

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden im Embryotransferlabor des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch durchgeführt. Die zur Gewinnung der Oozyten benutzten Ovarien stammten vorwiegend von geschlachteten Fleckvieh-Kühen aus dem Schlachthof Erlangen.

1. Nach Durchführung von insgesamt 96 Versuchen konnten aus 2 638 Ovarien 8 067 Oozyten durch Punktion der sichtbaren 2-8 mm großen Follikel gewonnen werden. Von diesen teilten sich nach der In-vitro-Fertilisation 5 485, was einer durchschnittlichen Befruchtungsrate von 68 % ($\pm 6,4$ %) entspricht. 1 536 der geteilten Oozyten entwickelten sich bis zum Tag 7 oder Tag 8 zu gefriertauglichen Blastozysten, was einer Weiterentwicklungsrate von 28 % ($\pm 7,7$ %) entspricht.
2. Der Zusatz von hochgereinigtem Cryoprotectin zum Einfriermedium in Konzentrationen von 10, 5, 1 und 0,1 % verbesserte gegenüber einer Kontrollgruppe die Überlebensraten von in vitro produzierten Embryonen 24 Stunden nach dem Auftauen signifikant. Die Überlebensraten 24 Stunden nach dem Auftauen betragen bei 10-, 5-, 1- und 0,1%igem Zusatz des hochgereinigten Cryoprotectins 78, 80, 79 und 81 % gegenüber den Kontrollgruppen mit 62 bzw. 64 %. 96 Stunden nach dem Auftauen betragen die Überlebensraten der entsprechenden Testgruppen 52, 54, 55 und 52 % gegenüber 43 bzw. 41 % bei den Kontrollgruppen.
3. Der Zusatz von 1 % hochgereinigtem Cryoprotectin führte zu einer signifikanten Steigerung der Schlupfraten von 30 auf 44 % gegenüber der Kontrollgruppe. Der Zusatz von 0,1 % des hochgereinigten Cryoprotectins verbesserte die Schlupfraten hochsignifikant von 30 auf 49 % - bezogen auf die Kontrollgruppe. Keine statistisch relevante Verbesserung der Schlupfraten wurde durch Zusatz von 10 und 5 % hochgereinigtem Cryoprotectin erreicht - sie betragen 36 und 38 % - die der Kontrollgruppe lag bei 34 %.

4. Ein Zusatz der Vorstufe 5 des Cryoprotectins in 1- und 0,1%iger Konzentration führte zu keiner Verbesserung der Überlebens- und Schlupfraten in vitro befruchteter Embryonen gemessen an einer Kontrollgruppe. Die entsprechenden Ergebnisse lagen bei den Überlebensraten nach 24 Stunden bei 71 und 67 % gegenüber 67 % in der Kontrollgruppe - nach 96 Stunden bei 51 und 47 % gegenüber 45 %. Die Anteile geschlüpfter Blastozysten lagen in den Testgruppen bei 36 und 32 %, in der Kontrollgruppe betragen sie 31 %.
5. Ein Zusatz der Vorstufe 4 des Cryoprotectins in 1- und 0,1%iger Konzentration führte bei den Überlebensraten in vitro befruchteter Embryonen zu keiner Verbesserung gegenüber einer Kontrollgruppe. Die erreichten Ergebnisse lagen in den Testgruppen 24 Stunden nach dem Auftauen bei 64 und 67 % gegenüber 61 % in der Kontrollgruppe - 96 Stunden nach dem Auftauen lagen sie bei 41 und 43 % gegenüber 42 %. Bei den Schlupfraten wurde eine statistisch hochsignifikante Verschlechterung, 18 bzw. 19 % in den Testgruppen gegenüber 35 % in der Kontrollgruppe, festgestellt.
6. Bei Verwendung eines tierischen Gefrierschutzproteins (AFGP) in Konzentrationen von 50, 5, 1 und 0,1 mg/ml wurde die Zerstörung in vitro produzierter Embryonen nach dem Auftauen festgestellt. Bei Konzentrationen von 50 und 5 mg/ml trat eine Auflösung der Embryonen direkt nach dem Auftauen auf, bei Konzentrationen von 1 und 0,1 mg/ml verzögert sich dieser Vorgang um bis zu 24 Stunden.
7. Die praktische Nutzung des hochgereinigten pflanzlichen Gefrierschutzproteins zur Verbesserung der Kryoprotektion in vitro produzierter Rinderembryonen ist problematisch, da die Herstellung des Cryoprotectins mit Schwierigkeiten verbunden und die Haltbarkeit nur begrenzt ist.
8. Weitere wissenschaftliche Untersuchungen mit pflanzlichen und tierischen Gefrierschutzproteinen zur Verbesserung der Kryokonservierung von IVF-Embryonen scheinen sinnvoll, zumal die vorliegenden Ergebnisse, zumindest mit dem Cryoprotectin, grundsätzlich für den Einsatz von Gefrierschutzfaktoren sprechen.

KARSTEN KLEIN

A contribution to clarify the application of plant and animal cryoprotecting proteins for cryopreservation of in vitro fertilized bovine embryos.

Summary

The experiments of the present thesis were carried out at the embryo transfer laboratory of the AI-Center Neustadt a.d.Aisch. The ovaries used for collection of oocytes mainly came from slaughtered Simmental cattle from the abattoir in Erlangen. The following results were achieved:

1. After carrying out 96 experiments a total of 8 067 oocytes could be collected from 2 638 ovaries by punctation of the visible 2-8 mm follicles. 5 485 of these cleaved after in vitro fertilization, resulting in an average fertilization rate of 68 % ($\pm 6.4\%$). 1,536 of the cleaved oocytes developed to blastocyst stages on day 7 and day 8, averaging a development rate of 28 % ($\pm 7.7\%$).
2. The addition of highly purified cryoprotectin to the freezing medium in concentrations of 10, 5, 1 and 0.1 % improved the survival rates of in vitro produced embryos 24 hours after thawing significantly in comparison with a control group. The survival rates 24 hours after thawing at 10, 5, 1 and 0.1 % addition of highly purified cryoprotectin amounted to 78, 80, 79 and 81 % in comparison with the control groups with 62 respectively 64 %. 96 hours after thawing the survival rates in the respective test groups amounted to 52, 54, 55 and 52 % in comparison with 43 respectively 41 % in the control groups.
3. The addition of 1 % highly purified cryoprotectin led to a significant increase of hatching rates from 30 to 44 % in comparison with the control group. The addition of 0.1 % of the highly purified cryoprotectin increased the hatching rates significantly from 30 to 49 % in comparison with the control group. No statistically relevant improvement of hatching rates was obtained by the addition of 10 and 5 % highly purified cryoprotectin, they amounted to 36 and 38 % in the experimental and to 34 % in the control group.

4. An addition in 1 and 0.1 % concentration of the preliminary stage 5 of the cryoprotectin did not result in an improvement of survival and hatching rates of in vitro fertilized embryos in comparison with a control group. The respective results for survival rates were 71 and 67 % after 24 hours in comparison with 67 % in the control group - after 96 hours 51 and 47 % in comparison with 45 % in the control group. The rates of hatched blastocysts were 36 and 32 % in the test groups and 31 % in the control group.
5. An addition in 1 and 0.1 % concentration of the preliminary stage 4 of the cryoprotectin did not result in an improvement of survival and hatching rates of in vitro fertilized embryos in comparison with a control group. The obtained results were 64 and 67 % in the test groups 24 hours after thawing in comparison with 61 % in the control group - 96 hours after thawing the results were at 41 and 43 % in comparison with 42 % in the control group. A statistically highly significant decrease of the hatching rates in the test groups from 18 and 19 % was determined in comparison with 35 % in the control group.
6. When using an animal cryoprotecting protein (AFGP) in concentrations of 50, 5, 1 and 0.1 mg/ml the destruction of embryos produced in vitro was determined after thawing. At concentrations of 50 and 5 mg/ml a dissolution of embryos occurred directly after thawing; at concentrations of 1 and 0.1 mg/ml this process was delayed up to 24 hours.
7. The practical use of the highly purified plant cryoprotecting protein for improvement of the cryoprotection of in vitro produced bovine embryos is uncertain since the production of the cryoprotectin is linked with difficulties and the stability is only limited.
8. Further scientific experiments with plant and animal cryoprotecting proteins for the improvement of the cryopreservation of IVF-embryos seem to make sense, in particular since the results - at least with the cryoprotectin - favour the use of cryoprotecting proteins.