

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Versuche war die schrittweise Überprüfung von Gefrierverfahren für Rinderoocyten in unterschiedlichem Reifungsstadium. Dazu wurden Ovarien vom Schlachthof geholt und Follikel von 2-8 mm Durchmesser punktiert. Die gewonnenen Oocyten wurden entweder sofort (ungereift) oder nach 24 Stunden Reifung in TCM 199 und 20% ECS mit FSH, HCG und Östradiol für die Versuche herangezogen. Nach der In-vitro-Reifung erfolgte die In-vitro-Fertilisation mit tiefgefrorenen/aufgetauten Sperma. Die Oocyten wurden nach 17 Stunden Kokultur in FERT TALP in TCM 199 und 20% ECS umgesetzt. Nach Fixation und Färbung mit 2% Orcein wurde nach weiteren 48-52 Stunden die Auswertung vorgenommen. In drei Versuchsabschnitten wurden die Toxizität verschiedener Gefrierschutzmittel, die Kühlung auf 0°C und -7°C und das Tiefgefrieren der Oocyten überprüft. Als Kriterien wurde die Teilungsrate nach Beendigung der Kultur herangezogen. Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Durch schrittweise Zugabe verschiedener Kryoprotektiva/ Kombinationen (2 M DMSO, 2 M PROH, 1,5 M DMSO plus 0,5 M Sucrose=SUC, 1,5 M PROH plus 0,5 M SUC) bei 37°C und Raumtemperatur (RT) wurde der Einfluß der Kryoprotektiva auf Befruchtungs- und Weiterentwicklungsfähigkeit geprüft. Die Zugabe von DMSO zu ungerreifen Oocyten bei RT und zu gereiften Oocyten bei RT und 37°C und die Zugabe von PROH zu gereiften Oocyten bei RT und 37°C erbrachte im Vergleich zur Kontrolle keine reduzierten Teilungsraten (Bei DMSO 62,5%, 74,6%, 76,9% gegenüber 69,2%, 70,0%, 66,7% der Kontrolle, bei PROH 72,4%, 70,8% gegenüber 71,1%, 70,5% der Kontrolle). Durch die Zugabe von DMSO/SUC zu ungerreifen und gereiften Oocyten bei 37°C und die Zugabe von PROH/SUC zu ungerreifen Oocyten bei RT und zu gereiften Oocyten bei 37°C wurden keine schlechteren Teilungsergebnisse im Vergleich zur Kontrolle erreicht (bei DMSO/SUC 73,3%, 50,0% gegenüber 78,6%, 57,1% der Kontrolle, bei PROH/SUC 51,9%, 68,2% gegenüber 61,2%, 76,1% der Kontrolle). Für die weiteren Versuche wurden folgende Kryoprotektiva ausgewählt: bei ungerreifen Oocyten bei RT: DMSO, PROH/SUC; bei ungerreifen Oocyten bei 37°C: DMSO/SUC; bei gereiften Oocyten bei RT und 37°C: DMSO, PROH.

2. Durch Kühlung mit $-1^{\circ}\text{C}/\text{Min}$ von RT auf 0°C , bzw. -7°C , oder bei direktem Umsetzen in -7°C sollte der Einfluß einer Temperaturerniedrigung auf die Teilung geprüft werden. Es kam in allen Versuchsanordnungen zu signifikant schlechteren Teilungsraten, die bei ungereiften Oocyten maximal 14,9% (PROH/SUC, Abkühlung auf -7°C) und bei gereiften 15,8% (PROH, Abkühlung auf 0°C) betragen.

3. Anschließend wurden ein schnelles (Umsetztemperatur in flüssigen Stickstoff -35°C) und ein langsames (Umsetztemperatur in flüssigen Stickstoff -60°C) Tiefgefrierverfahren überprüft. Mit beiden Verfahren wurden bei allen vier Versuchsanordnungen keine weiterentwicklungsfähigen Oocyten gewonnen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß gereifte und ungereifte Rinderroocyten die Zugabe von Kryoprotektiva tolerieren, sie aber sehr empfindlich auf erniedrigte Temperaturen reagieren. Die verwendeten Kryoprotektiva bieten unter diesen Versuchsbedingungen keinen ausreichenden Schutz für ungereifte und gereifte Rinderroocyten.

Stoffregen, Christa: Investigations into the freezing tolerance of immature and in vitro matured bovine oocytes.

7. Summary

The present study investigated the freezing tolerance of immature and in vitro matured bovine oocytes. Ovaries were collected at a local slaughterhouse and follicles of 2-8 mm diameter in size were punctured to obtain oocytes. Oocytes were exposed to the experimental treatments either immediately after recovery as immature oocytes or following in vitro maturation for 24 hours in TCM 199 with 20% ECS and hormones (FSH, HCG and E₂) as in vitro matured oocytes. In vitro fertilization was accomplished with frozen/thawed swim-up separated sperms. Following 17 hours coculture in FERT TALP all oocytes were transferred into TCM 199 supplemented with 20% ECS. Following 48-52 hours of culture all oocytes were fixed and stained with 2% orcein. In three experiments the influence of cryoprotectants, cooling (to 0°C and -7°C) and freezing was tested. Criteria for treatment effects were percentage of cleavage stages at termination of culture. The following results were obtained:

1. The effects of a stepwise addition at 37°C and room temperature (RT) of various cryoprotectants (2 M DMSO or 2 M PROH) or a combination of cryoprotectants (1,5 M DMSO or 1,5 M PROH plus 0,5 M sucrose) on cleavage was studied using immature and matured oocytes. Exposure of immature oocytes at room temperature and matured oocytes at 37°C and RT to 2 M DMSO or of matured oocytes at 37°C or RT to 2 M PROH did not adversely affect the potential of oocytes to undergo fertilisation and early cleavage compared to controls (DMSO: 62.5%, 74.6%, 76.9% to 69.2%, 70.0%, 66.7% of the controls, PROH: 72.4%, 70.8% to 71.1%, 70.5% of the controls. The exposure of immature or mature oocytes at 37°C to DMSO/SUC or immature ones at RT or matured ones at 37°C to PROH/SUC resulted in similar cleavage rates as for controls (DMSO/SUC: 73.3%, 50.0% to 78.6%, 57.1% of the controls, PROH/SUC: 51.9%, 68.2% to 61.2%, 76.1%) . The following cryoprotectants were used for further experiments : Immature oocytes at RT: DMSO, PROH/SUC; immature oocytes at 37°C: DMSO/SUC; mature oocytes at RT and 37°C: DMSO and PROH.

2. In the next experiment the efficiency of cryoprotectants when exposed to lower temperatures was tested. The temperature was either reduced slowly i.e. 1°C/min from room temperature to 0°C or -7°C or rapidly to -7°C. At -7°C Seeding was induced. Cleavage rate of oocytes was significantly decreased in all experiments. A maximum of 14.9% of immature oocytes (with PROH/SUC cooling slowly to -7°C) and 15.8% of mature oocytes (with PROH cooling to 0°) cleaved at least once.

3. Furthermore fast (transfer to liquid nitrogen at -35°C) and slow (transfer to liquid nitrogen at -60°C) freezing methods were tested. With both methods in all four trials no further development was achieved.

The present results show that matured as well as immature oocytes tolerate the addition and removal of cryoprotectants. Bovine oocytes are however very sensitive to reduced temperatures. Under our experimental conditions the cryoprotectants did not protect immature or matured oocytes sufficiently from freezing damage.