

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des Gefrierschutzmittels Ethylenglycol (EG) zur Verbesserung und Vereinfachung der Verfahren der Kryokonservierung von in vitro produzierten Embryonen untersucht.

Für die Versuche wurden insgesamt 18590 Oozyten, die durch die Slicingmethode aus Schlachthofovarien gewonnen worden waren, verwendet. In 82 In vitro-Produktionsdurchgängen wurden 3724 Blastozysten erzeugt und für die Experimente verwendet.

Im ersten Teil der vorliegenden Untersuchung wurde die Toxizität unterschiedlicher Konzentrationen des Gefrierschutzmittels Ethylenglycol auf IVP-Blastozysten geprüft (Versuch 1). Parallel dazu wurde die Eignung eines in der Praxis routinemäßig eingesetzten Gefrierverfahrens mit 1,8 M EG (Versuch 2) untersucht. Basierend auf den Ergebnissen der Versuche 1 und 2 wurden dann Kryokonservierungsversuche mit einem kontrollierten Gefrierverfahren unter Verwendung höherer EG-Konzentrationen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die optimale Seedingtemperatur für die erhöhten EG-Konzentrationen festgestellt (Versuch 3), um dann IVP-Blastozysten und expandierte Blastozysten in 3,6 M EG zu kryokonservieren (Versuch 4). Die Behandlungseffekte wurden durch in vitro Kultur bis zur geschlüpften Blastozyste auf Kumuluszellmonolayer überprüft. Zur Beurteilung der In vivo-Entwicklungscompetenz der IVP-Blastozysten nach kontrolliertem Gefrieren erfolgte die Übertragung von insgesamt 42 Embryonen per Direkttransfer auf Färsen der Rasse Holstein Friesian. Zur Überprüfung der Vitalität der kryokonservierten und aufgetauten Embryonen wurden die nach Kultur geschlüpften Blastozysten einer Lebend-Tod-Färbung mit Hoechst Bisbenzimid und Ethidium homodimer unterzogen.

Im zweiten Teil wurden Versuche zur Vitrifikation von Rinderembryonen durchgeführt. Nach Toxizitätstests in 7,2 M EG mit einem Äquilibrierungsschritt bei 3,6 M (Versuch 5) wurden Tag 7- und Tag 8-Blastozysten und expandierte Blastozysten mit 7,2 M Ethylenglycol vitrifiziert (Versuch 6). Auch hier erfolgte die Überprüfung der Behandlungseffekte durch Kultur auf Kumuluszellmonolayer bis zur geschlüpften Blastozyste.

### **Folgende Ergebnisse wurden erzielt:**

- 1 IVP-Rinderblastozysten waren in der Lage Konzentrationen bis zu 3,6 M EG ohne Verminderung der Weiterentwicklung zu tolerieren. Mit einer Schlupfrate von 98% wiesen Tag 7-Blastozysten eine höhere Überlebensrate als die Kontrollgruppe (85%) auf, die parallel zu den Versuchsgruppen ohne Gefrierschutzmittel kultiviert worden war. Bei direkter Äquilibrierung in höheren EG-Konzentrationen sank die Weiterentwicklungsrate signifikant ab.
- 2 Unabhängig vom Gefrierverfahren haben expandierte IVP-Blastozysten höhere Überlebensraten nach Kryokonservierung als IVP-Blastozysten.
3. Eine in der Praxis routinemäßig etablierte Technik der Kryokonservierung mit 1,8 M EG führte bei Tag 7 expandierten Blastozysten zu einer Weiterentwicklungsrate von 80%.
- 4 Die Temperatur für das Seeding mußte für Gefrierlösungen mit einer Konzentration von 3,6 M EG bei  $-11^{\circ}\text{C}$  liegen, um eine dauerhafte Kristallisation zu gewährleisten.
- 5 Nach Kryokonservierung von IVP-Rinderembryonen im kontrollierten Gefrierverfahren mit 3,6 M EG konnten bei Tag 7-expandierten Blastozysten Überlebensraten bis zu 81% erzielt werden (Kontrolle: 76%).
6. Schlupfraten von 93% nach Toxizitätsversuchen in 7,2 M EG mit einer Voräquibrierung bei 3,6 M EG zeigten, daß IVP-Blastozysten hohe Konzentrationen des Gefrierschutzmittels EG ohne Beeinträchtigung der Weiterentwicklung (Kontrolle: 97%) überleben können. Tag 7-expandierte Blastozysten (93% SR) waren eher in der Lage, hohe Konzentrationen zu tolerieren als Embryonen, die an Tag 8 das Blastozystenstadium (22% SR) erreicht hatten.

7. Die Vitrifikation von IVP-Rinderembryonen in 7,2 M EG und einem Äquilibrationsschritt bei direkter Ausverdünnung im Straw führte zu Überlebensraten nach Kultur von 51% bei Tag 7-explandierten Blastozysten. Die Vitrifikation von explandierten Blastozysten (42% SR) ergab signifikant höhere Überlebensraten als die Vitrifikation von Blastozysten (12% SR).

8. Die Kryokonservierung von explandierten Blastozysten (durchschnittlich: 132 Blastomeren) führte unabhängig vom Gefrierverfahren nach Auftauen, Kultur im Stadium der geschlüpften Blastozyste zu einer signifikant höheren Anzahl an Blastomeren als das Einfrieren von Blastozysten (durchschnittlich: 105 Blastomeren), während der Anteil degenerierter Zellen ähnlich war.

9. Die Kryokonservierung mit PVA (18% SR) als Ersatz für die Serumkomponente (80% SR) in der Gefrierschutzlösung führte zur signifikanten Verschlechterung der Schlupfrate nach Kultur. Die Gesamtzellzahl geschlüpfter Blastozysten war bei der Verwendung von PVA ebenfalls signifikant reduziert (132 Zellen mit NBCS, 119 Zellen mit PVA).

10. Nach direktem Transfer von explandierten Tag 7 Blastozysten, die im kontrollierten Gefrierverfahren kryokonserviert worden waren, auf Empfängertiere der Rasse Holstein Friesian konnten Trächtigkeitsraten von 43% erzielt werden. Die Übertragung von anderen Entwicklungsstadien führte zu niedrigeren Trächtigkeitsraten (explandierte Blastozysten Tag 8: 22% TR).

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, daß die Verwendung von Ethylenglycol als alleiniges Gefrierschutzmittel für die Kryokonservierung von IVP-Rinderembryonen geeignet ist und sowohl im kontrollierten Gefrierverfahren als auch in der Vitrifikation zu wesentlichen Vereinfachungen der Kryokonservierung in unterschiedlichen Bereichen führen kann.

Die zeit- und arbeitsaufwendige Ausverdünnung des Gefrierschutzmittels nach dem Auftauen ist nicht erforderlich, sodaß ein Direkttransfer der Embryonen möglich ist. Die Vitrifikation

## 6. SUMMARY

Volker Sommerfeld

### Freezing experiments of bovine-IVP-embryos with ethylene glycol by controlled freezing system or by vitrification.

In the current work, the cryoprotectant ethylene glycol (EG) was investigated with respect to improvement and simplification of the cryopreservation of in vitro produced embryos. A total of 18590 oocytes were used in this study. These oocytes were obtained from slaughterhouse ovaries. From these, 3724 embryos were produced in 82 discrete in vitro production (IVP) batches for evaluation of various cryopreservation protocols. In the first part of this research project, the toxicity of various concentrations of the cryoprotectant EG was investigated using IVP blastocysts (Experiment 1). In parallel with this, the suitability of a routine method of cryopreservation based on the use of 1.8 M EG was evaluated (Experiment 2). Based on the results of experiments 1 and 2, a further set of cryopreservation experiments was carried out using higher concentrations of EG with a computer controlled freezing system. In this system, the optimal seeding temperature was established for these higher concentrations of EG (Experiment 3). Finally, IVP blastocysts and expanded blastocysts were frozen using the programmed freezing apparatus with a concentration of 3.6 M EG (Experiment 4). The effect of these freezing protocols was evaluated by culturing the thawed embryos up to the hatched blastocyst stage on cumulus cell monolayers. The in vivo developmental competence of IVP blastocysts after controlled freezing was determined by direct transfer of 42 frozen/thawed embryos to Holstein Friesian heifers. The condition of hatched blastocysts obtained from frozen/thawed embryos was evaluated with a live/dead staining protocol based on Hoechst bisbenzimid and ethidium homodimer.

In the second part of the work, an experiment was carried out in which bovine embryos were vitrified. After the toxicity tests with 7.2 M EG (Experiment 5) preceded by a period of equilibration with 3.6 M EG, day 7 and day 8 blastocysts and expanded blastocysts were

vitrified with 7.2 M EG (Experiment 6). Evaluation of this freezing system was performed by culturing these frozen/thawed blastocysts to hatching.

The following results were obtained:

1. IVP bovine blastocysts were found to be able to tolerate storage in concentrations of up to 3.6 M EG without reduction of developmental potential. The hatching rate of 98% for EG exposed, day 7 blastocysts was higher than that obtained for the control group (85%) which was cultured in parallel. Concentrations of EG higher than 3.6 M were detrimental to the embryos when used in a single step equilibration protocol.
2. Independent of the freezing system, expanded IVP blastocysts (81% hatching rate) had higher developmental rates than non-expanded blastocysts (68% hatching rate).
3. A cryopreservation technique routinely used in practice with 1.8 M EG yielded a hatching rate of 80% on expanded blastocysts.
4. The seeding temperature for embryos in 3.6 M EG must be at  $-11^{\circ}\text{C}$  in order to achieve permanent crystalization.
5. After controlled freezing of cryopreserved IVP-bovine-embryos in 3.6 M EG, expanded day 7 blastocysts had a hatching rate of 81% while controls had a hatching rate of 76%.
6. The result of EG toxicity testing was that after pre-equilibration in 3.6 M EG, day 7 expanded blastocysts had a hatching rate of 93% using a final EG concentration of 7.2 M EG. These tests also revealed that day 7 expanded blastocysts were more able to tolerate high concentrations of EG than day 8 blastocysts which gave a hatching rate of only 22%.

7. The vitrification of IVP bovine embryos in 7.2 M EG after one equilibration step and direct (in straw) rehydration following thawing gave a hatching rate after culture of 51% for day 7 expanded blastocysts. After vitrification of expanded blastocysts (42%) a higher hatching rate was obtained than after vitrification of blastocysts (12%).

8. The expanded blastocysts had significantly more blastomeres (132 blastomeres) following freeze/thawing and culture to hatching than did the non-expanded blastocysts (105 blastomeres).

9. The use of polyvinyl alcohol (PVA) as a substitute for NBCS to the freezing medium gave significantly lower hatching rates after culture of the thawed embryos. PVA culture gave 18% hatching while NBCS gave 80%. The total cell number of hatched blastocysts was also significantly reduced in embryos maintained in PVA (119 blastomeres) rather than NBCS (132 blastomeres).

10. After direct transfer of controlled freeze/thawed day 7 expanded blastocysts to Holstein Friesian heifers, the pregnancy rate was 43%. The transfer of other developmental stages was significantly lower (expanded blastocysts at day 8 gave 22% pregnancy rate).

In conclusion, the use of ethylene glycol alone as a cryoprotectant is good for cryopreservation of IVP embryos in controlled freezing and in vitrification techniques. This simplified cryopreservation protocol greatly reduces the amount of work involved in performing reproducible cryopreservation. The post thawing rehydration time is also greatly reduced and direct transfer is also possible. In the future, it will be possible, using a simplified freezing medium, to employ direct (in straw) rehydration after vitrification for embryo transfer.

The high penetration rate of EG reduces the equilibration time. One can use a simplified freezing solution with EG and serum for vitrification and in comparison with other cryopreservation media, this is relatively non-toxic. However, the results show that more experiments are required to improve the pregnancy rate following embryo transfer.