

Taurine and preimplantation embryonic development in vitro

Citation for published version (APA):

Dumoulin, J. C. M. (1997). *Taurine and preimplantation embryonic development in vitro*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1997

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

During In Vitro Fertilization (IVF) treatment, embryos will develop in vitro for several days in culture medium. The culture conditions are considered to be among the most important factors for the success rate after IVF. However, in view of the relatively low implantation rate of human embryos obtained after IVF, it can be argued that conventional culture conditions are suboptimal. Also in many other animal species, it has been demonstrated that in vitro culture will result in impaired embryo development as compared to development in vivo. Therefore, more studies are necessary in order to improve our understanding of preimplantation embryonic development and of the interactions between the developing embryo and its surrounding environment.

One would expect that culture systems will mimic the biochemical conditions of the female reproductive tract fluid. At present, however, most conventional culture media differ substantially in composition with the natural environment of embryos. The amino acid taurine was chosen as the subject of study. This amino acid is absent from most embryo culture media, whereas it is present in high concentrations both in reproductive tract fluid of several species, as well as in embryos, suggesting a physiological function of taurine. Taurine has been shown to have many diverse effects on different cell types and tissues which can be summarized as being beneficial for cell viability.

We have determined the presence of taurine in mouse oviductal fluid. The results, described in chapter 2, indicate that taurine comprises a much higher proportion of the total free amino acid present in oviductal fluid than in serum (59% versus 17%).

Our studies on the effect of taurine on preimplantation embryonic development in the mouse (chapters 2 and 3) indicate that at concentrations of 1, 5, 10 and 20 mM taurine, significantly more two-cell embryos reach the blastocyst stage compared with medium without taurine (79-82% versus 64%). Furthermore, culture in the presence of 5 mM or 10 mM taurine resulted in blastocysts with the highest mean number of cells (65-68 versus 55). The effect of taurine on blastocyst formation appears to be restricted mostly to the period 20-48 h after fertilization, during which time interval mouse embryos are at the two-cell stage. It was expected that a compound which exerts such a marked effect on mouse embryo development during the two-cell stage, might also influence the two-cell block in vitro of mouse embryos from random-bred strains. However, no effect of taurine on this developmental block was observed.

The next series of experiments were undertaken to examine the mechanisms by which taurine may be exerting its positive effect on mouse embryonic development in vitro. Because taurine has been reported to inhibit the enzyme $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-adenosine triphosphatase}$ ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$), we used two other conditions known to inhibit the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ to study their effect on mouse embryo development (chapters 4 and 5). Culturing embryos during a short period (the second day postinsemination) in low extracellular K^+ concentrations (1.4 mM) or in medium supplemented with ouabain (50 μM) showed positive effects similar to those of culturing in medium with taurine (10 mM). When zygotes from randomly bred mice were used, inhibition of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ with ouabain clearly promoted development through the 2-cell block in vitro. It is as yet unclear why the temporary inhibition of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ by ouabain during the 2-cell stage leads to such a marked positive effect on subsequent embryonic development in vitro.

In chapter 6, we studied the osmoregulatory function of taurine, a function which could possibly be implicated in the effect of taurine on embryonic development in vitro. Mammalian cells maintain a constant cell volume by the release and uptake of solutes, followed by the release or uptake of water when confronted by either changing extracellular osmolality or changing concentrations of intracellular osmolytes. Taurine has been shown to be an important osmoregulator in many cell types. Our results indicate that also in mouse and human oocytes and embryos taurine functions as an osmolyte. Embryos lose much of their intracellular taurine when cultured in standard medium without taurine.

To conclude, taurine has a positive effect on development in vitro of mouse embryos. The observed effect of taurine supplementation of the culture medium could be the result of the replenishment of intracellular taurine concentrations. When no taurine is added to the medium, the resultant taurine depletion may be harmful to embryos, either because the embryo has to rely more on its inorganic osmolytes for its volume regulation, or because taurine can no longer provide its other protective functions, such as membrane stabilization.

Samenvatting

Bij de In Vitro Fertilisatie (IVF) methode worden embryo's gedurende enkele dagen buiten het lichaam in een kweekvloeistof gehouden. Het kweekmilieu van embryo's is een belangrijke factor in het succes van de IVF behandeling. Gesteld kan worden dat de kweekomstandigheden nog niet optimaal zijn. De kansen voor embryo's, ontstaan na IVF, om zich tot een kind te ontwikkelen zijn geringer dan de kansen voor embryo's ontstaan na natuurlijke bevruchting. Ook bij verschillende andere diersoorten is gebleken dat in vitro kweek de ontwikkeling van embryo's nadelig beïnvloedt. Nader onderzoek naar de ontwikkeling van embryo's gedurende de eerste dagen van hun ontwikkeling (de pre-implantatie fase) en de relatie tussen het embryo en zijn omringend milieu is dan ook zinvol.

Kweekomstandigheden van embryo's dienen het in vivo milieu zo veel mogelijk te benaderen. De meest gebruikte kweekvloeistoffen wijken echter op vele aspecten sterk af van de vloeistof in de eileider, waarin de embryo's zich bevinden in het lichaam van de moeder gedurende de pre-implantatie fase. In deze studie is het effect van het aminozuur taurine op de pre-implantatie embryo-ontwikkeling onderzocht. De keuze voor taurine berust enerzijds op het feit dat taurine voorkomt in relatief hoge concentraties in de vloeistof van baarmoeder en eileider bij verschillende diersoorten terwijl de stof afwezig is in de meeste kweekvloeistoffen en anderzijds op het feit dat taurine bekend staat als een stof met een algemeen "beschermend" effect tegen allerlei nadelige (milieu) omstandigheden bij zeer uiteenlopende celtypen. Het onderzoek werd uitgevoerd met muizenembryo's en, op zeer beperkte schaal, met menselijke rest-embryo's.

Als eerste werd de aanwezigheid van taurine in de eileider van de muis onderzocht. De resultaten, beschreven in hoofdstuk 2, geven aan dat taurine in de eileidervloeistof procentueel een veel groter aandeel heeft in de totale aminozuursamenstelling dan in serum (59% versus 17%).

De invloed van taurine op de in vitro ontwikkeling van muizenembryo's wordt beschreven in de hoofdstukken 2 en 3. Bij concentraties van 1, 5, 10 en 20 mM taurine bleken significant meer embryo's het blastocyststadium te bereiken dan in medium zonder taurine (79-82% versus 64%). Ook bleken blastocysten, gekweekt in medium met 5 en 10 mM taurine, uit significant meer cellen te bestaan dan blastocysten gekweekt in medium zonder taurine (65-68 versus 55). Het positieve effect van taurine bleek welhaast uitsluitend op te treden als embryo's tijdens de periode van 20-48 uur na de bevruchting gekweekt werden in de aanwezigheid van taurine. Tijdens deze periode bevinden muizenembryo's zich in het twee-cellig stadium, een stadium dat extra gevoelig is voor suboptimale kweekomstandigheden. Het lag derhalve voor de hand te veronderstellen dat taurine ook van invloed zou kunnen zijn op het zogenaamde '2-cell block', een ontwikkelingsblokkade die ontstaat als embryo's van bepaalde muizenstammen in vitro gekweekt worden. Taurine bleek echter geen effect te hebben op deze blokkade.

Nadat was vastgesteld dat taurine een duidelijk positief effect had op de embryo-ontwikkeling bij de muis, werd gepoogd dit effect van taurine te verklaren.

Omdat uit literatuurgegevens bekend is dat taurine de activiteit van het enzym Na^+/K^+ -adenosine trifosfatase (Na^+/K^+ -ATPase) remt, werd het effect van taurine op de embryo-ontwikkeling bij de muis vergeleken met twee andere condities waarvan bekend is dat ze de activiteit van het Na^+/K^+ -ATPase enzym remmen (ouabaine en een lage

kaliumpconcentratie). In de hoofdstukken 4 en 5 worden de resultaten beschreven. Inderdaad bleek het kweken van embryo's, gedurende de tweede dag van hun ontwikkeling, in medium met ouabaine (50 μM), en in medium met een lage kaliumpconcentratie (1.4 mM), vergelijkbare effecten te hebben als de kweek in medium met taurine (10 mM) op het percentage embryo's dat het blastocyststadium bereikt. Ook bleek ouabaine een duidelijk positief effect te hebben op het voorkomen van het '2-cell block' in vitro bij embryo's van 'random bred' muizenstammen. Waarom het remmen van het $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ enzym leidt tot een betere embryo-ontwikkeling is nog onbekend.

In hoofdstuk 6 wordt een ander mechanisme onderzocht dat het effect van taurine op de embryo-ontwikkeling zou kunnen verklaren. Taurine blijkt bij zowel muizenembryo's als bij menselijke embryo's te functioneren als een osmolyt, d.w.z. een stof die cellen snel kunnen opnemen of afstaan om veranderingen in de totale concentratie aan opgeloste stoffen in de cel te kunnen compenseren. In medium zonder taurine blijken embryo's hun intracellulaire taurine te verliezen als gevolg van osmolytische processen.

Concluderend kan gesteld worden dat taurine een positief effect heeft op de ontwikkeling in vitro van muizenembryo's. Dit effect is mogelijk het gevolg van de remming van het $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ enzym door taurine. Meer waarschijnlijk is dat het effect een gevolg is van het feit dat embryo's in medium met taurine hun intracellulaire taurine op peil kunnen houden door opname uit het medium. Uit literatuur gegevens is bekend dat een constant hoge intracellulaire taurine-concentratie cellen beschermt tegen o.a. membraanschade.