

5 Zusammenfassung

Die Zielsetzung der Arbeit bestand in der morphologischen und funktionellen Charakterisierung von dominanten und subordinanten Follikeln der Stute in Abhängigkeit vom Stadium der Follikelphase.

Für die Untersuchungen standen 13 laktierende genitalgesunde Warmblutstuten im Alter von vier bis 14 Jahren zur Verfügung, die aus züchterischen Gründen oder wegen Gliedmaßenanomalien aus der Zucht genommen werden sollten. Die Stuten durchliefen zunächst einen Kontrollzyklus. Danach erfolgte entsprechend dem Versuchsplan die Ovargewinnung entweder in der frühen (Tag eins und zwei der Rosse), mittleren (Tag drei und vier) oder späten (Tag fünf bis sieben) Follikelphase. Bei zehn Stuten wurde ein Ovar mittels Ovarrektomie und das zweite Ovar in einem Folgezyklus nach terminierter Schlachtung gewonnen. Bei drei Stuten wurden beide Ovarien im Anschluss an die Schlachtung entnommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jeweils nur das Ovar mit dem dominanten Follikel in die Auswertung einbezogen. Von den 23 verfügbaren Ovarien konnten sechs nicht in das komplette Untersuchungsprogramm einbezogen werden (Follikelraktur intra operationem, keine Follikelphase, luteinisierender Follikel, Ovulation), so dass im Rahmen dieser Arbeit 17 Ovarien zur Verfügung standen.

Von jedem Ovar wurden die Größendimensionen und das Gewicht sowie Anzahl und Größe aller Follikel größer als zehn Millimeter ermittelt. Zur morphologischen und funktionellen Charakterisierung der Follikel dienten folgende Parameter:

- Follikelgröße
- Beschaffenheit der Follikelwand (Dicke und Grad der Vaskularisierung)
- Morphologische Beschaffenheit der Granulosazellschicht (Anzahl der Zellen; Farbe; Qualität der Verbindung untereinander)
- Vorhandensein von Apoptose (DNA-Spaltungsmuster nach Agarose-Gelelektrophorese)
- Konzentrationen von Östradiol und Progesteron in der Follikelflüssigkeit bestimmt mittels Radioimmunoassay
- Morphologischer Befund des Kumulus-Oozyten-Komplexes (Kompaktheits- bzw. Expansions-Grad)
- Chromatin-Konfiguration der Oozyte beurteilt mittels Fluoreszenz-Färbung (Hoechst stain 33258).

Die Untersuchungen führten zu folgenden Resultaten:

1. Die Zahl der Follikel pro Ovar betrug $5,7 \pm 3,2$. Die dominanten Follikel zeigten von der frühen zur späten Follikelphase eine deutliche Größenzunahme (von $41,8 \pm 7,5$ mm auf $49,7 \pm 1,3$ mm). Die Größe der subordinanten Follikel blieb im Verlauf der Follikelphase weitgehend konstant, zeigte gegen Ende des Östrus jedoch zunehmende Variabilität ($20,9 \pm 3,7$ mm in der frühen, $22,3 \pm 12,5$ mm in der späten Follikelphase).
2. Von den 17 untersuchten dominanten Follikeln waren nach den Kriterien der Wandbeschaffenheit 14 als intakt einzustufen. Bei den übrigen drei (aus der frühen und mittleren Follikelphase stammenden) Follikeln lagen mangelhafte Vaskularisierung der Wand und Anzeichen der Atresie der Granulosazellen vor. Zwei dominante Follikel (aus der frühen Follikelphase) hatten Anzeichen von Apoptose.
3. Von 80 ausgewerteten subordinanten Follikeln waren nach morphologischen Kriterien fünf (6,8%) intakt und 75 (93,7%) atretisch. Zehn (67%) Follikel hatten in der frühen und neun und sechs (je 37%) in der mittleren und späten Follikelphase Anzeichen von Apoptose.
4. Die Östradiol-Konzentration in der Follikelflüssigkeit dominanter Follikel stieg von der frühen zur späten Follikelphase ($57,1 \pm 8,4$ vs. $74,1 \pm 7,1$ ng/ml). Die Progesteron-Konzentration zeigte bei starker Variabilität ($29,9 \pm 17,9$ ng/ml) keine Abhängigkeit von der Follikelphase. Subordinante Follikel wiesen sehr heterogene Östradiol- ($15,3 \pm 20,1$ ng/ml) und Progesteron-Konzentrationen ($8,0 \pm 9,8$ ng/ml) auf.
5. Von den insgesamt 97 ausgewerteten Follikeln wurden 56 Kumulus-Oozyten-Komplexe (Gewinnungsrate 57,7%) gewonnen. Von 13 aus dominanten Follikeln gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexen waren drei kompakt, neun expandiert und einer denudiert. Die Oozyten dieser Follikel befanden sich im Germinalvesikel-Stadium. Von 43 Kumulus-Oozyten-Komplexen der subordinanten Follikel waren 36 (84%) expandiert und sieben (16%) denudiert. Vier (18%) der Oozyten der subordinanten Follikel befanden sich im Germinalvesikel Breakdown.

Die erzielten Ergebnisse unterstreichen auffallende morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen dominanten und subordinanten Follikeln. Über 90% der subordinanten Follikel befanden sich in Atresie, die durch einen apoptotischen Prozess gekennzeichnet ist. Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Follikelatresie mit dem Verlust der Fähigkeit, die Oozyte in der meiotischen Arretierung zu halten, verbunden ist.

6 Summary

Kathrin Rödiger

Morphofunctional examination of ovar follicles from mares during the oestrous

The aim of the recent study is the morphological and functional characterisation of dominant and subordinate follicles during oestrous in the mare.

The examinations were performed on 13 lactating, genitally healthy, warmblood mares which were taken out of breeding due to breeding reasons or limb abnormalities. First, all mares went through a control cycle. After that, recovery of the ovaries was carried out according to the experimental plan during early (first and second day of oestrous), middle (third and fourth day) or late oestrous (fifth till seventh day). From ten mares, the first ovary was obtained by ovariectomy and the second ovary during the following cycle after slaughter. From three mares, both ovaries were taken after slaughter. Within the framework of this thesis, only the ovary with the dominant follicle was included in the evaluation. Six of the 23 available ovaries could not be evaluated (follicular rupture, no oestrous, luteinization or ovulation of the dominant follicle).

The size and the weight of each ovary as well as the number and size of the follicles bigger than 10 mm, were obtained. The following parameters were used for the morphological and functional characterisation of the follicle:

- Size of the follicle
- Consistency of the follicular wall (thickness and level of vascularization)
- Morphological consistency of the granulosa cells (number, colour and quality of their connection)
- Existence of apoptosis (DNA split pattern by agarose gelelectrophoresis)
- Concentration of oestradiol and progesterone in the follicular fluid determined by radioimmunoassay
- Morphological finding of the cumulus oocyte complex (compactness and expansion level)
- Chromatin configuration of the oocyte evaluated by use of Hoechst 33258 fluorescent stain

These examinations yielded the following results:

1. The number of follicles per ovary was 5.7 ± 3.3 . The dominant follicle showed a noticeable increase in size from the early to the late oestrous (from 41.8 ± 7.5 mm to 49.7 ± 1.3 mm). The size of the subordinate follicles remained nearly constant through the whole oestrous, but showed a bigger variability at the end of the oestrous (20.9 ± 3.7 mm during early and 22.3 ± 12.5 mm during late oestrous).
2. 14 of the evaluated 17 dominant follicles were rated intact by the criteria of the follicular wall. The remaining three follicles from the early and middle oestrous showed a insufficient vascularization of the follicular wall and signs of atresia of the granulosa cells. Two dominant follicles from the early oestrous showed signs of apoptosis.
3. The 80 evaluated subordinate follicles were rated by morphological criteria and yielded five (6.8%) intact ones and 75 (93.7%) atretic ones. Ten (67%) follicles showed signs of apoptosis in the early oestrous, whereas this number dropped to nine and six (both 37%) in the medium and late oestrous.
4. The oestradiol concentration in the follicular fluid of the dominant follicles increased from the early (57.1 ± 8.4 ng/ml) to the late oestrous (74.1 ± 7.1 ng/ml). The progesterone concentration (29.9 ± 17.9 ng/ml) showed a high variability and was invariant with the oestrous. Subordinate follicles showed very heterogenous oestradiol (15.3 ± 20.1 ng/ml) and progesterone concentrations (8.0 ± 9.8 ng/ml).
5. From the total number of 97 evaluated follicles 56 cumulus oocyte complexes were obtained (recovery rate 57.7%). Three of 13 oocytes gained from dominant follicles had a compact, whereas nine had an expanded cumulus mass and one was denuded. The oocytes of these follicles were in the germinalvesicle stage. 36 (84%) of the 43 oocytes gained from subordinate follicles had expanded cumulus mass and seven (16%) were denuded. Four (18%) of the oocytes from subordinate follicles were in the state of germinalvesicle breakdown.

The achieved results emphasise remarkable morphological and functional differences between dominant and subordinate follicles. More than 90% of the subordinate follicles were in the stage of atresia which is marked by an apoptotic process. It is also remarkable that the atresia of the follicle is linked with the loss of its ability to keep the oocyte in meiotic arrest.