

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die In-vitro-Fertilisationsraten und die Auftauergebnisse kryokonservierter IVF-Embryonen getestet. Zur Beurteilung der Überlebensraten nach dem Auftauen wurde der Anteil geschlüpfter Embryonen bis 96h nach dem Auftauen und der Anteil degenerierter Embryonen nach 24h, 96h und 120h Kultivierungszeit ermittelt. Untersucht wurde der bullenspezifische Effekt auf die Teilungs- und Weiterentwicklungsraten der befruchteten Oozyten in vitro sowie die Tiefgefriereignung der von unterschiedlichen Bullen stammenden Blastozysten. Weiterhin wurde der Einfluß des Alters und Entwicklungsstandes der Embryonen zum Zeitpunkt der Kryokonservierung auf die Überlebensraten nach dem Auftauen ermittelt. Schließlich wurde untersucht, welche Wirkung der Zusatz pflanzlicher Gefrierschutzsubstanzen zum Tiefgefriermedium auf die Auftauergebnisse kryokonservierter IVF-Rinderblastozysten hat.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Tiefgefriersperma von drei verschiedenen Bullen wurde zur IVF verwendet. Zwischen den Bullen wurden Unterschiede bei den Teilungsraten der Oozyten von 41% bis 78% und bei den Weiterentwicklungsraten bis zur Blastozyste zwischen 5% bis 30% ermittelt. Die Unterschiede sind hochsignifikant. Die Bullen wurden routinemäßig erfolgreich zur Rinderbesamung eingesetzt. Die Untersuchung von Spermaproben der Bullen ergab keine Befunde, die auf eine verminderte Befruchtungsfähigkeit in vivo hingewiesen hätten.
2. Bei Einsatz von Mischsperma von zwei Bullen mit niedrigen IVF-Ergebnissen konnte die Teilungsrate von 41% bzw. 54% auf 61% und die Weiterentwicklungsraten von 5% bzw. 7% auf 16% signifikant gesteigert werden.
3. Bei Verwendung verschiedener Heparinkonzentrationen ($1\mu\text{g}$ bis $2\mu\text{g}/\text{ml}$) im Befruchtungsmedium wurden Teilungsraten von 60% bis 63% und Weiterentwicklungsraten zu einfriertauglichen Blastozysten von 9% bis 10% erzielt. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.
4. Beim Vergleich der Auftauergebnisse kryokonservierter Blastozysten eines Bullen mit guten bzw. eines Bullen mit schlechten IVF-Ergebnissen wurden Schlupfraten von 35% bzw. 20% ermittelt. Die Unterschiede sind statistisch signifikant.

5. Die besten Überlebensraten nach dem Auftauen wurden mit expandierten bzw. expandierenden Blastozysten gleichermaßen am 7. oder 8. Tag nach der Befruchtung erzielt (Schlupfraten: 49% und 43%). Dagegen erwiesen sich beginnende Blastozysten und Blastozysten mit Schlupfraten von 35% und 28% als signifikant anfälliger gegenüber dem Einfrier- und Auftauprozeß. Für D7-Blastozysten wurden insbesondere hinsichtlich der Degenerationsrate deutlich bessere Auftauergebnisse ermittelt als für D8-Blastozysten (Degenerationsrate nach 24h Kultivierungszeit: 31% vs 48%, $p < 0,05$; nach 96h Kultivierungszeit: 65% vs 83%; $p < 0,05$).

6. Mit 10% Glycerin-Zusatz kryokonservierte Blastozysten wiesen nach dem Auftauen hochsignifikant häufiger Defekte der Zona pellucida auf als bei Verwendung von 1,5M Ethylenglycol als Kryoprotektivum (22% vs 7%).

7. Bei Verwendung von 1,5M Ethylenglycol als Kryoprotektivum konnten durch Zusatz von Gefrierschutzfaktoren sowohl aus frostakklimatisierten als auch aus nicht frostakklimatisierten Pflanzen, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne GSF, keine Verbesserungen der Überlebensraten nach dem Auftauen von kryokonservierten Blastozysten nachgewiesen werden. Die entsprechenden Schlupfraten lagen bei D7-Embryonen bei 34% vs 34% vs 35%, bei D8-Embryonen bei 23% vs 24% vs 28%.

8. Bei Verwendung eines hochgereinigten Gefrierschutzfaktors als Zusatz zum Tiefgefriermedium konnte mit 1,5M Ethylenglycol bzw. 10% Glycerin als Kryoprotektivum die Schlupfrate im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne GSF um 17% bzw. 13% signifikant gesteigert werden (Schlupfraten: 52%, 48% vs 35%). Der Anteil degenerierter Blastozysten 96h nach dem Auftauen lag in den mit Gefrierschutzfaktor kryokonservierten Gruppen mit 44% und 42% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit 60% signifikant niedriger. Bei der Tiefgefrierung von D8-Blastozysten hatte der Zusatz eines hochgereinigten Gefrierschutzfaktors zum Einfriermedium keinen deutlichen Einfluß auf die Überlebensraten nach dem Auftauen (Schlupfraten: 32% vs 28%).

9. Durch Zusatz eines hochgereinigten Gefrierschutzfaktors zum Tiefgefriermedium konnten die Auftauergebnisse von D7-Blastozysten, die von einem Bullen mit schlechter IVF-Eignung stammten, nicht signifikant verbessert werden. Mit und ohne Gefrierschutzfaktorzusatz lag der Anteil geschlüpfter Embryonen nach dem Auftauen bei 30% bzw. 20%. Nach 24h Kultivierungszeit waren 30% bzw. 32%, nach 96h Kultivierungszeit 46% bzw. 59% der aufgetauten Embryonen degeneriert.

Hildegard Thiemann:

Studies on improving the cryoconservation of cattle IVF embryos under consideration of semen donor, the age and developmental stage of the embryos and the addition of a vegetable cryoprotectant factor.

Summary

In the present study the influence of various parameters on in vitro fertilization rates and the thawing results of cryopreserved IVF embryos was tested. To evaluate the survival rates after thawing, the proportion of hatched embryos was determined up to 96h after thawing and was the proportion of degenerated embryos after 24h, 96h and 120h of cultivation. Bulls specific effects on the rates of division and further development of fertilized oocytes in vitro and in the suitability of embryos for cryopreservation were tested. Furthermore, the influence of the age and developmental status of the embryos at the time of cryopreservation on the survival rates after thawing was evaluated. Lastly, the effect of the addition of vegetable cryoprotectants to the thawing medium on the thawing rates of cryopreserved IVF embryos was investigated.

The following results were obtained:

1. Deep-frozen semen from three different bulls was used for IVF. Differences of 41% to 78% in the division rates of oocytes, and of 5% to 30% in the rates of further development were seen between bulls. These differences are highly significant. The bulls were successfully used for insemination on a routine basis. No results were found in spermatological examinations which might have been indicative of lowered fertility in vivo.
2. With the use of pooled semen from two bulls with low IVF results the division was increased significantly from 41% and 54%, respectively, to 64%, and the rate of further development increased significantly from 5% and 7%, respectively, to 16%.
3. Using various heparin concentrations (1 μ g to 2 μ g/ml) in the fertilization medium, rates of division of 60% to 63% and rates of further development to cryopreservable blastocysts of 9% to 10% were obtained. The differences were not statistically significant.

4. In comparing the thawing results of blastocysts from bulls with good or poor IVF results, hatching rates of 35% and 20%, respectively, were obtained. The differences were not statistically significant.
5. The best survival rates after thawing were obtained with expanded or expanding blastocysts on day 7 or 8 after fertilization (hatching rates: 49% and 43%). On the other hand, beginning blastocysts and blastocysts, with hatching rates of 35% and 28%, were significantly more sensitive to the freezing and thawing process. In regards to the degeneration rates, significantly better thawing results were found for D7 blastocysts than for D8 blastocysts (degeneration rate after cultivation for 24h: 31% vs. 48%, after cultivation for 96h: 65% vs. 83%).
6. Zona defects after thawing were seen highly significantly more often in blastocysts cryopreserved with 10% glycerin additive than in those with 1,5M ethylene glycol as cryopreservative (22% vs. 7%).
7. Using 1,5M ethylene glycol as cryopreservative, the addition of cryoprotectant factors (GSF) from winter-hard or non-winter-hard plants did not increase the survival rates of blastocysts above that of the control group without GSF. The corresponding hatching rates for D7 embryos were 34% vs. 34% vs. 35%, and for D8 embryos 23% vs. 24% vs. 28%.
8. Using a highly purified GSF as an additive to the freezing medium, the hatching rate with 1,5M ethylene glycol and 10% glycerin as cryoprotectants could be increased significantly by 17% and 13%, respectively, in comparison to the control group without GSF (hatching rates: 52%, 48% vs. 35%). The percentage of degenerated blastocysts 96h after thawing was significantly lower in the groups cryopreserved with GSF (44% and 42%, resp.) than in the untreated control (60%). In deep-freezing D8 blastocysts the addition of highly purified GSF to the freezing medium did not have a clear effect on survival rates after thawing (hatching rates: 32% vs. 28%).
9. The addition of highly purified GSF to the freezing medium did not significantly improve the thawing rates of D7 blastocysts from bulls poorly suited for IVF. With or without GSF the percentage of hatched embryos was 30% and 20%, respectively. After cultivating for 24h, 30% and 32% of the thawed embryos, respectively, had degenerated, as had 46% and 59%, respectively, after 96h.