

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Tiefgefrieren immaturer und in vitro gereifter Rinderoozyten mittels Vitrifikation durchgeführt. Hierzu wurden in einem nahegelegenen Schlachthof Ovarien von Färsen und Kühen gesammelt und durch Slicing pro Ovar ca. 10-15 Oozyten von guter bis sehr guter Qualität gewonnen. Von diesen immaturren Oozyten wurde bei jedem Versuch ein Teil vitrifiziert, ein Teil äquilibriert und direkt ausverdünnt sowie ein Teil als Kontrollgruppe unbehandelt belassen. Nach 24 h in vitro-Maturation in TCM 199 mit 20% OCS und Hormonen (FSH, HCG u. E₂) wurde mit gereiften Oozyten ebenso verfahren. Es wurden elf verschiedene Vitrifikationsmethoden eingesetzt.

Die vitrifizierten Eizellen wurden jeweils nach einem Aufenthalt von etwa einer Stunde im flüssigen Stickstoff wieder aufgetaut und ihrem Stadium entsprechend in das in vitro-Verfahren eingefügt. Zur in vitro-Fertilisation wurde Tiefgefriersperma benutzt. Nach 19-stündiger Ko-Kultur der Oozyten und Spermien wurden die Oozyten zur IVC in TCM 199 mit 20 % OCS überführt und regelmäßig auf Teilungen untersucht. Außerdem wurde zur Überprüfung der Lebensfähigkeit und um die morphologische Beurteilung abzusichern in jedem Abschnitt aller Versuche (äquilibrierte, vitrifizierte und Kontrollgruppe der ungerreifen und der gereiften Oozyten) ein Teil der KOK mit FDA gefärbt und auf Fluoreszenz untersucht.

Es wurden nach der Äquilibrierung an die Vitrifikationslösungen folgende Teilungs- und Entwicklungsraten erreicht:

Versuch 1 (VS Gly, drei Äquilibrierungsschritte)

ungereifte Oozyten 21 u. 15%, gereifte 35 u. 17%, Kontrollen 50,9 u. 30,9%;

Versuch 2 (VS ProH+Gly, drei Äquilibrierungsschritte)

ungereifte 0 u. 0%, gereifte 31 u. 14%, Kontrollen 55 u. 10%;

Versuch 3 (VS ProH+Gly, stufenweise äquilibriert)

ungereifte 37 u. 14%, gereifte 49 u. 16%, Kontrollen 40 u. 17,5%;

Versuch 4 (VS Gly+ProH, zwei Äquilibrierungsschritte)

ungereifte 42 u. 15%, gereifte 22 u. 9%, Kontrollen 46 u. 16%;

Versuch 5 (VS Gly+ProH, vier Äquilibrierungsschritte)

ungereifte 43 u. 17%, gereifte 17 u. 4%, Kontrollen 50 u. 23%;

Versuch 6 (VS Gly+ProH+Trehalose, vier Verdünnungsschritte)

ungereifte 6 u. 0%, gereifte 7 u. 1%, Kontrollen 45 u. 21,3%;

Versuch 7 (VS Gly+ProH, Trehaloseverdünnung)

ungereifte 33 u. 5%, gereifte 16 u. 6%, Kontrollen 57,5 u. 30%;

Versuch 8 (VS ProH+DMSO+Acetamid, 12 Verdünnungsschritte)

ungereifte 49 u. 19%, gereifte 31 u. 5%, Kontrollen 18 u. 54%;

Versuch 9 (VS ProH+DMSO+Acetamid+Sucrose, vier Verdünnungsschritte)

ungereifte 11 u. 0%, gereifte 23 u. 11%, Kontrollen 58,8 u. 27,5%;

Versuch 10 (VS ProH+Gly+AFP I)

ungereifte 40 u. 22%, gereifte 45 u. 13%, Kontrollen 39 u. 17%;

Versuch 11 (VS Gly+ProH+AFP I+Trehalose, vier Äquibrierungsschritte)

ungereifte 40 u. 23%, gereifte 41 u. 9%, Kontrollen 40 u. 13,3%

Im Anschluß an die Vitrifikation konnten in keinem der Versuche Teilungen oder Weiterentwicklungen beobachtet werden. Die Kontrollen hingegen wiesen durchschnittliche Teilungsraten von 49,2% und Entwicklungsraten von durchschnittlich 20,7% auf.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Äquibrierung und Ausverdünnung an verschiedene VS von ungereiften und in vitro gereiften Rinderoozyten toleriert werden kann. Es kommt allerdings - verglichen mit unbehandelten Kontrollen - zu signifikanten Reduktionen der Teilungs- und Entwicklungsraten. Diese Abweichungen waren innerhalb der Versuche bei ungereiften Oozyten am häufigsten. Einige Versuche (3, 10 und 11) lieferten jedoch Ergebnisse, die von denen der Kontrollen nicht signifikant abwichen.

Das Tiefgefrieren mit 11 verschiedenen Vitrifikationsverfahren führte jedoch in jedem Fall zum Absterben der Oozyten, womit dessen Ursache auf Schädigungen während des Tiefgefrierens und/oder Auftauens eingegrenzt werden konnte. Um erfolgreiche Verfahren zur Kryokonservierung von Rinderoozyten erstellen zu können, müssen die auslösenden Mechanismen der Schädigung festgestellt und Möglichkeiten zu deren Vermeidung gefunden werden. Der Einsatz von Glycoproteinen wie AFGP/AFP oder pflanzlichen Gefrierschutzfaktoren könnte eine solche Möglichkeit darstellen.

Baron, Ute: Experimental investigations on freezing of immature and in vitro matured bovine oocytes via vitrification

7.

SUMMARY

The present study investigated the possibility of freezing immature and in vitro matured bovine oocytes by different methods of vitrification. Ovaries from cows or heifers were collected at a local slaughterhouse and 10-15 good to very good quality oocytes each were obtained by slicing. Treatments were started either immediately after recovery (immature oocytes) or after 24 h in vitro maturation in TCM 199 supplemented with 20% ECS and hormones (FSH, HCG and E₂) as in vitro matured oocytes. From each group (immature vs matured oocytes) 20 cumulus-oocyte-complexes (COC) were processed through the complete vitrification procedure, another 20 COC only through equilibration directly followed by dilution and a third part was left untreated as control. 11 vitrification protocols were used in this study.

Vitrified oocytes were thawed after maximum 1 h in liquid nitrogen and entered the IVM vs IVF treatment depending on the stage of development.

For in vitro fertilization frozen-thawed sperm from one bull was used. After 19 h co-culture of oocytes and sperms the oocytes were placed in culture medium (TCM 199 with 20% ECS) and cleavage rates were recorded. Besides, a part of each experimental group (immature and matured equilibrated, vitrified and controls) was stained with FDA (Fluorescein diacetate) to evaluate viability and to control the morphological assessment.

The following cleavage and developmental rates (% of all oocytes used) were obtained after equilibration to the vitrification solutions (VS):

Exp. 1 (VS GLY, three steps of equilibration)

immature oocytes: 21 and 15%, matured: 35 and 17%, controls: 50.9 and 30.9%;

Exp. 2 (VS PROH+GLY, three steps of equilibration)

immature: 0 and 0%, matured: 31 u. 14%, controls: 55 and 10%;

Exp. 3 (VS PROH+GLY, stepwise equilibration)

immature: 37 and 14%, matured: 49 and 16%, controls: 40 and 17.5%;

Exp. 4 (VS GLY+PROH, two steps of equilibration)

immature: 42 and 15%, matured: 22 and 9%, controls: 46 and 16%;

Exp. 5 (VS GLY+PROH, four steps of equilibration)

immature: 43 and 17%, matured: 17 and 4%, controls: 50 and 23%;

Exp. 6 (VS GLY+PROH+Trehalose, four steps of dilution)

immature: 6 and 0%, matured: 7 and 1%, controls: 45 and 21.3%;

Exp. 7 (VS GLY+PROH, diluted with Trehalose)

immature: 33 and 5%, matured: 16 and 6%, controls: 57.5 and 30%;

Exp. 8 (VS PROH+DMSO+Acetamide, 12 steps of dilution)

immature: 49 and 19%, matured: 31 and 5%, controls: 18 and 54%;

Exp. 9 (VS PROH+DMSO+Acetamide+Sucrose, four steps of dilution)

immature: 11 and 0%, matured: 23 and 11%, controls: 58.8 and 27.5%;

Exp.10 (VS PROH+GLY+AFP I)

immature: 40 and 22%, matured: 45 and 13%, controls: 39 and 17%;

Exp.11 (VS GLY+PROH+AFP I+Trehalose, four steps of equilibration)

immature: 40 and 23%, matured: 41 and 9%, controls: 40 and 13.3%.

After vitrification none of the oocytes showed any cleavage or development in culture while in the controls average cleavage rates of 49.2% and developmental rates of 20.7% could be achieved.

The present results show that equilibration to and dilution of several vitrification solutions is tolerated by immature and in vitro matured bovine oocytes. However, there are significant reductions in cleavage and/or development as compared to untreated controls. These deviations were the highest for the immature oocytes when compared to all experiments. On the other hand there were some experiments which did not differ significantly from controls (Exp.3, 10 and 11). Freezing with the different vitrification protocols led in each trial to the death of the oocytes. It was assumed that the main damage is done while freezing and /or thawing is going on and not during equilibration or dilution procedures.

To find a way for successful cryopreservation of bovine oocytes the mechanisms of damage have to be investigated and also possibilities to avoid them must be found. The results of experiments using glycoproteins like AFGP/AFP or herbal cryoprotectant factors seem to be promising.