

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Kryokonservierung von Rinderembryonen mit dem Ethylenglycol-One-Step-Verfahren und der Vitrifikation durchgeführt.

Für die Versuche wurden insgesamt 752 Embryonen verwendet, die von 263 superovulierten Versuchstieren gewonnen wurden.

Bei dem "One-Step-Verfahren" (Versuch 1) wurde das Gefrierschutzmittel Ethylenglycol in der Konzentration 1,5 M in einem konventionellen Gefrierprogramm (0,5°C/min bis -35°C) eingesetzt. Zusätzlich wurden unterschiedliche Auftaubedingungen getestet, wobei unter anderem die Auftautemperatur verändert wurde. Bei einer Versuchsgruppe erfolgte sofort nach dem Auftauen der Transfer auf vorbereitete Empfängertiere.

Bei den Vitrifikationsversuchen (Versuche 2-5) wurden zwei unterschiedliche Verfahren auf die Toxizität der Lösungen und erfolgreiche Kryokonservierung untersucht. Bei einem Verfahren wurden weitergehende Modifikationen in Äquilibrationsart und -temperatur vorgenommen.

Zur Beurteilung der Embryonenqualität nach Versuchsdurchführung (Tiefgefrier-, Auftau-, oder Äquilibrationsversuche) wurden morphologische Kriterien, sowie die Weiterentwicklung nach 48stündiger Kultivierung herangezogen. Zusätzlich wurde der Embryonendurchmesser, die Anzahl der Zellkerne und durch eine Differentialfärbung der Anteil an ICM- und Trophektodermzellen ermittelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Tag 7 Embryonen, die 48 Stunden kultiviert wurden.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1) Bei den Untersuchungen zum Ethylenglycol-One-Step-Verfahren (Versuch 1) wurden nach dem Auftauen in Luft bei Raumtemperatur (18-22°C) bei Morulae und Blastozysten starke Degenerationserscheinungen festgestellt. In der anschließenden in vitro Kultur erfolgte keine Weiterentwicklung (0/29). Bei Änderung der Auftautemperatur im Wasserbad von 30°C auf 20°C zeigte sich bei einer Überlebensrate von 60% kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (30°C, 87/145; 20°C, 9/15). Wenn der Straw vor dem Eintauchen in das Wasserbad erst für 10 Sekunden in der Luft erwärmt wurde ergaben sich schlechtere Überlebensraten (46,7%) als wenn sofort in das Wasserbad getaucht wurde (60%). Der Vergleich von Morulae und Blastozysten ergab nur beim sofortigen Auftauen im 30°C Wasserbad einen hochsignifikanten Unterschied zugunsten der Blastozysten (Blastozysten 84% ÜR, Morulae 49,5% ÜR).

Bei direktem Embryotransfer nach dem Auftauen stellten sich zwischen Morulae und Blastozysten keine signifikanten Unterschiede in den Trächtigkeitsraten heraus, die Gesamtträchtigkeitsrate lag bei 57,7%.

Im Embryonendurchmesser und bei der Anzahl der Zellkerne ergaben sich keine Unterschiede zu den Kontrollembryonen. Ein hochsignifikanter Unterschied wurde jedoch bei der Differentialfärbung zwischen geschlüpften Blastozysten der Kontrollgruppe und Versuch 1 (30°C WB, sofortiges Eintauchen) in der Gesamtzellzahl festgestellt. Bei der ICM-Zellzahl zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Embryonen aus dem Versuch 4 gegenüber den Embryonen aus Versuch 1. Der Anteil der ICM-Zellen an der Gesamtzellzahl (Verhältnis) war bei diesen Gruppen nicht verschieden.

2) In dem Vitrifikations- und Äquilibrierungsversuch mit Glycerin und Propandiol mit 4 Äquilibrierungsschritten bei 18-22°C Raumtemperatur (Versuch 2) wurde nach beiden Versuchsdurchführungen (Äquilibrierung und/oder Vitrifikation) keine Reexpansion der Embryonen beobachtet. Nach 24stündiger in vitro Kultur bestanden die Embryonen nur noch aus kleingranuliertem Zellmaterial ohne erkennbare Blastomerenstruktur (ÜR: 0/20, 0/18).

3) In dem Vitrifikations- und Äquilibrierungsversuch mit Glycerin und Propandiol mit 16 Äquilibrierungsschritten bei 18-22°C Raumtemperatur (Versuch 3) haben sich 5 von 22 Embryonen in der in vitro Kultur weiterentwickelt (22,7% ÜR). Bei den überlebenden Embryonen aus dem Äquilibrierungsversuch wurde nach teils unvollständiger Reexpansion eine eintägige Wachstumsverzögerung beobachtet. Nach Vitrifikation wurde kein Wachstum festgestellt (0/16). Morphologisch fielen vermehrt Devitrifikationen auf. Bei Messungen des Embryonendurchmessers und der Kernzahlbestimmung ergab sich bei den fünf Embryonen, die sich zur expandierten Blastozyste weiterentwickelt haben, kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

4) In dem Vitrifikations- und Äquilibrierungsversuch mit Glycerin und Propandiol mit 16 Äquilibrierungsschritten bei 15°C Raumtemperatur (Versuch 4) zeigten die Embryonen nur nach dem Äquilibrierungsversuch eine Weiterentwicklung in der in vitro Kultur (38,4%). Auch hier waren vereinzelt Verzögerungen in der Reexpansion zu beobachten, wobei nach schneller, vollständiger Reexpansion immer auch eine Weiterentwicklung in der in vitro Kultur folgte. Bei den Vitrifikationsversuchen kam es häufig zu Devitrifikationen.

Bei der Bestimmung des Embryonendurchmessers konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe und den anderen Gruppen festgestellt werden. Bezüglich der durchschnittlichen Kernzahl ergab sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei den geschlüpften Blastozysten ein signifikanter Unterschied, der in einer reduzierten Kernzahl um ca.32 Kerne sichtbar wurde. Im Verhältnis der ICM-Zellen zur Gesamtzellzahl konnte bei den geschlüpften Blastozysten zwischen den Embryonen aus diesem Versuch und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied, zu den Embryonen aus VS5 ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei den expandierten Blastozysten war der proportionale Anteil der ICM-Zellen an der Gesamtzellzahl höher als bei den geschlüpften Blastozysten.

5) In dem Vitrifikations- und Äquilibrierungsversuch mit Ethylenglycol, Ficoll und Sucrose zeigten von den Embryonen 35,1 % (33/94) nach Äquilibrierung und 5,7 % (2/35) nach Vitrifikation eine Weiterentwicklung in der in vitro Kultur, der andere Teil dieser Gruppe (65%) und (94%) hatte trotz fast vollständiger Reexpansion nach 24stündiger Kultur starke Degenerationsbereiche in Form von kleingranuliertem Zellmaterial. Devitrifikationen wurden nicht beobachtet.

Der Embryonendurchmesser der geschlüpften Blastozysten war in dieser Gruppe signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe. In der durchschnittlichen Kernzahl ergab sich bei dem Vergleich von geschlüpften Blastozysten mit der Kontrollgruppe, expandierten Blastozysten mit der Gruppe aus Versuch 3, ein hochsignifikanter Unterschied in Form einer stark verminderten Kernzahl.

Mit der Differentialfärbung konnte bei den geschlüpften Blastozysten eine signifikant herabgesetzte ICM-Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt werden. In dieser Gruppe war auch der Unterschied im Anteil der ICM-Zellen an der Gesamtzellzahl gegenüber der Gruppe aus Versuch 4 hochsignifikant.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß mit dem hier durchgeführten Ethylenglycol-One-Step-Verfahren, bei einer Auftautemperatur von 20-30°C im Wasserbad, ein für Morulae und Blastozysten gleichermaßen geeignetes praxisnahes Verfahren für Kryokonservierung und anschließendem Embryotransfer zur Verfügung steht.

Bei dem ersten untersuchten und modifizierten Vitrifikationsverfahren (Versuche 2-4) zeigte sich, daß bei vielstufiger Äquilibrierung mit Herabsetzung der Umgebungstemperatur auf 15°C eine Weiterentwicklung in der in vitro Kultur erzielt werden kann.

In allen drei Versuchsansätzen führte das Tiefgefrieren jedoch zur Degeneration der Embryonen, was auf erhebliche Schädigungen während des Tiefgefrierens und/oder Auftauens hinweist.

Im zweiten Vitrifikationsverfahren (Versuch 5) gab es ähnliche Überlebensraten in den Äquilibrierungsversuchen, nur einige Embryonen überlebten das Tiefgefrieren (5,1%).

Diese Ergebnisse zeigen, daß für ein erfolgreiches Vitrifikationsverfahren für Rinderembryonen im Morula/Blastozystenstadium weitere intensive Forschungsbemühungen erforderlich sind.

Christiane Sonntag

Freezing experiments with bovine embryos with the ethylene glycol one-step method and with vitrification.

6. Summary

The present work is an investigation of three different cryopreservation media and several different equilibration protocols for the cryopreservation of bovine morulae and blastocysts. A comparison is made of the ethylene glycol one-step method with two vitrification methods, one using glycerol/propanediol and one using ethylene glycol/Ficoll/sucrose. In total 752 embryos were used for the experiments. These were obtained from 263 superovulated cows. For the one-step method (expt.1) the cryoprotectant ethylene glycol in the concentration 1,5 M was used with a conventional freezing program (0,5°C/min to -35°C). In addition, different thawing conditions and different thawing temperatures were tested. One group of embryos was transferred to synchronized heifers immediately after thawing. During the vitrification experiments (expt.2-5), various protocols were investigated for toxicity of the solutions and successful cryoconservation. Comprehensive modifications to media, equilibration programs and the temperature of equilibration were effected.

In all experiments (freezing, thawing or equilibration tests) the embryos were evaluated by both morphological criteria and by their capacity for further development over 48 hours in culture. In addition the embryo diameter, the number of the cells and the ratio of ICM to trophectoderm was determined. Untreated day-7 embryos were used as controls. The following results were obtained:

1) During the experiments to the ethylene glycol one-step method (expt.1), strong degeneration symptoms were evident after thawing in air at room temperature (18-22°C) in the case of morulae and blastocysts. During the subsequent in vitro culture, no further development (0/29) took place. Changing the thawing temperature from 30°C to 20°C produced no differences in survival rate. Both thawing temperatures resulted in 60% survival (87/145, 9/15) respectively. If the straw was held in the air for 10 seconds prior to immersion into the water bath, worse survival rates (46.7%) resulted than with an immediate immersion into the water (60%). Direct thawing by immersion in a 30°C waterbath was more successful with blastocysts (84% survival rate) than with morulae (49,5% survival rate).

However, when embryos were directly transferred following thawing there was no significant difference in pregnancy rate; the overall pregnancy rate was 57,7%. There was no apparent difference between these embryos and control embryos with respect to embryo diameter or number of nuclei after Giemsa staining.

Differential staining (Hoechst 33258 and propidium jodid) however, revealed that the total cell number was reduced in embryos thawed by direct immersion in a 30°C waterbath. The proportion of ICM to trophectoderm cells was not altered.

2) A 4 step equilibration schedule at room temperature (18-20°C) using glycerol 22,5%/propandiol 22,5% in TCM 199 with or without vitrification produced dehydrated embryos which failed to reexpand. Even after 24 hours of in vitro culture, these embryos were small granulated masses without normal blastomere structure (0/20, 0/18).

3) A 16 step equilibration schedule also at room temperature (18-22°C) and also using glycerol/propandiol gave 22,7% survival. Altogether, 5 of 22 embryos developed further in vitro culture, however these required 24 hours in culture before they had completely reexpanded and normal growth. The diameter and number of cells were the same in the 5 surviving embryos as in controls. The remaining embryos never reexpanded and did not survive. Vitrification of embryos was not successful in that no embryos developed further after thawing (0/16). Visual examination of the straws revealed significant ice crystal formation in this medium.

4) Vitrification and equilibration with glycerol/propandiol with 16 equilibration steps at lower temperature (15°C) was further improvement. Although again there was no survival after freezing, a total of 38% of the embryos developed further in vitro following equilibration and rehydration. As in the previous experiment, some retardation of the rehydration/reexpansion process was evident. It was more likely to develop further in vitro. Again considerable ice crystal formation was evident in the straws with this medium. The diameter of embryos was not different from controls but embryos surviving this equilibration test had less cells (32 less) at the hatched blastocyst stage than controls. At this stage the proportion of ICM cells to total cells was also significantly different. At the expanded blastocyst stage the ICM proportion was higher than at the hatched blastocyst stage.

5) The use of a mixture of ethylene glycol /Ficoll/sucrose (EFS) cryoprotectant gave 35% (33/94) survival in in vitro culture following equilibration and 5,7% (2/35) survival following vitrification. Embryos which did not survive were

reexpanded after 24 hours but obviously degenerated showing granulated cytoplasm. Ice crystals were not evident in the straws. The mean diameter of the surviving embryos at the hatched stage was less than that of controls and there was a significant reduction in cell number. Differential staining revealed a significantly reduced ratio of ICM to total cell number.

The results of this work show that the ethylene glycol one-step method carried out with a thawing temperature of 20-30°C in a waterbath is a practical procedure for cryoconservation and subsequent embryo transfer and is equally suitable for morulae and blastocysts.

All of the other methods tested were less successful. It was generally true that with these methods, equilibration at reduced temperature (15°C) as apposeure to room temperature gave improved survival. The other media tested, however, produced practically no survival after freezing and are at present not practical alternatives for cryopreservation of bovine embryos.

The results show that a further intensive research effort is required for a successful vitrification procedure for cow embryos at the morulae/blastocyst stage.