

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für den Hauptversuch von den Schlachthöfen in Erlangen und Bamberg 1392 Ovarien von geschlachteten Rindern zum Labor der ET-Station des Besamungsvereines Neustadt a. d. Aisch in Hambühl transportiert. Dort wurden die Oozyten gewonnen, gereift, in vitro befruchtet und kultiviert. Anschließend wurden die entstandenen Blastozysten unter verschiedenen Versuchsbedingungen tiefgefroren, aufgetaut und die Überlebens- und Schlupfraten festgestellt. Ein Teil der eingefrorenen Blastozysten wurde für Transferversuche verwendet.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Insgesamt wurden 5378 Oozyten gewonnen. Dies entsprach einer Anzahl von $3,9 \pm 1,5$ Oozyten pro Ovar. Nach der In-vitro-Fertilisation teilten sich $3881 = 72,2 \pm 11,8 \%$ der Oozyten, das Stadium einer einfriertauglichen Blastozyste erreichten $25,6 \pm 9,2 \%$ der geteilten Oozyten, so daß insgesamt 999 Blastozysten entstanden.
2. Durch Zusatz von $0,01 \%$ eines aus Pflanzen isolierten Gefrierschutzfaktors (GSF) zum Einfriermedium konnte weder mit Ethylenglykol noch mit Glycerin als Kryoprotektivum eine Verbesserung der Auftauergebnisse erzielt werden. Die Überlebens- bzw. Schlupfraten der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe lagen bei der Verwendung von Ethylenglykol mit D7-Blastozysten bei 74 vs. 81% bzw. 46 vs. 48% , mit D8-Blastozysten wurden 59 vs. 50% bzw. 25 vs. 27% ermittelt. Bei Verwendung von Glycerin beliefen sich die entsprechenden Werte mit D7-Blastozysten auf 58 vs. 59% bzw. 34 vs. 37% sowie mit D8-Blastozysten auf 35 vs. 42% bzw. 15 vs. 12% .
3. Bei Einsatz eines hochgereinigten pflanzlichen Gefrierschutzfaktors (HGGSF) konnte eine Verbesserung der Auftauergebnisse festgestellt werden. Im Rahmen der Versuche wurde eine Abnahme der Schutzwirkung des HGGSF nach 17 Tagen Aufbewahrung festgestellt. So konnte die Schlupfrate mit dem HGGSF 7-10 Tage nach seiner Isolierung um 17% verbessert werden (26 vs. 43%), während 17-19 Tage nach der Isolierung kein Effekt mehr nachgewiesen wurde (26 vs. 28%). Dabei fiel allerdings nur die Verbesserung der Überlebensrate 96 Stunden nach dem Auftauen signifikant aus (50 vs. 26%).

4. Die Ergebnisse eines parallel zu den Einfrierversuchen durchgeführten Aktivitätstests des HGGSF mit Hilfe eines Thylakoidmembranassays lassen offensichtlich Hinweise auf die zu erwartende Schutzwirkung des HGGSF auf IVF-Blastozysten zu. Der bis zu zehn Tage alte HGGSF zeigt im Assay eine Aktivität von 70 %, während für den 17 Tage alten HGGSF 50 % ermittelt wurden.
5. Nach 32 Transfers von IVF-Blastozysten mit und ohne GSF wurde in institutseigenen Herden bei Moskau im Mittel eine Trächtigkeitsrate von 44 % erreicht, wobei zwischen den beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede auftraten. Nach 87 Transfers in unkontrollierten Herden außerhalb Moskaus wurden 12 % der Empfängertiere tragend.
6. Eingefrorene in vivo gewonnene Blastozysten zeigten gegenüber in vitro erstellten Blastozysten sowohl 24 als auch 96 Stunden nach dem Auftauen mit 92 vs. 55 % und 92 vs. 34 % eine hochsignifikant höhere Überlebensrate. Die Schlupfrate 96 Stunden nach dem Auftauen lag bei in vivo gewonnenen Blastozysten ebenfalls hochsignifikant höher (92 vs. 31 %).
7. Beim Vergleich von D7- und D8-Blastozysten nach dem Auftauen zeigte sich eine deutlich höhere Überlebensrate der D7-Embryonen nach den Einfrier- und Auftauvorgängen. Sowohl bei der Verwendung von Ethylenglykol als auch Glycerin als Kryoprotektivum im One-step-Verfahren konnten signifikant höhere Überlebens- und Schlupfraten ermittelt werden. Bei der Verwendung von Ethylenglykol schlüpfen 47 % der D7- und 25 % der D8-Blastozysten, für Glycerin lagen die entsprechenden Werte bei 35 und 13 %.
8. Beim Vergleich drei verschiedener Einfrierverfahren (Glycerin-Standard, Glycerin- u. Ethylenglykol-one-Step) lagen die Überlebensraten von D7-Blastozysten 24 bzw. 96 Stunden nach dem Auftauen sowie die Schlupfrate 96 Stunden nach dem Auftauen nach Verwendung von Ethylenglykol mit 78 % bzw. 53 % sowie 47 % signifikant höher als bei der Verwendung von Glycerin im Standardverfahren (66 bzw. 32 % sowie 29 %) oder im One-step-Verfahren (59 bzw. 38 % sowie 35 %).

Stephan Lange

Results of the cryopreservation of in vitro produced cattle blastocysts under special consideration of the addition of a plant derived cryoprotective factor to the freezing media.

Summary

A total of 1392 ovaries from slaughtered cows have been transported from the slaughterhouses in Erlangen and Bamberg to the laboratory of the ET-Station of the "Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch" at Hambühl. There the oocytes have been collected, matured, fertilized and cultured in vitro. Afterwards the resulting blastocysts have been frozen under various conditions of experiment, thawed and the post-thaw-survival and hatching rates have been established. Part of the frozen blastocysts have been used for transfer experiments.

In detail, the following results have been obtained:

- 1.** Altogether 5378 oocytes have been derived. This corresponds to a quantity of 3,9 +/- 1,5 oocytes per ovary. After in vitro fertilization 3881 oocytes or 72,2 +/- 11,8 % cleaved, 25,6 +/- 9,2 % of the cleaved oocytes reached the state of a freezable blastocyst so that altogether 999 blastocysts were obtained.
- 2.** By adding a cryoprotective factor isolated from plants (GSF) to the freezing media, the post thaw survival could neither be improved with ethylenglycol as cryoprotectant nor with glycerin. The survival and hatching rate of D7-blastocysts frozen with ethylenglycol were 74 vs. 81 % and 46 vs. 48 % in the experimental group compared to the control group, with D8-blastocysts the corresponding results were 59 vs. 50 % and 25 vs. 27 %. After the use of glycerin, the results were 58 vs. 59 % and 34 vs. 37 % with D7-blastocysts and 35 vs. 42 % and 15 vs. 12 % with D8 blastocysts.
- 3.** By adding a highly purified plant-derived cryoprotective factor (HGGSF) the post thaw results could be improved. A reduction of the cryoprotective activity of the HGGSF was observed within 17 days of storage. By adding the HGGSF 7-10 days after the isolation the

hatching rate could be improved up to 17 % (26 vs. 43 %) while there was no more effect 17-19 days after the isolation (26 vs. 28 %). The post thaw survival 96 hours after thawing was significantly improved (26 vs. 50 %).

4. The results of an activity test with an thylakoidmembranassay that was conducted parallel to the freezing experiments can obviously give an indication of the expected protective activity of the HGGSF for IVF-blastocysts. The HGGSF up to 10 days old showed an activity of 70 % in the assay, while for the 17-day-old HGGSF an activity of 50 % was evaluated.

5. After the transfer of 34 IVF-blastocysts with or without GSF to recipient herds of two institutes near Moskau, an average pregnancy rate of 44 % could be established. No difference could be observed between the two experimental groups. By transferring 87 IVF-blastocysts to uncontrolled recipient herds outside the Moskau area, 12 % of the recipients became pregnant.

6. Cryopreserved in vivo derived blastocysts survived significantly better 24 and 96 hours after thawing than in vitro derived blastocysts (92 % vs. 55 % and 92 % vs. 34 %). The hatching rate of in vivo derived blastocysts was significantly higher as well (92 % vs. 31 %).

7. On comparing the post thaw survival of D7- and D8-blastocysts the D7-blastocysts showed significantly higher survival rates after freeze-thaw-procedures. Both with ethylenglycol and glycerin as cryoprotectant for the one-step-procedure they showed significantly higher survival and hatching rates after thawing. With ethylenglykol 47 % of the thawed D7- and 25 % of the D8-blastocysts hatched, with glycerin the corresponding results were 35 vs. 13 %.

8. On comparing three different procedures of freezing (glycerin-standard, glycerin-one-step and ethylenglycol-one-step) the survival rates 24 respectively 96 hours after thawing and the hatching rate 96 hours after thawing of D7-blastocysts were significantly higher after the use of ethylenglycol (78 resp. 53 % and 47 %) than with the use of glycerin in the standard procedure (66 resp. 32 % and 29 %) or in the one-step-procedure (59 resp. 38 % and 35 %).