Aus der Klinik für Pferde
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Einfluss der Inseminationstechnik und der Lokalisation des Inseminats auf die Trächtigkeitsrate bei Warmblutstuten unter Verwendung reduzierter Dosen flüssigkonservierten und tiefgefrorenen Hengstspermas

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des Grades einer
D O K T O R I N D E R V E T E R I N Ä R M E D I Z I N
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Anna-Christine Bonk

aus Hamburg

Hannover 2002

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.- Prof. Dr. Erich Klug

1. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Erich Klug
2. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Burkhard Meinecke

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2002

Meiner Mutter

Inhalt

1 EINLEITUNG ... 9

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 10

3 LITERATURÜBERSICHT ... 11

3.1 Spermientransport ... 11
3.1.1 Aktive und passive Fortbewegung ... 11
3.1.2 Uterusmotilität und Interaktion mit dem Inseminat ... 12
3.1.2.1 Myometriumskontraktionen ... 12
3.1.2.2 Verteilung der Spermien ... 14
3.1.2.3 Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten ... 15
3.1.3 Passage der uterotubalen Verbindung ... 16
3.1.4 Aufgabe des kaudalen Isthmus ... 17

3.2 Spermiendosis und Inseminationstechnik ... 19
3.2.1 Spermiendosis ... 19
3.2.1.1 Frischsperma ... 19
3.2.1.2 Tiefgefriersperma ... 25
3.2.2 Inseminationstechnik ... 29
3.2.2.1 Frischsperma ... 31
3.2.2.2 Tiefgefriersperma ... 35

3.3 Diagnostisch-therapeutische Hysteroskopie ... 37

4 EIGENE UNTERSUCHUNGEN ... 39

4.1 Material und Methoden ... 39
4.1.1 Versuchstiere ... 39
4.1.1.1 Hengste ... 39
4.1.1.1.1 Frischsperma ... 39
4.1.1.1.2 Tiefgefriersperma ... 40
4.1.1.2 Stuten ... 41
4.1.1.2.1 Untersuchung der Stuten ... 41
4.1.1.2.1.1 Zeitschema der Besamung / Ovulationsinduktion ... 41
4.1.1.2.1.2 Klinisch-gynäkologische Parameter ... 42
4.1.2 Versuchsgruppen ... 45
4.1.2.1 Vorbereitung zur Insemination ... 46
4.1.2.2 Methoden der Samenübertragung ... 47
4.1.2.2.1 Intracorporale Insemination (ICPI) ... 47
4.1.2.2.2 Tiefintracornuale Insemination (TICNI) ... 47
4.1.2.2.3 Hysteroskopische Insemination (HYSI) ... 48
4.1.3 Statistische Methoden ... 50

5 ERGEBNISSE ... 51

5.1 Gruppen- und Altersverteilung ... 51

5.2 Saison und Jahr 52

5.3 Vorbericht / Reproduktionsstatus 52

5.4 Volumen-, Dosis- und Konzentrationseffekte 57

5.5 Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit zur Aktivität der Ovarien 59
5.5.1 Anzahl präovulatorischer Follikel, sowie Häufigkeit singulärer bzw. zweifacher Ovulationen und Zwillingsträchtigkeiten 59
5.5.2 Konzeptionsergebnisse in Abhänigkeit des Seitenvergleiches von Follikeln, Ovulationen, sowie Follikelgröße 64

5.6 Resorptionsrate 67

5.7 Uterusödem 68

5.8 Endometriale Reaktion auf die Besamung 69

5.9 Endometriumszysten 73

5.10 Morphologie der uterotubalen Papille 74

5.11 Inseminationsdauer 75

5.12 Ovulationszeitpunkt nach hCG-Applikation und Besamung 76

5.13 Trächtigkeitsraten 78

6 DISKUSSION 80

6.1 Gruppen- und Altersverteilung 80

6.2 Vorbericht / Reproduktionsstatus 80

6.3 Volumen, Dosis und Konzentrationseffekte 81

6.4 Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit zur Aktivität der Ovarien 82
6.4.1 Anzahl präovulatorischer Follikel, sowie Häufigkeit singulärer bzw. zweifacher Ovulationen und Zwillingsträchtigkeiten 82
6.4.2 Konzeptionsergebnisse in Abhängigkeit des Seitenvergleiches von Follikeln, Ovulationen, sowie Follikelgröße 84

6.5 Resorptionsrate 85

6.6 Uterusödem 85

6.7 Endometriale Reaktion 85

6.8 Endometriumszysten 86

6.9 Morphologie der uterotubalen Papille 87

6.10 Inseminationsdauer 88

6.11 Ovulationszeitpunkt nach hCG-Applikation und Besamung 89

6.12 Trächtigkeitsraten 90

7 ZUSAMMENFASSUNG 95

8 SUMMARY 97

9 LITERATURVERZEICHNIS 99

DANKSAGUNG 112

ANHANG 113

1 Einleitung

Verglichen mit anderen Haussäugetieren weisen die Equiden eine geringere Fertilität auf. Dieses Defizit versucht man durch eine biotechnologische Aufbereitung von Hengstsamen und durch eine moderne instrumentelle Samenübertragung und ein umfangreiches Besamungsmanagement auszugleichen. Die Einflüsse von Besamungsdosis, -volumen, -zeitpunkt sowie Frequenz und Intervall der künstlichen Samenübertragung sind schon in vielen verschiedenen Studien erörtert worden. Ein Zusammenhang zwischen Besamungstechnik und Konzeptionsrate konnte bis heute jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

In den Gebärmutterkörper eingebrachte Spermien erreichen schon nach relativ kurzer Zeit die Uterushornspitze (KATILA et al. 2000) und stehen in einer spezifischen Anordnung zu den epithelialen Strukturen der uterotubalen Verbindung (SCOTT et al. 2002). Deutlicher als durch die individuelle Progressivität der Spermien wird die Verteilung im weiblichen Genitale jedoch durch eine Uterusmotilitätssteigerung im Zuge der Interaktion mit dem Inseminat beeinflusst (KATILA et al. 2000). Desweiteren können spezifische Anteile des Inseminats möglicherweise Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit der Spermien im Reproduktionstrakt der Stute haben (CLAUS et al. 1992, TROEDSSON et al. 1998). Eine zentrale Fragestellung ist, ob die Kolonisation der Samenzellen im kaudalen Isthmus in einem Zusammenhang mit einer möglichst ovulationsnahen gerichteten Samendeponierung steht.

Die vorliegende Arbeit bezieht sich in erster Linie auf die Besamungstechnik, bei der festgestellt werden soll, ob sich Unterschiede in Hinblick auf die Trächtigkeitsrate ergeben, wenn die Besamung in den Gebärmutterkörper mit der tiefintracornualen und der hysteroskopischen Inseminationstechnik verglichen wird. Im Rahmen der Zuchtsaisons 2001 und 2002 standen am Niedersächsischen Landgestüt in Celle Warmblutstuten für die Samenübertragung unter Verwendung reduzierter Dosen flüssigkonservierter und tiefgefrorener Spermien zur Verfügung. Es ist das Anliegen in dieser Arbeit, unter praxisnahen Bedingungen ohne kosten- und zeitintensive Laborarbeit mit einer möglichst großen Anzahl an Stuten eine wissenschaftlich begründete Einschätzung des Einflusses der Inseminationstechnik und der Spermiendosis auf die Fertilitätsergebnisse von Warmblutstuten auch hinsichtlich veschiedener vorberichtlicher Situationen zu erzielen.

2 Abkürzungsverzeichnis

a. ov. = ante ovulationem

BD = Besamungsdosis

BV = Besamungsvolumen

cAMP = zyklisches Adenosin-Monophosphat

FS = Frischsperma

FV = Französischer Verdünner (INRA 82)

GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormon

GSZ = Gesamtspermienzahl

hCG = humanes Choriongonadotropin

HYSI = Hysteroskopische Insemination

ICPI = Intracorporale Insemination (in den Gebärmutterkörper)

ID = Innendurchmesser

IU = Internationale Einheiten

k. A. = keine Angabe

KB = Künstliche Besamung

Mio. = Millionen

Mrd. = Milliarden

OV = Ovulation

PBS = Phosphate Buffered Saline

p.i. = post inseminationem

p.ov. = post ovulationem

p.m. = post mortem

PMN = Polymorphkernige Neutrophile

pms = progressiv motile Spermien

Tab. = Tabelle

TG = Tiefgefriersperma

TICNI = Tiefintracornuale Insemination

TR = Trächtigkeitsrate

TU = Trächtigkeitsuntersuchung

US = Ultraschalluntersuchung

UTP = Uterotubalpapille

3 Literaturübersicht

3.1 Spermientransport

Nachdem die Spermiogenese in den männlichen Keimdrüsen abgeschlossen ist, durchlaufen die Spermien die posttestikuläre Reifung im Nebenhoden. Bei der Ejakulation verlassen die Spermien geschützt durch eine Proteinhülle das männliche Genitale über den Samenleiter und die Harnröhre (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998). Im Natursprung sowie bei der instrumentellen Samenübertragung gelangen die Spermien direkt in die Gebärmutter. Von dort werden die Spermien durch aktive und passive Fortbewegungsmechanismen in die Hornspitze transportiert. Nur wenige Spermien befinden sich nach Passage der uterotubalen Verbindung in den Eileitern. Die Eileiterampulle, den Ort der Befruchtung, erreicht schließlich nur ein sehr geringer Teil der ursprünglich in das weibliche Genitale verbrachten Spermienanzahl (YANAGIMACHI 1994).

3.1.1 Aktive und passive Fortbewegung

Die Fähigkeit der Spermien zur aktiven Fortbewegung entwickelt sich während der Nebenhodenpassage (YANAGIMACHI 1994). Durch Wechselwirkungen mit den sekretorischen Produkten des Nebenhodens kommt es zu komplexen Veränderungen der Lipid- und Proteinmuster der Spermienmembranen (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998). YANAGIMACHI (1994) geht davon aus, dass eine Veränderung im cAMP-modulierten Proteinkinase-System sowie der Transfer einiger Substanzen, wie z.B. dem Forward-Motility-Protein, aus der epididymalen Flüssigkeit an der Entstehung der Beweglichkeit der Spermien beteiligt sind. Die Möglichkeit, die Calciumkonzentration intrazellulär niedrig zu halten, scheint für das Erreichen der Bewegungsfähigkeit von Bedeutung zu sein (YANAGIMACHI 1994).

Durch Schlagen des Flagellums bewegen sich die Spermien aktiv vorwärts. Hengstspermien weisen die Besonderheit des paraxialen Schwanzansatzes auf. Ihr Bewegungsablauf ist somit durch mehr oder weniger große Kreisbewegungen gekennzeichnet (BIELANSKI 1982). Die Spermienbewegung wird durch uterine Spalträume, rheologische Umstände der Sekrete und die epitheliale Oberflächencharakteristik beeinflusst (KATZ et al. 1989).

Der passive Spermientransport beruht auf Myometriums- und Myosalpinxsaktivität. Die Auslösung von Kontraktionen ist unter anderem abhängig von dem sensorischen Stimulus und dem Dehnungsreiz beim Deckakt (TROEDSSON et al. 1998). Darüber hinaus könnte das in den Uterus verbrachte Volumen einen kontraktilen Effekt auf die Gebärmutter haben (NIKOLAKOPOULOS u. WATSON 2000) und somit auf die Verteilung des Spermas Einfluss nehmen.

BADER (1982) beobachtete, dass bei Stuten, die zwei Stunden nach Insemination mit Tiefgefriersperma in den Gebärmutterkörper geschlachtet wurden, noch keine Spermien in den Eileiterampullen nachzuweisen waren. Bei Frischsperma hingegen konnte BADER (1982) bei zwei von fünf Stuten zwei Stunden p.i. einige Spermien in den Ampullen auffinden. Vier Stunden nach der KB hatte eine große Anzahl die Uterotubalpapille erreicht. In der Eileiterampulle kamen im besten Fall 1000 Spermien an. Nach sechs Stunden nahm die Zahl der Spermien an der uterotubalen Verbindung und in den Eileitern schon wieder ab.

Angekommen in den Hornspitzen der Gebärmutter, müssen die Spermien die Barriere der uterotubalen Verbindung in den Eileiter überwinden. TROEDSSON (1998) geht davon aus, dass einige der befruchtungsfähigen Spermien bis zur Ovulation im kaudalen Isthmus, dem sogenannten Spermareservoir, verweilen, bis sie dann zur Befruchtung in die Ampulle des Eileiters aufsteigen. Dass die Spermienmotilität mit dem Erreichen der Eileiters in Zusammenhang steht, konnten SCOTT et al. (1995) bestätigen, da bei Besamung mit Sperma von subfertilen Hengsten signifikant weniger Spermien die Eileiter erreichen, als Spermien von fertilen Hengsten. Motilität allein verspricht allerdings keine erfolgreiche Befruchtung, da eine zu große Abhängigkeit von den motilitätsbeeinflussenden Faktoren des weiblichen Genitals besteht (KATILA et al. 2000).

3.1.2 Uterusmotilität und Interaktion mit dem Inseminat

3.1.2.1 Myometriumskontraktionen

TROEDSSON et al. (1998) stellten fest, dass durch den Deckakt bzw. durch die künstliche Besamung koordinierte Kontraktionen der glatten Muskulatur in Gebärmutter und Eileiter

hervorgerufen werden können. Es wird vermutet, dass eine postcoitale Oxytocinausschüttung den Transport der Spermien zum Ort der Befruchtung vereinfacht. Es ist erwiesen, das sexuelle Stimulation bei rossigen Stuten zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von Oxytocin führt (ALEXANDER et al. 1995). RIGBY et al. (1999) verabreichten den Stuten kurz nach der Besamung Oxytocin intravenös. Sie konnten mit dieser exogen zugefügten Oxytocingabe jedoch keinen entscheidenden Effekt auf die Trächtigkeitsraten erzielen.

Zur Untersuchung der Myometriumsaktivität verwendeten TROEDSSON et al. (1998) die Elektromyographie, um aufzuzeigen, dass es kurz nach Insemination mit Frischsperma zu einer ersten Motilitätsphase mit einer Dauer von 30 Minuten kam. Eine zweite Aktivitätsphase des Myometriums setzte nach 4 Stunden ein und hielt für mindestens 12 Stunden an. Die Kontraktionswellen verliefen in beide Richtungen, zum einen vom Uteruskörper bis zu den Eileitern und zum anderen von den Hornspitzen bis zur Zervix (TROEDSSON et al. 1998). Dieses Phänomen der Motilitätssteigerung war TROEDSSON et al. (1993) in einer vorausgegangenen Versuchsreihe nach Inokulation einer Bakterieninfusion in die Gebärmutter bereits aufgefallen. Der Mechanismus dieser schnellen Reaktion des Myometriums konnte nicht geklärt werden. Durch das Einbringen einer dem Organismus fremden Materie ist jedoch eine physiologische Abwehrreaktion der Gebärmutter zu Reinigungszwecken zu erwarten (TROEDSSON 1995). TROEDSSON et al. (1998) vermuten, dass es bei der zweiten Motilitätsphase eher um die Ausscheidung der in der Gebärmutter verbliebenen Reste des Inseminats geht als um den Spermientransport. Die Autoren stellen fest, dass die Besamung sehr ähnliche Aktivitätskurven des Myometriums ergibt wie die Infusion einer Bakterienlösung in die Gebärmutter. Darüber hinaus konnte folgender Unterschied festgestellt werden: Ältere, zur Endometritis neigende Stuten reagierten im Vergleich zu jüngeren, unempfindlichen Stuten mit dreistündiger Verspätung auf die Bakterieninokulation. Wie von SCOTT et al. (1995) demonstriert wurde, weisen subfertile Stuten vier Stunden nach Insemination in den Gebärmutterkörper weniger Spermien im Ovidukt auf als fertile Stuten.

Die Uterusmotilität der Probandinnen in einer Studie von KATILA et al. (2000) zeigte sehr individuelle Schwankungen zwischen 5 und 65 Kontraktionen in der ersten halben Stunde nach Insemination. Bei den meisten Stuten beobachteten die Autoren vier bis sieben zirkuläre Kontraktionen, bei denen es zu einer relativ schnellen Vorwärtsbewegung des radioaktiv markierten Spermas in die Hornspitze und einem nachfolgenden Rücklauf in das Corpus uteri

kam. Separate Hornkontraktionen schienen für kurze Zeit das Uteruslumen komplett zu verschließen. KATILA et al. (2000) räumen ein, dass das zur Sedation eingesetzte Detomidine laut SCHATZMANN et al. (1994) eine für 30 Minuten nach Verabreichung positiv verstärkende Wirkung auf die Uterusmotilität besitzt. Ebenso ist es möglich, dass durch die rektale Manipulation leicht vermehrt uterine Kontraktionen aufgetreten sein könnten.

3.1.2.2 Verteilung der Spermien

KATILA et al. (2000) zeigten in einer Studie mit Hilfe der Scintigraphie, wie sich radioaktiv markierte Spermien im weiblichen Genitaltrakt verhalten. Bei Besamung in den Gebärmutterkörper konnten die ersten Spermien nach 8 bis 20 Minuten an der Hornspitze identifiziert werden. Eine Stunde p.i. erreicht die Spermienansammlung im Uterus ihren Höhepunkt, nach zweieinhalb Stunden haben jedoch die meisten Spermien die Gebärmutter über die Vagina und Vulva schon wieder verlassen. Und nach viereinhalb Stunden sind so gut wie keine motilen Spermien mehr im Uterus zu detektieren. KATILA et al. (2000) hatten erhofft, radiomarkierte Spermien periovariell oder abdominal aufzuzeigen, um direkt nachweisen zu können, ab wann sich die ersten Spermien im Eileiter befinden.

Die Verteilung des Spermas im weiblichen Genitale ist laut SCOTT (2000) von folgenden Faktoren abhängig: von der Lokalisation, an der das Sperma deponiert wird, von der Morphologie und Motilität der Spermien, sowie von der Anatomie der Stute und dem mikrobiologischen Milieu in Uterus und Eileiter. Auch Seminalplasmainhaltsstoffe könnten indirekt Einfluss auf die Motilität der Gebärmutter haben – zum Beispiel die kontraktile Wirkung des Prostaglandin, welches im Seminalplasma des Hengstes aber eher niedrig konzentriert vorkommt (CLAUS et al. 1992).

McCUE et al. (2000) vermuten, dass einige Spermien nur wenige Minuten brauchen, um sich an der uterotubalen Verbindung einzufinden. Laut BADER (1982) sind vier Stunden nach intrauteriner Besamung max. 1000 Spermien in der Ampulle angekommen. SCOTT et al. (1995) konnte vier Stunden nach der Besamung hochmotile Spermien aus den Eileitern zurückgewinnen.

3.1.2.3 Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten

Nach BADER (1982), KATILA (1997), KOTLAINEN et al. (1994) TROEDSSON et al. (1995), TROEDSSON et al. (1997) sind schon wenige Stunden nach der Besamung einige Leukozyten in die Gebärmutter gelangt. Aufgrund der Tatsache, dass sie ständig im Blut zirkulieren, können sie sich auf ein chemotaktisches Signal hin sofort ohne Verzögerung in der Gebärmutter einfinden (TROEDSSON et al. 1995). In einem Versuch von TROEDSSON (1995) stellte sich heraus, dass die mit 700 Mio. Spermien in 50 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) besamten Stuten mit einer ähnlich heftigen PMN-Migration auf die eingebrachten Spermien reagierten wie in einer anderen Versuchsreihe auf Streptococcus zooepidemicus. In der Kontrollgruppe hingegen, in der nur 50 ml PBS in die Gebärmutter verbracht wurden, war eine deutlich geringere Einwanderung von PMN registriert worden. TROEDSSON et al. (2001) gehen davon aus, dass die polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) über die Komplementaktivierung angeregt werden, in die Gebärmutter einzuwandern, um Spermien zu phagozytieren. Dies ergab sich aus In-vitro-Studien, bei denen Spermien mit Blutplasma inkubiert und hitzeinaktiviert wurden. Danach wurde fetales bovines Serum zugesetzt und mit einem speziellen Medium verdünnt. Die Proben wurden in die untere Etage einer chemotaktischen Kammer verbracht, in der die PMN durch einen Polykarbonatfilter in Richtung einer chemoattraktiven Substanz wandern sollten. Nach Inkubation wurden der Filter auf einem Objekträger ausgestrichen, angefärbt und ausgezählt. Durch eine Wärmebehandlung des Blutplasmas kam die Einwanderung der PMN vollständig zum Erliegen, was von TROEDSSON et al. (2000) auf die Inaktivierung des stark hitzeempfindlichen Komplements zurückgeführt wird.

TROEDSSON et al. (2000) haben festgestellt, dass sich im Gebärmutterlumen regelrechte Spermien-PMN-Aggregate bilden, die langsam umhertreiben und den Transport der Spermien zum Ovidukt verhindern. TROEDSSON (1995) vermutet, dass die an Spermien gebundenen Opsonine die Phagozytose vereinfachen. Während dieses Prozesses wird $PGF_{2\alpha}$ freigesetzt, was zu Uteruskontraktionen führt und den Reinigungsmechanismus vorantreibt.

Das Seminalplasma soll die Einwanderung, Chemotaxis, Phagozytose und Aggregation der PMN unterdrücken (TROEDSSON et al. 1997). Somit wird den Spermien indirekt geholfen, das Spermareservoir im kaudalen Isthmus der Eileiter zu erreichen (TROEDSSON et al. 2000). Die Autoren halten die Entzündungsreaktion nach der Bedeckung bzw. Besamung für

eine physiologische Reinigungsreaktion, um ein geeignetes Milieu für den Embryo zu schaffen (TROEDSSON et al. 1998). In diesem Zusammenhang fiel ihnen auf, dass nach Besamung mit Tiefgefriersperma die Gebärmutter im Vergleich mit Frischsperma sehr viel heftiger reagiert. Ob die Ursache hierfür das fehlende Seminalplasma ist oder ob es an den besonderen Zusätzen im Tiefgefrierverdünner oder an der veränderten Spermienoberfläche infolge der Kryokonservierung liegt, bleibt weiterhin ungeklärt. KATILA (1997) deutet an, dass bei Tiefgefriersperma die akrosomale Oberfläche so verändert worden sein könnte, dass die Spermien für die eingewanderten Leukozyten leichter zu phagozytieren sind. Möglicherweise bleibt durch den Mangel an Seminalplasma die Stimulation der Myometriumsaktivität aus. Dieses könnte eine mangelhafte Selbstreinigung der Gebärmutter von den Inseminationsprodukten zur Folge haben und würde so die vermehrte Neigung zur Endometritis erklären (KATILA 1997).

KOTILAINEN et al. (1994) sind der Meinung, dass das Ausmaß der Neutrophilen-Migration abhängig von der Konzentration des Spermas ist. Ihre Versuchsgruppen waren signifikant höher mit Neutrophilen belastet als die Kontrollgruppe, die heftigsten Reaktionen ergaben sich jedoch bei der Verwendung von Tiefgefriersperma und hochkonzentriertem Frischsperma. KOTILAINEN et al. (1994) vermuten, dass die Neutrophilen eher durch die Spermien als durch Bakterien chemotaktisch angelockt werden. In ähnlichen Experimenten erhielten NIKOLAKOPUOLOS und WATSON (2000) durch eine uterine Lavage 48 Stunden post inseminationem die höchste Anzahl an PMN bei vorhergegangener Inokulation von zwei Milliarden Spermatozoen in 40 ml Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS). KATILA (1995) beobachtete erste Polymorphkernige Neutrophile (PMN) dreißig Minuten nach Besamung und stellte ein Maximum eingewanderter PMN nach 8 Stunden fest. Dieses Maximum schien 24 Stunden erhalten zu bleiben, nach 48 Stunden waren jedoch alle PMN mit phagozytierten Spermien eliminiert oder hatten über die Lymphbahnen ihren Abfluss gefunden.

3.1.3 Passage der uterotubalen Verbindung

BOYLE et al. (1987) entnahmen mindestens 24 Stunden zuvor besamten oder bedeckten Ponystuten (n = 10) die Hornspitzen und den kaudalen Isthmus teils prae- und teils postovulatorisch. Im Elektronenmikroskop zeigten sich im Östrus sowohl in den Hornspitzen als auch radiär angeordnet auf der Uterotubalpapille und in dem kaudalen Isthmus tiefe,

ödematöse Longitudinalfalten, die post ovulationem deutlich abflachten und ihre sekundären Furchen verloren. Während die Zellen in unmittelbarer Umgebung der Papille und zwischen den radiär angeordneten Falten keine Besonderheiten an der Oberfläche besaßen, waren die Zellen auf den Faltenwülsten mit den unterschiedlichsten Mikrovilli und Cilien besetzt, die richtungsweisend orientiert zu sein schienen. In einigen Fällen waren Spermium und Oberfläche der uterotubalen Verbindung mit einer schleimigen Schicht überzogen. Es wurden jedoch weder Anzeichen für Phagozytose bemerkt, noch wurden Leukozyten gesichtet. Da bei der Stute die Spermien allgemein intrauterin platziert werden und sich schnell bis in die Hornspitze verteilen können, nehmen BOYLE et al. (1987) und YANAGIMACHI (1994) an, dass die uterotubale Papille die Funktion einer Barriere einnimmt und somit einen wichtigen Teil der Selektionsfunktion übernimmt und dadurch vor Polyspermie schützt.

SCOTT et al. (1995) konnten vier Stunden nach Besamung in den Gebärmutterkörper bei subfertilen Stuten signifikant weniger Spermien in den Eileiter nachweisen als bei normalen Stuten. Das Resultat einer Studie von SCOTT et al. (2000) ergibt , dass, selbst wenn sich ein großer Anteil teratogener Spermien in der Besamungsdosis befindet, an der UTP in situ mit einem Elektronenmikroskop zu über 90 % morphologisch einwandfreie Spermien angetroffen werden. Das veranlasst SCOTT et al. (2000) zu der Annahme, dass entweder missgebildete Spermien die uterotubale Verbindung gar nicht erst erreichen, oder dass diese Spermien keine normale Verbindung mit dem Epithel eingehen können. SCOTT et al. (2002) sind der Meinung, dass die uterotubale Papille ein präovulatorisches Spermareservoir darstellt.

3.1.4 Aufgabe des kaudalen Isthmus

SCOTT et al. (1995) fanden heraus, dass sich das Sperma innerhalb von vier Stunden vor allem an der Uterotubalpapille sammelt, und dass auch noch 18 Stunden (SCOTT et al. 2002) nach der Besamung Spermien dort anzutreffen sind. Sie ordnen sich bevorzugt seitlich zueinander an, wobei die Köpfe überwiegend an der luminalen Seite im Epithel verankert sind und weniger in den Falten der Papille. Die Bindung ist scheinbar ausschlaggebend für das Überleben der Spermien. SCOTT et al. (2002) konnten 18 Stunden nach Besamung eine Verschiebung der Spermienverteilung von der Papillenöffnung auf uteriner Seite in Richtung Papillenlumen beobachten. Das Reservoir soll den Spermien Schutz vor Phagozytose bieten. Diese Vorgänge können nur stattfinden, wenn die Spermien mit ihren membranständigen Kohlenhydraten in einer komplexen Verbindung mit dem Eileiterepithel stehen (LEFEBVRE

et al. 1995). LEFEBVRE et al. (1995) vermuten, dass bei dem Einsatz von TG-Sperma die Bindungskapazität reduziert sein könnte, da eine Interaktion der Kohlenhydrate mit dem Verdünner nicht ausgeschlossen werden kann. Auch der physikalische Stress, der durch das Einfrieren und Auftauen auf die Spermien ausgeübt wird, könnte zu einer Veränderung der Kohlenhydratkomposition führen und somit die Bindung zum Eileiterepithel einschränken. THOMAS et al. (1995) zeigten, dass bei in-vitro-Versuchen mit Monolayer-Zellkulturen von equinen Eileiterepithelzellen die Bindung von Hengstspermien am Eileiterepithel eine qualitative und quantitative Veränderung in der Proteinsekretion der Epithelzellen zur Folge hat. THOMAS et al. (1995) vermuten, dass die Proteinsekretion Einfluss auf die Lagerung, Reifung und Langlebigkeit der Spermien haben könnte.

HUNTER et al. (1987) und YANAGIMACHI (1994) konnten auch bei anderen Haussäugetieren eine Akkumulation im kaudalen Abschnitt des Eileiteristhmus registrieren. SCOTT (2000) geht davon aus, dass an jener Stelle reguliert wird, wie viele Spermien zur Eileiterampulle aufsteigen. YANAGIMACHI (1994) vermutet, dass dieser Vorgang durch hormonelle Schwankungen zum Zeitpunkt der Ovulation über ein direktes Gefäßversorgungssystem beeinflusst werden könnte. SCOTT et al. (1995) konnten bei fertilen Stuten signifikant höhere Konzentrationen an Spermien in dem kaudalen Isthmus registrieren als im proximalen Isthmus oder der Ampulla. DOBRINSKI et al. (1997) stellten durch in vitro-Versuche mit Monolayer-Zellkulturen fest, dass bei an den Eileiterepithelien gebundenen Spermien die intrazelluläre Calciumkonzentration der Spermien niedriger ist als bei den luminalen Spermien. Somit könnte eine vorzeitige Kapazitation in vivo verhindert werden. Das würde bedeuten, dass der kaudale Isthmus dafür verantwortlich ist, dass rechtzeitig zur Ovulation genügend befruchtungsfähige, kapazitationsbereite Spermien zur Verfügung gestellt werden.

Bei den bis zur Kapazitation in einer Art „Warteposition“ verharrenden Spermien löst sich – auf ein bisher noch ungeklärtes Signal hin – die schützende Proteinschicht auf. Vermutlich lösen sich die Spermien, deren Membran für Calcium permeabel geworden ist, vom Epithel des kaudalen Isthmus und werden durch den Einstrom von Calcium in den Zustand der Hyperaktivität versetzt (HO u. SUAREZ 2001), durch den die Spermien unterstützt werden, den Ort der Befruchtung, die Eileiterampulle, zu erreichen (YANAGIMACHI 1994). Durch biochemische Vorgänge und Umorganisation der Spermienmembran wird die Bindungsfähigkeit des Spermiums an die Zona pellucida der Eizelle erreicht und somit die

Akrosomenreaktion vorbereitet (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998). Die Eizelle ist von einer Hülle aus Cumuluszellen umgeben, die von den Spermien durchquert werden muss, um an die Zona pellucida zu gelangen. Diese schützt die Eizelle vor mechanischen Schäden, vollzieht eine speziesspezifische Gametenerkennung, induziert die Akrosomenreaktion und baut eine Polyspermieblockade auf (YANAGIMACHI 1994).

Die Akrosomenreaktion, die unter anderem durch einen intrazellulären Calciumeinstrom initiiert wird, ist ein im Elektronenmikroskop morphologisch sichtbarer Vorgang, der die Spermien auf die Penetration der Eizelle vorbereitet und die Fusion der Zellmembranen beider Gameten ermöglicht. Über eine zunächst punktförmige Verschmelzung mit der Plasmamembran unterzieht sich die äußere akrosomale Membran einer zunehmenden Vesikulierung, bis nur noch der Ansatz des Äquatorialsegments bestehen bleibt, während im Übrigen die innere akrosomale Membran freiliegt. Bei dem Vorgang induzieren exocytotisch freigesetzte hydrolytische Enzyme einen Spalt in der Zona pellucida, durch den das Spermium dann einzudringen vermag (YANAGIMACHI 1994).

3.2 Spermiendosis und Inseminationstechnik

3.2.1 Spermiendosis

3.2.1.1 Frischsperma

Die Tabelle 01 gibt eine Übersicht über Studien, in denen unterschiedliche Besamungsdosen bei der Verwendung von Frischsperma eingesetzt wurden. Erläuterungen zu den einzelnen Studien folgen im anschließenden Text.

Legende der Tab. 01:
FS = Frischsperma
k. A. = keine Angaben
NS = Nativsamen, unbehandelt
Oxy. = Oxytocin
Palp. = TU durch transrektale Palpation
pms = progressiv motile Spermien
postov. = nach Ovulation
VS = Versandsperma (24 Std. alt)

Tab. 01: Literaturvergleich zur Spermiendosis von Frischsperma

Autor	FS/VS	Dosis (Mio.)	Vol. (ml)	Gravidität %	Stuten	Anzahl KB	Std. n. hCG	Notizen	TU - Tag
PICKETT u. VOSS (1975)	NS	500	0,6 - 3,6	43	6 / 14	> 1		nicht signifikant	Palp. 50
		100	0,6 - 3,6	36	5 / 14				
	FS	500	-	72,2	13 / 18			signifikant im Tris - Verdünner	
		100	-	27,8	5 / 18				
	NS	500	-	88,9	16 / 18			Nativsperma	
HOUSEHOLDER et al. (1981)	FS	500 pms		75	18 / 24	> 1	24 Std., dann alle 48 Std.		
		50 pms		37,5	9 / 24				
KOSKINEN et al. (1990)	FS	500 pms		100	5 / 5	1		KB 6-18 postov.	16+21
				40	2 / 5			KB 18-24 postov.	
				0	0 / 5			KB 24-30 postov.	
SAMPER et al. (1991)	FS	500 pms		50	k. A. / 521	> 1	alle 48 Std.	TR/1. Zyklus	
JASKO et al. (1992)	FS	250 pms	10	70	35 / 50	> 1	alle 24 Std.	Embryo-spülung	7 p.i.
		250 pms	50	35,3	12 / 34				
		500 pms	10	77,8	14 / 18				
		250 pms	10	80	16 / 20				
		250 pms	50	60	12 / 20				
		1250 pms	50	78,9	15 / 19				

Fortsetzung der Tab. 01:

Autor	FS/VS	Dosis (Mio.)	Vol. (ml)	Gravidität %	Stuten	Anzahl KB	Std. n. hCG	Notizen	TU - Tag
BEDFORD u. HINRICHS (1994)	VS	250 pms	30	77,8	7 / 9	> 1	24Std.v.hCG		12+13
		250 pms	120	100	10 / 10				
GAHNE et al. (1998)	FS	500 pms		64	23 / 36	> 1	alle 48 Std.		16
		300 pms		75	21 / 28				
MANNING et al. (1998)	FS	100 pms	< 12	33	4 / 12	1	mit KB		14
		10 pms	2,5	17	2 / 12				
SQUIRES et al. (1998)	VS	1000 pms	40	64	16 / 25	2	mit 1. KB	n. Entnahme	12, 14 + 16
		1000 pms	40	31	9 / 29	1	mit KB		
		2000 pms	40	41,4	12 / 29	1	mit KB		
RIGBY et al. (1999)	FS	100	4	50	25 / 50	1	24	NaCl v. KB	14 + 16
		100	4	30	15 / 50			Oxy. v. KB	
BUCHANAN et al.`00	FS	500 pms	20	90	18 / 20	1	34 oder 40		12, 14 + 16
CLEMENT et al. (2000)	FS	200	10	36	4 / 11	1			10 + 12
		200	10	53	18 / 34	2	alle 48 Std.	Embryo-spülung	
		200	10	35	6 / 17	3	alle 48 Std.	Embryo-spülung	
McCUE et al. (2000)	FS	500 pms	20	40	6 / 15	1	24-28		12, 14 + 16
WOODS et al. (2000)	FS	25	1	56	10 / 18	1	24	PGE / NaCl	14 + 16

In vielen der hier erwähnten Studien betrug die Standardspermiendosis für Frischsperma 500 Mio. vorwärtsbewegliche Spermien. BEDFORD u. HINRICHS (1994) und GAHNE et al. (1998) haben die Erfahrung gemacht, dass es keinen negativen Einfluss auf die Trächtigkeitsergebnisse zu haben scheint, wenn anstelle der 500 Mio. mit 300 Mio. pms besamt wird. Bei Besamung in den Gebärmutterkörper mit 250 bis 2000 Mio. pms wird bei den hier erwähnten Studien im Durchschnitt eine Trächtigkeitsrate von etwa 63 % erwartet. In Frankreich wurden in einer umfangreichen Studie von VIDAMENT et al. (1999) Versuche zum Einfluss des Spermienalters nach Samenentnahme auf die Fertilität von Stuten durchgeführt. Es ergab sich eine Trächtigkeitsrate pro Zyklus von 56% (n = 5300 Zyklen), wenn die Insemination unmittelbar nach Gewinnung der Spermien stattfand. Bei Besamung innerhalb von 12 Stunden nach der Samenentnahme lag die Befruchtungsrate bei 56% (n = 2050 Zyklen), bzw. bei 49% (n = 4030 Zyklen), wenn innerhalb der 12 h nach Gewinnung das Sperma zusätzlich noch transportiert wurde.

McKINNON (1994) erstellte eine wahrscheinliche Trächtigkeitsrate anhand der Fertilität von Hengsten. Sie besagt, dass zwei sehr unterschiedlich fertile Hengste gleichwohl beide Befruchtungsergebnisse von 75% erreichen könnten, der fertilere Hengst schon nach zwei, der andere allerdings erst nach 6 Zyklen pro Stute. Statistisch geht McKINNON (1994) davon aus, dass die Fertilitätsergebnisse beim Einsatz von kryokonserviertem Sperma etwa an 50% der beim Einsatz von Frischsperma erzielten Trächtigkeitsraten heranreichen.

PICKETT und VOSS (1975) verglichen in ihrer Studie Besamungsdosen von 500 Mio. und 100 Mio. unbehandelten Spermien und erhielten Befruchtungsraten von 36 und 43 %, die sich nichtsignifikant voneinander unterschieden. Wurde das Ejakulat jedoch mit Trisverdünner aufbereitet, unterschieden sich die Trächtigkeitsraten bei einer Dosis von 500 Mio. (72,2%) bzw. 100 Mio. (27,8%) signifikant voneinander. In einer Studie von HOUSHOLDER et al. (1981) stellten sich für die mit 500 Mio. pms (75%) besamten Stuten gegenüber denen, die 50 Mio. pms (37,5%) erhielten, auch signifikant bessere Konzeptionsraten heraus. MANNING et al. (1998) besamten 12 Stuten mit 100 Mio. progressiv motilen Spermien (pms) in den Gebärmutterkörper und erhielten eine Trächtigkeitsrate von 33%. Mit 10 Mio. pms wurden noch 17% (2/10) tragend.

BUCHANAN et al. (2000) erreichten bei Besamung in den Gebärmutterkörper mit 500 Mio. Spermien und einem Besamungsvolumen von 20 ml eine Trächtigkeitsrate von 90% (18/20),

während SAMPER et al. (1991) 521 Stuten alle 48 Stunden mit 500 Mio. motilen Frischspermien versorgten und nach dem ersten Zyklus Trächtigkeitsraten von durchschnittlich 50% erhielten. JASKO et al. (1992) zeigten, dass das Besamungsvolumen von 50 ml (Spermiendosis:1250 Mio. pms) im Vergleich mit einem Besamungsvolumen von 10 ml (Spermiendosis: 250 Mio. pms) bei einer Konzentration von 25 Mio. pms/ml keinen Einfluss auf die Ergebnisse besitzt. Es wurden jeweils 19 Embryonen von 24 bzw. 25 Stuten zurückgewonnen. Es stellte sich heraus, dass eine niedrige Spermienkonzentration (5 Mio. pms/ml) bei großem Besamungsvolumen (50ml) einen negativen Einfluss auf die Anzahl der zurückgewonnenen Embryonen hatte.

In einer Studie von WOODS et al. (1990) führten die Autoren in ihren Untersuchungen Einzelinseminationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch. Eine Gruppe von Stuten wurde mit Erreichen eines Follikeldurchmessers von 35 mm besamt. Eine weitere wurde am Tag der Ovulation und eine letzte Gruppe einen Tag nach der Ovulation besamt. Die Inseminationsdosis betrug mindestens 400 Mio. bewegliche Spermien. Die daraus resultierenden Trächtigkeitsraten lagen bei 61, 52 und 6%. Demnach wiesen die am Tag nach der Ovulation belegten Tiere signifikant schlechtere Ergebnisse auf. Die Stuten, die 1, 2 oder 3 Tage prae ovulationem besamt wurden, hatten signifikant bessere Ergebnisse als die 4, 5, 6 oder mehr Tage vor dem Eisprung besamten Tiere. WOODS et al. (1990) beobachteten bei postovulatorisch besamten Stuten eine erhöhte Embryosterblichkeit zwischen Tag 11 und Tag 40 der Trächtigkeit. Die Ergebnisse einer Studie von KOSKINEN et al. (1990) lagen bei 100% (10/10), wenn die Stuten mit 500 Mio. pms in einem Zeitraum von 6 bis 18 Stunden post ovulationem besamt wurden. Im Zeitraum 18 bis 24 Stunden nach Ovulation sind es noch 40% und nach 24 Stunden 0%. In einem zweiten Experiment wurden die Stuten 0 bis 27 Stunden nach Ovulationsfeststellung besamt. Dabei erreichten sie eine Konzeptionsrate von 46% (13/28). Auffällig ist auch in dieser Arbeit die ungewöhnlich hohe frühe Embryomortalität. Vier der 13 Stuten verloren bis Tag 21 ihre Frucht und eine mit über 21 Tagen Trächtigkeit.

Die von BEDFORD und HINRICHS (1994) 18-30 Stunden nach Samengewinnung entweder mit 30 ml oder 120 ml besamten Ponystuten wiesen keinen signifikanten Trächtigkeitsunterschied auf (7/9 u. 10/10). Eine Spermiendosis von 250 Mio. pms wurde zwei Tage nach Erreichen eines 30 mm Follikels im 48-Stunden-Intervall eingesetzt. GAHNE et al. (1997) untersuchten an 64 Stuten, ob es einen signifikanten Unterschied in der

Trächtigkeitsrate ergibt, wenn die Stuten anstelle der 500 Mio. pms mit 300 Mio. pms belegt werden. Die im 48-Stunden-Intervall besamten Stuten beider Gruppen erreichten Konzeptionsraten von 64% (23/36) und 75% (21/28) und unterschieden sich nicht signifikant. SQUIRES et al. (1998) behandelten in einer Studie die Frage, ob es sinnvoller sei, beim Versand von Sperma die zweite Portion der selben Charge mit dem ersten Besamungstermin als Doppeldosis zu inseminieren oder diese am Folgetag, 48 Stunden nach der Samenentnahme, einzusetzen. Das Versuchsschema bestand aus drei Gruppen; in der ersten wurde mit einer Milliarde pms bei Anwesenheit eines präovulatorischen Follikels von mindestens 40 mm in den Gebärmutterkörper besamt. Zeitgleich bekamen alle Stuten 2500 IU hCG und wurden am darauffolgenden Tag ein zweites Mal mit 1 Mrd. pms besamt. Um den Versand zu simulieren war das bei 5°C gekühlte Sperma schon bei der ersten Besamung 24 Stunden und bei der zweiten Samenübertragung 48 Stunden alt. In Gruppe 2 und 3 wurden die Stuten nur einmal nach 24 Stunden mit einer bzw. zwei Milliarden pms besamt. Die Ergebnisse fielen folgendermaßen aus: In Gruppe 1 wurden 64% der Stuten tragend (16/25), in Gruppe 2 waren es 31 % (9/29) und in der dritten Gruppe konzipierten 41% (12/29). SQUIRES et al. (1998) folgerten aus diesen Resultaten, dass die Besamung in Ovulationsnähe einen entscheidenden Einfluss auf die Trächtigkeitsrate besitzt. Um bei den Einzelbesamungen näher an den Ovulationszeitpunkt heranzukommen, müsse die hCG-Gabe möglicherweise 24 Stunden vorverlegt werden. Hier merken die Autoren jedoch an, dass es unter praktischen Gesichtspunkten sinnvoller sei, mit der Ovulationsinduktion bis zum Eintreffen der Spermiendosis beim Züchter zu warten.

RIGBY et al. (1999) besamten einmal pro Rosse mit 100 Mio. Frischspermien (BV: 4ml). Im Anschluss an die Besamung wurde den Stuten 20 IU Oxytocin intravenös verabreicht. Die Verfasser hatten die Hoffnung, durch die Gabe von Oxytocin die Kontraktilität von Myometrium und Myosalpinx zu erhöhen. So sollten mehr Spermien am Ort der Befruchtung ankommen und sich daraus eine höhere Trächtigkeitsrate ergeben. Es stellte sich allerdings heraus, dass das exogen zugefügte Oxytocin keinen nachweisbaren Effekt auf die Trächtigkeitsrate zu haben schien (30%). Das Resultat von 50% Trächtigkeit in der Kontrollgruppe machte demgegenüber deutlich, dass selbst mit einem Fünftel der Standarddosis noch akzeptable Trächtigkeitsraten erreicht werden können.

CLEMENT et al. (2000) besamten Stuten mit einem präovulatorischen Follikel von mindestens 30 mm Durchmesser im 48-Stunden-Abstand. Die Besamungsdosis enthielt eine

Gesamtspermienzahl von 200 Mio. in 10 ml. Bei den zwei- bis dreifach besamten Stuten erhielten CLEMENT et al. (2000) eine Trächtigkeitsrate von 47% pro Zyklus. Dabei erwiesen sich die Mehrfachbesamungen als nicht signifikant besser im Vergleich zu den Einzelbesamungen, bei denen 4 von 11 Tieren konzipierten (36%). Auch in der Versuchsreihe von SCHÄFER (2001) erwiesen sich in der Frischsamenübertragung die Einzelbesamungen in den letzten 24 Stunden vor und in den ersten 12 Stunden nach der Ovulation als ähnlich erfolgreich wie die Mehrfachbelegungen im 24-Stunden-Intervall.

NIE et al. (2002) selektierten in ihrer Studie Ejakulate nach unterschiedlichen Charakteristika (Vorwärtsbeweglichkeit, normale Morphologie, hyperosmotisches Schwellvermögen und Gesamtspermienzahl) und verglichen sie hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Fruchtbarkeitsergebnisse. Die Stuten wurden mit 100 Mio. oder 500 Mio. Spermien besamt und erreichten folgende Trächtigkeitsraten: 44 und 41%, 55 und 41%, 39 und 31% und 45 und 41%. Die Autoren bemerkten, dass keine der Evaluationsmethoden zur Spermienselektion für die Trächtigkeitsrate von signifikanter Bedeutung ist. Demnach hätte es also keinen Einfluss auf das Ergebnis, wenn anstelle des auf einen bestimmten Parameter selektierten Ejakulats (z.B. Vorwärtsbeweglichkeit) ohne weitere Evaluation nur mit einer spezifischen Gesamtspermiendosis besamt würde. NIE et al. (2002) vermuten daher, dass die verwendeten Besamungsdosen über dem Schwellenwert des in dem 1983 von SAACKE beschriebene Zusammenhangs von Spermiendosis und Fertilität liegen könnten, da man andernfalls mit einem identifizierbaren, dosisabhängigem Fertilitätsoptimum rechnen würde. SAACKE (1983) beschreibt das Model von SALISBURY und VAN DEMARK (1961), das besagt, dass die Anzahl an Spermien in einer Spermiendosis soweit angehoben werden kann, bis sich die Fertilitätsergebnisse nicht weiter verbessern. Hier ist der sogenannte Schwellenwert erreicht, der die optimale Besamungsdosis darstellt. SAACKE (1983) weist allerdings darauf hin, dass dieses Modell verschiedenen Einflussfaktoren unterliegt und der Schwellenwert keine Konstante darstellt.

3.2.1.2 Tiefgefriersperma

In der folgenden Tabelle (Tab. 02) werden Studien zur Spermiendosis beim Einsatz von Tiefgefriersperma in Kurzform zusammengefasst und im anschließenden Text erläutert.

Tab. 02: Literaturvergleich zur Spermiendosis von Tiefgefriersperma

Autor	Dosis (Mio.)	Vol (ml)	TR / Zyklus (%)	Stuten	KB	Std. n. hCG	Notizen	TU - Tag
CHRISTIANELLI et al. (1984)	161-340 pms		56	k. A.	> 1	täglich	TU palp.	50
MÜLLER (1987)	300 pms n. d. A.	15	56	537 / 959	> 1	∅ 2,2	TU palp.	60
KLOPPE et al. (1988)	600	4	60	k.A. / 20	> 1	täglich	a.ov.	18
			55	k. A. / 20	1	max. 6 Std	p. ov.	18
SAMPER et al. (1991)	10 000		50	k. A. / 117		12 Std. p. ov.	TR / 1. Zyklus	
KATILA et al. (1996)	200 - 400 pms		30	10 / 34	> 1	alle 48 Std.	a. ov.	15
	200 - 400 pms		18	6 / 34	1	-	p.ov.	
VIDAMENT et al. (1997)	300		26	k. A. / 508	1			
	150		21	k. A. / 71				
LEIPOLD et al. (1998)	1600 / ml = 800 pms		33	8 / 24	> 1	alle 24 Std.	h. Konz / gr.Z.	12 + 14
	400 / ml = 800 pms		28	7 / 25			g. Konz / gr.Z.	
	1600 / ml = 320 pms		40	10 / 25			h. Konz / kl.Z.	
	400 / ml = 320 pms		15	4 / 26			g. Konz / kl.Z.	
VIDAMENT et al. (1999)	400		49	k. A/ 4190	> 1	alle 24 Std.		
NECOMBE (1999)	k. A.		40	37 / 93	1		b.12 Std. p.ov.	
MORRIS et al. (2000)	5 pms	0,1	25	k. A. / 8	1	30 - 32		
SCHÄFER (2001)	800	12	45	104 / 231	1+ >1			

a. ov. = ante ovulationem
p. ov. = post ovulationem
TU palp. = Trächtigkeitsuntersuchung per rektaler Palpation
k. A. = keine Angaben
gr. Z. = große Zahl an Spermien
kl. Z. = kleine Zahl an Spermien
g. Konz = geringe Konzentration
h. Konz = hohe Konzentration
n. d. A. = nach dem Auftauen

Bei Besamungen mit Tiefgefriersamen werden üblicherweise 800 Mio. bis 1 Mrd. Gesamtspermien mit einer Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 35% verwendet. Die durchschnittliche Trächtigkeitsrate beim Einsatz von 5 - 10 000 Mio. Spermien (überwiegend pms nach dem Auftauen) liegt in den hier erwähnten Studien (Tab. 02) bei etwa 38 %.

CHRISTIANELLI et al. (1984) besamten in einer mehrstufigen Versuchsreihe die Stuten mit einer Dosis von 161 bis 340 vorwärtsbeweglichen Spermien nach dem Auftauen und erreichten damit Trächtigkeitsraten von durchschnittlich 56%. In einer mehrjährigen Studie von MÜLLER (1987) wurden von 959 Stuten 537 tragend (56%). Es zeichneten sich Unterschiede bezogen auf die Fertilität der eingesetzten Hengste (29-62%) sowie individuelle Erfolgsquoten der unterschiedlich angelernten Besamungstechniker (0-79%) ab. KLOPPE et al. (1988) erreichten bei prä- bzw. postovulatorischer Besamung Trächtigkeitsraten von 60 und 55%. In einer Studie von SAMPER et al. (1991) wurden 177 Stuten innerhalb von 12 Stunden nach Ovulation mit 1 Milliarde Spermien insgesamt besamt. Die durchschnittliche Befruchtungsrate lag bei 50% nach dem ersten Zyklus.

LEIPOLD et al. (1998) verglichen Spermienkonzentration und Spermienanzahl in Tiefgefriersamen in Hinblick auf die Trächtigkeiten. Unterteilt in vier Besamungsgruppen wurden die Stuten einmal mit einer geringen Spermienkonzentration (400 Mio. Spermien/ml) und Dosis (320 Mio. pms), einmal mit einer geringen Spermienzahl bei hoher Konzentration (1600 Mio. Spermien/ml) und umgekehrt einmal mit großer Spermienanzahl (800 Mio. pms) in niedriger Konzentration und in der letzten Gruppe mit großer Spermienanzahl und hoher Konzentration besamt. Die Trächtigkeitsergebnisse lagen bei 15% (4/26), 40% (10/25), 28% (7/25) und 33% (8 /24).

In einer Feldstudie von VIDAMENT et al. (1997) zur Gefrierfähigkeit und Fertilität von Tiefgefriersperma wurden Besamungsdosen von 300 oder 150 Mio. Gesamtspermien eingesetzt. Bei Stuten, die zweimal pro Östrus besamt wurden, ergaben sich gegenüber den Einzelbesamungen (34%, n = 1576 vs 26%, n = 626; $P < 0{,}001$) signifikante Unterschiede. Wenn man nur die Einzelbesamungen betrachtet, die innerhalb von 24 Stunden vor Ovulation vorgenommen wurden, so erhält man für die mit 300 Mio. Spermien belegten Stuten (26%, n = 508) keine signifikant besseren Ergebnisse als für die Stuten die nur 150 Mio. Spermien bekamen (21%, n = 71). Die Trächtigkeitsraten (pro Zyklus) für Maiden-, Fohlen- und güste

Stuten sowie Stuten, die abortiert hatten, waren gleich: 31% (n = 281), 33% (n = 1326), 29% (n = 611) und 28% (n = 123).

KATILA et al. (1996) besamten die Stuten mit 200 bis 400 Mio. pms alle 48 Stunden bis zur Ovulationsdetektion. Von den präovulatorisch besamten Stuten erwiesen sich am Tag 15 nach Ovulation 30% als tragend, während in der Gruppe der postovulatorisch besamten die Trächtigkeitsrate bei 18% lag. NEWCOMBE (1999) führte Einzelbesamungen mit Tiefgefriersperma in den ersten zwölf Stunden nach Ovulationsfeststellung durch, und erreichte eine Trächtigkeitsrate von 40%. In den Saisons 1996-1999 erreichten VIDAMENT et al. (1999) mit Tiefgefriersperma bei Besamung mit 400 Mio. Spermien in einem Intervall von 24 Stunden eine Trächtigkeitsrate von 49% (n = 4190). In einer Studie von SCHÄFER (2001) wurden die Stuten mit 800 Mio. pms in den Gebärmutterkörper besamt. Wenn die Stuten 12 Stunden vor bis 12 Stunden nach Ovulation besamt wurden, ergaben sich keine signifikanten Trächtigkeitsunterschiede gegenüber Mehrfachbesamungen.

3.2.2 Inseminationstechnik

In Tabelle 03 werden Studien zur Besamungstechnik in Kurzform zusammengefasst und im anschließenden Text erläutert.

Tab. 03: Literaturvergleich zur Besamungstechnik

Autor	FS/VS/ TG	Dosis (Mio.)	Vol. (ml)	KB-Technik	TR/Zykl. (%)	Stuten	KB	Std. n.hCG	Notizen	TU - Tag
FEO et al. (1992)	TG	250 - 350	4	ICPI	32	8 / 25				
				TICNI	66,6	32 / 48				
MANNING et al. (1998)	FS	100 pms	< 12	ICPI	33	4 / 12	1	mit KB		14
		10 pms	2,5		17	2 / 12				
		10 pms	0,25	HYSI-	0	0 / 11			keine Kontr.	
		1 pms	< 0,16	Ovidukt	22	2 / 9			keine Kontr.	
VAZQUEZ et al. (1998)	FS	3,8 pms	0,2	HYSI	33	3 / 10	1	24		14, 25
BUCHANAN et al. (2000)	FS	500 pms	20	ICPI	90	18 / 20	1	34 oder 40		12, 14, 16
		25 pms	1	TICNI	57	12 / 21			rektal US-	
		5 pms	0,2 - 1		35	7 / 20			Kontrolle	
		25 pms gesext	1		30	3 / 10		34		16
		25 pms gesext	1		50	5 / 10		34	in Eigelbverd.	
WOODS et al. (2000)	FS	25	1	ICPI	56	10 / 18	1	24	PGE / NaCl	14, 16
				TICNI	63	10 / 16		24	PGE / NaCl	
McCUE et al. (2000)	FS	500 pms	20	ICPI	40	6 / 15	1	24-28		12, 14, 16
		0,05 pms	0,05	Ovid. OP	21,4	3 / 14		24-28	Infundibulum	
MORRIS et al. (2000)	FS	10	0,03-0,15	HYSI	60	6 / 10	1	30-32	keine Kontr.	2 bis 3
		5			75	6 / 8				Eil.-Spülg.
		1			64	16 / 25				p.m.
		0,5			29	k. A. / 14				
		0,1			22	k. A.				
		0,001			10	k. A.				
	TG	5 pms	0,1		47	k. A. / 34				
		5 pms		ICPI	25	k. A. / 8				
RIGBY et al. (2001)	FS	5	0,2	TICNI	50	10 / 20	1	24	rektal gef.	12, 14
				HYSI	62	13 / 21				

Fortsetzung der **Tab. 03:**

Autor	FS/VS/TG	Dosis (Mio.)	Vol. (ml)	KB-Technik	TR/Zykl. (%)	Stuten	KB	Std. n. hCG	Notizen	TU - Tag
LINDSEY et al. (2001, 2002 a, b)	FS	5	0,23	HYSI	40	4 / 10	1	6		16
		5 gesext			37,5	6 / 16		6	gesext	
	TG	5			37,5	6 / 16		30		
		5 gesext			13	2 / 15		30	gesext	
	FS	5	0,1	TICNI	0	0 / 10				
		5		HYSI	50	5 / 10				
		5 gesext			25	5 / 20			gesext	
		20 gesext			30	6 / 20			gesext	
	VS	20 gesext			35	7 / 20			gesext	
LINDSEY et al. (2002 c)	VS	20 gesext	0,3	HYSI	72	18 / 25	1	30	15° C	12 - 14
		20 gesext			55	12 / 22			5° C	
		20 gesext		TICNI	38	9 / 24			5° C	
ALVARENGA et al. (2002)	TG	10 pms		HYSI	33,3	4 / 12	1	0 - 8 p. OvF.	Percoll beh.	14
		10 pms			33,3	4 / 12			-	
		400 pms		ICPI	0	0 / 12			-	
PETERSEN et al. (2002)	TG	50 pms		TICNI	64	7 / 11	2	12 + 36		7 Embryo
	FS / VS	500 pms		ICPI	37	4 / 11		12 + 24	2. KB 24 Std.	
SQUIRES et al. (2002)	TG	800		ICPI	60	12 / 20	1	6 p. Ov.	3 x US	7 - 9
		400	0,5		55	11 / 20	2	24 + 40	1 x US	
		200	-		50	10 / 20			-	
		200	-	TICNI	20	4 / 20			rekt. geführt	

Legende:

OvF. = Ovulationsfeststellung
HYSI = Hysteroskopische Insemination
HYSI-Ovidukt = Katheter über HYSI in Eileiter vorgeschoben
Ovid. OP = Eileiterbesamung per Flankenschnitt
rektal gef. = transrektale palpatorische Kontrolle der Besamungspipette

FS = Frischsperma
VS = Versandsperma
Kontr. = Kontrolle
TG = Tiefgefriersperma
Eil.-Spülg. = Eileiterspülung

3.2.2.1 Frischsperma

In einer Studie von MANNING et al. (1998) zur endoskopisch geleiteten Samenübertragung in den Eileiter wurden die Stuten der ersten beiden Gruppen mit Frischsperma in den Gebärmutterkörper besamt, wobei Stuten der Gruppe 1 mit 100 Mio. PMMN (Progressiv-motile, morphologisch normale) Spermien in ca. 12 ml und Stuten der Gruppe 2 mit 10 Mio. PMMN Spermien in 2,5 ml besamt worden waren. In den Gruppen 3 und 4 wurden hysteroskopisch einmal 10 Mio. PMMN Spermien in 0,25 ml sowie 1 Mio. in 0,16 ml im ipsilateral zur Ovulation liegenden Eileiter abgesetzt. Bei einem präovulatorischen Follikel von >35mm ∅ bekamen die Stuten zeitgleich mit der Besamung 2000 IU hCG verabreicht und wurden für die Hysteroskopie mit Detomidine® und Butorphanol® sediert. Das Endoskop wurde durch die Zervix in die Gebärmutter eingeführt und anschließend Luft insufflliert. Nachdem der Besamungskatheter die Hornspitze erreicht hatte, wurde er durch die Öffnung der uterotubalen Papille in den Eileiter eingeführt. Die Trächtigkeitsraten für die Gruppen 1 - 4 fielen wie folgt aus: 1. Gruppe 4/12 Stuten (33%), 2. Gruppe 2/12 Stuten (17%), 3. Gruppe 0/11 Stuten (0%) und 4. Gruppe 2/9 Stuten (22,2%). Drei Stuten der 4. Gruppe hatten nach 3 Tagen noch nicht ovuliert. Zwei der hysteroskopisch besamten Stuten reagierten mit einer postinseminatorischen Flüssigkeitsansammlung in der Gebärmutter.

VAZQUEZ et al. (1998) besamten 10 Stuten mit 3,8 Mio. vorwärtsbeweglichen Frischspermien in 0,20 ml durch ein Hysteroskop direkt auf die Uterotubalpapille. Die Stuten wurden 24 Stunden nach Gabe von 2500 IU humanem Choriongonadotropin besamt. Die Mindestgröße des dominanten Follikels lag mit Applikation von hCG bei 35mm ∅. Es wurde eine Trächtigkeitsrate von 33% erreicht. Bei sechs Stuten hatte sich nach der Besamung Flüssigkeit in der Gebärmutter angesammelt.

In einer 1999 durchgeführten Studie verglichen LINDSEY et al. (2002 a) die hysteroskopische Besamung mit der tiefintracornualen Insemination. Die Stuten wurden mit 5 Mio. motilen Spermien je zur Hälfte mit einem Videoendoskop direkt auf die Uterotubalpapille bzw. mit Hilfe einer flexiblen Pipette unter Ultraschallkontrolle in die Hornspitze besamt. In der hysteroskopisch besamten Gruppe wurden fünf von zehn Stuten tragend (50%), in der tiefintracornualen keine. Warum das zweite Ergebnis so unbefriedigend ausfiel, konnten sich die Autoren nicht erklären; denn immerhin erreichten BUCHANAN et al. (2000) mit dieser Technik und gleicher Dosis eine Trächtigkeitsrate von 35%. In einer

weiteren Gruppe von LINDSEY et al. (2002 a) wurde bei 5 von 20 Stuten, die mit 5 Mio. gesextem Frischspermien hysteroskopisch inseminiert wurden, eine Trächtigkeit festgestellt (25%).

WOODS et al. (2000) überprüften den Effekt einer tiefintracornualen Prostaglandingabe (0,25mg PGE_2) zwei Stunden vor Insemination auf die Trächtigkeitsergebnisse. Die Stuten wurden in eine corporale und eine tiefintracornuale Besamungsgruppe eingeteilt. Bei der tiefintracornualen Insemination bzw. zur Applikation der PGE_2-Gabe wurde eine flexible Pipette unter manueller rektaler Kontrolle bis in die Hornspitze vorgeführt. Die Besamungsdosis betrug 25 Mio. Gesamtspermien (BV: 1ml) von einem Hengst mit anerkannt guter Fertilität oder einem zweiten Hengst mit geringerer Fertilität. WOODS et al. (2000) erreichten Befruchtungsergebnisse von 59 und 29 %. Die Prostaglandin-Gabe wirkte sich nur bei dem fertilen Hengst signifikant positiv auf die Trächtigkeitsrate aus. Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Besamungstechniken waren jedoch gleich: 56% der Stuten wurden mit der herkömmlichen Besamung und 63% mit Hilfe der tiefintracornualen Insemination tragend.

In einer Studie von RIGBY et al. (2000) wurden die Stuten wiederum jeweils 2 Stunden vor Insemination tiefintracornual mit einer Dosis von 0,25mg/ml Prostaglandin E_2 in physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Die Stuten der einen Gruppe wurden hysteroskopisch mit einem Videoendoskop direkt auf die Uterotubalpapille besamt, während bei der anderen Gruppe das Sperma mit Hilfe transrektaler Palpationskontrolle in der Hornspitze abgesetzt wurde. In zwei weiteren Gruppen wurde zur Kontrolle je ein Milliliter Kochsalzlösung zwei Stunden vor Samenübertragung in die Uterushornspitze eingebracht. Bei präovulatorischen Follikeln von >33mm Durchmesser wurde 2500 IU hCG i.v. verabreicht und 24 Stunden später besamt. Die Besamungsdosis wurde auf eine Gesamtspermienzahl von 5 Mio. festgelegt und das Besamungsvolumen betrug 0,20 ml. Vor der Besamung wurde das Sperma 24 Stunden in einem Equitainer, einem speziell für Hengstsperma konzipierten Lagerungsbehältnis, gelagert, anschließend zentrifugiert und mit Milch-Glucose-Verdünner auf die gewünschte Dichte eingestellt. Zwischen den Gruppen, die PGE_2 bekommen hatten, und denen, die keines bekommen hatten, gab es im Hinblick auf die Befruchtungsergebnisse (55% u. 57%) keinen Unterschied. Bei den hysteroskopisch besamten Stuten lag die Konzeptionsrate bei 62% (13/21), bei der TICNI wurden 10 von 20 Stuten tragend (50%). Eine signifikante Differenz war bei keiner der Gruppen festzustellen.

BUCHANAN et al. (2000) besamten 20 Stuten mit 500 Mio. Frischspermien (20 ml) in den Gebärmutterkörper und in einer zweiten Gruppe 21 Stuten mit 25 Mio. pms/ml tiefintracornual, wobei der Sitz des flexiblen Katheters transrektal sonographisch kontrolliert wurde. In einer weiteren Gruppe wurden 20 Stuten mit 5 Mio. pms in 0,2 oder 1,0 ml tiefintracornual inseminiert. Bei allen Stuten wurde die Ovulation mit einem GnRH-Analoga (Deslorelin®) eingeleitet und 34 Stunden später mit Frischsperma besamt. Von den 20 Stuten, die mit 500 Mio. Spermien besamt worden waren, wurden 18 Tiere tragend (90%); 12 von 21 Stuten wurden tragend, nachdem sie mit 25 Mio. Spermien besamt worden waren (57%), und in der dritten Gruppe, in der mit 5 Mio. Spermien besamt wurde, wurden 7 von 20 Stuten tragend (35%).

In einer Studie von McCUE et al. (2000) wurde die Spermiendosis von 50 000 frischen pms operativ per Flankenschnitt direkt in den Eileiter verbracht und eine Trächtigkeitsrate von 21,4 % erzielt. Die intrauterine Kontrollgruppe unterschied sich mit einer Trächtigkeitrate von 40 % nicht signifikant von der Versuchsgruppe.

MORRIS et al. (2000) machten hysteroskopische Besamungsversuche mit unterschiedlicher Spermienanzahl. Ab einer Follikelgröße von 35mm ∅ leiteten sie die Ovulation mit hCG oder GnRH ein. Mittels eines elektronischen Videoendoskops wurde das Sperma nach transzervikaler Insufflation von Luft direkt in kleinen Bläschen auf der Uterotubalpapille abgesetzt. Während der 45-60 Minuten andauernden Aufbereitung des Spermas wurde es im verdünnten Zustand durch die Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation konzentriert und anschließend anhand eines Densimeters auf die gewünschte Dichte eingestellt. MORRIS et al. (2000) verwendeten ein Besamungsvolumen von je etwa 100µl. Die Versuchsgruppen 1 - 6 dieser Studie wurden mit den nachfolgenden Konzentrationen an Frischsperma besamt: 10 Mio., 5 Mio., 1 Mio., 0,5 Mio., 0,1 Mio und 0,001 Mio. Spermien. Bei der hysteroskopischen Besamung wurde ein equiner GIFT-Katheter (Gamete-Intrafallopian-Transfer, Fa. Cook Veterinary Products, Brisbane) und ein Videoendoskop (Pentax EPM 3000, Fa. Pentax UK Ltd, Slough) verwendet. Die Trächtigkeitsergebnisse stellen sich wie folgt dar: Sechs von zehn Stuten (60%) wurden in Gruppe 1 tragend, in Gruppe 2 waren es 75% (6 von 8 Stuten) und in Gruppe 3 waren es 64% (16/25). In den Gruppen 4, 5 und 6 nimmt die TR deutlich ab: In Gruppe 4 wurden noch 29% erreicht und in den Gruppen 5 und 6 waren es nur noch 22% bzw. 10% Trächtigkeit. Sechs der Stuten der ersten drei Gruppen wurden zwei bis drei Tage

nach der Ovulation getötet, um die Eileiter zu spülen und die befruchteten Eizellen zu bestimmen. Alle 6 Stuten waren tragend und besaßen Embryonen im 4 - bis 8-Zellstadium.

Bei einer Vergleichsstudie von RIGBY et al. (2000) kam heraus, dass sich 18 Stunden nach der Besamung eine signifikant höhere Anzahl von Spermien im ipsilateralen Ovidukt befinden, wenn man anstatt der Insemination in den Uteruskörper tiefintracornual besamt. Der Sitz der Besamungspipette wurde durch transrektale Palpation an der Hornspitze kontrolliert. Zur Besamung wurde eine Dosis von 500 Mio. pms in 10 ml verwendet. 18 Stunden post inseminationem wurden die 20 Versuchstiere ovariohysterektomiert, die Eileiter gespült und die zurückgewonnenen Spermien quantitativ ausgewertet. Bei der Hälfte der Stuten war im Voraus eine verzögerte Clearancefunktion der Gebärmutter festgestellt worden. Es sollte geklärt werden, ob durch die herabgesetzte Uterusmotilität dieser Stuten weniger Spermien im Ovidukt anzutreffen waren als bei normal fertilen Stuten. Die Anzahl der Spermien im Ovidukt war jedoch bei beiden Gruppen gleich. RIGBY et al. (2000) vermuten, dass nach 18 Stunden post inseminationem selbst den Stuten mit verzögerter Reaktion genügend Zeit gelassen wurde, die Spermien zum Eileiter zu befördern, und sich so die Unterschiede zu anderen Studien, die im kürzeren Abstand nach Besamung die Anzahl der Spermien im Ovidukt untersucht hatten, erklären ließen.

LINDSEY et al. (2002 b) führten verschiedene Besamungsversuche durch. Nach hysteroskopischer Insemination von je 5 Mio. gesexten und nicht sortierten Spermien erhielten LINDSEY et al. (2002 b) Trächtigkeitsraten von 37,5 und 40%. Da es offensichtlich Schwierigkeiten bereitet, gesextes, kryokonserviertes Sperma erfolgreich einzusetzen, suchten LINDSEY et al. (2001) nach folgender Alternative: Sie besamten 20 Stuten mit 20 Mio. Frischspermien, welche sofort nach der Samenentnahme per Flowzytometrie gesext wurden. In einer zweiten Versuchsgruppe ließen sie das Sperma vor dem Sexen für 18 Stunden bei 20°C Raumtemperatur stehen. Beide Gruppen erhielten Ergebnisse um die 30-35 %. LINDSEY et al. (2001) verfolgten die Überlegung, anstelle des gesexten Gefrierspermas vorzugsweise Frischsperma an Reproduktionszentren zu schicken, die in der Lage sind Sperma zu sexen, um die Stuten dann vor Ort zu besamen. In einer weiteren Versuchsreihe, die sich mit derselben Problematik befasste, besamten LINDSEY et al. (2002 c) jeweils 25 und 22 Stuten hysteroskopisch mit 20 Mio. durch Flowzytometrie gesexten Frischspermien. Im ersten Fall wurde das Sperma bei 15 °C und in der zweiten Gruppe bei 5 °C für 18 Stunden gelagert. In einer dritten Gruppe wurde eine Dosis von 20 Mio. gesexten

Frischspermien nach 18 Stunden Verwahrung bei 5 °C mittels rektal geleiteter tiefintracornualer Besamung direkt an die Hornspitze verbracht. Die Trächtigkeitsergebnisse fielen mit 72, 55 und 38% in der Tendenz besser für die hysteroskopisch besamten Stuten aus, bei denen das Sperma bei 15 °C gelagert wurde.

Bei einer hysteroskopischen Versuchsreihe von KOENE et al. (2002) wurden drei Hengste mit unterschiedlicher Reproduktionsgeschichte eingesetzt: Ein Hengst hatte mit nur einem Hoden nach Orchidektomie einen verminderten Spermienausstoß, der zweite Hengst besaß eine gute Fertilität und wurde aufgrund der starken Nachfrage in die Untersuchungsreihe mit aufgenommen und der dritte war ein Junghengst. Die eingesetzten Spermiendosen variierten zwischen 6 und 200 Mio. motilen Spermien. KOENE et al. (2002) erreichten bei 71 tragenden Stuten insgesamt – bezogen auf die Anzahl an Stuten – eine Trächtigkeitsrate von 39,9%.

3.2.2.2 Tiefgefriersperma

In zwei ähnlichen Studien zeigten FÈO et al. (1992), dass zwar die Spermienanzahl im jeweiligen Uterushorn nach postmortaler Spülung bei der tiefintracornualen Besamung höher war als bei der Besamung in den Gebärmutterkörper, die Anzahl der Spermien in den p.m. gespülten Eileitern jedoch durch die verschiedenen Techniken kaum beeinflusst wurden. Allerdings stellten sich in einer zweiten Studie, in der 48 Stuten mit 250 - 350 Mio. motilen Spermien tiefintracornual (66,7%) und 25 Stuten in den Uteruskörper (32%) besamt wurden, die Trächtigkeitsraten der intracorporal besamten Stuten signifikant schlechter dar. MORRIS et al. (2000) verwendeten in ihren Versuchen jeweils 5 Mio. vorwärtsbewegliche Tiefgefrierspermien bei einmaliger Besamung. Es wurden 34 Stuten hysteroskopisch besamt und acht Stuten in den Gebärmutterkörper. Die Trächtigkeitsrate lag für die uterotubale Insemination bei 47 und in der Kontrollgruppe (n = 8) bei 25%.

In der Studie von LINDSEY et al. (2002 b) verglichen sie die Trächtigkeitsraten nach hysteroskopischer Insemination von je 5 Mio. gesexten Frisch- und Tiefgefrierspermien mit je 5 Mio. nicht sortierten Spermien. Laut LINDSEY et al. (2002 b) können maximal 15 Mio. Spermien pro Stunde durch Flowzytometrie nach X- oder Y- tragenden Chromosomen getrennt werden. Eine erfolgreiche Besamungstechnik mit reduzierter Spermiendosis würde den Einsatz von gesextem Sperma erheblich erleichtern. Die Trächtigkeitsraten für die

Gruppen mit TG-Sperma und gesextem Tiefgefriersperma lagen bei 37,5 und 13 %. Das schlechtere Ergebnis führen die Autoren darauf zurück, dass durch das Sexen und die Einfrier- und Auftauprozesse das Sperma zu starkem Stress ausgesetzt wurde.

ALVARENGA und LEÀO (2002) machten die Erfahrung, dass, wenn mit 10 Mio. vorwärtsbeweglichen, kryokonservierten Spermien hysteroskopisch besamt wurde, es hinsichtlich der Fertilisation keinen Unterschied ergab, ob die Spermien eine Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation erfahren hatten oder nicht (33,3%). Bei Insemination von 400 Mio. pms in den Gebärmutterkörper wurde von 12 Stuten keine tragend. In der Summe unterschieden sich die Ergebnisse der Hysteroskopien signifikant von denen der intracorporalen Besamung.

In einer Studie von PETERSEN et al. (2002) wurde ein Besamungsschema für Tiefgefriersperma mit einem Besamungsschema für Frisch- bzw. gekühltes Versandsperma verglichen. Alle Stuten wurden einer Ovulationsinduktion mit hCG unterzogen. In der ersten Gruppe wurden die Stuten zwölf und 36 Stunden nach hCG-Gabe mit je 50 Mio. vorwärtsbeweglichen Tiefgefrierspermien tiefintracornual besamt. In einer zweiten Gruppe erhielten die Stuten zwölf Stunden nach hCG 500 Mio. frische, progressiv motile Spermien (pms) in den Gebärmutterkörper und 24 Stunden nach hCG-Gabe 500 Mio. pms des Vortages. Die anhand nichtoperativer Embryonenzurückgewinnung auf 64% für Besamungen mit TG-Sperma und 37% für die Besamung mit gekühltem Frischsperma festgelegten Fertilisationsergebnisse unterschieden sich nicht signifikant.

Bei den Besamungsschemata, die SQUIRES et al. (2002) miteinander verglichen, wurden die Stuten der einen Gruppe mit 800 Mio. Tiefgefrierspermien nach dreimaliger Ultraschallkontrolle nach hCG-Gabe bis spätestens sechs Stunden post ovulationem in den Gebärmutterkörper besamt. Die Vergleichsgruppe erhielt nach nur einmaliger ultrasonographischer Kontrolle 24 und 40 Stunden nach hCG-Gabe jeweils eine Dosis von 400 Mio. Spermien/0,5ml intracorporal. Die beiden Schemata unterschieden sich im Hinblick auf ihre Trächtigkeitsraten nicht voneinander. In einem zweiten Experiment wurden die Stuten beider Versuchsgruppen mit jeweils 24 und 40 Stunden nach Einleitung der Ovulation mit 200 Mio. Tiefgefrierspermien besamt. In der einen Gruppe wurde das Sperma in den Gebärmutterkörper (n = 20) und in der anderen tiefintracornual (n = 20) abgesetzt. Die hieraus resultierenden Konzeptionsergebnisse von 50 und 20 % wurden durch die

Embryonenzurückgewinnung am Tag 7-9 post ovulationem festgelegt und fielen für die tiefintracornual besamten Stuten schlechter aus.

3.3 Diagnostisch-therapeutische Hysteroskopie

Schon 1983 setzte WILSON (1983 a) ein flexibles Glasfiberendoskop für die Hysteroskopie ein. Die leicht sedierten Stuten waren in einem gepolsterten Untersuchungsstand fixiert. Zur Distension des Uterus verwendete er eine Infusion von 3-4 l sterilen Wassers. Als anatomisch auffällig erwiesen sich die Longitudinalfalten, die sich durch Gebärmutterkörper und Hörner ziehen. WILSON (1983 b) stellt die Bifurcation als einen Orientierungspunkt dar, von dem aus die Eileiterpapillen, die in ihrer Form und Größe variieren, an den Hornspitzen aufgesucht werden können. BRACHER und ALLEN (1992) fiel auf, dass sich die Papille vom Aussehen, Relaxation und Öffnungsgrad ähnlich der Cervix verhält. Das Aussehen erschien pink-ödematös im Östrus und blass-protuberant im Diöstrus. WILSON (1983 a) wendet die Hysteroskopie zur Diagnose und Therapie von Endometriumszysten, Adhäsionen, sowie zur direkten Biopsie und Zytologie an. Durch einen Zulauf und eine Absaugpumpe können zum Beispiel Gewebeanteile und Entzündungsprodukte entfernt werden. Bei ihren Hysteroskopien verwendeten BRACHER und ALLEN (1992) ein Videoendoskop, welches dem Glasfiberendoskop gegenüber den Vorteil besitzt, robuster zu sein und eine bessere Bildqualität zu liefern. Der Vorgang konnte direkt auf einen Monitor übertragen werden. Die Distension erfolgte durch gefilterte Luft, die nach Beenden der Hysteroskopie wieder abgesogen wurde. So untersuchten BRACHER und ALLEN normal fertile, subfertile und tragende Stuten. Auch MERKT et al. (1991) behandelten Endometriumszysten durch den hysteroskopischen Eingriff unter Einsatz eines Nadelpapillotoms oder einer Polypektomieschlinge.

Die Hysteroskopie wird bisher vor allem als minimalinvasiver Eingriff zur Entfernung von Gebärmutterzysten und zur visuellen Überprüfung der Uterusbeschaffenheit eingesetzt. Dabei empfiehlt SCHIEMANN (2001) die Insufflation von Luft mit einem durchschnittlichen Arbeitsdruck von 20 mmHg, der zur vollständigen Distension der Gebärmutter ausreicht. Ein maximaler Druck von 40 mmHg sollte nicht überschritten werden, um eine übermäßige Kreislaufbelastung zu vermeiden. SCHIEMANN konnten feststellen, dass sich die Herzfrequenz unter der Hysteroskopie während der Insufflation von Luft signifikant erhöhte, ohne dass sich der Zustand der Versuchsstuten sichtbar veränderte. Es wurden acht klinisch

gesunde und negativ getupferte Stuten im Anöstrus und Interöstrus untersucht. Auffällig war eine bakterielle Besiedlung von Pseudomonas aeruginosa bei drei Stuten vier Tage nach der Hysteroskopie. Obwohl die Stuten nach dem darauffolgenden Zyklus klinisch gesund erschienen, konnten bei zwei Stuten die Keime noch nachgewiesen werden.

4 Eigene Untersuchungen

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Versuchstiere

4.1.1.1 Hengste

Für die Spermagewinnung standen alle Landbeschäler des Niedersächsischen Landgestüts Celle zur Verfügung, die 2001 und 2002 in der Samengewinnung aktiv waren. In der vorliegenden Arbeit kamen in den Versuchen mit Frischsamen 25 Hengste und bei den Tiefgefrierspermagruppen 22 Hengste zum Einsatz. Die Ejakulate aller eingesetzten Hengste sind von geprüfter Fertilität, wie auch dem saisonalen Endergebnis für die Saison 2001 (79,5%) des Niedersächsischen Landgestüts Celle zu entnehmen ist.

4.1.1.1.1 Frischsperma

Das Sperma wurde in einem Zeitraum von 6.00 - 7.00 Uhr morgens im Rahmen des routinemäßigen Stationsbetriebes gewonnen. Die Entnahme erfolgte an einem Phantom mit künstlicher Scheide „Modell Hannover“, unter Anwesenheit einer rossigen Stute, die in einem vor dem Phantom installierten Untersuchungsstand fixiert wurde. Es wurde Einmalschlauchfolie (Fa. Minitüb, Landshut) in die künstliche Scheide eingezogen. Als Auffanggefäße dienten sterile graduierte Glasflaschen, die mit einem Gazefilter (Fa. Minitüb, Landshut) versehen waren, um grobe Verunreinigungen und ggf. die abgegebene schleimige Fraktion des Ejakulats abzutrennen.

Jedes Ejakulat wurde sofort nach der Entnahme auf Aussehen, Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl, Motilität und Morphologie untersucht und mit modifiziertem Magermilchverdünner (INRA 82, IJAZ und DUCHARME 1995) auf eine Dichte von 25 Millionen vorwärts bewegliche Spermien pro Milliliter im Auffangglas verdünnt. Der so verdünnte Frischsamen wurde abgedeckt und bis zur Verwendung bei +5°C im Kühlschrank aufbewahrt.

4.1.1.1.2 Tiefgefriersperma

Die Herstellung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiefgefrierspermas erfolgte in der Pferdebesamungsstation des Landgestüts während des routinemäßig für diese Zwecke vorgesehenen Zeitraums (Oktober bis Ende Januar des Folgejahres). Hierzu wurden die Hengste auf einen 48-stündigen Entnahmerhythmus eingestellt (Montag, Mittwoch, Freitag). Die Samengewinnung erfolgte analog der unter 4.1.1.1.1 beschriebenen Methode.

Nach Vorverdünnung des Spermas mit modifiziertem Magermilchverdünner (INRA 82, IJAZ und DUCHARME 1995) auf eine Spermienkonzentration von 50 Mio. Spermien/ml erfolgte die Zentrifugation (10 min, 700 g). Der anschließenden Dekantierung des Überstandes folgte die Resuspension des spermienreichen Retentats nach Zusatz von Tiefgefrierverdünner (INRA 82 + 2,0% Eidotter + 2,5% Glycerol). Nach der Resuspension wurde die Spermienkonzentration mittels Hämozytometerverfahren (Thoma neu®, Hecht, Sontheim) ermittelt und unter weiterem Zusatz von Tiefgefrierverdünner auf eine Dichte von 200 Mio. Spermien/ml justiert. Die Abfüllung in 0,5 ml Pailletten (Fa. Minitüb, Landshut) erfolgte automatisiert. Nach einer zweistündigen Temperaturanpassung der Pailletten im Kühlschrank (+5°C) erfolgte die Tiefgefrierung im Gefrierautomaten (MRS-1®, Fa IMV, L`Aigle, Frankreich) mit einer Einfriergeschwindigkeit von 60°C/min. Bei Erreichen von -160°C wurde das Gefriergut in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verwendung in entsprechenden Lagerungsbehältnissen aufbewahrt. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei 37°C für 30 Sekunden. Als Mindestanforderung für die Besamungstauglichkeit von Tiefgefriersperma galt eine mikroskopisch ermittelte Auftaurate von ≥35% vorwärtsbeweglichen Spermien.

Eine Inseminationsdosis (Kontrollgruppe) bestand aus 8 x 0,5ml Pailletten; somit lag folglich eine Gesamtspermienzahl von 800 Mio. Spermien vor. In den Versuchsgruppen (TG-1 bis 3) ist jeweils nur eine 0,5 ml Paillette verwendet worden. Die Besamungsdosis dieser Gruppen belief sich somit auf eine Gesamtzahl von 100 Mio. Spermien.

4.1.1.2 Stuten

In diesem Inseminationsprogramm wurden Warmblutstuten (n = 331) im Alter von 3 bis 21 Jahren eingesetzt, die in der Zuchtsaison (Januar - Juli) der Jahre 2001 und 2002 zur Besamung stationär in der Zentralen Pferdebesamungsstation des Niedersächsischen Landgestüts Celle eingestellt waren. Die Besamung der Stuten erfolgte entweder mit Frischsperma (FS, n = 172) oder mit kryokonserviertem Sperma (TG, n = 159).

4.1.1.2.1 Untersuchung der Stuten

Die Länge des Aufenthaltes der Stuten im Landgestüt variierte: Je nach Entscheidung des Besitzers betrug die Aufenthaltsdauer eine Rosseperiode oder erstreckte sich bis zum Zeitpunkt der Trächtigkeitsfeststellung 15 - 18 Tage post ovulationem.
Bei der Eingangsuntersuchung wurde der Vorbericht der Stute aufgenommen und ihr Rosseverhalten am Hengst überprüft. Nach einer kurzen klinischen Allgemeinuntersuchung wurde der Reproduktionsstatus mittels transrektaler Palpation und Ultrasonographie erhoben. Anschließend wurden die Befunde in Anlehnung an den gynäkologischen Schlüssel von KLUG (1999) protokolliert.

4.1.1.2.1.1 Zeitschema der Besamung / Ovulationsinduktion

Um möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen zu erreichen, wurden zwei Besamungsschemata angewandt (s. Abb. 01). Danach erhielten die Stuten in den Frischspermagruppen (s. 4.1.2) 24 Std. (~10.00 h) vor Besamung 1500 IU Choriongonadotropin (Choriolutin 5000®, Fa. Albrecht, Aulendorf) intravenös. Die Stuten der TG-Spermagruppen hingegen wurden 30 Std. (~16.00 h) nach Applikation von 1500 IU hCG i.v. einmalig besamt.

Grundvoraussetzung für den Einsatz von hCG waren deutliche äußere und innere Rosseanzeichen und ein präovulatorischer Follikel mit einem Durchmesser von mindestens 40 mm. Das Untersuchungsintervall betrug 12 Stunden, bzw. 6 Stunden (24 h, 30 h und 36 h nach hCG-Applikation) beim Einsatz von Tiefgefriersperma.

Ovulationsfeststellung:						
US - Kontrolle FS (Std. zur KB):	-24	-12	0		12	24
US - Kontrolle TG (Std. zur KB):	-24	-12	-6	0	6	18
Besamung:			FS ↓	TG ↓		
Zeit (Std. post hCG):	**0**	**12**	**24**	**30**	**36**	**48**
Uhrzeit:	**10°°**$_{\text{Tag 1}}$	**22°°**	**10°°**$_{\text{Tag 2}}$	**16°°**	**22°°**	**10°°**$_{\text{Tag 3}}$

Abb. 01: Schematische Darstellung der Zeitgestaltung von Untersuchungsintervall (US-Kontrolle), Ovulationsinduktion (hCG) und Besamungszeitpunkt bei Einsatz von Frischsperma (FS) und Tiefgefriersperma (TG)

4.1.1.2.1.2 Klinisch-gynäkologische Parameter

Nach Kontrolle der äußeren Rossemerkmale unter Anwesenheit eines Hengstes (nach KLUG 1999) wurde bei den Stuten der Zyklusstand der inneren Geschlechtsorgane anhand rektaler Palpation und Ultrasonographie erhoben. Es kam dabei ein Gerät (Aloka Echo Camera SSD-210 DX, Fa. Hellige, Hamburg) zum Einsatz, welches mit einem 5 MHz-Linearschallkopf ausgestattet war. Bei vaginalen Untersuchungen wurde ein Spreizspekulum nach POLANSKI (Fa. Hauptner, Hannover) verwendet.

Es wurde der Zustand der Gebärmutter vor der Besamung sowie die postinseminatorische endometriale Reaktion klinisch-gynäkologisch erfasst. Mit einbezogen in die Beurteilung der Fertilitätsprognose wurden: Alter, Vorbericht, Follikelgröße, Follikelanzahl, Anzahl ovulierter Follikel, Ovulationsintervall, Besamungsdauer, endometriale Ödemausbildung zum Zeitpunkt der hCG-Gabe und ultrasonographisch detektierte Gebärmutterzysten.

Vorbericht

Die Stuten wurden vorberichtlich nach folgenden Kriterien klassifiziert: 1 = Fohlen bei Fuß, 2 = güst, 3 = Maiden, 4 = letzte Saison nicht gedeckt, 5 = Resorption der Fruchtanlage, 6 = Abort der Fruchtanlage, 7 = Tot-/ Fehlgeburt, 8 = unbekannt.

Follikelgröße und Anzahl

Die Follikelgröße wurde zum Zeitpunkt der hCG-Gabe festgehalten, wobei vom größten sonographisch darstellbaren Standbild jeweils der längste Durchmesser und die dazu senkrecht verlaufende größte Strecke gemessen wurden. Die Entscheidung zur Ovulationsinduktion bei östrischen Stuten erfolgte nach Erreichen eines Follikeldurchmessers von ≥ 40 mm. Alle weiteren Follikel, die zu diesem Zeitpunkt eine Größe von mind. 35 mm erreichten, wurden notiert. Außerdem wurde vermerkt, ob die Follikel auf dem linken oder dem rechten Ovar ausgebildet waren.

Ovulationsintervall und Ovulationsmittel

Zum einen wurde registriert, in welchem Zeitraum nach der hCG-Gabe die Stuten ovulierten, und zum anderen, wie viele Stunden nach der Besamung die Ovulation festzustellen war. Hierzu wurden die Stuten in einem zwölfstündigen Intervall (bzw. sechsstündig bei den TG-Gruppen) transrektalen palpatorischen und sonographischen Kontrollen unterzogen und aus dem Intervall zwischen dem Zeitpunkt der letzten Sonographiekontrolle vor und nach Ovulationsfeststellung wurde ein Ovulationsmittel gebildet.

In den Frischspermagruppen (FS-1 bis FS-5) wurden nur solche Stuten berücksichtigt, die zum vorausgegangenen Untersuchungszeitpunkt, zwölf Stunden vor der Besamung, noch nicht ovuliert hatten. Bei den Inseminationen mit Tiefgefriersperma (TG-1 bis TG-4) wurden nur solche Stuten einbezogen, die sechs Stunden vor der Besamung noch nicht ovuliert hatten. Andererseits wurden Stuten, die zum der KB vorausgegangenen Untersuchungszeitpunkt noch nicht ovuliert hatten, bei denen jedoch zum Zeitpunkt der Insemination die Ovulation festgestellt wurde, bei der Auswertung berücksichtigt.

Uterusödem

Die Beurteilung des Ödematisierungszustandes des Endometriums im Bereich der Bifurcation mit Hilfe der ultrasonographischen Untersuchung erfolgte unter Anwendung des nachfolgend angegebenen Protokolls.

Einteilung:

(+ + +) = sehr gut ausgeprägtes endometriales Ödem, sehr deutliche apfelsinenscheibenartige Struktur
(+ + (+)) = gut ausgeprägtes endometriales Ödem, Radspeichenstruktur deutlich
(+ + -) = ausgeprägtes endometriales Ödem, deutlich sichtbar
(+ (+) -) = wenig ausgeprägtes Ödem
(+ - -) = aufgelockerte endometriale Struktur,
((+) - -) = geringgradig aufgelockerte endometriale Struktur, Östrusbeginn / - Ende

Intrauterine Flüssigkeitsansammlungen

Intrauterine Ansammlungen von Flüssigkeit wurden nach sonographischer Diagnose entsprechend dem Beurteilungsschlüssel von RASCH et al. (1996) klassifiziert:

Flk. Grad 0 = keine intraluminale Flüssigkeitsansammlung
Flk. Grad I = 1,0 - 1,5 cm , anechogene, intraluminal angesammelte, kleine Flüssigkeitsmenge
Flk. Grad II = 1,5 - 2,0 cm , anechogene, intraluminal angesammelte, moderate Flüssigkeitsmenge
Flk. Grad III = > 2,0 cm , anechogene, intraluminal angesammelte, große Flüssigkeitsmenge

Die Beurteilung erfolgte 18-24 Std. nach der Samenübertragung.

Inseminationsdauer

Bei den hysteroskopischen Besamungen wurde mit transvaginaler Einführung des Endoskops die Zeit gemessen bis zum Zeitpunkt an dem das Endoskop aus dem weiblichen Genitaltrakt zurückgezogen wurde. In den anderen Besamungsgruppen wurde die Zeit vermerkt, wenn die Besamung vom Einführen der Pipette bis zum verlassen des Genitals länger als eine Minute dauerte.

Endometriumszysten

Die bei der ultrasonographischen Untersuchung aufgefundenen Zysten in der Gebärmutter wurden nach Lokalisation, Größe und Anzahl beschrieben.

Morphologie der uterotubalen Papille

Während den hysteroskopischen Besamungen wurde das Aussehen und die Form der Uterotubalpapille und ihrer unmittelbaren Umgebung registriert. Es wurde zwischen dem flachen Komplex, der hügeligen Erscheinung und der Zapfenform unterschieden.

Gynäkologische Untersuchung zur Feststellung von Trächtigkeit

Die Untersuchung erfolgte bei einem Großteil der Stuten (83%) durch transrektale, palpatorische und sonographische Kontrolle zwischen dem 15. und 18. Tag nach der Ovulationsfeststellung auf der Station. Die übrigen Ergebnisse (17%) wurden im gleichen Zeitraum durch die Haustierärzte erfasst und telefonisch erfragt.

Resorptionsrate

Nach Feststellung einer Trächtigkeit am 15. Tag nach Ovulation wurde eine Fruchtresorption bereits am Tag 18 nach Ovulation diagnostiziert, weitere wurden am 25. Tag p.ov. bis zum 43. Trächtigkeitstag durch transrektale Palpation und Ultrasonographie festgestellt. Zwei Resorptionen wurden durch den Haustierarzt bekanntgegeben.

4.1.2 Versuchsgruppen

In vorliegender Studie wurden verschiedene Besamungstechniken und Spermiendosen unter praxisnahen Bedingungen miteinander verglichen. Damit die Ergebnisse statistisch vergleichbar blieben, wurden alle Stuten einem konstanten Samenübertragungsmanagement (s. 4.1.1.2.1.1) unterzogen. Daraus ergaben sich neun Versuchsgruppen, die im folgenden schematisch festgehalten sind (s. Tab. 04).

Tab. 04: Schematische Darstellung der Inseminationsgruppen

Gruppe	Stuten	Inseminations-technik	Sperma	Inseminations-volumen	Inseminations-dosis
	(n)			(ml)	(x 10^6)
FS - 1	36	Intracorporal*	Frischsperma	12	50 pms
FS - 2	33	Tiefintracornual		12	50 pms
FS - 3	30	Hysteroskopisch		12	50 pms
FS - 4	35	Hysteroskopisch		2	50 pms
FS - 5	38	Intracorporal* (konventionell)		12	300 pms
TG - 1	39	Intracorporal*	TG-Sperma	0,5	100 total
TG - 2	42	Tiefintracornual		0,5	100 total
TG - 3	52	Hysteroskopisch		0,5	100 total
TG - 4	26	Intracorporal* (konventionell)		12	800 total

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
n = Stutenanzahl
pms = progressive motile Spermien
total = Gesamtspermienzahl
* in den Gebärmutterkörper

4.1.2.1 Vorbereitung zur Insemination

Rossigen Stuten mit einem präovulatorischen Follikel von mindestens 40 mm ∅ auf einer gemessenen Strecke wurde am Tag $_1$ morgens um 10.00 Uhr 1500 IU hCG (Choriolutin®, Fa. Albrecht, Aulendorf) intravenös verabreicht. Die Stuten wurden anschließend in den folgenden 24 Stunden zwei- bis dreimal (Frischspermagruppen 1-5) bzw. in den nächsten 30 Stunden drei- bis viermal (Tiefgefrierspermagruppen 1-4) transrektal palpatorisch und ultrasonographisch untersucht. Um 10.00 bzw. 16.00 Uhr des folgenden Tages (Tag $_2$) wurde die jeweilige Stute für die Besamung in einem Untersuchungsstand fixiert und die Vulva mit Zellstoff trocken gereinigt.

4.1.2.2 Methoden der Samenübertragung

Die Durchführung der Samenübertragung wurde in allen Versuchen von den gleichen Personen vorgenommen.

4.1.2.2.1 Intracorporale Insemination (ICPI)

Zur Besamung in den Gebärmutterkörper wurde nach dem Auftauen bei 37°C im Wasserbad für 30 Sekunden und anschließender gründlicher Abtrocknung eine 0,5 ml-Paillette (Fa. Minitüb, Landshut) mit Tiefgefriersamen an der versiegelten Seite mit einem Scherenschlag eröffnet und in eine Seminette („Pferdebesamungspipette Universal“, 65 cm, Fa. Minitüb, Landshut) eingeführt. Ein zur Pipette passender Metallmandrin (Fa. Minitüb, Landshut) schob die Paillette vorsichtig in der Pipette so weit vor, bis die Spitze des Mandrins Kontakt zum Verschlusstopfen der Paillette erhielt und das eröffnete Paillettenende im spezifisch konzipierten Seminettenvorderende arretiert werden konnte.

Bei dem Einsatz von verdünntem Frischsamen wurde das jeweilige Besamungsvolumen kurz vor der Samenübertragung aus dem Auffanggefäß im Kühlschrank in eine 20 ml fassende sterile Einmalspritze (Norm-Ject, Luer, Fa. Henke-Sass, Wolf GMBH, Tuttlingen) aufgezogen. Nach Entnahme der vorgesehenen Spermiendosis beim Frischspermaeinsatz von 50 Mio. vorwärtsbeweglichen Spermien wurden folglich 2 ml entnommen, wonach diese unmittelbar vor der Besamung mit dem oben erwähnten Magermilchverdünner (INRA 82) auf das konstante Besamungsvolumen von 12 ml aufgefüllt wurden.

Die Pipette wurde mit einer behandschuhten Hand durch die gespreizte Vulva transvaginal bis an den äußeren Muttermund vorgeführt. Unter digitaler Führung wurde die Seminette vorsichtig in der Zervix vorgeschoben, so dass das Sperma ca. 5 cm kranial des inneren Muttermundes entweder durch Druck auf den Spritzenkolben oder den Mandrin abgesetzt werden konnte.

4.1.2.2.2 Tiefintracornuale Insemination (TICNI)

Die vorbereitenden Maßnahmen für die TICNI entsprechen denen der ICPI. Zur tiefintracornualen Insemination wurde eine im Vergleich zur Universalpipette biegsamere und

längere (75cm) Seminette (Fa. Minitüb, Landshut) mit einem dazu passenden, flexiblen Mandrin verwendet, um die Einführung bis in die Uterushornspitze zu ermöglichen. Nach dem Vorschieben der Pipette bis in den Uteruskörper suchte die zuvor vaginal eingeführte Hand von rektal die Pipettenspitze auf. Das Erreichen der jeweiligen Hornspitze wurde durch vorsichtige rektale Manipulation und Drehbewegung der Pipette erleichtert. Nachdem das Seminettenvorderende in der ipsilateral zum periovulatorischen Follikel gelegenen Hornspitze palpiert werden konnte, wurde das Sperma an der Hornspitze abgesetzt. Anschließend wurde die Seminette vorsichtig zurückgezogen.

4.1.2.2.3 Hysteroskopische Insemination (HYSI)

Endoskop

Bei den nachfolgend beschriebenen hysteroskopischen Besamungen ist ein elektronisches Videoendoskop der Firma Videomed (Videomed GmbH, München) zum Einsatz gekommen. Das 180 cm lange, flexible Endoskop war mit zwei Lichtkanälen, einer Kamera, einer Spüleinrichtung für die Optik und einem Arbeitskanal mit 2,8 mm Innendurchmesser ausgestattet. Die Kamera (Pentax EPM-3000) war über einen Prozessor mit einem Computer verbunden. Die visuelle Übertragung erfolgte auf einem Monitor. Gleichzeitig konnte die Besamung über einen Videorecorder (Panasonic VCR Model AG-MD835E, Panasonic, Osaka, Japan) aufgezeichnet oder ein per „Freezetaste“ festgehaltenes Bild gespeichert und zu einem späteren Zeitpunkt auf speziellem Fotopapier ausgedruckt (Sony Digital Color Printer UP-D2500) oder per Computer ausgewertet werden. An der Steuerungseinheit des Endoskops befanden sich zwei Räder, mit denen sich die Endoskopspitze in alle vier Richtungen bewegen ließ, und zwei Feststellfunktionen, mit denen eine bestimmte Position fixiert werden konnte. Es durfte maximal ein Winkel von 180° eingestellt werden. Weitere wichtige Funktionen, die per Knopfdruck an der Einheit bedient werden konnten, waren das Insufflieren von Luft, die Spülung der Optik mit Flüssigkeit und das Absaugen von Luft oder Flüssigkeiten über eine Absaugpumpe (Kleinsauger Atmolit 12, Atmos Medizintechnik GmbH & Co, Lenzkirch).

Das Endoskop wurde nach jeder Besamung zur Reinigung und Desinfektion in ein U - Rohr mit einer speziellen Desinfektionslösung für Endoskope (Gigasept F®, Fa. Schülke & Mayr,

Norderstedt) gehängt. Aus hygienischen und funktionellen Gründen wurde darauf geachtet, die Optik, sowie den Spül - und Arbeitskanal von uterinen Sekreten frei zu halten.

Besamungsvorgang

Die hysteroskopische Samenübertragung erfolgte am unsedierten Pferd in einem Untersuchungsstand. Während eine Person das Rektum ausräumte, bereitete eine zweite Person das Videoendoskop vor. Der Stute wurde der Schweif in einen Untersuchungshandschuh einbandagiert und die Vulva mit Zellstoff trocken gereinigt. Ein zuvor bemessenes Stück Polyethylenschlauch (1,52 mm AD/ 0,86 mm ID, Fa. Kleinfeldt, Gehrden) wurde mit einer gekürzten und abgeschliffenen Kanüle (Neolus, 19G, 1,1 x 40 mm, Luer 6%, Fa. Terumo, Leuven, Belgien) versehen und durch den Zugang in den Arbeitskanal eingefädelt, bis das Schlauchende an der Spitze des Endoskops ca. 5 cm hervorstand. Bei Tiefgefriersperma wurde das geringe Besamungsvolumen (0,5 ml) direkt in die Schlauchspitze aufgezogen. Die zwei bzw. zwölf Milliliter Frischsperma wurden in einer Spritze auf den Kanülenkonus am Schlauchende aufgesteckt.

Nach transvaginaler Einführung des Endoskops in den Gebärmutterkörper, wurde das Endoskop unter rektaler Kontrolle bis in die jeweilige Hornspitze vorgeschoben. Anschließend wurde durch die zweite Person an der Steuerungseinheit des Endoskops solange gefilterte Luft in die Uterushornspitze insufflliert, bis die Uterotubalpapille fokussiert werden konnte. Anschließend wurde der Polyethylenschlauch vorgeführt, durch vorsichtige Navigation an der Steuerungseinheit ein direkter Kontakt des Schlauchendes und der Uterotubalpapille hergestellt und das Sperma langsam auf der Papille abgesetzt. Bei kleinen Inseminationsvolumina (0,5 ml und 2 ml) erfolgte - soweit möglich - die Applikation der gesamten Flüssigkeitsmenge auf die Papille. Bei großem Inseminationsvolumen (12 ml) wurde die Papille vorsichtig umspült. Anschließend wurden zur Entleerung des an der Wand des Polyethylenschlauches haftenden Spermas 2 ml Luft durch den Schlauch insufflliert. Während des Zurückziehens des Endoskopes wurde die Verteilung des Spermas beobachtet. Die verbleibende Luft entwich selbständig durch die östrusbedingt geweitete Zervix.

4.1.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SAS®-Programm („statistical analysis system“) im Rechenzentrum der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Beratung fand im Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover statt.

Die Trächtigkeitsergebnisse wurde mit dem χ^2-Homogenitätstest verglichen. Ab einer Prüfgröße von weniger als fünf Stuten fand der Fisher´s Exact Test Anwendung.

Zur statistischen Auswertung von Altersverteilung (s. 5.1), Uterusödem (s. 5.7), Inseminationsdauer (s. 5.11) und der Ovulationszeitpunkte nach hCG-Applikation sowie der Ovulationszeitpunkte nach Besamung (s. 5.12) wurde die einfaktorielle Varianzanalyse nach Wilcoxon eingesetzt.

5 Ergebnisse

Bei der Auswertung der Versuche wurden in erster Linie die Ergebnisse der verschiedenen Besamungstechniken an Hand der Trächtigkeitsraten miteinander verglichen. Einbezogen in die Beurteilung wurden das Alter, der Reproduktionsstatus der Stuten, das Besamungsvolumen, die Besamungsdosis, die Konzentration des Inseminats, die Follikelgröße, die Follikelanzahl, die Seitenverteilung der präovulatorischen Follikel und die Anzahl ovulierter Follikel sowie deren Seitenverteilung zwischen linkem und rechtem Ovar. Desweiteren wurde das Ovulationsmittel in Bezug zur hCG-Gabe und zum Besamungszeitpunkt ausgewertet, sowie die Besamungsdauer, die endometriale Ödemausbildung zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion und die mittels Ultrasonographie aufgezeigten Gebärmutterzysten innerhalb der Gruppen verglichen. Der sonographisch erfasste Zustand des Uterus vor der Besamung sowie die postinseminatorische endometriale Reaktion wurden in Hinblick auf die Trächtigkeitsraten dargestellt. Bei den hysteroskopischen Besamungen wurde die Uterotubalpapille morphologisch eingeteilt. Neben der Resorptions- und der Zwillingsträchtigkeitsrate wurde die Trächtigkeitsrate der gesamten Versuchspopulation gegenüber den Befruchtungsergebnissen aus singulären Ovulationen dargelegt. Die Trächtigkeitsangaben beziehen sich jeweils auf die Anzahl an Zyklen.

Von 342 Versuchsstuten ovulierten elf Stuten gar nicht oder später als 72 Stunden nach Ovulationsinduktion. Diese Stuten wurden von den Berechnungen ausgeschlossen. Die Anzahl der ausgewerteten Stuten lag somit bei 331.

5.1 Gruppen- und Altersverteilung

Es wurde für die fünf Frischspermagruppen (FS-1 bis FS-5) und für jede der vier Tiefgefrierspermagruppen (TG-1 bis TG-4) die Summe der an dem Versuch teilnehmenden Stuten gebildet und deren Altersdurchschnitt pro Gruppe mit der dazugehörigen Standardabweichung errechnet (Tab. 05). Die Altersdurchschnittswerte der Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Tab. 05: Übersicht über die Altersverteilung (in Jahren) in den Versuchsgruppen

Gruppe	**Stutenanzahl**	**Altersverteilung**	
	(n)	Mittelw.	± SD
FS-1	36	7,4	4,75
FS-2	33	8,2	3,99
FS-3	30	9,3	3,96
FS-4	35	8,8	3,92
FS-5	38	8,6	4,64
Σ FS	**172**	**∅ 8,4**	
TG-1	39	8,6	4,37
TG-2	42	8,6	3,68
TG-3	52	8,6	3,29
TG-4	26	9,3	4,44
Σ TG	**159**	**∅ 8,7**	
Σ FS + Σ TG	**331**	**∅ 8,6**	

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
Mittelw. = Altersdurchschnitt der Stuten in Jahren
± SD = Standardabweichung

5.2 Saison und Jahr

Die Einflüsse von Saison und Jahr bleiben in der vorliegenden Arbeit ohne besondere Bedeutung. Aus diesem Grund wird auf eine Darlegung der saisonalen und annualen Verteilung verzichtet.

5.3 Vorbericht / Reproduktionsstatus

Die Stuten wurden – wie in Tabelle 06 dargestellt – anhand ihres aktuellen Reproduktionsstatus in acht Vorberichtsgruppen unterteilt (VB 1 - VB 8). Nach dem Vorbericht führten 155 Warmblutstuten (46,8%) zur Zeit der Einstellung in die Besamungsstation ein Fohlen bei Fuß, 47 waren Maidenstuten (14,2%) und 80 Stuten

konzipierten aus den Belegungen des Vorjahres nicht (güste Stuten: 24,2%). Bei fünf Stuten wurde eine bestehende Trächtigkeit durch Resorption (1,5%) unterbunden, bei weiteren fünf Stuten kam es zum Abort (1,5%), und acht Stuten hatten eine Tot- oder Fehlgeburt (2,4%). In der vorangegangenen Saison waren 21 Stuten (6,3%) nicht gedeckt worden, bei 10 Stuten (3%) blieb der Vorbericht unbekannt.

Tab. 06: Übersicht über die Verteilung der Vorberichte in den Versuchsgruppen

Gruppe	Stuten	Vorbericht																	
		VB 1		**VB 2**		**VB 3**		**VB 4**		**VB 5**		**VB 6**		**VB 7**		**VB 8**	
	(n)	x_1	x_1 / n (%)	x_2	x_2 / n (%)	x_3	x_3 / n (%)	x_4	x_4 / n (%)	x_5	x_5 / n (%)	x_6	x_6 / n (%)	x_7	x_7 / n (%)	x_8	x_8 / n (%)
FS-1	36	16	44,4	6	16,7	9	25	1	2,8	-	-	-	-	-	-	4	11,1
FS-2	33	11	33,3	7	21,2	8	24,2	5	15,2	-	-	1	3	-	-	1	3
FS-3	30	16	53,3	7	23,3	3	10	1	3,3	1	3,3	-	-	1	3,3	1	3,3
FS-4	35	16	45,7	10	28,6	4	11,4	3	8,6	-	-	1	2,9	1	2,9	-	-
FS-5	38	14	36,8	11	28,9	6	15,8	2	5,3	1	2,6	-	-	1	2,6	3	7,9
Σ FS	**172**	**73**	**42,4**	**41**	**23,8**	**30**	**17,4**	**12**	**7**	**2**	**1,2**	**2**	**1,2**	**3**	**1,7**	**9**	**5,2**
TG-1	39	16	41	10	25,6	7	18	3	7,7	2	5,1	-	-	1	2,6	-	-
TG-2	42	25	59,5	12	28,6	2	4,8	1	2,4	-	-	2	4,8	-	-	-	-
TG-3	52	28	53,9	10	19,2	5	9,6	4	7,7	-	-	1	1,9	4	7,7	-	-
TG-4	26	13	50	7	26,9	3	11,5	1	3,9	1	3,9	-	-	-	-	1	3,9
Σ TG	**159**	**82**	**51,6**	**39**	**24,5**	**17**	**10,7**	**9**	**5,7**	**3**	**1,9**	**3**	**1,9**	**5**	**3,2**	**1**	**0,6**
Σ FS + Σ TG	**331**	**155**	**46,8**	**80**	**24,2**	**47**	**14,2**	**21**	**6,3**	**5**	**1,5**	**5**	**1,5**	**8**	**2,4**	**10**	**3**

Legende zu Tab. 06:
FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
VB = Vorbericht
VB 1 = Fohlen bei Fuß
VB 2 = güst
VB 3 = Maiden
VB 4 = letzte Saison nicht gedeckt
VB 5 = Resorption
VB 6 = Abort
VB 7 = Tot-/ Fehlgeburt
VB 8 = unbekannt
n = Stutenanzahl
x_{1-8} = Stutenanzahl mit VB 1 bis VB 8

In der Tabelle 07 wurden die fruchtbaren Vorberichtsgruppen VB 1 und VB 3 zusammengefasst, um sie mit VB 2, VB 5, VB 6 und VB 7, den Gruppen mit einer eher ungünstigen Fruchtbarkeitsprognose zu vergleichen. Die Stuten, die in der vorangegangenen Saison nicht belegt worden waren, und diejenigen mit unbekanntem Vorbericht wurden in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 07) nicht berücksichtigt. Die dargestellten Trächtigkeitsergebnisse beziehen sich auf die Gesamtpopulation.

Bei Betrachtung des Vorberichts in Bezug auf die Trächtigkeitsrate konnte festgestellt werden, dass in der Summe bei den Stuten der Gruppen VB 2, VB 5, VB 6 und VB 7 im Vergleich zu den mit Tiefgefriersperma besamten Stuten ein signifikanter Unterschied zu Gunsten der Besamung mit Frischsperma bestand. In den Gruppen der Fohlen- und Maidenstuten (VB 1 und VB 3) war dies nicht der Fall. Hier zeigte sich innerhalb der Frischspermagruppen ein signifikanter Vorteil für die mit 50 Mio. pms/2ml hysteroskopisch besamten Stuten gegenüber der Kontrollgruppe. Umgekehrt verhielt es sich bei den Problemstuten, hier resultierten aus der Besamung mit Frischsperma in den Gebärmutterkörper (300 Mio. pms/12ml) signifikant bessere Trächtigkeitsraten als aus den hysteroskopischen Besamungen (50 Mio. pms/12ml). Es ergab sich bei den Stuten mit VB 2, VB 5, VB 6 und VB 7 ein statistisch aufälliger Vorteil ($p = 0,118$) für die intracorporalen Versuchsgruppe (FS-1) gegenüber der hysteroskopischen Gruppe (FS-3).

Für Problemstuten ergab sich bei Besamung in den Gebärmutterkörper der Versuchsreihe mit Frischsperma im Gegensatz zu den Fohlen- und Maidenstuten ein signifikant besseres Befruchtungsergebnis. Tendenziell ($p = 0,113$) erhielt man umgekehrt bei der uterotubalen Insemination mit 50 Mio. pms/12ml (FS-3) bessere Trächtigkeitsraten bei Maidenstuten und Stuten mit Fohlen bei Fuß verglichen zu den Stuten mit ungünstigem Vorbericht.

Tab. 07: Zusammenhang zwischen Vorbericht und Trächtigkeitsergebnissen (gesamt)

Gruppe	**Vorbericht - Trächtigkeit**							
	VB 1, VB 3				**VB 2, VB 5, VB 6, VB 7**			
	ya	xa	ya / xa	%	yb	xb	yb / xb	%
FS-1	14	25	14 / 25	56	5	6	5 / 6	83,3
FS-2	11	19	11 / 19	57,9	4	8	4 / 8	50
FS-3	13	19	13 / 19	68,4	3	9	3 / 9	33,3[d]
FS-4	15	20	15 / 20	75 [a]	6	12	6 / 12	50
FS-5	9	20	9 / 20	45[2,b]	11	13	11 / 13	84,6[1,c]
Σ FS	**62**	**103**	**62 / 103**	**60,2**	**29**	**48**	**29 / 48**	**60,4[a]**
TG-1	10	23	10 / 23	43,5	5	13	5 / 13	38,5
TG-2	14	27	14 / 27	51,9	6	14	6 / 14	42,9
TG-3	16	33	16 / 33	48,5	6	15	6 / 15	40
TG-4	9	16	9 / 16	56,3	2	8	2 / 8	25
Σ TG	**49**	**99**	**48 / 99**	**49,5**	**19**	**50**	**19 / 50**	**38[b]**
Σ FS + Σ TG	**111**	**202**	**111 / 202**	**55**	**48**	**98**	**48 / 98**	**49**

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
VB = Vorbericht
VB 1 = Fohlen bei Fuß
VB 2 = güst
VB 3 = Maiden
VB 4 = letzte Saison nicht gedeckt
VB 5 = Resorption
VB 6 = Abort
VB 7 = Tot-/ Fehlgeburt
VB 8 = unbekannt

xa = Stutenanzahl mit VB 1 + VB 3
xb = Stutenanzahl mit VB 2 + VB 5 + VB 6 + VB 7
ya = Anzahl tragender Stuten mit VB 1 + VB 3
yb = Anzahl tragender Stuten mit VB 2 + VB 5 + VB 6 + VB 7

Signifikante Unterschiede der Konzeptionsraten innerhalb der Gruppen (horizontal):
1:2 $p \leq 0,05$

Signifikante Unterschiede der Konzeptionsraten zwischen den Gruppen (vertikal):
a:b $p \leq 0,05$; c:d $p \leq 0,05$

5.4 Volumen-, Dosis- und Konzentrationseffekte

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 08) werden die für einzelnen Versuchsgruppen verwendeten Besamungsvolumina, Besamungsdosen, Spermienkonzentrationen im Inseminat mit den dazugehörigen Trächtigkeitsraten (aus singulären Ovulationen) dargestellt.

Tab. 08: Übersicht zur Verteilung des Besamungsvolumens, der Spermiendosis und der Spermienkonzentration des Inseminats in den Versuchsgruppen

Gruppe	Volumen	Dosis	Konzentration	TR
	(ml)	(x Mio. pms)	(Mio. pms/ml)	tragend /sing. Ov.
FS-1	12	50	4,16	18 / 31
FS-2	12	50	4,16	16 / 32
FS-3	12	50	4,16	15 / 27
FS-4	2	50	25	19 / 28
FS-5	12	300	25	20 / 34
	(ml)	(x Mio. total)	(Mio. total/ml)	tragend /sing. Ov.
TG-1	0,5	100	200	16 / 37
TG-2	0,5	100	200	17 / 38
TG-3	0,5	100	200	22 / 48
TG-4	12	800	66,6	9 / 21

tragend = tragende Stuten aus singulärer Ovulation
sing. Ov. = Stutenanzahl mit singulärer Ovulation
pms = progressiv motile Spermien
total = Gesamtspermienzahl

In den folgenden Tabellen (Tab. 09, Tab. 10 u. Tab. 11) werden die Einflüsse von Besamungsvolumen, Spermiendosis und Spermienkonzentration des Inseminats in Bezug auf die Trächtigkeitsrate der Stuten mit singulärer Ovulation dargestellt. Weder bei dem Besamungsvolumen noch bei der Spermiendosis war ein signifikanter Zusammenhang mit den Trächtigkeitsergebnissen festzustellen. Auch die Konzentration der Spermien im Inseminat hatte innerhalb der Frischspermagruppen (FS-1 bis FS-5) und der

Tiefgefrierspermagruppen (TG-1 bis TG-4) keinen signifikanten Einfluss auf die Konzeptionsraten.

Tab. 09: Zusammenhang zwischen Besamungsvolumen und Trächtigkeitsrate

Gruppe	**Volumen**		
	(ml)	tragend /sing. Ov.	%
FS-1, FS-2, FS-3, FS-5	12	69 / 124	55,7
FS-4	2	19 / 28	67,9
	(ml)	tragend /sing. Ov.	%
TG-1, TG-2, TG-3	0,5	55 / 123	44,7
TG-4	12	9 / 21	42,9

tragend = tragende Stuten mit singulärer Ovulation
sing. Ov. = Stutenanzahl mit singulärer Ovulation

Tab. 10: Zusammenhang zwischen Spermiendosis und Trächtigkeitsrate

Gruppe	**Dosis**		
	(x Mio. pms)	tragend /sing. Ov.	%
FS-1, FS-2, FS-3, FS-4	50	68 / 118	57,6
FS-5	300	20 / 34	58,8
	(x Mio. total)	tragend /sing. Ov.	%
TG-1, TG-2, TG-3	100	55 / 123	44,7
TG-4	800	9 / 21	42,9

tragend = tragende Stuten mit singulärer Ovulation
sing. Ov. = Stutenanzahl mit singulärer Ovulation
pms = progressiv motile Spermien
total = Gesamtspermienzahl

Tab. 11: Zusammenhang zwischen Konzentration der Spermien im Inseminat und Trächtigkeitsrate

Gruppe		**Konzentration**	
	(Mio. pms/ml)	tragend /sing. Ov.	%
FS-1, FS-2, FS-3	4,16	49 / 90	54,4
FS-4, FS-5	25	39 / 62	62,9
	(Mio. total/ml)	tragend /sing. Ov.	%
TG-1, TG-2, TG-3	200	55 / 123	44,7
TG-4	66,6	9 / 21	42,9

tragend = tragende Stuten mit singulärer Ovulation
sing. Ov. = Stutenanzahl mit singulärer Ovulation
pms = progressiv motile Spermien
total = Gesamtspermienzahl

5.5 Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit zur Aktivität der Ovarien

5.5.1 Anzahl präovulatorischer Follikel, sowie Häufigkeit singulärer bzw. zweifacher Ovulationen und Zwillingsträchtigkeiten

Die folgende Tabelle (Tab. 12) bezieht sich auf die Anzahl der Stuten, die einen, zwei oder drei präovulatorische Follikel von ≥ 35 mm zum Zeitpunkt der hCG-Gabe entwickelt hatten, sowie auf die Anzahl der Stuten, die ein oder zwei von diesen Follikeln ovulierten. 296 Stuten ovulierten einen Follikel (Trächtigkeitsraten s. Tab. 28). Wie aus den Tabellen (Tab. 12, 13, 14 u. 15) zu entnehmen ist, erfuhren 35 der 69 Stuten, die zwei oder drei dominante Follikel angebildet hatten, innerhalb von 48 Stunden nach hCG-Applikation eine Doppelovulation (10,6% der Gesamtstutenanzahl), woraus in acht Fällen eine Zwillingsträchtigkeit (22,9%) resultierte. Die Zwillingsträchtigkeitsrate betrug bezogen auf die Gesamtträchtigkeit (172 Stuten) insgesamt 4,7%. Wurden die Doppelovulationen nach ipsilateraler (gleichseitiger, Tab. 13) und kontralateraler (ungleichseitiger, Tab. 14) Ovulation eingeteilt und die Versuchsgruppen nach corporaler und cornualer Inseminationstechnik zusammengefasst, so erhielt man folgende Ergebnisse: Bei cornualer Inseminationstechnik und kontralateraler

Doppelovulation bekam keine von zehn Stuten Zwillinge (0%), während davon signifikant verschieden die neun ipsilateralen Doppelovulationen zu vier Zwillingsträchtigkeiten (44,4%) führten. Bei der Summe der intracorporalen Inseminationen unterschieden sich die Zwillingsträchtigkeitsraten mit 33,3% (kontralateral) und 20% (ipsilateral) nicht signifikant voneinander.

Vergleicht man die Zwillingsträchtigkeitsraten der corporalen und cornualen Inseminationstechniken miteinander, so lässt sich weder innerhalb der ipsilateralen noch der kontralateralen Gruppierungen ein signifikanter Unterschied feststellen (Tab. 15).

Tab. 12: Verteilung der Stuten anhand der Anzahl präovulatorischer Follikel (1-3) unter Berücksichtigung des Anteils an Einzel- und Doppelovulationen

Gruppe	**Stuten**	**Follikelanzahl**			**Singul.-Ov.**		**Doppel-Ov.**			
	(n)	F_1	F_2	F_3	Ov_s	Ov_s / n (%)	Ov_d	Ov_d / n (%)	ipsil.	kontl.
FS-1	36	29	6	1	31	86,1	5	13,9	3	2
FS-2	33	30	2	1	32	97	1	3	1	-
FS-3	30	25	4	1	27	90	3	10	1	2
FS-4	35	26	8	1	28	80	7	20	5	2
FS-5	38	26	10	2	34	89,5	4	10,5	2	2
Σ FS	**172**	**136**	**30**	**6**	**152**	**88,4**	**20**	**11,6**	**12**	**8**
TG-1	39	33	5	1	37	94,9	2	5,1	1	1
TG-2	42	33	8	1	38	90,5	4	9,5	1	3
TG-3	52	43	7	2	48	92,3	4	7,7	1	3
TG-4	26	17	8	1	21	80,8	5	19,2	4	1
Σ TG	**159**	**126**	**28**	**5**	**144**	**90,6**	**15**	**9,4**	**7**	**8**
Σ FS + Σ TG	**331**	**262**	**58**	**11**	**296**	**89,4**	**35**	**10,6**	**19**	**16**

kontl. = kontralateral ovulierte Follikel
ipsil. = ipsilateral ovulierte Follikel
n = Stutenanzahl
F_1 = Stuten, die zum Zeitpunkt der hCG-Gabe einen dominanten Follikel entwickelt hatten
F_2 = Stuten, die zum Zeitpunkt der hCG-Gabe zwei dominante Follikel entwickelt hatten
F_3 = Stuten, die zum Zeitpunkt der hCG-Gabe drei dominante Follikel entwickelt hatten
Ov_s = Stuten, bei denen ein Follikel ovuliert ist
Ov_d = Stuten, bei denen zwei Follikel ovuliert sind

Die folgende Tabelle (Tab. 13) zeigt, wieviele Stuten mit ipsilateraler Doppelovulation umrossten, tragend wurden oder eine Zwillingsträchtigkeit aufwiesen.

Tab. 13: Trächtigkeiten und Zwillingsträchtigkeiten aus ipsilateralen Doppelovulationen

Gruppe	**Ipsilaterale Doppelovulationen**						
	(ip / ges)	(n.t.)	%	⊕	%	⊕⊕	%
FS-1	3 / 36	1	33,3	1	33,3	1	33,3
FS-2	1 / 33	-	-	-	-	1	100
FS-3	1 / 30	-	-	-	-	1	100
FS-4	5 / 35	3	60	-	-	2	40
FS-5	2 / 38	2	100	-	-	-	-
Σ FS	**12 / 172**	**6**	**50**	**1**	**8,3**	**5**	**41,7**
TG-1	1 / 39	1	100	-	-	-	-
TG-2	1 / 42	-	-	1	100	-	-
TG-3	1 / 52	1	100	-	-	-	-
TG-4	4 / 26	1	25	2	50	1	25
Σ TG	**7 / 159**	**3**	**42,9**	**3**	**42,9**	**1**	**14,3**
Σ FS +Σ TG	**19 / 331**	**9**	**47,4**	**4**	**21,1**	**6**	**31,6**
Σ - cp	**10 / 331**	**5**	**50**	**3**	**30**	**2**	**20**
Σ - cn	**9 / 331**	**4**	**44,4**	**1**	**11,1**	**4**	**44,4**

ip / ges = Stutenanzahl mit ipsilateraler Doppelovulation / Gesamtstutenanzahl
n.t. = nicht tragend
cp = corporale Inseminationstechniken
cn = cornuale Inseminationstechniken
⊕ = tragende Stuten mit einer Fruchtanlage aus ipsilateraler Doppelovulation
⊕⊕ = tragende Stuten mit zwei Fruchtanlagen aus ipsilateraler Doppelovulation

Die folgende Tabelle (Tab. 14) zeigt, wieviele Stuten mit kontralateraler Doppelovulation umrossten, tragend wurden oder eine Zwillingsträchtigkeit aufwiesen.

Tab. 14: Trächtigkeiten und Zwillingsträchtigkeiten aus kontralateralen Doppelovulationen

Gruppe	**Kontralaterale Doppelovulationen**						
	(ko / ges)	(n.t.)	%	⊕	%	⊕⊕	%
FS-1	2 / 36	1	50	1	50	-	-
FS-2	-	-	-	-	-	-	-
FS-3	2 / 30	-	-	2	100	-	-
FS-4	2 / 35	1	50	1	50	-	-
FS-5	2 / 38	-	-	1	50	1	50
Σ FS	**8 / 172**	**2**	**25**	**5**	**62,5**	**1**	**12,5**
TG-1	1 / 39	1	100	-	-	-	-
TG-2	3 / 42	1	33,3	2	66,7	-	-
TG-3	3 / 52	1	33,3	2	66,7	-	-
TG-4	1 / 26	-	-	-	-	1	100
Σ TG	**8 / 159**	**3**	**37,5**	**4**	**50**	**1**	**12,5**
Σ FS +Σ TG	**16 / 331**	**5**	**31,3**	**9**	**56,3**	**2**	**12,5**
Σ - cp	**6 / 331**	**2**	**33,3**	**2**	**33,3**	**2**	**33,3**
Σ - cn	**10 / 331**	**3**	**30**	**7**	**70**	**0**	**0**

ko / ges = Stutenanzahl mit kontralateraler Doppelovulation / Gesamtstutenanzahl
n.t.= nicht tragend
cp = corporale Inseminationstechniken
cn = cornuale Inseminationstechniken
⊕ = tragende Stuten mit einer Fruchtanlage aus kontralateraler Doppelovulation
⊕⊕ = tragende Stuten mit zwei Fruchtanlagen aus kontralateraler Doppelovulation

Tab. 15: Gesamtträchtigkeitsraten und Zwillingsträchtigkeitsraten unter Berücksichtigung corporaler und cornualer Inseminationstechniken

Gruppen	**Stuten**		**Zwillinge ges.**		**Zwillinge ipsil.**		**Zwillinge kontl.**	
	(x / n)	%	ip+kotr/ Dovges	%	iptr/ ipDov	%	kotr/ koDov	%
FS-1 + 5	43 / 74	58,1	2 / 9	22,2	1 / 5	20	1 / 4	25
FS-2 - 4	57 / 98	58,2	4 / 11	36,4	4 / 7	57,1	0 / 4	0
TG-1 + 4	28 / 65	43,1	2 / 7	28,6	1 / 5	20	1 / 2	50
TG-2 + 3	44 / 94	46,8	0 / 8	0	0 / 2	0	0 / 6	0
Σ cp	**71 / 139**	**51,1**	**4 / 16**	**25**	**2 / 10**	**20**	**2 / 6**	**33,3**
Σ cn	**101 / 192**	**52,6**	**4 / 19**	**21,1**	**4 / 9**	**44,4[1]**	**0 / 10**	**0[2]**
Σ cp + Σ cn	**172 / 331**	**52**	**8 / 35**	**22,9**	**6 / 19**	**31,6**	**2 / 16**	**12,5**

n = Stutenanzahl gesamt
x = Anzahl tragender Stuten gesamt
ipsil. = ipsilateral
kontl. = kontralateral
iptr = ipsilateral ovulierte Follikel, die zur Zwillingsträchtigkeit führten
kotr = kontralateral ovulierte Follikel, die zur Zwillingsträchtigkeit führten
ipDov = ipsilaterale Doppelovulationen
koDov = kontralaterale Doppelovulationen
Dov ges. = gesamt Doppelovulationen
cp = (FS-1, FS-5, TG-1, TG-4) corporal besamte Stuten
cn = (FS-2, FS-3, FS-4, TG-2, TG-4) cornual besamte Stuten

Signifikante Unterschiede der Konzeptionsraten (horizontal):
1:2 $p \leq 0,05$

5.5.2 Konzeptionsergebnisse in Abhänigkeit des Seitenvergleiches von Follikeln, Ovulationen, sowie Follikelgröße

Die Follikelgröße des dominanten Follikels betrug zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion im Durchschnitt 40-45 mm (Tab. 16). Die Follikel waren mit 52,6 und 47,4% etwa gleichmäßig zwischen der linken und rechten Seite verteilt. Ebenso verhielt es sich mit den Ovulationen und den aus ovulierten Follikeln resultierenden Trächtigkeiten. Von den insgesamt 411 Follikeln kam es in 366 Fällen zur Ovulation (89,1%). Im Mittel ergaben sich somit 1,24 Follikel und 1,10 Ovulationen pro Stute. Die Hälfte der 366 Ovulationen führte zu einer Trächtigkeit.

Tab. 16: Übersicht der Follikelgrößen sowie Seitenverteilung von Follikeln, Ovulationen und Trächtigkeiten

Gruppe	Follikelgr. (mm)		Follikelverteilung					Ovulationsverteilung					Trächtigkeitsverteilung				
	l. St. ∅	k. St. ∅	links	%	rechts	%	n_f	Ov.li	%	Ov.re	%	n_o	TR li.	% - Vertlg	TR re.	% - Vertlg	n_{tr}
FS-1	45	41	26	59.1	18	40,9	44	25	61	16	39	41	15	68,2	7	31,8	22
FS-2	44	40	19	51,4	18	48,6	37	18	52,9	16	47,1	34	10	58,8	7	41,2	17
FS-3	44	38	21	58,3	15	41,7	36	18	54,5	15	45,5	33	8	40	12	60	20
FS-4	45	41	26	57,8	19	42,2	45	26	61,9	16	38,1	42	15	65,2	8	34,8	23
FS-5	46	42	28	53,8	24	46,2	52	22	52,4	20	47,6	42	14	58,3	10	41,7	24
Σ FS	**45**	**40**	**120**	**56,1**	**94**	**43,9**	**214**	**109**	**56,8**	**83**	**43,2**	**192**	**62**	**58,5**	**44**	**41,5**	**106**
TG-1	45	40	27	58,7	19	41,3	46	24	58,5	17	41,5	41	8	50	8	50	16
TG-2	44	41	26	50	26	50	52	22	47,8	24	52,2	46	9	40,9	13	59,1	22
TG-3	44	40	28	44,4	35	55,6	63	26	46,4	30	53,6	56	8	30,8	18	69,2	26
TG-4	43	38	15	41,7	21	58,3	36	13	41,9	18	58,1	31	4	30,8	9	69,2	13
Σ TG	**44**	**40**	**96**	**48,7**	**101**	**51,3**	**197**	**85**	**48,9**	**89**	**51,1**	**174**	**29**	**37,7**	**48**	**62,3**	**77**
Σ FS + Σ TG	**45**	**40**	**216**	**52,6**	**195**	**47,4**	**411**	**194**	**53**	**172**	**47**	**366**	**91**	**49,7**	**92**	**50,3**	**183**

Legende zu Tab. 16:
FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
l. St. = lange Strecke
k. St. = kurze Strecke
n_f = Gesamtanzahl dominanter Follikel zum Zeitpunkt der hCG-Gabe
n_o = Gesamtanzahl der Ovulationen
n_{tr} = Gesamtanzahl ovulierter Follikel, die zur Trächtigkeit führten
Ov. li. = Ovulation links
Ov. re. = Ovulation rechts
TR li. = Trächtigkeiten links, bezogen auf Ovulationen
TR re. = Trächtigkeiten rechts, bezogen auf Ovulationen
% - Vertlg. = Prozentuale Verteilung bezogen auf die insgesamt rechts und links entstandenen Trächtigkeiten

Wird die Trächtigkeitsrate auf die Anzahl der jeweils linken und rechten Ovulationen bezogen und getrennt betrachtet (Tab. 17), so erhält man die folgenden signifikanten Unterschiede. Zunächst wird deutlich, dass auf der linken Seite die Summe der Ovulationen bei Frischspermabesamungen zu signifikant höheren Trächtigkeitsraten führte als die Summe der Ovulationen bei Tiefgefriersperma. Zwischen den Summen der rechten Seite bestand jedoch kein Unterschied. Innerhalb der Frischspermagruppen der rechten Seite war das Ergebnis der hysteroskopischen Besamung (50 Mio. pms/12ml) signifikant besser als bei der Besamung in den Gebärmutterkörper und der tiefintracornualen Gruppe. Für die Gruppen FS-4 ($p = 0,081$) und FS-5 ($p = 0,069$) zeichnete sich rechts eine in der Tendenz geringere Trächtigkeitsrate als für die Gruppe FS-3 ab.

Wenn man das Verhältnis von Ovulationen zu Trächtigkeiten auf der linken Seite innerhalb der Gruppen mit denen der rechten Seite vergleicht, so fällt auf, dass jeweils die Befruchtungsergebnisse der hysteroskopischen Gruppen rechts signifikant besser ausfallen als die der linken Seite. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Summen der Tiefgefrierspermagruppen wieder, wobei sich die Trächtigkeitsrate der rechten Seite signifikant von der linken Seite unterscheidet (Tab. 17).

Tab. 17: Darstellung der Trächtigkeitsraten unter Berücksichtigung der Seitenverteilung der Ovulationen

Gruppe	**Trächtigkeit pro Ovulation**					
	Ov. li.	TR li.	%	Ov. re.	TR re.	%
FS-1	25	15	60	16	7	43,8 [b]
FS-2	18	10	55,6	16	7	43,8 [b]
FS-3	18	8	44,4[2]	15	12	80[a,1]
FS-4	26	15	57,7	16	8	50
FS-5	22	14	63,6	20	10	50
Σ FS	**109**	**62**	**56,9[a]**	**83**	**44**	**53**
TG-1	24	8	33,3	17	8	47,1
TG-2	22	9	40,9	24	13	54,2
TG-3	26	8	30,8[2]	30	18	60[1]
TG-4	13	4	30,8	18	9	50
Σ TG	**85**	**29**	**34,1[b,2]**	**89**	**48**	**53,9[1]**
Σ FS + Σ TG	**194**	**91**	**46,9**	**172**	**92**	**53,5**

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
Ov. li. = Ovulation links
Ov. re. = Ovulation rechts
TR li. = Trächtigkeiten links
TR re. = Trächtigkeiten rechts

Signifikante Unterschiede der Konzeptionsraten innerhalb der Gruppen (horizontal):
1:2 $p \leq 0,05$

Signifikante Unterschiede der Konzeptionsraten zwischen den Gruppen (vertikal):
a:b $p \leq 0,05$

5.6 Resorptionsrate

Die sich auf die Gesamtanzahl der trächtigen Stuten beziehende Resorptionsrate (Fruchtresorptionen zwischen dem 18. und 43. Trächtigkeitstag) lag in der Summe bei 8,7% (Tab.18). Für die Gruppe TG-1, in der 25% der Stuten resorbierten, zeichnet sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,0614 eine tendenziell höhere Resorptionsrate gegenüber der Kontrollgruppe (TG-4) ab.

Tab. 18: Darstellung des Anteils an Fruchtresorptionen

Gruppe	**Stuten**	**Resorption**	
	(n)	resorb. / tragend	%
FS-1	36	2 / 21	9,5
FS-2	33	0 / 17	0
FS-3	30	2 / 18	11,1
FS-4	35	1 / 22	4,5
FS-5	38	2 / 22	9,1
Σ FS	**172**	**7 / 100**	**7**
TG-1	39	4 / 16	25
TG-2	42	2 / 20	10
TG-3	52	2 / 24	8,3
TG-4	26	0 / 12	0
Σ TG	**159**	**8 / 72**	**11,1**
Σ FS + Σ TG	**331**	**15 / 172**	**8,7**

n = Stutenanzahl
resorb. = Anzahl der Resorptionen
tragend = Anzahl der Trächtigkeiten

5.7 Uterusödem

Das während des Östrus ausgebildete Uterusödem wurde anhand der Ultrasonographie ermittelt und einer in Kap. 4 unter Punkt 4.1.1.2.1.2 (s. S. 43) beschriebenen Einteilung zugeordnet. Die Stuten hatten im Bereich der Bifurcation zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion ein durchschnittlich deutlich sichtbar ausgeprägtes endometriales Ödem.

Tab. 19: Darstellung des durchschnittlichen endometrialen Ödematisierungszustandes zum Zeitpunkt der hCG-Applikation (± SD)

Gruppe	**Uterusödem**	
	Mittelw.	± SD
FS-1	1,9	0,49
FS-2	1,9	0,54
FS-3	1,9	0,60
FS-4	1,9	0,61
FS-5	1,9	0,59
FS	**∅ 1,9**	
TG-1	1,8	0,53
TG-2	1,7	0,52
TG-3	1,7	0,37
TG-4	1,8	0,44
TG	**∅ 1,7**	
FS + TG	**∅ 1,8**	

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
Mittelw. = Endometriale Ödemausblidung zum Zeitpunkt der hCG-Gabe im Mittel (Skala: 0,5 bis 3)
± SD = Standardabweichung

5.8 Endometriale Reaktion auf die Besamung

Die Reaktion des Endometriums auf die Besamung wurde 24 Stunden post inseminationem ultrasonographisch untersucht und nach der in Kapitel 4 Punkt 4.1.1.2.1.2 (s. S. 44) erwähnten Einteilung dokumentiert. 7,9% der Stuten akkumulierten Flüssigkeitsmengen des ersten Grades (1-1,5 cm^2) und 1,5% der Stuten reagierten mit Flüssigkeitsgrad II (1,5-2 cm^2). Wurden die Stuten der beiden Gruppen zusammengefasst, so kam es bei 9,4% zu einer intrauterinen Flüssigkeitsansammlung (Tab. 20). Wenn man die in den Gebärmutterkörper besamten Stuten getrennt von den tiefintracornual und hysteroskopisch besamten Stuten betrachtet, reagierten nach 24 Stunden 7,9% der corporal besamten und 10,4% der cornual besamten Probandinnen auf die Besamung mit einer Flüssigkeitsansammlung. Nicht eine der Stuten reagierte auf die Besamung mit Flüssigkeitsgrad III. Wie der Tabelle 21 zu entnehmen

ist, wurden von 26 Stuten, die mit Flüssigkeitsgrad I auf die Besamung reagierten, 46,2% tragend, und von den fünf Stuten mit Flüssigkeitsgrad II konzipierten drei (60%). Die Gruppen wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Trächtigkeitsraten auf.

Tab. 20: Darstellung der endometrialen Reaktion auf die Besamung 24 Stunden post inseminationem (p.i.)

Gruppe	**Reaktion auf KB 24 Std. p.i.**					
	Flk. Grad I		**Flk. Grad II**		**Flk. Grad I + II**	
	Flk_1 / ges.	%	Flk_2 / ges.	%	Flk_{1+2} / ges.	%
FS-1	2 / 36	5,6	1 / 36	2,8	3 / 36	8,3
FS-2	4 / 33	12,1	-	-	4 / 33	12,1
FS-3	1 / 30	3,3	-	-	1 / 30	3,3
FS-4	2 / 35	5,7	-	-	2 / 35	5,7
FS-5	3 / 38	7,9	2 / 38	5,3	5 / 38	13,2
Σ FS	**12 / 172**	**7**	**3 / 172**	**1,7**	**15 / 172**	**8,7**
TG-1	2 / 39	5,1	-	-	2 / 39	5,1
TG-2	5 / 42	11,9	1 / 42	2,4	6 / 42	14,2
TG-3	6 / 52	11,5	1 / 52	1,9	7 / 52	13,5
TG-4	1 / 26	3,9	-	-	1 / 26	3,9
Σ TG	**14 / 159**	**8,8**	**2 / 159**	**1,3**	**16 / 159**	**10**
Σ FS + Σ TG	**26 / 331**	**7,9**	**5 / 331**	**1,5**	**31 / 331**	**9,4**
Σ - corporal	**8 / 139**	**5,8**	**3 / 139**	**2,4**	**11 / 139**	**7,9**
Σ - cornual	**18 / 192**	**9,4**	**2 / 192**	**1**	**20 / 192**	**10,4**

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
ges. = Stutenanzahl
corporal = in den Gebärmutterkörper besamte Stuten
cornual = tiefintracornual und hysteroskopisch besamte Stuten
Flk_1 = Anzahl der Stuten mit Flüssigkeitsgrad I 24 Std. post inseminationem
Flk_2 = Anzahl der Stuten mit Flüssigkeitsgrad II 24 Std. post inseminationem
Flk_{1+2} = Anzahl der Stuten mit Flüssigkeitsgrad I + II 24 Std. post inseminationem

Tab. 21: Trächtigkeitsraten bei Stuten, die 24 Stunden p.i. Flüssigkeit in der Gebärmutter akkumuliert hatten

Gruppe	**Trächtigkeiten bei Stuten mit Flk. Grad I / II**					
	Flk. Grad I		**Flk. Grad II**		**Flk. Grad I + II**	
	tr_1 / Flk_1	%	tr_2 / Flk_2	%	tr_{1+2} / Flk_{1+2}	%
FS-1	1 / 2	50	1 / 1	100	2 / 3	66,7
FS-2	2 / 4	50	-	-	2 / 4	50
FS-3	0 / 1	0	-	-	0 / 1	0
FS-4	1 / 2	50	-	-	1 / 2	50
FS-5	2 / 3	66,7	1 / 2	50	3 / 5	60
Σ FS	**6 / 12**	**50**	**2 / 3**	**66,7**	**8 / 15**	**53,3**
TG-1	0 / 2	0	-	-	0 / 2	0
TG-2	2 / 5	40	0 / 1	0	2 / 6	33,3
TG-3	3 / 6	50	1 / 1	100	4 / 7	57,1
TG-4	1 / 1	100	-	-	1 / 1	100
Σ TG	**6 / 14**	**42,9**	**1 / 2**	**50**	**7 / 16**	**43,8**
Σ FS + Σ TG	**12 / 26**	**46,2**	**3 / 5**	**60**	**15 / 31**	**48,4**
Σ - corporal	**4 / 8**	**50**	**2 / 3**	**66,7**	**6 / 11**	**54,5**
Σ - cornual	**8 / 18**	**44,4**	**1 / 2**	**50**	**9 / 20**	**45**

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
corporal = in den Gebärmutterkörper besamte Stuten
cornual = tiefintracornual und hysteroskopisch besamte Stuten
Flk_1 = Anzahl der Stuten mit Flüssigkeitsgrad I 24 Std. post inseminationem
Flk_2 = Anzahl der Stuten mit Flüssigkeitsgrad II 24 Std. post inseminationem
Flk_{1+2} = Anzahl der Stuten mit Flüssigkeitsgrad I + II 24 Std. post inseminationem
tr_1 = tragende Stuten mit Flüssigkeitsgrad I 24 Std. post inseminationem
tr_2 = tragende Stuten mit Flüssigkeitsgrad II 24 Std. post inseminationem
tr_{1+2} = tragende Stuten mit Flüssigkeitsgrad I + II 24 Std. post inseminationem

In der folgenden Tabelle (Tab. 22) werden diejenigen Stuten aufgeführt, bei denen sich schon vor Insemination zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion Flüssigkeit in der Gebärmutter

angesammelt hatte. Diese 11 Stuten wurden bei der Untersuchung zur Reaktion auf die Besamung nicht berücksichtigt. Von den im Durchschnitt 10 Jahre alten Stuten wurden 45,5% tragend.

Tab. 22: Stuten mit intrauteriner Flüssigkeitsansammlung vor Insemination nach Trächtigkeitsraten und Alter

Gruppe	**Flk. vor KB**	**TR / Flk. vor KB**		**Stutenalter**
	(n = ges.)	(tragend / ges.)	%	Jahre
FS-1	-	-	-	-
FS-2	-	-	-	-
FS-3	1	0 / 1	0	19
FS-4	-	-	-	-
FS-5	2	0 / 2	0	14, 19
Σ FS	**3**	**0 / 3**	**0**	**∅ 17,3**
TG-1	-	-	-	-
TG-2	1	0 / 1	0	5
TG-3	4	2 / 4	50	6, 7, 9, 12
TG-4	3	3 / 3	100	4, 6, 9
Σ TG	**8**	**5 / 8**	**62,5**	**∅ 7,3**
Σ FS + Σ TG	**11**	**5 / 11**	**45,5**	**∅ 10**

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
ges. = Stutenanzahl mit intrauteriner Flüssigkeitsansammlung vor der Besamung
tragend = tragende Stuten mit intrauteriner Flüssigkeitsansammlung vor der Besamung

5.9 Endometriumszysten

Bei zehn Stuten mit einem Altersdurchschnitt von 13 Jahren wurden Endometriumszysten mit Hilfe der Ultrasonographie erkannt. Die Stuten wurden nach Zystenanzahl, Zystengröße und Lokalisation eingeordnet. Aufgrund der geringen Stutenzahl werden die Daten in nachfolgender Tabelle (Tab. 23) ohne Berücksichtigung der oben erwähnten Kriterien zusammengefasst. Die Befruchtungsrate der zehn Stuten lag bei durchschnittlich 30%. Vorberichtlich hatten die meisten mit Frischsperma besamten Stuten in der vorhergegangenen Saison nicht konzipiert, während es sich bei den mit Tiefgefriersperma besamten Stuten überwiegend um Stuten mit Fohlen bei Fuß handelte.

Tab. 23: Anzahl der Stuten mit Zysten nach Trächtigkeitsrate und Alter

Gruppe	**Zysten**	**TR / Zysten**		**Stutenalter**	**Vorbericht**
	(n = ges.)	(tragend/ges.)	%	Jahre	
FS-1	1	0 / 1	0	10	VB 1
FS-2	1	0 / 1	0	19	VB 2
FS-3	-	-	-	-	-
FS-4	2	0 / 2	0	13, 15	VB 7, VB 2
FS-5	2	2 / 2	100	11, 21	VB 2, VB 2
Σ FS	**6**	**2 / 6**	**33,3**	**∅ 14,8**	
TG-1	1	1 / 1	100	6	VB 1
TG-2	1	0 / 1	0	15	VB 1
TG-3	1	0 / 1	0	8	VB 1
TG-4	1	0 / 1	0	12	VB 8
Σ TG	**4**	**1 / 4**	**25**	**∅ 10,3**	
Σ FS + Σ TG	**10**	**3 / 10**	**30**	**∅ 13**	

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
VB = Vorbericht
VB 1 = Fohlen bei Fuß
VB 2 = güst
VB 7 = Tot-/ Fehlgeburt
VB 8 = unbekannt

ges. = Stutenanzahl mit Zysten
tragend = tragende Stuten mit Zysten

5.10 Morphologie der uterotubalen Papille

Die bei der Hysteroskopie auffälligen Erscheinungsformen der uterotubalen Papille (vergl. Anhang) sowie das Ausehen der Papillenöffnung und die Farbe der umgebenden Schleimhaut sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 24) festgehalten und in Tabelle (Tab. 25) mit den dazugehörigen Trächtigkeitsergebnissen dargestellt. Bei den Besamungsvorgängen, bei denen die Form der uterotubalen Papille ausgewertet wurde (62 Stuten), kam es in 29 Fällen zu einer zapfenförmigen Erscheinung, bei 27 Stuten zu einer Hügelform, und sechs Papillen stellten sich flach dar. Bei der Hälfte der Stuten wurde eine rosettenförmige Öffnung beobachtet, und bei 8,1% der Fälle erschien die Papille umgeben von einem pink schimmernden Hof, der sich von der äußeren Umgebung abzeichnete. Hinsichtlich der Papillenform unterschieden sich die Trächtigkeitsraten (62%, 63% u. 50%) nicht signifikant voneinander. Von den Stuten, deren Uterotubalpapille eine rosettenförmige Öffnung aufwies, wurden 58,1% tragend.

Tab. 24: Form der UTP und der Papillenöffnung sowie Farbe der umgebenden Schleimhaut

Gruppe	**HYSI**	**Papillenform**							**Papillen-öffnung**		**Umgebung**	
			zapfen-förmig		hügel-förmig		flach		rosetten-förmig		pink	
	n	n	n_z	%	n_h	%	n_f	%	n_r	%	n_p	%
FS-3	30	16	7	43,8	7	43,8	2	12,5	8	50	2	12,5
FS-4	35	25	10	40	12	48	3	12	10	40	3	12
TG-3	52	21	12	57,1	8	38,1	1	4,8	13	61,9	-	-
Σ	**117**	**62**	**29**	**46,8**	**27**	**43,6**	**6**	**9,7**	**31**	**50**	**5**	**8,1**

n = Stutenanzahl
n_z = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit zapfenförmiger Papille
n_h = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit hügelförmiger Papille
n_f = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit flacher Papille
n_r = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit rosettenförmiger Papillenöffnung
n_p = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit pink erscheinender Papillenumgebung

Tab. 25: Zusammenhang zwischen Trächtigkeitsrate, Papillenform und Papillenöffnung

Gruppe	**TR bei Papillenform**						**TR bei Papillenöffnung**	
	zapfenförmig		hügelförmig		flach		rosettenförmig	
	x_z / n_z	%	x_h / n_h	%	x_f / n_f	%	x_r / n_r	%
Σ (FS-3, FS-4, TG-3)	**18 / 29**	**62,1**	**17 / 27**	**63**	**3 / 6**	**50**	**18 / 31**	**58,1**

n_z = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit zapfenförmiger Papille
n_h = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit hügelförmiger Papille
n_f = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit flacher Papille
n_r = Anzahl hysteroskopierter Stuten mit rosettenförmiger Papillenöffnung
x_z = Anzahl hysteroskopierter, tragender Stuten mit zapfenförmiger Papille
x_h = Anzahl hysteroskopierter, tragender Stuten mit hügelförmiger Papille
x_f = Anzahl hysteroskopierter, tragender Stuten mit flacher Papille
x_r = Anzahl hysteroskopierter, tragender Stuten mit rosettenförmiger Papillenöffnung

5.11 Inseminationsdauer

Die durchschnittliche Besamungsdauer betrug bei der Besamung in den Gebärmutterkörper weniger als eine Minute, bei der tiefintracornualen Insemination wurden durchschnittlich fast zwei Minuten gebraucht, während die hysteroskopische Insemination im Mittel 6,7 Minuten andauerte. Bei der Einteilung nach rechts- und linksseitigen Besamungen fällt auf, dass für die linken Besamungen durchschnittlich signifikant länger gebraucht wurde als für die rechten.

Tab. 26: Darstellung des Zeitaufwandes bei der Besamung unter Berücksichtigung der Besamungstechnik und der Seite des besamten Uterushorns

Gruppe	**KB-Dauer**	**KB-Dauer li.**	**KB-Dauer re.**
	(min.)	(min.)	(min.)
FS-1	< 1	-	-
FS-2	2,1	2,4	1,8
FS-3	8,4	10,6	6,2
FS-4	4,9	5	4,8
FS-5	< 1	-	-
TG-1	< 1	-	-
TG-2	1,7	1,8	1,6
TG-3	6,7	8,5	4,9
TG-4	< 1	-	-
Σ ICPI	**< 1**	**-**	**-**
Σ TICNI	**1,9**	**2,1**	**1,7**
Σ HYSI	**6,7**	**8,1[1]**	**5,3[2]**

KB-Dauer li. = durchschnittliche Zeit, die für Besamung in das linke Horn benötigt wurde
KB-Dauer re. = durchschnittliche Zeit, die für Besamungen in das rechte Horn benötigt wurde

Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen (horizontal):
1:2 $p \leq 0,05$

5.12 Ovulationszeitpunkt nach hCG-Applikation und Besamung

In der Tiefgefrierspermagruppe 4 wurden die Ovulationen bezogen auf die hCG-Gabe durchschnittlich signifikant später festgestellt, als in den Gruppen FS-1, FS-2, FS-4, FS-5 und TG-3. Im Vergleich der Mittelwerte waren es maximal 3,2 Stunden, die die Ovulationen in Gruppe TG-4 später festgestellt wurden. Die einfaktorielle Varianzanylse ergab weiterhin, dass sich auch die Werte von den Gruppen FS-3 und TG-1 signifikant gegenüber der Gruppe TG-2 verhielten. Ebenso wurde die Ovulation in der Gruppe TG-1 im Durchschnitt signifikant später als in Gruppe FS-2 und die Ovulation in Gruppe TG-2 signifikant früher als in Gruppe TG-3 festgestellt (Tab. 27).

Es wurden die Stunden in dem Zeitraum zwischen Besamung und Ovulationsfeststellung gemittelt und Durchschnittswerte für die einzelnen Gruppen gebildet. Aufgrund des Besamungsschemas, bei dem die Besamungszeitpunkte für Frisch- und TG-Sperma auf verschiedene Zeiten festgelegt wurden, sind die unterschiedlichen Werte zwischen den beiden Gruppen zu erklären. Die Mittelwerte der Frischspermagruppen waren zueinander nicht signifikant. In den TG-Gruppen kam es bei den Stuten der Gruppe TG-2 signifikant früher zu einer Ovulationsfeststellung als in den übrigen Tiefgefrierspermagruppen. Der deutlichste Unterschied in der Ovulationsfeststellung ergab sich mit 3,3 Stunden zwischen den Gruppen TG-2 und TG-4 (Tab. 27).

Tab. 27: Mittelwerte (± SD) für Ovulationsintervalle nach hCG-Applikation und nach Besamung

Gruppe	**Ov.-Mittel: hCG - Ov.**		**Ov.-Mittel: KB - Ov.**	
	Mittelw.	± SD	Mittelw.	± SD
FS-1	36,3 [b]	2,89	12,3	2,89
FS-2	35,6 [b, f]	2,16	11,6	2,16
FS-3	37,2 [c]	4,64	13,1	4,78
FS-4	36,6 [b]	4,01	12,5	4,02
FS-5	36 [b]	3,73	12	3,73
FS	**36,3**		**12,3**	
TG-1	37,6 [c, e]	4,38	8,2 [b]	3,54
TG-2	35,7 [b, d, h]	5,48	6,2 [a]	4,36
TG-3	37 [g]	3,95	8 [b]	3,49
TG-4	38,8 [a]	3,13	9,5 [b]	2,38
TG	**37**		**7,9**	
FS + TG	**36,7**		**10,2**	

FS = Frischsperma
TG = Tiefgefriersperma
Mittelw. = Mittelwert
± SD = Standardabweichung

Signifikante Unterschiede der Konzeptionsraten zwischen den Gruppen (vertikal):
a:b $p \leq 0,05$; c:d $p \leq 0,05$; e:f $p \leq 0,05$; g:h $p \leq 0,05$

5.13 Trächtigkeitsraten

Beim Einsatz von Frischsperma ergibt sich eine Gesamtträchtigkeitsrate von 58,1%, die sich von der Trächtigkeitsrate der Stuten mit singulärer Ovulation (57,9%) nicht signifikant unterscheidet. Ebenso waren die Ergebnisse mit 45,3% und 44,4% bei Tiefgefriersperma nicht signifikant verschieden voneinander. Die höchsten Konzeptionsraten (62,9% u. 67,9%) wurde in beiden Kategorien von der Gruppe FS-4 erreicht (Tab. 28). Bei Betrachtung der Gesamtträchtigkeit erzielte die Gruppe, in der intracorporal mit einer Paillette (TG-1) besamt wurde, die niedrigste Befruchtungsrate, während bei den Stuten mit singulärer Ovulation die Kontrollgruppe (TG-4) am schlechtesten abschnitt (42,9%).

Zwischen der Gesamtträchtigkeitsrate und der Trächtigkeitsrate aus singulären Ovulationen besteht kein signifikanter Unterschied. Beide Befruchtungsraten zeigen aber im Hinblick auf Frisch- und TG-Sperma signifikante Unterschiede zu Gunsten der mit Frischsperma besamten Stuten.

Tab. 28: Trächtigkeitsraten unter Berücksichtigung der Gesamtpopulation und der Stuten mit singulärer Ovulation

Gruppe	**TR (gesamt)**		**TR (singuläre Ovulation)**	
	x_{ges} / n	%	x_{sing} / n	%
FS-1	21 / 36	58,3	18 / 31	58,1
FS-2	17 / 33	51,5	16 / 32	50
FS-3	18 / 30	60	15 / 27	55,6
FS-4	22 / 35	62,9	19 / 28	67,9
FS-5	22 / 38	57,9	20 / 34	58,8
Σ FS	**100 / 172**	**58,1[a]**	**88 / 152**	**57,9[a]**
TG-1	16 / 39	41	16 / 37	43,3
TG-2	20 / 42	47,6	17 / 38	44,7
TG-3	24 / 52	46,2	22 / 48	45,8
TG-4	12 / 26	46,2	9 / 21	42,9
Σ TG	**72 / 159**	**45,3[b]**	**64 / 144**	**44,4[b]**
Σ FS + Σ TG	**172 / 331**	**52**	**152 / 296**	**51,4**

n = Stutenanzahl
x_{ges} = Trächtigkeiten von Stuten insgesamt
x_{sing} = Trächtigkeiten von Stuten mit Einzelovulation

Signifikante Unterschiede der Konzeptionsraten (vertikal):
a:b $p \leq 0,05$

6 Diskussion

6.1 Gruppen- und Altersverteilung

In der vorliegenden Studie wurde unter praxisnahen Bedingungen mit Einsatz reduzierter Spermiendosen von Frisch- und Tiefgefriersperma der Einfluss der Besamungstechnik auf die Fertilität von Warmblutstuten überprüft. Es wurden intracorporale (ICPI, in den Gebärmutterkörper), tiefintracornuale (TICNI) und hysteroskopische (HYSI) Inseminationstechniken an 331 Warmblutstuten im Alter von 3 bis 21 Jahren unter Einhaltung eines konstanten Besamungsschemas miteinander verglichen. Die Stuten wurden unter Berücksichtigung ihres Alters und ihres Laktationszustandes gleichmäßig, im Übrigen aber willkürlich, auf die fünf Frischsperma- und vier Tiefgefrierspermagruppen verteilt. Bei der statistischen Auswertung gab es für die Altersverteilung zwischen den Versuchsgruppen erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede.

6.2 Vorbericht / Reproduktionsstatus

VIDAMENT et al. (1997) erhielten für güste, Maiden- und Fohlenstuten, sowie für Stuten, die abortiert hatten, keine signifikant unterschiedlichen Trächtigkeitsraten. Wurden in der hier vogelegten Studie die Stuten jedoch nach Vorbericht mit günstiger und ungünstiger Fertilitätsprognose zusammengefasst, so stellte sich bei der Betrachtung der Trächtigkeitsraten von Fohlen- und Maidenstuten heraus, dass die mit 50 Mio. pms/2ml hysteroskopisch besamten Stuten signifikant höhere Trächtigkeitsraten aufwiesen als die Kontrollgruppe. Bei Zusammenfassung der Ergebnisse für die Stuten mit einem ungünstigen Vorbericht ergaben sich bei Insemination in den Gebärmutterkörper signifikant höhere Trächtigkeitsraten als bei Fohlen- und Maidenstuten. Ebenfalls signifikant höhere Trächtigkeitsraten wurden von den mit Frischsperma besamten Problemstuten der intracorporalen Kontrollgruppe gegenüber den hysteroskopischen Besamungen mit 50 Mio. pms/12ml erreicht. Diese Resultate lassen vermuten, dass bei Problemstuten die corporale Standardbesamung der uterotubalen Insemination vorzuziehen ist. Ähnlich äußern sich auch SCHIEMANN et al. (2001), indem sie empfehlen, nach diagnostischer Hysteroskopie die nächste Insemination um einen Zyklus zu verschieben.

6.3 Volumen, Dosis und Konzentrationseffekte

JASKO et al. (1992), ebenso wie BEDFORD und HINRICHS (1994), stellten fest, dass sich das Besamungsvolumen auf die Fertilität von Stuten nicht signifikant auswirkt. Die in dieser Studie verwendeten Inseminationsvolumina hatten ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf die Trächtigkeit.

Untersuchungen von LEIPOLD et al. (1998) führten bezüglich der Konzentration von Spermien in der Besamungsdosis zu keinen signifikanten Unterschieden in der Befruchtungsrate. JASKO et al. (1992) beschreiben, dass große Volumina im Zusammenhang mit einer niedrigen Konzentration an Spermien im Inseminat in der Tendenz einen eher negativen Effekt auf die Embryonenrückgewinnungsrate hatten – im Unterschied zu höheren Konzentrationen bei gleichem Volumen. In der vorliegenden Studie hatte die Konzentration der Spermien im Inseminat keinen signifikanten Einfluss auf die Trächtigkeitsrate. Die höchste Trächtigkeitsrate wurde jedoch in der Gruppe FS-4 mit kleinerem Volumen (2ml) und höherer Konzentration an Spermien im Inseminat (25 Mio. pms/ml) erreicht. Die Trächtigkeitsraten können also in Bezug auf die Besamungstechnik betrachtet werden, ohne dass sie durch Effekte des Besamungsvolumens oder der Konzentration des Inseminats verfälscht werden.

Es gab bereits viele Untersuchungen, in denen der Versuch unternommen wurde, die optimale Besamungsdosis zu ermitteln, bei der man mit der geringsten Spermienzahl eine maximale Fertilität erreicht. SAACKE (1983) spricht hierbei von dem sogenannten Schwellenwert, den es zu ermitteln gilt. Der Autor weist darauf hin, dass dieses Modell verschiedenen Einflussfaktoren unterliegt und der Schwellenwert keine Konstante darstellt. Aufgrund dieser Problematik ist es nicht nur schwierig, Studien miteinander zu vergleichen, sondern auch nahezu unmöglich, eine allgemeingültige Mindestdosis zu empfehlen.

Bezogen auf die Inseminationsdosis unterschieden sich in dieser Studie die Trächtigkeitsergebnisse innerhalb der Frisch- und Tiergefrierspermagruppen nicht signifikant. In den Studien von KLOPPE et al. (1988), VIDAMENT et al. (1997), GAHNE et al. (1998) und SQUIRES et al. (1998) wurden die Trächtigkeitsraten von den jeweiligen Besamungsdosen ebenfalls nicht signifikant beeinflusst. In der 1975 veröffentlichten Studie von PICKETT und VOSS unterschieden sich die Ergebnisse beim Einsatz von unbehandeltem

Sperma nicht signifikant voneinander, während die Trächtigkeitsraten bei aufbereitetem Frischsperma signifikant besser für die mit 500 Mio. als für die mit 100 Mio. Spermien besamten Stuten ausfielen. In einer Studie von HOUSEHOLDER et al. (1981) wurden die mit 500 Mio. pms (75%) besamten Stuten signifikant besser tragend als die mit 50 Mio. pms (37,5%). Aufgrund der vielen trächtigkeitsbeeinflussenden Faktoren bereitet es Schwierigkeiten, die Studien miteinander zu vergleichen. Dennoch ist zu vermuten, dass die Spermiendosis in Abhängigkeit von dem individuellen Besamungsmanagement auf eine bestimmte minimale Dosis reduziert werden kann, ohne dass dies negative Auswirkungen auf die Fertilitätsrate hätte.

CLEMENT et al. (2000) und auch KATILA et al. (1996) führten Einzel-, Doppel- und Dreifachbesamungen mit Frischsperma bzw. TG-Sperma durch, wobei sich für die Einzelbesamungen keine signifikant schlechteren Befruchtungsraten ergaben als für die Mehrfachbesamungen. Hingegen waren in einer Studie von VIDAMENT et al. (1997) beim Einsatz von Tiefgefriersperma signifikant höhere Trächtigkeitsraten bei den Mehrfachbesamungen (34%, $n = 1576$, $p < 0{,}001$) gegenüber den Einzelinseminationen (26%, $n = 626$) zu verzeichnen. Auch SQUIRES et al. (1998) erhielten signifikant höhere Trächtigkeitsraten, wenn an beiden Tagen um den Ovulationszeitpunkt herum jeweils mit einer Dosis von 1 Mrd. pms Versandsperma besamt wurde, als mit einer einmaligen Dosis von 2 Mrd. pms. In der Versuchsreihe von SCHÄFER (2001) erwiesen sich in der Frischsamenübertragung die Einzelbesamungen in den letzten 36 Stunden vor und in den ersten 12 Stunden nach der Ovulation als ebenso erfolgreich wie die Mehrfachbelegungen im 24-Stunden-Intervall. Bei kryokonserviertem Sperma gibt es wiederum vergleichbare Trächtigkeitsraten, wenn bei Einzelbesamungen innerhalb von 12 Stunden vor oder nach Ovulation besamt wurde.

6.4 Trächtigkeitsrate in Abhängigkeit zur Aktivität der Ovarien

6.4.1 Anzahl präovulatorischer Follikel, sowie Häufigkeit singulärer bzw. zweifacher Ovulationen und Zwillingsträchtigkeiten

Bei den 331 Stuten dieser Studie ergaben sich zu 10,6% Doppelovulationen, die in acht Fällen zu einer Zwillingsträchtigkeit führten. Damit liegt die Zwillingsträchtigkeitsrate für die

Gesamtpopulation bei 4,7%. In den Studien von CLEMENT et al. (2000) und WOODS et al. (2000) ereigneten sich Doppelovulationen zu 44% bzw. 26 - 29 %. Die im Vergleich zur vorliegenden Studie deutlich höhere Zahl an Doppelovulationen in der Studie von CLEMENT et al. (2000) überrascht zunächst, da man vermutet, dass durch die medikamentelle Ovulationsinduktion die Doppelovulationen begünstigt werden. Da jedoch bei CLEMENT et al. (2000) keine Ovulationsinduktion vorgenommen wurde, wäre es denkbar, dass die höhere Doppelovulationsrate auf eine reproduktionsaktivere Stutenpopulation zurückzuführen ist.

Wenn man die hier vorliegenden Doppelovulationen nach der ipsi- und kontralateralen Seite unterteilt und jeweils die corporalen und cornualen Inseminationstechniken zusammenfasst so erhält man bei kontralateralen Doppelovulationen mit der tiefintracornualen und hysteroskopischen Besamung signifikant seltener Zwillingsträchtigkeiten als mit der herkömmlichen Besamung in den Uteruskörper. Die cornual besamten Stuten weisen eine Trächtigkeitsrate von 70% auf. Da nicht geklärt werden kann, welche der Eizellen erfolgreich befruchtet wurde, lässt sich nur vermuten, dass nach tiefintracornualer Insemination mit einer geringen und kleinvolumigen Besamungsdosis kontralateral weniger befruchtungsfähige Spermien zur Verfügung stehen als auf der Seite, auf der die Besamung durchgeführt wurde. Zumindest bei Tiefgefriersperma sollte man jedoch davon ausgehen, dass der Abstand der beiden Ovulationen zueinander, bzw. vor allem der Abstand der zweiten Ovulation zum Besamungszeitpunkt, einen entscheidenden Effekt auf das Entstehen von Zwillingsträchtigkeiten hat. In dieser Studie ovulierten bei Tiefgefriersperma zwei der tragenden Stuten beide Follikel innerhalb von sechs Stunden nach der Besamung. Und bei drei tragenden Stuten ereignete sich die zweite Ovulation erst 6 bis 18 Stunden nach der Besamung.

Eine Studie von FÉO et al. (1992) zeigt, dass Spermien nach cornualer Deposition der Spermiendosis bereits zwei Stunden p.i. die kontralaterale Hornspitze erreichen. Insgesamt finden sich jedoch signifikant weniger Spermien auf der kontralateralen Seite ein. Es wurden von FÉO et al. (1992) nach cornualer Besamung signifikant weniger Spermien in der kontralateralen Hornspitze ausgezählt als nach corporaler Insemination in den Hornspitzen anzutreffen waren. In einem zweiten Experiment von FÉO et al. (1992) wurden mit der tiefintracornualen Besamungstechnik (66,6%) signifikant mehr Stuten tragend als bei corporaler Insemination (32%). Aufgrund der Tatsache, dass die Stuten zur Spermienauszählung schon zwei Stunden nach Insemination geschlachtet wurden, könnte

man vermuten, dass der Spermientransport noch nicht vollständig abgeschlossen war. Außerdem zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlich zurückgewonnenen Spermienanzahl zwischen dem rechten und linken Eileiter. Es ist also fraglich, in wie weit die Samendeposition die Besiedlung des kaudalen Isthmus beeinflusst. KATILA (2000) kann jedoch schon 8-20 min. nach corporaler Insemination einige radiomakierte Spermien mit Hilfe der Scintigraphie im Bereich der Hornspitze nachweisen. Und in einer Studie von RIGBY et al. (2000) zeigte sich, dass auch 18 Stunden nach cornualer Besamung sowohl bei normalen als auch bei zur Endometritis neigenden Stuten prozentual signifikant mehr Spermien aus dem ipsilateralen Eileiter zurückgewonnen werden konnten als aus dem kontralateralen.

6.4.2 Konzeptionsergebnisse in Abhängigkeit des Seitenvergleiches von Follikeln, Ovulationen, sowie Follikelgröße

Die durchschnittlichen Follikelgrößen von mindestens 40 mm zum Zeitpunkt der medikamentellen Ovulationsinduktion entsprechen der Versuchsvorgabe. Die Anzahl der Follikel und Ovulationen, sowie die daraus resultierenden Trächtigkeiten waren gleichmäßig zwischen der rechten und linken Seite verteilt. Im Mittel entwickelten sich 1,24 Follikel pro Stute, von denen 1,10 Follikel pro Stute zur Ovulation kamen. Innerhalb der Frischspermagruppen der rechten Seite war die Trächtigkeitsrate der hysteroskopischen Besamung (50 Mio. pms/12ml) signifikant besser als bei der intracorporalen und tiefintracornualen Gruppe.

Wenn man das Verhältnis von Ovulationen zu Trächtigkeiten zwischen der linken und rechten Seite innerhalb der Gruppen vergleicht, so fällt auf, dass jeweils die Befruchtungsergebnisse der hysteroskopischen Gruppen (FS-3 u. TG-3) rechts signifikant besser ausfallen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Summen der Tiefgefrierspermagruppen wieder, wobei sich die Trächtigkeitsrate zu Gunsten der rechten Seite signifikant von der linken unterscheidet. Auffällig ist, dass für die linken Besamungen auch eine signifikant längere Zeit in Anspruch genommen wurde als für die rechten. In diesem Zusammenhang kann davon ausgegangen werden, dass es – möglicherweise auf Grund von anatomischen Gegebenheiten – Schwierigkeiten gab, das Endoskop bis in die Hornspitze vorzuschieben. Es liegt also die Vermutung nahe, dass eventuell lokal entstandene Irritationen der endometrialen Schleimhaut einen negativen Effekt auf die Entstehung einer Trächtigkeit hatten. Dass das Sperma durch

die längere Verweildauer im Inseminationskatheter negativ beeinflusst wurde, ist eher unwahrscheinlich.

6.5 Resorptionsrate

Die Resorptionsrate der hier untersuchten Stuten lag bei 8,7%. Wobei das durchschnittliche Resorptionsvorkommen in der Gruppe TG-1 tendenziell (p = 0,0614) höher ausfiel als in der Gruppe TG-4. Die in den Studien von KOSKINEN et al. (1990) und WOODS et al. (1990) beschriebene höhere Fruchtresorptionsrate bei postovulatorisch besamten Stuten kann in der vorliegenden Studie keine Erklärung darstellen, da die Stuten präovulatorisch besamt wurden. Desweiteren könnten die niedrigen Werte in den tiefintracornualen Besamungsgruppen ein Hinweis darauf sein, dass befürchtete Läsionen im Endometrium durch die Manipulation beim Vorschieben der Besamungspipette nicht zu einer erhöhten Fruchtresorptionsrate führten.

6.6 Uterusödem

Die endometriale Ödematisierung zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion äußerte sich durchschnittlich in einem deutlich sichtbar ausgeprägten Ödem. Nur in den Gruppen TG-2 und TG-3 schien sich das Uterusödem schon etwas mehr in Rückbildung zu befinden. Dies bestätigt die Annahme, dass die Stuten in Gruppe TG-2 vom Zyklusstadium schon etwas weiter fortgeschritten waren und könnte erklären, warum bei diesen Stuten im Durchschnitt die Ovulation etwa zwei Stunden eher festzustellen war als bei den Stuten der übrigen Gruppen. BRAGG WEVER et al. (2002) stellten durch die computergestützte Pixelauswertung von Ultraschallbefunden fest, dass die Ödemausbildung im Uteruskörper früher beginnt und weniger variiert als in den Gebärmutterhörnern. Außerdem beobachteten die Autoren die Beschleunigung der Ödematisierung durch hormonelle Intervention von $PGF_{2\alpha}$ und hCG.

6.7 Endometriale Reaktion

Bei 9,4% der Stuten kam es 24 Stunden nach der Besamung zu einer im Ultraschallbild festzustellenden Ansammlung von Flüssigkeit. Die Zahl der Stuten, die derartig auf die Besamung reagierten, unterschied sich zwischen Frisch- und Tiefgefriersperma nicht so

deutlich wie KOTILAINEN et al. (1994) und TROEDSSON et al. (1998) es beobachten konnten. Nach TROEDSSON et al. (1998) beruht die heftigere endometriale Reaktion bei Einsatz von Tiefgefriersperma auf der Reduktion des Seminalplasmas im Rahmen der Herstellung von Tiefgefriersperma und gegebenenfalls auf stärkeren antigenen Wirkungen tiefgefrorener Samenzellen.

Werden corporal und cornual besamte Stuten getrennt voneinander betrachtet, so zeigen sie mit 7,9 und 10,4% keine signifikant unterschiedlichen Reaktionen auf die Besamung. MANNING et al. (1998) und VAZQUEZ et al. (1998) berichten, dass 10% bzw. 60% der hysteroskopisch besamten Stuten mit einer intrauterinen Flüssigkeitsansammlung reagierten. SCHIEMANN et al. (2001) untersuchten den mikrobiologischen und histopathologischen Status fünf Tage nach Distension des Uterus mit gefilterter Luft. Bei Stuten im Diöstrus stellte sich heraus, dass vier von acht zuvor negativ getupferten Stuten mit pathogenen Keimen (in drei Fällen Pseudomonas aeruginosa) belastet waren, und dass sich bei fünf der Stuten histopathologisch leicht akut-entzündliche endometriale Reaktionen entwickelt hatten. Bei einer Stute manifestierte sich eine akut oberflächliche Endometritis. 75% der Stuten zeigten die histolopathologische Entzündungsreaktion auch noch vor dem nächsten Östrus. Aus diesem Grund sollte der auf die Hysteroskopie folgende Zyklus laut SCHIEMANN et al. (2001) nicht zur Insemination genutzt werden.

Zwischen den corporalen und cornualen Gruppen waren in Bezug auf die Trächtigkeitsraten (54,5 u. 45%) keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

6.8 Endometriumszysten

Drei Prozent der in dieser Studie vorgestellten Stuten mit einem Durchschnittsalter von 13 Jahren hatten vereinzelt ultrasonographisch zu detektierende Gebärmutterzysten, die einen maximalen Durchmesser von 26 mm aufwiesen. Dieses Ergebniss lässt sich mit einer Studie von MERKT et al. (1991) vergleichen, in der bei Stuten in einem Alter von durchschnittlich 13,5 Jahren geringgradig Endometriumszysten von maximal zwei Zentimeter beobachtet wurden. MERKT et al. (1991) gehen davon aus, dass es sich bei dem Zystenvorkommen um eine Folgeerscheinung nach Trächtigkeiten handelt, da in ihrer Studie nur Stuten Endometriumszysten aufwiesen, die wenigstens einmal gefohlt hatten. Dass die Zysten zu einer erhöhten Fruchtresorption führen, konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet

werden; dies liegt möglicherweise an der sehr geringen Stutenanzahl in dieser Gruppe und an der geringen Trächtigkeitsrate von 30%. Dieses Ergebnis entspricht allerdings der von KLUG (2002) vorgeschlagenen Einteilung zur Einschätzung der Fruchtbarkeitsprognose, bei der den Stuten ohne klinische und bakteriologische Bedenken mit nicht-adäquatem endometrialhistologischen Befund eine Fruchtbarkeitsaussicht von 25 bis 50% zukommt.

6.9 Morphologie der uterotubalen Papille

Bei 62 Stuten wurde die uterotubale Papille nach ihrer Morphologie ausgewertet. In 46,8% der Fälle kam es zu einer zapfenförmigen Erscheinung, bei 43,6% der Stuten erschien sie hügelförmig, und 9,7% der Papillen stellten sich flach dar. MANNING et al. (1998) teilten die Uterotubalpapille in folgende Kategorien ein: papillenförmig (36%), komplex (32%), diffus (17%) und mit doppelten Hügelkamm (11%). WILSON (1983) beschreibt, dass die Papille sowohl rund, oval als auch erhaben sein kann und häufig in ihrer Größe variiert; nach seiner Erfahrung kann i.d.R. ein Katheter mit 1mm Durchmesser in die Papillenöffnung eingeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Hälfte der ausgewerteten Stuten eine rosettenförmige Papillenöffnung beobachtet, die sich wahrscheinlich durch die von BOYLE et al. (1987) und SCOTT et al. (2002) beschriebenen radial angeordneten Epithelfalten in dieser Form darstellt.

Bei 8,1% der ausgewerteten Stuten erschien die Papille umgeben von einem pink schimmernden Hof, der sich von der umgebenden Schleimhaut abzeichnete. Dieses Phänomen wird ebenfalls von BRACHER und ALLEN (1992) beschrieben, die außerdem feststellten, dass sich die uterotubale Papille ähnlich der Zervix im Östrus ödematös und relaxiert darstellt, während sie im Diöstrus blass, fest und protuberant erscheint. Ob die Verfärbungen im direkten Umfeld der Papille tatsächlich ein Zeichen für eine gesteigerte Durchblutung der UTP waren, oder ob es sich hierbei nur um einen technisch-optischen Effekt handelte, konnte nicht geklärt werden. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Trächtigkeitsraten (62%, 63% u. 50%) und der Papillenform konnte in vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden.

6.10 Inseminationsdauer

Für den hysteroskopischen-intratubalen Besamungsvorgang wurde von MANNING et al. (1998) eine Inseminationsdauer von 5-20 Minuten veranschlagt. KOENE et al. (2002) brauchten maximal 5 Minuten für das Auffinden der Eileiterpapille. Die durchschnittliche Inseminationsdauer in der vorliegenden Studie betrug für den gesamten hysteroskopischen Besamungsvorgang (inkl. Fohlenrossen) 6,7 Minuten, wobei für die hysteroskopischen Besamungen in das linke Uterushorn signifikant längere Zeit in Anspruch genommen wurde. Wie auch in anderen Studien (MORRIS et al. 2000, KOENE et al. 2002) von je drei Fällen berichtet wurde, konnte bei zwei Stuten in der vorliegenden Studie die Uterotubalpapille nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Das Inseminat musste quasi tiefintracornual abgesetzt werden. Bei zwei weiteren Stuten konnte das Endoskop zwar von rektal in der Hornspitze palpiert werden, optisch war jedoch kein Ende der Hornspitze auszumachen. Bei den zuletzt erwähnten Tieren handelte es sich um Stuten in der Fohlenrosse. Bei einer Häufung von Schwierigkeiten in der Fohlenrosse, sollte der Einsatz der hysteroskopischen Besamung bei diesen Stuten überdacht werden.

Alle Stuten tolerierten den Besamungsvorgang ohne sichtbare Verhaltensänderungen. Allerdings zeigte sich in der Studie von SCHIEMANN (2001), dass bei Distension der Gebärmutter mit Luft ein Druck oberhalb des Arbeitsbereiches (20 ± 5 mmHg) zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz führen kann. Die Gefahr, bei Stuten im Östrus den Arbeitsdruck zu überschreiten, wenn es darum geht, Luft in die jeweilige Hornspitze zu insufflieren, wird aufgrund der hier gemachten Erfahrungen als gering eingeschätzt, da die Luft über die Zervix spontan entweichen kann. Aufmerksamkeit ist allerdings geboten, wenn die durchführende Person mit der Hand von vaginal die Zervix geschlossen hält oder die Stute zu einer Zervixenge neigt. Hier sei aus praktischen Gründen erwähnt, dass das Vorschieben des Endoskops unter manueller rektaler Kontrolle nicht nur eine reduzierte Belastung durch geringere Luftinsufflation darstellt, sondern auch die Lokalisation und Verbiegungen der Endoskopspitze sofort korrigiert werden können.

6.11 Ovulationszeitpunkt nach hCG-Applikation und Besamung

Zur gezielteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Besamungstechnik und der Trächtigkeitsrate wurden in dieser Studie die Einfüsse von Besamungsfrequenz und Besamungsintervall ausgeschaltet, indem die Stuten nur einmal pro Zyklus besamt wurden. Aufgrund dieses Vorgehens gewinnen Besamungszeitpunkt und Untersuchungsintervall in Hinblick auf die Beeinflussung der Konzeptionsergebnisse noch mehr Bedeutung. Das Zeitschema wurde mit Hilfe der Ovulationsinduktion durch humanes Choriongonadotropin so gewählt, dass bei den mit Frischsperma besamten Stuten i.d.R. 12 Stunden nach Insemination die Ovulation festgestellt werden konnte. Für die Stuten, die Tiefgefriersperma erhielten, wurde mit 30 Stunden post injectionem ein späterer Besamungszeitpunkt als bei Besamung mit Frischsperma gewählt, um möglichst ovulationsnah zu besamen. Bei den Stuten der TG-Spermagruppen wurde die Ovulation durchschnittlich etwa 8 Stunden nach Insemination festgestellt. Dass bei den Stuten der Gruppe TG-2 die Ovulation mit 6,2 Stunden p.i. signifikant früher festgestellt werden konnte, mag daran liegen, dass diese Stuten durchschnittlich schon weiter im Zyklusgeschehen waren als die Stuten der anderen drei Gruppen. Entscheidende Auswirkungen hat der Zeitunterschied vermutlich nicht gehabt, denn dies hätte sich wahrscheinlich in den Trächtigkeitsraten widergespiegelt.

Bei 96,8% der 342 Stuten dieser Versuchsreihe konnte mindestens eine Ovulation innerhalb von durchschnittlich 36,7 Stunden nach intravenöser hCG-Applikation von 1500 IU festgestellt werden. In der einfaktoriellen Varianzanalyse ergaben sich für die meisten Werte signifikante Unterschiede. Maximal kam es jedoch 3,2 Stunden früher zu einer Ovulationsfeststellung. In der Literatur (SIEME und KLUG 1996, MANNING et al. 1998, MORRIS et al. 2000, SCHÄFER 2001 und BRAGG WEVER et al. 2002) wurden nach Induktion der Ovulation mittels hCG Ovulationsraten von 70-95%, 66,7%, 79,1%, 97,5% und 85% beschrieben.

Da nicht nur aufgrund der uterinen Belastung sondern auch aus wirtschaftlichen Gründen Einzelinseminationen gerade beim Einsatz von Tiefgefriersamen bevorzugt werden, sind in der Vergangenheit viele Studien zur Ermittlung des günstigsten Besamungszeitpunktes und zur Optimierung des Besamungsmanagements durchgeführt worden.

KOSKINEN et al. (1990) und WOODS et al. (1990) kamen zu dem Ergebnis, dass die Trächtigkeitsrate der Stuten, die einen Tag nach Ovulation besamt wurden, signifikant niedriger ist als die der präovulatorisch oder am Tag der Ovulation besamten Stuten. SQUIRES et al. (1998) vermuten, dass Besamungen, die in einem zeitlichen Zusammenhang von weniger als 24 Stunden zur Ovulation stehen, sich positiv auf die Fertilität auswirken.

In einer Studie von SCHÄFER (2001) zur Terminierung der Samenübertragung und Optimierung der Besamungsstrategie wurden die höchsten Trächtigkeitsraten verzeichnet, wenn die Stuten 24 - 0 Stunden vor Ovulation besamt wurden. Bei Versuchen mit Tiefgefriersperma lagen die Trächtigkeitsraten bei Besamung von 0 - 12 Stunden nach Ovulationsfeststellung höher – jedoch nicht signifikant höher – als bei den Stuten, die 12 - 0 Stunden vor Ovulation besamt wurden.

6.12 Trächtigkeitsraten

Es gibt in dieser Studie zwischen den verschiedenen Besamungstechniken sowohl bei der Betrachtung der Gesamtpopulation als auch in Hinblick auf die tragenden Stuten nach singulärer Ovulation keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Trächtigkeitsrate. Lediglich der Einsatz von Frischsperma führt, in der Summe betrachtet, in beiden Kategorien zu signifikant höheren Befruchtungsergebnissen gegenüber der Besamung mit Tiefgefriersperma.

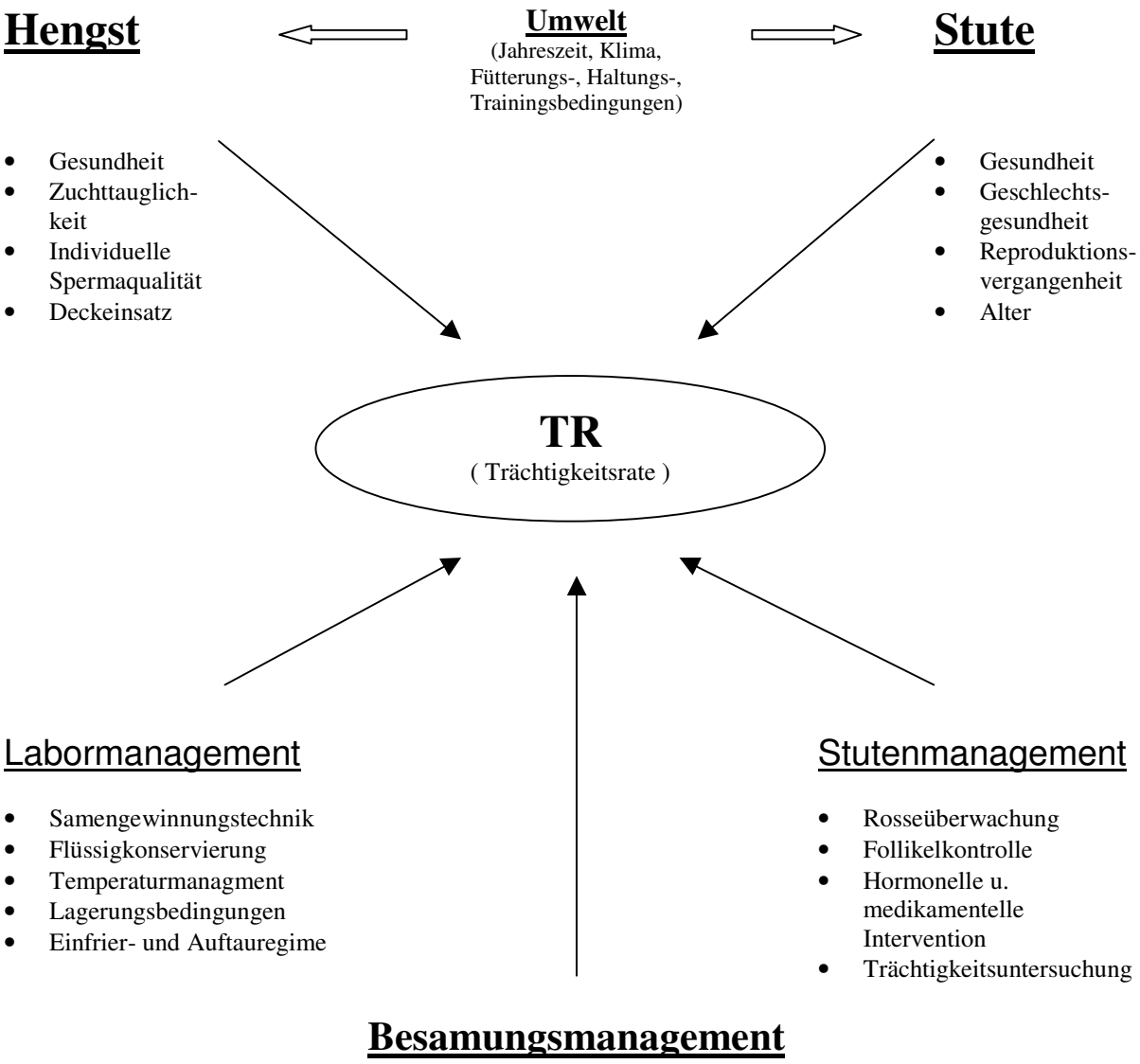
Besamungsdosen von 50 x 10^6 pms Frischsperma (bei Einsatz am Tag der Gewinnung) bzw. insgesamt 100 x 10^6 TG-Sperma können demnach ohne Fertilitätseinbußen eingesetzt werden. Es ist in zahlreichen anderen Studien (BUCHANAN et al. (2000), MORRIS et al. (2000), LINDSEY et al. (2001, 2002), RIGBY et al. (2001) und ALVARENGA et al. (2002)) gelungen, mit weitaus niedrigeren Spermienzahlen erfolgreich zu besamen. In aller Regel war hier die Aufbereitung des Ejakulats (Percoll-Dichtegradientenzentrifugation) allerdings nicht nur zeit- und arbeitsintensiv, sondern verlangte auch ein gut ausgerüstetes Labor. Mit Blick auf den Praxisalltag könnten nach den Ergebnissen der hier vorgelegten Studie aus einem Ejakulat eines Warmbluthengstes mit durchschnittlich 5-7 Milliarden Spermien (PICKETT et al. 1987) und einer angenommenen Vorwärtsbeweglichkeit von 50% bis zu 50 bis 70 Stuten besamt werden, ohne dass es einen zeit- oder labortechnischen Mehraufwand bedeuten würde. Angesichts dieser Tatsache erscheint es unnötig und unpraktikabel, die Spermiendosis unter

aufwendigen Verfahren noch weiter zu verringern. Diese Erkenntnis könnte allerdings für Hengsthalter und TG-Sperma-Handel erhebliche wirtschaftliche Auswirkungen haben.

Wenn man davon ausgeht, dass bei der oben erwähnten Dosierung die Besamungstechnik keinen signifikanten Einfluss auf die Trächtigkeitsraten besitzt, ist es weniger kosten- und arbeitsintensiv, corporal oder tiefintracornual zu besamen. Außerdem ist laut SCHIEMANN et al. (2001) zu vermuten, dass die Prozedur der Hysteroskopie die Stuten für eine bakterielle Keimbesiedlung empfänglich macht und häufig eine – nur histopathologisch nachweisbare – akute Entzündungsreaktion nach sich zieht. Da die Ergebnisse der vorliegenden Studie ohnehin den Schluss zulassen, dass die hysteroskopische Besamung bei Stuten mit problembehaftetem Vorbericht nicht von Vorteil ist, stellt sich die grundsätzliche Frage nach der Indikation für den Einsatz dieser Inseminationstechnik. Hier sei auf die Studien von BUCHANAN et al. (2000) und LINDSEY et al. (2001, 2002 a, b, c) verwiesen, die mit den cornualen Besamungstechniken durch flowzytometrische Verfahren geschlechtsgetrenntes Sperma in minimalen Dosierungen erfolgreich einsetzten. KOENE et al. (2002) testeten die uterotubale Besamung unter Einsatz von Sperma eines subfertilen Hengstes. Die hysteroskopische Besamung hat gegenüber der rektal geführten TICNI den Vorteil, dass man die Besamung optisch nachvollziehen kann, das Endoskop flexibler zu handhaben ist und sich das Endoskop beim Festsitzen in einer Schleimhautfalte durch die Insufflation von Luft leichter in die Hornspitze vorschieben lässt. Die tiefintracornuale Besamungstechnik ist nicht nur sehr viel kostengünstiger, sondern auch ortsunabhängig (auf dem Züchterhof) von einer Person durchführbar. Hinzu kommt, dass durch die Verwendung von Einmalbesamungspipetten die gleiche Hygiene wie bei der herkömmlichen Besamung eingehalten werden kann.

In der Literatur wird über tiefintracornuale oder hysteroskopische Besamungen einerseits von besseren (FÉO et al. (1992), WOODS et al. (2000), MORRIS et al. (2000), ALVARENGA et al. (2002) u. PETERSEN et al. (2002)) und andererseits von schlechteren (MANNING et al. (1998), BUCHANAN et al. (2000), McCUE et al. (2000) u. SQUIRES et al. (2002)) Befruchtungsergebnissen gegenüber der corporalen Inseminationstechnik berichtet. Dies mag seine Ursache nicht nur in der individuellen Anwendung der Technik haben – denn MÜLLER et al. (1987) erhält signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Besamungstechniker –, sondern lässt vermuten, dass die Gesamtheit aller reproduktionsbeeinflussenden Faktoren eine Rolle spielt (s. Abb. 02).

Abb. 02: Einflussfaktoren auf die Trächtigkeitsrate



KB - Dosis	KB - Zeitpunkt	KB -Technik	KB - Frequenz	KB - Intervall
• KB - Volumen • KB - Dichte	• möglichst ovulationsnah	• intracorporal (ICPI) • tiefintracornual (TICNI) • uterotubal (HYSI)	• Einzelbesamung • Mehrfachbesamungen	• TG - Sperma - alle 12 Std. • Frischsperma - alle 24 Std. - alle 48 Std.

Die durch die Inseminationstechnik veränderte Ausgangslokalisation der Spermien im weiblichen Genitale hat laut SCOTT et al. (2000) einen Einfluss auf die weitere Spermienverteilung. Auch die Studien von FÉO et al. (1992) und RIGBY et al. (2000) weisen darauf hin, dass es von dem Ort der Samendeponierung abhängt, wieviele Spermien an der uterotubalen Papille bzw. im Ovidukt anzutreffen sind. Wenn sich durch die cornualen Besamungstechniken die Anzahl der befruchtungsfähigen Spermien im kaudalen Isthmus erhöht, dann bleibt trotzdem noch ungeklärt, wie hoch die tatsächliche Bindungskapazität des kaudalen Isthmus ist, ob die ungebundenen luminalen Spermien auch für die Befruchtung in Frage kommen, wie sich der Ablösungsprozess vom Epithel des kaudalen Isthmus gestaltet (DOBRINSKI et al. 1997, LEFEBVRE et al. 1995) und wieviele Spermien tatsächlich zum Ort der Befruchtung – der Eileiterampulle – hochwandern (YANAGIMACHI 1994). Da all diese Vorgänge noch nicht im Detail erforscht werden konnten, bleibt die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Besamungstechnik und der Fertilitätsrate bei Warmblutstuten zunächst offen.

YANAGIMACHI (1994) behauptet, dass die uterotubale Verbindung bei Spezies mit intrauteriner Samendeponierung (Pferd, Schwein) die Hauptselektionsbarriere für die Spermien darstellt. Dies könnte erklären warum in der Arbeit von KRÜGER (2000) zur chirurgischen tiefintrauterinen Besamung von Jung- und Altsauen bei reduzierter Spermiendosis keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der konventionellen Besamung in Trächtigkeits- und Abferkelraten sowie Wurfgrößen zu verzeichnen sind. MARTINEZ et al. (2001, 2002) zeigen in ihren Versuchen, dass es trotz der komplizierten anatomischen Bedingungen des Genitaltraktes der Sauen möglich ist mit einer reduzierten Spermiendosis nicht-invasiv mittels Endoskop oder flexiblem Kathether ebenso erfolgreich zu besamen, wie auf konventionellem Weg.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, ist der Effekt der cornualen Besamungstechniken bei den hier festgelegten Versuchsbedingungen anscheinend nicht so groß, dass durch die Samendeponierung an der Hornspitze bzw. UTP signifikant mehr Stuten tragend werden als bei der herkömmlichen Besamung in den Uteruskörper. Dennoch ist der Einfluss der tiefintracornualen und hysteroskopischen Technik möglicherweise groß genug, um bei kontralateraler Doppelovulation die zweite Trächtigkeit auf der kontralateralen Seite zu verhindern. Anhand weiterer Studien müsste geprüft werden, ob bei einer größeren

Stutenzahl mit Doppelovulation die tiefintracornuale und hysteroskopische Besamungstechnik tatsächlich das Risiko einer Zwillingsträchtigkeit vermindert.

Es zeigt sich jedoch anhand der Ergebnisse der hier vorliegenden Studie, dass durch den Einsatz der tiefintracornualen (TICNI) und hysteroskopischen (HYSI) Besamungstechnik keine signifikant besseren Trächtigkeitsraten im Vergleich zur konventionellen Samenübertragung in den Gebärmutterkörper erreicht werden.

7 Zusammenfassung

Anna-Christine Bonk (2002): Einfluss der Inseminationstechnik und Lokalisation des Inseminats auf die Trächtigkeitsrate bei Warmblutstuten unter Verwendung reduzierter Dosen flüssigkonservierten und tiefgefrorenen Hengstspermas.

In der vorliegenden Studie wurden am Niedersächsischen Landgestüt Celle 342 Warmblutstuten innerhalb der Zuchtsaisons 2001 und 2002 nach dem Zufallsprinzip in neun Versuchsgruppen eingeteilt, um drei verschiedene Besamungstechniken bei reduzierter Spermiendosis unter Einsatz von Frisch- und Tiefgefriersamen miteinander zu vergleichen. Die Stuten wurden dazu einem konstanten Besamungsmanagement unterzogen. Als Voraussetzung zur Ovulationsinduktion galt ein präovulatorischer Follikel von ∅ 40 mm bei sich im Östrus befindenden Stuten. Die Stuten wurden nach intravenöser Gabe von 1500 IU hCG (Choriolutin 5000®, Fa. Albrecht, Aulendorf) 24 Stunden später mit Frisch- oder 30 Stunden später mit Tiefgefriersperma besamt. 48 Stunden nach hCG-Gabe hatten 96,8% der Stuten mindestens einen Follikel ovuliert (n = 331). Das eingesetzte Sperma stammte von Hengsten mit geprüfter normaler Fertilität. Nach der täglichen Samengewinnung wurde das mit Verdünner (INRA 82) aufbereitete Ejakulat bei + 5°C bis zur 2-4 Stunden später erfolgenden Insemination gelagert. Die Untersuchung zum Zweck der Feststellung einer Trächtigkeit erfolgte zwischen dem 15. und 18. Tag post ovulationem. Neben der Standardbesamung in den Gebärmutterkörper kam sowohl die von transrektal gelenkte tiefintracornuale Insemination wie auch die hysteroskopische Samendeponierung auf die uterotubale Papille zum Einsatz. Die Stuten der ersten vier Frischspermagruppen (FS-1, FS-2, FS-3 u. FS-4) wurden mit jeweils 50 Millionen progressiv motilen Spermien (pms) in den Gebärmutterkörper, tiefintracornual und uterotubal inseminiert. Das Besamungsvolumen der ersten drei Gruppen wurde kurz vor der Besamung von 25 Millionen pms/ml auf 12 ml durch Nachverdünnung erhöht. In FS-4 wurde mit den konzentrierten 2 ml besamt. FS-5 stellte mit 300 Millionen pms/12 ml die corporale Kontrollgruppe dar. Die Stuten der ersten drei Tiefgefrierspermagruppen (TG-1, TG-2 u. TG-3) wurden corporal, tiefintracornual und hysteroskopisch mit jeweils einer 0,5-ml-Paillette und einer Dosis von 100 Millionen Spermien belegt. Die Spermiendosis der konventionellen, corporalen Kontrollgruppe beinhaltete eine Standarddosis von 800 Millionen Gesamtspermien. Die Auftaurate betrug ≥ 35% vorwärtsbewegliche Spermien.

Corporale Inseminationen in den Frischspermagruppen bei Stuten mit einem ungünstigen Vorbericht führten zu signifikant besseren Befruchtungsraten (84,6%) als bei Fohlen- und Maidenstuten (45%), während bei der hysteroskopischen Besamung Stuten mit Fohlen bei Fuß oder Maidenstuten bessere Trächtigkeitsraten (68,4%) aufwiesen als die Problemstuten (33,3%). Werden die Besamungstechniken innerhalb der Gruppe der vorberichtlich als Problemstuten geltenden Stuten verglichen, so stellt sich die corporale Insemination mit 300 Millionen progressiv motilen Spermien in Hinblick auf die Trächtigkeitsrate als signifikant günstiger dar als die hysteroskopische Besamung. Umgekehrt verhält es sich bei den Fohlen- und Maidenstuten. Dort werden mit den hysteroskopischen Inseminationen signifikant höhere Befruchtungsergebnisse erzielt als mit der Kontrollgruppe.

Außerdem auffällig sind signifikante Unterschiede zu Gunsten der mit der uterotubalen Besamungstechnik in das rechte Horn besamten Stuten (80%) gegenüber den linksseitig besamten (44,4%). Hysteroskopische Besamungen in das linke Horn dauerten im Mittel signifikant 3 Minuten länger als die rechtsseitigen. Durch den verzögerten Ablauf linksseitiger hysteroskopischer Inseminationen, welcher i.d.R. auf Schwierigkeiten beim Vorschieben des Endoskops in die Hornspitze zurückzuführen war, wurde die Fertilität signifikant negativ beeinflusst.

Betrachtet man die Verteilung von Zwillingsträchtigkeiten nach Doppelovulation, so fällt auf, dass sich bei Insemination in den Gebärmutterkörper die Anzahl der Zwillingsträchtigkeiten aus ipsilateralen Ovulationen (20%) von denen aus kontralateralen Ovulationen (33,3%) nicht signifikant unterscheidet. Bei den tiefintracornual und hysteroskopisch besamten Stuten zeichnet sich hingegen zwischen 44,4% Zwillingsträchtigkeit nach ipsilateraler Doppelovulation und 0% nach kontralateraler Doppelovulation ein signifikanter Unterschied ab.

Beim Einsatz von Frischsperma ergab sich eine Gesamtträchtigkeitsrate von 58,1%, die sich von der Trächtigkeitsrate der Stuten mit singulärer Ovulation (57,9%) nicht signifikant unterschied. Ebenso waren die Ergebnisse mit 45,3% und 44,4% bei Tiefgefriersperma nicht signifikant verschieden voneinander. Lediglich die Summe der Frischspermabesamungen wies gegenüber der Summe der mit Tiefgefriersperma besamten Stuten einen signifikanten Unterschied auf. Die in dieser Studie verglichenen Besamungstechniken und die damit einhergehende unterschiedliche Deponierung des Inseminats in utero (corporal, tiefintracornual, hysteroskopisch-uterotubal) bei Verwendung reduzierter Dosen flüssigkonservierter und tiefgefrorener Spermien unterschieden sich hinsichtlich der Fertilitätsergebnisse nicht signifikant.

8 Summary

Anna-Christine Bonk (2002) : Effects of insemination technique and site of sperm deposition on fertility in warmblood mares using reduced numbers of fresh and frozen/thawed sperm.

The objective of this study was to compare pregnancy rates resulting from three different insemination techniques when mares were inseminated with reduced numbers of diluted fresh or frozen/thawed stallion semen. Therefore, 342 mares were assigned randomly into five treatment groups of fresh and four treatment groups of cryopreserved semen. When mares in estrus had developed a follicle of ≥ 40 mm ovulation was induced by administering 1500 IU hCG iv. Mares in fresh-semen groups were inseminated once 24 hours (h) after hCG-treatment whereas frozen/thawed semen was transferred 30 h after hCG application. Within 48 h 96,8% of the mares ovulated at least one follicle. Semen from stallions of proven normal fertility was used in this experiment. The semen was collected every day, diluted with semen extender and stored at +5°C until insemination was carried out 2-4 h after semen collection (10-12 am). Pregnancy examinations were carried out by ultrasonography 15 to 18 days post ovulation.

Mares of the first three groups (FS-1, FS-2, FS-3) were inseminated with 50 x 10^6 progressive motile sperm (pms) diluted in 12 ml semen extender either intracorporal (ICPI), deep intracornual (TICNI) or by hysteroscopic insemination (HYSI) directly onto the papilla of the uterotubal junction. The mares of group FS-4 were inseminated with 50 x 10^6 pms in 2 ml. The control group (FS-5) received 300 x 10^6 pms in the uterine body. Mares in the frozen-semen groups (TG-1, TG-2, TG-3) were inseminated with a total of 100 x 10^6 frozen/thawed sperm packaged in one 0,5 ml straw. The frozen semen controls were inseminated with a total of 800 x 10^6 spermatozoa into the uterine body. Sperm in general had a post-thaw-motility of ≥ 35%.

Mares were subdivided into two groups by their reproductive history. The ones with good fertility prognoses (maiden- and lactating mares) showed higher pregnancy rates (68,4%), when hysteroscopically inseminated with fresh semen than barren mares or mares who lost their pregnancy through resorption or abortion (33,3%). When mares with decreased fertility prognosis were inseminated with 300 x 10^6 pms into the uterine body pregnancy rates were

significantly higher (84,6 %) compared to mares with foal or maiden mares (40%). Furthermore, using the hysteroscopic technique mares had better pregnancy results when inseminated on the right (80%) instead of left side (44,4). In addition the procedure of hysteroscopic insemination took significantly longer for the left than for the right side.

In 35 mares double ovulations occured and resulted in 4,7% twin pregnancies. 16 mares ovulated one follicle on each ovary. When they were inseminated hysteroscopically no twin pregnancies (0/10) were observed. Assuming that less sperm will reach the contralateral tip of the horn, the risk of twin pregnancies might be reduced when using a small number of sperm in a small insemination volume transfered intracornually instead of intracorporally.

There was no difference between the total pregnancy rate and the pregnancy rates of mares with single ovulations. However, the mean pregnancy rate for mares inseminated with frozen semen were significantly lower compared to the mares receiving fresh semen. To conclude, technique and site of sperm deposition in the female genital tract using reduced numbers of fresh and frozen/thawed spermatozoa did not affect pregnancy rates of warmblood mares significantly in the present study.

9 Literaturverzeichnis

ALEXANDER, S.L., C.H.G. IRVINE, N. SHAND u. M.J. EVANS (1995):
Is luteinizing hormone secretion modulated by endogenous oxytocin in the mare? Studies on the role of oxytocin and factores affecting its secretion in estrous mares.
Biol. Reprod., Mono 1, 361-371

ALLEN, W.R. u. V. BRACHER (1992):
Videoendoscopic evaluation of the mare`s uterus: III. Findings in the pregnant mare.
Equine vet. J. 24, 4, 285-291

ALVARENGA, M.A. u. K.M. LEÀO (2002):
Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient.
Theriogenology 58, 651-653

BADER, H. (1982):
An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare.
J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 59-64

BEDFORD, S.J. u. K. HINRICHS (1994):
The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares.
Theriogenology 42, 571-578

BIELANSKI, W., E. DUDEK, A. BITTMAR u. K. KOSINIAK (1982):
Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.
J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 21-26

BOYLE, M.S., D.G. CRAN, W.R. ALLEN u. R.H.F. HUNTER (1987):
Distribution of spermatozoa in the mares oviduct.
J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 79-86

BRACHER, V. u. W.R. ALLEN (1992):
Videoendoscopic evaluation of the mare`s uterus: I. Findings in normal fertile mares.
Equine vet. J. 24, 4, 274-278

BRACHER, V., S. MATHIAS u. W.R. ALLEN (1992):
Videoendoscopic evaluation of the mare`s uterus: II. Findings in subfertile mares.
Equine vet. J. 24 , 4, 279-284

BRAGG WEVER, N.D., R.A. PIERSON u. C.E. CARD (2002):
Assessment of endometrial edema and echotexture in natural and hormonally manipulated estrus in mares.
Theriogenology 58, 507-510

BUCHANAN, B.R., G.E. SEIDEL, P.M. McCUE, J.L. SCHENK, L.A. HERICKHOFF u. E.L. SQUIRES (2000):
Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa.
Theriogenology 53, 1333-1344

CHRISTIANELLI, M.J., E.L. SQUIRES, R.P. AMANN u. B.W. PICKETT (1984):
Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure.
Theriogenology 22, 613-622

CLAUS, R., M.A. DIMMICK, T. GIMENEZ u. L.W. HUDSON (1992):
Estrogens and prostaglandin $F2_{\alpha}$ in the semen and blood plasma of stallions.
Theriogenology 38, 4, 687-693

CLEMENT, F, P.VINCENT, R. MAHLA, J.C. MERIAUX u. E. PALMER (2000):
Which insemination results in fertilization when several are performed before ovulation ?
Reprod., Suppl. 56, 579-585

DOBRINSKI, I., T. T. SMITH, S.S. SUAREZ u. B.A. BALL (1996):
Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro.
Biology of Reprod. 56, 861-869

FÈO, J.C.S.A., E. OBA, R.C. BARNABE u. J.R. BASILE (1992) :
Artificial insemination in the equine: Distribution of spermatozoa in the genital tract : A comparison of mares inseminated in the uterine body and the uterine horn ipsilateral to the ovulatory follicle.
12th International Congress on animal reproduction, the Hague, the Netherlands, Aug. 23rd - Aug. 27th 1992, Congress Proc. Vol. 3, 1545-1547

GAHNE, S., A. GANHEIM u. L. MALMGREN (1998):
Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares.
Theriogenology 49, 5, 1071-1074

HO, H.-C. u. S. SUAREZ (2001):
Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation.
Reprod. 122, 519-526

HOUSEHOLDER, D.D., B.W. PICKETT, J.L. VOSS u. T.T. OLAR (1981):
Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility.
J. Equine vet. Sci. 1, 9-13

HUNTER, R.H.F., B. FLÈCHON u. J.-E. FLÈCHON (1987):
Pre- and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscope study.
Tissue & Cell, 19, 3, 423-436

IJAZ, A. und R. DUCHARME (1995):
Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C.
Theriogenology 44, 1039-1050

JASKO, D.J., J.M. MARTIN u. E.L. SQUIRES (1992):
Effekt of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares.
Theriogenology 37, 1233-1239

KATILA, T. (1997):
Interactions of the uterus and the semen.
Pferdeheilkd. 13, 5, 508-511

KATILA, T., M. CELEBI u. E. KOSKINEN (1996):
Effect of timing of frozen semen insemination on pregnancy rates in mares.
Acta vet. scand. 37, 3, 361-365

KATILA, T., S. SANKARI u. O. MÄKELÄ (2000):
Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares.
J. Reprod. Fert., Suppl. 56, 571-578

KATZ, D.F., E.Z. DROBNIS u. J.W. OVERSTREET (1989):
Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments.
Gamete Res. 22, 443-469

KLOPPE, L.H., D.D. VARNER, R.G. ELMORE, K.N. BRETZLAFF u. J.W. SHULL (1988):
Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa.
Theriogenology 29, 2, 429-439

KLUG, E. (1999):
Klinisch-gynäkologischer Untersuchungsgang.
In: DIETZ, O. u. B. HUSKAMP (Hrsg):
Handbuch Pferdepraxis.
Enke Verlag Stuttgart, 578-580

KLUG, E. (2002):
Untersuchung von Stute und Hengst auf Zuchttauglichkeit.
Pferdeheilkd. 18, 3, 225-229

KOENE, M., N. ISMER, J.H. SWAGEMAKERS, H. BADER u. B. MEINECKE (2002):
Insemination der Stute unter hysteroskopischer Kontrolle – Erste Resultate.
Pferdeheilkd. 18, 2, 165-168

KOSKINEN, E., H.LINDEBERG, H. KUNTSI, L. RUOTSALAINEN u. T. KATILA (1990):
Fertility of mares after postovulatory insemination.
J. Vet. Med., Ser. A 37, 1, 77-80

KOTILAINEN, T., M. HUHTINEN u. T. KATILA (1994):
Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus.
Theriogenology 41, 629-636

KRÜGER, C. (2000):
Untersuchungen zur intrauterinen Besamung mit reduzierter Spermienzahl bei Jungsauen und Altsauen.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

LEFEBVRE, R., R.P. DE MOTT, S.S. SUAREZ u. J.C. SAMPER (1995):
Specific inhibition of equine sperm binding to oviductal epithelium.
Biol. Reprod., Mono 1, 689-696

LEIPOLD, S.D., J.K. GRAHAM, E.L. SQUIRES, P.M. McCUE, S.P. BRINSKO u. D.K. VANDERVALL (1998):
Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine sperm.
Theriogenology 49, 1537-1543

LINDSEY, A.C., J.E. BRUEMMER u. E.L.SQUIRES (2001):
Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm.
Anim. Reprod. Sci. 68, 279-289

LINDSEY, A.C., L.H.A. MORRIS, W.R. ALLEN, J.L. SCHENK, E.L. SQUIRES u. J.E. BRUEMMER (2002 a):
Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa.
Equine vet. J. 34, 2, 128-132

LINDSEY, A.C., J.L. SCHENK, J.K. GRAHAM, J.E. BRUEMMER u. E.L. SQUIRES (2002 b):
Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa.
Equine vet. J. 34, 2, 121-127

LINDSEY, A.C., D.D. VARNER, G.E. SEIDEL, J.E. BRUEMMER u. E.L. SQUIRES (2002 c):
Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5 or 15 °C prior to flow-cytometric sorting.
Theriogenology 58, Abstr., 659-662

MANNING, S.T., P.A. BOWMANN, L.M. FRASER u. C.L. CARD (1998):
Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare.
Proceedings for Annual Meeting Dec. 4-6, 1998 in Baltimore, Maryland, Society for Theriogenology, 84-85

MARTINEZ, E.A., J.M. VAZQUEZ, J. ROCA, X. LUCAS, M.A. GIL, I. PARRILLA, J.L. VAZQUEZ u. B.N. DAY (2001):
Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows.
Reprod. 122, 289-296

MARTINEZ, E.A., J.M. VAZQUEZ, J. ROCA, X. LUCAS, M.A. GIL, I. PARRILLA, J.L. VAZQUEZ u. B.N. DAY (2002):
Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows.
Reprod. 123, 163-170

McCUE, P.M., J.J. FLEURY, D.J. DENNISTON, J.K. GRAHAM u. E.L. SQUIRES (2002):
Oviductal insemination of mares.
Reprod., Suppl. 56, 499-502

McKINNON, A.O. (1994):
Guidelines for veterinarians involved in breeding horses with frozen semen.
Australian Equine Veterinarian Vol. 12, 3, 99-103

MERKT, H., E. DEEGEN, M. DIECKMANN, H. BADER, S. GREMMES, J.C. MERKT u. H. WERHAHN (1991):
Zysten in der Gebärmutterwand von Stuten sowie Behandlungsversuche unter hysteroskopischer Kontrolle.
Pferdeheilkd. 7, 5 , 251-256

METCALF, E.S. (2000):
Insemination and breeding management.
In: J.C. SAMPER (Hrsg.):
Equine breeding management and artificial inseminaton
W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 179-194

MORRIS, L.H.A., R.H.F. HUNTER u. W.R. ALLEN (2000):
Hysteroscopic insemination of small numsers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares.
J. Reprod. Fert., 118, 95-100

MÜLLER, Z. (1987):
Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen.
J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 121-125

NEWCOMBE, J.R. (1999):
Practical evaluation of the fertilizing capacity of frozen-thawed horse semen.
Vet. Rec. 145, 46-47

NIE, G.J., J.G.W. WENZEL u. K.E. JOHNSON (2002):
Comparison of pregnancy outcome in mares among methods used to evaluate and select spermatozoa for insemination.
Anim. Reprod. Sci. 69, 211-222

NIKOLAKOPOULOS, M. u. E.D. WATSON (2000):
Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares.
Equine vet. J. 32, 2, 164-166

PETERSEN, M.M., M.T. WESSEL, M.A. SCOTT, I.K.M. LIU u. B.A. BALL (2002):
Embryo recovery rates in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa.
Theriogenology 58, 663-665

PICKETT, B.W. u. J.L. VOSS (1975):
The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility.
J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 95-98

PICKETT, B.W., E.L. SQUIRES u. A.O. McKINNON (1987):
Procedures for collection, evaluation utilization of stallion semen for artificial insemination.
CSU, Anim. Reprod. Lab. Bull. No 3, Fort Collins, Colorado

PICKETT, B.W., E.L. SQUIRES A.O. McKINNON, R.K. SHIDELER u. J.L. VOSS (1989):
Management of the mare for maximum reproductive efficiency.
CSU, Anim. Reprod. Lab. Bull. No. 5, Fort Collins, Colorado

RASCH, K., H.A. SCHOON, H. SIEME u. E. KLUG (1996):
Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares.
Equine vet. J. 28 , 6, 455-460

RIGBY, S.L., J. HILL, C. MILLER, J. THOMPSON, D. VARNER u. T. BLANCHARD (1999):
Administration of oxytocin immediately after insemination does not improve pregnancy rates in mares bred by fertile or subfertile stallions.
Theriogenology 51, 1143-1150

RIGBY, S.L., S. DERCZO, S.P. BRINSKO, T.L. BLANCHARD, T. TAYLOR, D.W. FORREST u. D.D. VARNER (2000):
Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination.
AAEP Proceedings Vol. 46, 332-334

RIGBY, S.L., A.C. LINDSEY, S.P. BRINSKO, T.L. BLANCHARD, C.C. LOVE u. D.D. VARNER (2001):
Pregnancyrates in mares following hysteroscopic or rectally-guided utero-tubal insemination with low sperm numbers.
Proceedings of 3rd International Symposium on Stallion Reprod., Fort Collins, CO, 49

SAACKE, R.G. (1983):
Semen quality in relation to semen preservation.
J. Dairy Sci. 66, 2635-2644

SAMPER, J.C. (2000):
Artificial insemination.
In: J.C. SAMPER (Hrsg.):
Equine breeding management and artificial inseminaton
W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 109-131

SAMPER, J.C. (2001):
Management and fertility of mares bred with frozen semen.
Anim. Reprod. Sci. 68, 219-228

SAMPER, J.C., J.C. HELLANDER u. B.G. CRABO (1991) :
Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality.
J. Reprod. Fert. Suppl. 44, 107-114

SCHÄFER, T. (2001):
Untersuchungen zur Optimierung des Besamungszeitpunktes in zeitlich definierten Intervallen zur Ovulation bei Stuten unter Einsatz von Frisch- sowie Tiefgefriersperma.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SCHATZMANN, U., H. JOSSECK, J.-L. STAUFFER u. L. GOOSSENS (1994):
Effects of α_2-agonists on intrauterine pressure and sedation in horses: Comparison between detomidne, romifidine und xylazine.
J. Vet. Med. A. 41, 523-529

SCHIEMANN, V. (2001):
Untersuchung zur Uterusdistension und intrauteriner Druckentwicklung bei der Hysteroskopie des Pferdes.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SCHIEMANN, V., C.P. BARTMANN, G. KIRPAL, A. v. REISWITZ, H.-A. SCHOON u. E. KLUG (2001):
Monitoring of the clinical, microbiological and histopathological state of the equine uterus after its distension with filtered air during hysteroscopy.
Pferdeheilkd. 17, 687-688

SCOTT, M.A. (2000):
A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract.
Anim. Reprod. Sci. 60-61, 337-348

SCOTT, M.A., I.K.M. LIU u. J.W. OVERSTREET (1995):
Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications.
41st Ann. AAEP Convent. Proc., Lexington, Kentucky (Dec.3-6,1995), Vol. 41, 1-2

SCOTT, M.A., I.K.M. LIU, J.W. OVERSTREET u. A.C. ENDERS (2000):
The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy.
J. Reprod. Fert. Suppl. 56, 415-421

SCOTT, M.A., D.D. VARNER, I.K.M. LIU u. A.C. ENDERS (2002):
Presumptive evidence of a preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy.
Theriogenology 58, 639-642

SIEME, H. u. E. KLUG (1996)
Spezielle Erfahrungen mit der gezielten Ovulationssteuerung bei der Stute zur Samenübertragung.
Collegium veterinarium XXVI, 76-78

SIEME, H., E. TÖPFER-PETERSEN, H. BADER, R. PETZOLDT u. H. MERKT (2001):
A.I.-sperm of the stallion: Evaluation criteria and minimal standards - a survey.
Pferdeheilkd. 17 , 2, 145-154

SQUIRES, E.L., J.K.BRUBAKER, P.M. McCUE u. B.W. PICKETT (1998):
Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen.
Theriogenology 49, 743-749

SQUIRES, E.L., H.P. REGER, L.J. MACLELLAN u. J.E. BRUEMMER (2002):
Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen.
Theriogenology 58, 655-658

THOMAS, P.G.A., G.G. IGNOTZ, B.A. BALL, S.P. BRINSKO u. W.B. CURRIE (1995):
Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells.
Am. J. Vet. Res., Vol. 56 (12), 1657-1662

TÖPFER-PETERSEN, E., D. WABERSKI, O. HESS, S. BELLAIR, A. SCHAMBOY, M. EKHLASI-HUNDRIESER, M. GENTZEL, A. REINEKE u. J. CALVETE (1998):
Bedeutung des Seminalplasmas für die Befruchtung - ein kurzer Überblick.
Tierärtzl. Umschau 53, 7, 1-6

TROEDSSON, M.H.T. (1995):
Uterine response to semen deposition in the mare.
Proc. Ann. Meet. Soc. Theriogenology. San Antonio, TX, Sept. 13-15, 130-135

TROEDSSON, M.H.T., I.K.M. LIU, M. ING, J. PASCOE u. M. THURMOND (1993):
Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares suspectible and resistant to chronic uterine infection.
Reprod. 99, 307-313

TROEDSSON, M.H.T., B.G. CRABO, N. IBRAHIM, M. SCOTT u. M. ING (1995):
Mating-induced endometritis: Mechanisms, clinical importance and consequences.
41st Annual AAEP Convention Proc., Lexington, Kentucky, Dec. 3-6, Vol. 41, 11-12

TROEDSSON, M.H.T., I.K.M. LIU u. B.G. CRABO (1998):
Sperm transport and survival in the mare.
Theriogenology 49, 905-915

TROEDSSON, M.H.T, C-S. LEE, R.D. FRANKLIN u. B.G. CRABO (2000):
The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation.
Reprod. 56, 341-349

VAZQUEZ, J.J., V. MEDINA, I.K. LIU, B.A. BALL u. M.A. SCOTT (1998):
Nonsurgical uterotubal insemination in the mare.
Proceedings for annual meeting Dec. 4-6, 1998 in Baltimore, Maryland from the society for theriogenology, 82-83

VIDAMENT, M., A.M. DUPERE, P. JULIENNE, A. EVAIN, P. NOUE u. E. PALMER (1997):
Equine frozen semen: freezability and fertility field results.
Theriogenology 48, 907-917

VIDAMENT, M., M. MAGISTRINI, E. PALMER u. F. CLEMENT (1999):
Equine Artificial Insemination in French National Studs.
Annual ESDAR Conference 1999, Workshops, 61-66

WATSON, E. (1995):
Artificial insemination in horses.
In Practice 17, 54-58

WILSON, G.L. (1983 a):
Hysteroscopic examination of mares.
Equine Pract., Vet. Med., 568-578

WILSON, G.L. (1983 b):
Hysteroscopic examination of mares.
Equine Pract., Vet. Med., 1455-1466

WOODS, J., D.R. BERGFELDT u. O.J. GINTHER (1990):
Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares.
Equine vet. J. 22, 6, 410-415

WOODS, J., S. RIGBY, S. BRINSKO, R. STEPHENS, D. VARNER u. T. BLANCHARD (2000):
Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E_2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body.
Theriogenology 53, 1827-1836

YANAGIMACHI, R. (1994):
Mammalian fertilization.
In: E. Knobil u. J. D. Neill (Hrsg.), The Physiology of Reproduction, Second Edition, Raven Press, Ltd., New York, 189-281

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erich Klug danke ich recht herzlich für die Überlassung dieses interessanten, praxisnahen Themas sowie für die freundliche Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Harald Sieme für die Betreuung dieser Arbeit, für die immer gewährte fachlich kompetente Beratung, seine konstruktive Kritik und die aufmunternden Sprüche, das viele Gelächter und die ausgesprochen nette Zusammenarbeit.

Herrn Landstallmeister Dr. B. Bade und allen Mitarbeitern des Niedersächsischen Landgestüts Celle danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. K. Rohn vom Institut für Statistik und Biometrie danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Die praktische Durchführung der Arbeit wäre ohne die stets bereitwillige Unterstützung und unermüdliche Hilfe von Ulla und Jochen (auch nach Feierabend) niemals möglich gewesen. Vielen Dank Euch beiden !

Für die endlose Geduld und die effektiven Nachhilfestunden am Computer möchte ich mich ganz herzlich bei Norbert und Vita bedanken.

Und schließlich danke ich vor allem meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, Calvin und meinen Freunden dafür, dass sie mich während der ganzen Zeit nicht nur unterstützt, aufgemuntert und ertragen haben, sondern mir gerade auch in der entscheidenden Phase mit Rat und Tat zu Seite standen. DANKE !

Anhang

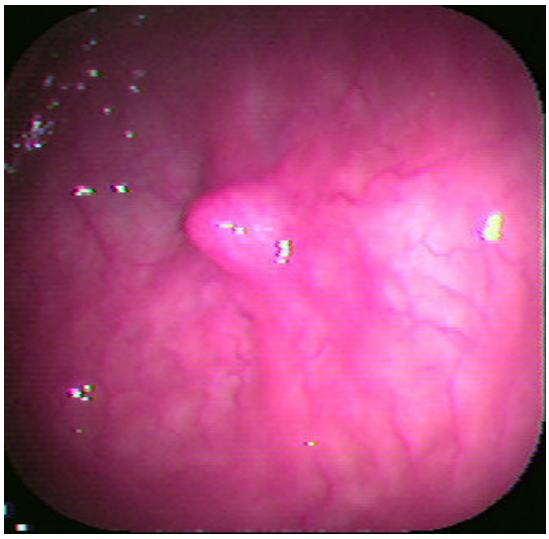


Bild 1 : Zapfenförmige UTP vor Insemination

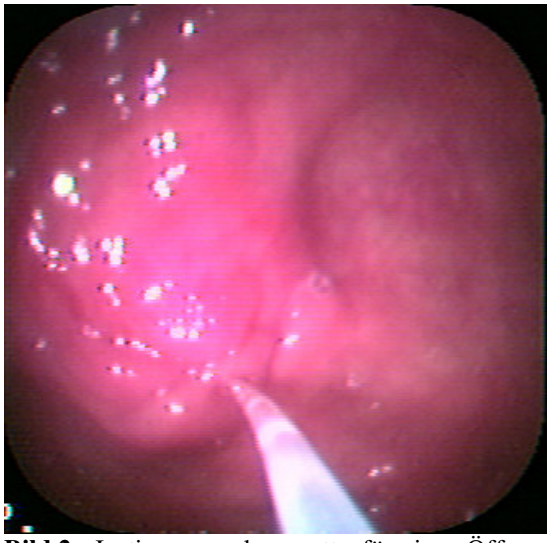


Bild 2 : Justieren vor der rosettenförmigen Öffnung

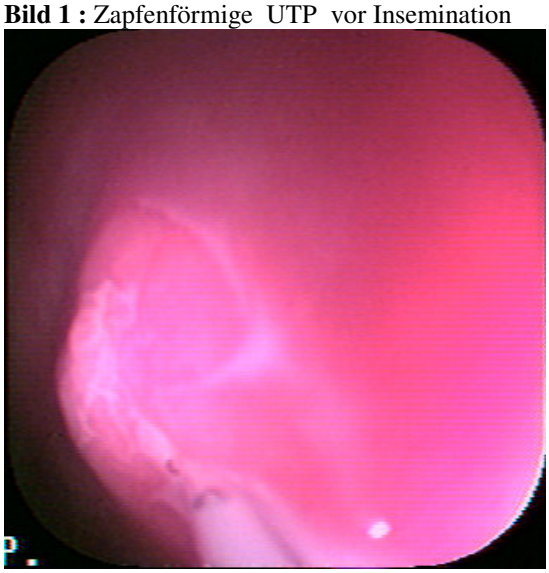


Bild 3 : Insemination

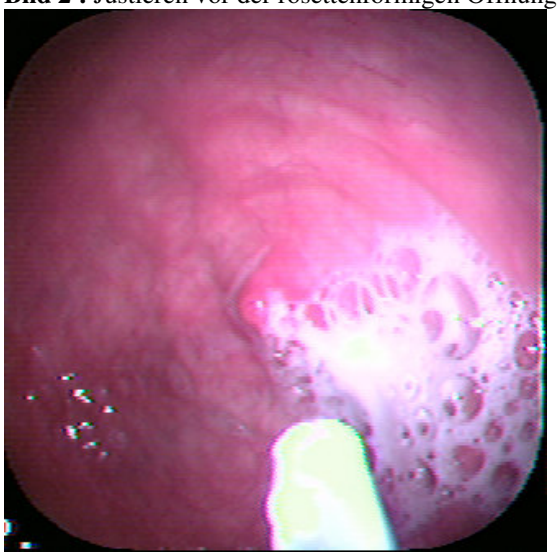


Bild 4 : Sperma in Bläschen seitlich der UTP

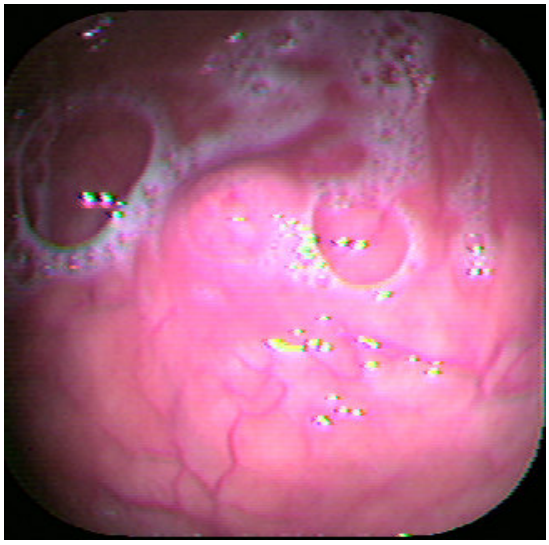


Bild 5 : Hügelförmige UTP post inseminationem

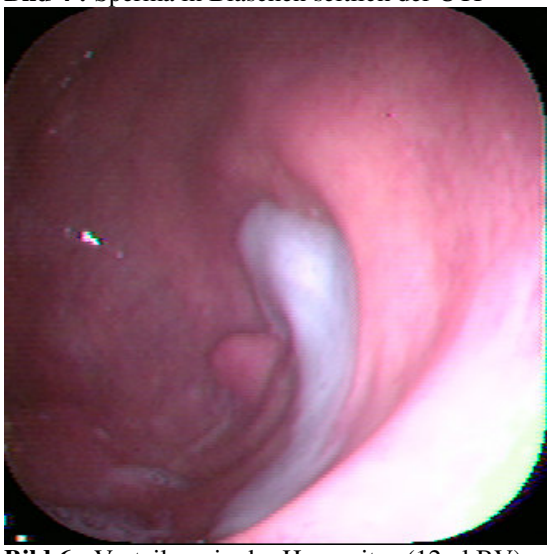


Bild 6 : Verteilung in der Hornspitze (12ml BV)