

Zwischenlagerung von tiefgefrorenen Mäuseembryonen bei verschiedenen Temperaturen

Soha Matar, M. El-Gayar und W. Holt

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Georg-August-Universität Göttingen,

Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen

Das Tiefgefrieren bei -196°C bietet eine gute Möglichkeit der Langzeitlagerung von Embryonen. Der Transport in flüssigem Stickstoff ist aber nicht unproblematisch. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Zwischenlagerung von bei -196°C tiefgefrorenen Mäuseembryonen bei Temperaturen von -79°C , -18°C oder -5°C , gefolgt von erneutem Einfrieren, auf deren Lebens- und Weiterentwicklungsfähigkeit *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Als Spendertiere wurden 50 präpuberale Weibchen der Hybridlinie CBA/C57 mit 7,5 IE eCG und 5 IE hCG superovuliert. Von 38 gedeckten Tieren wurden nach Spülung insgesamt 561 Embryonen gewonnen, davon 360 als gefriertauglich im Stadium der frühen Blastozyste beurteilt und mit Hilfe des Standardgefrierverfahrens wie folgt eingefroren: Nach 20 min Äquilibration im Gefriermedium (1,5 mol Ethylenglycol und 0,25 mol Saccharose) bei Raumtemperatur kamen sie in das auf -6°C vorgekühlte Alkoholbad, wo nach 5 min die Kristallisationsauslösung (Seeding) erfolgte. Anschließend folgte die Abkühlung mit einer konstanten Abkühlrate von $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis auf eine Temperatur von -32°C . Bei dieser Temperatur wurden die Embryonen 10 min gehalten und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196°C) verbracht. Die Embryonen wurden danach in vier gleichmäßige Gruppen aufgeteilt: Eine Gruppe verblieb als Kontrolle im flüssigen Stickstoff, die anderen wurden jeweils 72h bei -79°C , -18°C bzw. -5°C zwischengelagert und anschließend wieder in flüssigen Stickstoff zurückgesetzt.

Die Weiterentwicklungsrate nach dem Auftauen wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Für die *in vitro* Kultivierung wurden 120 transfertaugliche Embryonen nach dem Auftauen und Ausverdünnen des Gefrierschutzmittels in M16-Medium über einen Zeitraum von 24h inkubiert. Aus der Kontrollgruppe hatten sich 24 (86%) Embryonen weiterentwickelt, aus der für 3 Tage bei -79°C gelagerten Embryonen überlebten 5 (17%), die sich auch bis zum späten Blastozystenstadium weiterentwickelten. Weder die bei -18°C noch bei -5°C gelagerten Embryonen entwickelten sich *in vitro* weiter.

Zur Beurteilung der in vivo Weiterentwicklungsrate wurden insgesamt 240 Embryonen nach Auftauen und Ausverdünnen in Uterushörner von 12 scheinträchtigen Empfängertieren der Linie NMRI, die zwei Tage zuvor mit sterilen Böcken gedeckt worden waren, übertragen. In jedes Uterushorn, das jeweils als eine Versuchseinheit diente, wurden 10 Embryonen übertragen. Nach Tötung an Tag 17 waren 5 der 12 Empfängertiere tragend. Nur aus der Kontrollgruppe entwickelten sich 15 Embryonen (25%) zu lebenden Feten weiter. Bei den Embryonen, die für 72h bei -79°C gelagert worden waren, kam es in einem Fall zur Implantation, doch nicht zur Trächtigkeit. Von den bei -18°C bzw. -5°C zwischengelagerten Embryonen entwickelte sich kein einziger Embryo weiter.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Embryonen durch die Zwischenlagerung bei höheren Temperaturen oder das schnelle Wiedereinfrieren geschädigt wurden. Möglicherweise führte sowohl die Zunahme der Toxizität der Gefrierschutzmittel bei höheren Temperaturen als auch die Bildung von größeren Eiskristallen durch Umkristallisation zu erheblichen Zellschädigungen bei den Embryonen.