

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der Kultivierung präimplantativer Kaninchenembryonen in definierten Medien untersucht. Zur Wahl geeigneter definierter Grundmedien für Kaninchenembryonen wurde in Experiment 1 die Brauchbarkeit von neun komplexen und drei einfachen Medien für die Kultivierung von drei Embryonalstadien (1-Zeller, frühe Morulae, späte Morulae) geprüft. Die kultivierten Embryonen wurden im Abstand von 24 Stunden morphologisch beurteilt. In Experiment 2 wurden in fünf Versuchen den ausgewählten chemisch definierten Grundmedien (KF, Ham's F10, CZB u. CMRL) als synthetische oder hormonelle Medienzusätze PVA, EDTA, Steroide, Thyroide oder Insulin zugesetzt. Die Entwicklung von 2-4-Zellern im definierten Medium RD (CARNEY u. FOOTE, 1991) wurde in Experiment 3 mit der im definierten Medium KF verglichen. Für die Versuche standen insgesamt 4264 Kaninchenembryonen von 145 superovulierten Spendertieren zur Verfügung.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Die Kultur von Kaninchenembryonen bis zum Stadium der expandierten Blastocyste ist in definierten Medien möglich. Die höchsten Expansionsraten bei 2-4-Zellern wurden in CMRL mit 39,3% und in Medium RD + Insulin (35,7%) erreicht. Im Medium KF mit Thyroidhormonen (T3 + T4) und EDTA (0,01mM) expandierten 59,2% der kultivierten frühen Morulae.
2. Die Kompaktierungsraten bei 2-4-Zellern und frühen Morulae blieben von der Komplexität der definierten Medien unbeeinflusst. Zwischen dem einfachen Medium CZB und den komplexen Medien KF und Ham's F10 mit und ohne PVA Zusatz bestanden keine signifikanten Unterschiede. Im Medium CZB ergänzt durch Glucose und drei Aminosäuren (Methionin, Threonin, Serin) wurde mit 63,1% die höchste Kompaktierungsrate der kultivierten Einzeller erzielt und ebenso mit 68,9% die höchste Kompaktierungsrate der kultivierten frühen Morulae. Blastulation und Expansion der Kaninchenembryonen erfordern jedoch ein komplexes Medium. Im definierten CZB-Medium konnten 2-4-Zeller weder blastulieren noch expandieren. Lediglich frühe Morulae konnten bei Ergänzung des Mediums CZB mit PVA in geringem Ausmaß Blastulation und Expansion erreichen (1,2%).

3. Im Medium KF wurden von den kultivierten frühen Morulae teilweise signifikant bessere Blastulations- (KF +0,01mM EDTA: 44,8% gegenüber 23,1% in F10 +0,01mM EDTA) und Expansionsraten (KF +0,01mM EDTA: 16,4% gegenüber 1,5% in F10 + 0,01mM EDTA) erreicht als in Ham's F10. Auch die kultivierten 2-4-Zeller entwickelten sich im Medium KF mit den jeweiligen Zusatzstoffen meist signifikant besser als in Ham's F10. Die Entwicklungsretardierung im Medium Ham's F10 ist vermutlich auf die Bildung zellschädigender Sauerstoffradikale beim Hypoxanthinabbau zurückzuführen. Im Medium RD wurden jeweils höhere Entwicklungsraten der kultivierten 2-4-Zeller erzielt als im Medium KF. Für die Blastulationsrate nach 72h im Medium RD + Insulin (64,3%) war der Unterschied signifikant zu KF + Insulin (29,4%). Im Medium RD wird wahrscheinlich den Anforderungen der sich schnell teilenden Blastomeren für die Erstellung von Zellmembranen durch Bereitstellung hoher Mengen der Grundbausteine Glutamin und Inositol entsprochen. Das komplexe Medium CMRL konnte die Entwicklungsraten der kultivierten 2-4-Zeller nicht über die in Medium KF erzielten Raten steigern. Die in diesem Medium zusätzlich enthaltenen Stoffe (Nukleotide; Enzyme; Energieäquivalente des Zellstoffwechsels) hatten keinen positiven Einfluß auf die embryonale Entwicklung.

4. Durch Pyruvatsubstitution der Kulturmedien konnten insbesondere die Kompaktierungsraten der ab dem 2-4-Zeller kultivierten Embryonen und die Blastulations- und Expansionsraten vom frühen Morulastadium an signifikant gesteigert werden. Die Kompaktierungsrate von 2-4-Zellern war in CMRL (mit 0,33mM Pyruvat) mit 82,1% hochsignifikant besser als ohne Pyruvat (38,2%). Expansions- (16,7%) und Blastulationsrate (54,2%) kultivierter früher Morulae waren im Medium KF mit 0,33mM Pyruvat signifikant höher als im Medium Medium KF ohne Pyruvat (31,1%; 2,2%). Obwohl 2-4-Zellstadien vom Kaninchen über erhebliche endogene Energiereserven verfügen und ab dem Morulastadium Glucose über die Glykolyse und den Zitratzyklus energiebringend verstoffwechselt werden können, ist die Versorgung mit Pyruvat in beiden Stadien entwicklungsfördernd.

5. Durch makromolekulare Medienzusätze (PVA, Insulin) konnte die Handhabung der in definierten Medien kultivierten Embryonen wesentlich vereinfacht werden. Eine Adhäsion der Embryonen an den Kulturgefäßen blieb bei Zugabe beider Makromoleküle aus.

6. Alle hormonellen Medienzusätze (Insulin; Östradiol 17 β ; Progesteron; Trijodthyronin T3 u. Thyroxin T4) waren in der Lage die Kompaktierungs-, Blastulations- und Expansionsraten sowohl von kultivierten frühen Morulae als auch von 2-4-Zellern über die im definierten Medium KF ohne Zusatz erzielten Entwicklungsraten zu steigern. Signifikanz bestand für die Blastocystenbildungsraten der ab dem frühen Morulastadium kultivierten Embryonen und bei deren Expansionsraten in den Medien KF + Insulin (54,9% gegenüber 36,1%) und KF + T3+T4 +EDTA (59,2% gegenüber 36,1%). Ein signifikanter Unterschied bestand auch für die Kompaktierungsrate der in KF +Östradiol 17 β (80,0% gegenüber 58,3%) u. KF +Progesteron (87,3% gegenüber 58,3%) kultivierten 2-4-Zeller. Die in den NBCS ergänzten Medien erzielten Expansionsraten früher Morulae und die Blastulations- und Expansionsraten von 2-4-Zellern wurden jedoch nicht erreicht. Die Entwicklungsraten in den serumsupplementierten Medien waren in diesen Fällen signifikant höher.

7. In den serumhaltigen Kontrollmedien zeigte sich ein biphasischer Effekt des Serums. Während die Kompaktierungsraten in allen Versuchen gegenüber den nicht serumhaltigen Medien meist signifikant reduziert waren, zeigte sich für Blastulation und Expansion insbesondere der kultivierten 2-4-Zeller ein fördernder Einfluß des Serums. In Versuch 4 expandierten im serumhaltigen Medium KF signifikant mehr der kultivierten frühen Morulae (77,9%) als in den serumfreien Medien (\leq 59,2%). In Versuch 5 waren im serumhaltigen Medium KF sowohl die Blastocystenbildungsraten (80,0%) als auch Expansionsraten (42,9%) signifikant höher als in den serumfreien Medien (\leq 45,9% bzw. \leq 26,2%).

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, daß präimplantative Kaninchenembryonen in einfachen Kulturmedien in ausreichendem Maße kompaktieren, während für die Blastocystenbildung und -expandierung komplexe Medien erforderlich sind. Die Zugabe von Pyruvat verbessert die Entwicklung sowohl von 2-4-Zellern als auch von frühen Morulae. Synthetische Medienhilfsstoffe können zumindest teilweise die Funktionen eines Serum-Zusatzes übernehmen, so daß eine Entwicklung bis zur expandierten Blastocyste in definierten Medien möglich ist. Allerdings ist das Entwicklungspotential dieser in vitro gewachsenen Embryonen noch in vivo nach Transfer auf geeignete Empfängertiere zu überprüfen.

Andrea Berkenhoff

In vitro development of preimplantation rabbit embryos in chemically defined media supplemented with synthetic macromolecules (PVA, EDTA) or various hormones (thyroxine, triiodothyronine, estradiol 17 β , progesterone, insulin).

7

Summary

The work described above examined the possibility of culturing preimplantation rabbit embryos in defined medium. Experiment 1 tested nine complex media and three simple media for cultivation of embryos at three stages of development (zygotes, early morulae, and late morulae). The embryos were evaluated morphologically every 24 hours and four basic chemically defined media were selected for further study (KF, Ham's F10, CZB and CMRL). Experiment 2 assessed the effect of supplementation of these selected media with synthetic or hormonal additives including PVA, EDTA, steroid hormones, thyroid hormones and insulin. Experiment 2 consisted of five separate studies with 2-4 cell embryos and early morulae. The development of 2-4 cell embryos in chemically defined RD medium (CARNEY and FOOTE, 1991) was compared to that in chemically defined KF medium in Experiment 3. A total of 4264 rabbit embryos obtained from 145 superovulated donor animals were used in these studies. Compaction rate, blastulation rate and expansion rate were defined as the percentage of cultured embryos developing to compacted morulae, blastocysts or expanded blastocysts respectively.

The following results were obtained:

1. It is possible to culture rabbit embryos to the expanded blastocyst stage in chemically defined medium. The highest expansion rates for 2-4 cell embryos were 39.3% in CMRL medium and 35.7% in RD medium + insulin. In KF medium supplemented with thyroid hormones (T3 and T4) and EDTA (0.01 mM), 59.2% of early morulae developed into expanded blastocysts.
2. The compaction rate for 2-4 cell embryos and early morulae was not influenced by the complexity of defined media. There was no significant difference between the simple CZB medium and the complex media KF and Ham's F10 medium with or without PVA. CZB medium enriched with glucose and three amino acids (methionine, threonine, and serine) gave the highest compaction rate (63.1%) from cultivated zygotes

and also gave the highest success rate (68.9%) for cultivation of early morulae. Early rabbit embryos develop to the blastocyst or expanded blastocyst stage only in complex media. In simple CZB medium 2-4 cell embryos can not be cultured to expanded blastocysts. In CZB medium supplemented with PVA alone, only a very small proportion (1.2%) of early morulae can be cultured to expansion and blastulation.

3. Cultured early morulae had a significantly higher blastulation rate in KF medium than in Ham's F10 medium (44.8% with KF + 0.01 mM EDTA vs. 23.1% with Ham's F10 + 0.01 mM EDTA) and a significantly higher expansion rate (16.4% in KF + 0.01 mM EDTA vs. 1.5% in Ham's F10 + 0.01 mM EDTA). Similarly, 2-4 cell embryos developed significantly better in KF medium with EDTA supplementation than in Ham's F10. Developmental retardation in Ham's F10 is possibly due to cellular damage caused by oxygen radicals released by the degradation of hypoxanthine. RD medium was, in all cases, better for 2-4 cell embryos than KF medium and the blastulation rate after 72 h in RD medium + insulin (64.3%) was significantly better than in KF medium + insulin (29.4%). RD medium contains high concentrations of glutamine and inositol and it is suggested that these are essential because of the requirement for the synthesis of cell membranes in the rapidly dividing cells of the blastocyst. The complex medium CMRL could not produce a higher development rate than that achieved by KF medium. This suggests that the additional components in the complex medium (ie. nucleotides, enzymes, and energy sources for cellular metabolism) produce no positive effect on embryonal development.

4. It is possible to significantly increase the compaction rate for cultured 2-4 cell embryos and the blastulation and expansion rates for cultured early morulae by including pyruvate in the culture medium. The compaction rate of 2-4 cell embryos cultured in CMRL with 0.33 mM pyruvate was at 82.1% significantly better than that of 2-4 cell embryos in this medium without pyruvate (38.2%). Similarly, the expansion rate (16.7%) and the blastulation rate (54.2%) for cultured early morulae were significantly higher in KF medium with 0.33 mM pyruvate than in KF medium without pyruvate (31.1%, 2.2%). Despite the fact that 2-4 cell stage rabbit embryos contain considerable endogenous energy reserves and morula stage embryos derive metabolic energy primarily from glucose by glycolysis and the citric acid cycle it is possible to improve development at both stages by providing pyruvate.

5. The addition of macromolecular substances such as PVA and insulin greatly facilitates the handling of cultured embryos in chemically defined media. Adhesion of the embryos to the culture dish is prevented by addition of either of these macromolecules.

6. Using KF medium, all of the hormone additives tested (insulin, estradiol 17 β , progesterone, tri-iodo-thyronine (T3) and thyroxin (T4)) gave increased rates of compaction, blastulation and expansion over that achieved in KF medium without supplementation both in the culture of 2-4 cell embryos and in the culture of early morulae. This difference was significant for the expansion rates for KF medium + insulin (54.9%) and for KF medium + T3 + T4 + EDTA (59.2%) as compared to the expansion rate of 36.1% in KF alone using early morula stage embryos. Significant differences also exist between the compaction rates in KF + estradiol 17 β (80.0%) and KF + progesterone (87.3%) as compared to the compaction rate of 58.3% in KF alone using 2-4 cell embryos. These hormone additives never resulted in expansion rates equal to those achieved by NBCS supplementation in tests with early morulae or in blastulation and expansion rates for 2-4 cell embryos. The rates of development in serum supplemented medium were always significantly higher.

7. A biphasic effect of the serum was observed in analysis of results obtained in serum containing control media. Compaction rates were generally reduced (significantly in most cases) in the presence of serum. On the other hand, serum had a stimulatory effect on blastocyst formation and expansion especially in 2-4 cell embryos.

Conclusion:

The results of this investigation demonstrate that preimplantation rabbit embryos undergo compaction in simple culture media while blastocyst formation and expansion require complex culture media. The addition of pyruvate improves the in vitro development of 2-4 cell embryos as well as early morulae. Synthetic macromolecules can, at least partly, replace the functions of serum thus enabling development up to the expanded blastocyst stage in defined culture media. The developmental potential of in vitro grown embryos must, of course, eventually be tested in vivo by transfer into appropriate recipients.