

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Granulosazellen auf die Kernreifung porziner Oozyten untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Gesichtspunkte berücksichtigt: 1. die Follikelgröße bei der Gewinnung der Granulosazellen, 2. die Kultivierungsform (frische Zellsuspension oder präinkubierte Monolayer, z. T. mit Passagierung), 3. die Konditionierung des Mediums durch Granulosazellen, 4. speziesbedingte Unterschiede des Granulosazelleinflusses, 5. Interaktionen mit den potentiell reifungsbeeinflussenden Faktoren EGF und FSH.

Porzine Granulosazellen wurden in einer Ausgangskonzentration von 10^6 lebenden Zellen/ml Medium verwendet und entweder zu Beginn der 48stündigen Kokultivierungsphase als Suspension den Eizellen zugegeben oder drei bzw. fünf Tage (nach Passagierung) präinkubiert. Die Gewinnung der Granulosazellen erfolgte aus unterschiedlich großen Follikeln (<3 mm und >6 mm Follikeldurchmesser). Konditioniertes Medium wurde nach entsprechender Kultivierungsdauer der Zellen von den Monolayern gewonnen. Bovine Granulosazellen wurden aus 2-5 mm großen Follikeln gewonnen und 3-4 Tage vorinkubiert. Humaner rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor wurde in zwei Konzentrationen (1 bzw. 10 ng/ml) und in Kombination mit Granulosazellen verwendet. Porzines hochgereinigtes follikelstimulierendes Hormon (FSH) wurde dem Medium in einer Konzentration von 1 µg/ml allein und in Kombination mit EGF (1 ng/ml) oder Granulosazellen zugesetzt. Die Eizellen wurden aus 2-5 mm großen Follikeln gewonnen und bei 39°C über 48 Stunden inkubiert. In vier Versuchsabschnitten wurden insgesamt 4588 Eizellen kultiviert und beurteilt. Ausgewertet wurde das Anheftungsverhalten der Oozyten nach der Kokultivierung mit Granulosazellen, die Kumulusexpansion der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) und das Kernreifungsstadium der Oozyten.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Die Anheftung der KOK an den Granulosazellmonolayer beeinflusste die Kernreifung nicht.
2. Eine Kumulusexpansion wurde nur in Medien mit FSH-Zusatz beobachtet.
3. Die Kernreifung porziner Oozyten wurde durch porcine Granulosazellen, die aus Follikeln unterschiedlicher Größe gewonnen und als Monolayer kultiviert wurden, nicht gehemmt (Kontrolle: 62,3%, Granulosazellen aus Follikeln >6mm: 76,6%, aus Follikeln <3mm 69,6%). Granulosazellen aus großen Follikeln stimulierten die Reifung im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$).
4. Durch Granulosazellen konditioniertes Medium beeinflusste die Kernreifung porziner Oozyten nicht (Metaphase II-Raten in konditioniertem Medium zwischen 67,8 und 77,2%, Kontrollgruppe 72,7%).
5. Die Kokultivierung mit Monolayern aus Rindergranulosazellen führte zu einer Stimulation der Kernreifung von Schweineeizellen (76,0%, übrige Versuchsgruppen: 61,9-71,6%).
6. Bei Kultivierung in frischer Zellsuspension verharnte im Vergleich zur Kontrolle und anderen Zellkultursystemen ein größerer Prozentsatz der Eizellen im Germinal-vesicle-Stadium (12,2% gegenüber 8,2% in der Kontrolle, andere Versuchsgruppen 0,0-3,8%). Gleichzeitig war die Metaphase II-Rate gegenüber der Kontrollgruppe entweder signifikant erhöht (71,6%, Kontrolle: 61,9%, $p < 0,05$) oder entsprach der Kernreifungsrate der Oozyten im Kontrollmedium (57,9%, Kontrolle: 58,1%).

7. Der Zusatz von EGF zum Medium stimulierte die Kernreifung. EGF war in der geringeren Konzentration wirksamer als in der höheren (1 ng/ml: 75,3%, 10 ng/ml: 69,8%). In Kombination mit den Granulosazellen wurde keine Steigerung der Reifungsergebnisse erzielt (77,1%). Durch Kombination von EGF und FSH wurde ein 100%iger GVBD und die höchste Kernreifungsrate aller Versuchsgruppen erreicht (83,8%). Der Zusatz von FSH stimulierte Kumulusexpansion und Kernreifung (80,5%). In Kombination mit Granulosazellen wurden ähnliche Reifungsergebnisse erzielt (82,9%).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich eine Reifungshemmung durch die Kokultur mit porzinen Granulosazellen nicht bestätigen. Die Reifungsraten entsprachen größtenteils den in der Kontrollgruppe erzielten Ergebnissen. Die Kernreifung ließ sich sowohl durch Kokultur mit Rindergranulosazellen als auch durch Zugabe von EGF oder FSH allein oder in Kombination mit Granulosazellen signifikant steigern.

7 Summary

Petra Sommer

Investigations into the in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte-complexes via granulosa cells

The present experiments investigated the effects of granulosa cells on the in vitro maturation of porcine oocytes. The following aspects were covered:

1. the follicle size from which the granulosa cells were obtained (follicle diameter >6 mm or <3 mm),
2. the culture system for granulosa cells (used as fresh cell suspension or preincubated monolayers, with passages),
3. conditioning of culture media with granulosa cells,
4. the use of granulosa cells from other species ,
5. the interactions of granulosa cells with other potentially maturation promoting factors such as EGF/FSH.

Porcine granulosa cells in concentration of 10^6 viable cells/ml medium were either used as a suspension or after preculture for three or five days (with passages) before using for a 48 h coculture with cumulus-oocyte-complexes. Porcine granulosa cells were collected from follicles of different size (<3 mm, >6 mm). The medium in which the granulosa cells were cultured for 3 or 5 days was collected and used as conditioned medium. Bovine granulosa cells were collected from 2-5 mm size follicles and similarly pre-incubated for 3 to 4 days. EGF was used in two concentrations (1 and 10 ng/ml) alone or at a concentration of 1 ng/ml when used in combination with granulosa cells. P-FSH at a concentration of 1 μ g/ml was tested either alone or in combination with EGF (1 ng/ml) or with added granulosa cells. Oocytes were collected from 2-5 mm follicles and incubated for 48 h at 39°C in a humidified atmosphere. In four trials, a total of 4588 oocytes was studied. Following culture of oocytes, their adherence to the monolayers, cumulus expansion and the stage of nuclear maturation were recorded.

The following results were obtained:

1. Adherence of COC to the granulosa cells did not affect nuclear maturation.
2. Cumulus expansion only occurred in media enriched with FSH.
3. The nuclear maturation of the oocytes was not inhibited, regardless of the size of the follicles from which granulosa cells were obtained for coculture of porcine oocytes with the monolayer. A significantly better maturation of oocytes was obtained when granulosa cells from large follicles were used as compared to the control group (control group 62.3%, granulosa cells from follicles >6 mm: 76.6%, $p < 0.01$), while no differences existed between the control group and granulosa cells from follicles <3 mm (69.6%).
4. Conditioned media did not alter nuclear maturation of porcine oocytes (rate of metaphase II 67.8 to 77.2%, control group 72.7%).
5. Bovine granulosa cells as a monolayer for the coculture of porcine COC stimulated nuclear maturation (metaphase II 76.0% vs 61.9-71.6%).
6. When cultivated in a fresh cell suspension a higher percentage of oocytes remained in germinal vesicle stage as compared to controls and other culture methods (GV 12.2% vs 8.2% in the control group, other culture groups from 0.0 to 3.8%). At the same time either a significantly higher percentage of metaphase II oocytes was obtained in the cell suspension as compared to the control (71.6 vs 61.9%, $p < 0.05$), or coculture with a cell suspension did not alter the nuclear maturation rate (57.9 vs 58.1%).

7. The addition of EGF to the culture medium stimulated maturation of oocytes. EGF was maximal effective at the lower concentration of 1 ng/ml (75.3%) compared to EGF at the concentration of 10 ng/ml (69.8%). When used in combination with granulosa cells the maturation rate remained unchanged. When used in combination with FSH 100% GVBD with a very high nuclear maturation (83.8%) was observed. Addition of FSH stimulated cumulus expansion and nuclear maturation. Supplementation with granulosa cells did not increase the maturation rate (80.5 vs 82.9%).

The present results do not show an inhibitory effect of porcine granulosa cells on the maturation of porcine oocytes since the maturation rate was comparable to control groups in most of the trials. This is in apparent contrast to previous reports in the literature. Higher percentage of nuclear maturation was achieved either in coculture with bovine granulosa cells or by the use of EGF or FSH alone or in combination with granulosa cells.