

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob einerseits durch den Einsatz eines komplexen Einfrierbasismediums und andererseits durch den Zusatz eines aus winterfesten Gemüsepflanzen gewonnenen Gefrierschutzfaktors die Überlebens- und Weiterentwicklungsraten von IVF-Embryonen nach dem Auftauen gesteigert werden können.

Dafür wurde zuerst geklärt, in welchem Alter (Kultivierungsdauer vor dem Einfrieren: D₆ und D₇) die Embryonen am widerstandsfähigsten gegenüber der osmotischen Belastung während des Einfrierens und Auftauens sind.

Anschließend wurde ein auf der Grundlage des modifizierten Ménézo-Mediums entwickeltes Basismedium (TG-MMM), unter Zusatz von 10% Glycerin, als Einfriermedium benutzt.

Als Vergleichsmedium diente PBS mit einem Zusatz von 0,8% BSA und ebenfalls 10% Glycerin.

Weiterhin wurde der Einfluß eines aus Wirsing oder Rosenkohl gewonnenen Gefrierschutzfaktors auf das Überleben der IVF-Embryonen nach dem Auftauen ermittelt.

Im einzelnen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Die nach einer siebentägigen In-vitro-Kultivierung eingefrorenen Embryonen zeigten im Vergleich zu den nach einer sechstägigen Kultivierung eingefrorenen Embryonen gesteigerte Auftauraten. Diese Unterschiede waren nur bei einzelnen Kriterien signifikant (die Anzahl der Blastozysten nach 24- und 72stündiger Kultivierung war um 29% (Übersicht 6) und 13% (Übersicht 5) gesteigert, die Anzahl der degenerierten Embryonen nach 72stündiger Kultivierung um 21% gesenkt). Insgesamt konnte bei allen untersuchten Kriterien eine Überlegenheit nach Verwendung von D₇-Embryonen zum Einfrieren festgestellt werden.
2. Die Verwendung von TG-MMM als Einfrierbasismedium im Vergleich zu PBS bewirkte eine Steigerung der embryonalen Überlebensraten bezüglich aller Beurteilungskriterien (Morulae, Blastozysten, expandierte Blastozysten, geschlüpfte Blastozysten, Degenerierte). Bei Betrachtung der geschlüpften Blastozysten war nach einer 48stündigen Kultivierung eine signifikante Überlegenheit von 24% der in TG-MMM eingefrorenen Embryonen festzustellen. Nach einer 72stündigen Kultivierung wurde ein hochsignifikanter Unterschied von 33% ermittelt (Übersicht 8, beiden Basismedien war in diesem Versuchsansatz ein Gefrierschutzfaktorzusatz von 0,01% zugefügt).

In der in TG-MMM eingefrorenen Versuchsgruppe traten durchschnittlich 20% - 30% weniger degenerierte Embryonen auf als in der PBS-Gruppe.

(Die einzelnen Ergebnisse mit statistischer Auswertung sind den Übersichten 7 und 8 zu entnehmen.)

3. Nach Zusatz eines Gefrierschutzfaktors (GSF) zum Einfriermedium wirkte sich eine Konzentration von 0,01% am günstigsten auf die Auftauergebnisse aus. Kein Einfluß auf die Auftauergebnisse konnte festgestellt werden, wenn der Gefrierschutzfaktor aus zwei verschiedenen Gemüsesorten (Wirsing, Rosenkohl) extrahiert wurde.
4. Der Zusatz des Gefrierschutzfaktors zum Einfriermedium wirkte sich besonders auf die Überlebensraten der aufgetauten Embryonen aus. In allen Versuchsgruppen konnten über den Betrachtungszeitraum von vier Tagen die Degenerationsraten um ca. 25% gesenkt werden. Dagegen waren bei den embryonalen Weiterentwicklungsraten nur bei einzelnen Untersuchungskriterien Verbesserungen festzustellen. Hierbei konnte insbesondere 24 Stunden nach dem Auftauen die Zahl der festgestellten Blastozysten signifikant um 19% und 48 Stunden nach dem Auftauen die Zahl der geschlüpften Blastozysten signifikant um 23% und nach 72 Stunden hochsignifikant um 31% gesteigert werden. Bei den übrigen Kriterien waren die festgestellten Unterschiede geringer. (Die einzelnen Ergebnisse mit statistischer Auswertung sind den Übersichten 11, 12 und 13 zu entnehmen.)
5. Der aus Gemüsepflanzen extrahierte Gefrierschutzfaktor stellt nach derzeitigen Kenntnissen ein Gemisch aus Protein, Zucker und bisher nicht definierten Substanzen dar. Die Schutzwirkung dieses Gefrierschutzfaktors wurde bislang nur an pflanzlichen Membranen untersucht. Über ihren Wirkungsmechanismus gibt es bisher nur Hypothesen. Wahrscheinlich kommt es zu einer Fixierung des Gefrierschutzfaktors über Wasserstoffbrückenbindungen an die Zellmembran. Dadurch entsteht eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen Membran und Schutzstoff. Diese bewirkt einen Schutz der Membran vor den osmotischen Belastungen, die mit dem Einfrier- und Auftauvorgang einhergehen.

Claudia Walter:

Influence of a complex freezing medium on the results of cryopreservation of IVF embryos in consideration of a cryoprotecting factor extracted from vegetable plants

Summary

The purpose of this study was to test whether the use of a complex freezing medium on the one hand, and the addition of a cryoprotecting factor obtained from winter-hard vegetables on the other hand, can increase the survival rates and further development of IVF embryos after thawing.

For this it was first determined at which age embryos are most resistant to osmotic stress during freezing and thawing (length of cultivation before freezing: D₆ and D₇).

Following this a freezing medium developed on the basis of a modified Ménézo medium (TG-MMM) with the addition of 10% glycerin was used. PBS with 0,8% BSA and 10% glycerin served as control medium.

Furthermore, the effect of a cryoprotecting factor (GSF) won from savoy cabbage and Brussels sprouts on the survival of IVF embryos after thawing was tested.

The following results were obtained:

1. The embryos frozen after in vitro cultivation for seven days showed an increased thawing rate in comparison to embryos cultivated for six days. These differences were only significant for several criteria (the number of blastocysts after cultivation for 24 and 72 h was increased by 29% (see overview 6) and 13% (see overview 5), respectively, and the number of degenerated embryos after 72 h cultivation lowered by 21%). All in all the superiority of using D₇ embryos for freezing was shown in all criteria.
2. In comparison to PBS, the use of TG-MMM as freezing base medium increased the embryonal survival rates, in regards to all evaluational criteria (morulae, blastocysts, expanded blastocysts, hatched blastocysts, degenerated embryos). 24% more hatched blastocysts were seen from embryos frozen in TG-MMM after 48 h cultivation. After 72 h cultivation a difference from 33% was seen (overview 8, both base media were supplemented with 0,01% cryoprotecting factor).
An average of 20 - 30% fewer degenerated embryos were seen in the embryos frozen in TG-MMM than in the PBS group. (The individual results and statistical analysis can be taken from overviews 7 and 8.)

- 3. The addition of a cryoprotecting factor to the freezing medium at a concentration of 0,01% had the best effect on thawing rates. No influence could be seen in the thawing rates with the cryoprotecting factor extracted from two types of vegetables (savoy cabbage, Brussels sprouts).**
- 4. The addition of the cryoprotecting factor to the freezing medium is especially effective on the survival rates of thawed embryos. Over the observation period of four days the rates of degeneration could be reduced by approximately 25% in all test groups. In contrast, an improvement in the rates of further embryonal development could only be seen in a few of the criteria evaluated. In particular, the number of blastocysts found 24 h after thawing increased significantly by 19%. The number of hatched blastocysts found 48 and 72 h after thawing increased significantly by 23 and 31%, respectively. The changes seen in the other criteria were only slight. (The individual results and statistical analysis can be taken from overviews 11. 12 and 13)**
- 5. The cryoprotecting factor extracted from vegetable plants is currently thought to be a mixture of protein, sugar, and further undefined substances. The protective activity of this cryoprotecting factor had only been tested on plant membranes to date. The mechanism of activity is still hypothetical. The cryoprotecting factor is most likely bound to the cell membrane by hydrogen bounds. This results in a stabilizing interaction between the membrane and the cryoprotecting factor. This protects the membrane against osmotic stresses, which occur as a result of freezing and thawing**