglichen mit der Arbeit von Anderson und Simpson (1973) konnte in meiner Studie sowohl im Primordial- als auch im Sekundärfollikel insgesamt ein deutlich geringerer "germinal vesicle"- Durchmesser festgestellt werden. Die Ergebnisse am Hundeovar zeigen, dass der "germinal vesicle" gleichzeitig und unabhängig vom Entwicklungsstadium des Follikels mit dem Oozytendurchmesser wächst. Die Zona pellucida konnte in der vorliegenden Studie erstmals im Sekundärfollikel ausgemessen werden. Sie wies einen Mittelwert von 1,8 µm (± 2,0 µm) auf und wuchs im Tertiärfollikel signifikant auf eine Dicke von 13,4 µm (± 6,3 µm) an. Verglichen mit Barber et al. (2000) sind die Werte für den Sekundärfollikel geringer, jedoch höher im Tertiärfollikel. Ein interessantes Ergebnis ergab sich bei der Berechnung der Korrelation zwischen dem Durchmesser der Oozyte und der Dicke der Zona pellucida. Obwohl sich zeigte, dass die Dicke gleichzeitig mit der Oozytengröße signifikant wächst, war eine signifikant positive Korrelation, bei getrennter statistischer Auswertung der beiden Follikelstadien, zwischen den Werten nur im Sekundärfollikel nachzuweisen. Im Tertiärfollikel ist die Dicke der Zona pellucida nicht mehr mit dem Durchmesser der Oozyte korreliert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bildung der Zona pellucida bis zum

Sekundärfollikel bei allen Oozyten gleichmäßig und zeitgleich mit dem Wachstum der Oozyte erfolgt. Ab der Bildung des Tertiärfollikels scheinen jedoch weitere Regulationsmechanismen beteiligt zu sein, die, unabhängig vom Oozytenwachstum, zu unterschiedlich starker Weiterentwicklung der Zona pellucida führen.

Anhand der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigt sich, dass Oozyten aus Primordialfollikeln einen großen peripher liegenden vorwiegend euchromatischen Kern aufweisen, der stets ein bis zwei Nukleoli enthält. Im Verlauf der Follikelreifung kann in den Oozyten ein zentral liegender Kern beobachtet werden, der vorwiegend Euchromatin sowie einen zentral gelegenen Nukleolus aufweist. Diese Beobachtung stimmt mit denen früherer Studien an Ovarien verschiedener Spezies überein (Anderson and Simpson, 1973; Rüsse, 1978; Van Wezel and Rodgers, 1996).

Das Zytoplasma der Oozyten in caninen Primordialfollikeln zeigt in der Elektronenmikroskopie nur eine mäßige Anzahl an Zellorganellen. Es können hauptsächlich ovoide Mitochondrien mit wenigen lamellären Cristae sowie vereinzelte Stränge an glattem endoplasmatischem Retikulum nachgewiesen werden, die sich in einigen Fällen aneinander gelagert hatten. Ähnliche Verhältnisse konnten beim Rind (Van Wezel and Rodgers, 1996), beim Opossum (Falconnier and Kress, 1992) und in einer früheren Studie über die Ultrastruktur der Follikel der Hündin (Tesoriero, 1981) beobachtet werden. In meinen ultrastrukturellen Untersuchungen zeigen sich, in Übereinstimmung mit Studien zu anderen Tierarten (Lucci et al., 2001; Rüsse, 1978; Tesoriero, 1981; Van Wezel and Rodgers, 1996), neben Mitochondrien und glattem endoplasmatischem Retikulum auch vesikuläre Elemente und kleine Golgi-Körperchen. Die von Van Wezel und Rodgers (1996) in Rinderoozyten beschriebenen geringen Mengen an Ribosomen und rauem endoplasmatischem Retikulum konnten beim Hund ebenfalls bestätigt werden. Beides deutet auf den Ruhezustand der Oozyten hin.

Mit der Aktivierung der Primordialfollikel erfolgt eine Zunahme um Umstrukturierung der Zellorganellen im Zytoplasma der Oozyten. Neben einer Zunahme der Anzahl an Mitochondrien erfolgt eine Umverteilung innerhalb der Zelle. Die in frühen Entwicklungsstadien eher zentral gelegen und gleichmäßig verteilten Mitochondrien bilden im Tertiärfollikel Gruppen, die im Ooplasma neben organellenfreien Bereichen liegen. Auffällig ist, dass sich die Gestalt der Mitochondrien während der Follikelreifung beim Hund nicht wesentlich verändert. Ihre Form reicht von rund bis länglich mit unterschiedlich deutlich ausgeprägten lamellären Cristae. Letztere sind bei manchen Sekundärfollikeln und in Tertiärfollikeln zum Teil deutlich stärker ausgebildet. Bei der Ziege wurde berichtet, dass mit zunehmender Entwicklung der Follikel aus den zuerst runden Mitochondrien vermehrt solche mit länglicher Form entstehen (Lucci et al., 2001), was nach Wassarman und Josefowicz

(1978) Ausdruck der Veränderungen im Energiestoffwechsel darstellt. Andere Autoren beschreiben, dass charakteristische, aber zum Teil nur undeutlich erkennbare Veränderungen der Mitochondrienmorphologie während der Follikelreifung stattfinden (Falconnier and Kress, 1992; McGaughey et al., 1990; Wassarman and Josefowicz, 1978; Weakley, 1976). Das vorwiegend glatte endoplasmatische Retikulum hat mit dem Beginn des Follikelwachstums ebenfalls an Menge und Ausdehnung zugenommen, besteht in Primärfollikeln aus langen, kaum dilatierten Zisternen und dominiert, zusammen mit den Mitochondrien, das elektronenmikroskopische Bild. Ab der Stufe des Sekundärfollikels zeigt sich jedoch eine Veränderung in der Morphologie des Zellorganells. Endoplasmatisches Retikulum vom glatten Typ tritt dann meist in kurzen schwach dilatierten Strängen auf, was sich im Tertiärfollikel noch stärker auffällt. Ähnliche Verhältnisse berichten Falconnier und Kress (1992) in Opossumoozyten und Wassarman und Josefowicz (1978) in der reifenden Mäuseoozyte. Vor allem in Primärfollikeln bilden die Mitochondrien und das glatte endoplasmatische Retikulum großflächige Komplexe, in denen sich die Mitochondrien den Lamellen des glatten endoplasmatischen Retikulums anlagern. Diese Beobachtung stimmt mit den Literaturangaben beim der Maus (Wassarman and Josefowicz, 1978), dem Opossum (Falconnier and Kress, 1992) und mit früheren Studien zum Hund überein (Tesoriero, 1981). Erst ab dem Sekundärfollikel scheint die Verbindung zwischen den beiden Zellorganellen nicht mehr so intensiv. Raues endoplasmatisches Retikulum kann in den reifenden Oozyten des Hundes, ähnlich denen der Maus (Wassarman and Josefowicz, 1978), selten beobachtet werden. Die Anzahl an Ribosomen ist mäßig und verändert sich kaum, jedoch bilden sich in reiferen Follikelstadien zunehmend Polyribosomen im Ooplasma. Wassarman und Josefowicz (1978) konnten schon in kleinen Follikeln viele Polyribosomen feststellen, deren Menge mit zunehmender Entwicklung abnimmt und dafür gitterförmige fibrillenreiche Abschnitte bildet. Diese konnten in caninen Oozyten nicht nachgewiesen werden. Hundeoozyten wachsender Follikel sind durch große Mengen an Lipiddotterkörperchen charakterisiert. Damit gehören die Oozyten des Hundes, ähnlich der anderer Fleischfresser wie der Katze (Guraya, 1965) und dem Blaufuchs (Krogenaes et al., 1993), zu den fettreichsten Oozyten aller Haussäugetiere. In den Jahren 1981 und 1982 wurden von Tesoriero umfangreiche Studien zur Entstehung und Entwicklung der Lipiddotterkörperchen in den Oozyten der Hündin durchgeführt. Nach Angaben von Tesoriero (1981) werden die ersten Lipiddotterkörperchen bei der Hündin in Primärfollikeln gebildet. Abweichend hiervon zeigten in meinen Untersuchungen bereits Oozyten in Primordialfollikeln geringe Mengen an Lipiddottermaterial. Die Menge des Dottermaterials nimmt dabei während der gesamten Oogenese stetig zu (Tesoriero, 1981). Ähnliches zeigt sich auch in meiner Untersuchung, jedoch scheint die stärkste und auffälligste Lipidbildung, abweichend von den Studien Tesorieros, im Tertiärfollikel stattzufinden. Bei Rind (Rüsse,

1978) und Maus (Wassarman and Josefowicz, 1978), die zu den Tierarten mit relativ geringen Dottermengen zählen, beginnt die Dotterkörperchensynthese überhaupt erst im Tertiärfollikel. Tesoriero (1981) vermutet, dass der Dotter bei der Hündin eine evolutionsbedingte Energiequelle darstellt und eventuell der Ernährung der Oozyte während des langen Weges bis zur Befruchtung dient. Im Tertiärfolllikel lagern sich die bereits beschriebenen Komplexe aus Mitochondrien und glattem endoplasmatischem Retikulum mit den dann vorhandenen großen Mengen an Dottermaterial zusammen, und bilden so deutliche Gruppen neben organellenfreien Bereichen im Ooplasma, was beim Rind (Hyttel et al., 1986) als auch bei der Maus (Wassarman and Josefowicz, 1978) ebenfalls beobachtet wurde. Sowohl Wassarman und Josefowicz (1978) als auch Hyttel et al. (1986) deuten die enge Komplexbildung zwischen den Zellorganellen als Bildung von Stoffwechseleinheiten, die Anzeichen für den Anstieg der metabolischen Aktivität der Oozyten darstellen. Beim Wiederkäuer erfolgt gleichzeitig mit der Aktivierung der Follikel die Vergrößerung des Golgi-Feldes. Aus der vorher in Kernnähe gelegenen Golgi-Zone entstehen zahlreiche kleine Golgi-Körperchen, die sich später in der Peripherie der Oozyte verteilen (Rüsse, 1978). Ähnliche Beobachtungen konnten in meinen ultrastrukturellen Untersuchungen bei der Hündin gemacht werden. Bei Rind, Schaf und Affe sind die entstandenen Golgi-Körperchen an der Bildung von kortikalen Granula im Sekundärfollikel beteiligt (Rüsse, 1978; Zamboni, 1974). Von Tesoriero (1981) wurde das Auftreten der ersten kortikalen Granula bei der Hündin ebenfalls in späten Stadien von Sekundärfollikeln peripher im Zytoplasma berichtet, die dann im Tertiärfollikel dicht im Randbereich des Ooplasmas liegen. In den vorliegenden Untersuchungen zeigen sich vereinzelte kortikale Granula im Randbereich der Oozyten im Tertiärfollikel. Ursache für das Fehlen in früheren Follikelstadien könnte sein, dass die untersuchten Sekundärfollikel noch relativ jung waren und deshalb noch keine kortikalen Granula gebildet hatten.

Die Hundeoozyte in Primordialfollikeln besitzt noch keine spezifischen Verbindungen zu den sie umgebenden Follikelepithelzellen. Die beiden Membranen liegen glatt aneinander und bilden an einigen wenigen Stellen gruppenweise kurze Mikrovilli aus, was sich mit den Ergebnissen von Falconnier und Kress (1992) beim Opossum und von Van Wezel und Rodgers (1996) sowie Lucci et al. (2001) bei Wiederkäuern deckt. Jedoch scheint das Auftreten von Zell-Zell-Verbindungen tierartlich unterschiedlich früh in der Follikelentwicklung statt zu finden. Von Zamboni (1974) wurden bei Oozyten aus Primordialfollikeln des Affen bereits von vereinzelten Desmosomen zwischen Follikelepithelzelle und Oozyte berichtet. Ab dem Primärfollikel zeigen sich zwischen caninen Oozyten und umgebenden Epithel desmosomenähnliche Verdichtungen an den Membranen. Bei der Hündin wachsen die kleinen "Mikrovillinester" zunächst stark an, bis sie sich dann als zahlreiche einzelne

Mikrovilli im Tertiärfollikel gleichmäßig über die Oozytenoberfläche verteilen und aufrechte kurze Fortsätze in die Zona pellucida bilden. Beim Wiederkäuer wurde berichtet, dass sich ab dem Primärfollikel zunächst flach anliegende Mikrovilli bilden, die sich später aufstellen, länger werden und dann das Zona pellucida-Material durchziehen. Ihre Anzahl nimmt mit zunehmenden Wachstum der Follikel deutlich zu (Lucci et al., 2001; Rüsse, 1978).

In der vorliegenden Untersuchung konnte die Zona pellucida sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch erstmals im frühen Sekundärfollikel nachgewiesen werden, obwohl ihre Bildung bei der Hündin nach anderen Befunden bereits im Primärfollikel beginnt (Heigl. 1998). Ähnlich meinen Beobachtungen beim Hund, zeigt sich erstes Zona-Material beim Opossum im Bereich der Mikrovilli und bildet bald darauf eine zusammenhängende Schicht um die Oozyte, die zunehmend dicker wird (Falconnier and Kress, 1992). Die Zona pellucida des Hundes erscheint in der Elektronenmikroskopie als homogene mittelgradig elektronendichte Matrix, die deutlich von zahlreichen Cumuluszellfortsätzen durchdrungen wird. Dies steht damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen beim Opossum (Falconnier and Kress, 1992) und der Ziege (Lucci et al., 2001). Durch die Bildung der Zona pellucida entwickeln die unmittelbar an der Oozyte liegenden Granulosazellen lange Fortsätze, die bis zur Oozytenoberfläche reichen, in bulbus- bis scheibenförmigen Erweiterungen an der Ooplasmamembran enden und dort desmosomale Verbindungen und "gap junctions" ausbilden. Ähnliche Resultate ergaben Studien bei anderen Spezies (Rüsse, 1978; Tesoriero, 1981; Zamboni, 1974). Die Ergebnisse bei der Hündin zeigen, dass diese Fortsätze Zellorganellen wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Lipidtröpfchen sowie, in unmittelbarer Nähe zur Kontaktstelle zwischen Cumuluszellfortsatz und Oozyte, eine große Anzahl unterschiedlich elektronendichte kleine Vesikel aufweisen. Zamboni (1974) beschreiben ähnliche Verhältnisse in den Fortsätzen der Granulosazellen in Tertiärfollikeln von Primaten. Sie beschreiben diese Vesikel als vielgestaltige, "lysosomenähnliche Körperchen", die auf pinozytotische Aktivität und die Inkorporation stoffwechselrelewandter Stoffe hinweisen. Daneben können an den Kontaktstellen für den Stoffwechsel wichtige Substanzen zur Versorgung der Oozyte durch Diffusion ausgetauscht werden (Zamboni, 1974).

Die Follikelepithelzellen, die die Oozyte in Primordialfollikeln umgeben, sowie ihre Kerne, sind deutlich in die Länge gezogen. Beim Hund, wie auch bei Rind, Ziege und Opossum, enthalten sie einen Kern mit dicht gepacktem kondensierten Chromatin in der Nähe der Kernmembran (Falconnier and Kress, 1992; Lucci et al., 2001; Van Wezel and Rodgers, 1996). Übereinstimmend mit meinen Beobachtungen, konnten in den Follikelepithelzellen des Rindes ebenfalls nur selten bzw. gar keine Nukleoli dargestellt werden (Van Wezel and Rodgers, 1996). Die Organellenausstattung im Zytoplasma der Follikelepithelzellen der

Primordialfollikel des Hundes entspricht dabei der anderer Tierarten (Falconnier and Kress, 1992; Van Wezel and Rodgers, 1996; Zamboni, 1974). Es zeigen sich geringe Mengen an Zellorganellen, darunter wenige runde bis längliche Mitochondrien, unregelmäßig angeordnetes kurzes raues und glattes endoplasmatisches Retikulum, vereinzelte Ribosomen sowie Golgi-Apparat, Lipidtropfen und kleine Vesikel. Charakteristische Veränderungen zeigen sich an den Follikelepithelzellen mit Beginn des Follikelwachstums. Neben der Zunahme der Zellanzahl und der Veränderung der Zellform nach isoprismatisch bis polygonal, zeigen sich im Vergleich mit dem Primordialfollikel auch Unterschiede im elektronenmikroskopischen Bild. Die von mir bei der Hündin gemachten Beobachtungen stehen dabei in Übereinstimmung mit anderen Studien (Falconnier and Kress, 1992; Tesoriero, 1981; Zamboni, 1974). So bekommen die Kerne eine ovale Form, weisen zunehmend Einziehungen auf, und zeigen unterschiedliche Mengen an Heterochromatin, das sich vor allem im Bereich der Kernmembran sammelt. Im Zytoplasma erfolgt eine Zunahme der Mitochondrien, deren Gestalt länglicher wird und die vermehrt Cristae aufweist. Das raue endoplasmatische Retikulum sowie der Golgi-Apparat kommen in stärkerer Ausprägung vor, jedoch kann die von Falconnier und Kress (1992) beim Opossum beschriebene konzentrische Anordnung des endoplasmatischen Retikulums bei der Hündin nicht beobachtet werden. Ribosomen können sehr häufig nachgewiesen werden. All dies deutet auf steigende Stoffwechselaktivität in den Follikelepithelzellen gleichzeitig mit dem Follikelwachstum hin (Falconnier and Kress, 1992). Im Tertiärfollikel können im Bereich des Cumulus oophorus verschiedene Abschnitte an den Granulosazellen unterschieden werden. Aufgrund der Elektronendichte lassen sich zwei Bereiche unterscheiden, der Cumulus oophorus (dunkler) und die Zellen der wandständigen Granulosa (heller), was darauf hinweist, dass der Cumulus oophorus biochemisch anders regiert als die restlichen Granulosazellen. Die Einteilung in Basalzellen, Intermediärzellen und Corona radiata-Zellen erscheint in diesem Bereich aufgrund der elektronenmikroskopischen Ergebnisse nicht ausreichend. Die Ausstattung und Verteilung der Zellorganellen ist bei allen Zellpopulationen ähnlich und entspricht der oben beschriebenen. So unterscheiden sich die Zellen der Corona radiata von den Zellen der Cumulus oophorus durch die Bildung von Fortsätzen zur Oozyte, der vermehrten Ansammlung von Vesikeln sowie durch ihre hochprismatische Form. Im Übergangsbereich zwischen Cumulus oophorus und Stratum granulosum bildet das endoplasmatische Retikulum deutliche Zisternen, die in den anderen Zellen nicht beobachtet werden können. Große Mengen an Ribosomen deuten in diesem Bereich auf sehr stoffwechselaktive proteinsynthetisierende Zellen hin. Die Granulosazellen fallen dagegen aufgrund ihres hohen Zytoplasmaanteils auf. Ihr Chromatin erscheint stärker heterochromatisch als das der Cumuluszellen. Im Gegensatz dazu zeigen die Basalzellen

ein hohes Kern-Plasma-Verhältnis, weisen hochprismatische Form auf und liegen der Basalmembran direkt an. Ihre Kerne liegen basal.

Ähnlich den Untersuchungen von Van Wezel und Rodgers (1996) beim Rind ist auch beim Hund die unmittelbare Umgebung des Follikels relativ zellreich. Die Fibroblasten sind spindelförmig geformt und besitzen viele langen Fortsätzen, die oft alle parallel zur Achse des Follikels angeordnet sind. Dazwischen liegen Kollagenfasern, die den Follikel umgeben Im Tertiärfollikel werden die Follikel von der Theka folliculi umgeben, an der die Theka interna (epitheloide Zellen) von der Theka externa (längs verlaufende Fasern) unterschieden werden kann.

#### 5.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen am Hundeovar

Die immunhistochemischen Untersuchungen an Hundeovarien zeigen erstaunlicher Weise, dass die Fixierung mit Bouin`scher Lösung bei einigen der verwendeten Antikörper zu deutlich schlechteren Ergebnissen führt als die Fixierung mit 4 %iger PFA-Lösung. Derartige fixationsbedingte Unterschiede konnten jedoch nicht an der untersuchten Positivkontrolle vom Uterus des Hundes dargestellt werden, was beweist, dass nicht nur die Spezies Hund sondern in hohem Maße das verwendete Organ für diesen Reaktionsausfall verantwortlich ist. Die anderen verwendeten Positivkontrollen zeigten ebenfalls spezifische deutlich positive Ergebnisse.

Die Follikulogenese wird ab der Stufe der Tertiärfollikel neben der Wirkung der Gonadotropine FSH und LH essentiell durch das Steroidhormon Östrogen gesteuert (Van den Hurk and Zhao, 2005). Östrogene werden während der Follikelentwicklung von den Granulosazellen aus Androgenen synthetisiert, verteilen sich im Körper und erreichen über den Blutweg ihre Zielorgane. Die gebildeten Östrogene wirken dort auf die eigenen bzw. benachbarten Zellen (autokrin/parakrin), in dem sie an spezifische intrazelluläre Rezeptoren binden und so die Transkription bestimmter Gene beeinflussen (Drummond and Findlay, 1999). Bis jetzt konnten zwei verschiedene Östrogenrezeptoren, der Östrogenrezeptor α (ERα) (Green et al., 1986) und der Östrogenrezeptor β (ERβ) (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996) nachgewiesen werden, die beide die Effekte des Steroidhormons 17β-Östradiol vermitteln (Enmark et al., 1997; Mosselman et al., 1996). Sowohl ERα, als auch ERβ sind für die korrekte Ausbildung reifer Follikel essentiell (Couse et al., 2000), die genaue Wirkungsweise von ERα und β ist aber bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Bei der Ratte wird vor allem ERβ eine wichtige Rolle für die Vermittlung der Östrogenwirkung während des Follikelwachstum und -Reifung zugesprochen (Bao et al., 2000; De Carvalho Papa, 2001; Fitzpatrick et al., 1999; Rosenfeld et al., 1999; Sar and Welsch, 1999). ERβ scheint zudem in der Lage zu sein die Transkription von ERα zu verändern, da das Entfernen von ERβ im

Tierversuch zu erhöhter Expression des  $\alpha$ -Rezeptors führt (Yang et al., 2004). Des Weiteren gelang der Nachweis von ER $\alpha$  (Chen et al., 2004) und ER $\beta$  (Chen et al., 2004; Solakidi et al., 2005; Yang et al., 2004) im Zytoplasma im Bereich der Mitochondrien, weshalb eine direkte Beteiligung von Östrogenen an der Mitochondrienfunktion vermutet wird.

Das Vorkommen von ER $\alpha$  als auch von ER $\beta$  konnte im Ovar verschiedenen Spezies beobachtet werden. Dabei zeigt sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster der beiden Rezeptoren sowie Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Tierarten.

Im Gegensatz zu einer früheren Studie am Hundeovar (De Cock et al., 1997), konnte ERα von mir bei der Hündin immunhistochemisch hauptsächlich in den Follikelepithelzellen von Follikeln aller Entwicklungsstufen nachgewiesen werden. Die Intensität der Immunreaktion nimmt dabei mit wachsender Follikelgröße zu. Dies unterscheidet den Hund von Tierarten wie Maus und Ratte, bei denen ERα in den Granulosazellen der Follikel nicht auftritt (Bao et al., 2000; Fitzpatrick et al., 1999; Sar and Welsch, 1999). Anders zeigen sich die Verhältnisse bei Primaten und beim Menschen, bei denen der Nachweis von ERα in den Granulosazellen erst ab der Stufe der Tertiärfollikel (Saunders et al., 2000) gelang, was die in meiner Untersuchung festgestellte entwicklungsstadiumsspezifische Expression von ERa bei der Hündin unterstützt. Eine Untersuchung mittels RT-PCR zeigte, dass der Gehalt an ERa mRNA bei der Hündin vom Beginn der Läufigkeit bis zur Lutealphase deutlich ansteigt (Hatoya et al., 2003). Dies kann durch meine Untersuchung bestätigt werden, denn wachsende Follikel exprimieren zunehmend ERa. Wie bei De Carvalho Papa (2001) und Hoffmann et al. (2004) zeigten sich entsprechende Mengen an ERα auch in den Zellen der Corpora lutea der von mir untersuchten Hundeovarien. ERa wird beim Hund, zusammen mit dem Progesteronrezeptor, eine Beteiligung an der para- und autokrine Regulation der Corpus luteum-Funktion zugesprochen (De Carvalho Papa, 2001). Im Ooplasma von caninen Oozyten kleiner Follikel konnte ebenfalls eine positive Reaktion auf den ERα-Antikörper beobachtet werden. Abweichend davon konnte bei der Ratte keine Rezeptoren für ERα in den Oozyten nachgewiesen werden (Sar and Welsch, 1999). Der Kern der Oozyten ist stets immunnegativ.

Die Untersuchungen am Hundeovar zeigen entsprechende Mengen an ERα auch in den Stromazellen, den Granulosazellsträngen und in der Theka interna. Die Beschränkung der ERα positiven Reaktion auf die Theka interna weist auf eine Rolle in der Regulation der Steroidsynthese hin. Bei Ratte, Primaten und Menschen konnte ERα ebenfalls in Stromaund Thekazellen, sowie in den Zellen des Oberflächenepithels nachgewiesen werden (Sar and Welsch, 1999; Saunders et al., 2000). Übereinstimmend mit der Studie von De Cock et al. (1997) zeigt sich eine deutliche positive Immunreaktion auf ERα im Oberflächenepithel und dessen Gängen. Dies bestätigt die Beobachtungen von Okamura und Katabuchi (2005),

die das Vorkommen von ER beim Menschen im Oberflächenepithel beschreiben und daher auf eine Funktion bei der Follikelentwicklung schließen.

De Carvalho Papa (2001) beschreiben zusätzlich zu einer positiven Reaktion in den Kernen der Zellen, ein deutliches zytoplasmatisches Signal für ERα, was sich in meinen Untersuchungen ebenfalls zeigt. In den Untersuchungen von Sakaguchi et al. (2005) und Sar und Welsch (1999) konnte ebenfalls zytoplasmatische Färbung nachgewiesen werden, die diese allerdings auf eine unzureichende Blockierung der endogenen Peroxidase zurückführen. Untersuchungen zur Verteilung von Androgenrezeptoren in verschiedenen Zelllinien zeigen, dass sich Steroidrezeptoren im Zytoplasma befinden, so lange kein geeigneter Ligand anwesend ist. Durch Zugabe von Androgen konnte innerhalb einer Stunde die Wanderung des gebildeten Hormon-Rezeptor-Komplexes aus dem Zytoplasma in den Kern beobachtet werden. Dabei handelt es sich um eine dynamische Situation, denn der Rezeptor ist in der Lage bei sinkender Androgenkonzentration wieder zurück in das Zytoplasma zu wandern und somit für eine erneute Komplexbildung zur Verfügung zu stehen (Tyagi et al., 2000). Ähnliches konnte von Solakidi et al. (2005) für Östrogenrezeptoren gezeigt werden. Der Transport der gebildeten Komplexe in den Kern erfolgt dabei unter Energieaufwand (Guichon-Mantel et al., 1991), so dass Energiemangel der Zellen zu Efflux von Östrogenrezeptoren aus dem Kern in das Zytoplasma führt und die Verteilung ebenfalls beeinflussen kann (Miller and Toft, 1983).

Auffällig zeigt sich in den untersuchten Hundeovarien eine deutliche Immunreaktion von Nukleoli der Zellen, bei denen gleichzeitig Rezeptor im Kern und/oder Zytoplasma nachgewiesen werden konnte. Durch stärkere Vorbehandlung der Proben konnte die Immunreaktion zusätzlich noch verstärkt werden. Ein ähnliches Bindungsverhalten zeigt sich weder in der untersuchten Positivkontrolle am Uterus des Hundes noch in der anderen Positivkontrolle (Euter vom Rind). Auch in der Literatur konnten am Ovar keine positiv reagierenden Nukleoli nachgewiesen werden (De Carvalho Papa, 2001). Die Färbung der Nukleoli findet sich bei allen untersuchten Hündinnen, unabhängig vom Reproduktionsstatus, so dass eine hormonelle Beteiligung weitgehend ausgeschlossen werden kann. Eine derartige Immunreaktion auf ERa wurde nur in der Studie von Solakidi et al. (2005) beschrieben. In einer humanen Osteosarkom-, sowie einer Hepatokarzinom Zelllinie fand sich ERα im Kern der Zellen ausschließlich in den Nukleoli lokalisiert. Östrogen könnte damit über ERα direkt an der Nukleolusfunktion beteiligt sein. Eine Beteiligung von ERα an der präribosomalen RNA Biogenese im Nukleolus, deren Verarbeitung und dem Transport ins Zytoplasma liegt nahe (Solakidi et al., 2005). Die Ursache für die fehlende nukleoläre Immunreaktion in anderen Studien ist unklar. Von Solakidi et al. (2005) wurde vermutet, dass ein Zusammenhang der Immunreaktion mit dem hohen Wachstumspotential und den hoch

aktiven Nukleoli der von ihnen verwendeten Tumorzelllinien, im Gegensatz zu den relativ inaktiven Zellen in Reproduktionsorganen, besteht, und deshalb eine Bindung an die Nukleoli in Letzteren nicht nachzuweisen ist. In den von mir untersuchten Hundeovarien konnte jedoch stets eine deutliche nukleoläre Reaktion auf ERα in allen immunpositiv reagierenden Zellen gezeigt werden, was dieser These widerspricht. Dies zeigt, dass neben der untersuchten Spezies und des Gewebes weitere Faktoren großen Einfluss besitzen. So fällt bereits in der vorliegenden Studie eine deutliche Abhängigkeit der Intensität der Färbung von der Vorbehandlung des Gewebes auf. Daneben sind Faktoren wie die Fixierung und der verwendete Antikörper als Faktoren für die Darstellbarkeit des nukleolären ERα zu bedenken.

Im Gegensatz zu ERα findet sich ERβ bei verschiedenen Spezies hauptsächlich in den Follikel- und Granulosazellen der Follikel. Der Nachweis der mRNA und des Rezeptorproteins gelang vom Primordial- bis Tertiärfollikel bei Ratte (Bao et al., 2000; Fitzpatrick et al., 1999; Sar and Welsch, 1999), Rind (Haeseleer et al., 2005; Rosenfeld et al., 1999), Menschen und Primaten (Saunders et al., 2000) sowie bei der Maus (Fitzpatrick et al., 1999). Daneben zeigten auch die Thekazellen, das Stroma, das Corpus luteum sowie das Oberflächenepithel bei diesen Spezies eine meist schwache, aber positive Reaktion auf ERβ (Bao et al., 2000; Haeseleer et al., 2005; Rosenfeld et al., 1999; Sakaguchi et al., 2005; Saunders et al., 2000). Anders als bei diesen Tierarten scheint ERß bei der Hündin nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es tritt vor allem im Corpus luteum auf und scheint dort an der Bildung und insbesondere am Abbau beteiligt zu sein. Geringe Mengen ERβ können in den Kernen und im Zytoplasma der Granulosazellen von Hündinnen nachgewiesen werden, die gleichzeitig sich bildende Gelbkörper besitzen. Sehr geringe Mengen an ERβ können bei diesen Hündinnen auch in den Zellen des Oberflächenepithels, dessen Gängen und den Granulosazellsträngen beobachtet werden. Gar nicht zeigt sich ERß in Corpora lutea in Blüte, deutliche Mengen ließen sich dagegen wieder in den degenerierenden Luteinzellen des sich rückbildenden Corpus luteum bei Hündinnen im Anöstrus nachweisen. Die Untersuchungen von Hatoya et al. (2003) bei der Hündin beschreiben, dass der Gehalt an ERβ mRNA vom mittleren Anöstrus zum Proöstrus ansteigt. Das Zyklusstadium deutet auf eine Rolle bei der frühen Follikelentwicklung hin, da ERβ vor ERα steigt. In meinen Untersuchungen konnte dies nicht beobachtet werden. Eventuell konnte der Rezeptor jedoch aufgrund einer veränderten Sensitivität und Affinität des Antikörpers für das Ovargewebe in anderen Zyklusstadien als der Lutealphase nicht in ausreichender Menge dargestellt werden und zeigt deshalb negative Ergebnisse.

Das Follikelwachstum ist mit einer deutlichen Proliferation der Follikelepithelzellen verbunden. Als Proliferationsmarker diente ein monoklonaler Antikörper gegen Ki-67 (Clone

MIB-1), das ausschließlich in sich teilenden Zellen nachweisbar ist und in der Tumordiagnostik große Bedeutung erlangt hat, da es auf die Proliferationsrate von Tumorzellen zurück schließen lässt. Die strikte Verbindung zur Proliferation (G1-, S-, G2-Phase, Mitose) wurde in verschiedenen Studien bestätigt (Falini et al., 1989; Gerdes et al., 1983; Schlüter et al., 1993; Schmidt et al., 2002; Scholzen and Gerdes, 2000; Verheijen et al., 1989). Ki-67 konnte mittels monoklonalen Antikörpern in den Geweben verschiedener Spezies, darunter auch beim Hund, nachgewiesen werden (Falini et al., 1989). Zellproliferation kann von mir immunhistochemisch in den Follikeln des Hundeovars ab der Stufe des Primärfollikels nachgewiesen werden. Zunächst erfolgt diese gleichmäßig im Follikelepithel, mit zunehmendem Wachstum und der Bildung des Antrum folliculi zeigte sich jedoch, dass in diesem Stadium ausschließlich die Cumuluszellen mitotisch aktiv sind. Die Membrana granulosa proliferiert zu diesem Zeitpunkt kaum oder gar nicht. Erst im Tertiärfollikel erfolgt die Zellteilung wieder gleichmäßig in beiden Zellklassen. In Untersuchungen an humanen Ovarien zeigten sich in antralen Follikeln deutlich höhere Färbungsindexe (Anteil positiver Zellen pro 100 Zellen) für Ki-67 in Theka folliculi und Granulosazellen (Funayama et al., 1996). Selten können mitotisch aktive Zellen im Stroma, im Corpus luteum, in den Zellen der Theka folliculi, den Endothelzellen von Blutgefäßen sowie im Oberflächenepithel und im Epithel der Gangsysteme, was auf eine allgemein geringe Zellerneuerung schließen lässt.

Im Verlauf des Sexualzyklus ist das Ovargewebe ständigen Umbauvorgängen unterworfen. Wachsende Follikel werden ins Zentrum verlagert, um relativ kurz vor der Ovulation wieder an die Oberfläche zu treten. Die Ovulation und die Bildung bzw. Rückbildung des Gelbkörpers ist ebenfalls von großen Gewebeveränderungen geprägt. Substanzen, die von den Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert werden, werden als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet. Die ECM besteht aus einer Mischung verschiedener Moleküle, zu denen die Kollagene (Typ I-XXVIII), die Elastine, die Proteoglykane sowie die strukturellen Glykoproteine (v.a. Fibronektin) gehören (Labat-Robert et al., 1990). Sie besitzt Aufgaben wie Formgebung des Gewebes, Zellteilung, Differenzierung und Zelltod, ist an der Bildung der Basalmembranen, an der Steuerung der osmotische Aktivität bei der Antrumbildung, sowie an der Nährstoffversorgung der Zellen beteiligt (Irving-Rodgers and Rodgers, 2005; Rodgers et al., 2003). Die Neubildung und der Abbau der ECM-Komponenten werden von zwei wichtigen proteolytischen Systemen, dem Plasminogenaktivator (PA) System und dem Matrixmetalloproteinase (MMP) System gesteuert. Beide Systeme bestehen aus Proteinasen, wie auch aus deren Inhibitoren, die die proteolytische Aktivität genau kontrollieren und regulieren (Ny et al., 2002).

Die Aktivität der MMPs kann durch Inhibitoren, die so genannten "Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen" (TIMP) gehemmt werden. Bis jetzt wurden mindestens 28 verschiedene MMP- und vier verschiedene TIMP-Proteine (TIMP1-4) beschrieben (Curry and Osteen, 2003; Fassina et al., 2000; Ny et al., 2002). MMPs werden von den Zellen als inaktive Zymogene sezerniert, um dann im extrazellulären Raum aktiviert zu werden. Die Regulation der MMP-Aktivität erfolgt dabei auf Ebene der Transkription, der Aktivierung des Proenzyms oder der Inhibition (Ny et al., 2002). Ähnlich den MMPs werden die TIMPs lokal von den Zellen produziert und sezerniert (Curry and Osteen, 2003), binden im Extrazellulärraum spezifisch im Verhältnis 1:1 an aktive MMPs und verhindern so deren proteolytische Aktivität (Knäuper et al., 1996; Ny et al., 2002; Stetler-Sevenson et al., 1989). Besondere Bedeutung an der Aktivierung einiger pro-MMPs erhält die Bildung von Komplexen, zum Beispiel zwischen MMP-14, TIMP-2 und pro-MMP-2 (Bernardo and Fridman, 2003; Fassina et al., 2000; Jo et al., 2004). Neben der direkten Hemmwirkung auf MMPs sind TIMPs in der Lage die pro-MMP-Aktivierung zu reduzieren, das Zellwachstum zu fördern, die Angiogenese zu hemmen, sowie die Apoptose zu steuern und somit auf die Tumorentstehung, Metastasierung und Blutgefäßbildung Einfluss zu nehmen. Bedeutung erlangt dies unter anderem in der Herstellung von Medikamenten in der Tumortherapie (Fassina et al., 2000). Im Ovar werden MMPs und TIMPs mit dem Follikelwachstum sowie insbesondere mit den Gewebeveränderungen während der Ovulation in Verbindung gebracht. Die Literatur zeigt deutliche tierartliche Unterschiede im Expressionsmuster verschiedener MMP/TIMPs auf. Die Verteilung von drei der MMPs (MMPs-1, -2, -14) sowie von TIMP-2 habe ich am Hundeovar immunhistochemisch untersucht. Die Substrate dieser MMPs in der ECM zeigt Tab. 20.

Tab. 20 Gebräuchliche Namen und Substrate der MMPs-1, -2, und -14 in der ECM, nach Curry und Osteen (2003)

ММР	Name	Kollagen	Weitere Substrate der ECM
MMP-1	Kollagenase-1	I, II, III, VII, VIII, X, XI	Aggrecan, Gelatin, Fibrin, MMP-2, MMP-9
MMP-2	72kDa Gelatinase	I, III, IV, V, VII, X, XI	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMP-9, MMP-13
MMP-14	Membran-Typ 1 Metalloproteinase, MT1	I, II, III, IV	Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Gelatin, Laminin, MMPs -2,-13

Die Immunreaktion ist weitgehend auf das Zytoplasma positiv reagierender Zellen beschränkt. Schwach bis deutlich positiv reagieren, neben den Follikelepithelzellen, stets die

Zellen der Blutgefäße, der Corpora lutea, der Granulosazellstränge und des Oberflächenepithel mit seinen Gangsystemen. MMP-1, MMP-14 und TIMP-2 kommen dabei stets in den gleichen Zellpopulationen vor, aber in unterschiedlicher Intensität.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen vom Hund konnten beim Rind von Bakke et al. (2004) während der Follikelentwicklung Veränderungen der MMP-1 Expression beobachtet werden. Das MMP wird in bovinen Granulosa- und Thekazellen während des Wachstums in zunehmenden Mengen exprimiert und ist damit am Follikelwachstum beteiligt. Die regionale Verteilung innerhalb eines Tertiärfollikels verändert sich, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei der Hündin, jedoch nicht, so dass eine Beteiligung an der Ovulation auch bei anderen Spezies bezweifelt wird (Curry et al., 2001; Hägglund et al., 1999; Liu et al., 1998a). Auffällig ist, dass MMP-1 deutlich vor allem in den tiefen Gängen des Oberflächenepithels vorkommt und hier vornehmlich im apikalen Bereich der Zellen zu finden ist. MMP-2 kann in caninen Ovarien in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. So finden sich neben Ovarien, die gar keine Reaktion mit dem MMP-2 Antikörper zeigen, auch solche, die sehr deutliche Färbung in einzelnen Abschnitten des Oberflächenepithels, dessen Gängen, im Stromagewebe oder im Endothel der Blutgefäße aufweisen. Dabei reagieren stets nur einige der Zellen eines Gewebes immunpositiv. In den Zellen der Follikel konnte MMP-2 in keinem Fall nachgewiesen werden. Bei der Ratte konnte dagegen eine deutlich höhere MMP-2-Expression beobachtet werden. So zeigt sich MMP-2 in Thekazellen von Follikeln in verschiedenen Entwicklungsstadien, sowie im Stromagewebe (Bagavandoss, 1998; Curry et al., 2001) und im Corpus luteum (Bagavandoss, 1998; Hägglund et al., 1999; Liu et al., 1998a). In reiferen Follikeln der Ratte kann MMP-2 dann ebenfalls in der Membrana granulosa und in den Thekazellen nachgewiesen werden (Bagavandoss, 1998; Hägglund et al., 1999; Liu et al., 1998a). MMP-2 ist bei der Ratte (Curry et al., 2001) an der Follikelruptur beteiligt, was im Gegensatz zu Untersuchungen bei Rind (Bakke et al., 2002) und Pferd (Riley et al., 2004) steht. Ob und in wie weit eine Beteiligung an der Ovulation beim Hund vorhanden ist erfordert weitere Untersuchungen. Die Verteilung bei dieser Tierart weist auf eine spezifische regional begrenzte Bedeutung des MMPs in Geweben des Ovars hin, die jedoch nicht direkt mit dem Follikelwachstum in Verbindung steht. MMP-14, das einzige untersuchte membrangebundene MMP, zeigt am Hundeovar eine deutliche Immunreaktion, die in unterschiedlicher Intensität in fast allen Zellen des Ovars sowie in der ECM beobachtet werden kann. In den Follikelepithel- und Granulosazellen steigt die Expression von MMP-14 im Zytoplasma mit zunehmendem Follikelwachstum deutlich an. Das MMP scheint bei der Hündin am Follikelwachstum beteiligt zu sein. Vor allem im Tertiärfollikel kann in den antrumseitigen (Liquor folliculi produzierenden) Granulosa- und Cumuluszellen eine, im Vergleich zu den anderen Granulosazellen, deutlich stärkere positive

Immunreaktion auf MMP-14 beobachtet werden. Dies weist auf eine Rolle in der Antrumbildung und der Bildung des Liquor folliculi hin. Bei der Ratte wird MMP-14 in gleich bleibend geringen Mengen in der Theka folliculi und dem Stratum granulosum aller Follikelstadien exprimiert. Erst kurz vor der Ovulation zeigt sich bei dieser Tierart eine Veränderung im Sinne eines deutlichen Abfalls der MMP-14-Menge in den Granulosazellen bei gleichzeitigem Anstieg in den Thekazellen (Hägglund et al., 1999; Liu et al., 1998a). In Untersuchungen am Rind zeigte sich eine Beteiligung von MMP-14 an der Follikelruptur (Bakke et al., 2002). Der MMP-Inhibitor TIMP-2 kann in allen untersuchten Hundeovarien nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der Immunreaktion zwischen den einzelnen Hündinnen sind hier allerdings am deutlichsten zu erkennen. Die Intensität der Reaktion mit dem Antikörper steigt nur bei einem Teil der untersuchten Tiere deutlich mit zunehmendem Follikelwachstum an, während andere Hündinnen gleich bleibend immunpositive Ergebnisse liefern. Eventuell gibt es hier zyklusabhängige Unterschiede, die auf unterschiedliche hormonelle Beeinflussung des Wachstums schließen lassen. In wachsenden Rattenfollikeln konnte TIMP-2 in Theka und Stroma (Curry et al., 2001), sowie in den Zellen des Corpus luteum (Bagavandoss, 1998; Curry et al., 2001) nachgewiesen werden. Der Inhibitor zeigte beim Rind eine spezifische Verteilung in der Granulosa und wurde in diesen Zellen vor allem antralseitig gefunden. Das TIMP ist bei dieser Tierart an der Follikelruptur beteiligt (Bakke et al., 2002).

Ein Vergleich der Immunreaktion in caninen Follikeln unterschiedlicher Follikelstadien zeigt, dass die Expression von MMP-14 und TIMP-2 in Verlauf der Follikelreifung zunimmt. Beim Rind konnten in präovulatorischen Follikeln ein Anstieg an mRNA von MMP-14 und TIMP-2 gezeigt werden (Bakke et al., 2002). Für einen anderen Inhibitor, TIMP-1, wurde ähnliches beobachtet. Er steigt gleichzeitig mit den MMPs, was eigentlich paradox ist. Jedoch existiert ein Parallelregulationsmechanismus von MMPs und ihren Hemmern, mit dem Zweck die proteolytische Homöostase aufrecht zu erhalten und so die lokale Kontrolle des ECM-Abbaus zu gewährleisten (Curry and Osteen, 2003).

# 5.2 Canine Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung

## 5.2.1 Einflussfaktoren auf die Anzahl gewinnbarer caniner Oozyten

Die Gewinnung der caninen Oozyten erfolgte durch Slicing von Ovarien, die nach Ovariohysterektomie der Hündinnen unterschiedlicher Rassen und Alter in der tierärztlichen Praxis gewonnen wurden. Dies ist eine einfache und häufig benutzte Methode der Oozytenisolierung beim Hund (Fujii et al., 2000; Hewitt and England, 1998a; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Otoi et al., 2006; Rocha et al., 2006; Songsasen et al., 2002).

Bereits in früheren Arbeiten wurde jedoch beschrieben, dass mit dieser Methode Oozyten aus Tertiärfollikeln verschiedenster Größen und damit verschiedener Reifestadien gewonnen werden. Dies resultiert zwar in einer großen Gesamtanzahl an Oozyten, die Heterogenität der Oozyten ist jedoch ebenfalls sehr groß, was diese Methode für die Gewinnung von geeigneten Oozyten für die IVM problematisch erscheinen lässt.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit von 61 Hündinnen 4605 Oozyten gewonnen. Die durchschnittliche pro Hund gewonnene Oozytenanzahl liegt bei 75,5 Oozyten, wobei die Spannweite der Oozytenanzahl zwischen den einzelnen Hündinnen sehr groß war (0 Oozyten bis 230 Oozyten). In der Literatur unterscheiden sich die Angaben in den einzelnen Studien beträchtlich. So konnten pro Hündin von Fujii et al. (2000) durchschnittlich 128,4 Oozyten gewonnen werden, während von Bogliolo et al. (2002) mit durchschnittlich 57,8 Oozyten und von Hewitt and England (1997) mit nur 16,3 Oozyten wesentlich weniger Oozyten gewonnen wurden. Es zeigt sich auch in diesen Studien, dass die Anzahl deutlich von Hündin zu Hündin variiert und individuelle Gegebenheiten des Einzeltieres von großer Bedeutung sind.

Wie bei anderen Untersuchungen ist die gewonnene Oozytenanzahl deutlich abhängig vom Alter der Hündin (Hewitt and England, 1998a; Rodrigues and Rodrigues, 2003a; Theiss, 1997). In meiner Arbeit wurden Hündinnen im Alter von 4 Monaten bis 12,5 Jahren untersucht, von denen allerdings fast 80% jünger als 24 Monate waren. Die gewonnene Oozytenanzahl ist trotzdem signifikant negativ mit dem Alter der Hündinnen korreliert, wobei sich die Oozytengewinnung von Hündinnen zwischen 10 und 36 Monaten mit durchschnittlich 88 Oozyten (± 42 Oozyten) als am effektivsten herausstellte. Jüngere und ältere Tiere weisen deutlich geringere Zahlen auf. Die in meiner Studie gewonnene Oozytenanzahl ist unabhängig vom Reproduktionsstatus oder der Rasse der untersuchten Hündin. Dabei ist zu beachten, dass bei Hündinnen vor der ersten Läufigkeit bis etwa 9 Monaten altersbedingt niedrigere Oozytenzahlen auftreten. Zudem waren fast 80% der Hündinnen im Anöstrus. Von Rodrigues and Rodrigues (2003) und Songsasen and Wildt (2005) konnten in verschiedenen Reproduktionsstadien ebenfalls keine Unterschiede in der Gesamtanzahl an Oozyten nachgewiesen werden, während Cui et al. (2006), Fujii et al. (2000), Luvoni et al. (2001), Nickson et al. (1993) und Theiss (1997) eine deutliche Zyklusabhängigkeit beschreiben. Es finden sich jedoch bei diesen Autoren unterschiedliche Angaben darüber, welches Zyklusstadium das Erfolg versprechendste ist. Bezogen auf die Rasse der Hündinnen zeigen sich in der Literatur ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. Die fehlende Abhängigkeit der Oozytenanzahl von der Hunderasse in meiner Untersuchung wird durch die Untersuchung von Rodrigues and Rodrigues (2003) bestätigt. Im Gegensatz dazu

konnten Durrant et al. (1998), die ganze Follikel isolierten, die größte Anzahl an Follikeln von reinrassigen Hunden im Alter von 13 bis 48 Monaten gewinnen.

Bedeutend könnte ebenfalls die Transporttemperatur der caninen Ovarien sein, die bei Raumtemperatur erfolgte, und damit ebenfalls für eine Veränderung der Oozytenanzahl und möglicherweise auch für die Qualität der Oozyten mitverantwortlich sein könnte. Von Lee et al. (2006) und Tas et al. (2006) konnte eine Abhängigkeit der Reifungsraten caniner Oozyten von der Transporttemperatur der Ovarien bereits bestätigt werden.

Bis jetzt gibt es meines Wissens keine Untersuchungen über die Auswirkungen der Transportzeit der Ovarien von der Entnahme bis zur Oozytengewinnung im Labor. Da oft beträchtliche Zeit vergeht, bis die Ovarien im Labor ankommen, ist eine Beeinflussung der Oozytenanzahl und -qualität durch die Transportzeit nicht auszuschließen. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Ovarien in einer sterilen Lösung in einem Röhrchen bei Raumtemperatur (ca. 20°C) zwischen 15 Minuten und sieben Stunden (420 Minuten) bis zur weiteren Verarbeitung transportiert bzw. gelagert. Obwohl die Veränderung der gewonnenen Oozytenanzahl nach verschiedenen Zeiten nicht signifikant ist, so ist doch eine Tendenz zu geringeren Oozytenzahlen nach 240 Minuten Transport zu erkennen. Die Auswirkungen einer unterschiedlich langen Lagerung von caninen Ovarien auf die spätere Entwicklungsfähigkeit der Oozyten in vitro habe ich nicht untersucht und muss noch geklärt werden. In einer Studie beim Pferd konnte nachgewiesen werden, dass die Ovarien optimalerweise vier bis sechs Stunden vor der Oozytengewinnung gelagert werden sollten, da die Kernreifung durch die nach dieser Zeit beginnenden Degeneration der Cumuluszellen gefördert wird (Pederson et al., 2004).

#### 5.2.2 Größenverhältnisse durch Slicing gewonnener caniner Oozyten

Die Messung des Oozytendurchmessers, des Durchmessers des "germinal vesicle" sowie die Bestimmung der Dicke der Zona pellucida erfolgte an 53 kurz nach der Gewinnung in 4% PFA fixierten caninen Oozyten, deren Kerne mit Propidiumjodid und/oder Hoechst 33342 angefärbt worden waren und deren dreidimensionale Form durch Verwendung eines Platzhalters bei der Fixierung auf Objektträger erhalten werden konnte. Mittels des LSM Image Browsers wurden jeweils mehrere Werte bestimmt und der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Werte eine große Spannweite aufweisen. So schwankt der Oozytendurchmesser (ohne Zona pellucida) in den untersuchten Zellen von 43,4 μm bis 127,3 μm. Der mittlere Durchmesser der Oozyten beträgt 108,7 μm (± 14,99 μm). Dieses Ergebnis entspricht den Angaben über die Größenverhältnisse von durch Slicing gewonnener Oozyten in anderen Studien (Fujii et al., 2000; Theiss, 1997). Bei Lee et al. (2007a) zeigte sich an frisch ovulierten Oozyten ein Durchmesser von 134 μm, was darauf

hindeutet, dass die Oozyten, die aus Tertiärfollikeln gewonnen werden, ihr Größenwachstum noch nicht abgeschlossen haben. Die Messung des "germinal vesicle"- Durchmessers ergiebt eine Spannweite der Werte von 15,2  $\mu$ m bis 39,5  $\mu$ m. Im Mittel liegt der Durchmesser bei 30,3  $\mu$ m ( $\pm$  5,22  $\mu$ m). Dies ist etwas kleiner als von Anderson and Simpson (1973) mit ca. 40  $\mu$ m im Tertiärfollikel angegeben. Es scheinen jedoch nur Oozyten mit kleinerem "germinal vesicle"- Durchmesser (20  $\mu$ m) ovuliert zu werden (Reynaud et al., 2005; Saint-Dizier et al., 2004), da dieser deutlich kleiner ist als der aus Tertiärfollikel gewonnenen Oozyten. Für die Zona pellucida kann bei den untersuchten Oozyten eine Dicke zwischen 6,7  $\mu$ m und 21,6  $\mu$ m (Mittelwert 15,3  $\mu$ m  $\pm$  3,47  $\mu$ m) gemessen werden, was den von Anderson and Simpson (1973) für Oozyten in Tertiärfollikeln angegebenen Wert von 5  $\mu$ m bis 6  $\mu$ m deutlich übersteigt, jedoch mit den neueren Ergebnissen von Lee et al. (2007a) weitgehend übereinstimmt. Verglichen mit der in in vivo gereiften ovulierten caninen Oozyten gemessenen Dicke von 19  $\mu$ m ist die Zona pellucida deutlich zu schmal (Lee et al., 2007a).

Trotz dieser Differenzen zwischen meiner Untersuchung und den Angaben in der Literatur, kann bei einem Vergleich der ermittelten Werte der Oozyten mit den von mir gemessenen Werten der Oozyten in Tertiärfollikeln eine grundsätzliche Übereinstimmung festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass die Oozyten ausschließlich aus Tertiärfollikeln gewonnen wurden.

Die Berechnung der Korrelation zwischen dem Durchmesser des "germinal vesicle" und dem Durchmesser der Oozyte zeigt, dass die Größe des "germinal vesicle" gleichzeitig mit der Größe der Oozyte ansteigt. Im Gegensatz dazu kann ein derartiger Zusammenhang zwischen der Größe der Oozyte und der Dicke der Zona pellucida nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnisse, die die Messungen in Tertiärfollikeln im Ovar der Hündin ergaben, bei denen ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Dicke der Zona pellucida und dem Durchmesser der Oozyten in diesem Entwicklungsstadium festgestellt werden konnte. Literaturangaben zu diesem Thema sind spärlich. In der Studie von Pelletier et al. (2004) an humanen Oozyten, die nach Superovulationsbehandlung im Rahmen eines ICSI-Protokolls aspiriert wurden, konnte die Dicke der Zona pellucida direkt nach der Gewinnung gemessen werden. Die Variation der Zona pellucida- Dicke innerhalb einer Oozyte, zwischen verschiedenen Oozyten sowie zwischen Oozyten einzelner Patienten war auch hier sehr groß (durchschnittlich ca. 20 µm), jedoch wurde keine Korrelation zum Durchmesser der Oozyten bestimmt (Pelletier et al., 2004). In der Untersuchung von Lee et al. (2007a) bei der Hündin fand sich ebenfalls eine große Spannweite der ermittelten Werte. In der Humanmedizin wurde beschrieben, dass die Dicke der Zona pellucida als klinisches Mittel zur Embryonenselektion dienen kann (Gabrielsen et al., 2000). Ob und in wie weit die

Dicke der Zona pellucida auch beim Hund mit der Fähigkeit zur weiteren Entwicklung verbunden ist, ist bis jetzt unklar.

#### 5.2.3 Morphologische Aspekte der Oozytenreifung in vitro

Die Klassifizierung der gewonnenen Oozyten fand nach der Einteilung von Theiss (1997) mit Hilfe einer Stereolupe unmittelbar nach der Gewinnung durch Slicing statt. Demnach besaßen 48,1% aller von mir isolierten Oozyten ein dunkles homogenes Zytoplasma sowie eine vollständige Schicht an Cumuluszellen (Kategorie A), 14,7% ein dunkles homogenes Zytoplasma und unvollständige Cumuluszelllagen (Kategorie B), 11,4% hatten keine Cumuluszellen mehr (Kategorie C) und 25,8% waren defekt oder wiesen ein inhomogenes Zytoplasma auf (Kategorie D). Verglichen mit der Studie von Theiss (1997) konnten in meiner Studie deutlich mehr Kategorie A Oozyten und etwas mehr Kategorie C Zellen gewonnen werden. Ursache hiefür sind wahrscheinlich Unterschiede in der Durchführung des Slicings sowie bei der Klassifizierung, bei der in der vorliegenden Studie nur vollständige Oozyten miteinbezogen wurden und Oozytenbruchstücke nicht berücksichtigt wurden. Von Fujii et al. (2000) konnten mittels Slicing fast die Hälfte aller Oozyten mit vollständigem oder unvollständigem Cumulus oophorus isoliert werden.

In der vorliegenden Studie kann keine Änderung im Anteil der jeweiligen Kategorie mit dem Alter, dem Reproduktionsstatus, der Rasse oder der Transportdauer der Ovarien zwischen Entnahme und Oozytengewinnung nachgewiesen werden. Die Beurteilung der einzelnen Klassen bezogen auf das Alter ist in meiner Studie jedoch schwierig, da die Anzahl an untersuchten Hunden über 24 Monaten gering ist. In den Untersuchungen von Fujii et al. (2000) und Rodrigues und Rodrigues (2003) zeigt sich, übereinstimmend mit meinen Ergebnissen, ebenfalls kein Einfluss des Reproduktionsstatus auf die Einteilung der Oozyten in Klassen. Diese Hypothese wird letztendlich von Songsasen and Wildt (2005) bestätigt, die der Meinung sind, dass weniger das Zyklusstadium, als die Größe der Follikel für die Eignung der Oozyten für eine erfolgreiche IVM verantwortlich sind. In Bezug auf die Rasseabhängigkeit zeigt die Literatur nur wenige Ergebnisse. Rodrigues und Rodrigues (2003) konnten keine Einflüsse verschiedener Hunderassen auf die Zuordnung zu Klassen feststellen. Die Auswirkungen dieser Faktoren auf die Fähigkeit der Oozyten die Meiose in Kultur wieder aufzunehmen können aufgrund der in meiner Untersuchung geringen untersuchten Oozytenanzahlen nicht beurteilt werden. Von Hewitt und England (1998a) wird jedoch beschrieben, dass die Fähigkeit der Zellen zur Reifung bis MII ab einem Alter von sechs Jahren deutlich sinkt. Die Bedingungen in älteren Ovarien sind wahrscheinlich nicht mehr so gut für das Follikelwachstum, so dass es zu einem höheren Anteil an degenerierten Follikeln kommt (Telfer and Gosden, 1987).

Die genauere phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Oozyten in meiner Untersuchung zeigt, dass die Zona pellucida stets als heller Ring um die Oozyte erkennbar ist und der "germinal vesicle" bei den meisten Oozyten als heller Fleck im Zentrum des dunklen Ooplasmas identifiziert werden kann. Durch Slicing können außerdem zahlreiche degenerierte Oozyten sowie vereinzelte vollständige Follikel gewonnen werden. Morphologisch verändern sich die Oozyten nach unterschiedlichen Zeiten der IVM kaum. Die Oozyten weisen nach wie vor das dunkle homogene Ooplasma auf, das allerdings bei manchen Zellen durch Vakuolen im Randbereich auffällt. Bei einigen der Oozyten kann der "germinal vesicle" als heller Fleck im Zentrum des Ooplasmas nicht mehr nachgewiesen werden. Nur bei einer Oozyte kann die Kernreifung aufgrund der Bildung des Polkörperchens nach 72 Stunden IVM festgestellt werden.

Auffällig ist, dass sich die sonst sehr fest mit der Oozyte verbundenen Cumuluszellen ab einer Kulturdauer von 24 Stunden bei den meisten Oozyten leicht mechanisch entfernen lassen. Die Zellen des Cumulus oophorus zeigen bereits nach 24 Stunden IVM deutliche Anzeichen für Degeneration, die sowohl licht- wie auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Dazu zählen die leichte Ablösung der Cumuluszellen, die deutliche Vakuolenbildung sowie die ultrastrukturell nachweisbare Auflösung von Zellorganellen. Einige wenige Oozyten zeigen in meiner Untersuchung eine unterschiedlich starke Expansion der Zellen des Cumulus oophorus. In der Literatur gibt es hierzu verschiedene Angaben. Während in der Untersuchung von Theiss (1997) keine Cumulusexpansion beobachtet werden konnte, so spricht doch die Mehrheit der Arbeiten dafür, dass eine Cumulusexpansion ab einer Kulturdauer von 48 Stunden stattfindet und ein Maximum nach 72 Stunden zeigt (De los Reyes et al., 2005; Nickson et al., 1993; Yamada et al., 1992). Interessant ist hierbei, dass die Ausprägung der Expansion sehr variabel und insbesondere von der hormonellen Supplementation des Reifungsmediums abhängig ist (Bolamba et al., 2006; De los Reyes et al., 2005; Songsasen et al., 2002). Ob die Expansion ein positives oder negatives Anzeichen für die Entwicklung der Oozyte darstellt ist unklar. Nickson et al. (1993) konnten bei Oozyten mit nicht-intaktem Cumulus oophorus nach IVM regelmäßig Anzeichen der Degeneration feststellen. Generell scheint die Expansion der Zellen des Cumulus oophorus beim Hund weitgehend ein Phänomen der In-vitro-Kultur zu sein. In vivo sind Oozyten nach der Ovulation stets von lediglich zwei bis drei dichten Granulosazellschichten umgeben, deren äußere Schicht sich während der weiteren Entwicklung etwas lockert, jedoch keine deutliche Expansion zeigt (Anderson and Simpson, 1973; Holst and Phemister, 1971; Reynaud et al., 2005). Die COCs verlieren diese Zellen langsam während ihres Aufenthaltes im Eileiter (Holst and Phemister, 1971; Reynaud et al., 2005).

Für die ultrastrukturellen Untersuchungen von frisch gewonnenen caninen Oozyten wurden insgesamt je zwei COCs/Oozyten von drei verschiedenen Hündinnen aus dem Anöstrus für die Transmissionselektronenmikroskopie fixiert und untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Oozyten auch nach ultrastrukturellen Gesichtspunkten dem Stadium einer Oozyte im Tertiärfollikel entsprechen und sich alle untersuchten Oozyten in ihrem Aufbau stark ähneln. Neben dem zentral liegenden Kern mit rundem Nukleolus enthält das Ooplasma große Mengen an Mitochondrien und Lipiddotterkörperchen sowie glattes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat. Die Verteilung dieser Zellorganellen in der Oozyte entspricht im Wesentlichen der, die bereits für die Oozyten in Tertiärfollikeln beschrieben wurde, jedoch zeigen sich zwischen den Oozyten geringfügige Unterschiede, was auf Unterschiede im Reifezustand der Tertiärfollikel, aus denen sie gewonnen wurden, hindeutet. Bei allen Oozyten finden sich kurze aufrechte Mikrovilli, die in eine unterschiedlich dicke (8 µm – 13 µm) Zona pellucida vordringen. Verglichen mit der Zona pellucida in Tertiärfollikeln erscheint sie in nicht so engem Kontakt zu den Cumuluszellen zu stehen. Im Gegensatz zu den untersuchten Tertiärfollikeln im Ovar der Hündin, sind die Oozyten relativ reich an Lipiddotterkörperchen. Diese liegen dabei eher zentral, oder auch, bei manchen Oozyten, in Gruppen im Zytoplasma verteilt. Drei der Oozyten weisen eine deutliche Guppenbildung von Mitochondrien, Lipiddotterkörperchen und glattem endoplasmatischem Retikulum neben freien Bereichen im Ooplasma und vereinzelte kortikale Granula direkt unter der Ooplasmamembran auf. Letztere werden bei der Hündin ab der Stufe des Sekundärfollikels gebildet (Tesoriero, 1981). Bei zwei der Oozyten zeigt sich der Golgi-Apparat ausschließlich im Randbereich des Ooplasmas.

Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen an frisch gewonnen Hundeoozyten zeigten sich auch in den Untersuchungen von Nili et al. (2004) an unreifen Dromedaroozyten unterschiedliche Reifestadien, die sich bei dieser Tierart, ähnlich dem Hund, vor allem in der Menge und Verteilung von Mitochondrien, Vesikeln, Lipiden sowie kortikalen Granula zeigen. Beim Menschen wurde dies ebenfalls bereits beschrieben (Sundström et al., 1985). Weitere ultrastrukturelle Untersuchungen an isolierten Oozyten aus Tertiärfollikeln der Maus und dem Rind ergaben ähnliche Ergebnisse, jedoch variierten die Ergebnisse zwischen den einzelnen Oozyten nicht so stark (Hyttel et al., 1986; Wassarman and Josefowicz, 1978).

Sundström et al. (1985) beobachteten bei 20% aller gewonnenen Oozyten Anzeichen für Degeneration in Form von übermäßiger Vakuolenbildung. Jedoch sehen die Autoren das Vorhandensein von einer mäßigen Anzahl an Vesikeln als Anzeichen gesunder Oozyten an (Sundström et al., 1985). In meiner Untersuchung konnten bei keiner der caninen Oozyten Anzeichen der Degeneration festgestellt werden. Windt et al. (2001) zeigen allerdings, dass meiotische Arretierung nicht zwangsläufig mit Degeneration verbunden sein muss.

Die Cumuluszellen der Hundeoozyten sind ungleichmäßig begrenzt, weisen undeutlich zu erkennende Mitochondrien, dilatiertes endoplasmatisches Retikulum, sowie unterschiedlich elektronendichte Vesikel auf. Hyttel et al. (1986) konnten in den Cumuluszellen von Rinderoozyten gut entwickelte Zisternen rauen endoplasmatischen Retikulums sowie einen Golgi-Apparat feststellen. Der Zellverband des Cumulus oophorus erscheint deutlich aufgelockert und unstrukturiert. Ursache könnten beginnende degenerative Prozesse aufgrund zu langer Lagerung der Ovarien vor der Oozytengewinnung (Pederson et al., 2004) oder inadäguate Bedingungen bei der Gewinnung oder Fixierung der COCs sein.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an caninen Oozyten nach unterschiedlichen Reifungszeiten ergeben, dass nur Oozyten mit einer Kulturdauer von bis zu 24 Stunden beurteilt werden können. Sowohl bei den 72, als auch bei den 90 Stunden gereiften Oozyten, sind nur degenerierte Zellen zu finden, die, ähnlich den Studien von Sundström et al. (1985), Devine et al. (2000) und Zamboni et al. (1972), durch starke Vakuolenbildung, Verlust der Mikrovilli sowie die Auflösung von Zellorganellen charakterisiert sind.

Die Auswertung der Ergebnisse der für 24 Stunden in Kulturmedium belassenen Oozyten zeigt, dass alle diese Oozyten zytoplasmatische Reifungsvorgänge aufweisen, während die Kernreifung jedoch nur bei einer Oozyte beurteilt werden kann. Bei Rind und Mensch wurden in vitro ähnliche zytoplasmatische Reifungsvorgänge wie in vivo nachgewiesen (Hyttel et al., 1986; Kruip et al., 1983; Zamboni et al., 1972). Es zeigt sich jedoch, dass beim Hund die Literatur über ultrastrukturelle Untersuchungen von Oozyten während der Ovulation und zum Zeitpunkt der Polkörperchenbildung lückenhaft ist und zur genaueren Beurteilung der Vorgänge bei Wiederaufnahme der Meiose nicht ausreicht. Verglichen mit Studien zur Ultrastruktur von Oozyten anderer Spezies nach IVM zeigen die caninen Oozyten in meiner Untersuchung deutliche Unterschiede.

Die caninen Oozyten bilden während der IVM massiv Lipiddotterkörperchen und Mitochondrien, welche sich dabei bis auf einen schmalen Rand im Bereich der Ooplasmamembran gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilen. Eine derart massive Zubildung dieser Organellen wurde in vivo an Oozyten aus Tertiärfollikeln zu keiner Zeit beobachtet. Verglichen mit den Oozyten vor IVM sind einige der Mitochondrien deutlich länger und weisen vermehrt Cristae auf, was ebenfalls in vivo nicht nachgewiesen wurde und auf einen erhöhten Energieumsatz hinweist. Insgesamt kann nur wenig kurzes glattes endoplasmatisches Retikulum und vereinzelte Golgi-Felder nachgewiesen werden. Die sonst so häufig angetroffene intensive Komplexbildung zwischen Mitochondrien, glattem endoplasmatischem Retikulum und Lipiddotterkörperchen zeigt sich insgesamt selten und in geringerer Ausprägung. Beim Rind wird die Aufteilung des glatten endoplasmatischen Retikulums in kleine Abschnitte als eines der späten Anzeichen der Reifung sowohl in vivo

als auch in vitro angesehen (Hyttel et al., 1986; Kruip et al., 1983). Bei zwei der untersuchten caninen Oozyten konnten kortikale Granula im Bereich der Ooplasmamembran dargestellt werden, jedoch ist unklar, ob diese eventuell bereits vor der IVM anwesend waren. Die Menge und Lage entspricht den Verhältnissen, die in Tertiärfollikeln beobachtet wurden. Peripher im Ooplasma können in den Oozyten zudem eine Vielzahl an kleinen Vesikeln nachgewiesen werden, deren Menge während IVM deutlich gestiegen ist. Nach Sundström et al. (1985) ist die Bildung von einer kleineren Anzahl von Vesikeln ein physiologischer Prozess, mit dem die Zelle versucht degeneriertes Material zu verarbeiten, in großer Menge allerdings auch ein Anzeichen für die Degeneration der Zelle darstellen kann. Aufgrund dessen könnte es sich bei den caninen Oozyten somit ebenfalls um beginnende Zelldegeneration handeln. Die Ooplasmamembran bildet weniger und kürzere Mikrovilli aus, was zum einen ein Zeichen für die Retraktion während der Reifung sein kann, jedoch auch bei Degeneration beobachtet wird (Sundström et al., 1985).

Der Kern konnte nur bei einer der Oozyten eingehender beurteilt werden. Bei dieser Oozyte kann eine Verlagerung des Kernes in die Peripherie der Zelle beobachtet werden. Er ist leicht abgeflacht, weist vorwiegend Euchromatin auf und wird von einer unregelmäßig gefalteten Kernmembran umgeben und kann damit der späten Prophase zugeordnet werden. Ähnliches zeigt sich bei anderen Spezies. Bei Rind und Mensch erfolgt in vitro eine Verlagerung des Kernes in die Peripherie der Zelle, eine Abflachung sowie die Bildung von tiefen Einstülpungen der Membran. Kurz darauf kommt es zur Auflösung der Kernmembran in Vesikel, die gleichzeitig mit der Kondensation des Chromatins und der Auflösung der Nukleoli erfolgt (Hyttel et al., 1986; Zamboni et al., 1972). Letztere konnten in der Hundeoozyte nicht nachgewiesen werden.

Auffällig ist in dieser Zelle die Bildung von unterschiedlich großen Stapeln an "Annulate lamellae" sind eigenständige Zellorganellen, die vor allem im Zytoplasma von Keimzellen und sich schnell teilenden Körperzellen sowie in Tumorzellen vorkommen. Sie bestehen aus Membranstapeln mit Poren (Kessel, 1989), die eine wichtige Rolle bei der Neubildung der Kernmembran spielen (Sutovsky et al., 1998). Möglicherweise sind sie an der Migration des "germinal vesicles" (Miyazaki et al., 2005) und an der Vorkernbildung (Rawe et al., 2003; Sutovsky et al., 1998) beteiligt. Wie beim Menschen (Zamboni et al., 1972) beschrieben, konnten die "Annulate lamellae" des Hundes in meiner Untersuchung ebenfalls ausschließlich perinukleär dargestellt werden. Im Rahmen ultrastruktureller Untersuchungen bei verschiedenen Spezies nach IVM/IVF Protokollen konnten ebenfalls "Annulate lamellae" nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die Bildung der Membrankomplexe durch die Befruchtung induziert wird. Sowohl beim Rind (Sutovsky et al., 1998), bei der Seegurke (Miyazaki et al., 2005) als auch beim Menschen

(Rawe et al., 2003) wurde die Bildung der Membrankomplexe durch die Spermienpenetration stark erhöht. Im Gegensatz zum Rind (Sutovsky et al., 1998), konnten beim Menschen (Rawe et al., 2003; Zamboni et al., 1972) jedoch bereits vor der Befruchtung geringe Mengen an "Annulate lamellae" im Stadium des "germinal vesicle", sowie in der Metaphase I und II nachgewiesen werden. Beim Opossum wurden geringe Mengen sogar bereits im Primärfollikel beobachtet (Falconnier and Kress, 1992). Die Untersuchungen von Rawe et al. (2003) an nach der Befruchtung arretierten humanen Oozyten zeigen jedoch, dass große Mengen "Annulate lamellae" im Ooplasma auch ein Anzeichen für Degeneration sein können. In der Studie zeigten sich, verglichen mit den gesunden Kontrollzellen, eine große Zahl von "Annulate lamellae" im Bereich der fragmentierten Vorkerne gleichzeitig mit Defekten bei der Kernmembranbildung. Von Zamboni et al. (1972) konnten in humanen Oozyten "Annulate lamellae" ebenfalls nur in meiotisch inaktiven, degenerierten Oozyten nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass "Annulate lamellae" maßgeblich am Aufbau der Kernmembran beteiligt sind und ein Defekt in der Kernreifung zu einem Überschuss der Organellen und damit zur Bildung großer Mengen im Zytoplasma führt.

Bei der Hündin konnten bisher "Annulate lamellae" weder in Follikeln noch in ungereiften Oozyten gefunden werden, noch wurden sie in anderen ultrastrukturellen Studien über Oozyten oder Embryonen des Hundes beschrieben. Ihr verstärktes Auftreten in der Oozyte lässt darauf schließen, dass die Kernreifung nicht korrekt ablief und somit zur übermäßigen Bildung der Membranstapel führte.

#### 5.2.4 Beurteilung der Kernreifung in vitro

Es zeigte sich, dass eine Nativbeurteilung im Phasenkontrastmikroskop nur unzureichende Informationen über den Zustand caniner Oozyten liefert. Das dunkle homogene Ooplasma, sowie die meist sehr dichten Cumuluszelllagen der Oozyten erschweren die Beurteilung deutlich. Bereits in früheren Untersuchungen wurde beschrieben, dass canine Oozyten und Embryonen aufgrund des hohen Lipidgehaltes mit dieser Methode nicht ausreichend beurteilt werden können (Reynaud et al., 2005; Saint-Dizier et al., 2001; Saint-Dizier et al., 2004). Auch nach IVM zeigen sich kaum verwertbare Hinweise auf eine mögliche Kern- oder Zytoplasmareifung, was die Verwendung von verschiedenen Färbe- und Untersuchungsmethoden zur Beurteilung unerlässlich macht. Für die Untersuchung des Kernes wurden die Oozyten mit den Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumjodid und/oder Hoechst 33342 gefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Es kann stets eine deutliche Färbung einzelner Chromosomen mit Hoechst 33342 und eine deutliche Färbung des Nukleolus mit Propidiumjodid festgestellt werden.

Neben der Untersuchung von unmittelbar nach der Gewinnung fixierten Oozyten, wurde ein Teil der gewonnenen Oozyten in modifiziertem TCM-199 Medium für 24, 48 und 72 Stunden kultiviert, fixiert und dann untersucht.

In der vorliegenden Untersuchung finden sich bei direkt nach der Gewinnung fixierten Oozyten nur "germinal vesicle"- Stadien, die durch den deutlich darstellbaren runden "germinal vesicle" im Zentrum oder am Rand der Oozyte gekennzeichnet sind. Das vorhandene Chromatin kann jedoch aufgrund seines Kondensationsgrades sowie dem Vorhandensein von Nukleoli in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden, die nicht von der Einteilung der Oozyten in die Kategorien A bis C abhängig sind. So zeigen 68,9% aller ungereiften Oozyten schwach bis deutlich kondensiertes Chromatin sowie ein bis zwei Nukleoli (Kategorie A). Dagegen kann bei 5,9% stark bis sehr stark kondensiertes Chromatin nachgewiesen werden, das entweder hufeisenförmig, rund oder als Klumpen im "germinal vesicle" darstellbar ist. Nukleoli sind in diesen "germinal vesicles" nicht nachweisbar (Kategorie B). 25,2% aller Oozyten lassen sich aufgrund technischer Schwierigkeiten oder fehlender Kerndarstellung nicht auswerten. Ähnliche Beobachtungen machten Hishinuma et al. (2004) bei ungereiften Oozyten, die von Hündinnen mit Pyometra gewonnen wurden. Jin et al. (2006) teilten die Chromatinkonfigurationen in "germinal vesicle" aufgrund des Kondensationsgrades des Chromatins sogar in vier, Lee et al. (2007a) in fünf verschiedene Gruppen ein und vermuten, dass stärker kondensiertes Chromatin in weiter entwickelten Oozyten vorhanden ist, im Gegensatz zum mehr filamentös erscheinenden Chromatin in früheren Stadien. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass die DNA in frisch ovulierten caninen Oozyten um die Nukleoli organisiert ist und einen relativ starken Kondensationsgrad aufweist (Jin et al., 2006; Lee et al., 2007a; Reynaud et al., 2005). Der Anteil an der jeweiligen Gruppe ist bei der Hündin zudem vom Reproduktionsstatus abhängig, wobei die meisten Oozyten mit deutlich kondensiertem Chromatin aus follikularen Ovarien gewonnen werden konnten (Lee et al., 2007a). Wenig Aufmerksamkeit wurde in diesen Studien dem Nukleolus der Oozyte geschenkt, der sich normalerweise im Laufe der Wiederaufnahme der Meiose auflöst (Fair et al., 2001). In 6% aller caninen Oozyten ist dieser trotz bestehendem "germinal vesicle" bei gleichzeitig starker Chromatinkondensation nicht mehr nachweisbar. Von anderen Autoren werden auch unterschiedliche Kernreifestadien, von GVBD bis MII, bei frisch gewonnenen caninen Oozyten beschrieben (Bolamba et al., 1998; Hewitt and England, 1998a; Hewitt and England, 1998b; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992; Yamada et al., 1993). Sie beurteilen dies als vorzeitige Oozytenreifung, jedoch ist die Abgrenzung des "germinal vesicle" je nach Färbemethode oft nur undeutlich möglich, so dass unklar ist, ob nicht das gleiche Phänomen beschrieben wird. Es wird

vermutet, dass die vorzeitige Wiederaufnahme der Meiose mit Degenerationsvorgängen im Follikel zusammenhängt, ohne dass die Zelle dadurch Entwicklungskompetenz erhält.

Nach Beginn der In-vitro-Kultur können bereits 24 Stunden später die ersten GVBD-MI Stadien beobachtet werden, allerdings sind stets einige Oozyten vorhanden, die keine Anzeichen von Kernreifung zeigen und sich auch nach längerer Kulturzeit noch im GV-Stadium befinden. Aufgrund der insgesamt geringen Zahl untersuchter Oozyten wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Oozyten mit Anzeichen der Kernreifung weisen keinen abgrenzbaren "germinal vesicle" mehr auf, zeigen deutlich kondensiertes Chromatin, das sich entweder zentral oder peripher im Ooplasma der Oozyte zeigt sowie fehlende Nukleoli. Eine deutliche Zunahme an diesen Stadien, sowie eine Oozyte nach Polkörperchenbildung (MII) konnte jedoch erst nach 72 Stunden erreicht werden. Diese Beobachtungen stimmen mit anderen Studien grundsätzlich überein (Cui et al., 2006; De los Reyes et al., 2005; Fujii et al., 2000; Otoi et al., 2004; Yamada et al., 1993). Jedoch schwanken die Ergebnisse zwischen den einzelnen Studien beträchtlich und zeigen, dass eine "Universallösung" für eine sicher reproduzierbare Reifungsrate bis jetzt nicht gefunden wurde. Die bisher verwendeten, von der IVM anderer Tierarten abgeleiteten Kulturmedien sowie deren Zusätze, sind nur bedingt für die Kultivierung caniner Oozyten geeignet. Zusätzlich müssen die individuellen Besonderheiten einzelner Hündinnen, die unterschiedliche Oozytengewinnung und Verarbeitung sowie ihre Klassifizierung berücksichtigt werden.

# 5.2.5 Immun- und glykohistochemische Aspekte der Oozytenreifung in vitro

Mikrotubuli sind eine wichtige Komponente des Zytoskeletts der Oozyte. Sie bestehen vorwiegend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, wobei nur die Verteilung von  $\alpha$ -Tubulin in meiner Untersuchung bestimmt wurde. Beide wirken an der Chromosomenbewegung und Zellteilung mit und sind essentiell für die korrekte Fortführung der Meiose.

Bei der Hündin zeigte sich in den Untersuchungen von Jin et al. (2006) in GV-Oozyten eine Ansammlung von α-Tubulin sowohl peripher unter der Plasmamembran sowie im Kernbereich der Oozyte. Dies entspricht den Ergebnissen, die sich bei meinen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erkennen lassen. Allerdings kann diese Verteilung der Immunfluoreszenz von mir nur bei einigen der Oozyten nachgewiesen werden. Ein ähnliches Verteilungsmuster der Mikrotubuli fanden Saint-Dizier et al. (2004) in frisch ovulierten Hundeoozyten im GV-Stadium. Zudem zeigt sich in meiner Untersuchung eine gering α-Tubulin-positive Immunreaktion im Zytoplasma der Zellen des Cumulus

oophorus. Bei Oozyten nach unterschiedlichen Reifungszeiten können zunächst ähnliche Ergebnisse festgestellt werden. So kann die Ausbildung eines deutlichen Tubulinnetzwerks unter der Plasmamembran der Oozyten gleichzeitig mit beginnender Kondensation ihres Chromatins beobachtet werden. Saint-Dizier et al. (2004) konnten an in vivo gereiften Hundeoozyten mit Wiederaufnahme der Meiose ein deutliches Netzwerk an Mikrotubuli im gesamten Zytoplasma nachweisen, wobei sich α-Tubulin sternförmig im Bereich des kondensierten Chromatins ansammelte. Die für 72 Stunden in vitro gereifte Oozyte in der Metaphase II zeigt eine starke periphere ooplasmatische Immunreaktion auf α-Tubulin, sowie zusätzlich ein deutliches α-Tubulin-Netzwerk in den Polkörperchen. Um das deutlich peripher kondensierte Chromatin dieser Oozyten kann jedoch lediglich ein schwach immunpositiver Ring beobachtet werden. Letztere Beobachtung steht im Gegensatz zur Studie von Jin et al. (2006), die in MII Oozyten der Hündin nach In-vitro-Kultur Mikrotubuli in der Spindel der zweiten Reifeteilung darstellen konnten. Ursache für den negativen Ausfall der Immunreaktion in meinen Versuchen könnte sein, dass sich die zweite Spindel bei den von mir untersuchten Oozyten nicht korrekt ausgebildet hat. Von Li et al. (2006) wurde beschrieben, dass humane Oozyten nach IVM deutlich mehr Chromosomen- und Spindeldefekte aufweisen als in vivo gereifte. In einem Fallbericht über in MI pathologisch arretierten Oozyten bei der Frau konnten ebenfalls Defizite bei der Ausbildung einer korrekten Spindel nachgewiesen werden (Windt et al., 2001). In caninen Polkörperchen kann α-Tubulin von mir mittels Immunfluoreszenz deutlich dargestellt werden, was von den Ergebnissen von Jin et al. (2006) bei der Hündin wiederum abweicht. Nach meinen Beobachtungen entspricht die Verteilung in den Polkörperchen bei der Hündin eher den Verhältnissen beim Rind, bei dem das Chromatin des Polkörperchens eine kondensierte Masse bleibt, die vollständig von Mikrotubuli umgeben ist (Li et al., 2005).

Die Oozyte bildet zusammen mit dem umgebenden Follikelepithel eine Funktionseinheit, deren Zusammenwirken essentiell für die Entwicklung der Oozyte ist. Die Follikelepithelzellen sind dabei untereinander sowie mit der Oozyte über "gap junctions" verbunden, durch die kleine Moleküle wie Nährstoffe, Botenstoffe und Regulatoren in und aus den Zellen gelangen können (Luvoni and Chigioni, 2006). Sie dienen außerdem der Kontrolle des Meioseblocks, in dem die Kontakte bei Bildung des Perivitellinspaltes unterbrochen werden und so die Weiterführung der Meiose induzieren (Macchiarelli et al., 1992; Picton et al., 1998).

Die "gap junctions" sind aus Connexonen aufgebaut, die wiederum aus einzelnen Connexinen bestehen. Connexine zählen zur großen Familie der integralen Membranproteine. Ihre Expression erfolgt gewebespezifisch, wobei meist mehrere Connexine in einem Gewebe vorhanden sind (Kidder and Mhawi, 2002). Bei der Maus

konnte das Connexin 43 als eines der Haupt-Connexine im Ovar nachgewiesen werden. Es kommt ab dem Beginn der Follikulogenese vor und ist während der Follikelentwicklung ständig nachweisbar (Ackert et al., 2001). Die Vermittlung zwischen Oozyte und umgebenden Follikelepithelzellen über Connexin 43 ist dabei essentiell für das Follikelwachstum und die Oozytenreifung in vivo (Ackert et al., 2001; Gittens et al., 2005) und in vitro (Cecconi et al., 2006). Da die Cumuluszellen bei der Hündin in vivo sehr lange mit der Oozyte verbunden bleiben, wird vermutet, dass sie bei dieser Spezies sehr wichtig sind und eventuell sogar Ursache für den langen Meioseblock sein könnten (Holst and Phemister, 1971; Reynaud et al., 2005). Willingham-Rocky et al. (2007) untersuchten die Verteilung von Connexin 43 während der Follikulogenese im Hundeovar. Die Ergebnisse zeigen, dass zwar eine zyklus- sowie entwicklungsstadiumsspezifische Menge an Connexin 43 vorhanden ist, jedoch keine Unterschiede zu anderen Tierarten bestehen und Connexin 43 deshalb nicht für die Entwicklungsverzögerung beim Hund verantwortlich gemacht werden kann. Hohe Reifungsraten in vitro werden beim Rind von einer hohen Anzahl offener Kanäle begleitet (Luvoni and Chigioni, 2006). Untersuchungen an Hundeoozyten zeigen, dass nur COCs aus dem Proöstrus zahlreiche offene "gap junctions" besitzen, die für eine Dauer von 24 Stunden nach Beginn einer IVM offen bleiben (Luvoni et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte Connexin 43 in den Cumuluszellen von ungereiften und gereiften Oozyten nachgewiesen werden, jedoch lässt dies keine Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der Kanäle zu. Es scheint, als würde die Menge an Connexin 43 ab einer Reifungszeit von 24 Stunden abnehmen. Aufgrund der ultrastrukturellen Untersuchungen kann jedoch deutliche Degeneration in den Zellen des Cumulus oophorus und in keinem Fall die Bildung eines Perivitellinspaltes nachgewiesen werden, so dass es sich hierbei auch um ein Anzeichen an Degeneration handeln könnte.

Die Oozyten aller Säugetiere werden ab einer bestimmten Größe von einer dicken extrazellulären Glykoproteinschicht, der Zona pellucida, umgeben. Diese besteht aus Glykoproteinen, die eine dreidimensionale Matrix bilden. Insgesamt können meist drei verschiedene Glykoproteine (ZP1-3 bzw. ZPA-C) nachgewiesen werden, wobei ZP1 und ZP3 für die Funktionalität der Zona pellucida unbedingt notwendig sind. Die Funktion der Zona pellucida besteht in der Vermittlung der Oozyten-Cumuluszell-Interaktion, dem Schutz der sich entwickelnden Oozyten und Embryonen sowie in einer essentiellen Funktion bei der Spermienbindung und der Befruchtung der Oozyte (Wassarman et al., 1999). Bei der Hündin beginnt sich die Zona pellucida ab der Entwicklungsstufe des Primärfollikels zu bilden. Im Gegensatz zu anderen Tierarten, wie z.B. der Maus, sind bei der Hündin sowohl die Oozyte, als auch die Granulosazellen an der Bildung der Zona pellucida beteiligt (Barber et al., 2000; Blackmore et al., 2004; Heigl, 1998; Parillo et al., 2005). Bei verschiedenen Tierarten,

darunter auch bei der Hündin, wurde eine spezifische Verteilung der einzelnen Glykoproteine ZP1 bis ZP3, wie auch der anhängenden Oligosaccharidketten in der Zona pellucida nachgewiesen.

Mittels Immunfluoreszenz konnte das Zona pellucida Glykoprotein 3β (ZP3β) in den untersuchten caninen COCs und Oozyten spezifisch nachgewiesen werden. Da die gewonnenen Oozyten ausschließlich aus Tertiärfollikeln stammen, müsste die Verteilung der Fluoreszenz weitgehend der von Follikeln in diesem Entwicklungsstadium entsprechen. Deutlich ZP3β-positiv reagieren dabei das Zytoplasma der Cumuluszellen sowie deren Fortsätze durch die Zona pellucida zur Oozyte. In Untersuchungen am Hundeovar zeigt sich ebenfalls eine deutliche Immunreaktion auf ZP3β in den Cumuluszellen von Tertiärfollikeln (Heigl, 1998). Die Intensität variierte jedoch zwischen den einzelnen Cumuluszellen deutlich, was in meinen Untersuchungen nicht der Fall ist. Unterschiede zu dieser Studie zeigen sich auch im Färbeverhalten des Ooplasmas. Während von Heigl (1998) keine positive Immunreaktion im Ooplasma in Tertiärfollikeln beobachtet wurde, konnte ZP3β von mir in den isolierten Oozyten vor allem im Bereich der Plasmamembran der Oozyte dargestellt werden. So zeigt sich insbesondere in dem Bereich, in dem die Cumuluszellfortsätze direkt an die Ooplasmamembran grenzen eine deutliche Ansammlung ZP3β-positiven Materials, was auf einen kooperativen Prozess zwischen Oozyte und Cumuluszellen schließen lässt. Es ist auch möglich, dass von Cumuluszellen gebildetes Zona-Material an diesen Stellen über Zell-Zell-Verbindungen in die Oozyte gerät. Für diese Theorie spricht, dass Blackmore et al. (2004) ZPC-Material bei der Hündin nicht in Oozyten, dafür aber deutlich in den Granulosazellen nachweisen konnten. In meinen Untersuchungen zeigt die Zona pellucida selber nur eine sehr schwache oder gar keine Fluoreszenz, was den Ergebnissen von Heigl (1998) widerspricht, die eine gleichmäßig intensive Immunreaktion der Zona pellucida bei Verwendung des ZP3β-Antikörpers die Zona pellucida in allen Follikelstadien ergaben. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass sich die verwendete Methodik der Studien stark unterscheidet, was Ursache für diese Differenzen sein könnte. Nach unterschiedlichen Zeiten der In-vitro-Kultur kann kaum eine Veränderung der Immunreaktion in den COCs beobachtet werden. Lediglich die Fortsätze zur Oozyte zeigen geringere Fluoreszenz. Im Ooplasma scheint sich die Immunreaktion stärker verteilt und zeigt nicht mehr die deutliche Ansammlung im Randbereich. Eventuell kann das Zona pellucida-Material aufgrund degenerativer Störungen der Verbindung zwischen Cumuluszellen und Oozyte nicht mehr ausgetauscht werden und zeigt deshalb diese Veränderungen.

Die Verteilung der Kohlenhydratanteile der Glykoproteine in caninen Follikeln wurde mittels verschiedener Lektine bereits mehrfach untersucht. Neben N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin und L-Fucose gehört auch die D-Mannose zu den Zuckern, aus denen

die Oligosaccharidketten in der Zona pellucida des Hundes aufgebaut sind (Parillo et al., 2005). Weitere Untersuchungen zeigen, dass diese Zuckerketten bei der Hündin häufig sulfatiert sind, sowie reichlich Sialinsäurereste tragen welche essentiell für die Funktionalität der Zona pellucida sind (Parillo and Verini-Supplizi, 1999).

In den lektinhistochemischen Untersuchungen führt die Inkubation der Oozyten mit dem Lektin WGA-FITC meist zu einer deutlichen gleichmäßigen Fluoreszenz der gesamten Zona pellucida. Dies weist auf eine gleichmäßige Verteilung von N-Acetylglukosamin- und/oder Sialinsäureresten an der Zona pellucida von caninen Oozyten hin. In der Literatur gibt es zur Färbung von caninen Follikeln mit WGA unterschiedliche Ergebnisse. Verschiedene Studien am Hundeovar belegen, dass WGA nur bis zum frühen Sekundärfollikel zu einer über die gesamte Zona pellucida gleichmäßig verteilten Reaktion führt, um, mit weiterer Follikelentwicklung, einen deutlichen äußeren und inneren positiv-gefärbten Ring innerhalb der Zona pellucida zu bilden (Heigl, 1998; Parillo and Verini-Supplizi, 1999; Parillo et al., 2005). Von Parillo et al. (2005) konnten mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie eine Anhäufung von WGA im äußeren Bereich der Zona pellucida im Tertiärfollikel festgestellt werden. Diese Beobachtung ähnelt der von mir gemachten, dass die Fluoreszenz bei manchen Oozyten zur Innenseite hin schwächer wird. Eventuell beruht dies auf der Reifestufe des Follikels, aus dem die Oozyten gewonnen wurden, da in reiferen Follikeln eine Kompaktierung der Zona pellucida im inneren Bereich festzustellen ist und sich in diesem Bereich auch die biochemischen Eigenschaften (weniger Sulfatgruppen) unterscheiden (Tesoriero, 1984). Im Gegensatz dazu beschreiben Blackmore et al. (2004) ein ganz anderes Bindungsverhalten von WGA am Hundeovar. Die Zona pellucida zeigte in ihren Untersuchungen keine positive Reaktion, dafür konnte in den Granulosazellen und im Ooplasma eine Bindung von WGA nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Parillo und Verini-Supplizi (1999a) steht. In meinen Untersuchungen konnte ich lediglich eine geringe Fluoreszenz im Ooplasma, keine jedoch in den Cumuluszellen, darstellen. Von Parillo et al. (2005) wurden zudem WGA- positive Vesikel im Ooplasma und in den Cumuluszellen gefunden, die sich in den von mir untersuchten COCs ebenfalls nicht gefunden werden. Die Unterschiede zu anderen Studien beruhen wahrscheinlich auf unterschiedlichen Fixierungsmethoden, da das Bindungsverhalten der Lektine von einer Vielzahl Faktoren, wie z.B. dem pH-Wert, abhängig ist.

Parillo und Verini-Supplizi (1999a) war es nicht möglich eine positive Reaktion mit dem Lektin SBA ohne Vorbehandlung mit Neuraminidase nachzuweisen, da SBA an N-Acetylgalaktosaminreste bindet, diese bei der Hündin aber meist als Sialinsäure-D-GalNAc und in geringerer Menge als terminales Sulpho-D-GalNAc vorliegen und somit ohne Vorbehandlung nicht zugänglich sind. Eine Vorbehandlung der Oozyten, wie in dieser und

anderer Studien beschrieben, wurde von mir nicht durchgeführt, es zeigte sich allerdings trotzdem eine deutliche spezifische Bindung von SBA an die Zona pellucida der untersuchten Oozyten.

Verschiedene Untersuchungen mit SBA an Hundeovarien zeigen, dass N-Acetylgalaktosaminreste bis zu frühen Sekundärfollikeln einheitlich in der Zona pellucida vorhanden sind. Ab dieser Entwicklungsstufe erfolgt eine Regionalisierung des Zuckers an den inneren (schwach) und äußeren Rand (deutlich) der Zona pellucida (Parillo and Verini-Supplizi, 1999; Parillo et al., 2005). Auch in meiner Studie konnte ich eine deutliche Schichtung der Zona pellucida nachweisen, die jedoch anhand der Intensität der Fluoreszenz in vier verschiedene Schichten aufgeteilt werden kann. So findet sich eine deutlich gefärbte innerste Schicht direkt an der Plasmamembran der Oozyte, eine schwächer gefärbte darauf folgende, dann eine fast negative Schicht und wiederum, nach außen hin, eine schwächer positiv reagierender Bereich. Die innerste Schicht zeigt dabei stets die intensivste Bindung an SBA, was im Gegensatz zu den oben genannten Untersuchungen steht (Parillo and Verini-Supplizi, 1999; Parillo et al., 2005). Die unterschiedliche regionale Verteilung der Zucker deutet dabei auf unterschiedliche Funktionen, zum Beispiel in der Spermienbindung, hin (Parillo and Verini-Supplizi, 1999). Eine geringe Bindung nach Inkubation mit SBA kann im Zytoplasma der Cumuluszellen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Parillo et al. (2005) können sowohl im Ooplasma als auch im Zytoplasma der Cumuluszellen bei einigen der untersuchten Oozyten deutlich SBA-positive Vesikel nachgewiesen werden. Parillo et al. (2005) sehen diese als Zwischenform für den Transport von Zona-Material an, und beurteilen diese als Zeichen für die Beteiligung beider Zelltypen an der Zona pellucida-Bildung.

Weder nach Inkubation mit WGA noch mit SBA kann eine Veränderung in der Verteilung bei caninen Oozyten nach IVM nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit der Untersuchung von Verini-Supplizi et al. (1996), in der bei Rinderoozyten im Bindungsmuster von WGA und SBA vor und nach verschiedenen IVM-Zeiten keine Veränderung festgestellt werden konnte. Lediglich bei SBA scheint in meiner Untersuchung nach IVM eine deutlichere Fluoreszenz in den Cumuluszellen zu zeigen, was eventuell darauf hindeutet, dass das in den Cumuluszellen und in der Oozyte gebildete Zona-Material aufgrund degenerativer Prozesse nicht mehr abgegeben werden kann und sich deshalb in den Zellen ansammelt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, dass sich die Follikelreifung und die Entwicklung der Oozyten im Ovar der Hündin in den untersuchten Aspekten nicht wesentlich von der anderer Tierarten unterscheidet. In vitro konnten unter den verwendeten Kulturbedingungen an isolierten caninen Oozyten nur unzureichende Kernund Zytoplasmareifungsvorgänge beobachtet werden. Zudem zeigten sich ab einer Kulturzeit

von 24 Stunden vermehrt Anzeichen degenerativer Veränderungen an Cumulus oophorus und Ooplasma der COCs, was darauf hindeutet, dass das verwendete Kulturmedium die Bedürfnisse für eine erfolgreiche Reifung nicht ausreichend unterstützt.

# 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Wachstumsvorgänge der Follikel und Oozyten im Ovar der Hündin anhand morphologischer Kriterien licht- und elektronenmikroskopisch darzustellen sowie canine Oozyten vor und nach In-vitro-Reifung zu charakterisieren.

Für alle Untersuchungen wurden Ovarien von gesunden Hündinnen verschiedenen Alters (4 Monate bis 12,5 Jahren) und Rassen verwendet, die einer elektiven Ovariohysterektomie unterzogen worden waren. Die Ovarien von 15 Hündinnen wurden für immunhistochemische Untersuchungen in Bouin'scher Lösung oder in Paraformaldehyd (4%), sowie von drei Hündinnen für die elektronenmikroskopische Auswertung in Karnovsky-Lösung, fixiert. Von 61 weiteren Hündinnen wurden COCs und Oozyten durch Slicing der Ovarien gewonnen und sowohl vor als auch nach In-vitro-Kultur (24 bis 72 Stunden) in modifiziertem TCM-199 entweder nativ beurteilt oder in Paraformaldehyd (4%) fixiert und mittels Kernfärbung (Propidiumjodid/Hoechst 33342), Immunfluoreszenz oder Glykohistochemie untersucht. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Färbungen erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Oozyten und COCs nach 0, 24, 72 und 90 Stunden In-vitro-Reifung wurden zusätzlich elektronenmikroskopisch ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Aufbau des Ovars bei der Hündin nach licht- und elektronenmikroskopischen Aspekten weitgehend dem von anderen Haussäugetieren entspricht. Es zeigen sich Primordial-, Primär-, Sekundär- sowie Tertiärfollikel. Der Durchmesser der Oozyten und des "germinal vesicle" sowie die Dicke der Zona pellucida nehmen während der Entwicklung deutlich zu. Ultrastrukturell sind die wachsenden Oozyten durch eine starke Zunahme an Zellorganellen, insbesondere an Mitochondrien, glattem endoplasmatischem Retikulum sowie Lipiddotterkörperchen, gekennzeichnet. Anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 konnte Zellteilung ab der Stufe des Primärfollikels im Follikelepithel regelmäßig nachgewiesen werden. Die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen am Ovar ergaben, dass die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  sowie die MMPs - 1, -2, und -14 wie auch TIMP-2 ein für die Hündin spezifisches Verteilungsmuster zeigen.

Canine Oozyten ließen sich leicht durch Slicing der Ovarien gewinnen. Ein Einfluss auf die gewinnbare Oozytenanzahl zeigte sich dabei insbesondere beim Alter der Hündin, nicht jedoch bei der Rasse, dem Reproduktionsstatus oder der Transportzeit der Ovarien zwischen Entnahme der Organe in der Tierarztpraxis und Oozytengewinnung im Labor. 48% der so gewonnenen caninen Oozyten wiesen ein dunkles homogenes Ooplasma und mehrere dichte Cumuluszelllagen auf. Nach In-vitro-Reifung konnten phasenkontrastmikroskopisch Veränderungen wie Vakuolenbildung sowie der Verlust der

Cumuluszellen bei den meisten COCs beobachtet werden. Unmittelbar nach der Gewinnung befanden sich die Kerne aller Oozyten im "germinal vesicle"- Stadium, das Chromatin wies jedoch einen unterschiedlichen starken Kondensationsgrad auf. Erste Anzeichen der Wiederaufnahme der Meiose traten nach 24 Stunden auf, bei einer Oozyte wurde nach 72 Stunden Kultur in der Metaphase II beobachtet. Elektronenmikroskopisch zeigten sich bis zu einer Kulturdauer von 24 Stunden sowohl Reifungsvorgänge (Kern und Zytoplasma) als auch degenerative Prozesse, die besonders nach längeren Reifungszeiten deutlich nachzuweisen waren. Mittels Nachweis von ZP3β, α-Tubulin und Connexin 43, sowie der Bindungsstellen der Lektine WGA und SBA in caninen COCs und Oozyten konnten charakteristische Veränderungen vor und nach In-vitro-Reifung gezeigt werden.

# 7 Summary

#### Studies on maturation of canine oocytes

The objective of this work was to examine follicular and oocyte growth in canine ovaries with light and electron microscopic techniques and to characterize canine oocytes during in vitro maturation.

Ovaries of healthy bitches of different ages (4 months to 12.5 years) and breeds were used, which had undergone elective ovariohysterectomy at local veterinary clinics. The ovaries of 15 bitches were fixed in Bouin's solution or paraformaldehyde (4%) for immunohistochemical studies and of three bitches in Karnovsky's solution for electron microscopic evaluation. COCs and oocytes were recovered from 61 other bitches by slicing the ovaries. They were then examined before and after in vitro maturation (24 to 72 hours) in modified TCM-199 either by native evaluation or after fixation in paraformaldehyde (4%) and nuclear staining (propidium iodide/Hoechst 33342), immunofluorescence or glycohistochemistry. The evaluation of the fluorescence microscopic staining was performed by confocal laser scanning microscopy. Oocytes and COCs after 0, 24, 72 and 90 hours of in vitro maturation were also subjected to electron microscopic examination.

The morphology of the canine ovary in light and electron microscopic aspects is comparable to that of other domestic animals. Primordial, primary, secondary and tertiary follicles were regularly seen. The diameter of the oocytes and of the germinal vesicle, as well as the thickness of the zona pellucida, clearly increases during oocyte development. Growing canine oocytes are characterized ultrastructurally by rapid growth in the number of cellular organelles, particularly mitochondria, smooth endoplasmatic reticulum and lipid droplets. Mitotic division starting at the primary follicle stage can be regularly observed by immunostaining with the proliferation marker Ki-67. Further immunohistochemical studies on ovaries indicate that estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , as well as MMP-1, -2, -14 and TIMP-2, show a specific distribution in bitches.

Canine oocytes could easily be isolated by slicing the ovaries. The number of recovered oocytes was clearly influenced by the age of the donor bitch but not by the breed, the reproductive status or the transportation time between time of surgery in the veterinary clinic and the recovery of the oocytes in the laboratory. 48% of all isolated oocytes had a dark homogenous ooplasm and multiple dense layers of cumulus cells. After in vitro maturation, morphological changes like the formation of vesicles and the loss of cumulus cells could be observed in most of the COCs. Immediately after recovery, the nuclei of all oocytes were at

the germinal vesicle stage, although the chromatin showed different degrees of condensation. While first signs of the resumption of meiosis were seen after 24 hours of culture, only one oocyte in metaphase II could be seen after 72 hours. Nuclear and cytoplasmatic maturation could be detected by electron microscopy for up to 24 hours of in vitro culture, as well as signs of degeneration, which were even more prominent after longer culture periods. The immunoreaction of ZP3 $\beta$ ,  $\alpha$ -Tubulin and Connexin 43 and the binding sites of the lectins WGA and SBA showed characteristic changes in canine oocytes and COCs before and after in vitro maturation.

### 8 Literaturübersicht

- Ackert C, Gittens J, O'Brien M, Eppig J, Kidder G. Intercellular communication via Connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. Developmental Biology 2001; 233: 258-270.
- Anderson, Simpson. The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). Los Altos, California: Geron-X, 1973.
- Anderson D. The rate of passage of the mammalian ovum through various portions of the Fallobian tube. American Journal of Physiology 1927; 82: 557-569.
- Anderson R, Copeland T, Schöler H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. Mechanisms of Development 2000; 91: 61-68.
- Badinand F, Fontbonne A, Maurel M, Siliart B. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of estradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1993; 47: 63-67.
- Bagavandoss P. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary. Journal of Endocrinology 1998; 158: 221-228.
- Bakke L, Dow M, Cassar C, Peters M, Pursley J, Smith G. Effect of the preovulatory gonadotropin surge on matrix metalloproteinase (MMP)-14, MMP-2, and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. Biology of Reproduction 2002; 66: 1627-1634.
- Bakke L, Li Q, Cassar C, Dow M, Pursley J, Smith G. Gonadotropin surge-induced differential upregulation of collagenase-1 (MMP-1) and collagenase-3 (MMP-13) mRNA and protein in bovine preovulatory follicles. Biology of Reproduction 2004; 71: 605-612.
- Bao B, Kumar N, Karp R, Garverick H, Sundaram K. Estrogen receptor-β expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles. Biology of Reproduction 2000; 63: 1747-1755.
- Barber M, Lee S, Steffens W, Ard M, Fayrer-Hosken R. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. Theriogenology 2000; 55: 1705-1717.

- Barboni B, Mattioli M, Gioia L, Turriani M, Capacchietti G, Berardinelli P, Bernabò N.

  Preovulatory rise of NGF in ovine follicular fluid: possible involvement in the control of oocyte maturation. Microscopy Research and Technique 2002; 59: 516-521.
- Bernardo M, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. Biochemical Journal 2003; 374: 739-745.
- Blackmore D, Baillie L, Holt J, Dierkx L, Aitken R, McLaughlin E. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. Biology of Reproduction 2004; 71: 661-668.
- Bodart J-F, Baert F, Sellier C, Duesbery N, Flament S, Vilain J-P. Differential roles of p39mos-Xp42MPK1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. Developmental Biology 2005; 283: 373-383.
- Bogliolo L, Zedda M, Ledda S, Leoni G, Naitana S, Pau S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. Reproduction Nutrition Development 2002; 42: 265-273.
- Bolamba D, Borden-Russ K, Durrant B. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology 1998; 49: 933-942.
- Bolamba D, Russ K, Harper S, Sandler J, Durrant B. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro.

  Theriogenology 2006; 65: 1037-47.
- Bolamba D, Russ K, Olson M, Sandler J, Durrant B. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. Theriogenology 2002; 58: 1689-1703.
- Britt K, Saunders P, McPherson S, Misso M, Simpson E, Findlay J. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. Biology of Reproduction 2004; 71: 1712-1723.
- Bukovsky A, Keenan J, Candle M, Wimalasena J, Upadhyaya N, Van Meter S.

  Immunhistochemical studies of the adult human ovary: possible contribution of immun and epithelial factors to folliculogenesis. American Journal of Reproductive Immunology 1995; 33: 323-340.

- Burns K, Yan C, Kumar T, Matzuk M. Analysis of ovarian gene expression in folliclestimulating hormone beta knockout mice. Endocrinology 2001; 142: 2742-2751.
- Cecconi S, Rossi G, Palmerini M. Mouse oocyte differentiation during antral follicle development. Microscopy Research and Technique 2006; 69: 408-414.
- Chen J, Delannoy M, Cooke C, Yager J. Mitochondrial localization of ERα and ERβ in human MCF7 cells. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism 2004; 286: E1011-E1022.
- Chuva de Sousa Lopes S, Roelen B, Monteiro R, Emmens R, Lin H, Li E, Lawson K, Mummery C. BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes and Development 2004; 18: 1838-1849.
- Concannon PW, Hansel W, Visek W. The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and Progesterone. Biology of Reproduction 1975; 13: 112-121.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1989; 39: 3-25.
- Couse J, Hewitt S, Korach K. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in reproductive tissues. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2000; 74: 287-296.
- Cui X-S, Jin Y-X, Shen X-H, Lee J, Lee H-S, Yin X-J, Kong I-K, N-H K. Epidermal growth factor enhaces meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA.

  Theriogenology 2006; 66: 267-274.
- Curry T, Osteen K. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. Endocrine Reviews 2003; 24: 428-465.
- Curry T, Song L, Wheeler S. Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation, and early luteal formation in the rat. Biology of Reproduction 2001; 65: 855-865.
- D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Les Dees W, Ojeda S. Intrinsic neurons in the mammalian ovary. Microscopy Research and Technique 2002; 59: 484-489.

- De Carvalho Papa P. Darstellung von Estradiol-17b- und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus. Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz. Gießen: Justus-Liebig-Universität, 2001.
- De Cock H, Ducatelle R, Logghe J. Immunhistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract. Domestic Animal Endocrinology 1997; 14: 133-147.
- De Gier J, Kooistra H, Djajadiningrat-Laanen S, Dieleman S, Okkens A. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. Theriogenology 2006; 65: 1346-1359.
- De los Reyes M, de Lange J, Miranda P, Palominos J, Barros C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. Theriogenology 2005; 64: 1-11.
- Devine P, Payne C, McCuskey M, Hoyer P. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. Biology of Reproduction 2000; 63: 1245-1252.
- Dissen G, Romero C, Paredes A, Ojeda S. Neurotrophic control of ovarian development.

  Microscopy Research and Technique 2002; 59: 509-515.
- Drummond A. TGFbeta signalling in the development of ovarian function. Cell Tissue Research 2005; 322: 107-115.
- Drummond A. The role of steroids in follicular growth. Reproductive Biology and Endocrinology 2006; 4:16: doi:10.1186/1477-7827-4-16.
- Drummond A, Findlay J. The role of estrogen in folliculogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology 1999; 151: 57-64.
- Durlinger A, Gruijters M, Kramer P, Karels B, Ingraham H, Nachtigal M, Uilenbroek J, Grootegoed J, Themmen A. Anti-Müllerian Hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology 2002; 143: 1076-1084.
- Durrant B, Pratt N, Russ K, Bolamba D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology 1998; 49: 917-932.

- El Mouatassim S, Guérin P, Ménézo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during final stages of maturation. Molecular Human Reproduction 1999; 5: 720-725.
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-A. Human estrogen receptor β-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1997; 82: 4258-4265.
- Eppig J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction 2001; 122: 829-838.
- Evans H, Cole H. An introduction to the study of the oestrous cycle in the dog. "Memoires of the University of California". Vol 9 No. 2. Berkeley, 1931.
- Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. Molecular Reproduction and Development 1996; 43: 503-512.
- Fair T, Hyttel P, Lonergan P, Boland M. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization. Biology of Reproduction 2001; 64: 1516-1525.
- Falconnier C, Kress A. Ultrastructural aspects of oocyte growth in the marsupial Monodelphis domestica (grey short-tailed opossum). Journal of Anatomy 1992; 181: 481-498.
- Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Stein H, Schwarting R, Riccardi C, Manocchio I, Pileri S, Pelicci P-G, Lanfrancone L. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1989; 37: 1471-1478.
- Fan H-Y, Huo L-J, Meng X-Q, Zhong Z-S, Hou Y, Chen D-Y, Sun Q. Involvement of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. Biology of Reproduction 2003; 69: 1552-1564.
- Farstad W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. Animal Reproduction Science 2000; 60-61: 375-387.

- Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benlli R, Santi L, Noonan D, Albini A. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Regulation and biological activities. Clinical and Experimental Metastasis 2000; 18: 111-120.
- Feldman E, Nelson R. Canine and feline endocrinology and reproduction, 1996.
- Ferrell J, Wu M, Gerhart J, Martin G. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in Xenopus oocytes and eggs.

  Molecular and Cellular Biology 1991; 11: 1965-1971.
- Findlay J. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. Biology of Reproduction 1993; 48: 15-23.
- Findlay J, Drummond A, Dyson M, Baillie L, Robertson D, Ethier F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. Molecular and Cellular Endocrinology 2002; 191: 35-43.
- Fitzpatrick S, Funkhouser J, Sindoni D, Stevis P, Deecher D, Bapat A, Merchenthaler I, Frail D. Expression of estrogen receptor-β protein in rodent ovary. Endocrinology 1999; 140: 2581-2591.
- Freeman B. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. Reproduction 2003; 125: 635-643.
- Frewein J, Vollmerhaus B. Anatomie von Hund und Katze. Berlin: Blackwell Wissenschaftsverlag, 1994.
- Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. Journal of Veterinary Medical Science 2000; 62: 305-307.
- Funayama Y, Sasano H, Suzuki T, Tamura M, Fukaya T, Yajima A. Cell turnover in normal cycling human ovary. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1996; 81: 828-834.
- Gabrielsen A, Bhatnager P, Peterson K, Lindenberg S. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2000; 17: 323-328.

- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cellular proliferation.

  International Journal of Cancer 1983; 31: 13-20.
- Gittens J, Barr K, Vanderhyden B, Kidder G. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. Journal of Cell Science 2005; 118: 113-122.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J-M, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA sequence, expression and homology to v-*erb*-A. Nature 1986; 320: 134-139.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human Reproduction Update 2001; 7: 175-189.
- Guichon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. EMBO 1991; 10: 3851-3859.
- Guraya S. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. Journal of Experimental Zoology 1965; 160: 123-136.
- Haeseleer M, Van Poucke M, Van den Broeck W. Cell-specific localization of oestrogen receptor  $\beta$  (ESR2) mRNA within various bovine ovarian cell types using In situ Hybridization. Anatomia, Histologia, Embryologia 2005; 34: 265-172.
- Hägglund A-C, Ny A, Leonardsson G, Ny T. Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. Endocrinology 1999; 140: 4351-4358.
- Hatoya S, Sugiyama R, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Inaba T. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. Theriogenology 2006; 66: 1083-1090.
- Hatoya S, Torii R, Kumagai D, Sugiura K, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Inaba T. Expression of estrogen receptor alpha and beta genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. Neuroscience Letters 2003; 347: 131-135.

- Hayer P, Günzel-Apel A-R, Lüerssen D, Hoppen H-O. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1993; 47: 93-100.
- Heigl M. Zytochemische, lektinhistochemische und immunzytochemische Untersuchungen am Ovar der Hündin (Canis familiaris). München: Ludwig-Maximilians-Universität, 1998.
- Hewitt D, England G. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1997; 51: 83-91.
- Hewitt D, England G. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. Theriogenology 1998a; 49: 957-966.
- Hewitt D, England G. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. Veterinary Record 1998b; 143: 590-591.
- Hewitt D, England G. Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. Veterinary Record 1999a; 144: 237-239.
- Hewitt D, England G. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. Animal Reproduction Science 1999b; 55: 63-75.
- Hewitt D, Watson P, England G. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology 1998; 49: 1083-1101.
- Hishinuma M, Minami S, Okamoto Y, Miyatake K, Sekine J. Recovery, morphological quality, and in vitro maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra.

  Theriogenology 2004; 62: 1652-1662.
- Hoffmann B, Büsges F, Engel E, Kowaleski M, Papa P. Regulation of Corpus Luteumfunction in the bitch. Reproduction of Domestic Animals 2004; 39: 232-240.
- Holst P, Phemister R. The prenatal development of the dog: pre-implantation events. Biology of Reproduction 1971; 5: 194-206.
- Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. Biology of Reproduction 1991; 45: 547-552.

- Huntriss J, Gosden R, Hinkins M, Oliver B, Miller D, Rutherford A, Picton H. Isolation, characterization and expression of the human factor In the germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. Molecular Human Reproduction 2002; 8: 1087-1095.
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1989; 38: 35-47.
- Hyttel P, Xu K, Smith S, Greve T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. Journal of Reproduction and Fertility 1986; 78: 615-625.
- Irving-Rodgers H, Rodgers R. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. Cell Tissue Research 2005; 322: 89-98.
- Jang G, Kim M, Oh H, Hossein M, Fibrianto Y, Hong S, Park J, Kim J, Kim H, Kang S, Kim D, Lee B. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer.

  Theriogenology 2006; doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.11.006.
- Jin Y-X, Lee H-S, Yin X-J, Cui X-S, Kong I-K, N-H K. Chromatin, microtubule and microfilament configurations in the canine oocyte. Reproduction, Fertility and Development 2006; 18: 849-856.
- Jo M, Thomas L, Wheeler S, Curry T. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP)associated MMP-2 activation increases in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. Biology of Reproduction 2004; 70: 1024-1032.
- Josefsberg L-Y, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. Biology of Reproduction 2003; 68: 1282-1290.
- Kessel R. The annulate lamellae-from obscurity to spotlight. Electron Microscopy Reviews 1989; 2: 257-348.
- Kidder G, Mhawi A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. Reproduction 2002; 123: 613-620.

- Kim M, Fibrianto Y, Oh H, Jang G, Kim H, Lee K, Kang S, Lee B, Hwang W. Effects of estradiol-17β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. Theriogenology 2005; 63: 1342-1353.
- Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. The Journal of Biological Chemistry 1996; 271: 1544-1550.
- Kooistra H, Okkens A. Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 2001a; 57: 11-14.
- Kooistra H, Okkens A. Secretion of prolactin and growth hormone in relation to ovarian activity in the dog. Reproduction of Domestic Animals 2001b; 36: 115-119.
- Kooistra H, Okkens A, Bevers M, Popp-Snijders C, van Haaften B, Dieleman S, Schoemaker J. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in Beagle bitches. Biology of Reproduction 1999; 60: 65-71.
- Krogenaes A, Nagyova E, Farstad W, Hafne A. In vitro maturation of blue fox oocytes and cAMP production in oocyte-cumulus cell complexes (Abstract). Theriogenology 1993; 39: 250.
- Kruip T, Cran D, van Beneden T, Dieleman S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. Gamete Research 1983; 8: 29-47.
- Kuiper G, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. Cloning of novel receptor expressed in rat prosrate and ovary. Proceedings of the Natural Acadamy of Science USA 1996; 93: 5925-5930.
- Kumar T. What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? Reproduction 2005; 130: 293-302.
- Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. FEBS 08641 1990; 268: 386-393.
- Lawson K, Dunn N, Roelen B, Zeinstra L, Davis A, Wright C, Korving J, Hogan B. BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes and Development 1999; 13: 424-436.

- Lee H, Yin X, Jin Y, Kim N, Cho S, Bae I, Kong I. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. Animal Reproduction Science 2007a; doi:10.1016/j.anireprosci.2006.12.016.
- Lee H, Yin X-J, Kong I-K. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. Theriogenology 2006; 66: 1468-1470.
- Lee S, Kim M, SH K, Kim B, Yoo D, Park Y, Park Y, Ha J, Ryoo Z. Effect of conditioned medium of mouse embryonic fibroblasts produced from EC-SOD transgenic mice in nuclear maturation of canine oocytes in vitro. Animal Reproduction Science 2007b; 99: 106-116.
- Lefebvre C, Terret M, Djiane A, Rassinier P, Maro B, Verlhac M-H. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. The Journal of Cell Biology 2002; 157: 603-613.
- Li G-P, Liu Y, Bunch T, White K, Aston K. Asymmetric division if spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. Molecular Reproduction and Development 2005; 71: 220-226.
- Li M, DePaolo L, Ford J. Expression of Follistatin and Inhibin/Activin subunit genes in porcine follicles. Biology of Reproduction 1997; 57: 112-118.
- Li Y, Feng H-L, Cao Y-J, Zheng G-J, Yang Y, Mullen S, Critser J, Chen Z-J. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. Fertility and Sterility 2006; 85: 827-832.
- Liang C-G, Huo L-J, Zhong Z-S, Chen D-Y, Schatten H, Sun Q. Cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. Endocrinology 2005; 146: 4437-4444.
- Liang L, Soyal S, Dean J. FIG $\alpha$ , a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zoma pellucida genes. Development 1997; 124: 4939-4947.
- Liu K, Wahlberg P, Ny T. Coordinated and cell-specific regulation of membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT-MMP) and its substrate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation. Endocrinology 1998a; 139: 4735-4738.

- Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. Endocrinology 1998b; 139: 2342-2347.
- Lucci C, Silva R, Carvalho C, Figueiredo R, Bao N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. Small Ruminant Research 2001; 41: 61-69.
- Luvoni G, Chigioni S. Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. Theriogenology 2006; 66: 1471-1475.
- Luvoni G, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. Reproduction of Domestic Animals 2003; 38: 410-414.
- Luvoni G, Luciano A, Modina S, Gandolfi F. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 2001; 57: 141-146.
- Macchiarelli G, Vizza E, Nottola S, Familiari G, Motta P. Cellular and microvascular changes of the ovarian follicle during folliculogenesis: A scanning electron microscopic study.

  Archives of Histology and Cytology Supplement 1992; 55: 191-204.
- Marangos P, Carroll J. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. Reproduction 2004; 128: 153-162.
- McDougall K, Hay M, Goodrow K, Gartley C, King W. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1997; 51: 25-31.
- McGaughey R, Racowsky C, Rider V, Baldwin K, DeMarais A, Webster S. Ultrastructural correlates of meiotic maturation in mammalian oocytes. Journal of Electron Microscopy Technique 1990; 16: 257-280.
- Meinecke B. Endokrinologie. Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke Verlag, 2000.
- Miller J, Toft D. Characterization and physiological variation of estrogen receptors in rabbit corpora lutea throughout pregnancy and pseudopragnancy: the effect of hysterectomy and sustained estradiol treatment. Biology of Reproduction 1983; 29: 620-629.

- Miyazaki A, Kato K, Nemoto S. Role of microtubules and centrosomes in the eccentric relocation of the germinal vesicle upon meiosis reinitiation in sea-cucumber oocytes.

  Developmental Biology 2005; 280: 237-247.
- Mosimann W, Kohler T. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey, 1990.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ERβ: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Letters 1996; 392: 49-53.
- Nickel, Schummer, Seiferle. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band 2 Eingeweide. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey, 2004.
- Nickson D, Boyd J, Eckersall P, Ferguson J, Harvey M, Renton J. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1993; 47: 231-240.
- Nili H, Mesbah F, Kafi M, Nasr Esfahani M. Light and transmission electron microscopy of immature camelus dromedarius oocyte. Anatomia, Histologia, Embryologia 2004; 33: 196-199.
- Ny T, Wahlberg P, Brändström I. Matrix remodeling in the ovary: Regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. Molecular and Cellular Endocrinology 2002; 187: 29-38.
- Oh H, Fibrianto Y, Kim H, Jang G, Hossein M, Kim H, Kang S, Lee B, Hwang W. Effects of canine serum collected from dogs at different estrous cycle stages on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. Zygote 2005; 13: 227-232.
- Ohashi S, Naito K, Sugiura K, Iwamori N, Goto S, Naruoka H, Tojo H. Analyses of mitogenactivated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. Biology of Reproduction 2003; 68: 604-609.
- Okamura H, Katabuchi H. Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis. International Review of Cytology 2005; 242: 1-54.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. Reproduction Fertility Development 1999; 11: 387-390.

- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. Theriogenology 2000a; 54: 535-542.
- Otoi T, Murakami M, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Une S, Suzuki T. Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. Veterinary Record 2000b; 146: 52-53.
- Otoi T, Ooka A, Murakami M, Kurniani N, Suzuki T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycle.

  Reproduction, Fertility and Development 2001; 13: 151-155.
- Otoi T, Shimizu R, Naoi H, Wongsrikeao P, Agung B, Taniguchi M. Meiotic competence of canine oocytes embedded in collagen gel. Reproduction of Domestic Animals 2006; 41: 17-21.
- Otoi T, Shin T, Kraemer D, Westhusin M. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. Reproduction Nutrition Development 2004; 44: 631-637.
- Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer D, Westhusin M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. Reproduction 2002; 124: 775-781.
- Otsuka F, Moore R, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. Biochemical and Biophysical Research Communications 2001; 289: 961-966.
- Parillo F, Verini-Supplizi A. Glycohistochemical investigation of canine and feline zonae pellucidae of preantral and antral oocytes. Acta Histochemica 1999; 101: 127-146.
- Parillo F, Zelli R, Verini-Supplizi A, Fagioli O, Gargiulo A. Topographical localisation of glucidic residues and their variations in the canine zona pellucida during folliculogenesis. Journal of Molecular Histology 2005; 36: 131-137.
- Pederson H, Watson E, Telfer E. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. Theriogenology 2004; 62: 468-480.
- Pelletier C, Keefe D, Trimarchi J. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. Fertility and Sterility 2004; 81 (Suppl 1): 850-856.

- Pesce M, Di Carlo A, De Felici M. The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. Mechanisms of Development 1997; 68: 37-44.
- Phemister R, Holst P, Spano J, Hopwood M. Time of ovulation in the Beagle bitch. Biology of Reproduction 1973; 8: 74-82.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development.

  Molecular and Cellular Endocrinology 1998; 145: 27-37.
- Rawe V, Olmedo S, Nodar F, Ponzio R, Sutovsky P. Abnormal assembly of annulate lamellae and nuclear pore complexes coincides with fertilization arrest at the pronuclear stage of human zygotic development. Human Reproduction 2003; 18: 576-582.
- Reimers T, Phemister R, Niswender G. Radioimmunological measurement of follicle stimulating hormone and prolactin in the dog. Biology of Reproduction 1978; 19: 1978.
- Renton J, Boyd J, Eckersall P, Ferguson J, Harvey M, Mullaney J, Perry B. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (Canis familiaris). Journal of Reproduction and Fertility 1991; 93: 221-231.
- Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Bernex F, Panthier J, Draincourt M. Alterations in ovarian function of mice with reduced amounts of KIT receptor. Reproduction 2001; 121: 229-237.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrout M, Viaris de Lesegno C, Chastant-Maillard S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. Reproduction 2005; 130: 193-201.
- Riley S, Thomassen R, Bae S-E, Leask R, Pederson H, Watson E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. Animal Reproduction Science 2004; 81: 329-339.
- Rocha A, Bastos R, Cunha I, Adona P, Santos J. Quantity and quality of oocytes recovered from donor bitches of different ages. Theriogenology 2006; 66: 1465-1467.
- Rodgers R, Irving-Rodgers H, Russel D. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. Reproduction 2003; 126: 415-424.

- Rodrigues B, dos Santos L, Rodrigues J. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. Molecular Reproduction and Development 2004; 67: 215-223.
- Rodrigues B, dos Santos L, Rodrigues J. The effect of hyaluronan concentrations in hST-supplemented TCM 199 on in vitro nuclear maturation of bitch cumulus-oocyte complexes. Theriogenology 2006; 66: 1673-1676.
- Rodrigues B, Rodrigues J. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. Theriogenology 2003a; 60: 59-66.
- Rodrigues B, Rodrigues J. Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. Reproduction of Domestic Animals 2003b; 38: 58-62.
- Romeis. Mikroskopische Technik. München: Urban und Schwarzenberg, 1989.
- Rosenfeld C, Yuan X, Manikkam M, Calder M, Garverick H, Lubahn D. Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-β within the ovarian follicle. Biology of Reproduction 1999; 60: 691-697.
- Rota A, Cabianca G. In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. Reprod. Nutr. Dev. 2004; 44: 105-109.
- Rüsse I. Utrastruktur der Eizelle während der Oogenese. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft 1978; 72: 839-851.
- Rüsse I, Sinowatz F. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Berlin: Parey, 1998.
- Saint-Dizier M, Renard J-P, Chastant-Maillard S. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. Reproduction 2001; 121: 97-105.
- Saint-Dizier M, Reynaud K, Chastant-Maillard S. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. Molecular Reproduction and Development 2004; 68: 205-212.
- Sakaguchi H, Fujimoto J, Hong B, Tamaya T. Quanitative analysis of estrogen receptor proteins in rat ovary. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2005; 94: 83-91.

- Sar M, Welsch F. Differential expression of estrogen receptor- $\beta$  and estrogen receptor- $\alpha$  in the rat ovary. Endocrinology 1999; 140: 963-971.
- Saunders P, Millar M, Williams K, Mcpherson S, Harkiss D, Anderson R, Orr B, Groome N, Scobie G, Fraser H. Differential expression of estrogen receptor-α and -β and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. Biology of Reproduction 2000; 63: 1098-1105.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M, Key G, Flad H, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cyclemaintaining proteins. The Journal of Cell Biology 1993; 123: 513-522.
- Schmidt M, Broll R, Bruch H-P, Duchrow M. The proliferating marker pKi-67 becomes masked to MIB-1 staining after expression of its tandem repeats. Histochemical Cell Biology 2002; 118: 415-422.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. Journal of Cell Physiology 2000; 182: 311-322.
- Schotterer A. Beitrag zur Feststellung der Eianzahl in verschiedenen Altersperioden bei der Hündin. Anatomischer Anzeiger 1928; 65: 177-192.
- Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, Dekel N. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. Endocrinology 2005; 146: 1236-1244.
- Shimizu T. Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. Journal of Reproduction and Development 2006; 52: 23-32.
- Sirois J, Sayasith K, Brown K, Stock A, Bouchard N, Doré M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: A 2004 account. Human Reproduction Update 2004; 10: 373-385.
- Solakidi S, Psarra A-M, Sekeris C. Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: Localization of ER $\alpha$  in the nucleoli and ER $\beta$  in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. Biochimica et Biophysica Acta 2005; 1745: 382-392.

- Songsasen N, Wildt D. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes.

  Molecular Reproduction and Development 2005; 72: 113-119.
- Songsasen N, Yu I, Gomez M, Leibo S. Effects of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic Gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. Molecular Reproduction and Development 2003; 65: 435-445.
- Songsasen N, Yu I, Leibo S. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. Molecular Reproduction and Development 2002; 62: 407-415.
- Soyal S, Amleh A, Dean J. Fig $\alpha$ , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. Development 2000; 127: 4645-5654.
- Spindler R, Pukazhenthi B, Wildt D. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. Molecular Reproduction and Development 2000; 56: 163-171.
- Steinetz B, Goldsmith L, Lust G. Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. Biology of Reproduction 1987; 37: 719-725.
- Stetler-Sevenson W, Krutzsch H, Liotta L. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). The Journal of Biological Chemistry 1989; 264: 17374-17378.
- Ström-Holst B, Larsson B, Rodriguez-Martinez H, Lagerstedt A, Linde-Forsberg C. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. Journal of Veterinary Medicine A 2001; 48: 587-592.
- Stryer S. Biochemie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1999.
- Su Y-Q, Denegre J, Wigglesworth K, Pendola F, O`Brien M, Eppig J. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. Developmental Biology 2003; 263: 126-138.
- Sun Q, Breitbart H, Schatten H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. Reproduction Fertility and Development 1999; 11: 443-450.
- Sundström P, Nilsson B, Liedholm P, Larsson E. Ultrastructural characteristics of human oocytes fixed at follicular puncture or after culture. Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer 1985; 2: 195-206.

- Sutovsky P, Simerly C, Hewitson L, Schatten G. Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pronuclear development in fertilized mammalian oocytes. Journal of Cell Science 1998; 111: 2841-2854.
- Szöllösi D, Mandelbaum J, Plachot M, Salat-Baroux J, Cohen J. Ultrastructure of the human preovulatory oocyte. Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer 1986; 3: 232-242.
- Takakura I, Naito K, Iwamori N, Yamashita M, Kume S, Tojo H. Inhibition of mitogen activated protein kinase activity induces parthenogenetic activation and increases cyclin B accumulation during porcine oocyte maturation. Journal of Reproduction and Development 2005; 51: 617-626.
- Tas M, Evecen M, Özdas Ö, Cirit Ü, Demir K, Birler S, Pabuccuoglu S. Effect of transport and storage temperature of ovaries on in vitro maturation of bitch oocytes. Animal Reproduction Science 2006; 96: 30-34.
- Telfer E, Gosden R. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (Canis familiaris). J. Reprod. Fert. 1987; 81: 137-147.
- Tesoriero J. Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. Journal of Morphology 1981; 168: 171-179.
- Tesoriero J. A morphologic, cytochemical, and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the oocytes of the dog. Gamete Research 1982; 6: 267-279.
- Tesoriero J. Comparative cytochemistry of the developing ovarian follicles of the dog, rabbit, and mouse: Origin of the Zona Pellucida. Gamete Research 1984; 10: 301-318.
- Theiss T. Untersuchungen zur Gewinnung, In-vitro-Reifung und -Fertilisation von Oozyten beim Hund. Tierärztliche Fakultät. München: Ludwig-Maximilians-Universität, 1997.
- Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilisation in dogs. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1989; 39: 269-275.
- Tyagi R, Lavrowsky Y, Ahn S, Song C, Chatterjee B, Roy A. Dynamics of intracellular moverment and nucleoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. Molecular Endocrinology 2000; 14: 1162-1174.

- Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology 2005; 63: 1717-1751.
- Van Wezel I, Rodgers R. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. Biology of Reproduction 1996; 55: 1003-1011.
- Vannucchi C, Motos de Oliveira C, Marques M, Assumpcao, Visintin J. In vitro canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. Theriogenology 2006; 66: 1677-81.
- Verheijen R, Kuijpers H, van Driel R, Beck J, van Dierendonck J, Brakenhoff G, Ramaekers F. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen II.

  Localization in mitotic cells and association with cromosomes. Journal of Cell Science 1989; 92: 531-540.
- Verini-Supplizi A, Monaci M, Stradaioli G, Greve T, Parillo F. Identification of glycoconjugates in the zona pellucida of in vitro matured and tubal unfertilized bovine oocytes by lectin histochemistry. Animal Reproduction Science 1996; 43: 99-111.
- Villa-Diaz L, Miyano T. Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. Biology of Reproduction 2004; 71: 691-696.
- Wartenberg H, Hilscher B, Hilscher W. Germ cell kinetics during early ovarian differentiation:
  An analysis of the oogonial cell cycle and the subsequent changes in oocyte
  development during the onset of meiosis in the rat. Microscopy Research and
  Technique 1998; 40: 377-397.
- Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, Williams Z. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. Journal of Experimental Zoology 1999; 285: 251-258.
- Wassarman P, Josefowicz W. Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. Journal of Morphology 1978; 156: 209-236.
- Weakley B. Variations in mitochondrial size and ultrastructure during germ cell development. Cell and Tissue Research 1976; 169: 531-550.

- Wildt D, Panko W, Chakraborty P, Seager S. Relationship of serum estrone, estradiol-17beta and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. Biology of Reproduction 1979; 20: 648-658.
- Willingham-Rocky L, Golding M, Wright J, Kraemer D, Westhusin M, Burghardt R. Cloning of GJA1 (connexin43) and its expression in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. Gene Expression Patterns 2007; 7: 66-71.
- Willingham-Rocky L, Hanna C, Westhusin M, Kraemer D. Effects of porcine somatotropin and epidermal growth factor on the resumption of meiosis of canine oocytes matured in vitro (Abstract). Theriogenology 2002; 57: 742.
- Willingham-Rocky L, Hinrichs K, Westhusin M, Kraemer D. Effects of stage of oestrus cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. Reproduction 2003; 126: 501-508.
- Windt M, Coetzee K, Kruger T, Marino H, Kitshoff M, Sousa M. Ultrastructural evaluation of recurrent and in-vitro maturation resistant metaphase I arrested oocytes. Human Reproduction 2001; 16: 2394-2398.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. Biology of Reproduction 1992; 46: 853-858.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1993; 47: 227-229.
- Yang S-H, Liu R, Perez E, Wen Y, Stevens S, Valencia T, Brun-Zinkernagel A-M, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins J. Mitochondrial localization of estrogen receptor β. The National Academy of Sciences of the USA 2004; 101: 4130-4135.
- Zachos N, Billiar R, Albrecht E, Pepe G. Developmental regulation of Baboon fetal ovarian maturation by estrogen. Biology of Reproduction 2002; 67: 1148-1156.
- Zamboni L. Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association. Biology of Reproduction 1974; 10: 125-149.
- Zamboni L, Thompson R, Smith D. Fine morphology of human oocyte maturation in vitro. Biology of Reproduction 1972; 7: 425-457.

# 9 Anhang

## 9.1 Bilderverzeichnis

Bild	1	Follikulogenese und Oogenese, schematisch, Entwicklung von der
	Prim	ordialkeimzelle bis zum sprungreifen Graafschen Follikel, nach Picton et al., 1998
		19
Bild	2	Überblick über die Verwendung der Hundeovarien für die verschiedenen Versuche
		31
Bild	3	Überblick über die Verwendung der gewonnenen Hundeoozyten in den Versuchen.
		42
Bild	5	Oberfläche des Ovars, HE-Färbung, SB = 50 µm56
Bild	6	Rindenbereich des Ovars, HE-Färbung, SB = 75 $\mu$ m56
Bild	7	Früher Sekundärfollikel, HE-Färbung, SB = $50 \mu m$ 56
Bild	8	Sekundärfollikel, HE-Färbung, SB = 75 µm56
Bild	9	Früher Tertiärfollikel, HE-Färbung, SB = 75 µm57
Bild	10	Gleicher Follikel wie in Bild 9, SB = 50 µm57
Bild	11	Reifer Tertiärfollikel, HE-Färbung, SB = 500 µm57
Bild	12	Polyovulatorische Sekundärfollikel, HE-Färbung, SB = 75 μm57
Bild	13	Abhängigkeit des Durchmessers des "germinal vesicle" vom Durchmesser der
	Oozy	/te (n = 159)59
Bild	14	Abhängigkeit des Durchmessers des "germinal vesicle" vom Durchmesser der
	Oozy	te in Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien ( $n_{PROF} = 48$ , $n_{PRIM} = 42$ , $n_{SF} = 39$ ,
	n <sub>TF</sub> =	: 30)60
Bild	15	Abhängigkeit der Dicke der Zona pellucida vom Durchmesser der Oozyte in
	Seku	ındär- und Tertiärfollikeln (n = 159)61
Bild	16	Abhängigkeit der Dicke der Zona pellucida vom Durchmesser der Oozyte in
	Seku	ındär- und Tertiärfollikeln (n <sub>SF</sub> = 39, n <sub>TF</sub> = 30)62
Bild	17	Rindenbereich des Ovars, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 250 $\mu m \dots 67$
Bild	18	Oberfläche des Ovars, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 50 $\mu$ m67
Bild	19	Primordialfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 50 $\mu$ m67
Bild	20	Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von ERα, Citrat-Puffer, SB = 50 μm67
Bild	21	Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 250 $\mu$ m68
Bild	22	Gleicher Follikel wie in Bild 21, Citrat-Puffer, SB = 75 µm68
Bild	23	COC eines Tertiärfollikels, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , Citrat-Puffer, SB = 25 $\mu$ m68
Bild	24	Primordialfollikel, IHC-Nachweis von ER $\alpha$ , DAKO-Puffer, SB = 50 $\mu$ m69
Bild	25	Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von ERα, DAKO-Puffer, SB = 25 μm69

Bild 26	Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von ERα, DAKO-Puffer, SB = 50 μm	69
Bild 27	Granulosazellen eines Tertiärfollikels, IHC-Nachweis von ERβ, SB = 25 μm	72
Bild 28	Corpus luteum in Rückbildung, IHC-Nachweis von ERβ, SB = 25 μm	72
Bild 29	Corpus luteum in Bildung, IHC-Nachweis von ERβ, SB = 100 μm	72
Bild 30	Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67, SB = 75 µm	74
Bild 31	Früher Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67, SB = 75 µm	74
Bild 32	Früher Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67, SB = 25 µm	74
Bild 33	Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von Ki-67, SB = 250 µm	74
Bild 34	Rindenbereich des Ovars, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 100 μm	80
Bild 35	Primordialfollikel, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 50 μm	80
Bild 36	Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 10 µm	80
Bild 37	Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 50 µm	80
Bild 38	Tiefer Gang des Oberflächenepithels, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 25 $\mu$ m.	81
Bild 39	Blutgefäße, IHC-Nachweis von MMP-1, SB = 100 μm	81
Bild 40	Oberfläche des Ovars, IHC-Nachweis von MMP-2, SB = 50 µm	82
Bild 41	Ovarstroma, IHC-Nachweis von MMP-2, SB = 50 µm	82
Bild 42	Blutgefäß, IHC-Nachweis von MMP-2, SB = 50 μm	82
Bild 43	Rindenbereich des Ovars, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 μm	83
Bild 44	Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 µm	83
Bild 45	Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 µm	83
Bild 46	Cumulus oophorus, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 µm	83
Bild 47	COC eines Tertiärfollikels, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 25 µm	84
Bild 48	Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 µm	84
Bild 49	Oberfläche des Ovars, IHC-Nachweis von MMP-14, SB = 50 µm	84
Bild 50	Primordialfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB = 50 μm	85
Bild 51	Sekundärfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB = 50 µm	85
Bild 52	Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB = 50 µm	85
Bild 53	Tertiärfollikel, IHC-Nachweis von TIMP-2, SB = 25 µm	85
Bild 54	Primordialfollikel, SB = 2 μm	87
Bild 55	Primordialfollikel, SB= 2 μm	88
Bild 56	Primordialfollikel, SB = 2 μm	89
Bild 57	Primärfollikel, SB = 2 μm	92
Bild 58	Primärfollikel, SB = 1 μm	93
Bild 59	Primärfollikel, SB = 2 μm	94
Bild 60	Sekundärfollikel, SB = 5 µm	97
Bild 61	Sekundärfollikel, SB = 2 µm	98
Bild 62	Peripherie eines Sekundärfollikels, SB = 2 µm	99

Bild	63	Sekundärfollikel, SB = 1 µm	100
Bild	64	Sekundärfollikel, SB = 2 µm	101
Bild	65	Überblick über die Follikelwand im Bereich des Cumulus oophorus eines	
	Terti	årfollikels, SB = 5 μm	105
Bild	66	Tertiärfollikel, SB = 2 μm	106
Bild	67	Tertiärfollikel, SB = 1 μm	107
Bild	68	Tertiärfollikel, SB = 1 μm	108
Bild	69	Tertiärfollikel, Zellen des Cumulus oophorus und Corona radiata-Zellen,	
	SB =	2 μm	109
Bild	70	Tertiärfollikel, Übergangszone zwischen Cumulus oophorus und Granulosazellei	n
	(Inter	mediärzellen), SB = 2 µm	110
Bild	71	Tertiärfollikel, Granulosazellen (Basalzellen), SB = 2 µm	111
Bild	72	Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl pro Hündin vom Alter der jeweilig	en
	Hünd	lin (n = 61)	113
Bild	73	Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl von der Altersgruppe der Hündin	
			114
Bild	74	Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl vom Reproduktionsstatus der	
	Hünd	lin	115
Bild	75	Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl von der Hunderasse von Hündinr	nen
	im Al	ter von 10 bis 36 Monaten	116
Bild	76	Abhängigkeit der gewonnenen Oozytenanzahl von der Transportdauer der Ovar	ien
	zwisc	chen Ovarentnahme und Beginn der Oozytengewinnung im Labor (n = 61)	117
Bild	77	Abhängigkeit des Durchmessers des "germinal vesicle" vom Durchmesser der	
	Oozy	te bei frisch gewonnen in PFA fixierten caninen Oozyten (n = 53)	119
Bild	78	Abhängigkeit der Dicke der Zona pellucida vom Durchmesser der Oozyte in frisc	:h
	gewo	onnen in PFA fixierten caninen Oozyten (n= 53)	120
Bild	80	Frisch gewonnene COC der Kategorie A, SB = 50 µm	123
Bild	81	Frisch gewonnene COC der Kategorie A, SB = 50 µm	123
Bild	82	Frisch gewonnene COCs, SB = 50 µm	123
Bild	83	Frisch gewonnene Oozyte der Kategorie C, SB = 50 µm	123
Bild	84	Frisch gewonnene Oozyte der Kategorie D, SB = 50 µm	124
Bild	85	Frisch gewonnene Oozyte der Kategorie D, SB = 100 µm	124
Bild	86	Frisch gewonnener Follikel, SB = 100 µm	124
Bild	87	COC nach 24 Stunden IVM, SB = 50 µm	126
Bild	88	Oozyte nach 72 Stunden IVM, SB = 50 µm	126
Bild	89	Oozyte nach 72 Stunden IVM, SB = 50 µm	126
Rild	90	COC nach 72 Stunden IVM_SB = 50 um	126

Bild	91	COC, ungereift, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 µm	.128
Bild	92	"Germinal vesicle", PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 20 µm	.128
Bild	93	Oozyte, ungereift, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm	.128
Bild	94	COC, ungereift, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 µm	.128
Bild	95	COC nach 48 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 µm	.130
Bild	96	Oozyte nach 72 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm	.130
Bild	97	Oozyte nach 72 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm	.130
Bild	98	Oozyte nach 72 Stunden IVM, PI (rot), Hoechst 33342 (grün), SB = 50 μm	.130
Bild	99	COC, ungereift, IF-Nachweis von α-Tubulin, SB = 50 μm	.132
Bild	100	Oozyte nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von $\alpha$ -Tubulin, SB = 20 $\mu$ m	.132
Bild	101	Oozyte nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von $\alpha$ -Tubulin, SB = 20 $\mu$ m	.133
Bild	102	Gleiche Oozyte wie in Bild 101, IF-Nachweis von $\alpha$ -Tubulin, SB = 20 $\mu$ m	.133
Bild	103	COC, ungereift, IF-Nachweis von Connexin 43, SB = 50 µm	.134
Bild	104	COC nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von Connexin 43, SB = 50 µm	.134
Bild	106	Oozyte, ungereift, IF-Nachweis von ZP3 $\beta$ (grün), SB = 20 $\mu$ m	.136
Bild	107	Oozyte, ungereift, IF-Nachweis von ZP3β (grün), SB = 5 μm	.136
Bild	108	Oozyte nach 24 Stunden IVM, IF-Nachweis von ZP3 $\beta$ (grün), SB = 20 $\mu$ m	.136
Bild	109	Cumuluszellen nach 72 Stunden IVM, IF-Nachweis von ZP3 $\beta$ (grün), Hoechst	
	3334	2 (blau), SB = 10 μm	.136
Bild	110	COC, ungereift, WGA (grün), Hoechst 33342 (blau), SB = 50 µm	.138
Bild	111	COC nach 24 Stunden IVM, WGA (grün), Hoechst 33342 (blau), SB = 50 $\mu$ m	.138
Bild	112	Zona pellucida nach 72 Stunden IVM, WGA (grün), Hoechst 33342 (blau),	
	SB =	10 μm	.138
Bild	113	COC, ungereift, SBA (grün), PI (rot), SB= 50 µm	.139
Bild	114	Oozyte, ungereift, SBA (grün), PI (rot), SB= 50 µm	.139
Bild	115	COC nach 72 Stunden IVM, SBA (grün), PI (rot), SB = 50 µm	.139
Bild	116	Oozyte nach 72 Stunden IVM, SBA (grün), PI (rot), SB = 50 μm	.139
Bild	117	Überblick über Oozyte 1, ungereift, SB = 5 µm	.143
Bild	118	Überblick über Oozyte 3, ungereift, SB = 5 µm	.144
Bild	119	Oozyte 5, ungereift, SB = 2 µm	.145
Bild	120	Oozyte 5, ungereift, SB = 1 μm	.146
Bild	121	Cumuluszellen von Oozyte 6, ungereift, SB = 2 µm	.147
Bild	122	Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 5 μm	.151
Bild	123	Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 2 μm	.152
Bild	124	Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 500 nm	.153
Bild	125	Oozyte 4 nach 24 Stunden IVM, SB = 1 μm	.154
Rild	126	Oozyte 2 nach 24 Stunden IVM_SR = 1 um	155

Bild 127	Cumulus oophorus von Oozyte 2 nach 24 Stunden IVM, SB = 2 µm	156
Bild 128	Oozyte nach 90 Stunden IVM, SB = 2 μm	157

# 9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Größenverhältnisse bei caninen Follikeln verschiedener Entwicklungsstadien16
Tab. 2	Einteilung der einzelnen Reproduktionsstatus von Hündinnen aufgrund des
Vorl	perichts und der Beschaffenheit der Ovaroberfläche32
Tab. 3	Übersicht über die verwendeten Hundeovarien, Paraformaldehyd (PFA) 4% und
Bou	in (B) fixiert33
Tab. 4	Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen34
Tab. 5	Verwendete Konzentrationen des Antikörpers gegen ERβ39
Tab. 6	Klassifizierung von ungereiften Hundeoozyten nach Theiss (1997)44
Tab. 7	Überblick über die verwendeten Antikörper für die IF bei Oozyten46
Tab. 8	Überblick über die verwendeten FITC-markierten Lektine zur Färbung der Oozyten
	47
Tab. 9	Überblick über die Größenverhältnisse der Oozyten in Follikeln verschiedener
Ent	wicklungsstadien58
Tab. 10	Immunhistochemischer Nachweis von ERα nach Vorbehandlung mit Citrat-
Puff	er65
Tab. 11	Immunhistochemischer Nachweis von ERα nach Vorbehandlung mit DAKO-
Puff	er66
Tab. 12	Immunhistochemischer Nachweis von ERβ71
Tab. 13	Immunhistochemischer Nachweis von MMP-1, MMP-2, MMP-14 und TIMP-278
Tab. 14	Größenparameter von frisch gewonnenen Oozyten der Kategorie A bis C
(n =	53)118
Tab. 15	Klassifizierung der gewonnenen Oozyten nach den Kriterien von Theiss (1997)
	122
Tab. 16	Klassifizierung der Chromatinkonfigurationen im "germinal vesicle" von
ung	ereiften caninen Oozyten127
Tab. 17	Überblick über die Kernreifestadien nach 0 bis 72 Stunden IVM (Anzahl)129
Tab. 18	Ultrastrukturelle Besonderheiten von durch Slicing gewonnenen caninen
Ooz	yten vor In-vitro-Reifung142
Tab. 19	Ultrastrukturelle Besonderheiten von caninen Oozyten nach 24 Stunden In-vitro-
Reif	ung150
Tab. 20	Gebräuchliche Namen und Substrate der MMPs-1, -2, und -14 in der ECM, nach
Cur	ry und Osteen (2003)170

#### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

A Arterie

ABC Avidin-Biotin-Komplex
ABM Antibiotic-Antimycotic

AF Antrum folliculi
AK Antikörper

AL Annulate lamellae
AMH Anti-Müller-Hormon

AP Alkalische Phosphatase

APAAP Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase

B Bouin`sche Lösung

bFSH Bovines Follikel stimulierendes Hormon

BG Blutgefäß

bGH Bovine growth hormone

biot. Biotinyliert

bLH Bovines Luteinisierungshormon

BM Basalmembran

BMP Bone morphogenetic protein
BSA Bovines Serum Albumin

cAMP Zyklisches Adenosinmonophosphat

CEF Canine embryonic fibroblasts

CL Corpus luteum

CLSM Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

COC Cumulus-Oozyten-Komplex

Con43 Connexin 43
CZ Cumuluszellen

CZF Cumuluszellfortsätze
DAB 3,3-Diaminobenzidin

DNA Desoxyribonukleinsäure
DSH Deutscher Schäferhund

eCG Equines Choriogonadotropin

ECMExtrazelluläre MatrixEGFEpidermal growth factorERα/βÖstrogenrezeptor  $\alpha/\beta$ 

F-12/DME F-12 Ham's medium/Dulbecco's modified Eagle's medium

FE Follikelepithel

FITC Fluoreszeinisothiozyanat

Fix Fixierung

FKS Fetales Kälber Serum

FSH Follikel stimulierendes Hormon

G Golgi-Apparat

GalNAc N-Acetylgalaktosamin

GDF Growth differentiation factor

GER Glattes endoplasmatisches Retikulum

GlcNAc N-Acetylglukosamin

GnRH Gonadotropin-Releasing-Hormon

GV Germinal vesicle

GVBD Germinal vesicle breakdown

GZ Granulosazellen

GZS Granulosazellstränge

hCG Humanes Choriongonadotropin

HE Hämatoxylin-Eosin

hMG humanes Menopausengonadotropin

HRP Meerrettich-Peroxidase

IF Immunfluoreszenz
IgG Immunglobulin G
IHC Immunhistochemie
IVM In-vitro-Reifung
KF Kollagene Fasern

KL Kit Ligand
KM Kernmembran
LB Lamina basalis

LDK Lipiddotterkörperchen
LH Luteinisierungs Hormon

M Mitochondrien

MAPK Mitogen Activated Protein Kinase
MEF Mouse embryonic fibroblasts

MI Metaphase I Metaphase II

MMP Matrix Metalloproteinase
MPF Maturation promoting factor

N Nukleus (Kern)

NeuNAc N-Acetylneuraminsäure

NGF Nerve growth factor

NK Nukleolus

OE Oberflächenepithel

OG Gänge des Oberflächenepithels

OM Markbereich des Ovars

OP Ooplasma

OR Rindenbereich des Ovars
PBS Phosphate Buffered Saline

PFA Paraformaldehyd
PI Propidiumjodid
PRIM Primärfollikel
PROF Primordialfollikel

pST Porcines Somatotropin
PVP Polyvinylpyrrolidon
PVS Perivitellinspalt
R Ribosomen

R Ribosomen

r Korrelationskoeffizient

RER Raues endoplasmatisches Retikulum

RNA Ribonukleinsäure

S Ovarstroma
SB Scale Bar

SBA Soya Bean Agglutinin
SD Standardabweichung

SF Sekundärfollikel

SOF Synthetic oviductal fluid

T Theka follikuli

Tab. Tabelle

TCM Tissue Culture Medium

TE Theka externa

TEM Transmissionselektronenmikroskopie

TF Tertiärfollikel

TGF Transforming growth factor

TI Theka interna

TIMP Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases

VE Vene Vesikel

Verd. Verdünnung

WGA Wheat Germ Agglutinin

ZP Zona pellucida

ZP3β Zona Pellucida Glykoprotein 3β

# 9.4 Verwendete Lösungen und Medien

#### In-vitro-Reifung (IVM)

#### TCM-Stock (TCM 199-HEPES)

Natriumbikarbonat (NaHCO3) <sup>1</sup> 300 mg

Gentamycin-Sulfat <sup>1</sup> 5 mg

Natrium-Pyruvat <sup>1</sup> 2,5 mg

Medium 199 Hepes Modification <sup>1</sup> 1500 mg

Water for Embryotransfer <sup>1</sup> 100 ml

Steril filtriert, pH 7,2 - 7,4, für maximal 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt

## Modifiziertes TCM 199-HEPES II Medium (Hewitt et al., 1998, Luvoni, 2001)

TCM 199-HEPES 20 ml BSA  $(4\%)^{1}$  0,8 mg NaHCO $_{3}^{1}$  40 mg Penicillin G (Natriumsalz)  $^{1}$  1,24 mg Streptomycinsulfat  $^{1}$  1 mg

## PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4

Dulbecco's PBS <sup>1</sup> in Aqua dest.

#### Aufbewahrungslösung für Ovarien

Penicillin G (Natriumsalz) <sup>1</sup> 100 mg
Streptomycinsulfat <sup>1</sup> 100 mg
PBS <sup>1</sup> ad 1000 ml

# Slicing-Lösung

BSA <sup>1</sup> 0,5 g PBS <sup>1</sup> 100 ml

#### **bLH-Stock**

1 Flasche (50.000 IU) bovines LH 4

Das Protein wurde in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung aufgelöst und in Eppendorf-Cups á 40 µl bei -20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde es maximal 3 Tage im Kühlschrank gelagert.

Die Konzentration der Stocklösung liegt bei 5000 IU/ml.

# <u>bFSH – Stock</u>

1 Flasche (650 IU) bovines FSH <sup>4</sup>

Das Protein wurde in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung aufgelöst und in Eppendorf-Cups á 40 µl bei -20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde es maximal 3 Tage im Kühlschrank gelagert.

Die Konzentration der Stocklösung liegt bei 65 IU/ml.

#### **Fixierung**

#### PBS/PVP/ABM

PVP <sup>1</sup> 1 mg
PBS <sup>1</sup> 1 ml
ABM <sup>1</sup> 10 ml/l

### PFA-Stock 8%

Paraformaldehyd <sup>1</sup> 8 g
PBS <sup>1</sup> 100 ml

Rühren und auf 55-60°C erhitzen. Einige Tropfen 2 N Natriumhydroxid <sup>2</sup> hinzufügen, bis die Lösung aufklart. Filtrieren und auf Niederschläge überprüfen. Bilden sich Niederschläge die Lösung nicht verwenden.

#### PFA 4%

1:1 Verdünnung der 8 %igen Paraformaldehyd Stock-Lösung in PBS

### Bouin`sche Lösung

gesättigte wässrige Pikrinsäure <sup>2</sup> 375 ml Formalin (35%) <sup>2</sup> 125 ml Eisessig <sup>2</sup> 25 ml

## HE-Färbung

#### **Eosin**

Stammlösung: Eosin <sup>2</sup> 2 g

A. dest 198 ml

einige Tropfen Formol <sup>2</sup> zur Haltbarkeit

Verdünnung: A. dest 600 ml

Eosin-Stammlösung 60 ml

Eisessig <sup>2</sup> 8 Tropfen

#### <u>Hämalaun</u>

A. dest 2000 ml
Hämatoxylin <sup>2</sup> 2 g
Natriumjodat <sup>2</sup> 0,4 g
Kalialaun (chemisch rein) <sup>2</sup> 100 g
Chloralhydrat <sup>2</sup> 100 g
Kristalline Zitronensäure <sup>2</sup> 2 g

#### *Immunhistochemie*

#### Tris-Puffer

NaCl $^2$  43,9 g Trizma Hydrochlorid $^1$  34,25 g Trizma Base $^1$  4,5 g

Alle in 5 I A. dest lösen und pH 7,4-7,6 einstellen

PBS-Puffer

NaCl<sup>2</sup> 42,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O<sup>2</sup> 6,35 g

 $NaH_2PO_4-H_2O^2$  1,95 g

Alle in 5 I A. dest. lösen und pH 7,4-7,6 einstellen

DAB-Wasserstoffperoxid-Lösung

Lösung A

PBS 50 ml  $H_2O_2(30\%)^1$  15  $\mu$ l

Lösung B

DAB<sup>3</sup> 1 Tablette

A. dest 10 ml

Gebrauchslösung: 67 µl von Lösung A zu Lösung B geben, gut mischen und filtrieren

Hydrogenperoxid zur Hemmung der endogenen Peroxidase

 $H_2O_2 (30\%)^2$  50 ml

A. dest. 150 ml

Citratpuffer (10mM, pH 6,0)

Stammlösung A

0,1M Zitronensäure:  $C_6H_8O_7xH_2O^2$  21,01 g

A. dest 1000 ml

Stammlösung B

0,1M Natriumcitrat:  $C_6H_5O_7Na_3x2H_2O^2$  29,4 g

A. dest 1000 ml

Die Stammlösungen bei 4°C aufbewahren.

Gebrauchslösung: 9 ml von Stammlösung A und 41 ml von Stammlösung B mit 450 ml

A. dest auf 500 ml auffüllen und mischen.

### Kernfärbung/Immunfluoreszenz Oozyten

# Permeabilisierungs-Lösung

Triton X-100 <sup>2</sup> 0,5 ml PBS <sup>1</sup> 100 ml

#### Propidiumjodid-Stock

PI <sup>1</sup> 25 mg PBS <sup>1</sup> 1 ml

PI lösen und Stock-Lösung bei 4°C aufbewahren

# Elektronenmikroskopie

# Fixierungslösung nach Karnovsky

10% Paraformaldehyd-Lösung: PFA <sup>2</sup> 10 g

A. dest. ad 100 ml

NaOH (1M) <sup>2</sup> < 6 Tropfen

Karnovsky Stammlösung: PFA-Lösung (10%) 20 ml

Cacodylat-Puffer (0,2 M) 50 ml

Kalziumchlorid, wasserfrei 8 0,05 g

Karnovsky Gebrauchslösung: Karnovsky Stammlösung 10 ml

Glutaraldehyd (25%) <sup>7</sup> 1,37 ml

### **Propylenoxid**

Propylenoxid <sup>2</sup>

# **Kontrastierungslösung**

Lösung A

Osmiumtetroxid (4%) <sup>6</sup> Osmiumtetroxid-Lösung (2%) 2 ml

> Cacodylat-Puffer (0,1 M) 2 ml

Lösung B

Kaliumferrocyanid-Lösung (3%) Kaliumferrocyanid 1 0,3 g

> Cacodylat-Puffer (0,1 M) ad 10 ml

Osmiumtetroxid (1%)-Kaliumferrocyanid (1,5%) in Cacodylat-Puffer (0,1 M)

Lösung A 4 ml 4 ml

Lösung B

# Cacodylat-Pufffer

Lösung A

Cacodylat Na(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub> x 3 H<sub>2</sub>O <sup>7</sup> 8,56 g

A. dest

ad 200 ml

Lösung B

HCI (0,2 M)<sup>2</sup>

Cacodylat-Puffer (0,2 M, pH 7,2)

Lösung A 50 ml

Lösung B so viel, bis der pH-Wert erreicht ist

A. dest ad 100ml

Cacodylat-Puffer (0,1 M, pH 7,2)

50 ml Cacodylat-Puffer (0,2 M) 50 ml A. dest

**Epon** 

Poly/Bed 812 6 20 ml

DDSA 6 16 ml

NMA 6 10 ml

BDMA<sup>6</sup> 1,4 ml

# BSA-Lösung (20%)

BSA 2 g

Cacodylat-Puffer (0,1M) 10 ml

#### Bleicitrat-Lösung nach Reynolds

Natriumcitrat Stock

Natriumcitrat <sup>2</sup> 35,7 g

A. dest ad 100 ml

**Bleinitrat Stock** 

Bleinitrat <sup>2</sup> 33,1 g

A. dest ad 100 ml

Bleicitrat-Lösung

A. dest 16 ml
Natriumcitrat Stock 3 ml
Bleinitrat Stock 2 ml
NaOH, 1M <sup>2</sup> 4 ml

A. dest ad 100 ml

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Sigma-Aldrich, Deisenhofen

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Merck, Darmstadt

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Kem-En-Tec, Kopenhagen, Dänemark

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Sioux Biochemical Inc., USA

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Molecular Probes, USA

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Polysciences Inc., Warrington, USA

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Agar Scientific LTD. Essex, England

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Serva, Heidelberg

# 9.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Braun danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit sowie für die finanzielle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Sinowatz, der die Färbungen und Mikroskopie an seinem Institut ermöglicht und mich stets mit seinem Fachwissen unterstützt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Lehrstuhls für Tieranatomie II für die freundliche Aufnahme bedanken. Insbesondere bin ich Herrn Dr. Habermann für seinen geduldigen fachlichen Rat und die Unterstützung bei der CLSM sowie Frau Christine Neumüller für die Hilfe bei der TEM und bei sonstigen Belangen zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt außerdem den Münchner Tierarztpraxen Dr. Mantel und Dr. Böck sowie der Praxis Dr. Krolopp/Dr. Ballauf in Unterhaching für die gute Zusammenarbeit bei der Beschaffung von Hundeovarien. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik, die immer für frisches Untersuchungsmaterial gesorgt haben.

Dr. Bärbel Schmid danke ich für die Einarbeitung in die Techniken zur IVM. Christiane Otzdorff und Heidi Wondra und allen anderen aus dem IVF-Team danke ich für die vielen lustigen gemeinsamen Stunden, ihre Motivation, die vielen Diskussionen und auch für ihre Kritik.

Herzlichen Dank an "die Ameise" Ellen Schöner, Silvia Ballya und A. und D. Hounam, die sich der Korrektur der Arbeit gewidmet haben.

Bei all meinen Freunden bedanke ich mich für ihr Verständnis und die moralische Unterstützung.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die jahrelange Unterstützung, ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre.

Beagle Jenny danke ich für ihre unendliche Treue und Geduld.

# 9.6 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Sandra Elisabeth Wallner

Geburtsdatum: 14.04.1979

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

#### Schulausbildung

1985-1989 Grundschule am Ravensburger Ring, München

1989-1998 Städt. Bertolt-Brecht-Gymnasium, München

26.06.1998 Abitur

#### **Studium**

1998-2004 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität

in München

26.04.2004 III. Teil der Tierärztlichen Prüfung

Seit Mai 2004 Promotionsstudium an der Gynäkologischen und

Ambulatorischen Tierklinik (ab April 2005: Chirurgische und

Gynäkologische Kleintierklinik) in München

#### **Beruflicher Werdegang**

Juli 2004-September 2006 Wissenschaftliche Assistentin im IVF-Labor der Chirurgischen

und Gynäkologischen Kleintierklinik