

5. Diskussion

5.1 Embryotransfer beim Europäischen Reh

Während der letzten Jahrzehnte nahm die Bedeutung des Embryotransfers sowohl bei domestizierten als auch bei nicht-domestizierten Tierspezies stetig zu. Er bietet zusätzliche Möglichkeiten für die moderne, kommerzielle Tierproduktion und ist wertvolles Hilfsmittel und neue Strategie bei der Vermehrung seltener, vom Aussterben bedrohter Tierarten (PITRA et al., 1991).

Die limitierte Übertragbarkeit hormoneller und technischer Regime von landwirtschaftlichen Nutztieren wie Rind, Schaf und Ziege (NIEMANN und MEINECKE, 1993; GÖRLACH, 1997) auf Wildtiere macht den Erfolg eines Embryotransferprogramms bei einer neuen Spezies jedoch unvorhersehbar (WILDT et al., 1986; LOSKUTOFF et al., 1995). Beschränkte sich der Einsatz des Embryotransfers in der Familie der *Cervidae* bislang auf die Vertreter Rothirsch (*Cervus elaphus*), Damhirsch (*Dama dama*), Père-Davids-Hirsch (*Elaphurus davidianus*) und Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) (KRZYWINSKI, 1987; MAGYAR et al., 1988; BRINGANS, 1989; WALDHALM et al., 1989; WENKOFF und BRINGANS, 1991; DIXON et al., 1991; JABBOUR et al., 1993; AGRO et al., 1994; FENNESSY et al., 1994; McMILLAN und HALL, 1994; MORROW et al., 1994; BERG et al., 1995), erfolgte in der vorliegenden Studie erstmalig der Einsatz des Embryotransfers beim Europäischen Reh (*Capreolus capreolus*).

Anders als bei Rothirsch und Damtier (kommerzielle Erzeugung von Wildbret), wurde der ET beim Reh wie bei Père-Davids-Hirsch und Weißwedelhirsch (Modelltiere für bedrohte *Cervidae*) in der Grundlagenforschung eingesetzt, um (i) die embryonale Diapause näher zu charakterisieren und um (ii) neue Techniken der assistierten Reproduktion bei Wildtieren zu entwickeln und zu etablieren.

5.1.1 Hormonelle Zyklussynchronisation und Östruserkennung

Der Einsatz standardisierter, für den Einsatz bei Nutztieren entwickelter Hormonregime ermöglichte in der erstmaligen Anwendung am Europäischen Reh die definierte Synchronisation der Zyklen verschiedener weiblicher Tiere.

Intravaginale Gestagen-Schwämmchen, wie sie ursprünglich für die Anwendung beim Schaf, einer von den anatomischen Gegebenheiten und Größenverhältnissen mit dem Reh vergleichbaren Tierart, konzipiert wurden, kamen für die Zyklussynchronisation der Spendertiere zur Anwendung. Intravaginale Gestagen-Spiralen, wie sie bei den größeren domestizierten Wiederkäuern oder bei Rothirsch und Damtier eingesetzt werden (ASHER

et al. 1991; FENESSY et al., 1990; JABBOUR et al. 1992), schieden aufgrund ihrer Größe und der daran gekoppelten Hormondosierung für das Reh von vorneherein aus. Analog zu Ziege und Schaf, bei denen der Behandlungsbeginn kurz vor Einsetzen des natürlichen Brunstgeschehens empfohlen wird (NIEMANN und MEINECKE, 1993), erfolgte das Setzen der Hormonschwämmchen auch beim Reh kurz vor Beendigung des Anöstrus und des Wiedereinsetzens des Follikelwachstums. Liegt dieser Zeitpunkt bei Schaf und Ziege als saisonal polyzyklischen Tierarten ohne embryonale Diapause natürlicherweise im Herbst (Monate September/Okttober; abnehmende Tageslichtlängen), so fällt er beim Europäischen Reh (saisonal monoestrisch) in den Sommer (Monate Juni/Juli) eines jeden Jahres. Die Applikation der Gestagen-Schwämmchen zu Beginn der natürlichen Brunst, d. h. kurz vor Einsetzen der Follikelanbildung, führte wie für die kleinen Haus-Wiederkäuer beschrieben zur synchronen Anbildung von Follikeln im Schutze einer künstlich herbeigeführten Lutealphase.

Eine objektive Verifizierung der Wirkung der intravaginal applizierten Gestagene auf die Ovardynamik der Rehe erfolgte durch den Einsatz der transrektalen Sonographie, welche sich sowohl für die *in vivo* Darstellung der Funktionskörper des Rehovars als auch der anderer Wildtierarten als geeignet erwiesen hat (GÖRITZ et al., 1994 a, b; THIELEBEIN et al., 1994; HILDEBRANDT et al., 1995; GÖRITZ, 1996; HILDEBRANDT et al., 1996 a, b, c; HERMES, 1998).

Anders als bei Haustieren wie Ziege, Schaf oder Rind, ist die alleinige Verhaltensbeobachtung von Rehen zur Brunsterkennung nicht ausreichend. Mit der Brunst oftmals assoziierte Verhaltensweisen wie häufiger Harnabsatz der weiblichen Tiere, olfaktorische Kontrolle und Treiben durch das männliche Tier, wie sie für das Reh und andere Ungulaten beschrieben sind, traten zum erwarteten Ovulationszeitpunkt bei mehreren, aber nicht bei allen Tieren auf und waren aufgrund stark differierender Intensitäten bei einzelnen Individuen nicht genau zu beurteilen. Deckakte, die ein sicherer Hinweis auf das Einsetzen des Östrus bei den weiblichen Tieren sind, konnten nach Entfernen der Schwämmchen in einem Beobachtungszeitraum von einer Woche (bis zum berechneten Zyklustag + 4) nur bei 8 von 14 Donoren (57 %) beobachtet werden. Vergleicht man die Zeitpunkte, zu denen die Deckakte bei diesen Tieren stattgefunden haben, so fällt auf, daß bei 2 Tieren Deckakte ausschließlich am Tag, bzw. kurz nach der Entfernung der Hormonschwämmchen beobachtet wurden. Da bei diesen Tieren später keine Embryonen aufgefunden werden konnten, sind diese Deckakte möglicherweise eher als Nacheffekt der Narkose und nicht als Zeichen eines bereits vorhandenen Oestrus zu

werten. Auf der anderen Seite konnten bei 2 Tieren keinerlei Deckakte beobachtet werden, obwohl bei ihnen zum Zeitpunkt der Spülung Embryonen gefunden wurden. Bei diesen Tieren ist nicht auszuschließen, daß die Ovulation zu einem späteren Zeitpunkt (außerhalb des Beobachtungszeitraumes) als bei den anderen Tieren erfolgte, d.h. zwischen berechnetem Zyklustag + 4 und + 7 (Tag der Spülung).

Für ein Embryotransferprogramm beim Reh bedeutet dies, daß sich trotz Einsatz hormoneller Verfahren zur Synchronisation der Ovulationszeitpunkt nicht exakt auf die Stunde vorhersagen läßt. Dieser Schluß deckt sich mit Literaturangaben für verschiedene andere nicht-domestizierte Huftierspezies, bei denen trotz Hormonregimen und nachgewiesener ovulatorischer Ovarreaktion der genaue Ovulationszeitpunkt nicht genau zu bestimmen war (WILDT et al., 1992; LOSKUTOFF et al., 1995).

Die Hypothese, daß es zur Strategie vieler nicht-domestizierter Huftierspezies gehört, Deckakte nur in einem sehr engen Zeitfenster stattfinden zu lassen, um eine erhöhte Gefahr durch Beutegreifer zu umgehen (LOSKUTOFF et al. 1995), konnte in dieser Untersuchung für das Reh nicht bestätigt werden, da die Duldung des Bockes durch ein und dieselbe Ricke auch im Laufe vieler Stunden oder sogar einiger Tage beobachtet werden konnte.

Außer durch Gestagenbehandlung zur künstlichen Verlängerung der Lutealphase ist bei den meisten Säugetieren bei Anwesenheit eines Corpus luteum, darunter Schaf, Ziege und Cervidae, die Zyklussynchronisation auch durch Einsatz von Prostaglandinen zur Luteolyse möglich (ASHER et al., 1991; NIEMANN und MEINECKE, 1993). Auch beim Reh ist es möglich, im Zeitraum von Oktober bis März durch Applikation des $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogons Cloprostenol bestehende Corpora lutea zur Regression zu bringen und eine erneute Ovulation mit Anbildung neuer Gelbkörper zu induzieren (SEMPÉRÉ et al., 1992). Die von Sempéré im Blutserum der Tiere gemessenen Progesteron-Werte zeigten nach Applikation des Prostaglandins einen Abfall auf 25 % der ursprünglichen Werte (von durchschnittlich 2 ng/ml auf ca. 0,5 ng/ml).

In der vorliegenden Arbeit fand bei 6 von 8 Rehen, die als Embryonenrezipienten dienten (Gruppe V und VI), die Synchronisation durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ Anwendung. Die bei mehreren Wildtierarten bereits erfolgreich angewendete nicht-invasive Methode der Bestimmung des Progesterongehaltes in täglich gesammelten Kotproben (MEYER, 1989; LASLEY und KIRKPATRICK, 1991; GOERITZ et al., 1997; SCHWARZENBERGER et al., 1998) brachte auch beim Reh, gemessen an den 4 Tieren der Gruppe VI, Aufschluß über die unter dieser Behandlung an den Ovarien der Tiere ablaufenden Umbauvorgänge.

Nach der Injektion des Prostaglandins fielen die mittleren Progesteron-Werte der Tiere in

den Faeces innerhalb von 2 Tagen auf etwa 26 % ab, d. h. von durchschnittlich 170 ng/g auf 45 ng/g (Abb. 19). Am Tage des Embryotransfers, d.h. 9 Tage nach der Luteolyse, erreichten die Progesteronwerte in den Faeces mit durchschnittlich 145 ng/g in etwa die Höhe ihrer Ausgangswerte. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse Sempérés, daß eine Zyklusinduktion durch Luteolyse auch beim normalerweise monoestrischen Reh möglich ist. Bei den 4 untersuchten Empfängertieren konnte der Erfolg der Luteolyse durch abfallende Progesteronwerte bestätigt werden. Das Stattfinden einer erneuten Ovulation und die Anbildung neuer Corpora lutea wurde sowohl durch den erneuten Anstieg der Progesteron-Werte zurück auf den Ausgangslevel als auch durch das makroskopische Bild der Ovarien am Tage des Embryotransfers bestätigt.

5.1.2 Hormonelle Superovulation

Ziel einer hormonellen Superovulation ist es, die Zahl der angebildeten und zur Ovulation kommenden Follikel innerhalb eines Zyklus und damit die Zahl gewinnbarer Embryonen zu erhöhen. Von den beiden zum Auslösen multipler Ovulationen in Frage kommenden exogenen Gonadotropinen FSH und PMSG kam in der vorliegenden Studie ausschließlich PMSG zur Anwendung. Der große Vorteil, den die Verwendung von PMSG bietet, liegt in der einmaligen Applikation des Präparates, welche zum Auslösen einer Superovulation ausreichend ist, im Gegensatz zum mehrmals täglich zu verabreichenden und daher mit wiederholten Behandlungen verbundenen FSH. Durch den Einsatz von PMSG wurde versucht, den Streß für die Tiere durch das Handling, eine der Ursachen für das Mißlingen von Superovulationsregimen (SCHIEWE et al., 1991), so niedrig wie möglich zu halten.

Darüber hinaus kann die Ovarreaktion nach Gonadotropinapplikation je nach Tierart und Art des verwendeten Hormons unterschiedlich ausfallen. Dies gilt sowohl für domestizierte als im noch stärkeren Maße auch für nicht-domestizierte Tierarten (SCHIEWE, 1989; POPE und LOSKUTOFF, 1999). Dies liegt meist daran, daß die verwendeten Gonadotropine nicht homolog sind. Obwohl der Mechanismus der Steuerung des Follikelwachstums durch FSH im Säugetierbereich recht konservativ ausgebildet zu sein scheint, gibt es doch tierartspezifische Unterschiede in der Struktur und Wirkung von FSH. Der Isolierung bzw. Herstellung und Verwendung tierartspezifischer Gonadotropine wird daher immer größere Aufmerksamkeit geschenkt (z.B. bei Großkatzen).

NIEMANN und MEINECKE (1993) benennen sowohl FSH als auch PMSG als heute gebräuchliche Superovulationsregime beim Hausrind mit leichter Tendenz zu besseren Ergebnissen bei Verwendung von FSH, eine Auffassung, die von mehreren Autoren

bestätigt wird (BUSCH et al., 1991; MÜNNICH und BUSCH, 1992).

Auch bei Ziege und Schaf sind nach NIEMANN und MEINECKE (1993) beide Hormone prinzipiell zur Einleitung der Superovulation möglich, allerdings betonen sie die größere Variabilität der Ovarreaktion bei PMSG im Vergleich zu FSH. Für beide Hormonregime erwähnen sie vor allem bei guten Reagenten das Ausbleiben der Fertilisierung ovulierter Eizellen.

Vergleichende Studien über die Anwendung von PMSG bzw. FSH bei Cerviden (vor allem Rothirsch und Damhirsch) weisen bei dieser Familie auch auf einige negative Aspekte beim Einsatz von PMSG hin. Für den Einsatz von PMSG beim Rothirsch beschreiben ASHER et al. (1991) das Auftreten einer erhöhten ovariellen Sekretion von Östrogenen, welches sowohl das Milieu von Uterus und Eileiter negativ beeinflusst, als auch in einer hohen Zahl nicht-ovulierter Follikel resultieren kann. Applikation von PMSG-Antikörpern zu dessen Neutralisation und Injektion von GnRH zum Auslösen der Ovulation sind beim Rothirsch in der Lage, diese negativen Effekte zu umgehen (ASHER et al., 1991; BAINBRIDGE et al., 1995).

Der Einsatz von PMSG beim Damhirsch ist nach ASHER et al. (1991) aufgrund extrem hoher Sensitivität der Ovarien dieser Tiere auf das Hormon (extreme Variabilität der Ovarreaktionen; Überstimulation; ovarielle Zysten; schlechte Konzeptionsraten) kontraindiziert, eine Aussage, deren Zutreffen von anderen Autoren sogar auf alle Vertreter der Familie Cervidae erweitert wird. WENKOFF und BRINGANS (1991) empfehlen zur Einleitung der Superovulation bei Cerviden den ausschließlichen Einsatz von FSH mit Hilfe osmotischer Pumpen, um das Problem des Handling-Stresses durch multiple Injektionen zu umgehen.

Da bei verschiedenen Individuen ein alleiniger Einsatz von FSH keine Superovulation auszulösen vermag, weisen THOMPSON und ASHER (1988) auf die Möglichkeit der kombinierten Gabe von PMSG und FSH bei diesen Tieren hin.

In der vorliegenden Arbeit wurden Rehe erstmals einem Superovulationsregime unterzogen. Die Ergebnisse geben erste Hinweise auf die Einsatzfähigkeit von PMSG zur Superovulation von Rehen, da die Zahl der angebildeten Gelbkörper bei den synchronisierten und superovulierten Tieren signifikant höher ist als bei unbehandelten Tieren ($p=0,002$). Auffallend sind jedoch die hohe Variationsbreite der Ovulationsraten (Anzahl angebildeter Follikel in Relation zur Zahl der Gelbkörper) der stimulierten Rehe. Sie variierten im Versuch zwischen 27 und 150 %. Diese Variationsbreite ist möglicherweise ein erster Hinweis auf eine auch beim Reh bestehende, für Damhirsch und

zum Teil auch Rothirsch bereits beschriebene extreme Empfindlichkeit der Ovarien gegenüber PMSG. Ovulationsraten über 100%, wie sie bei 2 Tieren gefunden wurden, weisen zudem auf einen Nachhalleffekt des Hormons hin, der zur weiteren Follikelanbildung und deren Ovulation nach Entfernen der Gestagen-Schwämmchen führte, und der weder durch Applikation von Anti-PMSG noch hCG beeinflussbar war.

Die ermittelte Korrelation ($r=0,84$) zwischen Gelbkörperzahl und Progesterongehalt der Faeces stimmt mit den Ergebnissen von KELLY et al. (1982) und ASHER et al. (1992) überein und weist, wie durch HOFFMANN et al. (1978) beschrieben, das Corpus luteum als Hauptproduktionsstätte von Progesteron während des Zeitraumes der frühen Trächtigkeit aus.

Die Ergebnisse der Superovulation durch PMSG beim Reh sind laut Literatur vergleichbar mit denen bei Rothirsch und Damhirsch (ASHER et al., 1991), wobei die Zahl der gezählten Gelbkörper beim Damtier durchschnittlich leicht höher liegt als beim Reh. Das von ASHER et al. (1991) beschriebene Auftreten ovarieller Zysten in großer Zahl kann allerdings für das Reh weder durch das makroskopische noch das sonographische Bild der Ovarien bestätigt werden.

Obwohl von größerer technischer Unsicherheit für die Bewertung des Superovulationsregimes und daher alleine nicht geeignet, den Erfolg eines Hormonregimes zu überprüfen, bestätigt auch die Zahl der aufgefundenen Ovarprodukte die Ergebnisse der Gelbkörperzählung. Ebenfalls die Zahl der gewonnenen Ovarprodukte war bei den superovulierten Tieren signifikant höher als bei den nicht-behandelten Rehen (vergl. Seite 62). Auch bei wiederholter Anwendung (mehrere Zyklen) konnte eine gute Ovarreaktion ohne pathologische Veränderungen induziert werden.

PMSG scheint daher grundsätzlich zur Superovulation von Rehen geeignet.

5.1.3 Embryonengewinnung

Von den verschiedenen Methoden zur Gewinnung von Embryonen (Tötung oder Schlachtung von Donoren, chirurgische Embryonenspülung und nicht-chirurgische Spülung) ist die nicht-chirurgische Uterusspülung der Spendertiere als nicht-invasives, tierschonendes und vor allem am selben Tier wiederholbares Verfahren zu bevorzugen.

Beim Rind, als landwirtschaftlichem Nutztier, erfolgt die Gewinnung der Embryonen daher heute fast ausschließlich auf unblutigem Wege (NIEMANN und MEINECKE, 1993). Es sind vor allem die anatomischen Verhältnisse (besonders die Tiergröße), die es bei dieser Tierart ermöglichen, manuell unter rektaler Kontrolle einen Ballonkatheter durch

die Cervix in die Hörner der Gebärmutter einzuführen und die Embryonen auf diesem Wege herauszuspülen. Auch bei einigen Wildtierarten (darunter einige *Bovidae*, *Camelidae*, größere Antilopenarten) ist dieses Verfahren der Embryonengewinnung praktisch anwendbar. Wieder sind es Größe und Anatomie des weiblichen Genitaltraktes, die über die Anwendbarkeit entscheiden (POPE und LOSKUTOFF, 1999). Entsprechend gelingt es bei kleineren Tierarten weniger häufig, mittels unblutiger Methoden Embryonen zu gewinnen. So ist es z. B. möglich, bei Ziegen mittels geeigneter Katheter die Cervix zu passieren und Embryonen aus dem Uterus zu spülen, während man bei Schafen, einer Tierart vergleichbarer Größe, mit den gleichen Mitteln aufgrund des komplizierteren Aufbaus der Cervix auf große Schwierigkeiten stößt (NIEMANN und MEINECKE, 1993). Das Verfahren der Wahl bei dieser Tierart stellt daher nach wie vor die laparoskopische Gewinnung von Embryonen dar.

Bei den Vertretern der Familie *Cervidae* war es bislang lediglich bei Wapiti und Weißwedelhirsch möglich, nach Sedation oder Narkose Embryonen auf nicht-chirurgischem Wege zu gewinnen (MAGYAR et al, 1988; WENKOFF und BRINGANS, 1991; GRIFFITHS, 1993).

Obwohl es in der vorliegenden Studie bei 3 Rehen möglich war, analog zum bereits beschriebenen Verfahren der künstlichen Besamung beim Europäischen Reh (GÖRITZ et al., 1996), den meanderförmig verlaufenden *Canalis centralis cervicis* mittels Katheter zu durchdringen, die Katheterspitze in der Gebärmutter zu plazieren und Spülflüssigkeit in die Uterushörner zu verbringen, konnten auf unblutigem Wege keine Embryonen oder andere Ovarprodukte gewonnen werden. Der Grund hierfür ist in 2 der 3 Fälle vor allem in den nicht zufriedenstellenden Rückgewinnungsraten der Spülflüssigkeit und im zu niedrigen Spülsog, verursacht durch das sehr geringe Lumen des eingesetzten Katheters, zu suchen. Bei beiden Tieren konnten in der anschließend durchgeführten chirurgischen Uterusspülung mehrere Embryonen aufgefunden werden. Obwohl beim dritten Tier 70% der Spülflüssigkeit rückgewonnen werden konnte, konnten auch hier keine Embryonen oder Oocyten gefunden werden. Da bei dem Tier sonographisch nur ein Gelbkörper zu erkennen war, wurde hier jedoch auf eine zusätzliche chirurgische Spülung verzichtet.

Aufgrund der anatomischen Verhältnisse des Genitaltraktes des Rehs war es nicht möglich, mit Kathetern größeren Lumens die enge Cervix zu passieren, so daß eine zufriedenstellende nicht-chirurgische Spülung von Embryonen bei dieser Tierart zur Zeit noch nicht möglich ist.

Insgesamt wurden innerhalb der drei Versuchsjahre 21 Rehe auf chirurgischem Wege

gespült. Die Auffindungsraten der Embryonen (gemessen an der Zahl der Gelbkörper) variierten dabei zwischen 0% und 100%. Im Durchschnitt lagen sie bei 41%, was mit den für Rothirsch (65%) und Damhirsch (30% bis 50%) beschriebenen Raten vergleichbar ist (FENNESSY et al., 1994). Diese Werte liegen jedoch deutlich niedriger als die für Ziege und Schaf beschriebenen durchschnittlichen Auffindungsraten (75%) nach chirurgischer Embryonengewinnung (NIEMANN und MEINECKE, 1993).

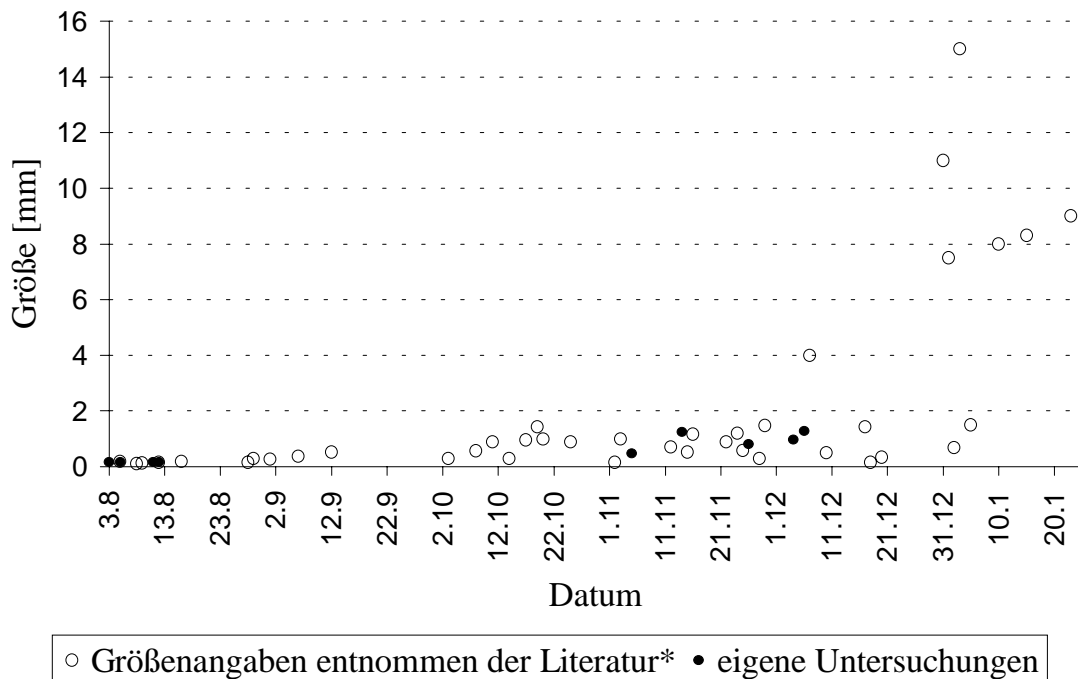
Lediglich bei 6 der 21 Tiere konnten bei vorhandener, jedoch geringer Zahl an Gelbkörpern (durchschnittlich 2,5) keine Ovarprodukte gewonnen werden.

5.2 Frühe Embryonalentwicklung beim Europäischen Reh

Die genaue Kenntnis des zeitlichen Ablaufs der frühen Embryonalentwicklung ist Voraussetzung für das Gelingen eines Embryotransfers. Zur Durchführung einer terminorientierten Spülung von Spendertieren nach einem Hormonregime, um Embryonen eines exakt definierten Entwicklungsstandes (angestrebtes Ziel ist in der Regel die Gewinnung von Morula- und frühen Blastozystenstadien) zu erhalten, benötigt man vor allem Wissen über die Zeitspanne, die von der Befruchtung der ovulierten Eizelle bis zum Erreichen eines transferfähigen Embryonalstadiums vergeht und welcher Weg dabei vom Embryo zurückgelegt wurde (Eileiterpassage). Dieser tierartspezifische Zeitraum ist für viele landwirtschaftliche Nutztiere, darunter Rind, Schaf und Ziege, bekannt. So können die bei der Spülung erwünschten Stadien (in der Regel Morulae und ungeschlüpfte Blastozysten) beim Rind an den Tagen 5 bis 8, bei Schaf und Ziege an den Tagen 4 bis 6 im Uterus gefunden werden. Der Übertritt der Embryonen aus dem Eileiter in die Gebärmutter findet bei diesen Tierarten jeweils im 8- bis 16-Zell-Stadium statt (NIEMANN und MEINECKE, 1997; KAUFFOLD und THAMM, 1985; BUSCH et al., 1991).

Beim Europäischen Reh gibt es keine Kenntnisse über die frühe Embryonalentwicklung. Lediglich die Größenverhältnisse der geschlüpfen Rehblastozysten während der Diapause und die Wiederaufnahme des Wachstums am Ende der Diapause waren bislang Gegenstand von Untersuchungen. Abbildung 22 gibt einen Überblick über die darüber der Literatur entnehmbaren Maße sowie die Einordnung der eigenen Ergebnisse der Vermessung von Embryonen in den Monaten August (Embryotransferprogramm) und November/Dezember (postmortale Untersuchungen).

Abb. 22 : Embryonales Wachstum während der Diapause des Rehs



(* BISCHOFF, 1854; KEIBEL, 1902; STIEVE, 1950; SHORT und HAY, 1966; AITKEN et al., 1973; AITKEN, 1974; LENGWINAT und MEYER, 1996; LAMBERT et al., 1999)

Literaturangaben und eigene Untersuchungen zeigen eine kontinuierlich ansteigende Kurve des embryonalen Wachstums und stimmen darin überein, daß die embryonale Diapause beim Reh keinen absoluten Stillstand des Wachstums darstellt und daß etwa ab Mitte Dezember die Wachstumsgeschwindigkeit der Embryonen wieder vergleichbar mit der anderer Tierarten ohne Diapause ist.

Es finden sich in der Literatur keine oder nur sehr lückenhafte Angaben über den für die Durchführung eines Embryotransfer-Programms wichtigen Zeitpunkt, zu dem die Rehembrionen aus dem Eileiter heraus in den Uterus übergehen und zu dem die Blastozysten aus ihrer Zona pellucida schlüpfen und in die Diapause eintreten.

Das in der vorliegenden Arbeit angewendete Embryotransfer-Programm orientierte sich daher zu Beginn in seinem gesamten Ablauf an den für landwirtschaftliche Nutztiere bekannten Daten, d.h. analog zum Vorgehen beim Rind wurde die Spülung der Embryonen terminorientiert am berechneten Tag 7 nach der Ovulation durchgeführt. Die Embryonen, die in den ersten beiden Jahren des Versuchs (1997 und 1998; Tiergruppen II und III) gewonnen wurden, zeigen ein sehr heterogenes Muster bezüglich der Entwicklungsstadien. Obwohl sämtliche Embryonen im Uterus aufgefunden wurden, reichte die Variationsbreite

der gefundenen Embryonalstadien vom 2-Zeller über 4-, 8- und 16-Zeller bis hin zur Morula und noch nicht im Schlupf befindlichen Blastozysten, d.h. sämtliche Embryonen hatten ihre Zona pellucida noch nicht verlassen. Dazu kamen 6 Ovarprodukte, die nicht eindeutig als Oocyte oder Embryo identifiziert werden konnten, da sie weder Zeichen von Degeneration noch von Zellteilungen aufwiesen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den für das Rind zu erwartenden Embryonalstadien für diesen Tag, so entsprechen am Tag 7 nur Morulae und Blastozysten bzw. am Tag 9 nur Blastozysten dem Bild von Embryonen mit einer zeitplangerechten Entwicklung. Alle anderen Embryonen sind nach dem Schema für das Rind als retardiert zu identifizieren (KAUFFOLD und THAMM, 1985; BUSCH et al., 1991). Eine verlangsamte Entwicklung kommt in der abschließenden Zustandsbeurteilung und Klassifizierung der Embryonen negativ zum Tragen, vor allem wenn zur Retardierung der Entwicklung zusätzliche morphologische Defekte hinzukommen. Auffällig ist jedoch, daß es bei einem Großteil der in einem sehr frühen Zustand der Entwicklung befindlichen Rehembryonen keinerlei äußerlich erkennbare morphologische Abweichungen oder Degenerationserscheinungen gab. Nach KAUFFOLD und THAMM (1985) ist das Auftauchen früher, retardierter Embryonen, zum Teil gleichzeitig mit normal entwickelten Stadien, bei Rindern, die einem Superovulationsregime unterzogen wurden bei ca. 20 – 30 % der Kühe bzw. Färsen anzutreffen; es wird davon ausgegangen, daß „eine Superovulationsbehandlung das Zeitplangefüge der Fortpflanzungsvorgänge stören kann“ und daß „selbst bei starker Abweichung vom Erwartungswert nicht ausgeschlossen ist, daß der untersuchte Embryo entwicklungsfähig ist“.

Eine weitere mögliche Erklärung für das Vorhandensein embryonaler Entwicklungsstadien in ungewöhnlich großer Variationsbreite am gleichen Tag der Spülung in ein und demselben Tier ist ein durch die Hormonbehandlung hervorgerufener, beschleunigter Transport der Oocyten bzw. Embryonen durch den Eileiter (SUMMERS, 1986; LOSKUTOFF et al., 1995). DONALDSON (1986) ist der Ansicht, daß das Auftreten unterschiedlich weit entwickelter Embryonen durch die mehr oder weniger große Zeitspanne, während der die Ovulation bzw. Fertilisation der Oocyten bei superovulierten Tieren stattfindet, begründet ist.

Auch für einige Wildtierarten, darunter auch Vertreter der Familie *Cervidae* (Rothirsch, Damhirsch), wird das Auftauchen sehr unterschiedlich weit entwickelter Embryonen nach Superovulation beschrieben (FENESEY et al., 1994; JABBOUR et al., 1993; FENESEY et

al., 1990). Es werden jedoch keinerlei Aussagen über Deckzeitpunkte der Spendertiere und/oder Entwicklungskompetenz der Embryonen getroffen.

Die eigenen Beobachtungen beim Reh ergaben, daß die sich im Östrus befindlichen weiblichen Tiere durchaus an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen gedeckt werden können. Diese Beobachtungen stimmen mit der Aussage von STUBBE (1997) überein, der die Zeitspanne der Brunst bei den Ricken mit 3 bis 4 Tagen angibt. Es ist daher nicht auszuschließen, daß dies den Grund für das Auffinden früher neben weiter entwickelten Embryonalstadien darstellt.

Um zu überprüfen, ob die erstmals beim Reh durchgeführten Synchronisations- und Superovulationsregime auch bei dieser Wildtierart einen Einfluß auf die frühe Embryonalentwicklung nehmen oder nicht, wurden im dritten Jahr des Versuches ausschließlich Tiere gespült, die keiner der beiden Behandlungen unterzogen wurden (Gruppe I). Das Spülergebnis zeigte, daß nur bei einem der 5 Tiere dieser Gruppe Embryonen zweier verschiedener Stadien aufgefunden werden konnten (8- und 16-Zeller, Tab. 14).

Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß sich auch beim Reh eine hormonelle Behandlung auf die weiteren Entwicklung der befruchteten Eizellen auswirkt.

Ohne hormonelle Behandlung zur Östrussynchronisation ist es nicht möglich, bei den Tieren der Gruppe I eine Aussage über die Deckzeitpunkte, bzw. über die Zeitspanne zwischen Befruchtung der ovulierten Eizellen und dem Tag der Spülung, zu treffen. Die unterschiedlichen Embryonalstadien, die bei den Tieren gefunden wurden (vom 2-Zeller bis hin zur Morula) liegen daher im zu erwartenden Rahmen. Auffällig ist jedoch, daß wie vorher bei den hormonell behandelten Tieren der Gruppen II und III sämtliche Embryonen in den Uterushörnern lokalisiert waren, d.h. auch die Stadien, die sich gemäß der Erfahrungswerte für andere Tierarten noch in den Eileitern hätten befinden müssen. Da bei den Tieren der Gruppe I ein durch SUMMERS (1986) und LOSKUTOFF et al. (1995) beschriebener, durch Hormonregime ausgelöster beschleunigter Transport der Ovarprodukte durch den Eileiter ausgeschlossen werden kann, ist zu vermuten, daß das Vorkommen früher Embryonalstadien wie 2-, 4-, 8- und 16-Zeller im Uterus beim Europäischen Reh einen physiologischen Zustand darstellt - ein Zustand, der entweder durch einen sehr schnellen Transport der befruchteten Eizelle durch den Eileiter oder durch eine gegenüber anderen Tierarten langsamere Teilungsrate der Zygote erreicht werden kann. Eine Wildtierart, für die *beide* Phänomene beschrieben wurden (schneller Transport verbunden mit langsamer Teilungsrate) ist das Tamar Wallaby, welches genau wie das

Reh die reproduktionsbiologische Besonderheit einer embryonalen Diapause aufweist (RENFREE und LEWIS, 1996).

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß das Einsetzen einer verzögerten embryonalen Entwicklung beim Reh sofort nach der Konzeption erfolgt, und nicht, wie bisher angenommen, erst nach dem Schlupf der Blastozyste.

Auch in früheren Studien über das Reh wird von mehreren Autoren das Auftauchen früher embryonaler Entwicklungsstadien im Uterus beschrieben (BISCHOFF, 1854; KEIBEL, 1902; STIEVE, 1950), ohne daß auf diese Tatsache jedoch besonderes Augenmerk gerichtet wurde. STIEVE (1950) gibt an, sogar im Zeitraum September / Dezember Embryonen in ihrer Zona pellucida aufgefunden zu haben, was er als Beweis für die von ihm postulierte Herbstbrunft des Rehs anführt. Für eine solche Brunft konnten in den eigenen Untersuchungen keinerlei Hinweise gefunden werden, da sämtliche Embryonen, die im fraglichen Zeitraum in postmortalen Untersuchungen gewonnen wurden, als geschlüpfte Blastozysten entsprechender Größe vorlagen.

Zur endgültigen Zustandsbeurteilung retardiert erscheinender Embryonen empfehlen KAUFFOLD und THAMM (1985) die Kultivierung *in vitro*, um festzustellen, ob bei diesen Embryonen eine Entwicklungskompetenz vorliegt oder nicht. Bei der vorliegenden Arbeit war es angesichts der geringen Zahl der gewonnenen Rehembryonen notwendig, alle Embryonen für den Embryotransfer zu verwenden, so daß auf eine *in vitro* Kultivierung einzelner Embryonen verzichtet werden mußte. Jedoch sollte in zukünftigen Untersuchungen auch für das Reh die Kultivierung von Embryonen hilfreich zur richtigen Klassifizierung und Einschätzung sein und möglicherweise weiteren Aufschluß über den Ablauf der frühen Embryonalentwicklung beim Reh geben.

5.3 Trächtigkeit und embryonale Diapause beim Reh nach Embryotransfer

Nach HERMES (1998) ist es durch den alleinigen Einsatz transrektalen Ultraschalls möglich, die Trächtigkeit beim Reh bzw. die postimplantative Embryonal- und Fetalentwicklung ab ihrem Einsetzen Anfang Januar zu diagnostizieren bzw. darzustellen. Der transrektale Ultraschall ermöglicht die Darstellung erster embryonaler Strukturen ab einer Größe von etwa 1 – 2 mm. Dementsprechend konnte bei den 8 Rezipienten dieses Versuches durch transrektalen Ultraschall in der 2. Januarwoche bei 2 Tieren eine Trächtigkeit (eine Einlings- und eine Zwillingsträchigkeit) durch die eindeutige Darstellung der Feten und deren Herzschlags diagnostiziert werden. Die Implantation fand

folglich bei diesen Tieren innerhalb des normalen Zeitraumes Ende Dezember/Anfang Januar statt.

Beide Trächtigkeiten wurden bei Tieren gefunden, die im August zuvor (i) als Embryonendonoren einer chirurgischen Uterusspülung unterzogen worden waren und die (ii) durch Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ durch Luteolyse in einen neuen Zyklus gebracht und mit dem Alter der zu transferierenden Embryonen synchronisiert worden waren. Der Embryotransfer erfolgte in den Monaten September, bzw. Oktober, d. h. nach einer Kryokonservierung der Embryonen von 47 bzw. 74 Tagen.

Die Scheitel-Steiß-Längen der sonographisch dargestellten Feten (12 und 26 mm) liegen innerhalb der in der Literatur angegebenen Maße und lassen auf ein dem Alter der Feten nach ihrer Implantation entsprechendes Entwicklungsstadium schließen (HERMES, 1998; BISCHOFF, 1854; STIEVE, 1950; BORG, 1970; STUBBE, 1997).

Lediglich bei einem der 8 Rezipienten erwies sich das Ergebnis der Ultraschalluntersuchung als falsch negativ, da im Frühjahr auch von diesem Tier ein Kitz geboren wurde. Wie bei den anderen beiden tragenden Ricken fand auch bei diesem Tier vor dem Embryotransfer (Monat Oktober) eine Zyklussynchronisation mit den transferierten Embryonen statt. Es ist anzunehmen, daß die Implantation des Embryos bei diesem Tier später stattgefunden haben muß als bei den anderen untersuchten Rehen, so daß zum Zeitpunkt der Ultraschalluntersuchung noch keinerlei embryonale oder fetale Strukturen nachweisbar waren. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß auch die Geburt des Kitzes ca. zwei Wochen später als bei den anderen beiden Tieren erfolgte.

Die Geburt der vier Kitze erfolgte ausschließlich im Zeitraum Mitte Mai bis Anfang Juni, d.h. zu Zeitpunkten, zu denen auch bei den Tieren in freier Wildbahn mit der Geburt ihrer Kitze gerechnet wird. Nach STUBBE (1997) werden in diesem Zeitraum 96 % aller Kitze gesetzt, der mittlere Setztermin ist der 1. Juni.

Aufgrund der Tatsache, daß die Rezipienten, bei denen es nach Embryotransfer zur Geburt von Kitzen kam, entweder synchronisiert ($n = 2$) oder sogar gespült und synchronisiert ($n = 1$) worden waren, wurde die Hypothese erstellt, daß die geborenen Kitzen mit den transferierten Embryonen identisch sind, d.h. daß der Embryotransfer bei 3 Tieren erfolgreich war. Basierend auf dieser Hypothese lassen sich Trächtigkeitsdauern von 257, 217 und 239 (241) Tagen errechnen. Für die Länge der embryonalen Diapause bedeutet dies in allen drei Fällen eine deutliche Verkürzung um ca. 6 Wochen, denn die normale durchschnittliche Trächtigkeitsdauer beim Reh wird in der Literatur mit 276 – 295 Tagen angegeben, wovon in etwa die Hälfte der Zeit auf die Diapause entfällt (PRELL, 1937).

Eine solche Verkürzung würde gleichzeitig bedeuten, daß es unabhängig vom Zyklusstand des Muttertieres und unabhängig vom Alter der im Uterus befindlichen Embryonen im Zeitraum Dezember/Januar zur Implantation der Embryonen gekommen ist. Eine genetisch vorprogrammierte Dauer der embryonalen Diapause – sei es von Seiten der Mutter oder von Seiten des Embryos –, auf die Versuche von LINCOLN und GUINNESS (1972) hinweisen und wie sie von LAMBERT et al. (1998) vertreten werden, schiene damit ausgeschlossen, die Beendigung der Embryonalruhe durch äußere, auf das Muttertier einwirkende Faktoren (Tageslichtlänge, Temperatur, Futterzusammensetzung o.ä.) wäre wahrscheinlich.

Zur Verifizierung der Hypothese eines erfolgreichen Embryotransfers und der sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Diapause wurden alle Kitze, deren Putativ-Eltern sowie alle vom Versuchsaufbau her in Frage kommenden biologischen Eltern auf ihre genetischen Verwandtschaftsverhältnisse hin untersucht. Bei allen drei Rehfamilien konnte jeweils ein Elternteil zweifelsfrei bestimmt werden, so daß die Benennung des zweiten Elternteils vom Versuchsansatz her möglich war. In Familie 1 wurde die Ricke 2 („orange 8“) als biologische Mutter identifiziert, der dazugehörige Vater konnte nicht eindeutig bestimmt werden, jedoch war Bock 2 („Piefke“) der einzige Bock, zu dem die Mutter Kontakt hatte. In Familie 2 konnte Bock 2 („Boris“) als biologischer Vater benannt werden, die biologische Mutter muß also, sowohl von Seiten der Genetik als auch von Seiten des Versuchsaufbaus her, Ricke 2 („grün 17“) sein. Wie in Familie 2 war es auch in Familie 3 der Bock, der als Kitz-Vater eindeutig bestimmt werden konnte, nämlich Bock 1 („Boris“). Die dazugehörige Ricke ist (wiederum analog zur Schlußfolgerung bei Familie 2) Ricke 1 („blau 18“).

Das Ergebnis der genetischen Untersuchung zeigt also, daß bei allen 3 Paaren die Putativ-Eltern, d. h. Rezipienten plus dazugehöriger Bock, mit den biologischen Eltern identisch sind. Keines der Donoren-Paare konnte als biologisches Elternpaar identifiziert werden. Die Frage, ob es sich bei den 4 Kitzen um das Ergebnis eines erfolgreichen Embryotransfers handelt oder nicht, kann also in allen 3 Rehgruppen eindeutig mit „nein“ beantwortet werden. Eine Aussage über die Beeinflussbarkeit der Diapause kann somit nicht getroffen werden, denn es ist davon auszugehen, daß alle Kitze das Ergebnis der Brunst zum normalen Zeitraum sind. Mit anderen Worten handelt es sich bei den Kitzen um nach der Sommerbrunst in Uterus verbliebene Embryonen, die nach physiologischer Tragzeit und normaler Diapausenlänge zur Welt kamen. Die Hypothese, daß es sich bei der

Diapause des Rehs nicht um einen genetisch fixierten Zeitraum, sondern um eine durch äußere Faktoren bestimmte Zeitspanne handelt, kann folglich *nicht* verifiziert werden.

Da es aufgrund des geringen Tiermaterials nicht möglich war, die Lebensfähigkeit der Embryonen nach der Spülung sowie nach der Kryokonservierung zu überprüfen, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es durch die transferierten Embryonen ohne das Vorhandensein verbliebener Embryonen zu einer Trächtigkeit hätte kommen können oder nicht. Die Tatsache, daß es bei 3 Rezipienten nachweislich und bei 2 Rezipienten sehr wahrscheinlich (Exitus vor Beendigung der Diapause), zu keiner Trächtigkeit bzw. der Geburt von Kitzen kam, weist u. U. auf eine mögliche Schädigung der eingebrachten Embryonen hin. Untersuchungen zur Trächtigkeit beim Reh durch HERMES (1998) ergaben, daß es beim Reh physiologischerweise auch ohne Eingriffe wie hormonelle Behandlung der Muttertiere oder die Kryokonservierung der Embryonen zum Auftreten von nicht lebensfähigen Embryonalstadien mit anschließender Resorption oder folgendem Spätabort kommen kann.

Betrachtet man die 3 als Mütter identifizierten Rehe, so bedeutet dies, daß bei allen 3 Tieren die dem Embryotransfer vorausgegangene Behandlung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ zwar wie bereits beschrieben zum Abbau bestehender Corpora lutea mit parallelem Abfall des Progesteronspiegels geführt hat (SEMPÉRÉ et al., 1992), so daß ein neuer Zyklus mit der Anbildung neuer Gelbkörper resultierte, daß aber die zu diesem Zeitpunkt sich im Uterus im Stadium der Diapause befindlichen Embryonen davon unbeeinflusst blieben. Das Reh scheint sich folglich von domestizierten Wiederkäuern wie Rind, Schaf und Ziege dahingehend zu unterscheiden, daß die Applikation des Prostaglandins zumindest nicht in jedem Fall, jedenfalls nicht während der Diapause, zur Beendigung einer bestehenden Trächtigkeit und zur Resorption des Embryos führt.

Eine ähnliche Beobachtung beschreiben ASHER et al. (1992) in ihren Versuchen beim Rothirsch, wie das Reh ein Vertreter der Familie *Cervidae*. Sie geben an, daß es bei rund 30 % der Hirschkühe des Versuches, die mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ zur Zyklusinduktion behandelt wurde, trotz nachgewiesener Anbildung neuer Gelbkörper und messbarem Abfall des Progesteronspiegels nicht zur Resorption der Embryonen, sondern zur nachfolgenden Geburt von Hirschkälbern kam. Für dieses Phänomen geben ASHER et al. mehrere in Frage kommende Gründe an:

1. eine aus unbekanntem Grunde nicht ganz vollständig abgelaufene Luteolyse, von der die jüngeren Corpora lutea nicht erfasst wurden (GLOVER, 1985),

2. erneute Ovulationen innerhalb der Lutealphase (beschrieben für superovulierte Schafe) (HUNTER und SOUTHEE, 1989),
3. eine im Vergleich zu domestizierten Spezies geringere Sensibilität der nicht implantierten Embryonen gegenüber dem Progesteronabfall oder
4. Refraktät der Corpora lutea gegenüber $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei Anwesenheit eines präimplantiven Embryos bei dieser Tierspezies

Keines der drei Rehe des eigenen Versuchs war vorher einem Superovulationsregime unterzogen worden, so daß Grund 2 (erneute Ovulation und Konzeption) als Ursache für die Geburt der Kitze unwahrscheinlich ist, zumal auch die Fähigkeit der Böcke, erfolgreiche Deckakte herbeizuführen, zum Jahresende hin kontinuierlich abnimmt (BLOTTNER et al., 1996).

Ist es allein aufgrund des makroskopischen Bildes nicht mit 100%iger Sicherheit möglich, die vollständige Rückbildung aller Gelbkörper des ersten Zyklus zu verifizieren, so ermöglicht jedoch der Verlauf bzw. der Abfall der Progesteronkurve bei den Tieren der Gruppe VI eine Aussage darüber, in wie weit bestehende Gelbkörper abgebaut wurden. Bei zwei der drei trächtigen Rezipienten wurden die Progesteronwerte in ihrem Verlauf nach der Luteolyse bestimmt. Bei Ricke „blau 18“ war in den Faeces ein Abfall der Werte von 162,7 ng/g auf ein Minimum von 26,91 ng/g, bei Ricke „grün 17“ ein Abfall von 169,6 ng/g auf minimal 17,02 ng/g innerhalb von 4 Tagen zu verzeichnen. Diese Ergebnisse entsprechen einem Rückgang auf ca. 17%, bzw. 10% der Ausgangswerte (vergl. Seite 67). Dieser Rückgang der Progesteron-Werte von den tragender Tiere entsprechenden auf für nicht-tragende Rehe charakteristische Werte (HOFFMANN et al., 1978) deutet auf eine Luteolyse mit vollständiger Rückbildung allen Gelbkörpergewebes hin.

Es hat den Anschein, als sei ASHERs dritte Hypothese, daß beim Rothirsch frühe, noch nicht implantierte Embryonalstadien gegenüber einem Abfall des Progesteronspiegels weniger sensibel als bei anderen Tierspezies sind, d.h. daß ein hoher Progesteron-Spiegel nicht zu jedem Zeitpunkt Voraussetzung zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit ist, die für das Reh am wahrscheinlichsten zutreffende ist. Der Zeitraum, in dem durch alleinige Gabe von Prostaglandinen die Trächtigkeit beim Reh nicht unterbrochen werden kann, ist bei diesem Tier aufgrund der fünfmonatigen Diapause, in der der Embryo nicht-implantiert im Uterus verweilt, möglicherweise noch größer als beim Hirsch. Die These, aufgestellt durch HERMES (1998), daß die Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ beim tragenden Reh während der Diapause nicht zu einer Luteolyse führt, ist nach den eigenen Ergebnissen folglich nicht haltbar. Die Luteolyse läuft demnach nach Applikation des Prostaglandins vollständig ab,

als alleinige Maßnahme zur Trächtigkeitsunterbrechung scheint sie jedoch nicht ausreichend.

Die exakte Rolle des bei anderen Tierarten trächtigkeitserhaltenden Hormons Progesteron scheint beim Reh demnach unklar.

Rezipientin „orange 8“ ist die einzige der tragenden Ricken, die vor dem Transfer der Embryonen nicht nur neu synchronisiert wurde, sondern die zuvor als Embryonendonator der Gruppe II zusätzlich einer chirurgischen Uterusspülung unterzogen wurde. Bei einer Auffindungsrate von 62,5 % bei diesem Tier (es wurden 5 Ovarprodukte bei 8 gezählten Gelbkörpern gefunden), heißt dies, daß nach der Brunstsynchronisation im Sommer tatsächlich mehr entwicklungskompetente Embryonen vorhanden waren als in der Spülung aufgefunden wurden. Daß ein nach Spülung im Uterus verbliebener Embryo trotz Spülung und Luteolyse tatsächlich ausgetragen wurde, ist umso verwunderlicher, als es sogar bei den Embryonendonoren, die gespült, aber nicht neu synchronisiert wurden (n=11), lediglich in einem Fall zur Geburt eines Kitzes kam. Die chirurgische Uterusspülung der Rehe, verbunden mit den Stressoren wie dem Einfangen der Tiere sowie deren Narkose, scheint als schwerwiegender Eingriff in den meisten Fällen mit der Fortsetzung einer Trächtigkeit unvereinbar zu sein, auch wenn nicht alle vorhandenen Embryonen aufgefunden werden können.