

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine Methode zur Kryokonservierung von Rattenspermien zu entwickeln und nachfolgend *in vitro* Fertilisationen durchzuführen.

Aus diesem Grund wurden Spermien des Auszuchtstammes Ztm SPRD und der genetisch weit voneinander entfernten Inzuchtstämme LEW/Ztm und BN/Ztm aus den Nebenhodenschwänzen gewonnen. Nach unterschiedlichen Vorbehandlungen und Inkubationstemperaturen wurden 9 Tiefgefriermedien getestet, von denen 2 für die weiteren Versuche ausgewählt wurden. Nach 10 unterschiedlichen Einfrierverfahren (stufenweises manuelles oder programmiertes, schnelles [Pelletmethode] und ultraschnelles [Vitrifikation]) und anschließendem Auftauen (Auftauraten: 1416°C/min, 936°C/min, 436°C/min und 66°C/min) in 5 verschiedenen Auftaumethoden, wurden die Spermien morphologisch beurteilt. Die Membranintegrität (Vitalität) wurde durch Fluoreszenzfärbung (CFDA-PI) ermittelt. Nachfolgend wurden sowohl mit den aufgetauten als auch mit frischen Spermien *in vitro* Fertilisationen und abschließend Embryotransfers durchgeführt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Es konnten zwei Tiefgefriermedien gefunden werden, in denen die Spermien vor dem Einfrieren noch bis zu 70% Motilität zeigten. Dabei handelte es sich um das Tris-Bullen Medium (modifiziert nach JENICHEN u. BATHIE, 1965) und um das MSC-Medium (nach PENFOLD u. MOORE, 1993), in denen Glycerin als Gefrierschutz verwendet wurde. Der Ersatz dieses Gefrierschutzmittels durch Propandiol (PROH) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) führte bereits nach Zugabe in geringen Konzentrationen (1% DMSO, 3% PROH) zur vollständigen Unbeweglichkeit der Spermien. Nach Zugabe von unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen konnten dagegen bis zu einer Konzentration von 13% Spermienmotilität beobachtet werden.

- Nach Inkubationstemperaturen von 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) und 5°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) in den oben genannten Medien, wurden durchschnittliche Motilitätsraten von 63,2% erreicht. Nach Inkubationstemperaturen von mehr als 30°C zeigten die Spermien stetigen Motilitätsverlust.
- Die morphologischen Untersuchungen vor dem Einfrieren wiesen keine von der Norm abweichenden Befunde auf. Bei der getrennten Untersuchung der Nebenhodenschwänze konnten intraindividuelle Unterschiede (ohne Systematik) zwischen rechtem und linkem Nebenhodenschwanz bezüglich Spermiedichte und -motilität beobachtet werden. Die durchschnittliche Motilitätsdifferenz lag zwischen rechtem und linkem Nebenhodenschwanz bei 9%, die Dichtedifferenz bei 6131/ μl Spermien.
- Nach dem Einfrieren (Dreistufen-Einfrierverfahren und schnelles Einfrieren [Pelletmethode]) und Auftauen der Spermien konnten nur nach zwei der durchgeführten Verfahren vereinzelt Spermienmotilitäten mit ausschließlicher Ortsbewegung beobachtet werden (Angabe in Prozent war nicht möglich). Das Dreistufen-Einfrierverfahren gehörte zu den manuellen Einfrieremethoden und bestand aus einer Äquilibration der Spermiesuspension bei 5°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) für 5 Minuten, Umsetzen in -60°C , -70°C oder -80°C und anschließendem Umsetzen in flüssigen Stickstoff (-196°C). Nach Auftauen mit einer Auftaurate von $1416^{\circ}\text{C}/\text{min}$ wurden, bei einer Umsetztemperatur von -70°C , vereinzelt Motilitäten beobachtet. Das gleiche Bild ergab sich nach dem Einfrieren mit der Pelletmethode (15 Minuten Äquilibration der Spermiesuspension bei $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 5 Minuten Haltezeit in Trockeneis (-70°C), und nachfolgendem Umsetzen in flüssigen Stickstoff). Die Auftaurate betrug $436^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Zentrifugation (800g) führte zu vermehrten Hals- und Schwanzbrüchen.
- Nach der Membranfärbung der aufgetauten Spermien zeigten sich Membranschäden.

- Bei der IVF mit aufgetauten Spermien wurden die Oozyten in direkten Kontakt mit den Spermien gebracht. Es kam aber zu keiner Penetration der Oozyten.
In vitro Fertilisationen mit frischen Spermien zeigten Weiterentwicklungen befruchteter Eizellen von durchschnittlich 18,3%, wobei die höchste Rate bei 56,2% lag
- Nach Embryotransfer wurden bisher keine lebenden Nachkommen geboren, jedoch wurden durchschnittlich 10% Implantationsstellen beobachtet

Schlußbetrachtung

Die einzelnen Methoden des Einfrierens und Auftauens führten in den hier durchgeführten Kombination nur zu unzureichenden Motilitäten nach dem Auftauen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen erste grundlegende Versuche bezüglich dieser Thematik dar, und liefern einen Grundstock, auf dem weitere Untersuchungen zur Kryokonservierung von Rattenspermien aufbauen sollten.

7 Summary

Mahnken, Martina (1998) Cryopreservation and *in vitro* Fertilization of Rat Spermatozoa

The aim of this dissertation was to develop a method for cryopreservation of rat spermatozoa and an *in vitro* fertilization protocol. Spermatozoa were obtained from the cauda epididymidis of the outbred stock Ztm SPRD and the inbred strains LEW/Ztm and BN/Ztm. Different protocols and conditions were tested including nine cryopreservation media, two of which were chosen for further experiments. Different freezing programs (step by step, slow freezing, rapid freezing and vitrification) in combination with different thawing protocols were tested and morphological characteristics were determined. After thawing of spermatozoa, *in vitro* fertilization and embryo transfer were performed both with thawed and native sperm.

The following results were obtained:

- The sperm showed motility up to 70% in the „Mouse-Sperm-Cryoprotectant-Medium“ (PENFOLD and MOORE, 1993) and the „Tris-Bull-Medium“ (JENICHEN and BATHIE, 1965). Both media contained glycerin as cryoprotectant. The concentration of glycerin could be raised up to 13% to still find motility. Replacement of glycerin by propanediol or dimethyl-sulfoxide resulted in immobility of the sperm even at low concentrations.
- Incubation of the sperm at 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) and 5°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) showed the highest degree of sperm motility with a mean rate of 63,2%. Loss of motility was observed at temperatures above 30°C.

- The morphological characterization before freezing showed no morphological deviations. Additional evaluation of the left and the right cauda epididymidis showed intraindividual differences with regard to sperm motility and density. The mean difference in motility between the right and the left cauda epididymidis was 9%, the mean difference in density was 6131/ μ l sperm.
- Freezing and thawing with the above mentioned media occasionally resulted in local without forward movement. These sperm had either been frozen by means of a three step method (thawing velocity 1416°C/min.) or by the pellet method (two step method, thawing velocity 436°C/min.)
- Centrifugation (800g) resulted in increased damage of sperm (head and tail).
- Subsequent staining of freeze-thawed sperm showed membrane damage
- Probably because of the poor motility of the freeze-thawed sperm a successful *in vitro* fertilization (IVF) was not observed. IVF with native sperm resulted in successful fertilization and high developmental ability (56,2%)

These results allow the following conclusions

In principal the possibility of a successful freezing of rat spermatozoa can not be excluded.

The data presented a basis for further investigations