

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein definiertes, serum- und proteinfreies In-vitro-Kultivierungssystem weiter zu entwickeln und daran die Wirkungen des Wachstumsfaktors Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) auf die präimplantative Embryonalentwicklung in vitro produzierter Rinderembryonen zu untersuchen. Dazu wurden insgesamt 13.914 Oozyten aus 1.587 Schlachthofovarien mittels Slicing gewonnen, mit Hormonen in vitro gereift, mit durch Swim-up Methode separiertem, in vitro kapazitiertem und heparinbehandeltem Tiefgefriersperma zweier unterschiedlicher Bullen (Holstein Friesian Bulle / Holstein Bulle alter Zuchtichtung) in vitro fertilisiert (Spermienkonzentrationen  $1 \times 10^6/\text{ml}$  und  $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) und mit den umgebenden Kumuluszellen bis zur geschlüpften Blastozyste kokultiviert. Die Grundmedien bestanden für die Reifungs- und Kultivierungsphase aus TCM-199, sowie für die In-vitro-Fertilisation aus Sperm- und Fert-TALP.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde Polyvinylalkohol (PVA) als Serum- und Proteinersatz, im Vergleich zu bovinem Serumalbumin (BSA) in gleicher Konzentration (1 mg/ml) zugesetzt, um Wechselwirkungen und mögliche Maskierungen von undefinierten Inhaltsstoffen, die in Serum und BSA enthalten sind, zu vermeiden. In-vitro-Reifung und -Fertilisierung wurden durch Fixation und Färbung der Oozyten kontrolliert. Die Teilungs- und Entwicklungsraten bis Kulturtag 10 wurden durch stereomikroskopische Beurteilung ermittelt und die Zellzahlen und Chromosomen in vitro produzierter Blastozysten an Kulturtag 8 durch Fixation und Färbung festgestellt.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurden die Wirkungen des Wachstumsfaktors PDGF (10 ng/ml) auf die In-vitro-Produktion von Rinderembryonen in proteinfreien Medien mit PVA-Zusatz untersucht. PDGF wurde entweder ins Fertilisierungsmedium oder kombiniert dem Fertilisierungsmedium und Kultivierungsmedium an Tag 3 zugesetzt, wobei mittels eines Antikörpers gegen PDGF dessen spezifische Wirkung unterbunden werden sollte. Um eine mögliche bullenabhängige Wirkung von PDGF zu identifizieren, wurde in einer dritten Versuchsanordnung der Einsatz von Spermien zweier unterschiedlicher Bullen bei der In-vitro-Fertilisierung näher untersucht.

Es wurden folgende Ergebnisse erarbeitet:

- 1.) Die Oozytenreifung war in BSA- und PVA-Medium gleich (75,8% bzw 80,8%) Die Penetrations- und Vorkernbildungsraten lagen in den BSA-Gruppen signifikant über den der PVA-Gruppen (BSA: 75,7%  $\pm$  6,9 - 87,3%  $\pm$  4,0, 55,9%  $\pm$  6,9 - 70,6%  $\pm$  4,9 und PVA: 43,5%  $\pm$  4,7 - 46,4%  $\pm$  8,9; 30,6%  $\pm$  9,5 - 33,9%  $\pm$  5,2). Die Teilungs-, Morula- und Blastozystenraten lagen in den Medien mit BSA-Zusatz (69,1%, 25,5%, 17,1%) signifikant höher als in den Medien mit PVA-Zusatz (41,1%, 11,7%, 7,1%), wobei in PVA-Medium kein Kumuluszellmonolayer ausgebildet wurde
- 2.) Eine Reduzierung der Spermienkonzentration von  $1 \times 10^6$ /ml auf  $5 \times 10^5$ /ml zeigte eine signifikante Verminderung der Polyspermierate in der BSA-Gruppe von 15,6% auf 5,7%. Gleichzeitig fielen die Morula- und Blastozystenraten signifikant ab (von 48,5% auf 38,1% und von 31,8% auf 20,8%). In der PVA-Gruppe zeigte sich nur bei den Teilungsraten eine signifikante Verminderung (von 45,5% auf 28,8%)
- 3.) Untersuchungen des zeitlichen Verlaufes der Befruchtung bei 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Stunden nach IVF und Verwendung von Spermien zweier unterschiedlicher Bullen zeigten einen retardierten Anstieg der Penetrations- und Vorkernbildungsraten in den PVA-Gruppen. Der Anstieg dieser Raten war nach 24 Stunden mit Werten bis 64,9% und 54,6% noch nicht beendet, während in den BSA-Gruppen Plateauphasen bereits nach 6 - 18 Stunden (abhängig vom eingesetzten Bullen) mit Werten bis 100% und 68,5% festgestellt wurden. Ferner zeigten sich deutliche Unterschiede in den Penetrations-, Vorkernbildungs- und Polyspermieraten im Vergleich der beiden Bullen miteinander. Die Polyspermieraten in den PVA-Gruppen waren über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich mit den BSA-Gruppen oft signifikant niedriger (0,0% - 4,0%  $\pm$  4, 0,0% - 41,8%  $\pm$  2,4). Auch hier lagen die Werte in den BSA-Gruppen beim Bullen Nektan (8,5%  $\pm$  6,9 - 41,8%  $\pm$  2,4) oft signifikant über denen des Bullen Erwin (0,0% - 19,8%  $\pm$  4,4)

Bei den Entwicklungsraten (Teilungs-, Morula- und Blastozystenraten) zeigten sich nur im PVA-Medium signifikante Unterschiede beim Einsatz unterschiedlicher Bullen (PVA-Erwin: 43,6%; 18,2%; 9,0%; PVA-Nekton: 54,5%, 27,4; 17,6%) Inner cell mass (ICM), Gesamtzellzahlen und das Verhältnis aus beiden waren unabhängig vom eingesetzten Bullen bei allen Gruppen gleich (ICM:  $37,6 \pm 2,9 - 58,5 \pm 5,0$ ; Gesamtzellzahl:  $99,2 \pm 6,5 - 153,1 \pm 6,9$ , ICM / Gesamtzellzahl:  $33,6\% \pm 1,7 - 48,3\% \pm 3,6$ ).

- 4 ) PDGF-Zusatz im Fertilisations- und Kultivierungsmedium an Tag 3 zeigte unabhängig vom eingesetzten Bullen keinen Effekt auf Entwicklungsraten oder Zellzahlen von Blastozysten an Tag 8
- 5 ) Durch Zusatz eines spezifischen PDGF-Antikörpers konnten weder Wirkungen von zugesetztem noch eventuell von den Zellen selbst gebildetem PDGF aufgehoben werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die In-vitro-Produktion von Rinderembryonen bis zur geschlüpften Blastozyste in definierten Medien mit Zusatz von PVA möglich ist. Ein Proteinzusatz für die einzelnen Phasen der In-vitro-Produktion erscheint, ebenso wie die Ausbildung eines Monolayers bei Kokultur mit Kumuluszellen, nicht notwendig zu sein. Die Polyspermie, die in den Kontrollgruppen mit BSA-Zusatz beobachtet wurde, stellt in Medium mit PVA-Zusatz kein Problem dar, vielmehr ist ein Überprüfen der IVF-Tauglichkeit unterschiedlicher Bullen mit PVA-Medium während der Embryonalentwicklung besser möglich als bei BSA-Zusatz. BSA scheint im Gegensatz zu PVA aber bestimmte Faktoren zu besitzen, die in Synergie mit Kumuluszellen in der Lage sind die Befruchtungsvorgänge während der IVF-Phase zu unterstützen und zu beschleunigen. Die verzögerten Entwicklungsphasen bei PVA-Zusatz während der IVF können als Ursache der niedrigeren Entwicklungsraten bis zum Blastozystenstadium angesehen werden. Die fehlende Wirkung des Wachstumsfaktors PDGF im Fertilisierungsmedium und im Kultivierungsmedium an Tag 3 ist möglicherweise auf fehlende oder reduzierte Rezeptor-Ligand-Bindungen zurückzu-

führen. Die Entwicklungsfähigkeit der in diesem definierten Kultivierungssystem produzierten Embryonen ist noch *in vivo* nach Übertragung auf Empfänger zu prüfen

## 7 SUMMARY

Holger Heymann

Experimental investigations of the importance of Platelet-derived growth factor (PDGF) on the development on preimplantation bovine embryos in a defined *in vitro* culture system

The goal of this research was to further develop a defined serum- and protein-free *in vitro* culture system and to investigate the effects of platelet derived growth factor on the development on preimplantation bovine embryos. A total of 13 914 oocytes were obtained by the slicing technique from 1 587 abattoir ovaries, matured *in vitro* with hormones and fertilized *in vitro* with frozen / thawed sperm (concentration  $1 \times 10^6$ /ml and  $5 \times 10^5$ /ml). Sperm was obtained from two bulls (one Holstein Friesian - „Nekton“ and one old type Holstein - „Erwin“), separated in Sperm-TALP by the swim up method, washed again in Sperm-TALP, then capacitated in Fert-TALP including heparin and used for fertilization. The resultant zygotes were cocultured with the associated cumulus cells up to the hatched blastocyst stage. The basic culture medium for maturation and culture was TCM-199 while the media for *in vitro* fertilization was Sperm and Fert-TALP.

In the first group of experiments, polyvinylalcohol (PVA) was added as a serum and protein substitute in comparison to bovine serum albumin (BSA) in the same concentration (1 mg/ml) to eliminate the undefined and possible masking effects of undefined substances in serum and BSA. *In vitro* maturation and fertilization were evaluated by fixation and staining of the oocytes. The rate of cell division and the developmental rate up to culture day 10 were determined by stereomicroscopic ex-

amination. The cell number and number of chromosomes in in vitro produced blastocysts were determined by fixation and staining on culture day 8.

In the second group of experiments, the effect of the growth factor PDGF (10 ng/ml) on in vitro production of bovine embryos in protein-free medium supplemented with PVA was investigated. PDGF was added either to the fertilization medium or to both the fertilization medium and subsequently to the culture medium on day 3. In a parallel group, an antibody to PDGF was used to block the specific activity of this growth factor. A third experiment was performed to test whether the PDGF effects observed are bull specific by using semen from two different bulls for IVF.

The following results were obtained.

- 1.) Maturation of oocytes in BSA and PVA medium was the same (75.8%, 80.8%). The penetration and pronucleus formation rates were significantly higher in the BSA groups than in the PVA groups (BSA: 75.7% ± 6.9 - 87.3% ± 4.0; 55.9% ± 6.9 - 70.6% ± 4.9; PVA: 43.5% ± 4.7 - 46.4% ± 8.9; 30.6% ± 9.5 - 33.9% ± 5.2). The cell division-, morula-, and blastocyst- rates were significantly higher in medium containing BSA (69.1%, 25.5%, 17.1%) than in PVA (41.1%, 11.7%, 7.1%) supplemented medium. Additionally, cumulus cells failed to form a monolayer when PVA supplemented medium was used.
- 2.) Reducing the sperm concentration from  $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^5$ /ml showed a significant reduction of the polyspermy rate in the BSA group from 15.6% to 5.7%. At the same time, the morula and blastocyst rates were significantly reduced from 48.5% to 38.1% and from 31.8% to 20.8% respectively. In the PVA group, reducing the sperm concentration produced a significant reduction only in the rate of cell division from 45.5% to 28.8%.
- 3.) The time course of fertilization was determined by taking samples at 3, 6, 9, 12, 18, and 24 hours after addition of the sperm of the two different bulls tested. This revealed a retarded increase in the rates of penetration and pronucleus formation

in the PVA group in which the increase up to 64.9% and 54.6% had not plateaued even at 24 hours. In the BSA group, plateau occurred at 6 to 18 hours depending on which bull used with values up to 100% and 68.5% respectively.

In addition, there was a pronounced difference in the penetration-, pronucleus formation-, and polyspermy-rates in comparison of the two bulls. Polyspermy rates in the PVA groups were significantly lower over the total period of the investigation than the rates observed in the BSA groups (0.0% - 4.0%  $\pm$  4.0; 0.0% - 41.8%  $\pm$  2.4). Also the values observed in the BSA groups using sperm from Nekton (8.5%  $\pm$  6.9 - 41.8%  $\pm$  2.4) were often significantly higher than with sperm from Erwin (0.0% - 19.8%  $\pm$  4.4).

Differences in the development rates (cells division-, morula-, and blastocyst rates) between the two bulls were observed only with PVA media (Erwin: 43.6%; 18.2%; 9.0%, Nekton: 54.5%, 27.4%, 17.6%).

Inner cell mass (ICM), total cell number, and the relationship between these, were the same in all groups and were independent of the bull used (ICM: 37.6  $\pm$  2.9 - 58.5  $\pm$  5.0, total cell number: 99.2  $\pm$  6.5 - 153.1  $\pm$  6.9, ICM / total cell number: 33.6%  $\pm$  1.7 - 48.3%  $\pm$  3.6).

4) The addition of PDGF to fertilization- and culture-media with PVA at day 3 had no effect on the developmental rate or cell number of blastocysts on day 8.

5) The addition of antibody to block the effect of both supplemental PDGF and endogenously produced PDGF had no effect on embryo development.

The results of these investigations show that it is possible to produce bovine embryos in vitro and culture them up to the hatched blastocyst stage in protein-free defined media supplemented with PVA. Therefore neither the addition of protein nor the formation of a monolayer of cumulus cells in coculture is necessary at any stage of in vitro production. Polyspermy, which was observed in the BSA supplemented medium, was not a problem in PVA supplemented medium. The suitability of different bulls for IVF can be better tested by evaluating embryonic development in PVA