

Tiefgefrierkonservierung von Embryonen – Grundlagen, aktueller Stand und Entwicklungen

Praktikerseminar anlässlich der Aet-d Jahrestagung in Berlin 06.06. -07.06.2013

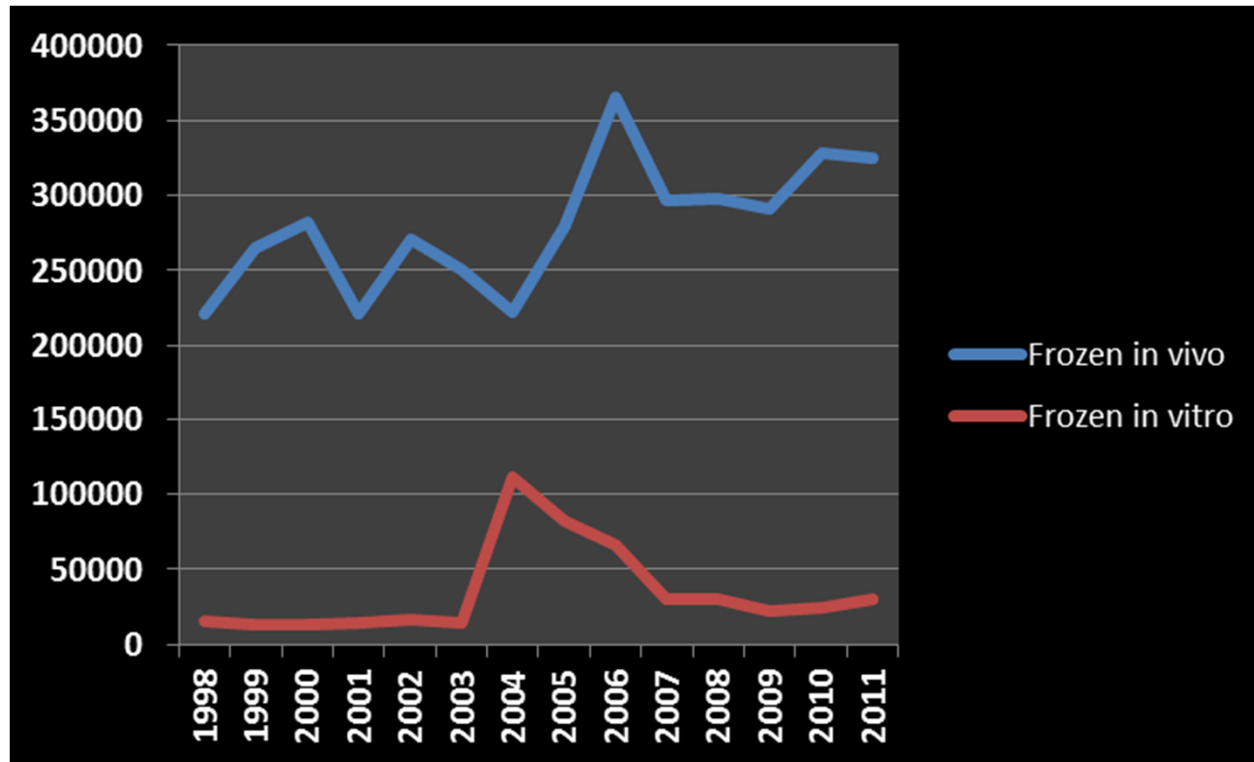
Hanna Stinshoff

Kryokonservierung boviner Embryonen

- 1973: Erstes Kalb nach Kryokonservierung (kontrolliert)
- 1986: Erstes Kalb nach Vitrifikation
- 1995: Erstes Kalb nach Kryokonservierung (kontrolliert) einer immaturen Oozyte
- 2002: Erstes Kalb nach Vitrifikation einer immaturen Oozyte
- Am weitesten entwickelt
- Am häufigsten verwendet:
Kontrollierte Gefrierverfahren (One step);
Trächtigkeitsraten (Embryonen): 60%



Bedeutung der Kryokonservierung im kommerziellen Embryotransfer



Bedeutung der Kryokonservierung im kommerziellen Embryotransfer

Table 3 Fresh vs. Frozen Bovine Transfers 2011

CONTINENTS	Number of Transferred Embryos			
	FRESH	FROZEN	TOTAL & PERCENTAGE	
AFRICA	4056	2469	6525	1.14%
ASIA	24026	51697	75723	13.23%
EUROPE	41040	69381	110421	19.29%
N. AMERICA	109197	139418	248615	43.44%
S. AMERICA	36953	26054	63007	11.01%
OCEANIA	32921	35130	68051	11.89%
TOTAL	248193	324149	572342	

Prinzipien der Kryokonservierung

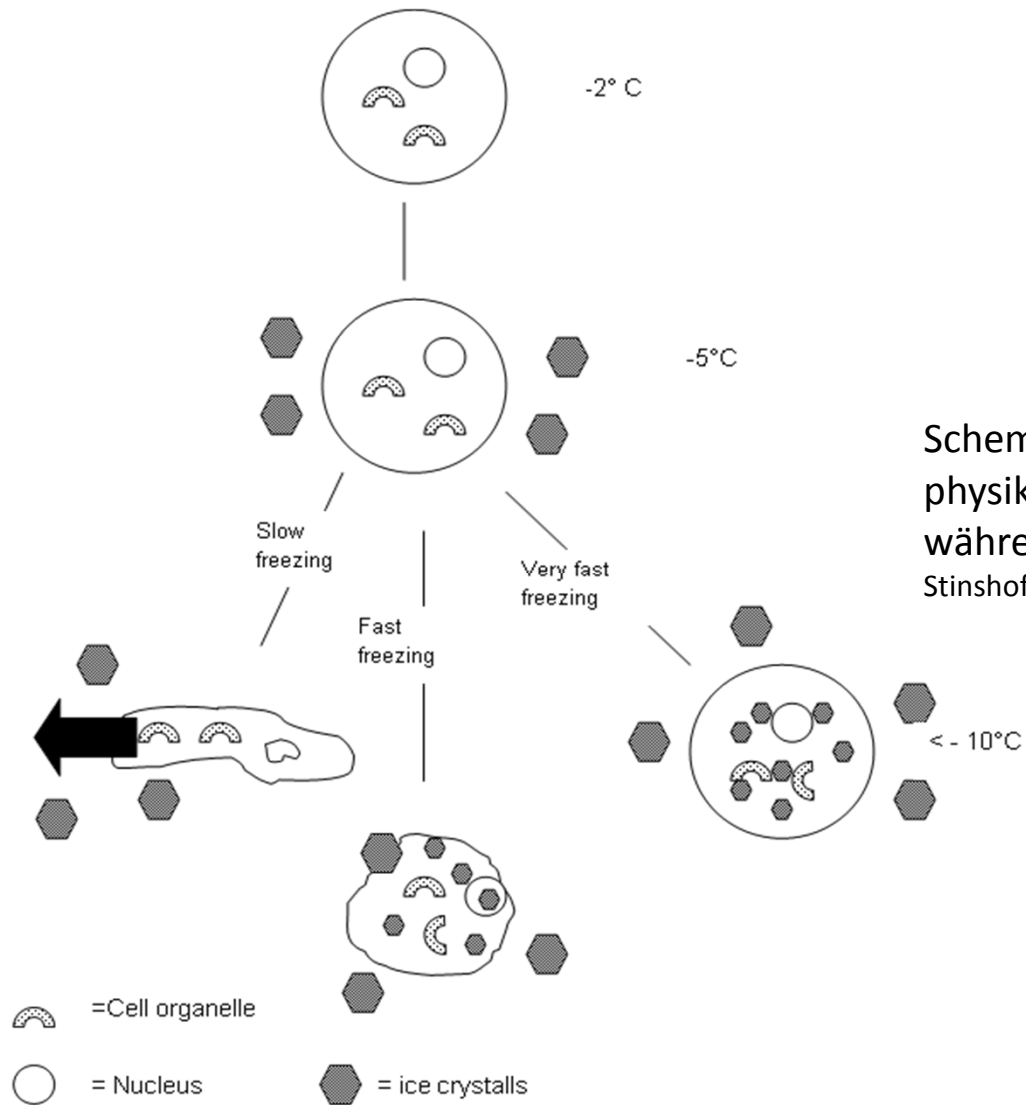
Gefrieren:

Transformation von Wasser in Eiskristalle

Vitrifizieren:

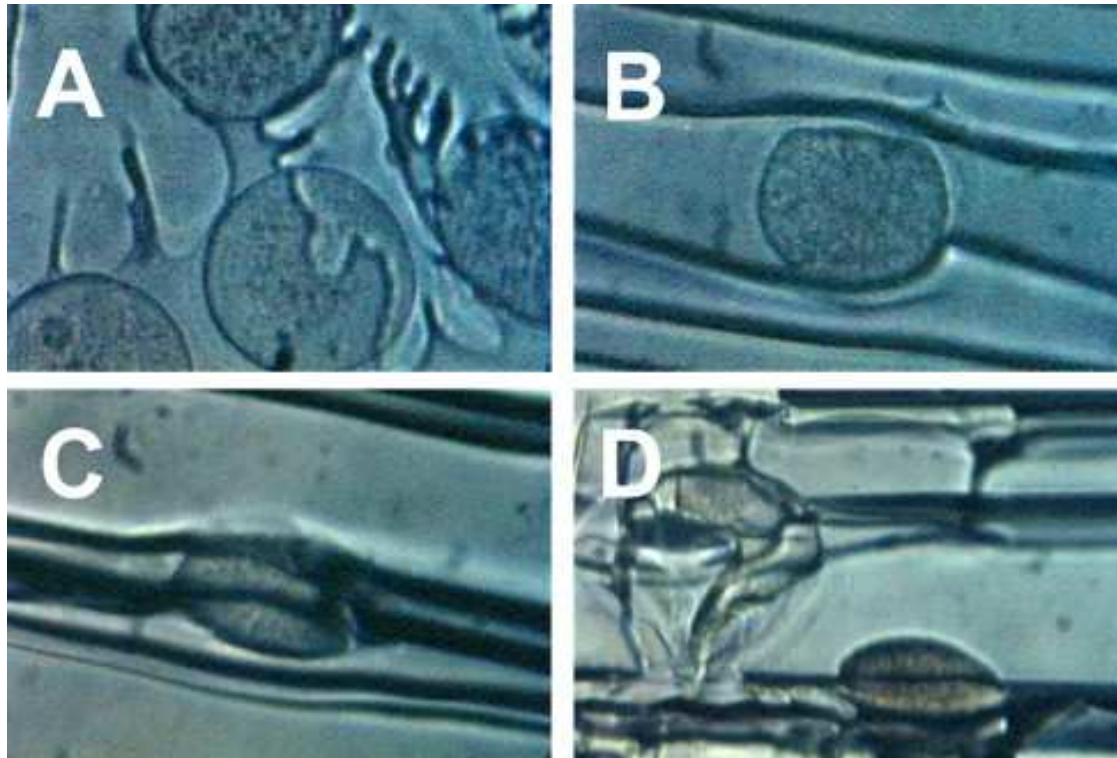
Überführen eines Stoffes in einen amorphen, glasähnlichen Zustand

Prinzipien der Kryokonservierung



Schematische Darstellung der physikalischen Veränderungen während des Einfrierens
Stinshoff 2009, modified from Mazur 1977

Eiskristallbildung (murine Oozyte)



Mäuseoozyte, gekühlt mit 1.7°C/min von

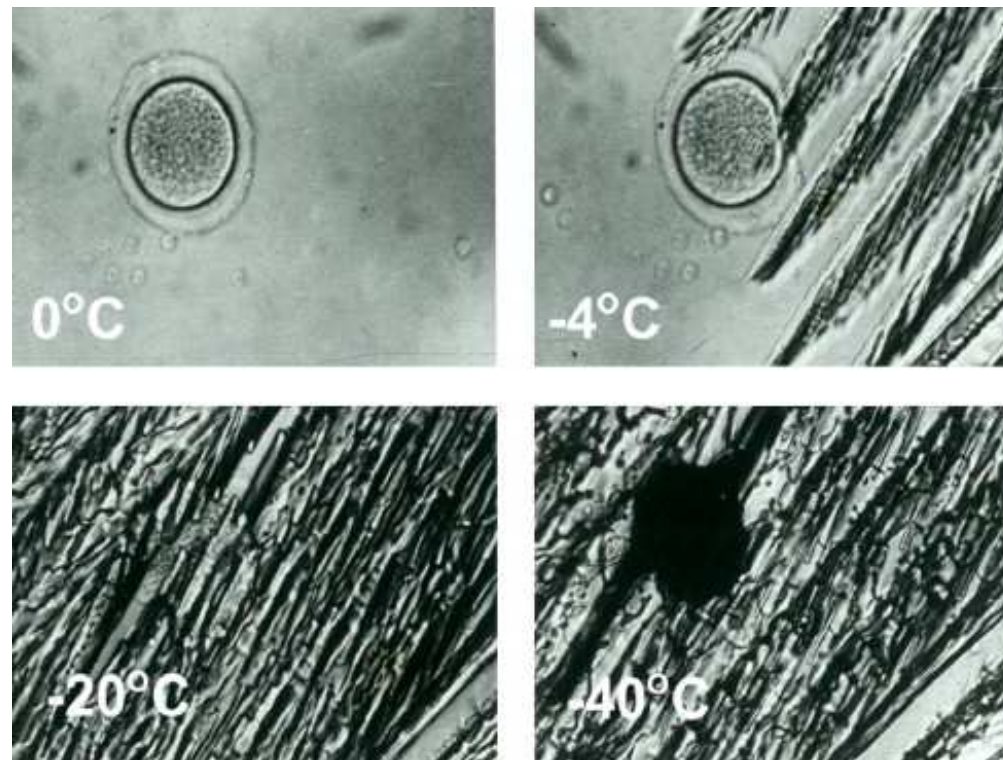
A: -5°C zu

B: -10°C zu

C: -20°C zu

D: -70°C

Eiskristallbildung (murine Oozyte)



Mäuseoozyte, gekühlt mit 32°C/min

Kryoprotektiva

- **Penetrierende Kryoprotektiva:**

Haben die Fähigkeit die Zellmembran zu penetrieren

Glycerin

Dimethylsulfoxid

Propandiol

Ethanol

Andere Alkohole

- **Nicht penetrierende Kryoprotektiva:**

Entfalten ihre kryoprotektive Eigenschaft
außerhalb der Zellmembran

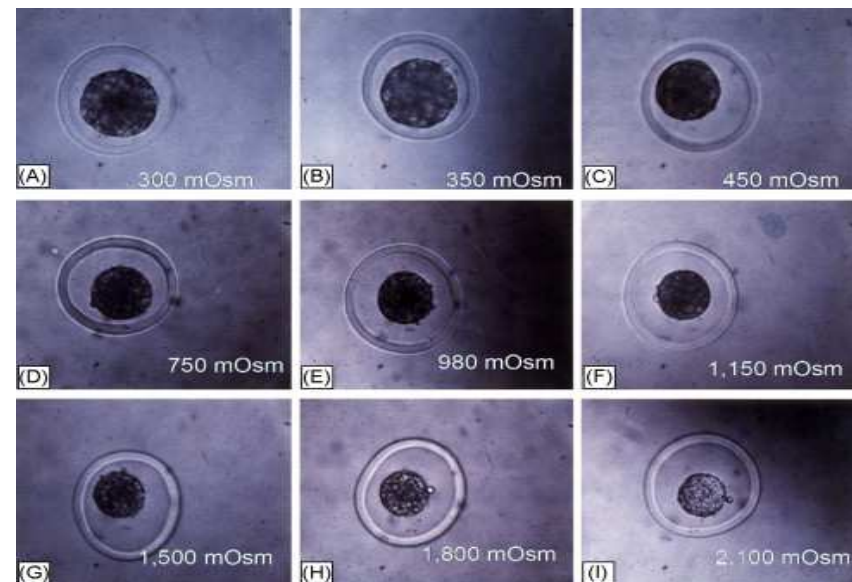
Agieren hauptsächlich durch Wasserentzug

Sucrose

Polyvinylpyrrolidon

Glukose

Andere Zucker



Mechanismen der Gefrierschutzwirkung

- Reduzierung der Schädigungen durch Lösungseffekte
- Reduzierung der Schädigungen durch intrazelluläres Gefrieren
- Erniedrigung der Temperatur des Einsetzens intrazellulären Gefrierens
- Stabilisierung der Zellmembran

Aber: Erhöhung der Osmolarität des Mediums

→ Schädigung der Zellen

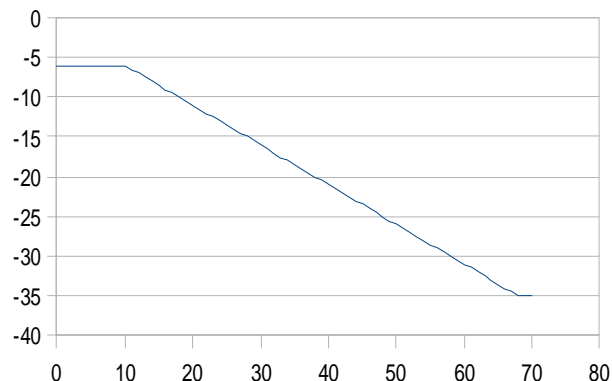
Konventionelle Kryokonservierung

Nach einem Auslösen der extrazellulären Kristallisation wird durch langsame, kontrollierte Kühlraten sichergestellt, dass nur außerhalb der Zelle Wasser kristallisiert. Das osmotisch aktive Wasser verlässt die Zelle in die extrazelluläre Matrix, was zu einer Dehydrierung der Zelle führt bis schlussendlich die Temperatur erreicht ist, bei der die intrazelluläre Matrix vitrifiziert.

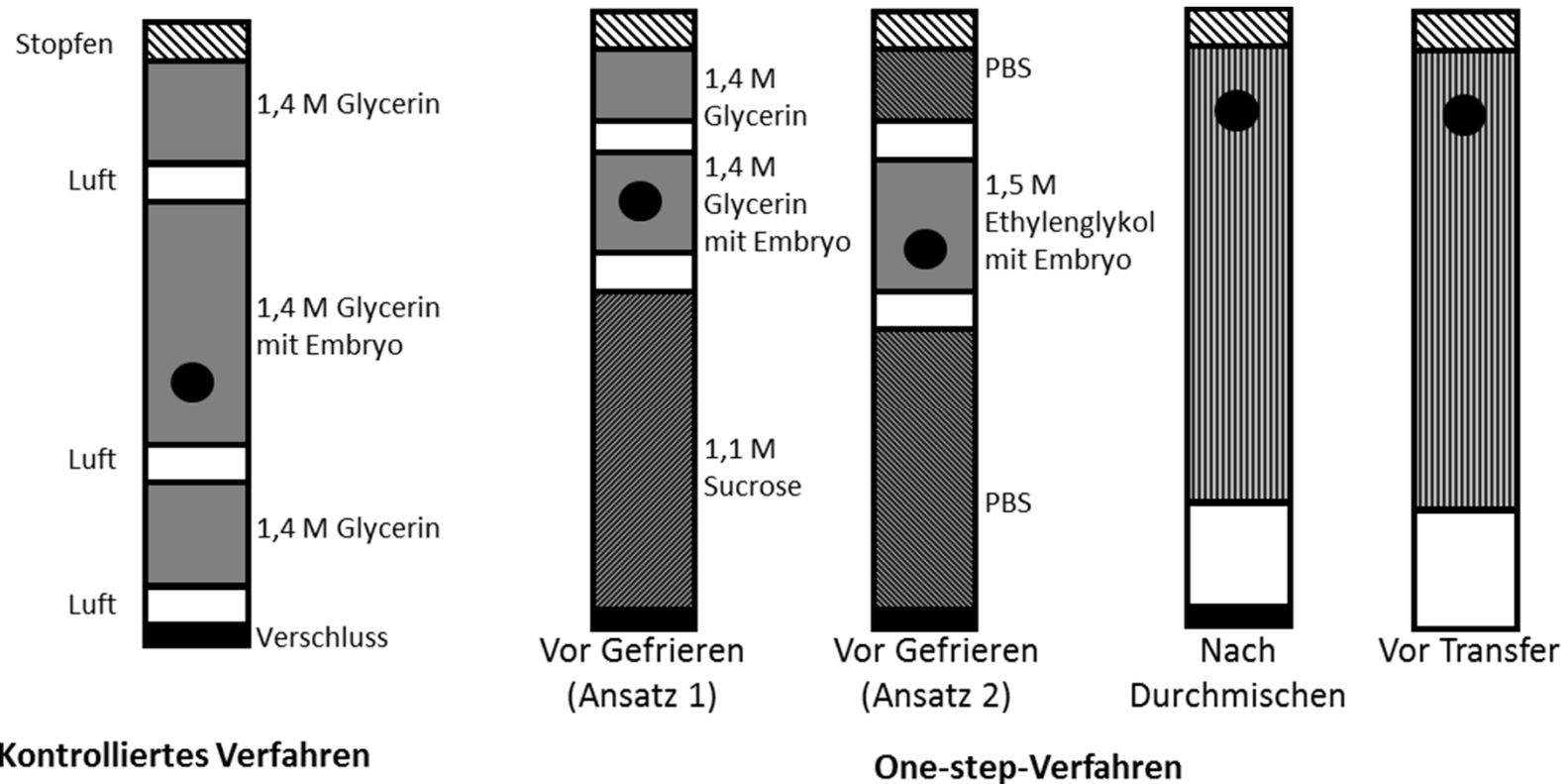
Ablauf der konventionellen Kryokonservierung



- Die Embryonen werden relativ niedrigen Konzentrationen von penetrierenden Kryoprotektiva ausgesetzt → i.d.R. Glycerol oder DMSO
- Die Embryonen werden in Straws geladen und bei -5°C bis -7°C für mehrere Minuten äquibriert
- Die extrazelluläre Kristallisation wird durch Seeding ausgelöst
- Anschließend erfolgt ein langsames Herunterkühlen auf -30°C bis -65°C mit ca $0,3^{\circ}\text{C}$ - $0,5^{\circ}\text{C}/\text{Min}$
- Die Straws werden dann in flüssigen Stickstoff überführt



Ablauf der konventionellen Kryokonservierung



Ablauf der Vitrifikation

VITRIFIKATION – GLASBILDUNG

ist das Festwerden einer Flüssigkeit durch Erhöhung ihrer Viskosität, während sie abgekühlt wird – wobei eine Kristallisation ausbleibt und somit ein amorpher Zustand entsteht.

- Zugabe des Gefrierschutzmittels in einer umgekehrten Verdünnungsreihe (von niedermolaren Lösungen zu hochmolaren Lösungen)
 - Verpacken der Embryonen
 - Direkte Überführung in flüssigen Stickstoff
 - Erwärmen der Proben
- Schrittweise Entfernung des Kryoprotektivums

Einflussfaktoren auf den Erfolg der Vitrifikation

1) KÜHLRATE

Durch direkten Kontakt zu flüssigem Stickstoff (-196°C) oder Stickstoff“matsch“(-210°C) werden Kühlraten von Hunderten zu Zehntausenden °C/Min erreicht

2) VISKOSITÄT DES KRYOPROTEKTIVUMS

Je höher die Viskosität des Mediums, desto höher liegt die Temperatur, bei der die Glasbildung einsetzt

3) VOLUMEN

Je kleiner das zu vitrifizierende Volumen, desto höher die Wahrscheinlichkeit der Vitrifikation

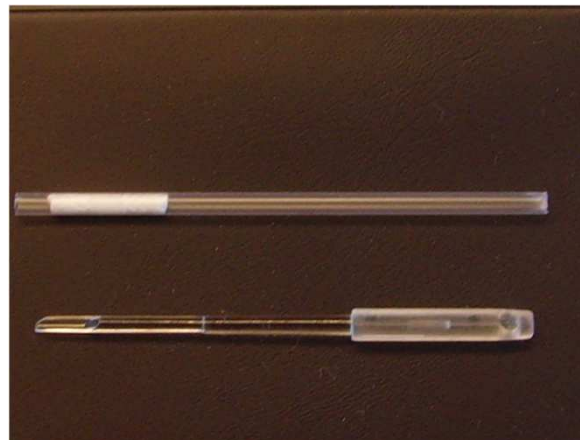
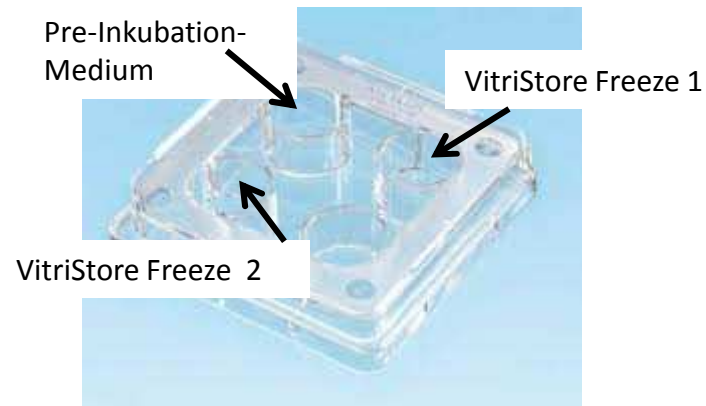
$$\text{Wahrscheinlichkeit der Vitrifikation} = \frac{\text{Kühlrate x Viskosität}}{\text{Volumen}}$$

Ablauf der Vitrifikation

- Beispiel VitriStore Freeze-



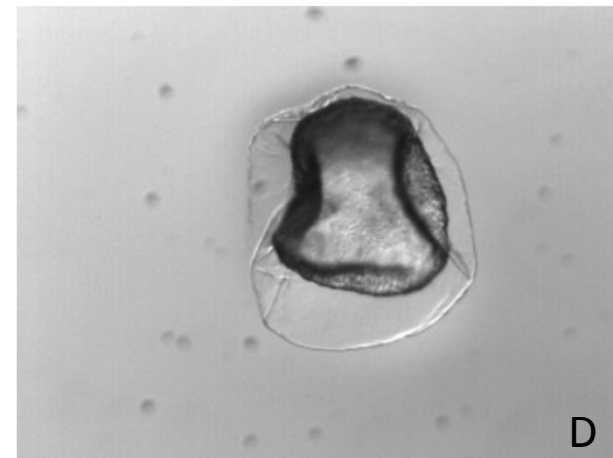
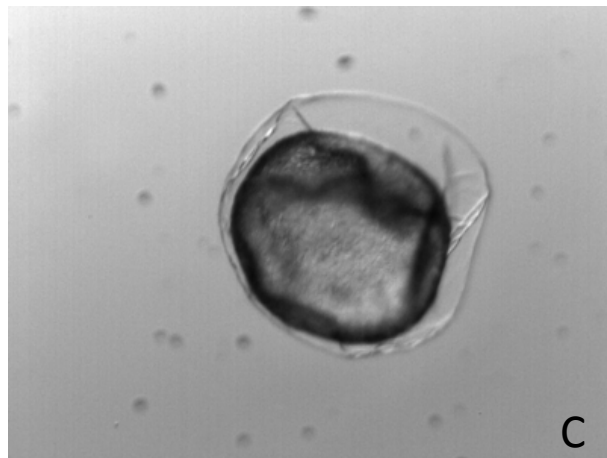
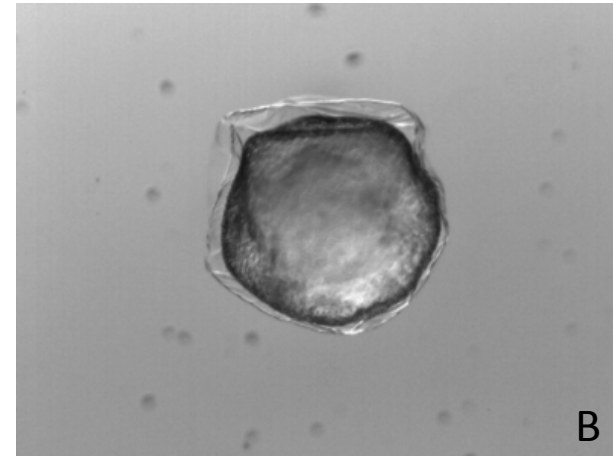
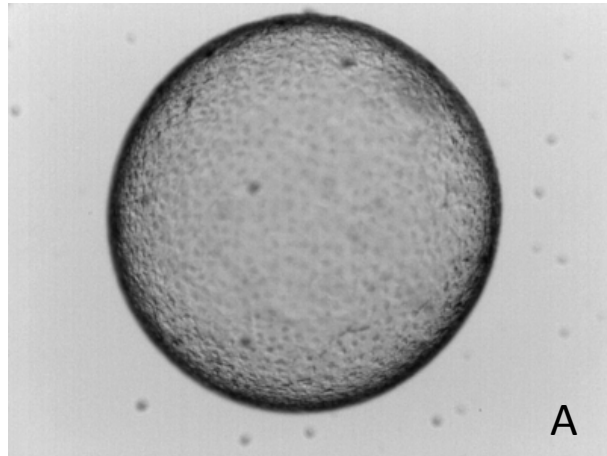
Stadium	Pre-Inkubation-Medium	VitriStore Freeze 1	VitriStore Freeze 2	Temperatur
Mo, frühe Bla	2 min	2 min	10-30s	Raumtemp.
Bla – ex. Bla	2 min	3 min	10-30s	37°C



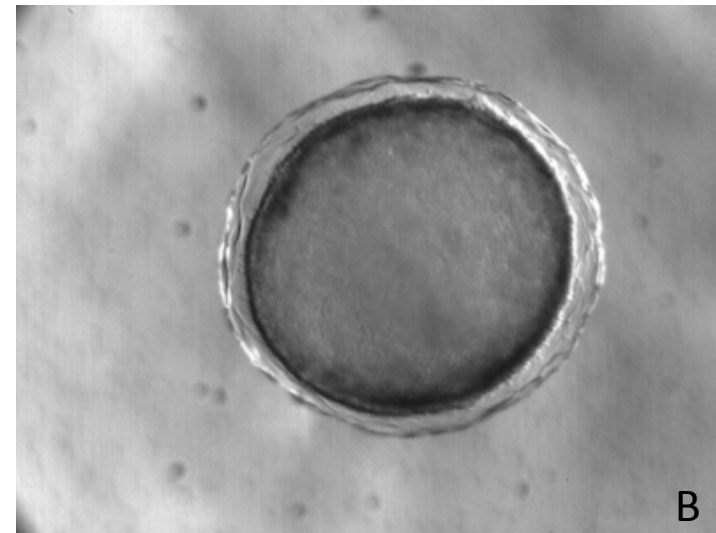
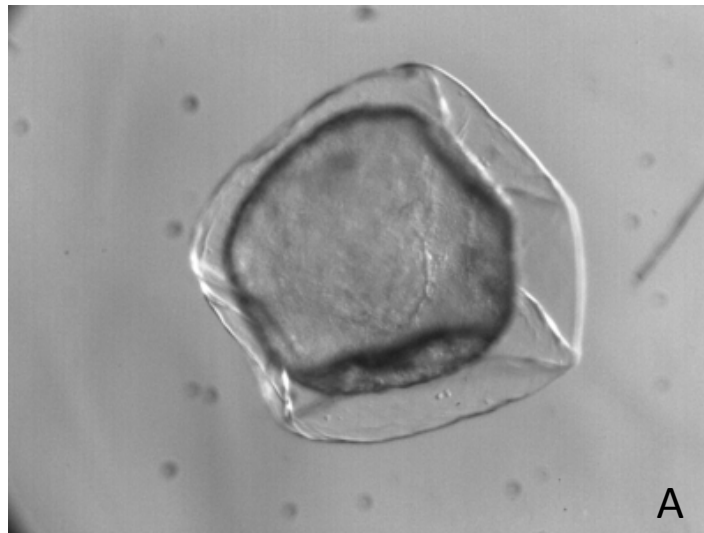
Bildquellen: Gynemed, Nunc, Kitazato

Trägersystem

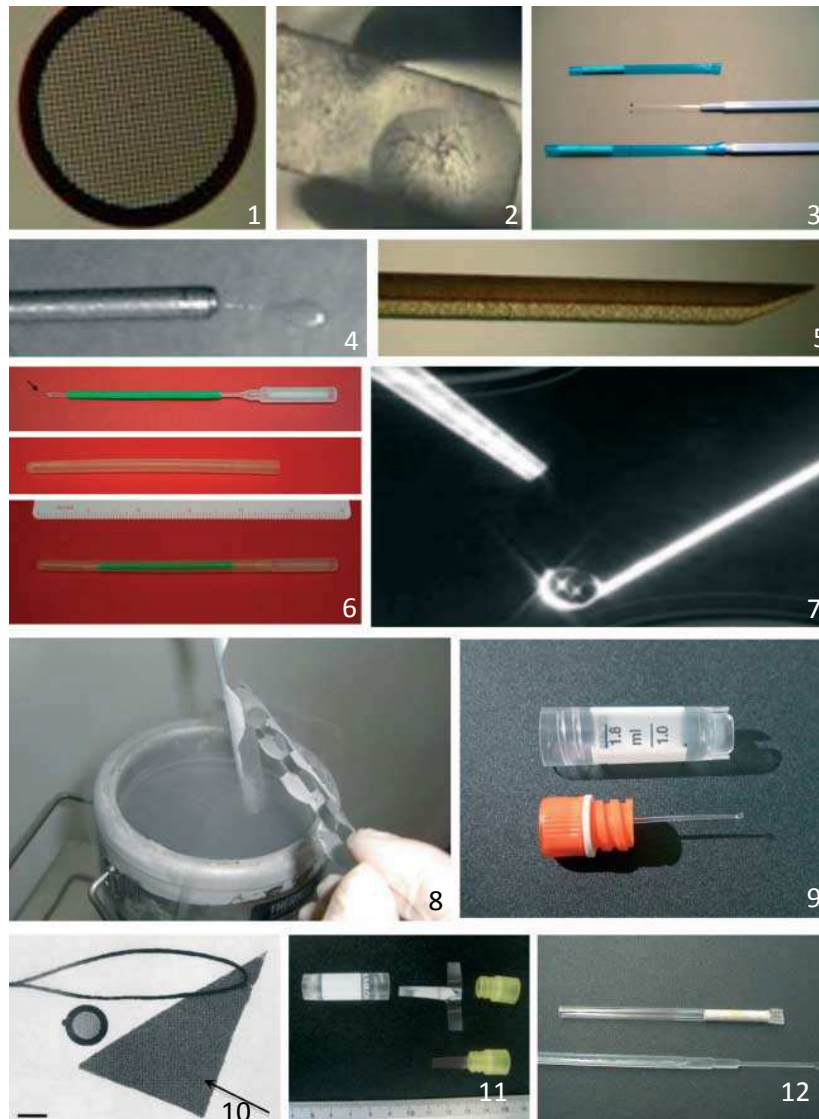
Vitrifikation einer equinen Blastozyste



Erwärmen einer equinen Blastozyste



Systeme für die Vitrifikation - offene Systeme -



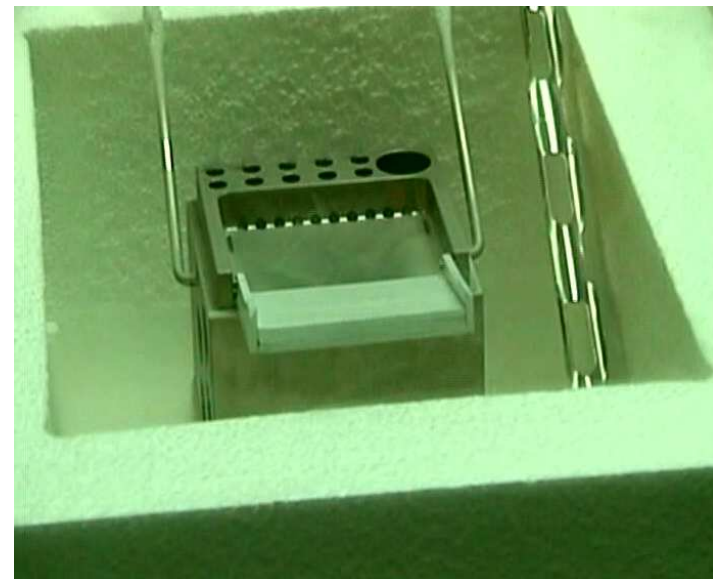
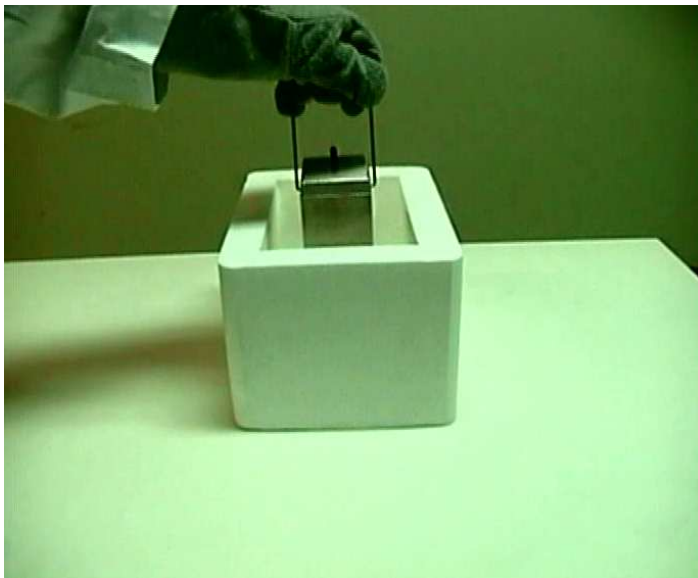
Offene Systeme für die Vitrifikation:

- (1) Elektronenmikroskop Gitter
- (2) minimum drop size
- (3) Cryotop
- (4) Cryoloop
- (5) Hemi-straw
- (6) Cryoleaf
- (7) Fiber plug
- (8) Direct cover vitrification
- (9) Vitrification spatula
- (10) Nylon Netz
- (11) Plastic blade
- (12) Vitri-Inga.

Systeme für die Vitrifikation

- geschlossene Systeme/Systeme ohne Kontakt zum N₂ -

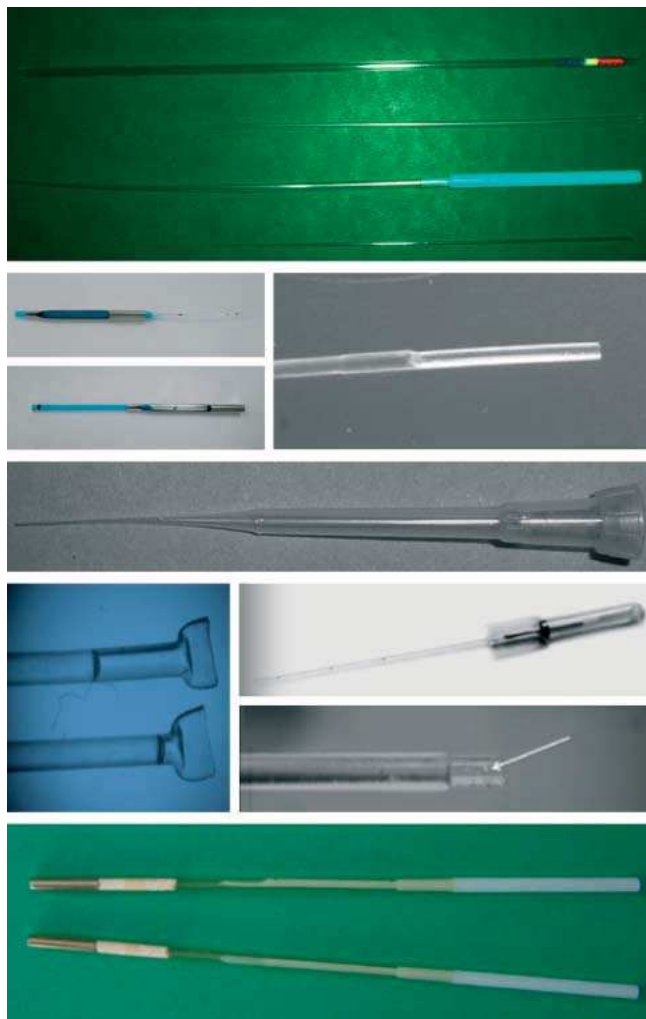
Solid Surface Vitrification



Dinnyes, A. et al. Biol Reprod 2000;63:513-518
Biology of Reproduction

Systeme für die Vitrifikation

- geschlossene Systeme/Systeme ohne Kontakt zum N₂ -



Vitrification tubing carrier systems:

- (1) Oben: Plastik Straw,
- (1) 2. von oben: Open-pulled straw,
- (1) 3. von oben: Superfine open-pulled straw
- (1) unten: Flexipet-denuding Pipette
- (2) CryoTip,
- (3) High-security vitrification device,
- (4) Pipetten Spitze
- (5) Sealed pulled straw
- (6) Cryopette,
- (7) Rapid-i
- (8) JY Straw.

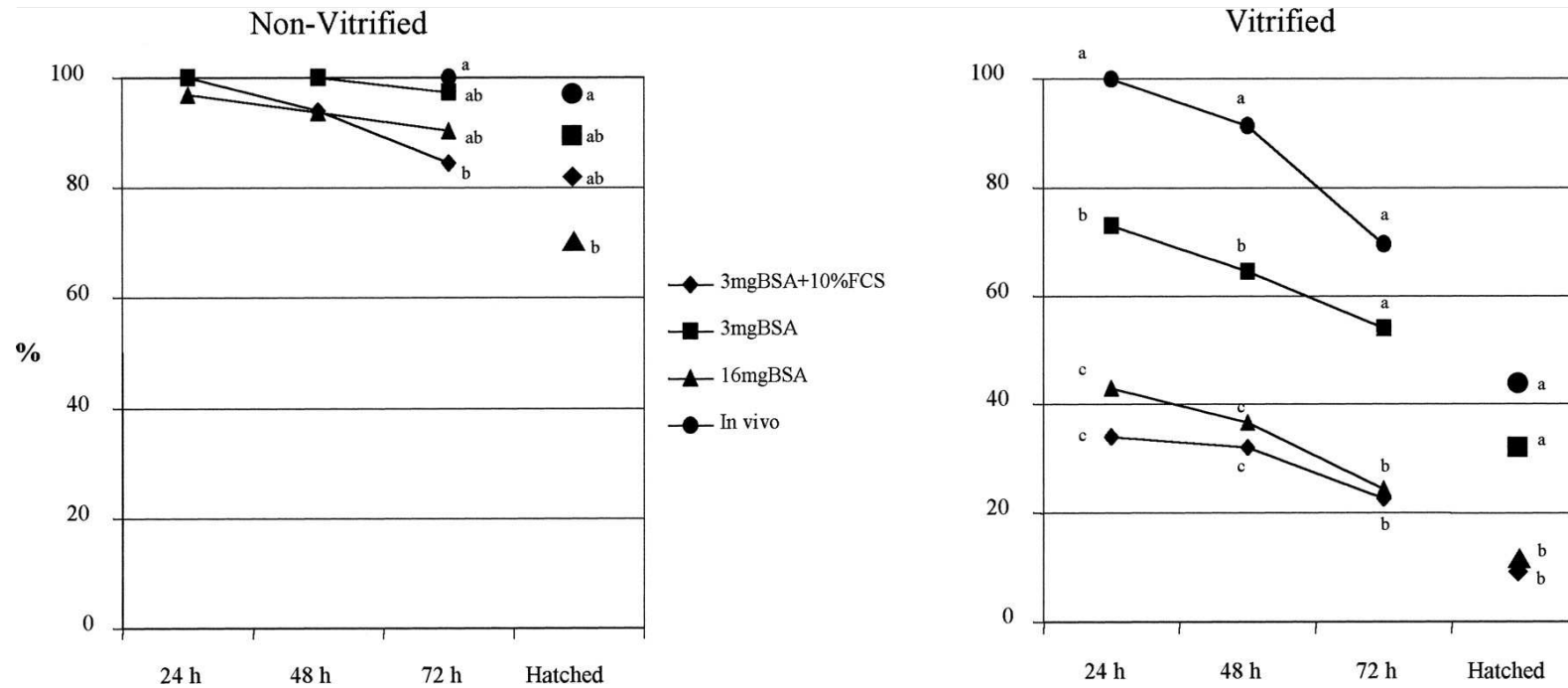
Einflussfaktoren auf die Überlebensraten nach Kryokonservierung

- **Spezies (Lipidgehalt)**
- **Verwendetes Gefrier- und Auftauverfahren**
- **Embryonenherkunft (in vivo vs. in vitro)**
- **Embryonales Entwicklungsstadium**
- Embryonenqualität
- Individuelle Variabilität
- Empfänger (Plasmaprogesteronspiegel)

Einflussfaktoren auf die Überlebensraten nach Kryokonservierung

	Höhere Widerstandsfähigkeit	Geringere Widerstandsfähigkeit
Spezies	Rind, Schaf	Schwein, Pferd
Entwicklungsstadium	Morula, (junge) Blastozyste	Geschlüpfte Blastozysten, Eizellen
Herkunft	In vivo produzierte Embryonen	In vitro produzierte Embryonen
		Mikromanipulierte Embryonen

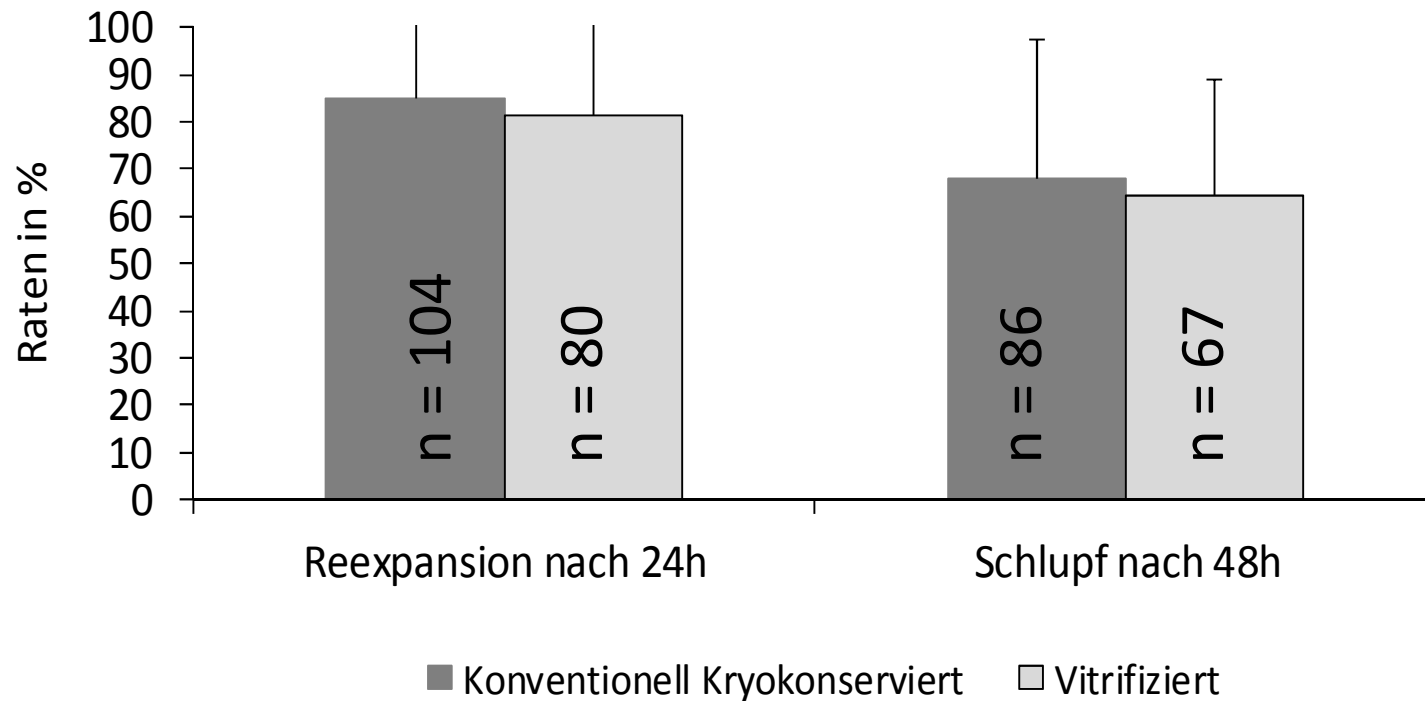
Überlebensraten nach Vitrifikation in Abhängigkeit zur Herkunft der Embryonen - Beispiel Rind-



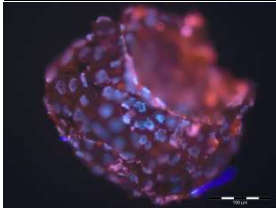
Konventionelle Kryokonservierung vs. Vitrifikation - Beispiel Rind -



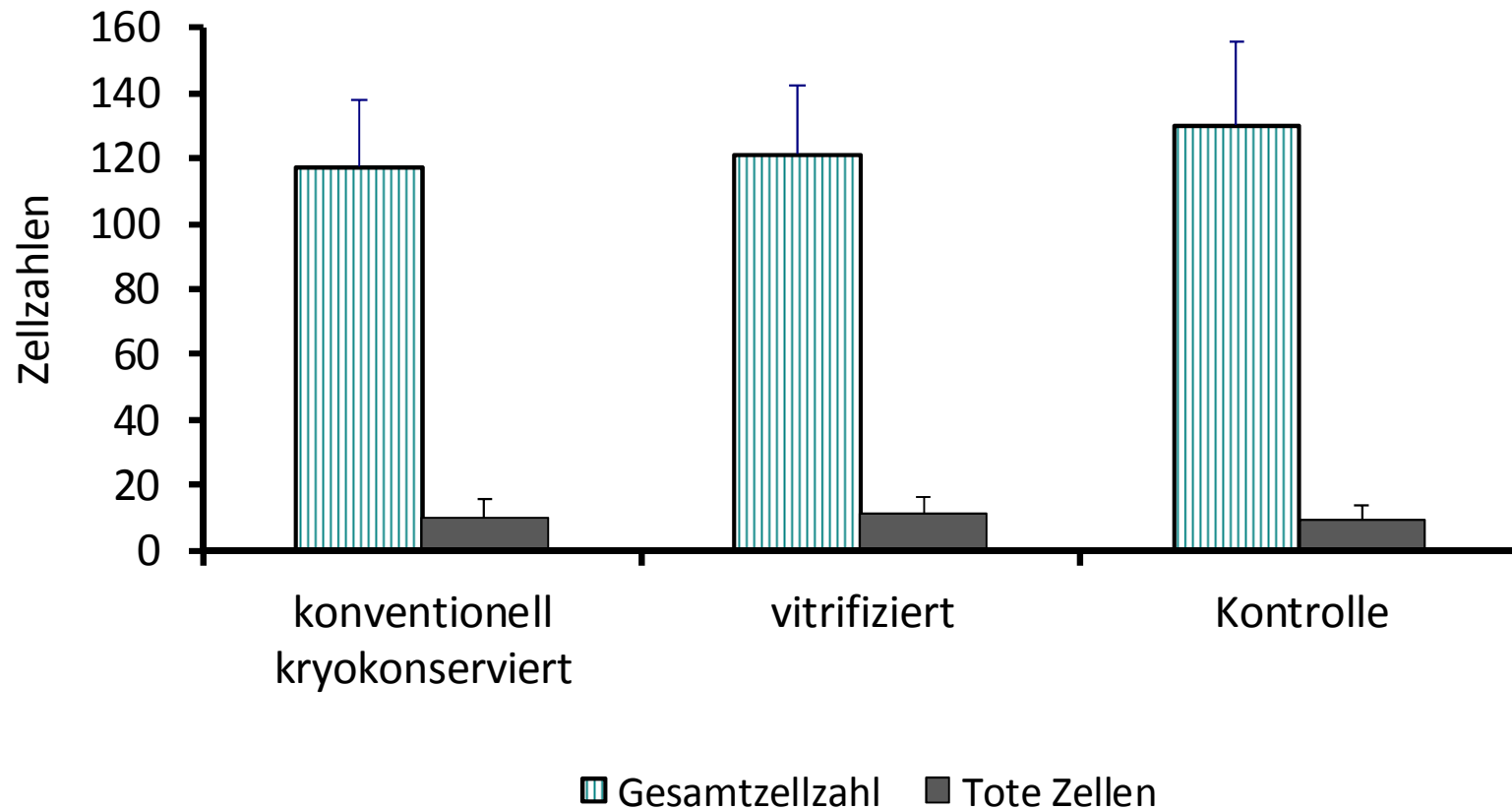
Reexpansions- und Schlupfraten nach dem Auftauen



Konventionelle Kryokonservierung vs. Vitrifikation - Beispiel Rind -

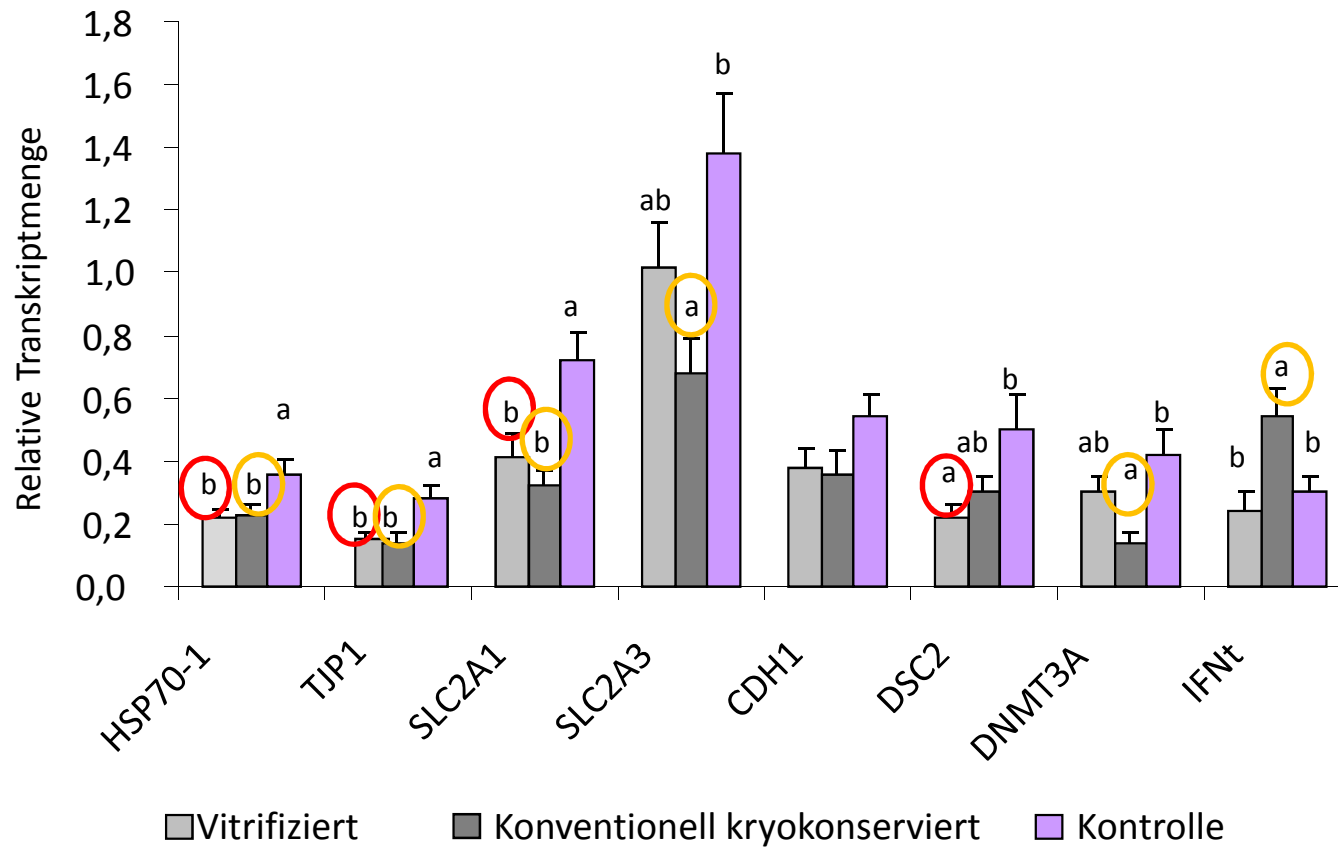


Zellzahlen nach Lebend-Tot-Färbung



Konventionelle Kryokonservierung vs. Vitrifikation - Beispiel Rind -

Relative Transkriptmenge entwicklungsrelevanter Gene



Einfluss der Kryoprotektiva bei der Vitrifikation -Beispiel Rind-

Expandierte Tag 8 Blastozysten



mit DMSO

V1: Vitrifiziert
KV1: Kontakt zum
Vitrifikationsmedium



V2: Vitrifiziert
KV2: Kontakt zum
Vitrifikationsmedium



Ohne DMSO

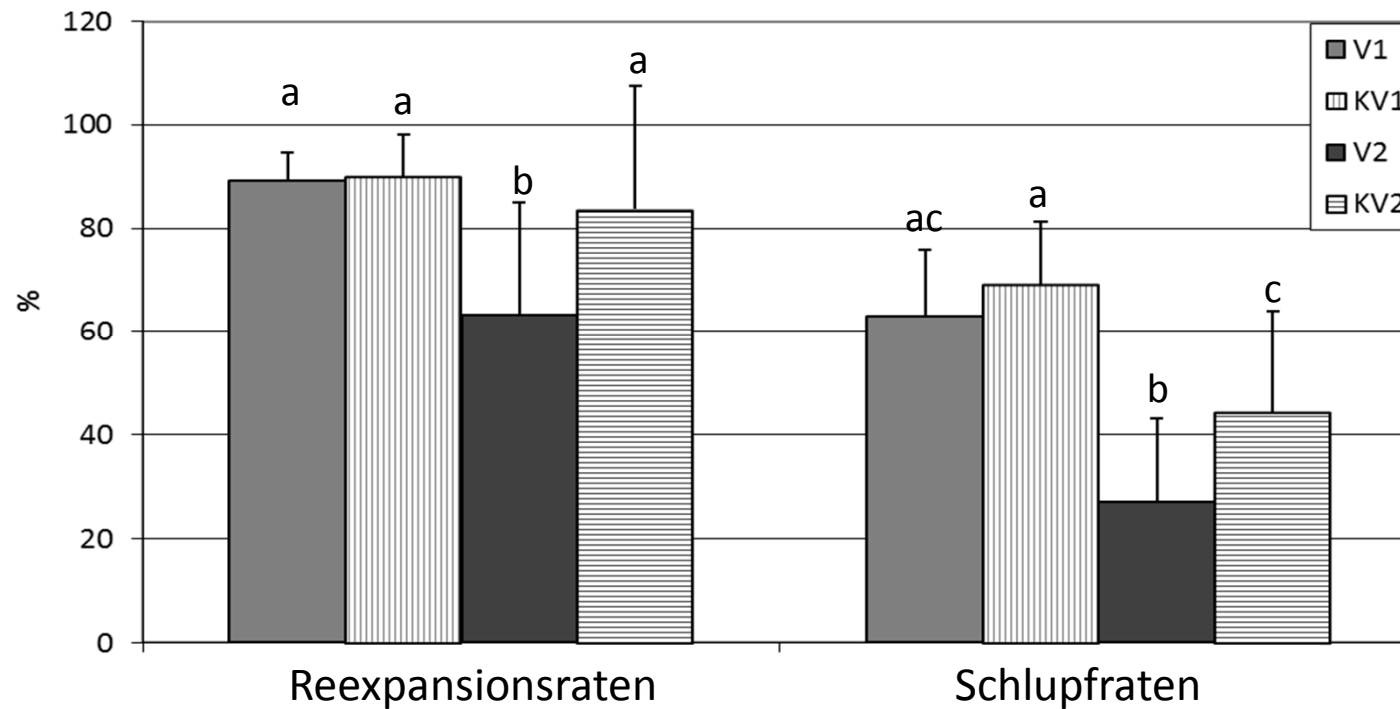


Kultur für 48 h
Reexpansionsraten nach 24h
Schlupfraten nach 48 h
Genexpression

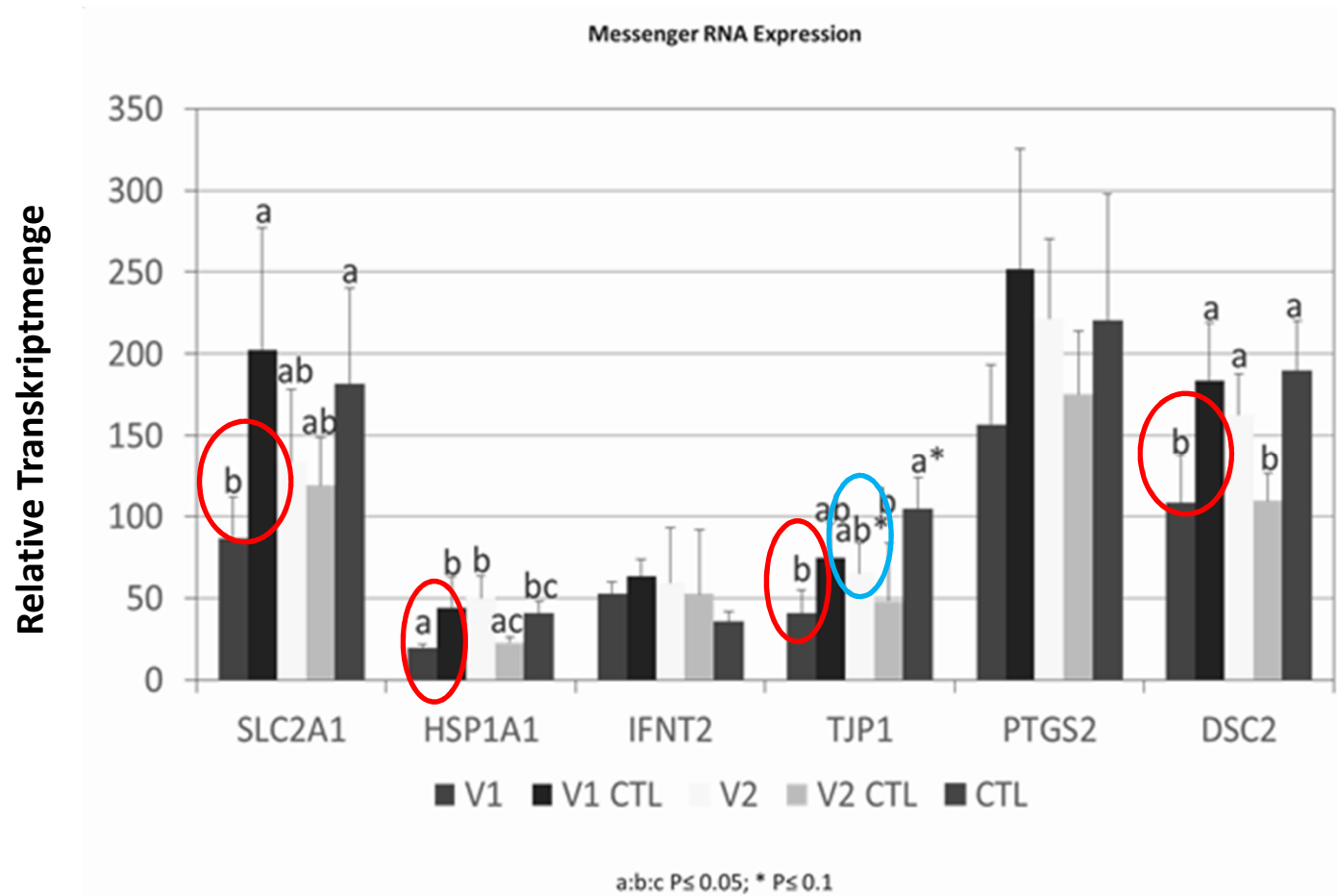


Einfluss der Kryoprotektiva bei der Vitrifikation -Beispiel Rind-

Reexpansions- und Schlupfraten

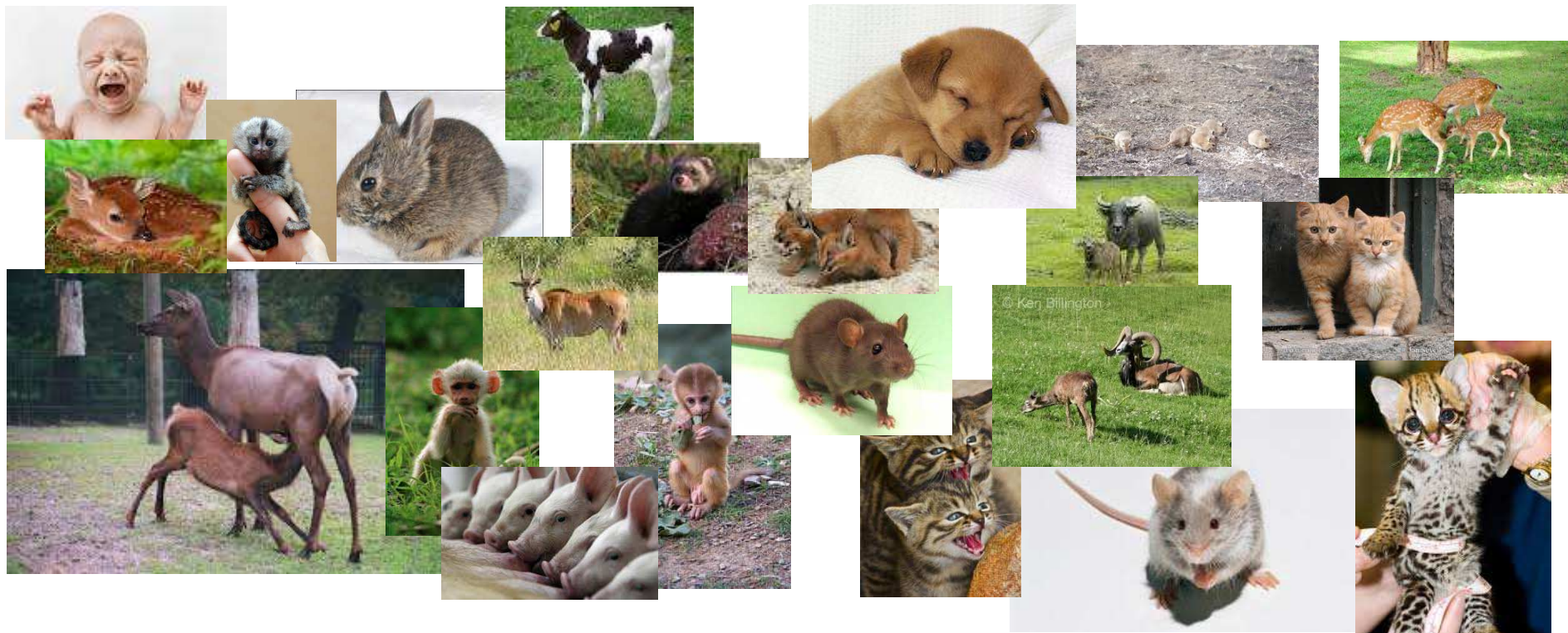


Einfluss der Kryoprotektiva bei der Vitrifikation -Beispiel Rind-



Entwicklungen -Kryokonservierung von Embryonen-

- Entwicklung direkter Transfersysteme für vitrifizierte Embryonen
- Weitere Optimierung der Kryokonservierungssysteme
- Voranschreiten der Gameten- und Embryonen-Kryokonservierung bedrohter Tierarten



Entwicklungen -Kryokonservierung von Eizellen-

Probleme

- Verhältnismäßig großes Volumen der Eizellen → Vermindertes Oberflächen-Volumen Verhältnis → höhere Anfälligkeit für intrazelluläre Eisbildung
- Hohe intrazytoplasmatische Lipidgehalte → Kältesensitivität wird ausgeprägter
- Höhere Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen

Lösungsansätze

- Vitrifikation scheint geeigneter als konventionelle Verfahren
- Kryokonservierung unreifer Eizellen/preantraler Follikel → Allerdings erlauben die heutigen Kultursysteme noch keine Vollendung der Reifung



Fragen?

