

Aus der Bayern-Genetik GmbH¹, Altenbach, Deutschland und der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung², Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Einfluss von Puffermedien auf Spermaqualität und Fruchtbarkeit bei high-volume-Besamung beim Rind

M. Fuchs^{1,2}, M. Reichenbach¹, Y. Zablotski², H. Zerbe², C. Otzdorff² und J. Scherzer^{1,*}

Eingelangt am 21. Dezember 2022

Angenommen am 2. Juni 2023

Veröffentlicht am 7. Juli 2023

Schlüsselwörter: Bullensperma, computergestützte Spermienanalyse, Durchflusszytometrie, Trägermedium, künstliche Besamung, Besamungsvolumen.

Keywords: bovine semen, computer-assisted sperm analysis, flow cytometry, carrier medium, artificial insemination, insemination volume.

Zusammenfassung

Weltweit stellt die künstliche Besamung eine der wichtigsten Reproduktionstechnologien dar und ist aus der modernen Rinderzucht nicht mehr wegzudenken. Bis heute hat sich die tiefe zervikale oder intrauterine Besamung als Standardbesamungsmethode durchgesetzt. Entgegen dem Trend der stetigen Reduktion des Besamungsvolumens und basierend auf der Frage, wie man aus einer Besamungsportion die meisten Kälber erzeugen kann, wurde in der jüngeren Vergangenheit eine high-volume-Besamungsmethode (HVB) entwickelt. Bei dieser wird das aufgetaute Sperma vor der Besamung mit bis zu 30 ml eines spermienfreundlichen Mediums verdünnt. Auf Grund des Aufbaus der Besamungsapparatur bietet die HVB daher auch die Möglichkeit, Spermaportionen unter hygienischen Bedingungen auf mehrere Tiere aufzuteilen.

Ziel der Studie war es einerseits, den Einfluss vier verschiedener Puffermedien [BO-IVFTM (BIVF), BO-SemenPrepTM (BSPREP), EasyBuffer B (EBB), modifiziertes Fert-TALP (mFert-TALP)] auf Qualitätsparameter boviner Spermien zu untersuchen, um Rückschlüsse auf ihre potenzielle Eignung als Trägermedium für die HVB zu ziehen. Andererseits wurde im praktischen Teil die HVB bei routinemäßigen Besamungen angewendet und mit der Standardbesamung in Bezug auf das Besamungsergebnis verglichen.

Während beim Anteil an Spermien mit intakter Plasmamembran kein signifikanter Unterschied zwischen den Puffermedien bestand (BIVF–BSPREP

Summary

Influence of buffer media on sperm quality and fertility in high-volume-insemination in cattle

Introduction

Due to its simplicity, economy and efficiency, artificial insemination (AI) has become one of the most important reproductive technologies worldwide and deep cervical or intrauterine insemination is now the standard insemination (SI) method. We tested a high-volume-insemination (HVI) method, where semen is diluted with up to 30 ml of medium before insemination, and compared the pregnancy rates with those attained with the SI method.

Material and methods

In laboratory tests, we used computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to examine four buffer media [BO-IVFTM (BIVF), BO-SemenPrepTM (BSRPEP), EasyBuffer B (EBB), modified Fert-TALP (mFert-TALP)] for sperm compatibility and potential suitability as a carrier medium for HVI using bovine frozen-thawed ejaculates (n=10). We then undertook routine inseminations (SI n=100, HVI n=100) during natural oestrus and compared the conception rates of the two insemination methods. Pregnancy status was diagnosed by transrectal palpation starting 35 days after AI. We used modified Fert-TALP as carrier medium for HVI.

*E-Mail: Jakob.Scherzer@bayern-genetik.de

$p=0,549$, BIVF–EBB $p=0,960$, BIVF–mFert-TALP $p=0,990$, BSPREP–EBB $p=0,267$, BSPREP–mFert-TALP $p=0,738$, EBB–mFert-TALP $p=0,854$), wurde der Anteil an progressiv motilen Spermien (Zeitpunkt 0 h: BIVF–BSPREP $p=0,207$, BIVF–EBB $p=0,559$, BIVF–mFert-TALP $p=0,968$, BSPREP–EBB $p=0,007$, BSPREP–mFert-TALP $p=0,076$, EBB–mFert-TALP $p=0,832$; Zeitpunkt 1 h: BIVF–BSPREP $p<0,001$, BIVF–EBB $p<0,001$, BIVF–mFert-TALP $p=0,695$, BSPREP–EBB $p<0,001$, BSPREP–mFert-TALP $p<0,001$, EBB–mFert-TALP $p=0,003$) und der Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (BIVF–BSPREP $p<0,001$, BIVF–EBB $p<0,001$, BIVF–mFert-TALP $p=0,997$, BSPREP–EBB $p=0,621$, BSPREP–mFert-TALP $p<0,001$, EBB–mFert-TALP $p<0,001$) zum Teil signifikant von den Puffermedien beeinflusst. Sie erscheinen daher nicht in gleichem Maße als Trägermedium geeignet. Bei den Besamungen konnte kein signifikanter Einfluss der Besamungsmethode auf das Trächtigkeitsergebnis festgestellt werden ($p=0,670$). Da die HVB im Vergleich zur Standardbesamung jedoch mit einem deutlichen Mehraufwand hinsichtlich Zeit, Logistik und Kosten verbunden ist, ist sie für einen breiten routinemäßigen Einsatz derzeit nicht zu empfehlen.

Abkürzungen: AI = artificial insemination; ATP = Adenosintriphosphat; BIVF = BO-IVF™; BSPREP = BO-SemenPrep™; CASA = computer-assistierte Spermienanalyse; EBB = EasyBuffer B; evB = eine vorangegangene Besamung; HMMP = hohes Mitochondrienmembranpotential; HVB = high-volume-Besamung; HVI = high-volume-insemination; JC-1 = 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin Iodid; KB = künstliche Besamung; kvB = keine vorangegangene Besamung; mFert-TALP = modifiziertes Fert-TALP; MMP = Mitochondrienmembranpotential; mvB = mehr als eine vorangegangene Besamung; PI = Propidium Iodid; PMI = Plasmamembranintegrität; PMS = Anteil progressiv motiler Spermien; SB = Standardbesamung; SI = standard insemination; VCL = Geschwindigkeit bezogen auf die tatsächliche Strecke; VSL = Geschwindigkeit bezogen auf die direkte Strecke

■ Einleitung

Die künstliche Besamung (KB) ist auf Grund ihrer Einfachheit, Wirtschaftlichkeit und Effizienz eine der bedeutsamsten Reproduktionstechnologien (Vishwanath 2003). Sie ist die Methode der Wahl, wenn es um die Verbreitung von wertvollem genetischem Material geht und stellt für Landwirte weltweit das wichtigste Werkzeug zur Verbesserung der Herdengenetik dar (Foote 2002; Vishwanath 2003; Bols et al. 2010). Als KB ist das Einbringen von gewonnenem Spermia in den weiblichen Reproduktionstrakt unter Verwendung eines Instruments definiert (Bols et al. 2010). Ihr Ziel ist es, zum Zeitpunkt der Ovulation ein Reservoir an befruchtungsfähigen Spermien im kaudalen Eileitersthmus zu schaffen und damit die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Befruchtung zu

Results

The laboratory tests revealed several differences in semen quality depending on the buffer media. While there was no significant difference in plasma membrane integrity (BIVF–BSPREP $p=0.549$, BIVF–EBB $p=0.960$, BIVF–mFert-TALP $p=0.990$, BSPREP–EBB $p=0.267$, BSPREP–mFert-TALP $p=0.738$, EBB–mFert-TALP $p=0.854$), the proportions of progressively motile sperm (point of time 0 h: BIVF–BSPREP $p=0.207$, BIVF–EBB $p=0.559$, BIVF–mFert-TALP $p=0.968$, BSPREP–EBB $p=0.007$, BSPREP–mFert-TALP $p=0.076$, EBB–mFert-TALP $p=0.832$; point of time 1 h: BIVF–BSPREP $p<0.001$, BIVF–EBB $p<0.001$, BIVF–mFert-TALP $p=0.695$, BSPREP–EBB $p<0.001$, BSPREP–mFert-TALP $p<0.001$, EBB–mFert-TALP $p=0.003$) and sperm cells with high mitochondrial membrane potential (BIVF–BSPREP $p<0.001$, BIVF–EBB $p<0.001$, BIVF–mFert-TALP $p=0.997$, BSPREP–EBB $p=0.621$, BSPREP–mFert-TALP $p<0.001$, EBB–mFert-TALP $p<0.001$) were partially significantly influenced by the buffer media. Within routine inseminations, the method of insemination had no significant influence on conception rates ($p=0.670$).

Conclusion

The laboratory tests revealed that buffer media are not equally suitable as a carrier medium for HVI. EBB gave the best results, followed by mFert-TALP, BIVF and BSPREP. In practice, the HVI method is equal to the SI method due to similar conception rates achieved in routine insemination during natural oestrus. As the HVI method is associated with additional expenses in terms of time, logistics and costs, it is not recommended for widespread routine use.

erhöhen (Diskin 2018). Bis heute hat sich die bereits in den 1940er Jahren entwickelte tiefe zervikale oder intrauterine Besamung, bei der die Zervix über das Rektum fixiert wird, als Standardbesamungs-(SB)-methode durchgesetzt (López-Gatius 2000).

Während beim Rind als Scheidenbesamer (Töpfer-Petersen 2007) beim natürlichen Deckakt die Zervix die erste Barriere darstellt, in deren Zervikalschleim immotile und morphologisch abnormale Samenzellen sowie Seminalplasma und Bakterien hängen bleiben (Töpfer-Petersen & Waberski 2001), wird dieser Selektionsvorgang bei der SB mit der Deponierung des Spermias im Uteruskörper umgangen (Busch 2007). Dadurch und auf Grund der immer besser werdenden Konservierungsmethoden wurde eine starke Reduktion der Spermienkonzentration in den Besamungsportionen bei gleichbleibenden Trächtigkeit

keitsraten möglich (Foote 2002; Vishwanath 2003). Konventionelle Tiefgefrierpailletten enthalten in der Regel $15\text{--}20 \times 10^6$ Spermien (Vishwanath & Shannon 2000). Mit der Einführung der Tiefgefrierkonservierung kam es auf Grund der kostspieligen Lagerung in flüssigem Stickstoff zudem zu einer stetigen Reduktion des Besamungsvolumens. Heute enthalten Besamungsportionen standardmäßig 0,25 ml verdünntes Sperma (Pickett & Berndtson 1974; Foote 2002; Diskin 2018). Entgegen diesem Trend des geringen Besamungsvolumens und basierend auf der Fragestellung, wie man aus einer Spermaportion die meisten Kälber erzeugen kann, entstand die Idee zu einer großvolumigen Besamung. Stroud (2012, 2016, 2017, 2020) entwickelte über mehrere, aufeinander aufbauende Patente eine high-volume-Besamungs-(HVB)-Methode. Bei dieser HVB wird das aufgetaute Sperma vor der Besamung mit bis zu 30 ml eines spermienfreundlichen Mediums vermischt, weshalb sie auch die Möglichkeit bietet, eine Spermaportion unter hygienischen Bedingungen sowohl im Rahmen des Embryotransfers als auch bei routinemäßigen Besamungen auf mehrere Tiere aufzuteilen. Laut Stroud (2015) führt das höhere Besamungsvolumen dazu, dass der Uterus einschließlich der beiden Uterushörner geflutet wird und die Spermien einen verstärkten passiven Transport in Richtung uterotubaler Verbindung erfahren. Der Autor konnte mit der HVB bei der Besamung superovulierter Fleischrinder unter Verwendung von Standardspermienkonzentrationen erste vielversprechende Ergebnisse erzielen und empfiehlt die HVB daher auch für niedrige Spermienkonzentrationen und gesextes Sperma (Stroud 2015).

Ziel dieser Arbeit war es, eine in der jüngeren Vergangenheit in die Besamungspraxis eingeführte, großvolumige Besamungsmethode, die HVB, erstmals im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit bei routinemäßigen Besamungen mit Standardspermienkonzentrationen anzuwenden und mit der SB-Methode hinsichtlich des Besamungserfolges zu vergleichen. Da laut Stroud (2012, 2016, 2017, 2020) verschiedene Medien wie gepufferte Salzlösung, kommerziell erhältliche Embryo-Spüllösungen sowie Verdüner, die auch in der Kryokonservierung von Sperma eine Rolle spielen, als Trägermedium für die HVB geeignet sind, wurde in Laboruntersuchungen der Einfluss von vier verschiedenen Puffermedien auf Qualitätsparameter boviner Spermien und ihre Eignung als Trägermedium für die HVB analysiert. Im praktischen Teil der Arbeit wurden die von Stroud (2020) entwickelte HVB-Methode und die SB-Methode bei der routinemäßigen KB im Rahmen der natürlichen Brunst angewendet und die Trächtigkeitsergebnisse der beiden Methoden wurden miteinander verglichen.

■ Material und Methoden

Spermaproben

Für die Arbeit wurde Tiefgefriersperma von Fleckviehzuchtbullen ($n=15$) aus der Routineproduktion der Besamungsstation Bayern-Genetik GmbH (Altenbach, Deutschland) herangezogen. Die gewonnenen Ejakulate wurden mit dem eigelhaltigen Verdüner Steridyl® verarbeitet, in 0,25 ml Besamungspailletten abgefüllt und nach mindestens vierstündiger Äquilibrierung bei $+5\text{ °C}$ mit Hilfe einer automatischen Einfriermaschine tiefgefroren und in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Die Spermienkonzentration lag bei $15\text{--}20 \times 10^6$ Spermien je Paillette. Die im praktischen Teil eingesetzten Ejakulate ($n=5$) erfüllten die von der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter festgelegten Mindestanforderungen für natives Bullensperma und die Qualitätskriterien für Bullensperma nach Tiefgefrierkonservierung (Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e. V. 2006a, 2006b).

Laboruntersuchungen

In den Laboruntersuchungen wurden vier verschiedene Puffermedien, drei kommerziell erhältliche [EasyBuffer B (EBB), BO-IVF™ (BIVF), BO-SemenPrep™ (BSPREP)] sowie ein selbst hergestelltes Medium [modifiziertes Fert-TALP (mFert-TALP); $113,96\text{ mmol/l NaCl}$, $3,15\text{ mmol/l KCl}$, $25,03\text{ mmol/l NaHCO}_3$, $0,34\text{ mmol/l NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $2,70\text{ mmol/l CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $16,60\text{ mmol/l NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$, $0,49\text{ mmol/l MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $10,00\text{ mmol/l MOPs Puffer}$, $0,03\text{ mmol/l Phenolrot}$, Reinstwasser; pH $6,9\text{--}7,1$, Osmolarität $295\text{--}305\text{ osmol/l}$] unter Verwendung von je einem Tiefgefrierejakulat von zehn Fleckviehzuchtbullen auf ihre Spermienverträglichkeit untersucht, um daraus Rückschlüsse auf ihre potenzielle Eignung als Trägermedium für die HVB zu ziehen. Für die spermatologischen Untersuchungen wurden die computerassistierte Spermienanalyse (CASA) zur Bestimmung der progressiven Motilität und die Durchflusszytometrie zur Analyse der Plasmamembranintegrität (PMI) und des Spermienanteils mit hohem Mitochondrienmembranpotential (HMMP) herangezogen. Diese beiden Untersuchungsverfahren werden bei der Bayern-Genetik GmbH auch bei der standardmäßig durchgeführten Qualitätskontrolle eingesetzt.

Computerassistierte Spermienanalyse (CASA)

Die CASA wurde mit dem AndroVision®-System (Software-Version 1.1.4. vom 11.12.2017) durchgeführt. Je Ejakulat wurden drei Pailletten für 30 s bei $+38\text{ °C}$ im Wasserbad aufgetaut und eine Poolprobe erstellt. Hundert μl der Poolprobe wurden mit einer äquivalenten Menge der vier Puffermedien verdünnt, die zuvor auf $+38\text{ °C}$ angewärmt worden waren. Die

Analyse erfolgte nach 10 min (0 h) und 70 min (1 h) Inkubation bei +38 °C. Dazu wurden 3,7 µl der vorverdünnten Probe auf einem vorgewärmten Objektträger vorgelegt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Je Probe wurden mindestens vier Analysefenster manuell fokussiert und ein Minimum von 1000 Spermazellen analysiert. Die Bildfrequenz war auf 60 Hz festgelegt und die Klassifizierung der Spermien erfolgte basierend auf den im AndroVision®-System hinterlegten tierartspezifischen Setup-Einstellungen. Als progressiv motil wurden alle Spermien mit einem zeitlich gemittelten Richtungswechsel des Spermienkopfes entlang der gemittelten Strecke von $\geq 0,0870$ rad sowie einer Geschwindigkeit von ≥ 48 µm/s bezogen auf die tatsächliche Strecke (VCL) und ≥ 24 µm/s bezogen auf die direkte Strecke (VSL) gewertet.

Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit dem Durchflusszytometer Guava® easyCyte 5HT Benchtop und der Software CytoSoft (Version 5.4.1 beta2). Das Durchflusszytometer verfügte über einen Plattenloader. Das Anregungslicht des blauen Lasers wies eine Wellenlänge von 488 nm auf. Für die Emissionsmessung wurden drei Filter verwendet: Filter 1 (525/30 nm) für die grüne Fluoreszenz, Filter 2 (583/26 nm) für die gelbe Fluoreszenz und Filter 3 (690/50 nm) für die rote Fluoreszenz. Die Flussrate lag bei 0,59 µl/s und je Probe wurden 5000 Zellen analysiert, sofern das mit 60 s gesetzte Zeitlimit nicht vorher erreicht wurde.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden je Ejakulat drei Pailletten für 30 s bei +38 °C im Wasserbad aufgetaut und gepoolt. Je 50 µl Poolprobe wurden mit einer äquivalenten Menge der vier zuvor auf +38 °C angewärmten Puffermedien verdünnt und für 10 min bei +38 °C inkubiert.

Für die Analyse der Plasmamembranintegrität wurden 0,5 µl SYBR®-14 (1 mM) mit 245 µl EBB verdünnt. Dann wurde eine Arbeitslösung aus 5910 µl BoviHold, 32 µl verdünntem SYBR®-14 und 3,1 µl Propidium Iodid (PI; 2,4 mM) erstellt. Ein µl der vorverdünnten Spermprobe wurde nach Ablauf der Inkubationszeit in 199 µl Arbeitslösung überführt und nach 12 min Inkubation bei +38 °C durchflusszytometrisch analysiert. Nach Ausschluss nicht-zellulärer Partikel wurde der Anteil an plasmamembranintakten, SYBR®-14-positiven und PI-negativen Spermien (%) bestimmt.

Für die Analyse des Spermienanteils mit HMMP wurde 1 mg Pulver des Fluorochroms 5,5,6,6-Tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid (JC-1) in 200 µl Dimethylsulfoxid (99,5 %) gelöst und in 1 µl-Aliquoten eingefroren. Zur Fertigstellung der Arbeitslösung wurden dem 1 µl JC-1-Aliquot 90 µl Ethanol hinzugefügt. Davon wurden 70 µl in 5940 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; 10x) überführt, die im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser verdünnt

war. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde je 1 µl der vorverdünnten Spermprobe in 199 µl Arbeitslösung überführt und nach 32 min Inkubation bei +38 °C durchflusszytometrisch analysiert. Nach Ausschluss nicht-zellulärer Partikel wurde der Anteil an Spermien mit HMMP (%) bestimmt.

Künstliche Besamungen

Im praktischen Teil wurden routinemäßige Besamungen im Rahmen der natürlichen Brunst mit Standardspermienkonzentrationen bei Kühen und Kalbinnen mit der SB-Methode (n=100) und der HVB-Methode (n=100) durchgeführt und die Trächtigkeitsraten beider Besamungsmethoden miteinander verglichen. Die dabei zum Einsatz gekommenen Tiefgefrier ejakulate (n=5) waren für beide Besamungsmethoden die Gleichen, das heißt, sie wurden bis zur Besamung als Einheit aufbereitet. Die Qualität der Spermachargen wurde im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle der Besamungsstation überprüft.

Die SB erfolgte, wie von Busch (2007) beschrieben, als intrauterine Besamung mit transrektaler Fixation der Zervix. Die HVB wurde basierend auf dem Patent „Method, apparatus and kit for artificial insemination of bovine“ von Stroud (2020) durchgeführt (siehe Abb. 1). Anstelle der Metallkatheter wurden Einmaluteruskatheter verwendet. Analog zur SB wurde die Spermapaillette für 10 s bei +38 °C im Wasserbad aufgetaut, abgetrocknet und das verschweißte Ende abgetrennt. Mit einem Mandrin wurde der Pailletteninhalt durch Verschieben des Kunststoffstopfens in das Trägermedium im Faltenbalg überführt, das zuvor in einer Klimabox auf +37 °C angewärmt worden war. Die Fixation des Faltenbalges am Einmaluteruskatheter erfolgte über eine flexible Silikonverbindung. Die sich anschließende Besamung wurde wie die SB als intrauterine Besamung mit transrektaler Fixation der Zervix durchgeführt. Bei richtigem Sitz des Katheters wurde der Faltenbalg in eine senkrechte Position gebracht und das Medium-Spermagemisch durch vorsichtiges Zusammendrücken des Faltenbalges in das *Corpus uteri* appliziert. Als Trägermedium wurde mFert-TALP verwendet, das auf Basis von Fert-TALP, einem Befruchtungsmedium für die *In-vitro*-Fertilisation boviner Eizellen, und der Zusammensetzung von Maximate®, einem von Stroud (2015) eigens für die HVB entwickelten Trägermedium, hergestellt worden war. Die Faltenbälge waren mit 23 ml mFert-TALP befüllt.

Die Besamungen wurden im Mai 2020 durch einen Fachagrarwirt für Besamungstechnik durchgeführt. Von fünf genomisch selektierten Fleckviehzuchtbullen wurde je ein Tiefgefrier ejakulat ausgewählt. Mit jedem Ejakulat wurden 40 Besamungen durchgeführt, 20 als SB und 20 als HVB. Die Brunsterkennung erfolgte durch die Landwirte. Es wurden sowohl Kalbinnen als auch Kühe besamt (HVB: 22 Kalbinnen, 78 Kühe;

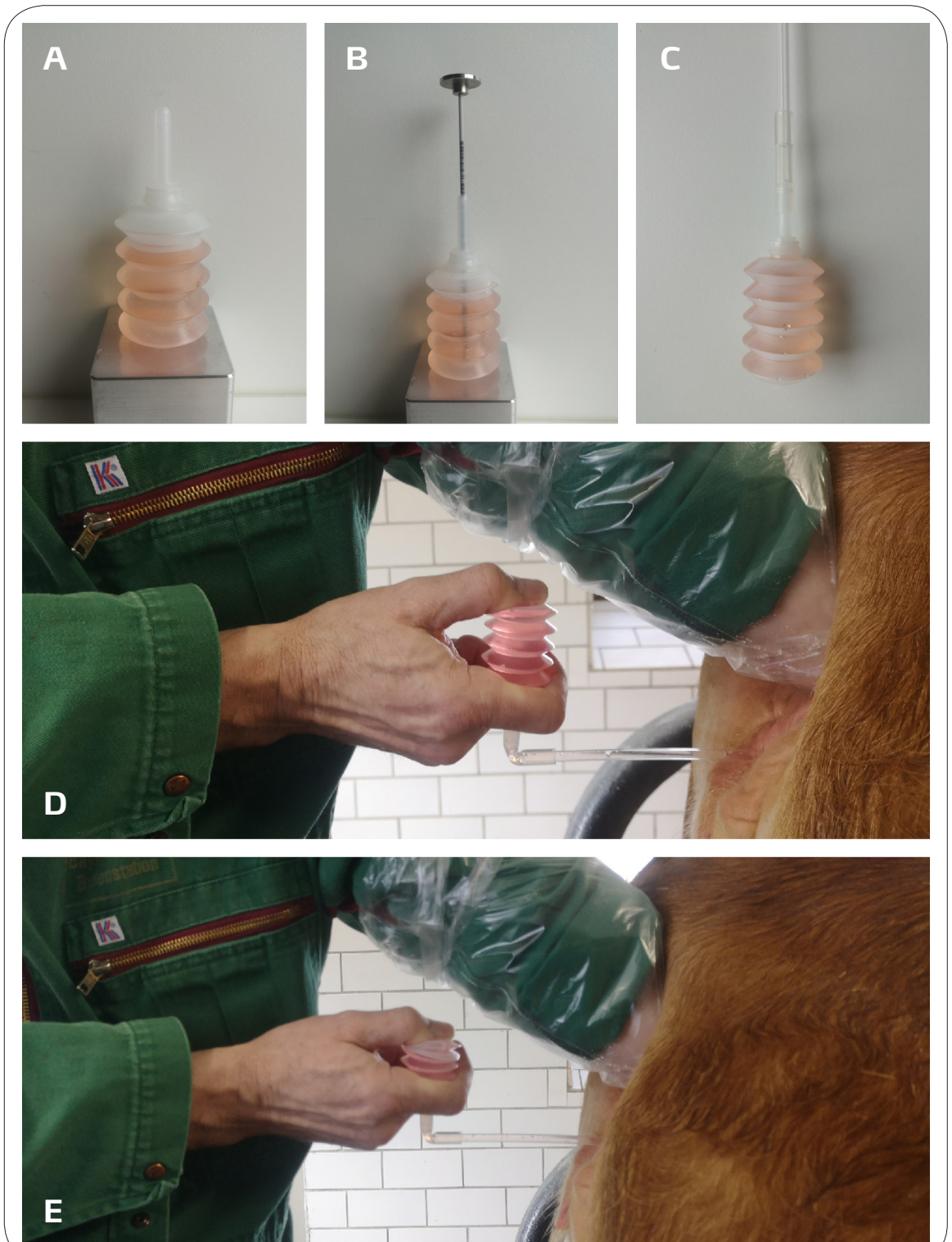


Abb. 1: Praktische Durchführung der high-volume-Besamung: Nach dem Auftauen der Paillette für 10 s bei +38 °C wird das verschweißte Ende entfernt und die Paillette über die Öffnung in den Faltenbalg gesteckt (A). Mit einem Mandrin wird das Sperma durch Vorschieben des Kunststoffstopfens in das Trägermedium überführt (B) und der Faltenbalg über eine flexible Silikonverbindung am Einmaluteruskatheter fixiert (C). Bei der Besamung wird die Spitze des Katheters unter transrektaler Palpation in den Gebärmutterkörper eingeführt (D). Dann wird der Faltenbalg um 90° nach oben gedreht und das Medium-Sperma-Gemisch durch Zusammendrücken des Faltenbalges in den Uterus appliziert (E). / Practical implementation of the high-volume insemination. After the straw is thawed for 10 s at +38 °C its sealed end is removed and the straw inserted in the bellows (A). By pushing the plastic stopper forward with a stylet, the semen is transferred to the carrier medium (B) and the bellows is fixed to the disposable uterine catheter with a flexible silicone connection (C). During insemination, the tip of the catheter is inserted into the uterine body with transrectal palpation (D). The bellows is rotated 90° and the medium containing the semen is applied to the uterus by squeezing the bellows together (E).

SB: 34 Kalbinnen, 66 Kühe). Jedes Tier wurde in der Brunst nur einmal besamt. Bei Nichterfolg wurde im Rahmen der Arbeit keine erneute Besamung durchgeführt. Die besamten Tiere verteilten sich auf 65 oberbayerische Betriebe. Auf Grund der unterschiedlichen Betriebsgrößen variierte die Anzahl der je Betrieb durchgeführten Besamungen (Min.: 1; Max.: 9). Innerhalb eines Betriebes wurde versucht, die beiden Besamungsmethoden zu einem etwa gleichen Anteil anzuwenden. Über das Mobile-Daten-Erfassungsgerät wurden die Besamungsdaten erfasst und in die zentrale Warenwirtschaftssoftware KBPro eingespielt. Erfasst wurden Betrieb, Identität des besamten Tieres, Paritätsstatus (Kalbin oder Kuh), Ejakulat, Besamungsdatum und Besamungsmethode. Zudem wurde die Anzahl der in der laufenden Zuchtperiode vorher durchgeführten Besamungen dokumentiert und die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: Keine (kvB), eine (evB) und mehr als eine vorangegangene Besamung (mvB). Ab Tag 35 *post inseminationem* wurde bei allen Tieren, die nicht erneut zur Besamung vorgestellt wurden, eine Trächtigkeitsuntersuchung per transrektaler Palpation durch den Fachagrarwirt für Besamungstechnik durchgeführt.

Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde mit der Software R (R version 4.0.3 (2020-10-10)) und Microsoft Excel (Microsoft 365) durchgeführt. Für die Auswertung der Laboruntersuchungen wurde mit gemischten Regressionsmodellen, mit Bulle als zufälliger Effekt, gearbeitet. Beim praktischen Teil wurden der Einfluss von Besamungsmethode, Paritätsstatus, Anzahl der in der laufenden Zuchtperiode vorangegangenen Besamungen und Bulle auf die Trächtigkeitsraten mittels logistischer Regressionsmodelle analysiert. Die sich den einzelnen Modellen anschließenden Vergleiche wurden mit Kontrastanalysen durchgeführt. Die p-Wert-Anpassungen für multiple Vergleiche wurden mit der Tukey-Methode vorgenommen. Das Signifikanzniveau α war auf 5 % festgelegt.

Bezugsquellennachweis

Besamungspailletten (Classic mini straws, IMV, L'Aigle, Frankreich); BO-IVF™ (IVF Bioscience, Falmouth, Vereinigtes Königreich); BO-SemenPrep™ (IVF Bioscience, Falmouth, Vereinigtes Königreich); BoviHold (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland); CASA-System (AndroVision®, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland); Chemikalien für die Herstellung des modifizierten Fert-TALP (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); CytoSoft (IMV Technologies, L'Aigle, Frankreich); Deckgläschen (Menzel-Gläser 18 x 18 mm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA); Dimethyl Sulfoxid (99,5 %, Sigma Aldrich, St. Louis, USA); Durchflusszytometer (Guava® easyCyte 5HT Benchtop, Millipore Corporation, Billerica, USA); EasyBuffer B (IMV, L'Aigle, Frankreich);

Einfriermaschine (Digitcool, IMV, L'Aigle, Frankreich); Einmaluteruskatheter (Mülleten, Müller, Nürnberg, Deutschland); Ethanol ($\geq 99,5$ %, reinst, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland); Faltenbalgbehälter (Squeeze-Jet™, 30 ml, Genesis Industries, Inc., Elmwood, USA); Klimabox mit variabler Temperatureinstellung (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland); LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA); Mobile-Daten-Erfassungsgerät (Typ Honeywell CT50, Scientific Industries Inc., Bohemia, USA); Objektträger (Thermo Scientific Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA); Phosphatgepufferte Salzlösung (10x, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA); Reinstwasseranlage (arium® mini, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Göttingen, Deutschland); Silikonverbindung (Silikon-Schlauch, 5 x 1,5 mm, transparent, nach DIN 40628, MBM Lehrmittel- & Verlagsgesellschaft mbH, St. Goarshausen, Deutschland); Steridyl® (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland); Warenwirtschaftssoftware (KBPro, Bayern-Genetik GmbH, Altenbach, Deutschland); Wasserbad mit Einhängethermostat (Exatherm U3 electronic, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland)

■ Ergebnisse

Vergleich von vier potenziellen Trägermedien für die high-volume-Besamung

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. In Tabelle 2 finden sich die Ergebnisse der Kontrastanalysen der Puffermedien für die ausgewählten Spermaqualitätsparameter. Bei der Untersuchung mittels CASA war zum Zeitpunkt 0 h bei den mit EBB inkubierten Spermien ein signifikant höherer Anteil an progressiv motilen Spermien als bei den mit BSPREP inkubierten Proben zu verzeichnen ($p=0,007$). Die Inkubation mit mFert-TALP führte zu einer tendenziell höheren progressiven Motilität im Vergleich zu BSPREP ($p=0,076$). Zum Zeitpunkt 1 h war bei den mit EBB inkubierten Spermien ein signifikant höherer Anteil an progressiv motilen Spermien als bei den mit mFert-TALP inkubierten Spermien zu verzeichnen ($p=0,003$), der im Vergleich zu den mit BIVF und BSPREP inkubierten Spermien höchst signifikant war ($p<0,001$). Zwischen mFert-TALP und BIVF konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beim prozentualen Anteil an progressiv motilen Spermien festgestellt werden ($p=0,695$). Bei Inkubation mit mFert-TALP und BIVF waren zum Zeitpunkt 1 h höchstsignifikant mehr Spermien progressiv motil als bei Inkubation mit BSPREP ($p<0,001$). Bei allen vier Puffermedien bestand ein höchstsignifikanter Unterschied im Anteil an durchschnittlich progressiv motilen Spermien zu den Zeitpunkten 0 h und 1 h ($p<0,001$) (siehe Tab. 1 und 2).

Beim Anteil an plasmamembranintakten Spermien konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den

Tab. 1: Ergebnisse der Laboruntersuchungen als statistisch modellierte Mittelwerte einschließlich unterem und oberem 95 % Konfidenzintervall unter Berücksichtigung des für die Inkubation verwendeten Puffermediums / Results of laboratory tests as statistically modeled mean values including lower and upper 95 % confidence intervals in relation to the buffer medium used for incubation

Puffermedium	PMS 0 h (%)	PMS 1 h (%)	PMI (%)	HMMP (%)
BO-IVF™	61,8 (55,3–68,3)	51,8 (45,3–58,2)	41,3 (37,5–45,2)	45,2 (42,5–47,9)
BO-SemenPrep™	59,2 (52,8–65,7)	41,0 (34,6–47,5)	40,3 (36,5–44,2)	52,1 (49,4–54,8)
EasyBuffer B	63,5 (57,1–70,0)	57,8 (51,4–64,3)	41,7 (37,8–45,6)	50,6 (47,8–53,3)
modifiziertes Fert-TALP	62,4 (56,0–68,9)	53,2 (46,8–59,7)	41,1 (37,2–45,0)	45,0 (42,2–47,7)

HMMP = hohes Mitochondrienmembranpotential; PMI = Plasmamembranintegrität; PMS = Anteil progressiv motiler Spermien; 0 h = nach 10 min Inkubation; 1 h = nach 70 min Inkubation

Tab. 2: Kontrastanalysen zum Vergleich der Puffermedien hinsichtlich ihres Einflusses auf die einzelnen Spermaqualitätsparameter. Angegeben sind der prozentuale Unterschied (Est) einschließlich Standardfehler (SE) sowie p-Wert. / Contrast analysis to determine the influence of the buffer media on sperm quality. Percent difference (Est) including standard error (SE) and p value are given.

Kontrastanalysen	PMS 0 h		PMS 1 h		PMI		HMMP	
	Est (SE) (%)	p-Wert	Est (SE) (%)	p-Wert	Est (SE) (%)	p-Wert	Est (SE) (%)	p-Wert
BIVF–BSPREP	2,59 (1,32)	0,207	10,74 (1,32)	<0,001	1,01 (0,76)	0,549	-6,90 (1,27)	<0,001
BIVF–EBB	-1,73 (1,32)	0,559	-6,05 (1,32)	<0,001	-0,38 (0,76)	0,960	-5,36 (1,27)	<0,001
BIVF–mFert-TALP	-0,06 (1,32)	0,968	-1,45 (1,32)	0,695	0,23 (0,76)	0,990	0,26 (1,27)	0,997
BSPREP–EBB	-4,32 (1,32)	0,007	-16,80 (1,32)	<0,001	-1,38 (0,76)	0,267	1,54 (1,27)	0,621
BSPREP–mFert-TALP	-3,20 (1,32)	0,076	-12,19 (1,32)	<0,001	-0,77 (0,76)	0,738	7,16 (1,27)	<0,001
EBB–mFert-TALP	1,12 (1,32)	0,832	4,61 (1,32)	0,003	0,61 (0,76)	0,854	5,62 (1,27)	<0,001

BIVF = BO-IVF™; BSPREP = BO-SemenPrep™; EBB = EasyBuffer B; HMMP = hohes Mitochondrienmembranpotential; mFert-TALP = modifiziertes Fert-TALP; PMI = Plasmamembranintegrität; PMS = Anteil progressiv motiler Spermien; 0 h = nach 10 min Inkubation; 1 h = nach 70 min Inkubation; Est = Unterschied in Prozent; SE = Standardfehler

vier Puffermedien aufgezeigt werden (BIVF–BSPREP $p=0,549$; BIVF–EBB $p=0,960$; BIVF–mFert-TALP $p=0,990$; BSPREP–EBB $p=0,267$; BSPREP–mFert-TALP $p=0,738$; EBB–mFert-TALP $p=0,854$). Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied beim Anteil an Spermien mit HMMP zwischen den mit EBB und BSPREP ($p=0,621$) sowie mFert-TALP und BIVF inkubierten Spermaproben ($p=0,997$). Die mit EBB und BSPREP inkubierten Spermien wiesen einen signifikant höheren Anteil an Spermien mit HMMP als die mit mFert-TALP und BIVF inkubierten Spermien auf ($p<0,001$) (siehe Tab. 1 und 2).

Trächtigkeitsergebnisse nach high-volume-Besamung versus Standardbesamung

Von den insgesamt 200 besamten Tieren wurde bei 109 eine Trächtigkeit festgestellt. Die Trächtigkeitseraten

lagen bei 56,0 % (SB) und 53,0 % (HVB). Für die beiden Besamungsmethoden konnte kein signifikanter Unterschied bei den Trächtigkeitseraten aufgezeigt werden ($p=0,670$). Die Interaktion aus bei der Besamung verwendetem Bullen und Besamungsmethode hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Trächtigkeitserate ($p=0,708$). Die Trächtigkeitseraten der einzelnen Bullen für die beiden Besamungsmethoden zeigten keinen signifikanten Unterschied (Bulle A: $p=0,768$; Bulle B: $p=0,954$; Bulle C: $p=0,384$; Bulle D: $p=0,543$; Bulle E: $p=0,333$). Die Besamungen wurden anhand der in der laufenden Zuchtperiode vorher durchgeführten Besamungen in drei Gruppen zusammengefasst: keine, eine und mehr als eine vorangegangene Besamung. Für die Interaktion aus Anzahl vorangegangener Besamungen und Besamungsmethode konnte kein signifikanter Einfluss auf die Trächtigkeitserate festgestellt werden ($p=0,316$). Es bestand weder innerhalb

einer Besamungsmethode (SB: kvB-evB $p=0,906$, kvB-mvB $p=0,972$, evB-mvB $p=0,990$; HVB: kvB-evB $p=0,604$, kvB-mvB $p=0,337$, evB-mvB $p=0,155$) noch zwischen den Besamungsmethoden (kvB $p=0,844$, evB $p=0,777$, mvB $p=0,148$) ein signifikanter Unterschied bei den Trächtigkeitsraten in Abhängigkeit von der Anzahl der vorangegangenen Besamungen. Mit beiden Besamungsmethoden wurden sowohl Kühe als auch Kalbinnen besamt. Die Interaktion aus Paritätsstatus und Besamungsmethode hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Trächtigkeitsrate ($p=0,258$). Bei beiden Besamungsmethoden bestand kein signifikanter Unterschied in den Trächtigkeitsraten zwischen Kühen und Kalbinnen (SB: $p=0,460$; HVB: $p=0,506$). Zudem konnte weder innerhalb der Gruppe der Kühe ($p=0,855$) noch der Gruppe der Kalbinnen ($p=0,281$) ein signifikanter Unterschied in den Trächtigkeitsraten bei den mittels SB und mittels HVB besamten Tieren aufgezeigt werden.

■ Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine in der jüngeren Vergangenheit entwickelte großvolumige Besamungsmethode, die HVB, die bereits erste vielversprechende Ergebnisse bei der Besamung superovulierter Fleischrinder geliefert hatte (Stroud 2015), bei routinemäßigen Besamungen angewendet und mit der SB-Methode in Bezug auf die Trächtigkeitsraten verglichen.

Da laut Stroud (2012, 2016, 2017, 2020) verschiedene Medien als Trägermedium für die HVB verwendet werden können und das von ihm eigens für die HVB entwickelte Maximate® kommerziell nicht erhältlich war, wurde in Laboruntersuchungen der Einfluss vier verschiedener Puffermedien auf die Spermaqualitätsparameter progressive Motilität, Plasmamembranintegrität (PMI) und Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (HMMP) untersucht. Die verwendeten spermatologischen Untersuchungsverfahren der CASA und Durchflusszytometrie finden bei der BayernGenetik GmbH auch bei der Standardqualitätskontrolle Einsatz. Sie ermöglichen die objektive Analyse einer großen Spermienpopulation unter Berücksichtigung der Heterogenität der Spermienzellen (Waberski & Petrunkina 2007; Petrunkina et al. 2008; Contri et al. 2010; Vincent et al. 2021). Wie die Ergebnisse der Laboruntersuchungen verdeutlichen, wirken sich Puffermedien unterschiedlich auf die untersuchten Spermaqualitätsparameter aus und erscheinen daher nicht gleichermaßen als Trägermedium für die HVB geeignet. Die besten Ergebnisse, sowohl bei der CASA als auch bei der durchflusszytometrischen Untersuchung, wurden bei Inkubation der Spermien mit EBB erzielt, gefolgt von mFert-TALP, BIVF und BSPREP. Hier sei darauf hingewiesen, dass sowohl mFert-TALP als auch BIVF für die *In-vitro*-Fertilisation unter bestimmten Gasbedingungen entwickelt wurden.

Unter atmosphärischen Bedingungen kommt es bei beiden Medien zu pH-Wert-Veränderungen, die die analysierten Spermaqualitätsparameter beeinflussen können.

Der Spermienmotilität wird in der Spermatologie ein hoher Stellenwert zugeschrieben, da nur motile Spermien in der Lage sind, den Uterus sowie die uterotubale Verbindung zu passieren und somit bei der Befruchtung eine Rolle spielen. Bereits in vorangegangenen Studien wurde beschrieben, dass die für die Verdünnung der Spermaproben verwendeten Medien einen Einfluss auf die Motilität der Spermien und damit einhergehend auf die Analyseergebnisse der CASA haben (Farrell et al. 1996; Tardif et al. 1997; Rijsselaere et al. 2003; Cox et al. 2006; Robayo et al. 2008; Mostafapor & Ardebili 2014). Der bereits nach zehnmütiger Inkubation signifikant niedrigere Anteil an progressiv motilen Spermien bei BSPREP im Vergleich zu EBB spricht dafür, dass sich BSPREP bereits nach kurzem Kontakt negativ auf die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien auswirkt, weshalb BSPREP nicht als Trägermedium zu empfehlen ist.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für eine erfolgreiche Befruchtung ist eine intakte Plasmamembran. Die Plasmamembran wirkt als physiologische Barriere, und ihre Intaktheit ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und die Lebensfähigkeit der Spermienzelle (Hammerstedt et al. 1990; Hossain et al. 2011; Petrunkina & Harrison 2013). Eine Schädigung der Plasmamembran durch eines der Medien wäre ein Ausschlusskriterium für seine Verwendung als Trägermedium bei der HVB, da folglich weniger lebensfähige Spermien für die Befruchtung verfügbar wären. In unseren Untersuchungen konnte nach zehn Minuten Inkubation kein signifikanter Unterschied bei der PMI für die vier Puffermedien festgestellt werden. Die im Mittelstück gelegenen Mitochondrien sind mit ihrer Adenosintriphosphat-(ATP)-Produktion das energetische Kraftwerk der Spermienzelle und für die Vorwärtsbeweglichkeit verantwortlich. Die Grundlage für die ATP-Produktion bildet die oxidative Phosphorylierung, bei der das sogenannte Mitochondrienmembranpotential (MMP) generiert wird (Paoli et al. 2011; Luo et al. 2013). Die Messung der Höhe des MMP erlaubt die Beurteilung des Energiestatus der Spermienzellen (Reers et al. 1995; Paoli et al. 2011). In mehreren Studien wird eine Korrelation zwischen MMP und Spermienmotilität beschrieben (Garner & Thomas 1999; Paoli et al. 2011; Agnihotri et al. 2016). Mit der Bestimmung des Anteils an Spermien mit HMMP sollte untersucht werden, ob die vier Puffermedien das MMP negativ beeinflussen. Wie in früheren Studien gezeigt wurde, führt die präanalytische Behandlung von Spermien mit Spermiziden oder oxidativen Entkopplern zu einer drastischen Reduktion des MMP (Marchetti et al. 2004; Agnihotri et al. 2016). Für mFert-TALP und BIVF war im Vergleich zu EBB und BSPREP ein höchstsignifikant niedrigerer Anteil an Spermien

mit HMMP zu beobachten ($p < 0,001$). Dies ist Hinweis darauf, dass die Spermien bei diesen beiden Medien nicht jene Bedingungen vorfinden, die notwendig sind, um den Prozess der oxidativen Phosphorylierung und der damit einhergehenden ATP-Synthese optimal nutzen zu können.

Für die HVB wurde das mFert-TALP als Trägermedium verwendet, das im Wesentlichen dem vom Patentgeber Stroud eigens für die HVB entwickelten Maximate® entspricht (Stroud, persönliche Mitteilung). Das mFert-TALP erwies sich in den Laboruntersuchungen als positiv und konnte im eigenen Labor gefertigt werden. Von den anderen drei Medien (EBB, BIVF, BSPREP) war einerseits die genaue Zusammensetzung nicht bekannt, andererseits wären sie in ihrer Anschaffung für das nötige große Volumen bei HVB zu teuer gewesen.

Um einen reibungslosen Ablauf bei der praktischen Anwendung zu gewährleisten, wurde die HVB im Rahmen dieser Arbeit nicht mit dem von Stroud (2017, 2020) für die HVB entwickelten Metallkatheter, sondern mit Einmaluteruskathetern durchgeführt. Diese finden routinemäßig bei Uterusbehandlungen Einsatz. Im Gegensatz zur SB, bei der die Besamungspistole durch eine Einwegbesamungshülle vor Verschmutzungen geschützt ist, gibt es bis dato keine Hülle zum Schutz des Metallkatheters vor Kontaminationen. Daher besteht bei Wiederverwendung die Gefahr der Übertragung von (Geschlechts-) Krankheiten und Tierseuchen, weshalb der Metallkatheter nach jeder Besamung gereinigt und sterilisiert werden muss (Stroud, persönliche Mitteilung). Die Faltenbälge wurden mit 23 ml Trägermedium befüllt. Dies entspricht dem 92-fachen des standardmäßig eingesetzten Besamungsvolumens von 0,25 ml. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass möglichst wenig Medium-Sperma-Gemisch in Faltenbalg und Uteruskatheter zurückbleibt und der Spermienverlust auf ein Minimum reduziert wird (Stroud 2020). Inwieweit bei der HVB durch die starke Nachverdünnung des aufgetauten Spermas ein sogenannter Verdünnungseffekt bzw. -schock eintritt, wurde nicht untersucht. Beschrieben ist, dass eine zu starke Verdünnung, unter anderem auf Grund der in Folge zu geringen Seminalplasmakonzentration, die Spermaqualität negativ beeinflussen kann (Garner et al. 2001; Weitze 2001; Weitze & Petrunkina 2007).

Auch wenn sich die HVB in ihrer praktischen Durchführung am Tier mit transrektaler Fixation der Zervix und intrauteriner Deponierung des Spermas kaum von der SB unterscheidet, ist sie mit einem deutlichen Mehraufwand hinsichtlich Zeit, Logistik und Kosten verbunden. Dies beeinträchtigt die Praktikabilität der HVB und verhindert einen breiten Einsatz im Feld. Die Herstellung des mFert-TALP, die Befüllung der Faltenbälge mit dem Trägermedium und die Vorbereitung der Besamungskatheter erfordern einen zusätzlichen Zeitaufwand. Die HVB ist daher gegenüber der SB zeitaufwendiger und folglich auch mit höheren Arbeitskosten

verbunden. Aufgrund der begrenzten Haltbarkeit von Puffermedien wie mFert-TALP und eines möglichen Kontaminationsrisikos, das zu Veränderungen des Trägermediums führen und folglich Auswirkungen auf die Spermaqualität haben könnte, bringt die praktische Anwendung der HVB auch logistische Herausforderungen mit sich. So ist das mFert-TALP gekühlt zu lagern, und die Faltenbälge sind idealerweise erst kurz vor der HVB mit dem bei der Herstellung steril gefilterten mFert-TALP zu befüllen. Da Temperaturschwankungen die Spermaqualität negativ beeinflussen, ist das Trägermedium vor Spermienzugabe anzuwärmen. Nach Zugabe der Spermien ist die Besamung alsbald durchzuführen. Diese Anforderungen haben sich bei der praktischen Anwendung im Rahmen der routinemäßigen Besamungen als schwierig erwiesen. Hinzu kommt, dass jede HVB im Vergleich zur SB aufgrund der Kosten für Einmaluteruskatheter, Faltenbalgbehälter, Silikonverbindung und Trägermedium sowie der einmaligen Anschaffungskosten für die Klimabox, die zum Anwärmen der befüllten Faltenbälge benötigt wird, mit zusätzlichen Kosten verbunden ist.

Da Stroud (2015) die HVB bisher nur bei Besamungen im Rahmen des Embryotransfers angewendet hat, liegen keine Daten zur Routinebesamung vor. Mit dieser Arbeit sollten erste Erkenntnisse gewonnen werden, inwieweit die HVB bei Routinebesamungen mit der SB gleichzusetzen ist. Daher wurde auf eine Teilung der Besamungsportion verzichtet und beide Besamungsmethoden wurden mit einer vollständigen Besamungsportion durchgeführt. Von Stroud (2015) wurde, basierend auf den erzielten Spülergebnissen, berechnet, dass bei Verwendung der HVB mit Standardspermienkonzentrationen im Vergleich zur SB bei superovulierten Fleischrindern durchschnittlich ein lebensfähiger Embryo je Spülung mehr gewonnen werden kann. Daher war auch bei den routinemäßigen Besamungen ein positiver Effekt der HVB im Vergleich zur SB zu erwarten. Daher war es unerwartet, dass die Trächtigkeitsrate nach HVB sogar etwas unter jener nach SB lag, auch wenn der Unterschied zwischen den beiden Besamungsmethoden nicht signifikant war ($p = 0,670$). Die insgesamt erzielte Trächtigkeitsrate von 54,5 % (HVB: 53,0 %, Standard: 56,0 %) ist ähnlich jener, die Verberckmoes et al. (2004) bei der Testung des „Ghent-Katheters“ verzeichneten (insgesamt 54,7 %, SB-Methode 57,6 %, „Ghent-Katheter“ intrauterin 52,7 %, „Ghent-Katheter“ intrakornual 53,8 %). Die relativ geringen Fallzahlen ($n = 200$) sind vor allem den logistischen Herausforderungen in Kombination mit der vergleichsweise kleinstrukturierten Landwirtschaft im Einzugsgebiet der Besamungsstation geschuldet. Für eine erneute Studie zur HVB wird daher empfohlen, einen sehr großen landwirtschaftlichen Betrieb mit einer höheren Anzahl an zu besamenden Tieren auszuwählen. Dadurch können alle Vorbereitungen unmittelbar vor Ort und unter standardisierten Bedingungen getroffen

und mögliche Betriebseffekte reduziert bzw. ausgeschlossen werden.

Bereits vor der Entwicklung der HVB gab es Bestrebungen, die SB durch andere Besamungsmethoden bzw. -techniken zu ersetzen. Die Annahme, dass bei Ablage des Spermas näher am Eileiter eine Verbesserung der Trächtigkeitsraten und folglich eine Konzentrationsreduktion in den Pailletten erzielt werden können, war Anlass für die tiefe intrauterine oder intrakornuale Besamung, die uni- oder bikornual durchgeführt werden kann (Peters et al. 1984; Senger et al. 1988; López-Gatius 2000). Diesbezüglich durchgeführte Studien lieferten allerdings sehr unterschiedliche Ergebnisse: Während bei einigen Untersuchungen keine Unterschiede in den Non-Return- bzw. Trächtigkeitsraten nachgewiesen werden konnten (Hawk & Tanabe 1986; Williams et al. 1988; Momont et al. 1989; McKenna et al. 1990), kam es bei anderen zu einer Verbesserung (López-Gatius & Camón-Urgel 1988; Senger et al. 1988; Meirelles et al. 2012) und in einem Fall sogar zu einer Verschlechterung des Besamungsergebnisses (Marshall et al. 1989). Hinzu kommt, dass die (bilateral) intrakornuale Besamung mit einem größeren Zeitaufwand einhergeht und ein höheres Verletzungsrisiko mit sich bringt (Diskin 2018), weshalb sich die tiefe intrauterine oder intrakornuale Besamung nicht gegen die SB-Methode durchsetzen konnte. Mit dem zu Beginn des 21. Jahrhunderts speziell für die intrakornuale Besamung entwickelten „Ghent-Katheter“ wurde eine schonende Samenablage nahe am Eileiter möglich. Der zeitliche Mehraufwand bei der praktischen Durchführung der Besamung

sowie eine im Vergleich zur SB-Methode, sowohl bei normaler ($10\text{--}12 \times 10^6$ Spermien/Paillette) als auch bei reduzierter Spermienkonzentration ($2, 4, \text{ und } 8 \times 10^6$ Spermien/Paillette), ausbleibende Verbesserung der Trächtigkeitsraten verhinderten jedoch auch hier einen breiteren Einsatz im Feld (Verberckmoes et al. 2004, 2005). Laut Stroud (2015) erfahren die Spermien bei der HVB durch das Trägermedium einen passiven Transport in Richtung uterotubaler Verbindung, weshalb die HVB eine verletzungsrisikofreie Alternative zur tiefen intrauterinen oder intrakornualen Besamung darstellen könnte. Neben der routinemäßigen KB ist heutzutage vor allem die Superovulation mit nachfolgender Embryonengewinnung eine wichtige Reproduktionstechnologie, um möglichst viele Nachkommen von genetisch hochwertigen männlichen und weiblichen Spendertieren zu erzeugen. Allerdings ist der Embryotransfer im Vergleich zur routinemäßigen KB mit einem deutlich höheren Arbeits- und Kostenaufwand verbunden und daher genetisch wertvollen Tieren vorbehalten. Eine weitere Möglichkeit, mehr Nachkommen aus einer Besamungsportion zu erhalten, stellt das Halbieren bzw. Aufteilen einer Besamungsportion auf mehrere Tiere dar. Grundsätzlich sollte eine Aufteilung von Besamungsportionen jedoch nur in Spezialfällen, wie z.B. bei Spermaknappheit oder der Verwendung von sehr teurem Sperma, erfolgen. Die HVB-Methode bietet sich auf Grund des Aufbaus der Besamungsapparatur sehr gut dafür an, da sie ein einfaches und schnelles Teilen der Besamungsportion, sowie ein hygienisches Besamen ermöglicht.

Fazit für die Praxis:

Die in dieser Studie untersuchte HVB-Methode erwies sich hinsichtlich der erzielten Trächtigkeitsrate als ebenbürtig zur SB-Methode. In der praktischen Anwendung bringt sie allerdings einen größeren Aufwand mit sich und ist daher für einen routinemäßigen Einsatz derzeit nicht zu empfehlen. Inwieweit die Spermien bei der HVB durch das Trägermedium einen verstärkten passiven Transport in Richtung uterotubaler Verbindung erfahren und die HVB daher, wie von Stroud empfohlen, bei Verwendung von geringen Spermienkonzentrationen sowie gesextem Sperma vorteilhaft sein könnte, ist in weiteren Untersuchungen abzuklären.

Literatur

- Agnihotri SK, Agrawal AK, Hakim BA, Vishwakarma AL, Narender T, Sachan R, et al. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2016;52(9):953–960. DOI: 10.1007/s11626-016-0061-x
- Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e. V. ADR-Empfehlung 8.2: Anforderungen an Zuchtbullen für den Einsatz in der KB und für Deckbullen. 2006a. [cited: 2022 Jun 24]. Available from: <https://www.rind-schwein.de/brs-richtlinien-und-empfehlungen/besamungszucht.html>
- Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e. V. ADR-Empfehlung 8.3: Garantierte Qualität für Bullensperma im Handel. 2006b.

- [cited: 2022 Jun 24]. Available from: <https://www.rind-schwein.de/brs-richtlinien-und-empfehlungen/besamungszucht.html>
- Bols PE, Langbeen A, Verberckmoes S, Leroy J. Artificial insemination in livestock production: the Vet's perspective. *F, V & V.* 2010;6–12.
- Busch W. Insemination. In: Busch W, Waberski D, editors. *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren.* Stuttgart: Schattauer; 2007. p. 168–188.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology.* 2010;74(3):424–435. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.025

- Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*. 2006;66(4):860–867. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.062
- Diskin MG. Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal*. 2018;12(s1):75–84. DOI: 10.1017/S1751731118000952
- Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL. Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). *J Androl*. 1996;17(3):293–300. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1996.tb01785.x
- Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci*. 2002;80(Suppl 2):1–10. DOI: 10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a
- Garner DL, Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev*. 1999;53(2):222–229. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<222::AID-MRD11>3.0.CO;2-L
- Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, Allen CH. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*. 2001;56(1):31–40. DOI: 10.1016/S0093-691X(01)00540-4
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*. 1990;11(1):73–78. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
- Hawk HW, Tanabe TY. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in super-ovulating and single-ovulating cattle. *J Anim Sci*. 1986;63(2):551–560. DOI: 10.2527/jas1986.632551x
- Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl*. 2011;13(3):406–419. DOI: 10.1038/aja.2011.15
- López-Gatius F, Camón-Urgel J. Increase of pregnancy rate in dairy cattle after preovulatory follicle palpation and deep cornual insemination. *Theriogenology*. 1988;29(5):1099–1103. DOI: 10.1016/S0093-691X(88)80034-7
- López-Gatius F. Site of semen deposition in cattle: A review. *Theriogenology*. 2000;53(7):1407–1414. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00283-1
- Luo S-M, Schatten H, Sun Q-Y. Sperm Mitochondria in Reproduction: Good or Bad and Where Do They Go? *J Genet Genom*. 2013;40(11):549–556. DOI: 10.1016/j.jgg.2013.08.004
- Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod*. 2004;19(10):2267–2276. DOI: 10.1093/humrep/deh416
- Marshall CE, Graves WM, Meador JL, Swain JB, Anderson JI. A fertility comparison of uterine body and bicornual semen deposition procedures in dairy cattle. *J Anim Sci*. 1989;72(s1):455 (Abstr.).
- McKenna T, Lenz RW, Fenton SE, Ax RL. Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. *J Dairy Sci*. 1990;73(7):1779–1783. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78857-1
- Meirelles C, Kozicki LE, Weiss RR, Segui MS, Souza A, dos Santos IW, et al. Comparison between deep intracornual artificial insemination (dIAI) and conventional artificial insemination (AI) using low concentration of spermatozoa in beef cattle. *Braz Arch Biol Technol*. 2012;55(3):371–374. DOI: 10.1590/S1516-89132012000300006
- Momont HW, Seguin BE, Singh G, Stasiukynas E. Does intrauterine site of insemination in cattle really matter? *Theriogenology*. 1989;32(1):19–26. DOI: 10.1016/0093-691X(89)90517-7
- Mostafapour S, Ardebili FF. Effects of diluting medium and holding time on sperm motility analysis by CASA in ram. *Vet Res Forum*. 2014;5(2):101–105.
- Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, et al. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril*. 2011;95(7):2315–2319. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.059
- Peters JL, Senger PL, Rosenberger JL, O'Connor ML. Radiographic evaluation of bovine artificial inseminating technique among professional and herdsman-inseminators using .5- and .25-ml French straws. *J Anim Sci*. 1984;59(6):1671–1683. DOI: 10.2527/jas1984.5961671x
- Petrunkina A, Töpfer-Petersen E, Waberski D. Moderne Verfahren in der spermatologischen Diagnostik. *J Reproduktionsmed Endokrinol*. 2008;5(5):262–271.
- Petrunkina A, Harrison R. Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. *Reprod Domest Anim*. 2013;48(Suppl 1):11–14. DOI: 10.1111/rda.12202
- Pickett BW, Berndtson WE. Preservation of Bovine Spermatozoa by Freezing in Straws: A Review. *J Dairy Sci*. 1974;57(11):1287–1301. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(74)85058-7
- Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol*. 1995;260:406–417. DOI: 10.1016/0076-6879(95)60154-6
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*. 2003;60(8):1553–1568. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00171-7
- Robayo I, Montenegro V, Valdés C, Cox J. CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. *Reprod Domest Anim*. 2008;43(4):393–399. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2007.00920.x
- Senger PL, Becker WC, Davidge ST, Hillers JK, Reeves JJ. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *J Anim Sci*. 1988;66(11):3010–3016. DOI: 10.2527/jas1988.66113010x
- Stroud BK, inventor; Google Patents, assignee. Artificial breeding techniques for bovines including semen diluents and AI apparatus. United States Patent US 8,202,210. 2012 Jun 19.
- Stroud BK. A novel insemination system for superovulated beef donors. In: Canadian Embryo Transfer Association, American Embryo Transfer Association editors. 2015 CETA/ACTE & AETA Joint Convention; 15.–17.10.2015; Niagara Falls, Ontario, Canada. 2015. p. 41–66.
- Stroud BK, inventor; Google Patents, assignee. Artificial breeding techniques for bovines including semen diluents and AI apparatus. United States Patent US 9,433,484. 2016 Sep 6.
- Stroud BK, inventor; Google Patents, assignee. Method and apparatus to reduce the number of sperm used in artificial insemination of cattle. United States Patent US 9,554,883. 2017 Jan 31.

- Stroud BK, inventor; Google Patents, assignee. Method, apparatus and kit for artificial insemination of bovine. United States Patent US 10,610,343. 2020 Apr 7.
- Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Foote RH. Computer-Assisted Sperm Analysis for Assessing Initial Semen Quality and Changes During Storage at 5°C. *J Dairy Sci.* 1997;80(8):1606–1612. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76091-0
- Töpfer-Petersen E, Waberski D. Spermienreifung und Befruchtung. In: Busch W, Holzmann A, editors. *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren.* Stuttgart: Schattauer; 2001. p. 67–82.
- Töpfer-Petersen E. Spermienreifung, Transport und Befruchtung. In: Busch W, Waberski D, editors. *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren.* Stuttgart: Schattauer; 2007. p. 84–93.
- Verberckmoes S, Van Soom A, De Pauw I, Dewulf J, Vervaeke C, de Kruif A. Assessment of a new uterotubal junction insemination device in dairy cattle. *Theriogenology.* 2004;61(1):103–115. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00186-9
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, Thys M, de Kruif A. Low dose insemination in cattle with the Ghent device. *Theriogenology.* 2005;64(8):1716–1728. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.04.017
- Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P. Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. In: Hooper RM, editor. *Bovine Reproduction.* 2nd ed. Hoboken, USA: Wiley Blackwell; 2021. p. 1019–1031.
- Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci.* 2000;62(1-3):23–53. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00153-6
- Vishwanath R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology.* 2003;59(2):571–584. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)01241-4
- Waberski D, Petrunkina AM. Spermatologie. In: Busch W, Waberski D, editors. *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren.* Stuttgart: Schattauer; 2007. p. 99–118.
- Weitze KF. Prinzipien der Verdünnung und Konservierung. In: Busch W, Holzmann A, editors. *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren.* Stuttgart: Schattauer. 2001. p. 511–517.
- Weitze KF, Petrunkina AM. Samenkonservierung, biochemische Grundlagen und Prinzipien der Einfrier- und Auftautechniken. In: Busch W, Waberski D, editors. *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren.* Stuttgart: Schattauer. 2007. p. 119–131.
- Williams BL, Gwazdauskas FC, Whittier WD, Pearson RE, Nebel RL. Impact of site of inseminate deposition and environmental factors that influence reproduction of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1988;71(8):2278–2283. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79804-5

Please cite as:

Fuchs M, Reichenbach M, Zablotzki Y, Zerbe H, Otdorff C, Scherzer J. Einfluss von Puffermedien auf Spermaqualität und Fruchtbarkeit bei high-volume-Besamung beim Rind. *Wien Tierärztl Monat – Vet Med Austria.* 2023;110:Doc6. DOI:10.5680/wtrm000020
Copyright ©2023 Fuchs et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License. See license information at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>