

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte im Rahmen des Embryotransfers beim Rind geprüft werden, ob sich durch den Einsatz des β -Blockers Carazolol (Suacron[®]) vor jeder künstlichen Besamung der Anteil transfertauglicher Embryonen steigern läßt. Dabei wurden für die Superovulationseinleitung Folltropin[®]-V (FSH) und PMSG/Anti-PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin/PMSG-Antikörper) verwendet. Ein Teil der gewonnenen Embryonen wurde für die Geschlechtsbestimmung biopsiert und teilweise für die Produktion monozygoter geschlechtsdeterminierter Zwillinge mit dem Mikromanipulator "Unimanus" geteilt. Bis zum Vorliegen des Ergebnisses der Geschlechtsbestimmung mit Hilfe der PCR-Methode, wurden die Embryonen entweder 24 Stunden kultiviert oder tiefgefroren.

Es wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

1. Zwischen der Superovulierung mit Folltropin[®]-V und PMSG/Anti-PMSG war kein signifikanter Unterschied erkennbar. Im Mittel wurden mit Folltropin[®]-V bzw. PMSG/Anti-PMSG $4,97 \pm 6,35$ bzw. $5,53 \pm 7,34$ transfertaugliche Embryonen, $2,30 \pm 3,46$ bzw. $2,47 \pm 3,06$ degenerierte Embryonen und $1,85 \pm 3,12$ bzw. $1,78 \pm 2,95$ unbefruchtete Eizellen gewonnen. Die Gesamtzahl gewonnener Embryonen und Eizellen betrug im Mittel $9,12 \pm 6,35$ bzw. $9,75 \pm 8,28$.
2. Bei Einsatz von 2,5mg Carazolol (=5ml Suacron[®]) zu jeder künstlichen Besamung war der Anteil transfertauglicher Embryonen signifikant höher ($68,4\% \pm 25,1\%$ gegenüber $55,8\% \pm 33,5\%$) und die Rate unbefruchteter Eizellen signifikant niedriger ($6,8\% \pm 12,3\%$ gegenüber $19,2\% \pm 28,7\%$) als ohne Verwendung von Carazolol. Eine Steigerung der Carazololdosis auf 5mg je Besamung brachte keine weitere Verbesserung der Spülergebnisse, sondern führte sogar zu signifikant mehr unbefruchteten Eizellen ($26,1\% \pm 34,7\%$) und weniger transfertauglichen Embryonen ($52,3\% \pm 34,8\%$) gegenüber der 2,5mg-Dosierung.
3. Die Superovulationsmethode hatte keinen Einfluß auf das Wirkungsmuster von Carazolol.
4. Nach Applikation von jeweils 2,5mg Carazolol (5ml Suacron[®]) waren bei 69,6% der Spülungen alle Eizellen befruchtet. Nach keiner Spülung wurden mehr als 40% bzw. mehr als 5 unbefruchtete Eizellen gefunden.

5. Konditioniertes MMM (Modifiziertes Ménézo-B2-Medium) und konditioniertes MPM (Modifiziertes Parker-Medium) eignen sich für die 24-stündige Kultivierung von biopsierten und von geteilten Rinderembryonen. Die Weiterentwicklungsraten betragen für biopsierte Embryonen der Klassen 1 und 2 ca. 90% und ca. 78% für Embryonen der Klasse 3. Die Weiterentwicklungsrate der Hälften aus Embryonen der Klasse 1 und 2 betrug ca. 81%. Embryonen der Klasse 3, denen ca. 20% der Zellmasse für die Geschlechtsbestimmung entnommen wurde, hatten eine Weiterentwicklungsrate von ca. 45%. Ein Unterschied zwischen den beiden Medien war nicht festzustellen.

6. Die Mikromanipulationsmethode hatte einen deutlichen Einfluß auf die Entwicklung von biopsierten Klasse 3 Embryonen. Während nach der Mikromanipulation (Biopsie) mit dem Leitz-Mikromanipulator und der Entnahme von bis zu 6 Zellen die Weiterentwicklungsrate ca. 78,1% betrug, betrug die Überlebensrate nach Abteilung von ca. 20% der Zellmasse mit dem Mikromanipulator "Unimanus" nur 45,5%.

7. Für den Versand der Zellproben zur Geschlechtsbestimmung mit der PCR eignete sich am besten das Antrocknen der Zellproben direkt im Eppendorf-Reaktionsgefäß. Der Frischversand der Zellen in PBS in feinen Pailletten war signifikant schlechter.

8. Die Trächtigkeitsrate für den Transfer biopsierter und 24 Stunden kultivierter Embryonen lag bei 58,3%. Die Rate für biopsierte, tiefgefrorene und im One-step-Verfahren übertragene Embryonen betrug 34,5%.

9. Für die Teilung von Embryonen der Klasse 1 und 2 ist der Mikromanipulator "Unimanus" gut geeignet. Nach dem paarweisen Transfer von zusammengehörenden Hälften betrug die Abkalberate 66,6% (12/18). Die Zwillingsrate betrug 17% (2/12).

10. Die Genauigkeit der Geschlechtsbestimmung mit der PCR betrug 87,5% bezüglich der getroffenen Voraussagen. Die Genauigkeit liegt damit mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zwischen 67% und 97%.

Lothar P. Richter: Experiments to increase the proportion of transferable embryos through the use of the β -blocker Carazolol and investigations for sex determination and splitting of bovine embryos.

Summary

In the attached paper should be examined whether the proportion of transferable embryos can be increased through the use of the β -Blocker Carazolol (Suacron[®]) before artificial insemination. In this process Folltropin[®]-V (FSH) and PMSG/AntiPMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin/PMSG-Antibodies) were used to initiate superovulation. A part of the embryos obtained were biopsied to determine their sex and some of them were divided with the micromanipulator "Unimanus" for the production of monozygotic twins of predetermined sex. Until the results of the sex determination, which were carried out using the PCR-method, were available, the embryos were either cultivated for 24 hours or frozen.

The following results were obtained:

1. No significant difference was discernable between the superovulation with Folltropin[®]-V and PMSG/AntiPMSG. On average 4.97 ± 6.35 and 5.53 ± 7.34 transferable embryos, 2.30 ± 3.46 and 2.47 ± 3.06 degenerated embryos and 1.85 ± 3.12 and 1.78 ± 2.95 unfertilized egg cells were obtained using Folltropin[®]-V and PMSG/AntiPMSG respectively. The average number of embryos and egg cells thus obtained was 9.12 ± 6.35 and 9.75 ± 8.28 respectively.
2. With the use of 2.5mg Carazolol (=5ml Suacron[®]) before each artificial insemination the share of transferable embryos was significantly higher ($68.4\% \pm 25.1$ compared to $55.8\% \pm 33.5$) and the proportion of unfertilized egg cells was significantly lower ($6.8\% \pm 12.3$ compared to $19.2\% \pm 28.7$) than without the use of Carazolol. An increase in the dose of Carazolol to 5mg per artificial insemination did not bring a further improvement in the flushing results but led to significantly more unfertilized egg cells ($26.1\% \pm 34.7\%$) and less transferable embryos ($52.3\% \pm 34.8$) than the 2.5mg dosage.
3. The method of superovulation had no influence on the effect of Carazolol.

4. After the application of 5ml Suacron[®] all the egg cells were fertilized in 69.6% of the flushings and after no flushing more than 40% or more than 5 unfertilized egg cells were found in the flushing medium.
5. Conditioned MMM (Modified Ménézo-B2-Medium) and conditioned MPM (Modified Parker Medium) are suitable for the 24-hour cultivation of biopsied and of divided cow embryos. The rate of further development was approximately 90% for the class 1 and 2 biopsied embryos and approximately 78% for the class 3 embryos. The rate of further development for the halves consisting of class 1 and 2 embryos was approximately 81%. Class 3 embryos from which approximately 20% of the cell mass was removed in order to determine sex had a rate of further development of about 45%. No difference could be ascertained between the two media.
6. The method of micromanipulation had a clear influence on the development of the biopsied class 3 embryos. The rate of further development was approximately 78.1% after micromanipulation with the Leitz-micromanipulator and the removal of up to 6 cells. It was only 45.5% after 20% of the cell mass had been split off using the micromanipulator "Unimanus".
7. Drying the cell samples directly in the Eppendorf-reaction-tubes proved to be the most suitable method of sending the cell samples for sex determination using the PCR. Sending the cells fresh in PBS in French straws was significantly worse.
8. The rate of conception for the transfer of biopsied and 24 hours cultivated embryos was 58.3%. The rate for biopsied frozen and one-step transferred embryos was 34.5%.
9. The micromanipulator "Unimanus" is well suited for the division of class 1 and 2 embryos. After matching halves were transferred in pairs the calving rate was 66.6%. The twinning rate was 17% (2/12).
10. 87.5% of the predictions made concerning sex determination using the PCR were accurate. The accuracy is therefore between 67% and 97% with a probability of error of 5%.