

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß des Wachstumsfaktors Platelet-derived growth factor (PDGF) auf die präimplantative Embryonalentwicklung in vitro produzierter Rinderembryonen aus Oozyten von Schlachthofovarien zu untersuchen. Dabei wurden in vitro mit Hormonen gereifte Oozyten mit durch Swim up separiertem, in vitro kapazitiertem und Heparin-behandeltem Tiefgefriersperma eines Holsteinbullens in vitro fertilisiert und mit Kumuluszellen bis zur geschlüpften Blastozyste kokultiviert. Als Grundmedium dienten TCM 199 für Maturation und Kultivierung der Embryonen, und Sperm- und Fert-Talp (PARRISH et al. 1986) für die Fertilisierung in vitro. In vitro Reifung und Fertilisierung wurden durch Fixation und Färbung von Oozyten und die Teilungs- und Entwicklungsraten der Embryonen durch stereomikroskopische Beurteilung festgestellt. Für die Untersuchungen erfolgte die Gewinnung von 23.734 Oozyten aus 1399 Ovarien mit der Slicing-Methode. In allen Untersuchungen fand zusätzlich eine morphologische Beurteilung und Unterteilung in Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) der Qualitätsklassen 1 und 2 statt. Im ersten Teil der Studie wurden ein serumfreies und ein definiertes Kulturmedium entwickelt, indem östrisches Kuhserum (OCS) durch bovines Serumalbumin (BSA) oder das synthetische Makromolekül Polyvinylalkohol (PVA) ersetzt wurde, um entwicklungsfördernde oder -inhibierende Effekte dem Wachstumsfaktor und nicht ungewollten "Kontaminanten" der eingesetzten undefinierten Proteinquellen (Serum oder BSA) zuordnen zu können. Der zweite Teil der Arbeit befaßte sich mit der Bedeutung von PDGF in der in vitro Produktion von Rinderembryonen in serumfreiem Medium. Es wurden 3 verschiedene Konzentrationen (1/10/100 ng/ml) des Wachstumsfaktors jeweils entweder ins in vitro Reifungs-, Fertilisierungs- oder Kulturmedium an Tag 1 zugegeben. Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Versuchen und in Anlehnung an die Literatur (LARSON et al. 1992b; THIBODEAUX et al. 1993b; B.K. YANG et al. 1993) erfolgte dann der PDGF-Zusatz (1 ng/ml) ins Fertilisierungs- und/oder Kulturmedium an Tag 3. Abschließend wurde der Einfluß der Lagerungsdauer des PDGF-Präparates auf die Wirkungsfähigkeit geprüft, indem PDGF (10 ng/ml) dem Fertilisierungsmedium zugesetzt wurde.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet :

- 1.) Kernreifung und Vorkernbildung nach in vitro Fertilisierung waren bei Embryonen aus KOK verschiedener morphologisch beurteilter Qualitätsklassen

gleich. Eine bessere Entwicklungsfähigkeit von Embryonen aus KOK der Qualitätsklasse 1 manifestierte sich erst ab dem Morula- oder Blastozystenstadium, war aber nur zum Teil statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) abzusichern (siehe Tabellen im Anhang).

- 2.) Die Kernreifung in vitro war in Medium mit Serumsupplementation oder BSA- bzw. PVA-Zusatz gleich (bis 83 %), wobei die Konzentration von BSA (1/6/10 mg/ml) keine Rolle spielte. Bis zu 100 % GVBD (Germinal vesicle breakdown) wurde beobachtet.
- 3.) Die Vorkernbildung lag nach in vitro Fertilisierung in Medium mit Proteinsupplementation bei bis zu 65 %, ohne Proteinzusatz (PVA-Zugabe) um 20 % - 30 %. Dabei war die Penetration der Oozyten in beiden Medien gleich hoch und lief zeitlich parallel ab (bis 79 % penetriert). Die Vorkernbildung setzte in Medium mit PVA später ein und hatte auch 24 h nach Beginn der Spermien-Oozyten-Kokultur noch nicht ihr Maximum erreicht. Ferner wurden Polyspermieraten bis 7 % und Teilung bis zu 8-Zellern nach Parthenogenese von 8 % festgestellt.
- 4.) Die Entwicklungsraten bis zur Blastozyste (bezogen auf die eingesetzten Oozyten) lagen in Medium mit Protein (OCS oder BSA) bei bis zu 26 % (Teilungsrate bis 73 %, geschlüpfte Blastozysten bis 56 %), in Medium mit PVA bei bis zu 16 % (Teilungsrate bis 59 %, geschlüpfte Blastozysten bis 38 %). Die Konzentration von BSA spielte keine Rolle. In allen Versuchsgruppen traten große Schwankungen auf, daher waren die Entwicklungsraten in Medium ohne Proteinsupplementation nur zum Teil statistisch signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ) (siehe Tabellen im Anhang). In Medium mit PVA-Zusatz erfolgte keine Bildung eines Monolayers aus Kumuluszellen wie in den anderen Gruppen, sondern eine frei schwimmende Zusammenlagerung von Kumuluszellhaufen und Embryonen ohne Anheftung an den Boden der Petrischale.
- 5.) BSA kann unabhängig von der Konzentration (1/6/10 mg/ml) als vollständiger Serumersatz bezeichnet werden, in dem Oozyten/Zygoten ohne Verringerung der Entwicklungsraten kultiviert werden können.

- 6.) PDGF-Zusatz in Reifungs- oder Kulturmedium an Tag 1 bei PVA-Zusatz oder in Medium mit BSA-Supplementation hatte keinen positiven Effekt. Die verringerte Vorkernbildung in Fertilisierungsmedium mit PVA konnte auch durch PDGF-Zusatz, unabhängig von der Konzentration, nicht verhindert werden. Bei Zusatz von PDGF ins Reifungsmedium mit PVA und anschließender in vitro Fertilisierung in proteinfreiem Medium wurde eine weitere konzentrationsunabhängige Verminderung der Vorkernbildung bei Oozyten der Qualitätsklasse 2 beobachtet (OCS  $57,0 \pm 29,7 \%^a$ , PVA  $35,4 \pm 37,4 \%$ , PDGF-Zusatz  $18,5 \pm 9,0 \%^b$ ;  $a : b = p < 0,05$ ).
- 7.) Durch PDGF-Zusatz (1 ng/ml) in Fertilisierungs- und/oder Kulturmedium an Tag 3 konnte die Morularate (bezogen auf die gesamt kultivierten Oozyten) in Medium mit PVA-Zusatz fast auf das Niveau wie in Medium mit Serumsupplementation gesteigert werden (OCS  $32,1 \pm 16,3 \%^a$  aus KOK Kl.1 bzw.  $24,8 \pm 13,1 \%^a$  aus KOK Kl.2, PVA  $16,6 \pm 2,7 \%^b$  aus KOK Kl.1 bzw.  $9,7 \pm 2,3 \%^b$  aus KOK Kl.2, PDGF-Zusatz  $24,3 \pm 10,5 \%$  bis  $27,4 \pm 7,6 \%$  aus KOK Kl.1 bzw.  $17,8 \pm 6,9 \%$  bis  $18,8 \pm 1,0 \%$  aus KOK Kl.2,  $a : b = p < 0,05$ ). Durch PDGF im Kulturmedium an Tag 3 wurde das Morulastadium von Embryonen aus KOK der Qualitätsklasse 1 etwas früher erreicht (Morulae an Tag 5/Morulae insgesamt : OCS  $98,2 \pm 3,6 \%$ , PVA  $81,6 \pm 12,8 \%$ , PDGF-Zusatz  $94,1 \pm 6,8 \%$ ).
- 8.) PDGF im Fertilisierungsmedium mit PVA-Zusatz steigerte die Blastozystenrate (bezogen auf die eingesetzten Oozyten) konzentrationsunabhängig gegenüber der Kontrolle mit PVA-Supplementation ohne Wachstumsfaktor statistisch signifikant (OCS  $5,3 \pm 6,2 \%^{a,b}$ , PVA  $3,6 \pm 1,4 \%^a$ , PDGF-Zusatz  $11,5 \pm 5,3 \%^b$ ;  $a : b = p < 0,05$ ), während die Blastozystenrate nicht mehr signifikant gesteigert war, sobald PDGF im Kulturmedium an Tag 3 vorhanden war (nur im Kulturmedium an Tag 3:  $7,9 \pm 2,9 \%$ ; in Fertilisierungs- und Kulturmedium an Tag 3:  $7,0 \pm 3,1 \%$ ).
- 9.) Der Zusatz von PDGF im Fertilisierungs- und Kulturmedium an Tag 3 mit PVA-Zusatz brachte keine weitere Steigerung der Entwicklungsraten bezogen auf die eingesetzten Oozyten (PDGF im Fertilisierungsmedium  $18,1 \pm 8,4 \%$  Morulae bzw.  $11,5 \pm 5,3 \%$  Blastozysten, PDGF im Kulturmedium an d3  $18,8 \pm 1,0 \%$  Morulae bzw.  $7,9 \pm 2,9 \%$  Blastozysten, PDGF in Fertilisierungs- und Kulturmedium an d3  $17,8 \pm 6,9 \%$  Morulae bzw.  $7,0 \pm 3,1 \%$  Blastozysten).

10.) Lange tiefgefroren gelagerter PDGF (10 ng/ml) hat bei Zugabe ins Fertilisierungsmedium mit PVA eine fast statistisch signifikante Verringerung der Blastulationsrate (bezogen auf geteilte Oozyten) von Embryonen aus KOK der Qualitätsklasse 2 gegenüber der OCS-Gruppe zur Folge, kurzzeitig gelagerter PDGF nicht (OCS  $21,5 \pm 27,4$  %, PVA  $5,4 \pm 7,3$  %, PDGF "alt"  $1,4 \pm 2,8$  %, PDGF "neu"  $9,2 \pm 10,6$  %, Mittelwertsdifferenz für  $p < 0,05$  : 22,9).

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, daß Unterschiede in der Entwicklungsfähigkeit von Embryonen aus KOK verschiedener morphologisch beurteilter Qualitätsklassen erst in der Entwicklung zu Morulae oder Blastozysten deutlich werden und großen Schwankungen unterliegen. Die in vitro Produktion von Rinderembryonen bis zur geschlüpften Blastozyste in einem definierten Kulturmedium bei PVA-Zusatz ist mit annähernd gleichen Entwicklungsraten wie in serumhaltigen Medium möglich. Serum (OCS) kann durch BSA konzentrationsunabhängig ersetzt werden ohne Verringerung der Entwicklungsraten. Ein Proteinzusatz für in vitro Reifung, Fertilisierung und Kultur erscheint nicht unbedingt erforderlich, ebensowenig wie die Ausbildung eines Monolayers bei Kokultivierung mit somatischen Zellen. Allerdings ist eine retardierte Vorkernentwicklung bei in vitro Fertilisierung in Medium mit PVA möglich, was einen Qualitätsverlust der Embryonen bedeuten könnte. Dies kann nur durch weitere Untersuchungen und Transfers von in vitro in Medium mit PVA-Zusatz produzierten Embryonen festgestellt werden.

Der Wachstumsfaktor PDGF kann bei Anwesenheit in der in vitro Fertilisierung oder Kultur der Embryonen ab Tag 3 die präimplantative Embryonalentwicklung in vitro produzierter Rinderembryonen unterstützen. Der Zusatz zum Fertilisierungs- und Kulturmedium an Tag 3 bringt keine weitere Steigerung der Entwicklungsrate. Dabei wirkt PDGF konzentrationsunabhängig und nur in Medium ohne zusätzliche Proteinsupplementation. Die Dauer der Lagerung von tiefgefrorenem PDGF nach Portionierung scheint Einfluß auf die Wirkung von PDGF zu haben.

## 7. SUMMARY

Judith Eckert

Experimental investigations into the role of platelet-derived growth factor (PDGF) in the in vitro production of bovine embryos derived from cumulus-oocyte-complexes of different morphological categories

The aim of the present study was to investigate the effects of platelet-derived growth factor (PDGF) on the development of in vitro produced bovine preimplantation embryos derived from slaughterhouse ovaries. Oocytes matured in vitro with hormones and fertilized with swim-up separated, heparin-treated, frozen-thawed bull spermatozoa were cocultured with cumulus cells up to the hatched blastocyst. Cumulus-oocyte-complexes (COC) were evaluated morphologically and placed into two categories. TCM 199 served as basic medium for in vitro maturation and culture and Sperm- and Fert-Talp (PARRISH et al. 1986) for in vitro fertilization. Maturation- and fertilization rate were determined by fixation and staining of oocytes with aceto-orcein. The developmental rates were assessed by stereomicroscope at 40 x magnification. A total of 23.734 oocytes were recovered from 1399 ovaries by the slicing-method. In the first part of the present study a serum-free defined culture medium was developed replacing estrous cow serum (ECS) by bovine serumalbumin (BSA) or by the synthetic macromolecule polyvinylalcohol (PVA) in order to elucidate the effects of the added growth factor. In the second part the role of PDGF was investigated by adding different concentrations of PDGF (1/10/100 ng/ml) either to in vitro maturation, fertilization or culture medium on day 1 supplemented either with BSA or PVA. Based on the results and these of the literature (LARSON et al. 1992b; THIBODEAUX et al. 1993b; B.K. YANG et al. 1993), 1 ng/ml PDGF was then added to fertilization and/or culture medium on day 3. Finally the influence of duration of froze storage of PDGF was tested adding 10 ng/ml PDGF to fertilization medium after storage for less than 3 or more than 9 months.

The following results were obtained :

- 1.) Nuclear maturation and pronuclear formation were not influenced by the two different categories of COC. A better developmental capacity of embryos

derived from category 1 oocytes was first evident at the morula- or blastocyst stage but only partly statistically significant ( $p < 0.05$ ).

- 2.) Nuclear maturation (up to 83 %) did not differ in medium supplemented with serum, different concentrations of BSA (1/6/10 mg/ml) or PVA reaching up to 100 % GVBD (germinal vesicle breakdown).
- 3.) Pronuclear formation reached 65 % after in vitro fertilization in medium supplemented with protein and ca. 20 - 30 % in medium containing PVA. The time course of penetration did not differ in both media reaching up to 79 % penetrated oocytes. However, pronuclear formation was delayed in medium with PVA. Rates of polyspermy were up to 7 % and cleavage rates after parthenogenetic development of 8 % were observed.
- 4.) In medium supplemented with protein (ECS or BSA) developmental rates to the blastocyst stage (based upon cultured oocytes) up to 26 % were achieved (up to 73 % cleavage and up to 56 % hatched blastocysts) regardless of BSA concentration. In medium incorporating PVA up to 16 % blastocysts (up to 59 % cleavage and up to 38 % hatched blastocysts) were obtained. Within all experimental groups there was a great variability. Thus, the differences of developmental rates in medium with and without protein-supplementation were only partly statistically significant ( $p < 0.05$ ). Formation of a cumulus-cell-monolayer did not occur in medium with PVA, but a floating aggregation of cumulus-cells and embryos without contact to the bottom of the petri-dish was observed.
- 5.) BSA can replace serum (ECS) regardless of concentration (1/6/10 mg/ml) without any decrease of developmental rates in vitro.
- 6.) Addition of PDGF to maturation or culture medium on day 1 containing PVA or BSA did not have any stimulating effect on development. The delayed pronuclear formation in fertilization medium supplemented with PVA could not be compensated by PDGF regardless of the concentration. In vitro maturation in the presence of PDGF and in vitro fertilization in medium containing PVA led to further reduction of pronuclear formation in category II oocytes without influence

of the concentration of PDGF (ECS  $57.0 \pm 29.7 \%^a$ , PVA  $35.4 \pm 37.4 \%$ , PDGF-addition  $18.5 \pm 9.0 \%^b$ ;  $a : b = p < 0.05$ ).

- 7.) By adding PDGF (1 ng/ml) to fertilization and/or culture medium on day 3 supplemented with PVA the development up to the morula stage (based upon cleaved oocytes) was enhanced almost to levels of development in medium containing ECS (ECS  $32.1 \pm 16.3 \%^a$ , PVA  $16.6 \pm 2.7 \%^b$ , PDGF-addition  $24.3 \pm 10.5 \%$  up to  $27.4 \pm 7.6 \%$ ;  $a : b = p < 0.05$ ). PDGF in the culture medium on day 3 seemed to increase developmental speed to the morula stage slightly (morulae on day 5/total morulae : ECS  $98.2 \pm 3.6 \%$ , PVA  $81.6 \pm 12.8 \%$ , PDGF-addition  $94.1 \pm 6.8 \%$ ).
- 8.) Regardless of concentration PDGF added to fertilization medium containing PVA could increase the developmental rate to the blastocyst stage (based upon cultured oocytes) statistically significant compared to the control without PDGF (ECS  $5.3 \pm 6.2 \%^{a,b}$ , PVA  $3.6 \pm 1.4 \%^a$ , PDGF-addition  $11.5 \pm 5.3 \%^b$ ;  $a : b = p < 0.05$ ) while the statistical significance disappeared when PDGF was present in culture medium on day 3 (PDGF only in culture medium on day 3  $7.9 \pm 2.9 \%$ ; in fertilization and culture medium on day 3  $7.0 \pm 3.1 \%$ ).
- 9.) The combined presence of PDGF in fertilization and culture medium on day 3 containing PVA did not further enhance developmental rates based upon cultured oocytes (PDGF in fertilization medium  $18.1 \pm 8.4 \%$  morulae and  $11.5 \pm 5.3 \%$  blastocysts, PDGF in culture medium on d3  $18.8 \pm 1.0 \%$  morulae and  $7.9 \pm 2.9 \%$  blastocysts, PDGF in fertilization and culture medium on d3  $17.8 \pm 6.9 \%$  morulae and  $7.0 \pm 3.1 \%$  blastocysts).
- 10.) Long term stored PDGF (10 ng/ml) added to fertilization medium supplemented with PVA considerably decreased blastocyst formation rate (based upon cleaved oocytes) of embryos derived from category II oocytes compared with the ECS-group while short term stored PDGF did not (ECS  $21.5 \pm 27.4 \%$ , PVA  $5.4 \pm 7.3 \%$ , PDGF "old"  $1.4 \pm 2.8 \%$ , PDGF "new"  $9.2 \pm 10.6 \%$ , difference of the mean for  $p < 0.05 : 22.9$ ).

The results of the present study show that the different developmental capacity of embryos derived from different morphological categories of oocytes first becomes

evident at the morula- and blastocyst stage and large variations occur. In vitro production of bovine embryos up to hatched blastocyst in a defined culture system containing PVA is possible reaching almost identical developmental rates as in medium supplemented with serum. ECS can be completely replaced by BSA regardless of the concentration without any decrease of the development in vitro. Thus, protein supplementation is not necessary for in vitro maturation, fertilization and culture as well as monolayer formation in a coculture system with somatic cells. Pronuclear formation in oocytes fertilized in vitro in medium containing PVA occurred delayed and indicates a loss of embryo quality. This should be further investigated.

The growth factor PDGF can enhance the development of preimplantation bovine embryos when added to in vitro fertilization or culture on day 3. A combined presence of PDGF in fertilization and culture medium on day 3 does not further increase the developmental rates in vitro. PDGF acts regardless of concentration and only in medium without further protein supplementation indicating a compensation of suboptimal culture conditions in vitro. The duration of froze storage after first thawing for aliquotation seems to influence the effects of PDGF.