

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Kryokonservierung immaturer und in vitro gereifter Rinderoozyten durch Vitrifikation mit der „Minimal-drop-size“-Technik zu verbessern, eine Senkung der Toxizität der Kryoprotektiva durch Verwendung von Kryoprotektiva-Kombinationen zu erreichen und einen Vergleich der beiden „Minimal-drop-size“-Techniken mit „Electron-microscope-copper-grids“ (EMC-grids) und „Open-pulled-straws“ (OPS) durchzuführen.

Für die Untersuchungen wurden 7557 aus Schlachthofovarien gewonnene Oozyten verwendet. Es wurden immature und in vitro gereifte Oozyten untersucht. Zu Versuchsbeginn wurden die Oozyten in etwa 3 gleich große Gruppen für die Kontrollgruppen, Toxizitäts- und Vitrifikationsversuche aufgeteilt. In den Vitrifikationsversuchen wurden fünf verschiedene Kryoprotektiva-Kombinationen in Verbindung mit EMC-grids und eine Kryoprotektiva-Kombination in Verbindung mit OPS zur Vitrifikation eingesetzt. Für die Toxizitätsversuche wurden die Oozyten bis auf das Eintauchen in den flüssigen Stickstoff und das anschließende Auftauen gleich behandelt. Die immaturren Oozyten wurden direkt nach der Gewinnung behandelt, anschließend erfolgte für 22-24 Stunden die In-vitro-Maturation. Bei in vitro gereiften Oozyten erfolgte die In-vitro-Maturation vor der Behandlung mit den Kryoprotektiva. Daran schloß sich bei beiden Gruppen eine 18stündige Kokultur von Oozyten und Spermien und die In-vitro-Kultur der befruchteten Oozyten an. Nach der In-vitro-Maturation der immaturren Versuchsgruppe wurde an einem repräsentativen Anteil der Oozyten eine Maturationskontrolle durchgeführt. Eine Fertilisationskontrolle erfolgte 18 Stunden nach Beginn der Kokultur für die Versuchsgruppen der immaturren und in vitro gereiften Oozyten. Insgesamt wurden 2739 Oozyten nach In-vitro-Maturation und In-vitro-Fertilisation ausgewertet. Für die In-vitro-Kultur wurden 4818 befruchtete Oozyten eingesetzt. Am Tag 3 der In-vitro-Kultur wurden die Furchungsraten und am Tag 7/8 die Entwicklungsraten zur Blastozyste ermittelt. Die Gesamtzellzahl von 15 am Tag 7/8 erhaltenen Blastozysten aus der Kontrollgruppe, einer Blastozyste aus immatur vitrifizierten Oozyten und vier Blastozysten aus in vitro gereiften und vitrifizierten Oozyten wurden nach Färbung mit Höchst-33342-Färbstoff ermittelt. Neun weitere Blastozysten, die nach

Vitrifikation in vitro gereifter Oozyten und anschließender In-vitro-Fertilisation und -Kultur erzielt wurden, wurden auf Empfängertiere übertragen.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1.) Innerhalb der jeweiligen Kryoprotektiva-Kombinationen waren in der Versuchsgruppe immaturer Rinderoozyten die Furchungsraten in den Toxizitätsversuchen nach Verwendung der ersten (22,5% Glycerin + 22,5% Propandiol; 23,6% Furchungen) und zweiten Kryoprotektiva-Kombination (25% Glycerin + 25% Propandiol; 42,5% Furchungen) signifikant ($P < 0,05$) unterschiedlich zur Kontrollgruppe (64,9%, 57,1% Furchungen). Die Furchungsraten in den Vitrifikationsversuchen waren nach Anwendung der Kryoprotektiva-Kombination zwei (25% Glycerin + 25% Propandiol; 2% Furchungen), vier (20% Ethyleoglykol + 20% DMSO + 10% Butandiol; 12,1% Furchungen) und fünf (20% Ethylenglykol + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose; 9,5% Furchungen) im Vergleich zur Kontrollgruppe (57,1%, 64,3%, 62,2% Furchungen) und zu den Toxizitätsversuchen (42,5%, 52,5%, 55,6% Furchungen) signifikant ($P < 0,05$) verringert. Nach Anwendung der ersten und dritten Kryoprotektiva-Kombination konnten keine Furchungen beobachtet werden. Die Entwicklungsraten zur Blastozyste waren bei den Toxizitätsversuchen nach Verwendung aller Kryoprotektiva-Kombinationen (6,5%, 6,2%, 18,6%, 6,7%, 14,4%) in Relation zur Kontrollgruppe (32,0%, 26,9%, 29,0%, 26,4%, 30,4%) erniedrigt. Bei den Vitrifikationsversuchen konnte nur nach Verwendung der Kryoprotektiva-Kombination fünf (20% Ethylenglykol + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose) eine Blastozyste erzielt werden.

2.) Innerhalb der jeweiligen Kryoprotektiva-Kombinationen in der Versuchsgruppe in vitro gereifter Rinderoozyten waren die Furchungsraten in den Toxizitätsversuchen nach Verwendung der ersten Kryoprotektiva-Kombination (22,5% Glycerin + 22,5% Propandiol; 34,3% Furchungen) signifikant ($P < 0,05$) unterschiedlich zur Kontrollgruppe (60,6% Furchungen). Die Furchungsraten der Vitrifikationsversuche waren nach Anwendung aller Kryoprotektiva-Kombinationen (3,5%, 8,9%, 9,2%, 19,4%, 29,5%, 14,8% Furchungen) im Vergleich zur Kontrollgruppe (60,6%, 45,2%, 52,5%, 56,1%, 58,6%, 66,2% Furchungen) und

zu den Toxizitätsversuchen (34,3%, 48,1%, 61,3%, 65,9%, 53,6%, 65,8% Furchungen) signifikant ($P < 0,05$) verringert. Die Entwicklungsraten zur Blastozyste waren bei den Toxizitätsversuchen (6,4%, 8,9%, 7,4%, 12,7%, 8,0%), außer Versuch 5, im Verhältnis zur Kontrollgruppe (18,9%, 12,0%, 21,0%, 27,1%, 29,0%) signifikant ($P < 0,05$) erniedrigt. In den Vitrifikationsversuchen waren die Entwicklungsraten nach Anwendung der Kryoprotektiva-Kombinationen zwei (25% Glycerin + 25% Propandiol; 1,1%), vier (20% Ethylenglykol + 20% DMSO + 10% Butandiol; 2,4%), fünf (20% Ethylenglykol + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose) mit EMC-grids (2,8%) und fünf (20% Ethylenglykol + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose) mit OPS (2,6%) signifikant ($P < 0,05$) in Relation zur Kontrollgruppe (12,0%, 27,1%, 17,8%, 29,0%) und zu den Toxizitätsversuchen (8,9%, 12,7%, 12,7%, 8,0%) verringert. Nach Vitrifikation in Kryoprotektiva-Kombination eins und zwei konnten keine Blastozysten erzielt werden.

3.) Mit immaturren Oozyten ergab sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (82,1-91,6%) in den Toxizitätsversuchen (50-85,1%) ein geringerer Anteil gereifter Oozyten, der in den Vitrifikationsversuchen noch weiter absank (15,6-42,5%).

4.) Nach den Toxizitäts- und Vitrifikationsversuchen mit immaturren und in vitro gereiften Oozyten wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe (immaturre Oozyten 35,8-72%, in vitro gereifte Oozyten 24-50%) in den Toxizitätsversuchen (immaturre Oozyten 16,3-62,5%, in vitro gereifte Oozyten 31,8-52,2%) ein etwa gleich hoher Anteil monospermier Befruchtung gefunden. Nach Vitrifikation (immaturre Oozyten 0-22,8%, in vitro gereifte Oozyten 9,2-25,4%) ergaben sich deutlich weniger monosperm befruchtete Oozyten. Die Anzahl polysperm befruchteter Oozyten war in allen drei Versuchsgruppen ähnlich.

5.) Die Furchungsrate nach Anwendung der ersten Kryoprotektiva-Kombination (22,5% Glycerin + 22,5% Propandiol) bei immaturren Oozyten war in den Toxizitätsversuchen (23,6% Furchungen) signifikant ($P < 0,05$) zur Kontrollgruppe (61,6% Furchungen) verschieden. Nach den Vitrifikationsversuchen mit allen Kryoprotektiva-Kombinationen (0%, 2,0%, 0%, 12,1%, 9,5% Furchungen) waren die Furchungsraten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($P < 0,05$) erniedrigt.

In der Versuchsgruppe der *in vitro* gereiften Oozyten unterschieden sich die Furchungsraten in den Toxizitätsversuchen mit den Kryoprotektiva-Kombinationen (34,3%, 48,1%, 61,3%, 65,9%, 53,6%, 65,8% Furchungen) nicht signifikant von der Kontrollgruppe (55,1% Furchungen). Die Furchungsraten nach Äquilibration mit der ersten Kryoprotektiva-Kombination (22,5% Glycerin + 22,5% Propandiol) waren mit 34,3% signifikant ($P < 0,05$) niedriger als die mit der vierten Kryoprotektiva-Kombination (20% EG + 20% DMSO + 10% Butandiol) mit 65,9%. Nach den Vitrifikationsversuchen mit allen Kryoprotektiva-Kombinationen waren die Furchungsraten (3,5%, 8,9%, 9,2%, 19,4%, 29,5%, 14,8% Furchungen) signifikant ($P < 0,05$) niedriger als in der Kontrollgruppe.

6.) Die Entwicklungsraten nach Äquilibration in der ersten (22,5% Glycerin + 22,5% Propandiol), der zweiten (25% Glycerin + 25% Propandiol) und der vierten (20% EG + 20% DMSO + 10% Butandiol) Kryoprotektiva-Kombination (6,5%, 6,2%, 6,7%) mit immaturren Oozyten war bei den Toxizitätsversuchen signifikant ($P < 0,05$) zur Kontrollgruppe (29,2%) verringert. Nach den Vitrifikationsversuchen war die Entwicklungsrate der fünften Kryoprotektiva-Kombination (20% EG + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose) mit 0,5% zur Kontrollgruppe signifikant ($P < 0,05$) unterschiedlich. Nach Anwendung der übrigen Kryoprotektiva-Kombinationen konnten keine Blastozysten erzielt werden.

7.) In der Versuchsgruppe mit den *in vitro* gereiften Oozyten unterschieden sich die Entwicklungsraten in den Toxizitätsversuchen mit den Kryoprotektiva-Kombinationen (6,4%, 8,9%, 7,4%, 12,7%, 12,7%, 8,0%) nicht signifikant von der Kontrollgruppe (19,5%). Die Entwicklungsraten waren nach den Vitrifikationsversuchen mit der zweiten (25% Glycerin + 25% Propandiol), der vierten (20% EG + 20% DMSO + 10% Butandiol), der fünften mit EMC-grids oder OPS (20% EG + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose) Kryoprotektiva-Kombination (1,1%, 2,4%, 2,8%, 2,6%) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($P < 0,05$) verringert. Nach Anwendung der ersten (22,5% Glycerin + 22,5% Propandiol) und dritten (10% Glycerin + 20% Propandiol) Kryoprotektiva-Kombination konnten keine Blastozysten erstellt werden.

8.) Die Verwendung von EMC-grids (FuR: 29,5%, ER: 2,8%) oder OPS (FuR: 14,8%, ER: 2,6%) als Gefrierbehälter bei Vitrifikation mit der fünften Kryoprotektiva-Kombination (20% EG + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose) erbrachte keine Verbesserungen.

9.) Die Gesamtzellzahlen der nach Vitrifikation, In-vitro-Fertilisation und Kultur erhaltenen Blastozysten (Tag 7: 71, Tag 10: 77, 141) erscheinen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag-7-Blastozysten $80,5 \pm 21,3$ und Tag-8-Blastozysten $105,9 \pm 21,3$) leicht verringert.

10.) Trächtigkeiten konnten nach Transfer von insgesamt neun Blastozysten auf fünf Empfängertiere nicht erzielt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß immature und in vitro gereifte Rinderoozyten durch Vitrifikation mit der „Minimal-drop-size“-Technik erfolgreich kryokonserviert werden können. Jedoch sind die Furchungs- und Entwicklungsraten signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen. Die Auswirkungen schädigender Noxen in den Toxizitäts- und Vitrifikationsversuchen zeigen sich bei immaturren Oozyten stärker in verringerten Furchungs- und Entwicklungsraten als bei in vitro gereiften Oozyten. Die beiden Gefrierbehälter EMC-grids oder OPS sind unter Verwendung der in diesen Versuchen besten Kryoprotektiva-Kombination (20% EG + 20% Butandiol + 0,5 M Sucrose) gleichwertig.

Weitergehende Untersuchungen zur Verbesserung der Überlebens-, Furchungs-, Entwicklungs- und auch Trächtigkeitsraten nach Transfer von erzeugten Blastozysten sind erforderlich.

7 SUMMARY

Margit Nonnenberg genannt Weustenfeld

Studies of the vitrification of immature and in vitro matured bovine oocytes using the "Minimal drop size" technique with various combinations of cryoprotectant agents

The purposes of this research project were 1) to improve the technique for cryopreservation of immature and in vitro matured bovine oocytes through vitrification with the minimal drop size technique; 2) to reduce the toxicity of the cryoprotective agents through the use of various combinations of cryoprotectants; 3) to compare two minimal drop size techniques: A) a technique based on the use of electron microscope copper grids (EMC grids) and B) a technique based on open pulled straws (OPS).

A total of 7557 immature and in vitro matured bovine oocytes derived from abattoir ovaries were used in these experiments. Each experiment was initiated by dividing oocytes into three groups of approximately equal size to be used as untreated controls and for the toxicity and vitrification studies. Five different combinations of cryoprotective agents were used in the vitrification experiments with EMC grids and one combination was tested with the OPS system. For the toxicity studies, the oocytes were prepared as for vitrification up to the point of plunging into liquid nitrogen but were then taken through the series of dilution solutions instead of freezing.

Immature oocytes taken directly through cryopreservation or toxicity experiments directly after collection and then allowed to mature for 22-24 hours in vitro after the experimental treatment. In vitro matured oocytes were taken first through the 22-24 period of in vitro maturation and then exposed to the experimental treatment. In both cases, the oocytes were then co-cultured with sperm for 18 hours and following fertilisation, were cultured in vitro.

With the immature treated oocytes, a sample was taken following the *in vitro* maturation step for microscopic evaluation of maturation following staining with aceto-lacmoid. A fertilisation control was made following the 18 hour co-culture period for both groups. A total of 2739 oocytes/zygotes embryos were evaluated microscopically following *in vitro* maturation and *in vitro* fertilisation. A total of 4818 presumptive zygotes were evaluated by further culture *in vitro* to the blastocyst stage. On the third day of *in vitro* culture, cleavage was evaluated and on day 7/8 of culture, development to the blastocyst stage was quantified. Fifteen control blastocysts (day 7/8) were stained with Hoechst 33342 dye and the cell number was counted. For comparison with the control blastocysts, one blastocyst was evaluated for cell number from the group of immature vitrified oocytes; four blastocysts were evaluated from the group of *in vitro* matured, vitrified oocytes. Nine additional blastocysts which had been taken through the procedure of vitrification following *in vitro* maturation and then culture were transferred to selected recipients.

The following results were obtained:

- 1) Among the groups of immature oocytes exposed to the various combinations of cryoprotective agents, the cleavage rates in toxicity experiments with the first (22.5% glycerol + 22.5% propanediol; 23.6% cleavage) and the second (25% glycerol + 25% propanediol; 42.5% cleavage) combinations of cryoprotectants were significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with controls (64.9% and 57.1% cleavage, respectively). The cleavage rates in the vitrification experiments using cryoprotective agent combinations two (25% glycerol + 25% propanediol; 2% cleavage); four (20% ethylene glycol + 20% DMSO + 10% butanediol; 12.1% cleavage) and five (20% ethylene glycol + 20% butanediol + 0.5 M sucrose; 9.5% cleavage) were significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison to control (57.1%, 64.3%, 62.2% cleavage, respectively) and toxicity experiments (42.5%, 52.5%, 55.6% cleavage, respectively). After vitrification using the first (22.5% glycerol + 22.5% propanediol) and the third (10% glycerol + 20% propanediol) combinations of agents, no cleavage was observed. In the five toxicity experiments performed with immature oocytes, the blastocyst developmental rate following all combinations of cryoprotective agents (6.5%, 6.2%, 18.6%, 6.7%, 14.4%) was

consistently lower than controls (32%, 26.9%, 29%, 26.4%, 30.4%). In the vitrification experiments with immature oocytes, only one zygote (from the group exposed to cryoprotectant combination 5; 20% ethylene glycol + 20% butanediol + 0.5 M sucrose) reached the blastocyst stage following *in vitro* culture.

- 2) Among the groups of *in vitro* matured oocytes exposed to the various combinations of cryoprotective agents, the cleavage rates in toxicity experiments with the first (22.5% glycerol + 22.5% propanediol; 34.3% cleavage) was significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with the control (60.6% cleavage). The cleavage rates in the vitrification experiments using all cryoprotective agent combinations (3.5%, 8.9%, 9.2%, 19.4%, 29.5%, 14.8%) were significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with control (60.6%, 45.2%, 52.5%, 56.1%, 58.6%, 66.2%) and toxicity experiments (34.3%, 48.1%, 61.3%, 65.9%, 53.5%, 65.8%). In the six toxicity experiments performed with *in vitro* matured oocytes, the blastocyst development rate following all combinations of cryoprotective agents except for the fifth (6.4%, 8.9%, 7.4%, 12.7%, 12.7%, 8%) were significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with controls (18.9%, 12%, 21%, 27.1%, 17.8%, 29%). In the vitrification experiments with *in vitro* matured oocytes, after vitrification with cryoprotectant combinations two (25% glycerol + 25% propanediol; 1.1%), four (20% ethylene glycol + 20% DMSO + 10% butanediol; 2.4%), five (20% ethylene glycol + 20% butanediol + 0.5 M sucrose; with EMC grids; 2.8%) and five (with OPS; 2.6%); the developmental rates were significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison to control (12%, 27.1%, 17.8%, 29%) and toxicity experiments (8.9%, 12.7%, 12.7%, 8%). After vitrification using combinations one (22.5% glycerol + 22.5% propanediol) and two (25% glycerol + 25% propanediol), no blastocysts were found.
- 3) The *in vitro* maturation rate for control oocytes ranged from 82.1% to 91.6%. Following the toxicity experiments the yield of matured oocytes was reduced (50% - 85.1%) and following the vitrification experiments the yield of matured oocytes was further reduced (15.6% - 42.5%).

- 4) Monospermic fertilisation rates were approximately the same in the toxicity experiments (immature oocytes 16.3% - 62.5%, in vitro matured oocytes 31.8% - 52.2%) in comparison to controls (immature oocytes 35.8% - 72%, in vitro matured oocytes 24% - 50%). After vitrification the yield of monospermic fertilized oocytes (immature oocytes 0 - 22.8%, in vitro matured oocytes 9.2% - 25.4%) was lower. The yield of polyspermic fertilized oocytes was similar in all treatment groups.
- 5) The cleavage rate in the first cryoprotectant combination (22.5% glycerol + 22.5% propanediol) with immature oocytes in the toxicity experiments (23.6%) was significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with controls (61.6%). After vitrification with all combinations of cryoprotective agents the cleavage rate (0%, 2%, 0%, 12.1%, 9.5%) was significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with controls. Using matured oocytes, there was no difference in cleavage rates between control groups (55.1%) and those exposed to toxicity experiments with any of the combinations of cryoprotective agents (34.3%, 48.1%, 61.3%, 65.9%, 53.6%, 65.8%). In the experiments with cryoprotective agents, the cleavage rates of oocytes exposed to the first combination (34.3%) was significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison to the fourth combination (65.9%). After the vitrification experiments using all combinations of cryoprotective agents, the cleavage rates (3.5%, 8.9%, 9.2%, 19.4%, 29.5%, 14.8%) were significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with controls.
- 6) The development rate was significantly ($P < 0.05$) reduced after equilibration in the first, the second, and the fourth (6.5%, 6.2% and 6.7% respectively) in comparison with controls (29.2%). After vitrification with the fifth combination the development rate (0.5%) was significantly ($P < 0.05$) reduced in comparison with the control. After using the other combinations for vitrification, no blastocysts were observed.
- 7) In the tests with in vitro matured oocytes, the development rate after toxicity experiments with all combinations of cryoprotective agents (6.4%, 8.9%, 7.4%, 12.7%, 12.7%, 8%) was not significantly different from the control (19.5%). There was a significant ($P < 0.05$) difference in developmental rates after vitrification with cryoprotectant combinations two,

four, five (with EMC grids) and five (with OPS; 1.1%, 2.4%, 2.8%, 2.6% respectively) in comparison with the control. After vitrification with the first and the third combination, no blastocyst was observed.

- 8) There was no difference observed in either cleavage rate or blastocyst rate in the comparison of EMC grids (cleavage rate 29.5%, development rate 2.8%) and OPS (cleavage rate 14.8%, development rate 2.6%) in conjunction with cryoprotection using the fifth combination of cryoprotective agents.
- 9) The total cell number of blastocysts obtained following vitrification in vitro fertilization and in vitro culture (day 7 blastocyst - 71 cells, day 10 blastocysts - 77 cells and 141 cells), was slightly lower than that of controls (day 7 blastocysts - 80.5 ± 21.3 cells and day 8 blastocysts - 105.9 ± 21.3 cells).
- 10) No pregnancies resulted from five transfers (a total of nine blastocysts) from the vitrification procedure to recipients.

The results of this work show that immature and in vitro matured bovine oocytes can be successfully cryopreserved through vitrification with the minimal drop size technique. The cleavage and development rate is significantly lower than that of controls. The stress produced by the conditions present in the toxicity and vitrification protocols had a greater effect on cleavage and development rates with immature oocytes than with in vitro matured oocytes. Using the best combination of cryoprotective agents (20% ethylene glycol + 20% butanediol + 0.5 M sucrose), there was no difference between the two support methods tested (EMC grids and OPS).

Future work is needed to obtain improved survival, cleavage, development and pregnancy rates following blastocyst transfer following cryopreservation.