

Überlebensrate und energetischer Status von eingefrorenen/aufgetauten in vitro produzierten Rinderblastozysten

M. Stojkovic, S. Peinl, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, ¹H. Wenigerkind, ²H-D. Reichenbach,
³J.G. Thompson und E. Wolf

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU München,

¹BFZF, Oberschleißheim; ²BFS Poing, Grub, Deutschland

³Lehrstuhl für Gynäkologie, Universität von Adelaide, Australien

Eingefrorene/aufgetaute in vitro produzierte Rinderembryonen haben im Vergleich zu ex vivo gewonnenen Embryonen ein wesentlich niedrigeres Entwicklungspotential. Ein Grund dafür sind sicher suboptimale Kulturbedingungen. Zusätzlich weisen Embryonen, die in Anwesenheit von Serum kultiviert wurden, einen erhöhten Lipidgehalt auf, welcher die Überlebenschance der Embryonen nach dem Auftauen reduziert. Außerdem hat die Bildung von Eiskristallen des intrazellulären Wassers während des Einfriervorgangs oft schädliche Konsequenzen für die Embryonen.

Wir haben schon demonstriert, dass Hyaluronsäure und ihre Salze (HS) die in vitro Entwicklung von Rinderembryonen erfolgreich unterstützen (Stojkovic et al., *Theriogenology* 1999: 51, 254). HS wird normalerweise in der Plasmamembran synthetisiert und besitzt die Fähigkeit, Wasser zu binden und dessen Mobilität zu verringern. Deshalb haben wir in dieser Studie die Reexpansionsrate (R), die Schlupfrate (S), die Gesamtüberlebensrate (RS) und den energetischen Status (ATP-Gehalt) von Rinderblastozysten, die mit oder ohne HS kultiviert wurden, untersucht und verglichen.

Vier Gruppen von Tag 7 und Tag 8 expandierten Blastozysten wurden wie schon beschrieben (Stojkovic et al., *Biology of Reproduction* 2001, 64, 904-909), mit einigen Modifikationen, in vitro produziert. Die Kulturbedingungen für die frühen embryonalen Stadien waren: 1) SOF mit essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren (SOFaa) und 1 mg/ml BSA (SOFaaBSA), 2) SOFaa mit 10% Serum von östrischen Kühen (OCS; SOFaaOCS). Am Tag 5 wurden die Embryonen aus der Gruppe 1 in zwei neue Gruppen geteilt und in SOFaaBSA oder SOFaaBSA mit 6 mg/ml HS weiter kultiviert. Expandierte Blastozysten wurden am Tag 7 (SOFaaOCS) und Tag 8 (SOFaaBSA, SOFaaHS, SOFaaOCS) mit 1,5 M Ethylenglycol eingefroren (Stojkovic et al., *Theriogenology* 1995: 43, 326). Eine Gruppe der eingefrorenen Blastozysten wurde nach dem Auftauen auf R, S und RS Raten nach 24, 48 und 72 Stunden untersucht, bei der anderen Gruppe wurde der ATP-Gehalt 0, 0,5, 1, 3, und 6 Stunden nach dem Auftauen gemessen und mit ex vivo gewonnenen Embryonen verglichen, um die Vitalität der Embryonen zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 1: Reexpansions- (R), Schlupf- (S) und Gesamtüberlebensrate (RS) der in vitro produzierten Rinderblastozysten

Kultur (Tag)	n	24 h			48 h			72 h		
		R	S	RS	R	S	RS	R	S	RS
aaSOFOCS (7)	49	22.6 ^a	31.0 ^a	53.6 ^{ab}	27.4	31.0 ^a	58.4 ^{ab}	0	56.0 ^{ab}	56.0 ^{ab}
aaSOFOCS (8)	45	60.3 ^b	13.7 ^{ab}	74.0 ^a	19.6	56.0 ^b	75.6 ^{ab}	0.9	68.4 ^a	69.3 ^{ab}
aaSOFBSA (8)	57	33.3 ^{ab}	4.8 ^b	38.1 ^b	21.6	29.1 ^a	50.7 ^a	11.0	37.4 ^b	48.4 ^a
AaSOFHS (8)	53	60.5 ^b	9.5 ^b	70.0 ^a	24.3	61.2 ^b	85.5 ^b	10.0	76.0 ^{ac}	86.0 ^b

Ergebnisse sind als Prozente dargestellt (P<0,05, ANOVA mit LSD post-hoc Test).

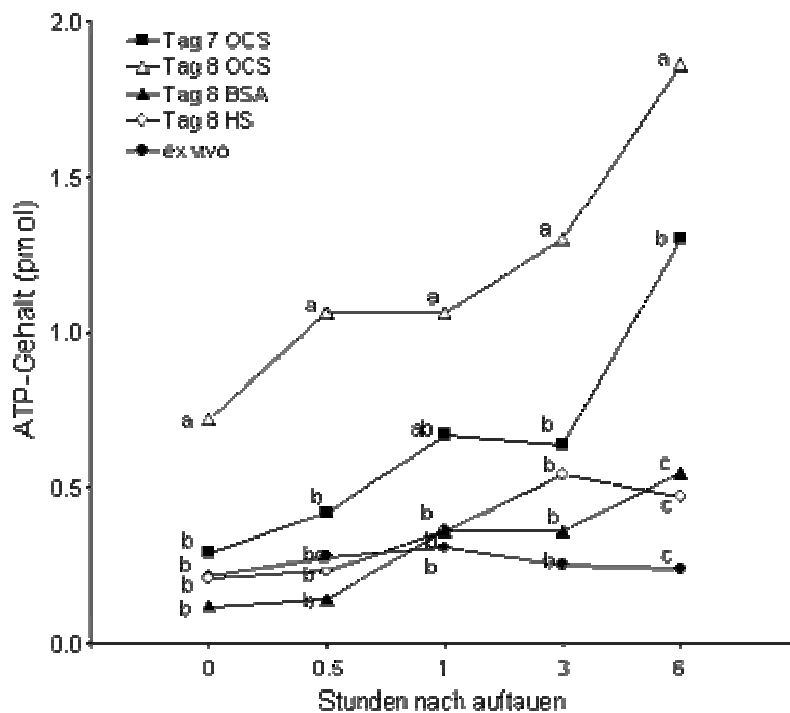


Abbildung 1: ATP-Gehalt der eingefrorenen/aufgetauten in vitro produzierten und ex vivo gewonnenen Embryonen.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass hohe Konzentrationen von HS im Kulturmedium auch die Überlebensrate nach Einfrieren/Auftauen steigern (Tabelle 1). Dieser Effekt kann durch die Eigenschaften der HS erklärt werden. HS bindet intrazelluläres Wasser und außerdem steigert HS die rheologischen Eigenschaften des Kulturmediums und des Zytosols der Embryonen, was die Bildung von intrazellulären Eiskristallen verhindert. Die ATP-Messungen zeigen, dass HS und BSA Embryonen einen sehr ähnlichen energetischen/metabolischen Status nach dem Einfrieren/Auftauen haben wie ex vivo gewonnene Embryonen (Abbildung 1).

Unterstützt durch die Bayerische Forschungsförderung (76/93).