

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob Mäuseembryonen im 2-Zellstadium nach Cryokonservierung wie 8-Zellstadien revitalisiert werden können und welche Methode für dieses Zellstadium am besten geeignet ist.

Aus diesem Grund wurden 7 verschiedene Einfrierprogramme vergleichend geprüft. Dabei handelte es sich sowohl um "One-Step-Verfahren" (Vitrifikation) als auch langsame und schnelle "Two-Step-Verfahren".

Beim "Two-Step-Verfahren" wurden verschiedene Umsetztemperaturen (-24°C ; -32°C ; -40°C und -80°C) angewendet. Nach der Äquilibrierung der Embryonen bei 0°C wurden die Embryonen mit einer Geschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. bis zum "Seedingpunkt" (-6°C) gekühlt, anschließend mit $0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. bis zu den genannten Umsetztemperaturen abgekühlt und schließlich direkt in flüssigen Stickstoff umgesetzt. Darüberhinaus wurde der Einfluß unterschiedlicher Gefrierschutzmittel (PROH bzw. DMSO in 1,5M Konzentration) auf die Revitalisierungsrate nach langsamem und schnellem Zweistufen-Einfrierverfahren untersucht.

Bei der Vitrifikation wurden die Embryonen vor und nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff in 4 Schritten (12,5%, 25%, 50%, 100%) an die Vitrifikationslösung (VS1 nach RALL und FAHY, 1985a) bei 0°C äquilibriert.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- In der Anzahl lebend geborener Nachkommen bezogen auf wiedergefundene (%WGE) sowie auf morphologisch intakte Embryonen (% MIE) konnten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden festgestellt werden. Die besten Resultate wurden mit dem schnellen Two-Step-Verfahren bis -32°C erzielt (45,2% bzw. 48,4%), wenn PROH als Gefrierschutzmittel diente. Während das schnelle Einfrierverfahren bis -24°C als ungenügend (10,2% bzw. 24,4%) eingestuft werden muß. Ein zwar konstantes, aber deutlich niedrigeres Ergebnis wurde mit dem langsamen Einfrierverfahren bis -80°C mit PROH erzielt (15,6% bzw. 19,9%). Dagegen bringt die Vitrifikation ebenfalls gute Ergebnisse (25,8% bzw. 39,4%), die bezogen auf die Anzahl lebender Nachkommen pro tragende Amme von allen getesteten Verfahren am besten abschnitt (63,9%).

- Bei einem direkten Vergleich der Gefrierschutzmittel zeigt PROH beim schnellen Zweistufen-Einfrierverfahren bis -32°C eine bessere cryoprotektive Wirkung (45,2% bzw. 48,4%) gegenüber DMSO (26,4% bzw. 32,6%), während der Gefrierschutz von DMSO (21,7% bzw. 30,3%) beim langsamen Zweistufen-Einfrierverfahren bis -80°C günstiger zu sein scheint als der von PROH (15,6% bzw. 19,9%).

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- 2-Zell-Mäuseembryonen können sowohl durch Vitrifikation als auch mit langsamen oder schnellen Two-Step-Einfrierverfahren erfolgreich cryokonserviert werden.
- Die Revitalisierungsergebnisse von cryokonservierten 2-Zellstadien sind zumindest gleich gut wie die für 8-Zellstadien publizierten Ergebnisse und widerlegen die bislang geläufige Annahme, daß dieses frühe Entwicklungsstadium weniger gut für die Cryokonservierung und damit den Aufbau einer Embryobank geeignet sei.
- Das zuverlässigste Verfahren ist die schnelle Two-Step-Methode bis -32°C mit PROH als Gefrierschutzmittel und somit die Methode der Wahl für den Aufbau einer Embryobank.
- Die Eignung von PROH und DMSO als Gefrierschutzmittel muß in Abhängigkeit vom Einfrierverfahren beurteilt werden. Dabei ist PROH beim schnellen Two-Step-Einfrierverfahren DMSO überlegen, während dies beim langsamen Two-Step-Einfrierverfahren umgekehrt ist.

6. Summary

MENDES DA CRUZ, Gilson (1991): The Influence of the freezing method on the revitalization rate of mouse embryos.

The aim of this study was to determine whether two cell mouse embryos can be as successfully freeze preserved and revitalized as eight cell embryos. Further it was to be tested which method of freezing is best suited for this developmental stage.

Therefore seven different embryo freeze protocols have been compared. This included a one-step-freezing procedure (vitrification) as well as slow and fast two-step-freezing procedures.

With the two-step-freezing procedures the cryotubes were transferred to liquid nitrogen at different temperatures (-24°C; -32°C; -40°C, and -80°C). After an equilibration to the freezing medium at 0°C, embryos were cooled at a rate of 1°C/min. to -6°C (seeding point), thereafter at a rate of 0.4°C/min. to the desired transfer temperature, and finally dropped into liquid nitrogen.

In addition to this the influence of different cryoprotective agents (1,5M PROH vs. 1,5M DMSO) on the revitalization rate after slow and fast two-step-freezing has been analyzed.

In the vitrification protocol embryos were equilibrated before freezing in liquid nitrogen and upon thawing in 4 steps (12,5%, 25%, 50%, 100%) at 0°C to the vitrification solution (VS1 after RALL and FAHY, 1985a).

The following results were obtained:

- There were significant differences between the different methods in the number of live born offspring in relation to recovered (% WGE) as well as morphologically unimpaired (% MIE) embryos. The fast two-step procedure with a transfer temperature of -32°C using PROH as cryoprotectant showed the best results with 45,2% (WGE) and 48,4% (MIE), while this method is rather inferior if cryotubes are transferred to liquid nitrogen at -24°C (10,2% respectively 24,4%).

A rather constant, but lower revitalization result was obtained with the slow two-step procedure using PROH and a transfer temperature of -80°C (15,6% respectively 19,9%).

Upon vitrification also good results have been obtained (25,8% respectively 39,4%). One has to mention that this method provided the best results of all methods tested if the number of live offspring is considered in relation to pregnant surrogate dams (63,9%).

- By comparing two different cryoprotectants using identical freezing protocols, PROH is superior with the fast two-step-freezing to -32°C (45,2% respectively 48,4% in contrast to 26,4% respectively 32,6% for DMSO), while DMSO gives better results if embryos are slowly frozen until -80°C (26,4% respectively 32,6% in contrast to 15,6% respectively 19,9% for PROH).

These results allow for the following conclusions:

- Two-cell mouse embryos can be successfully cryopreserved by vitrification as well as slow or fast two-step freezing procedures.
- Revitalization rates of cryopreserved two-cell stages are at least as good as those published for eight-cell embryos and disprove the common notion that this early developmental stage is less suitable for cryopreservation and thus for the development of an embryo bank.
- The most reliable procedure apparently is the fast two-step freezing to -32°C using PROH as cryoprotectant, and thus the method of choice for setting up an embryo bank.
- The selection of PROH or DMSO according to the results obtained depends on the freeze protocol used. While PROH should be given preference if embryos are frozen by a fast two step method, DMSO apparently is superior with the slow freezing to -80°C .