

Die Insemination der Stute unter hysteroskopischer Kontrolle – Erste Resultate

M. Koene¹, N. Ismer^{1,2}, J. H. Swagemakers¹, H. Bader² und B. Meinecke²

¹Tierärztliche Klinik für Pferde, Lüsche; ²Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover

Zusammenfassung

Während der Zuchtsaison 2001 wurden an zwei privaten Besamungsstationen in orientierenden Versuchen videoendoskopische Inseminationen bei 178 Oldenburger Warmblutstuten vorgenommen. Unter Verwendung eines Koloskopes, das bis zur Eileitermündung in die Uterushornspitze ipsilateral zum Ovar mit dem präovulatorischen Follikel eingeführt wurde, erfolgte die Samenapplikation direkt auf oder in die Nähe der uterinen Eileiterpapille. Die Versuchsbesamungen erfolgten mit dem Sperma von zwei Hengsten mit bekannter Fertilität (A, B) und einem Junghengst (C). Das verdünnte und zentrifugierte Sperma kam innerhalb von 9 Stunden nach der Gewinnung zum Einsatz. Bei Hengst B wurde teilweise auch unbehandeltes Nativsperma verwendet.

Hengst A (einseitige Orchidektomie nach Torsio testis) erzielte bei Besamungen mit 6, 12 bzw. 80×10^6 motilen Spermien 5,9% (1 von 17), 17,1% (7 von 41) bzw. 25,3% (21 von 83) Trächtigkeiten. Inseminationen mit 6 sowie 12×10^6 Spermien erfolgten jeweils in einem Zyklus pro Stute, Inseminationen mit 80×10^6 in insgesamt 146 Zyklen.

Wegen der niedrigen Erfolgsquote bei Hengst A wurde die Spermadosis bei Hengst B auf 100, 150 bzw. 200×10^6 und bei Hengst C auf 100×10^6 erhöht. Hengst B erzielte bei einer Gesamtzahl von 89 genutzten Zyklen Trächtigkeiten – in der Reihenfolge der genannten Spermiosierungen – bei 13 von 21 (61,9%), 8 von 20 (40,0%) sowie 12 von 20 (60,0%), Hengst C bei 9 von 20 (45,0%) inseminierten Stuten (mit 28 genutzten Zyklen). Insgesamt führten die endoskopischen Besamungen zu 71 Graviditäten entsprechend einer Trächtigkeitsrate von 39,9%.

Schlüsselwörter: Stute, Insemination, Videoendoskopie, Spermiosierung

Video endoscopic inseminations in broodmares – First results

In a field trial conducted at two commercial A.I. centers during the breeding season 2001, video endoscopic inseminations were performed in 178 broodmares (Oldenburger Warmblood, age 2 to 20 years) by depositing the inseminate directly onto or in the vicinity of the oviductal papilla ipsilateral to the ovary bearing the ovulatory follicle.

Semen of two stallions of proven fertility (stallions A, B) and one young stallion (C) diluted and centrifuged to prepare small insemination doses with reduced numbers of spermatozoa was used within 9 hours of collection. In stallion A, hemi-castrated because of unilateral torsio testis four months ago, inseminations with 6, 12 or 80×10^6 , respectively, motile spermatozoa resulted in 1/17 (5,9%), 7/41 (17,1%) and 21/83 (25,3%) respectively, pregnancies. On account of these low conception rates the sperm number was increased performing inseminations with semen of stallion B (100 , 150 and 200×10^6 spermatozoa, respectively) and stallion C (100×10^6 spermatozoa) leading to the following pregnancy results: 13/21 (61,9%), 8/20 (40,0%) and 12/20 (60,0%, stallion B) and 9/20 (45,0%, stallion C) based on 89 mare cycles. Altogether 71 of 178 mares became pregnant (39,9%) during the trial by use of the endoscopic insemination technique.

It is concluded that the videoendoscopic insemination technique can be integrated into the flow of work of a commercial A.I. center. For a further improvement of this technique a more feasible preparation of the motile spermatozoa leading to high conception rates is required. However, although a deposition of very low sperm numbers per insemination is possible, care must be taken to exclude permanent subfertile stallions from the breeding programs.

Keywords: broodmare, insemination, videoendoscopy, sperm dosis

Einleitung

Um bei der Stute eine hohe Konzeptionschance zu gewährleisten, wird bei der Insemination mit Frischsperma eine Besamungsdosis von 300 – 500×10^6 vorwärtsbeweglicher Spermien empfohlen (Pickett und Voss 1975; Klug 1993; Sieme et al. 2001). Diese hohe Spermienzahl scheint bei der konventionellen intrauterinen Samendeponierung erforderlich zu sein, um im Zuge des rasch einsetzenden uterinen Selektionsprozesses die Etablierung eines ausreichenden funktionellen Spermienreservoirs im Isthmus des Eileiters für die Befruchtung zu ermöglichen (Scott et al. 1998). Stark frequentierte Hengste können aufgrund des biologisch limitierten Spermienausstoßes den Nachfragen aus der Züchterschaft vielfach nicht gerecht werden. Aus veterinärmedizinischer Sicht kommen zudem transiente funktionelle Beeinträchtigungen der samenbildenden Organe als begrenzendes Faktoren für die Nutzung von Zuchthengsten in Betracht. So führen fieberhafte Allgemeinerkrankungen, die Aufnahme bestimmter Pestizide über die Nahrung und die missbräuchliche Anwendung von Anabolika zu einer vorübergehenden Depopulation des Keimepithels und drastischer Verminderung der Spermienzahl und/

oder des Anteils motiler Spermien im Ejakulat (Amann 1993). Permanente Veränderungen der quantitativen und qualitativen Ejakulatparameter, die sich im Anschluss an eine Orchitis oder Hemikastration manifestieren, stellen weitere, den Einsatz von Hengsten limitierende Faktoren dar. Mit der Entwicklung der hysteroskopischen Inseminationstechnik, bei der eine stark reduzierte Spermiosierung (1 – 10×10^6) in unmittelbarer Nähe der endoskopisch dargestellten Eileiterpapille deponiert wird, bietet sich möglicherweise ein Verfahren an, mit dem die beschriebenen Engpässe kompensiert werden können (Manning et al. 1998; Vazquez et al. 1998).

Die hierüber bislang publizierten Arbeiten berichten über Ergebnisse, die unter experimentellen Bedingungen erzielt wurden. In einer eigenen Studie soll geprüft werden, ob die Technik der hysteroskopisch kontrollierten Insemination in den Routinebetrieb von kommerziell arbeitenden Pferdebesamungsstationen integriert werden kann. Über die ersten Ergebnisse und Erfahrungen von orientierenden Versuchen, die während der Zuchtsaison 2001 an zwei privaten Besamungsstationen durchgeführt wurden, wird nachstehend berichtet.

Material und Methode

Stuten

Die von Ende Februar bis August 2001 durchgeführten Untersuchungen erfolgten an 178 Oldenburger Warmblutstuten im Alter von 2 bis 20 Jahren. Dabei handelte es sich um Klientenstuten von zwei privaten Besamungsstationen, die zur Insemination durch 3 Hengste (Hengst A, Station 1; Hengste B und C, Station 2) vorgesehen waren. Bei den zufallsmäßig ausgewählten Probandinnen handelte es sich um 60 (34%) Maiden-, 71 (40%) güste und 47 (26%) Fohlenstuten.

Die Mehrzahl der Stuten wurde während der für die Besamung genutzten Zyklen permanent auf den Stationen gehalten, die anderen wurden während der Rosseperioden zu den jeweils festgelegten Untersuchungsterminen zur Station gebracht. Für die Versuchsbesamungen wurden ausschließlich klinisch genitalgesunde Stuten mit unbedenklichem mikrobiellen Uterustupferbefund herangezogen. Dabei waren es überwiegend Stuten, die erstmalig zur Besamung angemeldet waren, teils aber auch Stuten, die zuvor bereits – erfolglos – besamt worden waren. Von den laktierenden Stuten ($n = 47$) wurden 32 (68,1%) in der Fohlenrosse, die übrigen 15 (31,9%) in einer Folgerosse für die endoskopische Insemination genutzt.

Auf beiden beteiligten Stationen wurden die Stuten regelmäßig an einem Probierhengst auf Rosseanzeichen geprüft. Zu Beginn der Rosse wurde die Follikelentwicklung mit Hilfe der rektalen Palpation und Sonographie alle 36–72 Stunden vor-

genommen. Ab einer Follikelgröße von $\geq 3,5$ cm erfolgte eine tägliche Kontrolle bis zur Feststellung der Ovulation. Der Inseminationstermin orientierte sich an der Follikelgröße (≥ 4 cm) und -konsistenz. Die endoskopisch kontrollierten Inseminationen wurden täglich wiederholt, sofern die Ovulation zwischenzeitlich nicht erfolgt war.

Die klinische und sonographische Trächtigkeitskontrolle erfolgte erstmalig zwischen Tag 16 und 20 post inseminationem. Stuten, die keine Trächtigkeitsanzeichen aufwiesen, wurden teilweise in weiteren Rossen erneut endoskopisch inseminiert.

Hengste

Wie bereits erwähnt, erfolgten die endoskopischen Besamungen mit dem Sperma von 3 Hengsten (A, B, C; Oldenburger Warmblut, Alter 11, 9 bzw. 4 Jahre). Hengst A hatte in der Vorsaison eine Trächtigkeitsrate von 61,4% (137 Trächtigkeiten bei 223 inseminierten Stuten) erzielt. Im Oktober 2000 war bei ihm wegen einer Torsio testis eine einseitige Orchidectomie erforderlich geworden. Aufgrund des dadurch bedingten verminderten Spermienausstoßes ($0,5\text{--}0,5 \times 10^9$ Spermien/Ejakulat bei intakter Morphologie) war er für die Versuchsbesamungen ausgewählt worden.

Hengst B mit einer Trächtigkeitsrate von 81,8% (320/391) in der Saison 2000 und unauffälligem Spermabefund wurde wegen der starken Nachfrage in das Versuchsprogramm aufgenommen und diente als Kontrolle.

Hengst C kam in der Saison 2001 erstmalig zum Zuchteinsatz und hatte vor Aufnahme in das Versuchsprogramm (Ende April) bei 4 von 70 besamten Stuten (überwiegend Spermaversand) eine Trächtigkeit erzielt. Die Gründe hierfür lagen offensichtlich in einer reduzierten Spermienmotilität (10–15% Vorwärtsbeweglichkeit) ungeklärter Ätiologie.

Samenaufbereitung

Die mittels künstlicher Vagina am Phantom gewonnenen Ejakulate wurden nach Gazefiltration und anschließender makroskopischer und mikroskopischer Bewertung (Volumen, Farbe, Konsistenz, Motilität) sowie photometrischer Dichtebestimmung (SpermaCue, Minitüb GmbH, Tiefenbach b. Landshut) mit einem Magermilch-Glucose-Verdüner im Verhältnis 1:1 verdünnt und danach für 10 Minuten bei 870 g (Hengst A) bzw. 1100 g (Hengst B und C) zentrifugiert.

Nach Teilresuspension und erneuter Konzentrationsbestimmung (Zählkammer) wurden bei den 3 Hengsten die in Tabelle 1 aufgeführten Besamungsdosen präpariert. Bei Hengst B kam bei 19 (31%) von 61 Inseminationen Nativsperma (ohne Zentrifugation) zum Einsatz.

Die Zeitspanne zwischen Samengewinnung und Insemination betrug 15 Minuten bis 9 Stunden. Bei einer Aufbewahrungsdauer von ≥ 2 Stunden wurden die Besamungsportionen bei $+5^\circ\text{C}$ gelagert.

Tab. 1: Trächtigkeitsergebnisse bei Stuten nach endoskopischer Insemination unter Berücksichtigung der Spermiedosis (vorwärtsmotile Spermien).

Pregnancy results for mares after videoendoscopic insemination with

	Inseminationsdosis	Inseminationsvolumen	Stuten	Zyklen	Trächtigkeiten	
	($\times 10^6$)	ml	n	n	n	%*
Hengst A	6	0,2	17	17	1	5,9
	12	0,4	41	41	7	17,1
	80	1,6	39 (+44)**	146	21	25,3
		gesamt	97	204	29	29,9
Hengst B	100	10-20	21	35	13	61,9
	150	10-20	20	27	8	40,0
	200	10-20	20	27	12	60,0
		gesamt	61	89	33	54,1
Hengst C	100	5,0	20	28	9	45,0
Total			178	321	71	39,9

*bezogen auf die Zahl der Stuten

**Stuten, die zuvor mit 6×10^6 bzw. 12×10^6 Spermien inseminiert

Inseminationstechnik

Die hysteroskopisch kontrollierte Samendeponierung im Bereich der uterotubalen Verbindung (UTV) erfolgte unter Verwendung eines Koloskopes (Typ GIF-XQ10, Olympus, Hamburg; Arbeitslänge 1600 mm, äußerer Durchmesser 9,4 mm, Arbeitskanal 2,8 mm) in Verbindung mit einem Kaltlichtgerät (Typ B) als Lichtquelle und einem CO_2 -Insufflator (AR-10-901, beide Geräte Dr. Fritz-GmbH-Tuttlingen). Nach Reinigung und Desinfektion des äußeren Genitale wurde das Koloskop unter manuell kontrollierter Passage von Vagina und Zervix bis in das Corpus uteri eingeführt. Nach CO_2 -Insufflation (50 mm Hg) und Distension des Uterus wurde es unter videoskopischer Kontrolle bis zur Eileiterpapille (ipsilateral zum Ovulationsfollikel) vorgeführt. Die Applikation der Besamungsdosis auf die Eileiterpapille erfolgte über einen Bronchoskopiekatheter aus Teflon (Länge 2200 mm, Durchmesser 2 mm, Dr. Fritz GmbH) oder einen Endoskopie-Spülkatheter (Typ V-GPFC Länge 2200 mm, Durchmesser 2,6 mm, Cook GmbH, Mönchengladbach). Für das endoskopische Auffinden der Eileiterpapille war ein Zeitraum von maximal 5 Minuten erforderlich. Es gelang bei allen Inseminationen mit Ausnahme von 3 Stuten, die sich in der Fohlenrosse befanden.

Ergebnisse

Die bei 178 Stuten unter endoskopischer Kontrolle durchgeführten Inseminationen resultierten in 71 Trächtigkeiten, entsprechend einer Erfolgsquote von 39,9%. Dieses Ergebnis wurde unter Nutzung von 321 Zyklen (Rosseperioden) erzielt. Tabelle 1 zeigt die Resultate der einzelnen Hengste unter Berücksichtigung der Spermienzahl pro Inseminat (vorwärtsmotile Spermien). Hengst A, dessen Sperma ab Ende Februar eingesetzt wurde, erzielte mit einer Spermiedosis von 6×10^6 in 17 Zyklen lediglich eine Trächtigkeit (5,9%). Nach Erhöhung der Dosis auf 12×10^6 und 80×10^6 Spermien konnte die Trächtigkeitsrate auf 17,1% und 25,3% gesteigert werden (Tabelle 1). Von Hengst B (Einsatz ab Mitte März) kamen aus Sicherheitsgründen Spermiedosierungen von 100, 150 sowie 200×10^6 zum Einsatz. Unter Nutzung von 89 Zyklen wurden bei 33 von 61 Stuten Graviditäten (54,1%) erzielt. Ausgehend von diesen Resultaten kamen von Hengst C (Einsatz ab Ende April) Inseminate mit einheitlich 100×10^6 Spermien zur Anwendung. Von 20 inseminierten Stuten wurden 9 (45,0%) tragend.

In Tabelle 2 sind die Trächtigkeitsergebnisse pro genutzten Zyklus zusammengestellt. Bei den Hengsten B und C sind die Resultate zwischen 1., 2. und 3. genutzten Rosse bzw. 1. und 2. Rosse weitgehend ausgeglichen. Bei Hengst A, bei dem im Versuchsverlauf die Spermiedosis erhöht wurde (Tabelle 1), deutet sich ein damit eingehender Anstieg der Trächtigkeitsrate im 2. und 3. genutzten Zyklus an.

Diskussion

Die Etablierung der für die Befruchtung notwendigen Spermienpopulation im Eileiteristhmus erfolgt bei der Stute zwischen zwei und vier Stunden nach intrauteriner (Corpus uteri) Samendeponierung (Bader, 1982; Brinsko et al. 1991; Scott et al. 1998). Während dieser initialen, überwiegend passiven Spermientransportphase des Inseminates werden uterine Abwehrmechanismen induziert, die zu einer starken Spermien-

lektion und zur massiven Eliminierung von Spermien durch Phagozytose und Rückfluss via Zervix führen. Spermienrückgewinnungsversuche in vivo ergaben, dass sich vier Stunden nach einmaliger ovulationsnaher Insemination $70 \pm 20\%$ der noch vorhandenen Spermien in der Vagina befanden (Krause, 1980). Im Zuge der uterinen Transport- und Selektionsvorgänge wird die uterotubale Verbindung (Eileiterpapille) von selektierten, funktionell kompetenten Spermien besiedelt, die zur Migration in den Eileiter fähig sind. An Schlachtstuten konnte gezeigt werden, dass 4 Stunden (vs. 2 und 6 Stunden) nach der Insemination die höchsten Spermienzahlen (bis zu 128.000) im Bereich der UTV vorhanden waren (Bader, 1982). Diese Befunde, ebenso wie spätere Ergebnisse von Scott et al. (1998) sprechen dafür, dass die UTV eine temporäre Reservoirfunktion für selektierte Spermien übernimmt.

Bei einer endoskopischen Insemination wäre demnach dann mit höchsten Konzeptionsraten zu rechnen, wenn die Spermien so vorbehandelt werden, dass der physiologische Selektionsprozess nachgeahmt wird. Einen Beleg hierfür scheinen die exzellenten Ergebnisse von Morris et al. (2000) zu liefern. Nach einmaliger endoskopischer Insemination von $10,5$ bzw. 1×10^6 motilen Spermien wurden Trächtigkeitsraten von 60, 75 und 64% erzielt. Die Autoren selbst sehen den wichtigsten Faktor hierfür in der Vorbehandlung der Spermien (Percoll-Gradienten-Zentrifugation), die einen signifikanten Motilitätsanstieg (auf 70%) bewirkte und zur Entfernung von Semialplasma- und Verdünnerbestandteilen führte.

Die von anderen Arbeitsgruppen (Vazquez et al. 1998; Manning et al. 1998; Squires et al., 2000) erzielten Trächtigkeits-

raten von 33%, 22% sowie 40% sind vergleichbar mit den Resultaten der eigenen Untersuchung (39,9%). Bemerkenswert ist, dass in keiner dieser Arbeiten eine Percoll-Gradienten-Zentrifugation des Spermas wie bei Morris et al. (2000) durchgeführt wurde. Die eigenen Untersuchungen hatten orientierenden Charakter, wobei zu prüfen war, ob die Technik in den Arbeitsablauf kommerziell arbeitender Besamungsstationen zu integrieren ist. Nachdem bei dem zuerst eingesetzten Hengst (A) trotz hoher Motilitätswerte unerwartet niedrige Trächtigkeitsraten (Tabelle 2) eingetreten waren, wurden – den Zwängen der Praxis folgend, möglichst hohe Befruchtungsziffern zu erzielen – bei den beiden später genutzten Hengsten höhere Spermiosierungen ($100\text{--}200 \times 10^6$) verwandt, woraus offenbar ein Anstieg der Graviditätsrate resultierte (54,1% bzw. 45,0%).

Die Technik der endoskopischen Insemination hat sich für den Arbeitsablauf von Besamungsstationen als praktikabel erwiesen. Wenn es gelingt, eine für die Praxis kompatible Spermienaufbereitungsmethode zu entwickeln, die akzeptable Konzeptionsraten sichert, könnte sich die endoskopische Insemination zu einem effektiven Instrument entwickeln. Dieses würde sich anbieten zur Überwindung von Spermaengpässen bei stark gefragten Hengsten, bei Hengsten mit niedrigem Spermaausstoß, möglicherweise für den Einsatz von Gefriersperma sowie bei Stuten, die nach der Insemination zu einer übersteigerten inflammatorischen Uterusreaktion neigen (Squires et al., 2000). Kritisch zu bewerten sind Hinweise von anderer Seite, die endoskopische Besamung zur Nutzung von subfertilen Hengsten zu verwenden. Vertretbar scheint dies nur in

Tab. 2: Trächtigkeitsergebnisse pro genutzten Zyklus nach endoskopischer Insemination (ohne Berücksichtigung der Spermiedosierung)

Pregnancy results per used cycle after videoendoscopic insemination regardless of insemination doses

	Zyklus	Stuten	Trächtigkeiten	
		n	n	%*
Hengst A	1	97	12	12,4
	2	62	12	19,4
	3	28	4	14,3
	4	12	1	8,3
	5	3	0	0,0
	6	2	0	0,0
		204 (Zyklen)	29	29,9
Hengst B	1	61	24	39,3
	2	20	6	30,0
	3	8	3	37,5
		89 (Zyklen)	33	54,1
Hengst C	1	20	6	30,0
	2	8	3	37,5
		28 (Zyklen)	9	45,0

*bezogen auf die Zahl der Stuten

solchen Fällen, wo es sich zweifelsfrei um erworbene, nicht jedoch um genetisch bedingte Fertilitätsmängel handelt.

Es ist geplant, die eigenen Untersuchungen in der Zuchtsaison 2002 fortzusetzen. Eine umfassende Auswertung der bisherigen und zukünftigen Ergebnisse erfolgt in einem Dissertationvorhaben (N. Ismer).

Literaturverzeichnis

- Amann, R. P. (1993): Effects of Drugs or Toxins on Spermatogenesis. In: McKinnon, A.O.; J. L. Voss (Hrsg.): Equine Reproduction, Verlag Lea & Febiger, Philadelphia, London, 831–839
- Bader, H. (1982): An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. J. Reprod. Fert. Suppl. 32, 59–64
- Brinsko, S.P.; D.D. Varner and T.L. Blanchard (1991): The effect of uterine lavage on pregnancy rate in mares when performed four hours post insemination. Theriogenology 35, 1111–1119
- Klug, E. (1993): Frischsamenübertragung beim Pferd 4. Auflage, Verlag M + H Schaper, Hannover, 65
- Krause, A. (1980): Untersuchungen über Verteilung und Verbleib der Spermien im Genitaltrakt der Stute nach Insemination von frischem und tiefgefrorenem Sperma. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- Manning S.T., P.A. Bowman, L.M. Frazer and C.F. Card (1998): Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare. Proceed. Annual Meeting Society for Theriogenology, 84–85 (Abstr.)
- Morris, L. H. A., R. H. F. Hunter and W. R. Allen (2000): Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. J. Reprod. Fert., 118, 95–100
- Pickett, B.W. and J.L. Voss (1975): The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. J. Reprod. Fert. Suppl. 23, 95–98
- Scott, M.A., I.K.M. Liu, J.W. Overstreet, and A.C. Enders (1998): The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy. 7th Intern. Symp. Equine Reproduction, Pretoria, 113–114 (Abstr.)
- Sieme, H., Edda Töpfer-Petersen, H. Bader, R. Petzoldt and H. Merkt (2001): A. I. sperm of the stallion: evaluation criteria and minimal standards - a survey Pferdeheilk. 17, 145–154
- Squires, E.L.; A.C. Lindsay and B.R. Buchanan (2000): A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. Proceed. Amer. Ass. Equine Pract. 46, 335–337.
- Vazquez, J.J., V. Medina, I.K. Liu, B.A. Ball and M.A. Scott (1998): Nonsurgical utero-tubal insemination in the mare. Proceed. Annual Meeting Society for Theriogenology, 82–83 (Abstr.)

Prof. Dr. Burkhard Meinecke

Institut für Reproduktionsmedizin
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 15, 30559 Hannover

E-Mail: Burkhard.Meinecke@tiho-hannover.de