

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Methoden zur in vitro Entwicklung von Blastozystenstadien aus in vivo befruchteten Schweineembryonen im 2- und 4-Zellstadium zu vergleichen und, soweit wie möglich, entwicklungsunterstützende Faktoren zu charakterisieren. Die Untersuchungen wurden unter konstanten Kulturbedingungen und im split-sample Verfahren durchgeführt.

Die Embryonen wurden einen Tag nach der zweiten Belegung, die durch Besamung oder Natursprung erfolgte, aus dem Genitaltrakt superovulierter präpuberaler Jungsauen gewonnen. Eileiter und Uterushörner wurden nach Schlachtung und vor dem Entbluten entnommen und kurz danach gespült. 1902 Embryonen im 2-Zellstadium und 1983 Embryonen im 4-Zellstadium wurden nach morphologischer Untersuchung für intakt befunden und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Die Embryonen wurden nach Entwicklungsstadium gruppiert und 5 Tage unter in vitro Bedingungen kultiviert. Die Blocküberwindung und die Blastozystenbildungsrate wurden durch tägliche stereomikroskopische Beurteilung festgestellt. Zur Beurteilung des Entwicklungspotentials wurden das erreichte Entwicklungsstadium durch morphologische Beurteilung begutachtet, sowie der Embryonendurchmesser und die nach Fixation und Färbung der Embryonen ermittelten Zellkernzahlen herangezogen.

Im ersten Versuchsabschnitt wurden die Embryonen auf einem Eileiterepithelzellmonolayer kokultiviert, dessen Zellen entweder im Proöstrus, Östrus oder Diöstrus gewonnen wurden. Die Primärkultur wurde 3 Tage vor der Embryonengewinnung in Medium TCM 199 mit 10% NBCS Zusatz angesetzt.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurden Embryonen in drei semi-definierten Medien kultiviert, denen in der Literatur fördernde Eigenschaften hinsichtlich in vitro Block-Überwindung und der Blastozystenbildungsrate zugeschrieben wurden. Es handelte sich um die Medien NCSU-23 (PETTERS u. REED 1991), modifiziertes Whitten's-Medium (mWhitten's) und modifiziertes Krebs-Ringer Bikarbonat Medium (mKRB) (BECKMANN u. DAY 1991). In dieser vergleichenden Untersuchung wurden mit dem Medium NCSU-23 die besten Kulturergebnisse erreicht, was auf die Anwesenheit der Aminosäuren Taurin und Hypotaurin zurückgeführt wurde. Daher wurde im dritten Versuchsabschnitt der Zusatz dieser Aminosäuren, getrennt oder in Kombination, in den im vorherigem Abschnitt verwendeten Vergleichsmedien geprüft.

Um eine Prüfung des in vivo Entwicklungspotentials der unter den eigenen Laborbedingungen in vitro in Medium NCSU-23 gewachsenen Embryonen

durchzuführen, wurden im letzten Versuchsabschnitt in vitro entwickelte Embryonen in Empfängertiere übertragen. Als Vergleichsgruppe wurden in vivo entwickelte Embryonen im Blastozystenstadium innerhalb von 4 Stunden nach Gewinnung in synchronisierte Empfängertiere transferiert. Es erfolgte ein Vergleich der Trächtigkeitsraten, In-vivo-Entwicklungsraten und der Entwicklungsparameter der geborenen Ferkel zwischen beiden Gruppen.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1.) Nach Superovulation von 251 präpuberalen Jungsauen wurden insgesamt 2526 Embryonen im 2-Zellstadium und 2425 Embryonen im 4-Zellstadium gewonnen, von denen 1902 bzw. 1983 als tauglich für die Versuche beurteilt wurden. Bei den Spendertieren traten erhebliche individuelle Schwankungen in der Ovulationsrate von 2 und 91 Gelbkörpern auf. Zwischen den besamten und den durch Natursprung belegten Tieren traten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Befruchtungsrate oder der Embryonenqualität auf.

2.) Durch Kokultivierung mit Eileiterepithelzellen, gewonnen von Tieren in unterschiedlichem Zyklusstand, konnte keine embryonale Entwicklung über das 4-Zellstadium erreicht werden. Embryonen im 2-Zellstadium führten eine Zellteilung durch und degenerierten danach, ebenso wie die Embryonen, die ab dem 4-Zellstadium kultiviert wurden. Ob diese Ergebnisse dem Effekt der Zellen oder dem verwendeten Medium (TCM 199 mit 10% NBCS-Zusatz) zuzuschreiben sind, ist offen. Ein Einfluß der Eileiterepithelzellen aus den verschiedenen Zyklusständen wurde nicht festgestellt.

3.) Beim Vergleich der embryonalen Entwicklungsraten [Blocküberwindungsrate (BÜR) und Blastozystenbildungsrate (BBR)] von Embryonen im 2- und im 4-Zellstadium bestanden keine Unterschiede innerhalb eines Mediums, was auf gleiche Entwicklungspotenz schließen läßt. Aufgrund der hohen Standardabweichungen kann aber nicht mit letzter Sicherheit ein Unterschied in der Entwicklungspotenz ausgeschlossen werden.

4.) Bei der Verwendung von Medium NCSU-23 ergaben sich signifikant höhere BÜR und BBR ( $p \leq 0,001$ ), verglichen mit denen in den Medien mWhitten's und mKRB. Die jeweiligen BÜR betragen im ersten Versuchsabschnitt und unabhängig vom verwendeten Ausgangsstadium durchschnittlich 91,7%, 60,6% bzw. 45,9%, wobei

die Ergebnisse für mWhitten's und mKRB sich signifikant unterschieden ( $p \leq 0,05$ ). In Bezug auf die BBR unterschieden sich die zwei letzten Medien nicht signifikant (80,9% : 45% : 30,8%).

5.) Es entwickelten sich signifikant mehr Embryonen zu expandierten Blastozysten im Medium NCSU-23 (60,6% : 16,5% : 28,8%,  $p \leq 0,001$ ), der Schlüpfvorgang trat nur in diesem Medium regelmäßig auf. Daraus ist zu schließen, daß die Medien mWhitten's und mKRB die Weiterentwicklung der Blastozyste in einem geringerm Maße unterstützen als das Medium NCSU-23.

6.) Die in den verschiedenen Medien entwickelten Blastozystenstadien, die im zweiten und dritten Versuchsabschnitt kultiviert wurden, unterschieden sich nicht signifikant in Zellkernanzahl, Durchmesser und morphologischer Beurteilung voneinander. Die niedrigere BBR in den Medien mWhitten's und mKRB ist daher nicht nur auf eine geringere Unterstützung der in vitro Entwicklung durch diese Medien sondern auch auf eine größere Entwicklungsverzögerung der Embryonen in diesen Medien zurückzuführen.

7.) Die Aminosäuren Taurin und Hypotaurin hatten unter den Kulturbedingungen dieser Arbeit keinen positiven Effekt auf in vitro die Entwicklung von frühen Embryonalstadien des Schweines, wenn diese als Zusatz in mWhitten's oder mKRB vorhanden waren. Im NCSU-23 hatten die Zusätze keinen Effekt auf das 2-Zellstadium, nur für das 4-Zellstadium wurde eine signifikante Erhöhung der BÜR festgestellt ( $p \leq 0,05$ ), die jedoch bei der BBR dieses Ausgangstadiums nicht auftrat.

8.) Ein suppressiver Effekt von Taurin, wenn allein zum Medium zugegeben, wurde in allen drei Medien sowohl bei der BÜR und BBR als auch bei den verschiedenen Ausgangsstadien (2- oder 4-Zellstadium) festgestellt. Interessanterweise wird aber Hypotaurin in Säugetierzellen fast ausschließlich zu Taurin oxidiert, welches biologisch aktiv ist.

9.) Abferkelrate und in vivo Entwicklungsfähigkeit von in NCSU-23 kultivierten Embryonen betragen ca. 50% der von in vivo entwickelten Embryonen, die kurz nach Gewinnung übertragen wurden (33,3% : 83,3% bzw. 12% : 23,8%). Das Geburtsgewicht und das nach 4 Wochen ermittelte Gewicht der Ferkel, die sich aus in vivo (Kontrollgruppe) und in vitro (in NCSU-23 Medium) kultivierten Blastozysten (Versuchsgruppe) entwickelten, waren ähnlich. Das Entwicklungspotential von in

vivo und in vitro produzierten Embryonen nach erfolgter Implantation und Weiterentwicklung bis zur Geburt, war in dieser Untersuchung nicht unterschiedlich.

## 7. SUMMARY

Claudia Renz Lorenzo Torres Hellmann

Comparative investigations into the developmental capacity of preimplantation pig embryos in coculture systems and in semi-defined culture media supplemented either with or without taurine and hypotaurine

The purpose of this study was to compare various methods for *in vitro* cultivation of 2- to 4-cell stage porcine embryos to the blastocyst stage and to evaluate the developmental importance of several potentially growth promotig factors. With the exception of the factors being tested, experimental conditions were identical throughout all phases of this work. The experimental design involved taking random "split samples" from pooled embryos.

The donors used were prepubertal gilts and were superovulated prior to either natural mating or artificial insemination. Independent of the form of insemination, embryos were collected 24 hours after the second insemination. The genital tract was excised from the donor immediately after slaughter prior to any heat treatment of the carcass and embryos were obtained by flushing the excised genital tract with phosphate buffered saline solution (PBS). Only embryos of high quality were used in this study which included 1902 2-cell and 1983 4-cell stage embryos. In the standard experimental protocol, 2-cell and 4-cell embryos were pooled after the flushing. Embryos were then randomly selected from each of these pools to make up the experimental groups which were cultured for 5 days. Development was evaluated as the percentage of embryos which overcame the 4-cell block and the percentage of these which went on to become blastocysts. The quality of the blastocysts was evaluated by measuring the diameter, and after fixation and staining, by counting the number of nuclei.

In the first experiment, embryos were cultured on oviduct epithelial cell monolayers which had been produced from preestrous, estrous, or diestrous oviduct epithelia. The epithelial cells for these primary cultures were plated three days before the embryos were introduced. The medium used for coculture system was TCM 199 with 10% NBCS.

The second experiment involved a comparison of three different semi-defined, serum free media. The three media chosen for testing were: 1) NCSU-23 (PETTERS and REED, 1991); 2) modified Whitten's medium (mWhitten's) and 3) modified Krebs-Ringer Bicarbonate medium (mKRB) (BECKMANN and DAY, 1991). In this comparison, NCSU-23 medium was best. The components of NCSU-23 not contained in mWhitten's and mKRB are taurine, hypotaurine and glutamine. Glutamine is generally thought to be an energy substrate which can substitute for glucose. Both mWhitten's and mKRB contain glucose so it was not expected that additional glutamine was an important factor in the observed difference between NCSU-23 and these media.

The importance of taurine or hypotaurine (or both) was therefor examined in the third experiment. This study involved the evaluation of the effects of taurine, hypotaurine, or both, in the three media previously tested.

In a fourth experiment, the viability of *in vitro* embryos (grown in NCSU-23) was compared with that of *in vivo* produced embryos by transfer to foster mothers. In this study, the "*in vivo*" embryos were removed from donors and transferred to foster mothers with no more than four hours exposure to PBS *in vitro*. The comparison involved pregnancy rate, the litter size, the average weight of piglets at birth and after four weeks.

The following results were obtained:

1) A total of 251 prepubertal gilts were superovulated for the studies reported here. A total of 2526 2-cell embryos were obtained of which 1902 were judged acceptable for experimental usage by morphological criteria and a total of 2425 4-cell embryos were obtained of which 1983 were useable. There was great variability in the ovulation rate of the gilts used (the range was from 2 to 91 *corpora lutea* per animal). There was no difference between natural mating and artificial insemination with respect to either fertilization rate or embryo quality.

2) No embryos overcame the 4-cell block when cultured in TCM 199 with oviduct epithelial cells obtained at any of the three estrous cycle stages. Those embryos which were introduced into this system at the 2-cell stage did develop to the 4-cell stage but then were blocked.

3) There was no statistical difference in the developmental potential of 2- and 4-cell stage embryos in any of the three media tested (NCSU-23, mWhitten's, and mKRB) but because of the large standard deviations a small effect can not be excluded.

4) Because there was no difference in the results with 2- or 4-cell embryos, the three media were also evaluated by the development rate of these combined groups. The percentage of embryos overcoming the 4-cell block in NCSU-23 (91.7 %) and the percentage of these which developed to blastocysts (80.9 %) were significantly higher ( $p \leq 0.001$ ) than obtained with mWhitten's (60.6 % and 45 %) and mKRB (45.9 % and 30.8 %). Only the difference in overcoming the 4-cell block was significant between mWhitten's and mKRB ( $p \leq 0.05$ ).

5) Blastocysts obtained in NCSU-23 were further advanced after five days of culture than those in mWhitten's and mKRB. The percentage of expanded blastocysts in NCSU-23 (60.6%) was significantly higher ( $p \leq 0.001$ ) than that in mWhitten's (16.5%) or in mKRB (28.8%). Hatched blastocysts were only produced in NCSU-23 cultures.

6) The fact that there was an increased ratio of unexpanded to expanded blastocysts in mWhitten's or mKRB medium implies that the lower rate of blastocyst production in mWhitten's or mKRB was not only due to lower survival but also due to a retardation of the rate of development. This is supported by the observation that there was no significant difference in the number of nuclei or the diameter of either unexpanded or expanded blastocysts between the three media tested.

7) Taurine and hypotaurine had no effect on the development of porcine embryos when used as supplements to either mWhitten's or mKRB. With NCSU-23, the effect of taurine and hypotaurine on overcoming the 4-cell block was greater for 4-cell embryos than for 2-cell embryos ( $p \leq 0.05$ ).

8) In all three media, taurine alone produced a suppressive effect on both the percentage of embryos overcoming the 4-cell block and the percentage which developed further to blastocysts. This was seen for both 2- and 4-cell stage embryos. Hypotaurine was apparently able to compensate for or modify the negative effect of taurine when the two were used together. Hypotaurine alone was as effective as the combination of taurine and hypotaurine in these culture conditions. Interestingly, it is well known that in mammalian cells hypotaurine is broken down to taurine and it is taurine which has biological activity.

9) The percentage of transfers which resulted in pregnancy (pregnancy rate) and the percentage of transferred blastocysts resulting in live births (development rate) in NCSU-23 are only 50 % that of embryos which have been allowed to develop *in vivo*. The pregnancy rate for NCSU-23 embryos was 33.3 % as compared to an *in vivo* rate of 83.3 % while the development rate for NCSU-23 was 12 % compared to 23.8% *in vivo*. There was no difference in either birthweight or weight at four weeks between piglets obtained after *in vitro* or *in vivo* development.