

# Kryokonservierung von Schweineembryonen mit dem „open pulled straw“ (OPS)-Verfahren – erste Ergebnisse

J. Reischl, A. Strohmeyer, N. Weber, W. Holtz

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

Die Kryokonservierung von Embryonen ermöglicht einen Embryotransfer zeitlich unabhängig von der Gewinnung der Embryonen. Unter dem Gesichtspunkt einer routinemäßigen Anwendung verschiedener biotechnischer Verfahren, wie z.B. die *in vitro*-Produktion von Embryonen, der Nutzung von Embryonen zum Erhalt und Austausch von genetischem Material ohne seuchenhygienischen Probleme oder der biomedizinischen Forschung gewinnt die Kryokonservierung zusätzlich an Bedeutung. Im Gegensatz zu anderen landwirtschaftlichen Nutztieren ist aber der umfangreiche Einsatz der Kryokonservierung beim Schwein durch noch sehr niedrige Überlebensraten begrenzt. Ein Grund hierfür könnte die hohe Kältesensitivität der Schweineembryonen in dem Temperaturbereich zwischen 15 und 10°C sein. Bei einem schnellen Einfrierprozeß wie bei der Vitrifikation, wird dieser Temperaturbereich schnell durchschritten und so möglicherweise das Überleben der Embryonen erleichtert. Das „open pulled straw“ (OPS) – Verfahren, eine modifizierte Vitrifikationstechnik, wurde bereits erfolgreich bei verschiedenen Tierarten eingesetzt und soll in dieser Studie auf seine Eignung zur Tiefgefrierung von Schweineembryonen überprüft werden.

Zur Gewinnung von Blastozysten wurden präpuberalen Jungsauen zur Einleitung einer ovulatorischen Brunst mit 1000 I.E. eCG behandelt, 84 und 96h danach terminorientiert besamt und am Trächtigkeitstag 7 geschlachtet. Die Embryonen wurden aus den Uterushörnern ausgespült und in Haltemedium (HM; TCM-Hepes + 20 % Ziegenbockserum) bei 39°C gesammelt. Im ersten Versuch wurden zur Tiefgefrierung der Embryonen verschiedene Konzentrationen der Vitrifikationslösung (VL) 1 getestet: Gruppe A wurde in HM mit 7,5% Ethylenglykol (EG) und 7,5% Dimethylsulfoxid (DMSO) und Gruppe B in HM mit 10% EG + 10% DMSO für 1min äquilibriert. Danach wurden die Embryonen aus beiden Gruppen für 20 sec in die

VL 2 (HM + 20% EG + 20% DMSO) umgesetzt, mit einem Volumen von ca. 2 µl in die OPS-Palette aufgenommen und unverzüglich in flüssigen Stickstoff getaucht. Das Auftauen erfolgte in zwei Ausverdünnungsschritten (HM + 0,2M und 0,1M Saccharoselösung für jeweils 5 min). Die Embryonen wurden anschließend entweder in HM für 48h in vitro kultiviert (n=60) oder auf synchrone Empfängertiere (Tag 7; 18 Embryonen/Empfänger), die analog zu den Spendertieren vorbehandelt waren, chirurgisch in die Uterushornspitze übertragen. Nach 12 h Kultur waren in beiden Gruppen etwa 60% der Embryonen reexpandiert und nach 26 h betrug der Anteil 74% (Gruppe A) bzw. 87% (Gruppe B), der später auch nicht mehr zunahm. Von den 10 Empfängertieren bildete keines eine Trächtigkeit aus.

Basierend auf den Ergebnissen des ersten Versuches wurde in Versuch 2 die VL1 mit den höheren Gefrierschutzmittelkonzentrationen (HM + 10% EG + 10% DMSO) verwendet. Eine Gruppe von Embryonen wurde vor dem Einfrieren für 45 min in Cytochalasin b (7,5 µg/ml) inkubiert, womit eventuelle Schäden am Cytoskelett der Embryonen vermieden werden sollten. Die aufgetauten Embryonen wurden ebenfalls entweder für 48h in vitro kultiviert (n=42) oder auf Empfängertiere (n=8) übertragen, die -1 Tag asynchron zu den Spendertieren vorbereitet wurden. Jedem Empfänger wurden 30 aufgetaute, sowie 9 frisch ex vivo ausgespülte Embryonen (Tag 6) übertragen, mit dem Ziel, den Eintritt einer Trächtigkeit möglichst sicher zu stellen. Die Ferkel der tiefgefrorenen Embryonen ließen sich genetisch von den frisch transferierten unterscheiden. Die in vitro Kultur bestätigte die Ergebnisse des ersten Versuches bezüglich der nötigen Reexpansionszeit der Embryonen von etwa 24h. Die mit Cytochalasin b vorbehandelten Embryonen unterschieden sich in ihren Reexpansionsraten nicht von den Kontrollembryonen (69% vs. 62%). Von bisher 8 Empfängertieren blieben 5 tragend, eines bildete keine Trächtigkeit aus und 2 Tiere stehen noch zur Trächtigkeitsuntersuchung an. Zum jetzigen Zeitpunkt liegt ein Wurf mit fünf Ferkeln vor, aus dem ein Ferkel von einem tiefgefrorenen, mit Cytochalasin b vorinkubierten Embryo stammte.

Dieses vorläufige Ergebnis zeigt, dass die Kryokonservierung von Blastozysten vom Schwein mit dem OPS-Verfahren in Kombination mit Cytochalasin b Behandlung und asynchronem Transfer grundsätzlich möglich ist. Bis zur praxistauglichen Anwendung dieses Verfahrens bedarf es sicher noch weiterer Untersuchungen.