

Der Einfluss der Gabe von humanem Choriongonadotropin auf die Konzentration des Anti-Müller-Hormons bei zyklischen Stuten

Heinz Gehrke¹, Johannes Handler² und Stefanie Neuhauser²

¹ Tierarztpraxis Agethorst

² Abteilung für Reproduktionsmedizin, Pferdezentrum Bad Saarow der Freien Universität Berlin

Zusammenfassung: Das Anti-Müller-Hormon (AMH) spielt sowohl bei der sexuellen Differenzierung während der Embryonalentwicklung als auch bei der Follikulogenese eine wichtige Rolle. Neben dem Einfluss auf die initiale Rekrutierung der Primordialfollikel und den Prozess der Follikelselektion wird AMH eine prognostische Aussagekraft bei der Antwort auf eine Superovulation und der möglichen Embryogewinnungsrate zugeschrieben. Beim Pferd ist die Auswirkung einer Ovulationsinduktion auf die AMH-Konzentration im Serum nicht näher untersucht, weshalb im Rahmen dieser Studie der Einfluss der Gabe von humanem Choriongonadotropin (hCG) in der Rosse evaluiert wurde. Die AMH-Konzentration unterschied sich nicht zwischen Stuten, die mit hCG behandelt wurden und unbehandelten Stuten ($p > 0,05$). Zwischen den einzelnen Messungen an unterschiedlichen Zyklastagen gab es keinen Unterschied in der AMH-Konzentration ($p > 0,05$). Die Gabe von hCG hatte keinen Einfluss auf die Trächtigkeitsrate ($p > 0,05$), konnte aber das Intervall bis zur Ovulation deutlich verkürzen ($p < 0,05$). Es bestand kein Zusammenhang zwischen der AMH-Konzentration in der Rosse und zum Zeitpunkt der Ovulation und dem Nachweis einer Trächtigkeit ($p > 0,05$). Allerdings konnte in der Mitte des Diöstrus (Tag 7 bis 9 nach der Ovulation) eine tendenziell höhere Konzentration von AMH bei nicht tragenden Stuten gemessen werden.

Schlüsselwörter: Müllerian inhibiting substance (MIS), Ovulationsinduktion, hCG, Pferd, Trächtigkeit

Influence of human choriongonadotropin on the concentration of Anti-Muellerian-hormone in cyclic mares

The Anti-Muellerian-Hormone (AMH) is a dimeric glykoprotein of the transforming growth factor superfamily and plays an important role in sexual differentiation during embryo development but also during follicle development. AMH can be used as a biomarker in artificial reproduction technologies, predicting success of superovulation. There is also a relation between AMH and fertility, and AMH correlates well with primordial follicular pool leading to a diagnostic value for the ovarian reserve. The present study investigated the effect of the ovulation inducing agent human choriongonadotropin (hCG) on the concentration of AMH in serum of cyclic mares. Serum concentrations of AMH were evaluated during oestrus immediately before (T-2) and 24 hours following administration of hCG (T-1), at ovulation (T0) and day 7 to 9 post ovulation (T+1). The concentration of AMH (ng/ml, median; minimum-maximum) did not differ between mares treated with hCG (T-2: 0.33; 0.16–2.00; T-1: 0.40; 0.17–2.06; T0: 0.42; 0.20–2.07; T+1: 0.38; 0.21–1.82) and controls (T-2: 0.48; 0.13–1.47; T-1: 0.59; 0.17–1.48; T0: 0.62; 0.14–1.70; T+1: 0.47; 0.17–1.17; $p > 0.05$). Among single measurements on different days of oestrous cycle, there was no difference in serum AMH ($p > 0,05$). Administration of hCG to induce ovulation had no influence on the pregnancy rate (control group: 80%; treated group 70%; $p > 0.05$) and significantly enhanced time of ovulation (control group: 4, 2 to 6; treated group: 2, 2 to 2 days; median, minimum to maximum; $p < 0.05$). Serum AMH concentration during oestrus and on the day of ovulation did not differ dependent from pregnancy success (pregnant: 0.37; 0.13–1.47; 0.45; 0.17–2.06; 0.61; 0.14–1.70; non-pregnant: 0.67; 0.33–2.00; 0.71; 0.32–2.00; 0.58; 0.34–2.07ng/ml at T-2, T-1 and T0, respectively; $p > 0.05$). However, in mid dioestrus AMH concentration had the tendency to be higher in non-pregnant mares (pregnant: 0.42; 0.17–1.17; non-pregnant: 0.63; 0.32–1.82ng/ml; at T+1; $p = 0.08$). Further studies are needed to evaluate AMH concentration on defined days during oestrous cycle and early pregnancy to evaluate the prognostic value of AMH concentration for mare fertility.

Keywords: Müllerian inhibiting substance (MIS), induced ovulation, hCG, horse, pregnancy

Zitation: Gehrke H., Handler J., Neuhauser S. (2018) Der Einfluss der Gabe von humanem Choriongonadotropin auf die Konzentration des Anti-Müller-Hormons bei zyklischen Stuten. *Pferdeheilkunde* 34, 247-252; DOI 10.21836/PEM20180305

Korrespondenz: Prof. Dr. Johannes Handler, Freie Universität Berlin, Pferdezentrum Bad Saarow, Abteilung für Reproduktionsmedizin, Siberberg 1, 15526 Bad Saarow; johannes.handler@fu-berlin.de

Einleitung

Der französische Physiologe Alfred Jost beschäftigte sich mit dem Thema der sexuellen Differenzierung und berichtete 1953 erstmals von einer Substanz, welche die Rückbildung der Müller'schen Gänge induziert, das Anti-Müller-Hormon (AMH; *Josso und Picard* 1986, *Claes und Ball* 2016). Dieses ist ein dimeres Glykoprotein bestehend aus zwei Monomeren, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (*Josso und di Clemente* 2003). Es gehört zur Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren β (TGF- β ; *Josso und di Clemente* 2003)

und ist neben der sexuellen Differenzierung während der Embryonalentwicklung (*Josso und Picard* 1986, *Klattig und Englert* 2007) auch für die Follikulogenese relevant (*Durlinger et al.* 2002).

Die Follikelentwicklung kann in vier Stadien eingeteilt werden: (1) die initiale, FSH-unabhängige Rekrutierung, bei der Primordialfollikel zu Primärfollikeln heranreifen; (2) die zyklische, FSH-abhängige Rekrutierung bei der eine Gruppe von Antralfollikeln heranwächst; (3) die Selektion des dominanten Follikels, während (4) die anderen Follikel atresieren (*McGee und*

Hsueh 2000, Ginther 2000, Pepling 2013). Der dominante Follikel entwickelt sich zu dem präovulatorischen Follikel, der kurz vor dem Eisprung beim Pferd einen Durchmesser von 3,5 bis 5,5 cm erreichen kann (Gastal et al. 2006).

Die Primordialfollikel entstehen bereits während der Embryonalentwicklung und die Bildung des Pools an Primordialfollikeln ist zum Zeitpunkt der Geburt abgeschlossen (Ginther 1992, Schnorr und Kressin 2011). In den Ovarien von Stuten im Alter von 2–4 Jahren konnten 6400 bis 75200 Primordialfollikel gezählt werden (Driancourt et al. 1982). Der Pool der vorhandenen Primordialfollikel am Eierstock bestimmt die ovarielle Funktionsreserve und kann als Hinweis für die Fertilität von alternden Stuten dienen (Claes et al. 2015, Claes und Ball 2016). Die AMH-Konzentration korreliert mit der Anzahl antraler Follikel mit einem Durchmesser von 0,6 bis 2 cm. Bei Stuten über 19 Jahren nimmt sowohl die Anzahl antraler Follikel, als auch die AMH-Konzentration ab (Claes et al. 2015).

Das AMH spielt eine wichtige inhibitorische Rolle in zwei Stadien der Follikulogenese. Erstens hemmt AMH die initiale Rekrutierung der Primordialfollikel und beeinflusst dabei entscheidend wie viele Follikel im Primordialpool bleiben. Zweitens inhibiert AMH die Follikelsensitivität gegenüber dem Follikel-stimulierenden Hormon (FSH) und reduziert die Aromataseaktivität, wodurch es den Prozess der Follikelselektion beeinflusst (Durlinger et al. 1999, 2002, Visser et al. 2006, Pellatt et al. 2011). Während die AMH-Expression beim Pferd in den Primordialfollikeln nicht nachweisbar war, stieg diese in den kleinen antralen Follikeln an und nahm in den größeren Follikeln wieder ab. Eine exakte Bestimmung ab welchem Entwicklungsstadium des Follikels die AMH-Expression sistiert war allerdings nicht möglich (Ball et al. 2008). In bereits atresierten Follikeln sowie im Gelbkörper konnte keine AMH-Expression festgestellt werden (Ball et al. 2008).

In der Pferdemedizin erfährt das AMH eine zunehmende Bedeutung als labordiagnostischer Parameter für den Nachweis von Granulosa- (Ball et al. 2008, 2013, Almeida et al. 2011, Gharagozlou et al. 2013) und Sertolizelltumoren (Ball et al. 2008) sowie von Hodengewebe bei Kryptorchiden (Ball et al. 2008, Claes et al. 2013, 2014).

Bei Schafen korreliert die Fruchtbarkeit mit der präpubertären AMH-Konzentration im Plasma (Lahoz et al. 2012). Außerdem hat AMH bei Wiederkäuern und beim Menschen bei der Antwort auf eine Superovulation und der möglichen Embryogewinnungsrate eine prognostische Aussagekraft (van Rooij

et al. 2002, Rico et al. 2009, Monniaux et al. 2011, Lahoz et al. 2014, Souza et al. 2015).

Die AMH-Konzentration spiegelt die ovarielle Reserve (Anzahl der Primordialfollikel) bei Mäusen wieder (Kevenaar et al. 2006). Sowohl die Anzahl antraler Follikel, als auch die AMH Konzentration im Serum erlauben eine Vorhersage bezüglich der Anzahl morphologisch gesunder Follikel und Oozyten beim Rind (Ireland et al. 2008). Bei Stuten korrelierte die AMH-Konzentration im Serum mit der Anzahl der wöchentlich abgebildeten und aspirierten Follikel (Vernunft et al. 2011).

Im Rahmen der Besamung von Stuten wird zur Ovulationsinduktion häufig humanes Choriogonadotropin (hCG) eingesetzt, wodurch der Zeitraum des Eisprungs erfolgreich eingegrenzt werden kann (Ginther und Pierson 1989, Bollwein und Braun 1999).

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von hCG auf die AMH-Konzentration um den Zeitpunkt der Ovulation analysiert. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen Trächtigkeitsrate und der AMH-Konzentration sowie der Applikation von hCG bei Stuten im Rahmen der Besamung untersucht.

Material und Methode

Tiere

Die Untersuchungen wurden in der Zuchtsaison 2017 von Ende März bis Anfang Juli im Raum Steinburg, Schleswig-Holstein durchgeführt. Im Rahmen der routinemäßigen Besamung wurden 20 Holsteiner Stuten untersucht. Bei den Zuchtstuten handelte es sich um unipare und pluripare Stuten (4 Stuten waren 2016 güt, 7 mit Fohlen bei Fuß, 4 wurden 2016 nicht belegt, 3 haben 2016 resorbiert, 2 Maidenstuten) im Alter von 3-18 Jahren. Nur klinisch geschlechtsgesunde Stuten mit einem negativen mikrobiologischen Uterustupfer durften an der Studie teilnehmen. Die Stuten wurden in zwei gleich große Gruppen aufgeteilt wobei es keine Unterschiede bezüglich des Reproduktionsstatus und der Altersverteilung der Stuten gab.

Studiendesign

Alle Stuten wurden während der Rosse jeden zweiten Tag mittels transrektalem Ultraschall (Digital Ultrasonic Diagnostic Imaging System, Model Magic 5000; Eickemeyer, Tuttlin-

Tab. 1 Einteilung des Grades des mittels transrektalen Ultraschalls feststellbaren endometrialen Ödems bei der Stute (nach Samper 2009). | *Scoring of the endometrial oedema in mares determined by transrectal ultrasound examination (according to Samper 2009).*

Grad	Beschreibung
0	homogene Echogenität des Endometriums
1	deutliche Heterogenität des Endometriums
2	deutliches endometriales Ödem, aber nicht über den gesamten Uterus ausgedehnt
3	deutliches endometriales Ödem über den gesamten Uterus ausgedehnt
4	durch das Ödem sind prominente Falten des Endometriums mit einer erhöhten Wanddicke darstellbar, hyperechogene Grenzgebiete zwischen den Falten
5	endometriale Falten mit verdickten Wänden, hyperechogenen Grenzflächen und hypoechogenen Zentren; freie Flüssigkeit im Corpus uteri

gen, Deutschland) untersucht. Hierbei wurde der Grad des Uterusödems beurteilt (Score 0–5; Tab. 1; nach Samper 2009) und der Durchmesser des dominanten Follikels durch zwei Messungen von aufeinander normal stehenden Distanzen D1+D2 gemessen. Dadurch konnte die Fläche des dominanten Follikels in der Auswertung als Ellipse berechnet werden. Sobald bei der Bestimmung der Follikelgröße beide Distanzen mindestens 3,5cm betragen und ein Ödem des Endometriums von Grad 2 bis 3 vorhanden war, erfolgte die transrektale Ultraschalluntersuchung täglich. Wenn bei der Follikelgröße beide Distanzen 4,0cm erreicht hatten und das Ödem des Endometriums bei Grad bei 3 bis 4 lag, wurde der Kontrollgruppe (n = 10) 5 ml 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung (NaCl 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland) intravenös (i.v.) injiziert. Den Stuten aus der Behandlungsgruppe (n = 10) wurden zu diesem Zeitpunkt 1500 I.E. hCG (5 ml Ovogest 300 I.E./ml, Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) i.v. verabreicht. Im Anschluss bis 30h nach der Injektion wurden alle 6h transrektale Ultraschalluntersuchungen durchgeführt und danach alle 2h bis zur Feststellung der Ovulation durch das plötzliche Verschwinden des dominanten Follikels (Tag 0). Am Tag 17 nach der Ovulation erfolgte die Trächtigkeitsuntersuchung mittels transrektaler Ultraschalluntersuchung da bei keiner Stute eine Doppelovulation festgestellt wurde.

Die AMH-Konzentration wurde im Serum mit Hilfe eines Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (Elecsys® AMH Plus, Roche, Mannheim, Deutschland) durch das Labor Biocontrol (Ingelheim, Deutschland) bestimmt. Dafür wurden Blutproben durch Punktion der V. jugularis während der Rosse unmittelbar vor der Applikation von 0,9% Natriumchlorid-Lösung bzw. hCG (T-2), 24h nach der Injektion (T-1), zum Zeitpunkt der festgestellten Ovulation (T0) und zwischen dem 7. und 9. Tag post ovulationem (T+1) gewonnen. Das Blut wurde innerhalb von 2h zentrifugiert (2500×g, 10min, 20°C) und das Serum bis zur Abholung durch das Labor bei -20° C gelagert .

Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe von JMP Statistiksoftware (SAS Institute Inc., Cary, NC) ausgewertet. Die Normalverteilung wurde mit Hilfe des Shapiro Wilk Tests überprüft. Da die Werte nicht normalverteilt waren wurden nicht-parametrische statistische Verfahren für verbundene Stichproben (Wilcoxon) zur Auswertung der Unterschiede zwischen den Gruppen verwendet. Die Ergebnisse aller erhobenen Daten werden als Median; Minimum-Maximum angegeben.

Ergebnisse

Die hCG-Gabe hatte keinen Einfluss auf die AMH-Konzentration im Serum der Stuten (p > 0,05; Tab. 2). Außerdem veränderte sich die AMH-Konzentration nicht zwischen den untersuchten Zyklustagen (p > 0,05; Tab. 2). Die AMH-Konzentration im Serum korrelierte signifikant mit dem Alter der Stuten (r = 0,04; p < 0.05).

Das Intervall zwischen der Injektion und Ovulation war in der Kontrollgruppe signifikant länger (4; 2-6 Tage) als in der Behandlungsgruppe (2; 2-2 Tage; p < 0,05). Die Follikelgröße war bei der Injektion (Kontrollgruppe: 25,8; 18,9–28,4; Behandlungsgruppe: 24,8; 21,3–26,4cm²; p > 0,05) und bei der Besamung (Kontrollgruppe: 39,28; 27,57–42,41; Behandlungsgruppe: 33,2; 27,7–39,2cm²) in beiden Gruppen gleich (p > 0,05).

Die Trächtigkeitsrate lag insgesamt bei 75% und unterschied sich zwischen den Gruppen nicht (Kontrollgruppe: 80%;

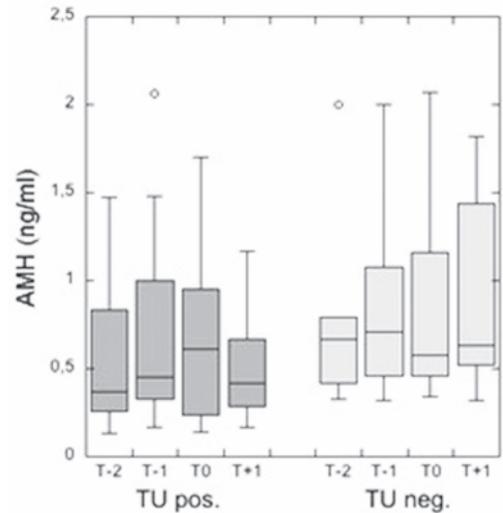


Abb. 1 Konzentration des Anti-Müller-Hormons (AMH, ng/ml) während des Zyklus der Stute im Zusammenhang mit dem Trächtigkeitsergebnis am Tag 17 nach der Ovulation (T-2: unmittelbar vor der Applikation in Rosse; T-1: 24h nach der Applikation; T0: Zeitpunkt der Ovulation = Tag 0; T+1: Tag 7 bis 9 nach der Ovulation). Concentration of Anti-Muellerian-Hormone (AMH, ng/ml) during different stages of the oestrous cycle in relation to the result of the pregnancy examination on Day 17 post ovulation (T-2: immediately before the injection in oestrus, T-1: 24h after the injection; T0: timepoint of detected ovulation = Day 0; T+1: Day 7 to Day 9 post ovulation).

Tab. 2 Konzentration des Anti-Müller-Hormons (ng/ml) in der Kontrollgruppe (Verabreichung von 0,9% NaCl-Lösung) und in der Behandlungsgruppe (Ovulationsinduktion mit humanem Choriongonadotropin) während unterschiedlicher Zyklusstadien (T-2: unmittelbar vor der Applikation in Rosse; T-1: 24h nach der Applikation; T0: Zeitpunkt der Ovulation = Tag 0; T+1: Tag 7 bis 9 nach der Ovulation). | Concentration of Anti-Muellerian-Hormone (ng/ml) in the control group (administration of 0.9% NaCl-solution) and in the treatment group (induction of ovulation using human choriongonadotropin) during different stages of the oestrous cycle (T-2: immediately before the injection in oestrus, T-1: 24h after the injection; T0: timepoint of detected ovulation = Day 0; T+1: Day 7 to Day 9 post ovulation).

Gruppe	T-2	T-1	T0	T+1	p-Wert (Zeitpunkte)
Kontrolle	0,48 (0,13-1,47)	0,59 (0,17-1,48)	0,62 (0,14-1,70)	0,47 (0,17-1,17)	p>0,05
Behandlung	0,33 (0,16-2,00)	0,40 (0,17-2,06)	0,42 (0,20-2,07)	0,38 (0,21-1,82)	p>0,05
p-Wert (Gruppe)	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

Behandlungsgruppe 70%; $p > 0,05$). Weder das Ödem des Endometriums noch die Follikelgröße bei der Injektion oder bei der Besamung beeinflussten die Trächtigkeitsrate ($p > 0,05$). Das Alter der Stuten hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Trächtigkeitsrate ($p > 0,05$).

Da sich die Trächtigkeitsraten von Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe nicht unterschieden, wurde die AMH-Konzentration im Zusammenhang mit dem Trächtigkeitsergebnis für beide Gruppen gemeinsam ausgewertet. Zu den Zeitpunkten T-2, T-1 und T0 gab es keinen Unterschied in der AMH-Konzentration zwischen Stuten, die tragend wurden und Stuten, die nicht tragend wurden ($p > 0,05$; Abb. 1). Allerdings war zum Zeitpunkt T+1 die AMH-Konzentration tendenziell höher bei Stuten, die nicht tragend wurden ($p = 0,08$; Abb. 1).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit hatte die Gabe von hCG keinen Einfluss auf die AMH-Konzentration im Serum von Stuten. Allerdings konnte bei Stuten, die nicht tragend wurden eine tendenzielle höhere AMH-Konzentration am Tag 7 bis 9 nach der Ovulation festgestellt werden.

Die Expression von AMH beginnt in den Granulosazellen der Primärfollikel und steigert sich in den Präantral- und den kleinen Antralfollikeln und ist in Follikeln $> 3,0$ cm deutlich reduziert (Ball et al. 2008). Die Ovulationsinduktion mit Hilfe von hCG erfolgt sobald sich ein dominanter, vom luteinisierenden Hormon abhängiger Follikel entwickelt hat. Wird hCG während der Rosse ab einer Follikelgröße von 3,0 cm verabreicht, führt dies bei über 80% der Stuten innerhalb von 24–48 h zur Ovulation (Ginther und Pierson 1989, Bollwein und Braun 1999). In der vorliegenden Studie wurde hCG bei einer Follikelgröße von 4,0 cm appliziert. Deshalb hatte die Gabe von hCG in der vorliegenden Studie wahrscheinlich keinen Einfluss auf die AMH-Konzentration im Serum.

Das AMH scheint am Ovar eine parakrine Rolle zu haben und kaum mit dem systemischen endokrinen Feedbackmechanismus der Zyklusregulierung zu interferieren (Durlinger et al. 1999, La Marca et al. 2005, Visser et al. 2006). Die Gabe von GnRH-Agonisten im Rahmen von IVF-Protokollen hatte beim Menschen keinen Einfluss auf die AMH-Konzentration im Serum (van Rooij et al. 2002). In der Humanmedizin ist die endogene FSH-Ausschüttung während der Schwangerschaft supprimiert, die AMH-Konzentration verändert sich während der Gravidität jedoch nicht (La Marca et al. 2005). Beim Pferd wäre es interessant ob es einen Zusammenhang zwischen dem equinen Choriongonadotropin und AMH gibt, besonders bei Stuten, die nach der erwarteten Ausbildung der endometrialen Schleimhautkrater (endometrial cups) wiederholt resorbieren. Allerdings wären dann häufigere Probenentnahmen in der Frühträchtigkeit erforderlich.

Die AMH-Konzentration unterschied sich nicht zwischen den ausgewählten Zyklustagen. Allerdings wurden Proben nur spät in der Rosse, im frühen Diöstrus und in der Mitte des Diöstrus gemessen. Die Konzentration zu einem späteren Zeitpunkt im Diöstrus bzw. am Beginn der Rosse wurden nicht bestimmt. Jedoch konnten auch bei dreimal wöchentlichen Messungen der AMH-Konzentration über einen Zeitraum von

einer Zykluslänge keine zyklusabhängigen Schwankungen festgestellt werden (Almeida et al. 2011).

Stuten im Alter zwischen 19 und 27 Jahren hatten im Diöstrus deutlich niedrigere AMH-Konzentrationen im Serum als Stuten im Alter von 9 bis 18 Jahren. Allerdings, lagen Stuten unter 8 Jahren mit Ihren Werten zwischen den beiden ersten Altersgruppen (Claes et al. 2015). Bei Stuten ab 9 Jahren, gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der AMH-Konzentration im Serum und der Anzahl antraler Follikel (Claes et al. 2015). Im fortgeschrittenen Alter treten bei Stuten zunehmend Fruchtbarkeitsstörungen und verlängerte Zyklen auf bis es schließlich zu einem Ausbleiben der Ovulation kommt (Vanderwall und Woods 1990, Carnevale et al. 1993, 1994, Ginther et al. 1993). Die AMH-Konzentration könnte in diesem Zusammenhang, ähnlich wie beim Menschen, einen Hinweis auf die bevorstehende altersbedingte Einstellung des Zyklus sein (Sowers et al. 2008). Interessanterweise stieg in der vorliegenden Studie die AMH-Konzentration im Serum mit zunehmendem Alter an während der Trächtigkeitserfolg vom Alter der Stuten unbeeinflusst war. Die Zuchtstuten in der vorliegenden Untersuchung waren jedoch nicht älter als 18 Jahre.

In der vorliegenden Arbeit gab es große individuelle Schwankungen in der AMH-Konzentration (0,13–2,07 ng/ml). Diese Unterschiede wurden bei gesunden zyklische Stuten bereits dokumentiert (0,22–2,94 ng/ml {Almeida et al. 2011}, 0,01–0,50 ng/ml {Ball et al. 2013}, $0,35 \pm 0,02$ ng/ml {Gharagozlou et al. 2013}, $1,10 \pm 0,24$ ng/ml {Gharagozlou et al. 2014}). Die Werte für AMH änderten sich während des Sexualzyklus nicht; dies stimmt mit früheren Berichten überein (Almeida et al. 2011). Gharagozlo et al. (2014) konnten bei normal zyklischen Stuten höhere AMH-Konzentration als bei Stuten mit anovulatorischen hämorrhagischen Follikeln ($0,30 \pm 0,05$ ng/ml) oder im Anöstrus ($0,40 \pm 0,09$ ng/ml) messen. Diese Werte liegen im Literaturvergleich aber innerhalb der Referenzbereiche für zyklische Stuten wodurch die Bestimmung eines Grenzwertes für anovulatorische Follikel nur schwer möglich ist (Almeida et al. 2011, Ball et al. 2013, Gharagozlou et al. 2013).

Stuten mit einem Granulosazelltumor haben deutlich höhere AMH-Konzentrationen im Serum (14–10596 ng/ml, Almeida et al. 2011, Ball et al. 2013, Gharagozlou et al. 2013) wobei innerhalb von zwei Wochen nach Entfernung des Granulosazelltumors die AMH-Konzentration auf 2 ng/ml absank (Gharagozlou et al. 2013). Ovariectomierte Stuten hatten die niedrigste AMH-Konzentration im Serum (0,05–0,07 ng/ml); bei tragenden Stuten lagen die Werte bei 0,26–2,61 ng/ml (Almeida et al. 2011).

Das Intervall bis zum Zeitpunkt der Ovulation konnte in der vorliegenden Studie durch die intravenöse Gabe von 1500 I.E. hCG signifikant verkürzt werden. Außerdem gab es keinen Unterschied in der Trächtigkeitsrate zwischen den beiden Gruppen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Applikation von hCG zur Ovulationsinduktion im Besamungsmanagement von Stuten eine sinnvolle Anwendung findet (Houssholder et al. 1981, Bollwein und Braun 1999).

In der vorliegenden Studie lag der Erstbesamungserfolg bei 75%. Diese Trächtigkeitsrate kann bei geschlechtsgesunden

Stuten, die mit Frischsamen besamt wurden, erwartet werden und ist im Literaturvergleich ein gutes Ergebnis (Householder et al. 1981, Jasko et al. 1992, Gahne et al. 1998, Pickett und Voss 1999, Sieme et al. 2005). Eine einmalige Belegung führte in einer früheren Untersuchung zu deutlich niedrigeren Trächtigkeitsraten pro Rosse (30,7%) und durch vier oder mehr Belegungen im Abstand von 24 Stunden konnten die besten Trächtigkeitsergebnisse (47,3%) pro Rosse erzielt werden (Hamann et al. 2005). Allerdings wurde in jener Arbeit der Ovulationszeitpunkt nicht bestimmt; somit konnten weder sehr lange Intervalle zwischen Besamung und Ovulation noch postovulatorische Besamungen ausgeschlossen werden. Die Autoren geben in der Diskussion an, dass die kontinuierliche Zykluskontrolle mit Rosseüberwachung und Follikelkontrolle ein wesentlicher Bestandteil für eine erfolgreiche Belegung ist (Hamann et al. 2005).

Die Trächtigkeitsrate war von der Follikelgröße und der Radspeichenstruktur unabhängig. Allerdings wurden nur klinisch geschlechts gesunde Stuten mit einer deutlichen Radspeichenstruktur und einer Follikelgröße von mindestens 4,0 cm in die Studie aufgenommen. Um einen Einfluss Reproduktionsstatus auf die AMH-Konzentration oder den Trächtigkeitserfolg zu analysieren, müsste eine größere Anzahl an Stuten für die jeweilige Kategorie untersucht werden.

Die AMH-Konzentration in der Rosse um den Ovulationszeitpunkt hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das Trächtigkeitsergebnis. Zwischen dem 7. und 9. Tag post ovulationem war allerdings eine Tendenz zu erkennen, dass bei dem Ausbleiben einer Trächtigkeit höhere AMH-Konzentrationen messbar waren (tragend: 0,42; 0,17–1,17; nicht tragend: 0,63; 0,32–1,82). Bei tragenden Stuten lagen die monatlich bestimmten Werte während der gesamten Gravidität bei 0,26–2,61 ng/ml (Almeida et al. 2011). Die individuelle Variabilität der AMH-Konzentration erschwert die Erstellung eines Schwellenwertes für die Vorhersagekraft der Fertilität. Außerdem hat AMH mit 1,9 Tagen eine relativ lange Halbwertszeit im Serum (Almeida et al. 2011) was bei häufigen Blutprobenentnahmen berücksichtigt werden muss. Nur fünf Stuten hatten in dieser Studie ein negatives Trächtigkeitsergebnis und eine größere Stutenanzahl müsste untersucht werden um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Fertilität und der AMH-Konzentration zu beschreiben. In der Humanmedizin gibt es kontroverse Ergebnisse bezüglich der Aussagekraft von AMH über die erfolgreiche Etablierung und das Fortbestehen einer Schwangerschaft (van Rooij et al. 2002, Hazout et al. 2004, Peñarrubia et al. 2005). Almeida et al. (2011) konnten beim Pferd keine Unterschiede im Verlauf der Trächtigkeit feststellen; jedoch wurde die AMH-Konzentration nur einmal pro Monat bestimmt. Dennoch könnte der Zusammenhang zwischen negativem Trächtigkeitsergebnis und der höheren AMH-Konzentration am Tag 7 bis 9 post ovulationem interessant für weitere Studien sein. Besonders für den Embryotransfer wäre ein Biomarker interessant, um zu entscheiden ob eine Embryogewinnung aussichtsreich sein wird bzw. ob sich ein Embryo nicht herauspülen ließ und die Spülung wiederholt werden sollte.

Fazit

Die Gabe von hCG zur Ovulationsinduktion hat keinen Einfluss auf die AMH-Konzentration und die Trächtigkeitsrate bei

Stuten. Es konnte allerdings eine tendenziell höhere AMH-Konzentration bei Stuten, die nicht tragend wurden, gemessen werden. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl von Stuten sind nötig um die AMH-Konzentration als Biomarker zu verwenden und beispielsweise für den Embryotransfer am Tag der Embryospülung einzusetzen.

Interessenskonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenskonflikt besteht.

Erklärung zum Tierschutz

Das Tierversuchsvorhaben wurde vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung Schleswig-Holstein genehmigt (V 241-37854/2017).

Literatur

- Almeida J., Ball B. A., Conley A. J., Place N. J., Liu I. K. M., Scholtz E. L., Mathewson L., Stanley S. D., Moeller B. C. (2011) Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. *Theriogenology* 76, 1393-1403
- Ball B. A., Almeida J., Conley A. J. (2013) Determination of serum anti-Müllerian hormone concentrations for the diagnosis of granulosa-cell tumours in mares. *Equine Vet. J.* 45, 199-203
- Ball B. A., Conley A. J., Grundy S. A., Sabeur K., Liu I. K. M. (2008) Expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in the equine testis. *Theriogenology* 69, 624-631
- Ball B. A., Conley A. J., MacLaughlin D. T., Grundy S. A., Sabeur K., Liu I. K. M. (2008) Expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in equine granulosa-cell tumors and in normal equine ovaries. *Theriogenology* 70, 968-977
- Bollwein H., Braun J. (1999) Follikeldynamik nach Anwendung von hCG für die Ovulationsinduktion bei der Stute. *Tierärztl. Prax.* 27 (G), 47-51
- Carnevale E. M., Bergfelt D. R., Ginther O. J. (1993) Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 31, 287-299
- Carnevale E. M., Bergfelt D. R., Ginther O. J. (1994) Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 35, 231-246
- Claes A. N. J., Ball B. A. (2016) Biological functions and clinical applications of anti-Müllerian hormone in stallions and mares. *Vet. Clin. Equine* 32, 451-464
- Claes A., Ball B. A., Almeida J., Corbin C. J., Conley A. J. (2013) Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology* 79, 1229-1235
- Claes A., Ball B. A., Corbin C. J., Conley A. J. (2014) Anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for equine cryptorchidism in three cases with equivocal testosterone concentrations. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 442-445
- Claes A., Ball B. A., Scoggin K. E., Esteller-Vico A., Kalmar J. J., Conley A. J., Squires E. L., Troedsson M. H. T. (2015) The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. *Equine Vet. J.* 47, 537-541
- Driancourt M.-A., Paris A., Roux C., Mariana J.-C., Palmer E. (1982) Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 22, 1035-1047
- Durlinger A. L., Kramer P., Karels B., De Jong F. H., Uilenbroek J. T. J., Grootegoed J. A., Themmen A. P. N. (1999) Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789-5796

- Durlinger A. L. L., Visser J. A., Themmen A. P. N. (2002) Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 124, 601-609
- Gahne S., Ganheim A., Malmgren L. (1998) Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 49, 1071-1074
- Gharagozlou F., Youssefi R., Akbarinejad V., Ashrafihelan J. (2013) Elevated serum anti-Müllerian hormone in an arabian mare with granulosa cell tumor. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 645-648
- Gharagozlou F., Akbarinejad V., Youssefi R., Masoudifard M., Hasani N. (2014) Reduced anti-Müllerian hormone (AMH) in mares with hemorrhagic anovulatory follicles. *IJVR* 15, 336-340
- Ginther O. J. (1992) Embryology and Placentation. In: Ginther O.J. (Ed.): *Reproductive biology of the mare*. 2. Aufl. Wisconsin, Equi-services, S. 345-418
- Ginther O. J. (2000) Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 61-79
- Ginther O. J., Carnevale E. M., Bergfelt D. R. (1993) Delay in emergence of the ovulatory follicular wave in old mares. *J. Equine Vet. Sci.* 13, 75-79
- Hamann H., Mertens U., Sieme H., Klug E., Distl O. (2005) Einfluss des Besamungsmanagements auf Fruchtbarkeitsmerkmale in der Population des Hannoverschen Warmbluts. *Züchtungskunde* 77, 194-205
- Hazout A., Bouchard P., Seifer D. B., Aussage P., Junca A. M., Cohen-Bacrie P. (2004) Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin, or estradiol. *Fertil Steril* 82, 1323-1329
- Householder D. D., Pickett B. W., Voss J. L., Olar T. T. (1981) Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility. *J. Equine Vet. Sci.* 1, 9-13
- Ireland J. L. H., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Themmen A. P. N., Ward F., Lonergan P., Smith G. W., Perez G. I., Evans A. C. O., Ireland J. J. (2008) Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 79, 1219-1225
- Jasko D. J., Moran D. M., Farlin M. E., Squires E. L., Amann R. P., Pickett B. W. (1992) Pregnancy rates utilizing fresh, cooled, and frozen-thawed stallion semen. *Proc. 38th AAEP*, 649-660
- Josso N., di Clemente N. (2003) Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-family. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 91-97
- Josso N., Picard J.-Y. (1986) Anti-Müllerian hormone. *Physiol. Rev.* 66, 1038-1090
- Kevenaar M. E., Meerasahib M. F., Kramer P., van de Lang-Born B. M. N., de Jong F. H., Groome N. P., Themmen A. P. N., Visser J. A. (2006) Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 147, 3228-3234
- Klattig J., Englert C. (2007) The Müllerian duct: recent insights into its development and regression. *Sex. Dev.* 1, 271-278
- Lahoz B., Alabart J. L., Cocero M. J., Monniaux D., Echegoyen E., Sánchez P., Folch J. (2014) Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: an endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology* 81, 347-357
- Lahoz B., Alabart J. L., Monniaux D., Mermillod P., Folch J. (2012) Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Vet. Res.* 8, 118
- La Marca A., Giulini S., Orvieto R., De Leo V., Volpe A. (2005) Anti-Müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum. Reprod.* 20, 1569-1572
- McGee E. A., Hsueh A. J. W. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Rev.* 21, 200-214
- Monniaux D., Baril G., Laine A.-L., Jarrier P., Poulin N., Cognié J., Fabre S. (2011) Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* 142, 845-854
- Pellatt L., Rice S., Dilaver N., Heshri A., Galea R., Brincat M., Brown K., Simpson E. R., Mason H. D. (2011) Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* 96, 1246-1251
- Peñarrubia J., Fábregues F., Manau D., Creus M., Casals G., Casamitjana R., Carmona F., Vanrell J. A., Balasch J. (2005) Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum. Reprod.* 20, 915-922
- Pepling M. (2013) Oocyte development before and during folliculogenesis. In: Krisher R.L. (Ed.) *Oocyte physiology and development in domestic animals*. Oxford, Wiley-Blackwell, pp 1-19
- Pickett B. W., Voss J. L. (1999). *Physiology and philosophy of breeding horses*. *J. Equine Vet. Sci.* 19, 363-373
- Rico C., Fabre S., Médigue C., di Clemente N., Clément F., Bontoux M., Touzé J.-L., Dupont M., Briant E., Rémy B., Beckers J.-F., Monniaux D. (2009) Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50-59
- Samper J. C. (2009) Uterine edema in the mare. In: Samper J.C. (Ed.) *Equine breeding management and artificial insemination*. 2. Aufl. St. Louis, Saunders, 133-138
- Schnorr B., Kressin M. (2011) *Embryologie der Haustiere*. 6. Aufl. Stuttgart, Enke Verlag
- Souza A. H., Carvalho P. D., Rozner A. E., Vieira L. M., Hackbart K. S., Bender R. W., Dresch A. R., Verstegen J. P., Shaver R. D., Wiltbank M. C. (2015) Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 169-178
- Sowers M. R., Eyvazzadeh A. D., McConnell D., Yosef M., Jannausch M. L., Zhang D., Harlow S., Randolph J. F. Jr. (2008) Anti-Müllerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3478-3483
- Vanderwall D. K., Woods G. L. (1990) Age related subfertility in the mare. *Proc. 36th AAEP*, 85-89
- van Rooij I. A. J., Broekmans F. J., te Velde E. R., Fauser B. C. J. M., Bancsi L. F. J. M. M., de Jong F. H., Themmen A. P. N. (2002) Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 17, 3065-3071
- Vernunft A., Schneider F., Tuchscherer A., Becker F., Kanitz W. (2011) Anti-Müller-Hormon (AMH) kann zur Vorhersage des Follikelmehrwachstums bei Stuten dienen. *Pferdeheilkunde* 27, 293-296