

# Experimentelle Studien zur Uteruskontraktionsaktivität der Stute nach Insemination mit kryokonserviertem Sperma

Melanie Carola Witt<sup>1</sup>, Sabine Meinecke-Tillmann<sup>1</sup>, Jan-Hein Swagemakers<sup>2</sup>, Mark Koene<sup>2</sup> und Burkhard Meinecke<sup>1</sup>

Institut für Reproduktionsbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover<sup>1</sup> und Tierärztliche Klinik für Pferde, Lüsche<sup>2</sup>

## Zusammenfassung

Die uterine Kontraktionsaktivität im Anschluss an eine einmalige, nach hCG-Behandlung 0-6 h post ovulationem ausgeführte, konventionelle intrakorporale Samenübertragung oder eine hysteroskopisch kontrollierte Insemination im Bereich der Eileiterpapille (jeweils 4 ml kryokonserviertes Sperma) wurde über eine Zeitperiode von je 20 min mit Hilfe der transrektalen Sonographie bei 20 Maidenstuten ermittelt. Als Kontrolltiere dienten 10 nicht inseminierte Maidenstuten. Zur Abgrenzung des Spermaverdünnereinflusses auf die Uteruskontraktionsaktivität erfolgte bei zusätzlichen 10 Maidenstuten die konventionelle und bei weiteren 10 Maidenstuten die hysteroskopisch kontrollierte Deponierung von jeweils 4 ml Spermaverdüner. Die inseminierten Stuten wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren und den nur mit Verdüner behandelten Stuten eine signifikant gesteigerte Uteruskontraktionsaktivität auf. Unabhängig von der Inseminationsmethode wurde das Sperma nach der Deponierung innerhalb von 15 min bis in beide Uterushornspitzen verteilt. Die Studie dokumentiert anhand eines weitestgehend einheitlichen Probandengutes und standardisierter Einflussgrößen, dass Tiefgefriersperma fast unmittelbar nach der intrauterinen Deponierung koordinierte Kontraktionsaktivitäten der Gebärmutter auslöst, die den Spermatransport zu der uterotubalen Verbindung fördern. Hinsichtlich der Graviditätsrate konnte zwischen der konventionellen (4/10 gravid) und der hysteroskopisch kontrollierten Insemination (4/10 gravid) kein Unterschied ermittelt werden. Die hier getestete Hypothese, dass ein Tiefgefrierspermavolumen von 4 ml zu besseren Graviditätsergebnissen führt, wenn es ipsilateral zum ovulatorischen Follikel hysteroskopisch kontrolliert an der Eileiterpapille deponiert wird, konnte nicht bestätigt werden.

**Schlüsselwörter:** Stute, Ultrasonographie, Hysteroskopie, Besamung, Uteruskontraktionen, Reproduktion

## Experimental studies on uterine contractile activity in mares following insemination with cryopreserved sperm

Uterine contractions were ultrasonically recorded (t = 20 min) in 50 maiden mares (3-4 years old) within 0-6 h after hCG induced ovulation. The mares were divided into 5 groups (n = 10, respectively). Group 1 was inseminated conventionally into the uterine body, while Group 2 was inseminated onto the oviductal papilla ipsilateral to the ovulatory follicle. Inseminations were carried out once with a dose of 800 x 10<sup>6</sup> frozen/thawed sperm (4 ml total volume) from a single stallion of proven fertility. Ten non-inseminated maiden mares served as controls (Group 3). Mares of two further groups received only semen extender into the uterine body (Group 4) or onto the oviductal papilla (Group 5). Uterine contractile activity of the uterine horn ipsilateral to the ovulating follicle was documented using a score level system (0 = no contractions to IV = very strong contractions). Inseminated mares showed a significantly higher uterine contractile activity than non-inseminated mares (p < 0.05). Within and between the groups of mares inseminated hysteroscopically onto the oviductal papilla or conventionally into the uterine body no differences in uterine contractile activity were observed. After conventional or hysteroscopically controlled insemination of 4 ml cryopreserved semen uterine contractile activity was significantly stronger than in the group of mares receiving only extender. Within 15 min after hysteroscopic insemination onto the oviductal papilla parts of the inseminate were detected in the tip of the contralateral uterine horn in every mare. Single conventional intrauterine or hysteroscopically controlled inseminations onto the oviductal papilla led to identical pregnancy rates (40 %, each 4/10). The results of the present study show that the deposition of a standard dose of cryopreserved sperm, irrespective of the intrauterine localization, induces similar uterine contractile activities. Uterine contractions support intrauterine sperm transport, even resulting in a retrograde distribution of sperm that was deposited onto the oviductal papilla. Hysteroscopic inseminations onto the oviductal papilla with an insemination volume of 4 ml did not result in better pregnancy rates compared to inseminations into the uterine body.

**Keywords:** mare, ultrasonography, hysteroscopy, insemination, uterine contractions, reproduction

## Einleitung

In der equinen Reproduktionsmedizin hat die Entwicklung neuer Methoden der instrumentellen Samenübertragung sowie der Einsatz artifizierender Reproduktionstechniken durch den Druck der intensiven Hengstnutzung in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen (Sampers und Plough 2010). Eine moderne Methode der instrumentellen Samenübertragung ist die hysteroskopisch kontrollierte Insemination (Lyle und Ferrer 2005), bei der die Spermien auf die Eileiterpapille ipsilateral zum ovulatorischen Follikel deponiert werden. Sie ermöglicht eine Reduktion der zur Konzeption erforderlichen Spermiedosis und macht damit auch die

Besamung mit maschinell gesextem Pferdesperma möglich (Lyle und Ferrer 2005).

Bei der konventionellen instrumentellen Insemination wird der Samen im Uteruskörper deponiert. Im weiblichen Genitale wird das Inseminat dann einerseits durch die progressive Motilität der Spermien, andererseits durch die Uterusmotilitätssteigerung nach Interaktion von Uterus und Inseminat verteilt (Katila et al. 2000).

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, die uterine Kontraktionsaktivität mittels transrektaler Ultrasonographie an zwei Stutengruppen zu vergleichen, die entweder mit

einer Standarddosis Tiefgefriersperma konventionell in den Uteruskörper oder hysteroskopisch auf die Eileiterpapille ipsilateral zum ovulatorischen Follikel besamt wurden. Zum einen sollte festgestellt werden, ob es nach der Samenübertragung im Vergleich zu Stuten, die nicht besamt wurden, zu einer koordinierten Muskelaktivität im Uterus kommt und ob sich diese Kontraktionsaktivität in ihrer Stärke nach konventioneller beziehungsweise hysteroskopisch kontrollierter Insemination unterscheidet.

Weiterhin sollte der Einfluss der Uterusmotilität auf die Spermienverteilung im Genitaltrakt ultrasonographisch charakterisiert und ein möglicher Zusammenhang zwischen der Besamungstechnik und der Graviditätsrate aufgezeigt werden.

## Material und Methoden

Die Untersuchungen erfolgten an insgesamt 50 Maidenstuten (3-4 Jahre alt, Deutsches Warmblut) eines Gestüts im Oldenburger Land (Saison 03/04). Die Tiere wurden gemeinsam in Laufställen mit Stroheinstreu beziehungsweise ab Mai auf der Weide gehalten. Die Fütterung bestand aus Kraftfutter und Heu, verteilt auf zwei Futtergaben pro Tag, in den Sommermonaten aus Weidegras. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Es wurden ausschließlich allgemeingesunde Stuten für die Versuche herangezogen.

Die Maidenstuten wurden täglich durch Fachpersonal des Gestüts einem Probierhengst vorgeführt. Bei Auftreten äußerer Rossemerkmale (Parameter nach Klug 1999) wurden die Stuten zur Insemination in der Tierklinik für Pferde in Lüsche aufgestellt. Die gynäkologische Untersuchung gliederte sich in eine äußere Adspektion und die innere Untersuchung durch transrektale Palpation und Sonographie (100 Falco Vet, Pie Medical Dorsten, 5/7,5 MHz Linear-Schallkopf) des Uterus und der Ovarien. Die Dokumentation der gynäkologischen Befunde erfolgte nach dem Schlüssel von Klug (1999).

### Untersuchungsgruppen

Der Versuchsaufbau ist Abb. 1 zu entnehmen. Die nur einmalige Besamung der Stuten mit kryokonserviertem Sperma erfolgte entweder konventionell in das Corpus uteri (Gruppe 1, n=10) oder unter hysteroskopischer Kontrolle auf die Ovidukt papille ipsilateral zum ovulatorischen Follikel (Gruppe 2,

n=10). Als Vergleichsgruppe bezüglich der Kontraktionsmessungen standen insgesamt 30 Stuten zur Verfügung: In Gruppe 3 (n=10) wurde weder eine Insemination noch eine Spermaverdünnerübertragung ausgeführt, bei Tieren der Gruppe 4 (n=10) wurden 4 ml Spermaverdünner entsprechend der konventionellen Insemination in den Uteruskörper deponiert während der Spermaverdünner bei Gruppe 5 (n=10) endoskopisch auf die Eileiterpapille verbracht wurde.

Zur Besamung der Stuten wurde Tiefgefriersperma eines 4-jährigen Hannoveraner Hengstes verwendet, der seit einem Jahr im Deckeinsatz war und eine geprüfte Gesundheit und Fertilität aufwies. Das für die Inseminationsversuche benötigte Sperma wurde von 4 gleichwertigen Ejakulaten gewonnen. Die Samengewinnung erfolgte im Rahmen des routinemäßigen Stationsbetriebes der Deckstation Böckmann mit einer künstlichen Scheide „Modell Hannover“ (Minitüb, Tiefenbach, Landshut) an einem Phantom in Anwesenheit einer rossigen Stute.

### Beurteilung und Behandlung des Ejakulates

Das in einem sterilen Glasbehälter aufgefangene Ejakulat wurde umgehend nach der Gewinnung hinsichtlich Aussehen, Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl sowie Spermienmotilität untersucht. Im Rahmen der sich anschließenden Kryokonservierung (SBS-Northgermany, Lüsche) wurde die Spermienkonzentration nach Vorverdünnung mit Magermilchverdünner, Zentrifugation, Dekantierung des Überstandes und Resuspension mit Tiefgefriererdünnung (www.selectbreeders.com) auf eine Dichte von  $200 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt. Die Motilität der Samenzellen nach dem Auftauen wurde sowohl mikroskopisch geschätzt als auch per Computer (Motion Analyzer) analysiert (Select Breeders Service, Italien: www.selectbreeders.com) und lag bei den vier Ejakulaten zwischen 35 und 40 %.

### Untersuchungsintervalle und Ovulationsinduktion

Bei Auftreten eines präovulatorischen Follikels mit einem Durchmesser von mindestens 35 mm wurden den Stuten 2500 IE hCG (Ovogest®, Intervet, Tönisvorst) intravenös injiziert. Nachfolgend wurden die Tiere im Abstand von 6 h bis zum Nachweis der Ovulation transrektal ultrasonografisch untersucht. Bei einigen Stuten wurde das Untersuchungsintervall bei herannahender Ovulation auf 2-3 h verkürzt.

### Insemination

Das in 0,5 ml fassenden Pailletten tiefgefrorene Sperma wurde 30 s in einem 38°C warmen Wasserbad aufgetaut. Eine Besamungsdosis bestand aus 8 Pailletten (insgesamt  $800 \times 10^6$  Spermien), die in zufälliger Gruppierung aus dem Stickstoffcontainer entnommen wurden. Die Stuten wurden zum Zeitpunkt der Ovulation bis maximal 6 h post ovulationem mittels zweier verschiedener Methoden inseminiert.

Bei den Stuten der Gruppe 1 (n=10) wurde das Inseminat nach der Methode von Kenney et al. (1975) in den Uteruskörper verbracht. Hierbei wurde eine flexible Seminette (Pferdebesamungspipette Universal“, 65 cm, Minitüb, Landshut) nach Säuberung des äußeren Genitales und Einbandagieren des Schweißs mit einer behandschuhten Hand transvaginal eingeführt und unter digitaler Kontrolle durch den leicht

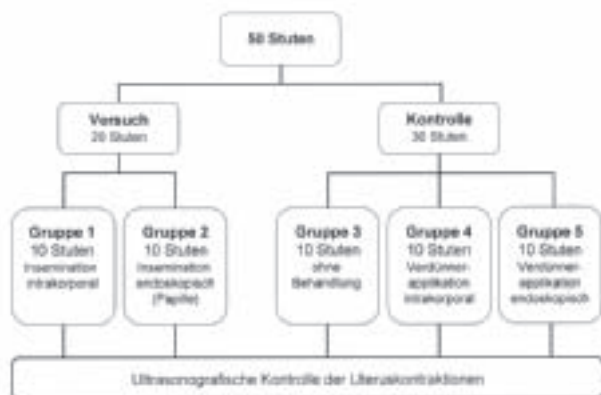


Abb. 1 Schema des Versuchsaufbaus  
Experimental schedule

geöffneten Gebärmutterhalskanal hindurch in den Uteruskörper vorgeschoben. Die einzelnen Pailletten wurden mittels eines zur Pipette passenden Metallmandrins (Minitüb, Landshut) in die Pipette eingeführt und das 4 ml umfassende Inseminat in den Uteruskörper appliziert.

Stuten der Gruppe 2 (n=10) wurden nach einer von Manning et al. (1998) beschriebenen Methode inseminiert. Nach Reinigung des äußeren Genitales mit Zellstoff und Einbandagieren des Schweifs mit einer Mullbinde wurde ein 160 cm langes, flexibles Koloskop (GIF-XQ 10, Olympus, Hamburg, äußerer Durchmesser 9,4 mm, Arbeitskanaldurchmesser 2,8 mm) zusammen mit einem sterilen Gasschlauch aus Silikonkautschuk (Semandini, Düsseldorf, Innendurchmesser 8 mm) unter manuellem Schutz transvaginal bis zum Muttermund geleitet und unter digitaler Kontrolle in den Uterus eingeführt. Als Lichtquelle diente ein tragbares Kaltlichtgerät (Kaltgerät Typ B, Dr. Fritz, Tuttlingen). Die sich anschließende Distension des Uterus erfolgte über einen an eine mobile Gasflasche angeschlossenen CO<sub>2</sub>-Insufflator (AR-10-901, Dr. Fritz, Tuttlingen) durch Insufflation von medizinischem CO<sub>2</sub> mit einem Druck von 40 mmHg. Dieser Druck, der nach Untersuchungen von Schiemann (2001) als optimal für die Stute anzusehen ist, wurde während des gesamten Besamungsvorganges aufrechterhalten. Unter Sichtkontrolle wurde die Spitze des Koloskops dann im Uteruslumen bis zur uterotubalen Verbindung ipsilateral zum ovulatorischen Follikel vorgeschoben. Durch einen auf 37°C vorgewärmten, in den Arbeitskanal des Endoskops eingelegten Teflon-Katheter (Länge 220 cm, Durchmesser 2 mm, Dr. Fritz, Tuttlingen), erfolgte die exakte Deponierung des bereits in den Katheter aufgezogenen Inseminats (4 ml) auf die Eileiterpapille. Im Anschluss daran wurde die Katheterspitze in den Arbeitskanal zurückgezogen und das Koloskop aus dem Genitaltrakt entfernt. Das insufflierte Gas entwich spontan über den offenen Zervikalkanal.

#### *Ultrasonographische Messung der Uteruskontraktionen*

Unmittelbar im Anschluss an die Samenübertragung wurde die ultrasonographische Messung der Uteruskontraktionen durchgeführt, um die Reaktion der Gebärmutter auf die Besamung aufzuzeichnen sowie die Verteilung des Inseminats zu beobachten. Hierzu wurde der bei den Pferden transrektal eingeführte Ultraschallkopf (100 Falco, Linearschallkopf, 7,5 MHz, Pie Medical) quer über dem Uterushorn ipsilateral zum ovulierten Follikel positioniert und die ultrasonographische Messung über eine Dauer von 20 Minuten durchgeführt. Dieser Zeitraum von 20 Minuten wurde in 4 Intervalle (jeweils 5 Min) unterteilt und das Ausmaß der Kontraktionen in den verschiedenen Zeitintervallen nach einem subjektiven Score von 0-4 eingestuft (0=keine; 1=geringgradig; 2=deutlich; 3=stark; 4=sehr stark) eingestuft, wobei zwischenliegenden Ausprägungen ein Wert von 0,5 zugeteilt wurde. Jeweils zwischen zwei Messintervallen wurde die Messposition verlassen und die gesamte Gebärmutter mit dem Ultraschallkopf abgefahren, um die Verteilung des Inseminates Uteruslumen zu begutachten.

Als Vergleichsgruppe bezüglich der Uteruskontraktionsmessungen standen 30 Stuten zur Verfügung, die ebenfalls vor maximal 6h ovuliert hatten. Nach Ovulationsfeststellung wurde die Kontraktionsaktivität bei 10 Stuten (Gruppe 3) ohne vorausgehende Einführung eines Inseminationsinstrumentes

in den Uterus durchgeführt, um die Uteruskontraktionen ausschließlich unter Einfluss der transrektalen Manipulation mit der Ultraschallsonde darzustellen. Bei weiteren 10 Stuten (Gruppe 4) wurde die kontraktile Reaktion der Gebärmutter nach Instillation von 4 ml Spermaverdünner in das Corpus uteri und bei 10 Stuten (Gruppe 5) nach endoskopischer Instillation von 4 ml Spermaverdünner auf die Oviduktpapille ultrasonographisch beurteilt.

Die 20-minütigen Messungen wurden durch eine an das Ultraschallgerät angeschlossene Videokamera (VR-X, Sony) aufgezeichnet und später auf einem Computer digitalisiert.

#### *Statistik*

Die biometrische Analyse der Daten erfolgte mit dem SAS®-Programm im Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Uteruskontraktionsaktivität der Gruppen 1-5 sowie die Zeitspannen zwischen hCG-Applikation und Ovulation wurden mithilfe des Wilcoxon-Two-Sample-Tests geprüft. Für den Vergleich der Kontraktionsaktivität in den einzelnen Zeitintervallen innerhalb der Gruppen 1 und 2 diente zusätzlich der Student's t-Test. Der Fisher's Exact Test wurde für die Analyse der Graviditätsresultate und des Einflusses der Besamungsmethode eingesetzt. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  angenommen.

## **Ergebnisse**

### *Uteruskontraktionsaktivität*

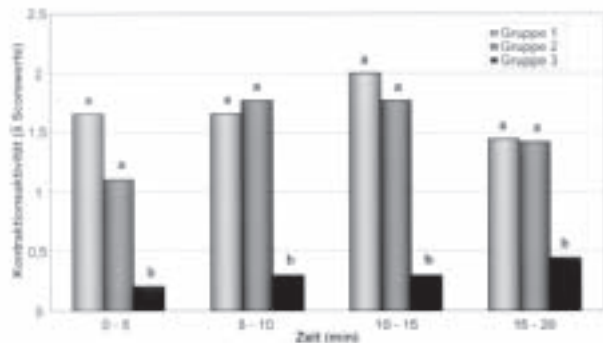
Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2-5 zusammengefasst (Erläuterung: In Gruppe 1 ließ eine Stute die Ultrasonographie nicht zu und in Gruppe 2 fielen im Zeitintervall 2 und 3 je eine und im Zeitintervall 3 drei Stuten aus).

Abbildung 2 zeigt die mittleren Scorewerte der Gebärmutterkontraktionen nach der konventionellen intrakorporalen sowie der hysteroskopisch kontrollierten Insemination auf die Eileiterpapille und die dazugehörigen Kontrollen vergleichend dargestellt. Unabhängig vom Inseminationsmodus stieg die Kontraktionsaktivität des Uterus in allen Untersuchungszeiträumen im Vergleich zu den nicht inseminierten Kontrollen signifikant an. Demgegenüber unterschied sich die nach konventioneller, intrakorporaler oder hysteroskopisch kontrollierter Samenübertragung protokollierte Uteruskontraktionsaktivität in den Versuchsgruppen 1 und 2 nur geringfügig.

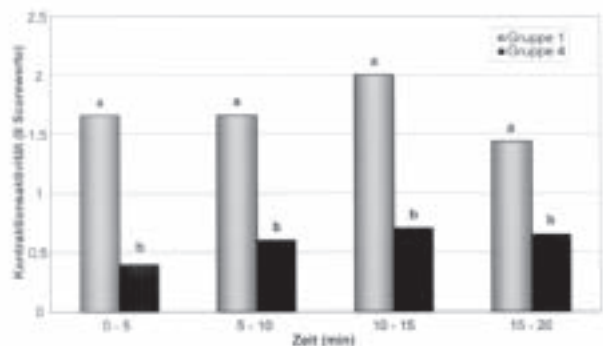
Um differenzieren zu können, ob die gesteigerte Uterusmotilität nach der Besamung auf das eingebrachte Tiefgefriersperma zurückzuführen ist oder ob andere Inseminatkomponenten oder die Manipulation während der Besamung als Auslöser wirken, wurden jeweils 4 ml Spermaverdünner konventionell intrakorporal beziehungsweise hysteroskopisch kontrolliert intrauterin deponiert. Es zeigte sich, dass die konventionelle Insemination mit Tiefgefriersperma eine signifikant höhere Uteruskontraktionsaktivität nach sich zieht als die intrakorporale Übertragung eines Spermaverdünners mit identischem Volumen (Abb. 3). Ein entsprechendes Ergebnis erbrachte die hysteroskopische Insemination mit Tiefgefriersperma im Vergleich zur Deponierung von Spermaverdünner

auf die Eileiterpapille (Abb. 4). Diese Beobachtungen belegen, dass Spermien eine kontraktionsfördernde Wirkung auf die Gebärmuttermuskulatur haben.

Das Ausmaß dieser durch Spermien induzierten Gebärmutterkontraktionen konnte durch den Vergleich der Kontraktionsaktivität nach der Deponierung von Spermaverdünner in den Uterus (Gruppe 4 und 5) mit der nicht inseminierten Kontrolle (Gruppe 3) weiter charakterisiert werden. Nach konventionel-



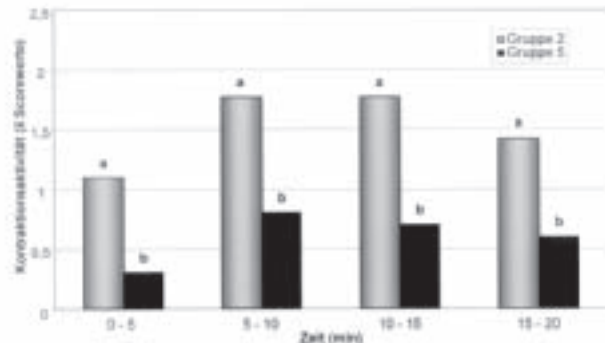
**Abb. 2** Kontraktionsaktivität des Uterus (mittlerer Scorewert) nach konventioneller intrakorporaler Samenübertragung (Gruppe 1, n=9) sowie nach endoskopisch kontrollierter Insemination auf die Eileiterpapille (Gruppe 2, n=9) im Vergleich zu nicht inseminierten Kontrollstuten (Gruppe 3, n=10). Säulen mit unterschiedlichen Exponenten (a, b) unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).  
*Uterine contractile activity (mean score values) following conventional intracorporal (Group 1, n=9) or endoscopically controlled insemination onto the oviductal papilla (Group 2, n=9), compared with non-inseminated control mares (Group 3, n=10). Columns with different superscripts (a, b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).*



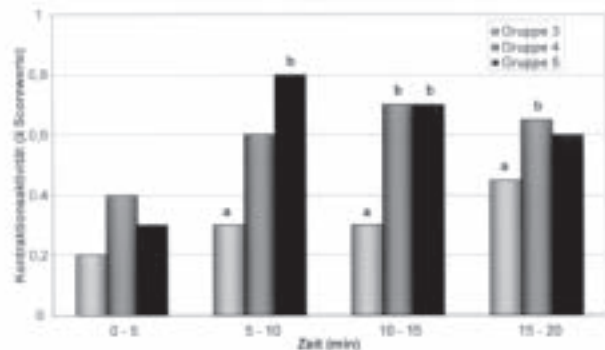
**Abb. 3** Kontraktionsaktivität des Uterus (mittlerer Scorewert) nach konventioneller intrakorporaler Tiefgefriersperma- (Gruppe 1, n=9 Stuten) beziehungsweise Spermaverdünnerübertragung (Gruppe 4, n=10 Stuten). Säulen mit unterschiedlichen Exponenten (a, b) unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).  
*Uterine contraction activity (mean score values) following conventional intracorporal insemination with cryopreserved sperm (Group 1, n=9 mares) or after transfer of semen extender (Group 4, n=10 mares). Columns with different superscripts (a, b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).*

ler, intrakorporaler Übertragung von Spermaverdünner steigerte sich die Uteruskontraktionsaktivität im Vergleich zu den nicht inseminierten Kontrollen lediglich im 3. (10-15 min) und 4. (15-20 min) Untersuchungsintervall signifikant (Abb. 5). Auch die hysteroskopisch kontrollierte Übertragung von Spermaverdünner auf die Eileiterpapille führte, verglichen mit den

nicht inseminierten Kontrollen, lediglich im 2. (5-10 min) und 3. (10-15 min) Untersuchungsintervall zu signifikant gesteigerten Uteruskontraktionen (Abb. 5). Es wurde außerdem erkennbar, dass die konventionelle intrakorporale und die hysteroskopische Übertragung von Spermaverdünner eine sehr ähnliche Kontraktionsaktivität der Gebärmutter nach sich zieht. Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, dass von der Manipulation und von dem Spermaverdünner nur geringgradige kontraktionsfördernde Reize ausgehen.



**Abb. 4** Kontraktionsaktivität des Uterus (mittlerer Scorewert) nach endoskopisch kontrollierter Tiefgefriersperma- (Gruppe 2, n=9 Stuten) beziehungsweise Spermaverdünnerübertragung auf die Eileiterpapille (Gruppe 5, n=10 Stuten). Säulen mit unterschiedlichen Exponenten (a, b) unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).  
*Uterine contraction activity (mean score values) following endoscopically controlled insemination onto the oviductal papilla with cryopreserved sperm (Group 2, n=9 mares) or with sperm extender only (Group 5, n=10 mares). Columns with different superscripts (a, b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).*



**Abb. 5** Kontraktionsaktivität des Uterus (mittlerer Scorewert) nach konventioneller intrakorporaler Samenübertragung (Gruppe 4, n=10) sowie nach endoskopisch kontrollierter Samenverdünerübertragung (Gruppe 5, n=10) im Vergleich zu nicht inseminierten Kontrollstuten (Gruppe 3, n=10). Säulen mit unterschiedlichen Exponenten (a, b) unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).  
*Uterine contraction activity (mean score) following conventional intracorporal (Group 4, n=10) as well as endoscopic controlled deposition of sperm extender onto the oviductal papilla (Group 5, n=10) compared with non-inseminated control mares (Group 3, n=10). Columns with different superscripts (a, b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).*

*Verteilung des Inseminates*

Nach der endoskopisch kontrollierten Insemination (Gruppe 2) wurde die intrauterine Verteilung des Inseminates (4 ml) im

Ultraschallbild dokumentiert (Zeitperiode: 0-20 min post inseminationem). Bereits 5 min nach der Insemination konnten bei 2 Stuten Anteile des übertragenen Spermias im kontralateralen Uterushorn nachgewiesen werden. Nach 10 min war Tiefgefriersperma bei der Hälfte ( $n = 5$ ) und nach 15 min bei allen Stuten in der kontralateralen Hornspitze detektierbar. Diese Beobachtung spricht für einen schnellen intrauterinen Verteilungsmechanismus.

Bei der konventionellen intrakorporalen Insemination konnte bei der Hälfte der Stuten ( $n = 5$ ) bereits zu Beginn der 1. Messperiode nach der Insemination Sperma an der Basis beider Uterushörner dokumentiert werden. Bei den übrigen Stuten ließ sich Sperma am Ende des 1. Messintervalls in den Uterushörnern detektieren.

#### *Ovulation und Gravidität*

Stuten der Gruppe 1 und 2 ovulierten im Mittel  $34,3 \pm 10,9$  h, die übrigen (Gruppen 3-5)  $31,7 \pm 12,0$  h nach der hCG Applikation. Von den inseminierten Stuten (Gruppe 1 und 2) ovulierten 95,0 % innerhalb von 48 h und 55,0 % innerhalb von 36 h nach der intravenösen Hormonapplikation. In beiden Gruppen wurden nach der einmaligen Insemination je 4 von 10 Stuten trächtig und fohten ab.

#### **Diskussion**

In der vorliegenden Studie wurden erstmals kontinuierlich über zwanzig Minuten B-Mode-Querschnittsbilder des Uterushornes ipsilateral zum ovulationsnahen Follikel aufgezeichnet, um die Kontraktionsaktivität des Uterus nach konventioneller Besamung oder hysteroskopisch kontrollierter Insemination auf die Eileiterpapille zu vergleichen. Der B-Modus bietet den Vorteil, Bewegungen der dem Uterus ventral anliegenden Darmanteile beobachten und diese so von den Eigenkontraktionen des Uterus differenzieren zu können. Als Messlokalisierung wurde für die eigenen Untersuchungen das Uterushorn gewählt, weil in diesem insgesamt mehr Kontraktionen als im Uteruskörper zu erwarten waren (Campbell und England 2002).

Die Einteilung der Stärke der uterinen Kontraktionsaktivität fand mit Hilfe eines Score-Systems von 0 bis 4 statt. Diese subjektive Beurteilung ließ sich an wiederholt begutachteten Videoaufnahmen reproduzieren und stellt somit ein verifizierbares Bewertungssystem dar.

Es konnte in den Gruppen, die intrakorporal oder hysteroskopisch besamt wurden, in allen Zeitintervallen eine signifikant höhere Kontraktionsaktivität der Gebärmutter, als in der nicht inseminierten Stutengruppe, dokumentiert werden. Dieses Resultat bestätigt Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten, bei denen mittels Elektromyographie nach konventioneller Besamung eine Frequenzsteigerung von EMG-Spikes verzeichnet wurden (Taverne et al. 1979, Jones et al. 1991, Troedsson et al. 1998) beziehungsweise sich mit Hilfe dynamischer Szintigramme eine Zunahme der Stärke und Frequenz von Uteruskontraktionen nach Besamung mit radioaktiv markiertem Sperma aufzeigen ließ (Katila et al. 2000).

Die transrektale Ultrasonographie stellt eine nicht invasive Technik dar, die zu keiner relevanten Stimulation der uterinen

Kontraktionsaktivität beziehungsweise Hormonausschüttung führt. So konnten während einer zehnmütigen transrektalen Messung der uterinen Kontraktionsaktivität bei rossigen Stuten keine Veränderungen der Stärke der Uteruskontraktionen und der parallel zur Messung minütlich bestimmten Blut-Oxytocin- und Prostaglandin-F-Metaboliten-Werte durch die Manipulation festgestellt werden (Nikolakopoulos und Watson 2002).

In früheren Studien zur Darstellung von Uteruskontraktionen im Zyklus mittels transrektaler Ultrasonographie wurden mit einminütigen Messungen deutlich geringere Zeitintervalle gewählt (Cross und Ginther 1987, 1988, Griffin und Ginther 1990, 1993, Gastal et al. 1998). Die Sonographien wurden einmal täglich (Griffin und Ginther 1990) beziehungsweise alle 10 min über 1-2 h wiederholt (Cross und Ginther 1987) und die Kontraktionen mit Hilfe eines subjektiven Score-Systems eingestuft. Diese vorausgegangenen Studien bedienten sich zur transrektalen ultrasonographischen Darstellung der Uteruskontraktionen einer Messung über dem Uteruskörper, wobei im B-Mode-Ultraschallbild ein Längsschnitt abgebildet wurde (Cross und Ginther 1987, 1988, Griffin und Ginther 1990, 1993, Gastal et al. 1998). Campbell und England (2002) ermittelten zunächst im B-Mode eine Querschnittsbild und verwendeten zur anschließenden Messung den M-Mode des Ultraschallgerätes, um mit einer am Monitor angelegten mm-Einheit Abweichungen in der Horizontallachse quantitativ zu messen, die sie als Maßeinheit für die Stärke der Uteruskontraktionen definierten. Ultrasonographische M-Mode-Studien verdeutlichen den beschriebenen kontraktilen Effekt der Besamung auf die Gebärmutter (Campbell und England 2003). Nach Bedeckung oder Insemination mit 80 ml Frischsamen kam es sowohl im Uteruskörper als auch in den Uterushörnern zu einem deutlichen Anstieg von Anzahl, Amplitude und Dauer der Uteruskontraktionen. Nach Insemination mit 10 ml Frischsamen konnten Campbell und England (2003) per Ultraschall jedoch keinen Effekt auf die Uteruskontraktionen feststellen, wohingegen in anderen Versuchen ein Anstieg der uterinen Kontraktionsaktivität nach Besamung mit 5 ml verdünntem radioaktivmarkiertem Sperma zu verzeichnen war (Katila et al. 2000). In der vorliegenden Studie konnte jedoch mit einem Volumen von nur 4 ml Tiefgefriersperma eine deutliche uterine Kontraktionsaktivität nachgewiesen werden.

Die beiden untersuchten Besamungstechniken unterschieden sich in der Stärke ihrer nachfolgend aufgezeichneten Uteruskontraktionen in keinem Zeitintervall signifikant voneinander. Eine Insemination von Spermien direkt auf die Eileiterpapille löste im Mittel gleich starke myometriale Kontraktionen aus, wie die Samenübertragung in den Uteruskörper. Zusätzlich konnte eine Verteilung der in die Uterushornspitze verbrachten Spermien in der Gebärmutter beobachtet werden. Nach 5 bis 15 min waren Teile des Inseminates auch im Lumen der kontralateralen Uterushornspitze zu sehen, was für eine kontraktionsbedingte Abschwemmung spricht. Um zu differenzieren, ob die myometrialen Reaktionen auf die Manipulation bei der Besamung oder das eingebrachte Inseminat hin ausgelöst wurden, wurden bei zwei Vergleichsgruppen je 4 ml Verdünner entweder intrakorporal oder hysteroskopisch intrauterin eingebracht.

Die in den beiden Verdünnerversuchsgruppen signifikant geringere uterine Kontraktionsaktivität gegenüber den beiden

besamten Gruppen verdeutlicht, dass der Verdünner selbst keine mit einer Insemination vergleichbar starke Uteruskontraktion auslöst. Verdünneranteile, die auch als Ursache für verstärkte postinseminatorische Flüssigkeitsansammlungen diskutiert werden, scheinen, in geringen Volumina eingesetzt, keinen Reiz auszulösen, der zu einer gesteigerten uterinen Kontraktionsaktivität führt. Im Vergleich der Verdünnergruppen mit der nicht besamten Gruppe zeigten sich in jeweils zwei Zeitintervallen signifikante Unterschiede der uterinen Kontraktionsaktivität, so dass hier als Ursache der Verdünner oder die Manipulation bei der intrauterinen Deponierung in Frage kommen. Welcher der beiden Faktoren von größerer Bedeutung ist, konnte nicht geklärt werden.

In der vorliegenden Studie konnte hinsichtlich der Trächtigkeitsrate zwischen der konventionellen und endoskopisch kontrollierten Insemination kein Unterschied ermittelt werden. Die Trächtigkeitsrate entspricht den Resultaten, die andere Autoren nach einmaliger Insemination einer standardisierten Tiefgefrierspermadosis erzielten (Newcombe 1999, Squires et al. 2002, Sieme et al. 2003). Die hier getestete Hypothese, dass ein Tiefgefrierspermavolumen von 4 ml zu besseren Trächtigkeitsraten führt, wenn es hysteroskopisch kontrolliert an die Eileiterpapille ipsilateral zum ovulationsnahen Follikel deponiert wird, konnte nicht bestätigt werden.

Die endoskopische Besamungstechnik stellt demnach bei diesem relativ großen Inseminatsvolumen hinsichtlich der Trächtigkeitsergebnisse im Vergleich zur konventionellen, intrakorporalen Besamung keinen Vorteil dar. Eine Indikation zur hysteroskopischen Insemination wird von einigen Autoren jedoch bei einer Reduzierung der Spermiendosis gesehen. Sie verweisen darauf, dass bei einer Spermiendosis von 5 oder  $3 \times 10^6$  nach hysteroskopischer Insemination knapp die Hälfte (jeweils 47,0 %, 16/34) der Stuten tragend wurden, während die konventionelle Samenübertragung nur bei 25 % (2/8) beziehungsweise 14 % (2/14) der Stuten zu einer Graviddität führte (Morris et al. 2000, 2003). Eine derart weit gehende Reduzierung der Spermadosis ( $5 \times 10^6$ ) wird beispielsweise auch beim Einsatz maschinell gesexten Spermas empfohlen, das dann hysteroskopisch kontrolliert versamt wird (Lindsey et al. 2002). Eine weitere medizinische Indikation wird in der Verwendung von Hengsten mit reduzierten Ejakulatparametern gesehen (Manning et al. 1998, Vasquez et al. 1998). Ein solches Vorgehen muss jedoch aus zucht-hygienischen Gründen sehr kritisch hinterfragt werden.

## Danksagung

T. Böckmann und W. Hammermann sei an dieser Stelle für die Bereitstellung der Maidenstuten und die unermüdliche Hilfestellung herzlich gedankt.

## Literatur

- Campbell M. L. und England G. C. (2002) M-mode ultrasound imaging of the contractions of the equine uterus. *Vet. Rec.* 150, 575-577  
 Campbell M. L. und England G. C. (2003) The effect of coitus and of artificial insemination on uterine contractions in mares: a review. *Ippologia* 14, 3-8  
 Cross D. T. und Ginther J. (1987) The effect of estrogen, progesterone and prostaglandin F2 alpha on uterine contractions in seasonally anovulatory mares. *Dom. Anim. Endocrinol.* 4, 271-278

- Cross D. T. und Ginther J. (1988) Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and jennies as determined by ultrasonography. *J. Anim. Sci.* 66, 250-254  
 Gastal M. O., Gastal E. L., Torres C. A. A. und Ginther O. J. (1998) Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology* 50, 989-999  
 Griffin P. G. und Ginther O. J. (1990) Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology* 34, 47-55  
 Griffin P. G. und Ginther O. J. (1993) Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. *Theriogenology* 39, 997-1008  
 Jones D. M., Fielden E. D. und Carr D. H. (1991) Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 357-368  
 Katila T., Sankari T. und Makela O. (2000) Transport of spermatozoa in the genital tracts of the mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 571-578  
 Kenney R. M. R., Bergmann R. V. und Cooper W. L. (1975) Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. In: *Proc. 21nd Ann. Meet. Am. Ass. Eq. Pract.; Lexington, Kentucky, Hrsg. AAEP, 327-336*  
 Klug E. (1999) Klinisch-gynäkologischer Untersuchungsgang. In: *Handbuch Pferdepraxis, Dietz O., Huskamp B., 2. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, 578-580*  
 Lindsey A. C., Morris L. H., Allen W. R., Schenk J. L., Squires E. L. und Bruemmer J. E. (2002) Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow cytometrically sorted spermatozoa. *Equine Vet. J.* 34, 128-132  
 Lyle S. K. und Ferrer M. S. (2005) Low-dose insemination – why, when and how. *Theriogenology* 64, 572-579  
 Manning S. T., Bowmann L. M., Frazer C. F. und Card C. E. (1998) Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare. In: *Proc. Ann. Meet. Soc. Theriogenology, Baltimore, Maryland. Society of the Theriogenology, Verlag Hastings, Nebraska, 84-85*  
 Morris L. H., Hunter R. H. und Allen W. R. (2000) Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J. Reprod. Fertil.* 118, 95-100  
 Morris L. H., Tiplady C. und Allen W. R. (2003) Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Vet. J.* 35, 197-201  
 Newcombe J. R. (1999) Practical evaluation of the fertilizing capacity of frozen-thawed horse semen. *Vet. Rec.* 145, 46-47  
 Nikolakopoulos E. und Watson E. D. (2002) Can uterine contractile activity be evaluated by transrectal ultrasonography? *Theriogenology* 58, 483-486  
 Samper J. C. und Plough T. (2010) Techniques for insemination of low doses of stallion sperm. *Reprod. Dom. Anim.* 45 Suppl. 2, 35-39.  
 Schiemann V. (2001) Untersuchungen zur Uterusdistension und intrauterinen Druckentwicklung bei der Hysteroskopie des Pferdes. *Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation*  
 Sieme H., Schaefer T., Stout T. A., Klug E. und Waberski D. (2003) The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology* 60, 1153-1164  
 Squires E. L., Reger H.P., Maclellan L. J. und Bruemmer J. E. (2002) Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology* 58, 655-658  
 Taverne M. A., Van der Weyden G. C., Fontijne P., Dieleman S. J., Paschen R. L. und Allen W. R. (1979) In-vivo myometrial electrical activity in the cyclic mare. *J. Reprod. Fertil.* 56, 521-532  
 Troedsson M. H., Liu I. K. und Crabo B. G. (1998) Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology* 50, 807-818  
 Vasquez J. J., Medina V., Liu I. K., Ball B. A. und Scott M. A. (1998) Non-surgical utero-tubal insemination in the mare. In: *Proc. Ann. Meet. Soc. Theriogenology, Baltimore, Maryland. Society of the Theriogenology. Verlag Hastings, Nebraska, 82-83*

Prof. Dr. Sabine Meinecke-Tillmann  
 Institut für Reproduktionsbiologie  
 Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
 Bünteweg 2  
 30559 Hannover  
 sabine.meinecke-tillmann@tiho-hannover.de