

# **Kromatinstabilitet som grund för kvalitetsbedömning av hingstsperma**

**Linda Hammar**

**Huvudhandledare: Anne-Marie Dalin  
Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU**

---

**Sveriges lantbruksuniversitet**

**Examensarbete 2007:40**

**Fakulteten för veterinärmedicin och  
Husdjursvetenskap**

**ISSN: 1652-8697**

**Veterinärprogrammet Uppsala 2007**

## **INNEHÅLLSFÖRTECKNING**

<b>Sammanfattning.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>2</b>
<b>Inledning.....</b>	<b>3</b>
Seminverksamheten i Sverige.....	3
Fruksamhetsresultat med AI.....	3
Metoder för bedömning av spermakvalitet.....	4
Analys av kromatinstabilitet.....	5
Målsättning.....	5
<b>Material och metoder.....</b>	<b>6</b>
Kromatinstabilitetsanalys.....	7
Statistisk analys.....	7
Figur 1.....	8
<b>Resultat.....</b>	<b>9</b>
Tabell 1.....	9
Tabell 2.....	9
Tabell 3.....	10
Tabell 4.....	10
<b>Diskussion.....</b>	<b>11</b>
<b>Tack.....</b>	<b>13</b>
<b>Referenser.....</b>	<b>14</b>

## SAMMANFATTNING

Denna studie ingår i ett projekt som har som mål är att utvärdera och vidareutveckla metoder för kvalitetsbedömning av hingstsperma avsedd för semin. Studien har genomförts i samarbete mellan SLU och Flyinge AB. Syftet med studien var att undersöka

- om det finns individuella skillnader mellan hingstar vad gäller spermernas kromatinstabilitet
- om det finns korrelation mellan subjektivt bedömd spermimotoilitet och kromatinstabilitet hos spermier
- om kromatinstabilitet hos spermier förändras efter centrifugering genom single layer och gradient dvs använda kromatinanalys som ett mått på om selektionsmetoden fungerar

Under de senaste 10 åren har det skett en kraftig ökning av användningen av kyld transportsperma ffa inom svenskvarmblodsavel. Eftersom fölningsprocenten sjunkit i takt med att verksamheten med kyld sperma ökat är det av stort intresse att utveckla metoder för att kvalitetsbedöma hingstsperma. En bedömning av kromatinets kvalitet skulle kunna utgöra en kvalitetskontroll av hingstsperma för semin.

Kromatinet finns i spermiekärnan. Skador i kromatinet kan leda till en misslyckad befruktning då spermies kärna inte dekondenseras normalt och det befruktade ägget dör eller till en felaktig embryoutveckling.

Tio hingstar av halvblodsras stationerade i Flyinge i åldrarna 4-23 år ingick i studien. Hingstarna samlades på sperma vid 7 tillfällen under en period på 2 ½ vecka. För varje spermaejakulat togs prover för kromatinundersökning samt bedömdes motiliteten, både före centrifugering och efter centrifugering av ejakulaten genom två olika silikatsfärer, "Single layer" och "Gradient". Spermieproverna frystes omedelbart in med TNE buffert i flytande kväve och transporterades sedan till Uppsala där de analyserades med hjälp av flödescytometri. Resultaten presenterades som DFI (DNA Fragmentation Index) vilket är ett mått på hur stor andel av spermerna som har skadat DNA, angivet i procent, samt X-DFI (medelvärde för DFI) och SD-DFI (standardavvikelsen för DFI).

Resultaten i denna studie visade att selektionsmetoden var effektiv när det gällde att selektera bort spermier med skadat kromatin. Däremot skiljde sig inte de två selektionsmetoderna med gradient centrifugering och single layer centrifugering åt i effektivitet när de jämfördes med varandra. Resultaten visade också att det fanns en statistiskt signifikant skillnad i DFI mellan hingstar vad gäller kromatinstabilitet samt en negativ korrelation mellan DFI och motilitet. Ju lägre DFI (dvs låg andel spermier med skadat kromatin) desto högre motilitet.

## SUMMARY

This study is part of a project to evaluate and develop methods to control the semen quality in stallions. The study was carried out in cooperation between SLU and Flyinge AB. The objective of the study was to analyse

- if there are individual differences in sperm chromatin integrity between different stallions
- if there is a correlation between subjectively evaluated sperm motility and sperm chromatin integrity
- if sperm chromatin integrity is changed after selection of the semen with a centrifugation method through the silica-spheres, gradient or a single-layer, i.e. to use the chromatin integrity analysis as a method to evaluate the selection method.

The use of chilled transported semen has increased a lot during the last 10 years, especially among the Swedish warmblood breed. Because the foaling percentage has decreased with the increased use of chilled transported semen, there is a need to develop methods to control the sperm quality. Evaluation of the chromatin integrity could be one way to evaluate the quality of the semen.

Chromatin is the DNA in the nucleus of the sperm. If the chromatin is denatured it may lead to a failed fertilization or a disturbed development of the embryo or the placenta.

Ten stallions of Swedish Warmblood breed at the Flyinge National Stud with the age 4-23 years were used in the study. The stallion semen was collected at seven times during a period of 2 ½ weeks. From every ejaculate samples were taken both before and after centrifugation through either of two different silica-spheres, single-layer or gradient for chromatin analysis and evaluation of sperm motility. The samples were immediately frozen in TNE buffer and transported to Uppsala where they were analyzed with help of flow-cytometry. The results was presented as DFI (DNA Fragmentation Index) which measures the percentage of the sperms fragmented DNA, and also the mean DFI (X-DFI) and the standard deviation of DFI (SD-DFI).

The result showed that the method of sperm centrifugation was effective in the selection of sperms with damage chromatin integrity. There was no difference in effectiveness between the two different methods of centrifugation, single-layer and gradient.

The DNA Fragmentation Index (DFI) and the subjectively evaluated sperm motility was negative correlated. This means that the lower the DFI, the higher the motility. The result also showed that there was a statistical significant difference in DFI between stallions.

## INLEDNING

I Sverige används idag artificiell insemination (AI) i stor utsträckning inom aveln för varmlodiga travare och svenska halvblod samt de senaste åren även för svensk ridponny. Detta har medfört en utbredd seminverksamhet. Det finns många fördelar med AI t ex en minskad risk för skador i samband med betäckningen och minskad smittorisk. Dessutom kan ett enda ejakulat från en hingst fördelas på flera ston så att hingstar med goda arvsanlag kan utnyttjas i högre utsträckning än vid naturlig betäckning. Dessutom, om kyld sperma används behöver inte stona transporteras långa sträckor till hingsten. Tillgängligheten till hingstars sperma ökar för stoägarna liksom möjligheten till import av sperma. Eftersom spermernas motilitet bedöms före insemination medför detta att problem med spermakvaliteten också kan upptäckas.

### Seminverksamhet i Sverige

Hästseminverksamheten i Sverige regleras av Statens Jordbruksverks föreskrifter om seminverksamhet med hästdjur (1999:113, M4). I M4 står det i 2 § i de allmänna bestämmelserna att ”för att bedriva seminverksamhet krävs tillstånd av jordbruksverket. Tillståndet kan omfatta ett eller flera delmoment. Delmomenten är samling och behandling, lagring och distribution samt seminering.” År 2006 utfärdade SJV totalt 229 tillstånd att bedriva seminverksamhet i Sverige. Av dessa var det 87 stationer som hade tillstånd till spermasamling och övriga endast semin, dvs de var mottagarstationer av transportsperma. Motsvarande siffror år 2005 var totalt 206 seminstationer varav 79 hade tillstånd att samla sperma. Det är alltså på många seminstationer runt om i Sverige som sperma samlas och hanteras.

Sperman som insemineras kan vara färsk, kyld eller fryst (och sedan tinad). Fryst sperma kan förvaras under lång tid. Enligt ASVH inseminerades år 2005 89% av totalt 5057 betäckta varmlodiga ston och enligt STC inseminerades 93,3 % av totalt 4809 betäckta varmlodiga travst. Under de senaste 10 åren har det skett en kraftig ökning av användningen av kyld transportsperma, ffa inom varmlodsaveln. Inom denna ras skedde en ökning från 3,4 % år 1990 till 60 % år 2005.

Enligt SJV's författning är stoägare skyldiga att rapportera dräktighetsresultatet av genomförd seminering. Hingstägaren ska sedan göra en sammanställning av semineringarna på en så kallad språngrulla. Anordnare ska sedan rapportera antal semineringar och distribution av sperma. Med information från språngrullorna räknar sedan avelsorganisationerna ut fölningsprocent som ett mått på fruktsamheten.

### Fruksamhetsresultat med AI

Tyvärr har man sett en trend att fölningsprocenten har sjunkit i takt med att transportsperma har ökat i användning. Fölningsprocenten för både varmlodiga travare och övriga varmlod år 1995 var 71 %, år 2004 var den 63 % för varmlod (ASVH) och år 2003 68 % för varmlodiga travare (STC). Detta kan sannolikt bero på flera olika orsaker, tex bristande kunskap om spermahanteringens effekter på kvaliteten och enkel utrustning (tex frigitlådor som sperman skickas i). Distributionsrutinerna, begränsade till tre dagar per vecka (måndag, onsdag och fredag), medför att många ston inte blir inseminerade vid optimal tid. Transporttiden för kyld sperma bör vara så kort som möjligt, helst inom 12 timmar. En orsak som dock bedöms vara viktig är bristande möjligheter till bedömning om sperman duger till att kylas ned, eftersom det finns stora individuella skillnader mellan olika hingstar. Vissa hingstars sperma tål kylning sämre än andra hingstars sperma.

Hästaveln grundar sig på prestation där de individer som går i avel ffa selekteras på meriter inom respektive användningsområde (ridsport och trav) och inte efter fertilitet. Detta skiljer sig från den avel som bedrivs inom lantbrukets djur tex nöt och svin där selektionen av avelsdjur till stor del grundar sig på fertilitet.

Prestationsaveln medför att man inte avlar på spermakvalitet och därför kan det hända att vissa av de populära avelshingstarna har en sämre kvalitet på sperman vilken då inte lämpar sig för kylning eller frysning. Det förekommer dock att sådan sperma ändå transporteras och insemineras med nedsatt fruktsamhet som följd. Hantering av sperman samt kylning och frysning påverkar spermakvaliteten negativt och en från början dålig spermakvalitet blir ännu sämre vid kylning och frysning vilket ger sämre dräktighetsresultat och därmed bidrar till en försämrad fölningsprocent.

En studie (Dahlsten, 2006) visade att ett lämpligt mått för att bedöma enskilda hingstars fertilitet är dräktighet/brunst för den första seminerade brunsten. Totalt ingick 1540 ston i studien och det totala antalet brunster var 2197. Av dessa brunster användes färsk sperma i 22,3 % och kyld sperma i 77,7 %. För hingstarna var dräktighetsprocenten per brunst för AI (färsk sperma) i medeltal 65,6 % och för TAI (kyld transporterad sperma) 53,9% dvs signifikant lägre. Medeldräktigheten per brunst för båda teknikerna sammanräknade var 56,6% och medeldräktigheten per sto för säsongen var 80,6 %. Den separata redovisningen av AI med färsk eller kyld sperma ger en möjlighet att sälla ut de hingstar som har låg fertilitet vid kyld sperma, men som fungerar bra på färsk semin.

Förutom spermakvalitet kan flera olika faktorer påverka hingstars fertilitet, tex betäckningsförmåga, hur hingsten hålls och hanteras samt veneriska sjukdomar såsom Contagious Equine Metritis (CEM), Equine Viral Arteritis (EVA) samt patogenerna Pseudomonas Auruginosa och Klebsiella Pneumoniae (Couto et. al. 1993).

### **Metoder för bedömning av spermakvalité**

Spermakvaliteten hos hingstar utgörs av en kombination av kvantitativa och kvalitativa spermieparametrar, dvs koncentration, totalantal, spermimotoilitet samt spermiernas morfologi och livslängd. Det som idag används för bedömning av hingstesperma är omedelbar mätning av ejakulatvolym och spermiekoncentration (kvantitet) samt motilitetsbedömning (kvalitet) vilket är en subjektiv bedömningsform som görs i ljusmikroskop. Det finns även utrustning där man med datorns hjälp kan bestämma spermimotoiliteten, sk "Computer-Assisted Sperm Analyzers (CASA) (Dott & Foster, 1997, Quintero-Moreno et. al. 2003 ). Detta är inte en metod som används i praktiken ännu på seminestationer då utrustningen är dyr.

Eftersom fölningsprocenten sjunkit i takt med att verksamheten med kyld sperma ökat är det av stort intresse att utveckla metoder för att kvalitetsbedöma hingstesperma. Att bedöma kromatinets kvalitet skulle kunna utgöra en kvalitetskontroll av hingstesperma för semin.

Kromatinet finns i spermiekärnan och innehåller spermies DNA. Skador i kromatinet kan leda till en misslyckad befruktning (spermies kärna dekondenseras inte normalt och det befruktade ägget dör), eller en felaktig embryoutveckling (genomet är skadat och leder till letala rubbningar i det tidiga embryot eller till felaktigheter i bildandet av placentan).

Metoder har utvecklats för att bedöma kromatin i spermier. En metod är SCSA- "sperm chromatin structure assay" där man med hjälp av flödescytometri analyserar hur stor andel spermier i ett prov som har intakt kromatin. Studier har gjorts både på hingstesperma (Love,

2005) och andra djurslag tex nöt (Januskauskas et.al. 2001) och svin (De Ambrogi et al. 2006).

### **Analys av kromatinstabilitet**

SCSA-”sperm chromatin structure assay” mäter andelen spermier med skadat kromatin i ett prov. Spermierna behandlas i ett syrligt medium vilket exponerar DNAt och därefter färgas detta med ett flourescerande ämne, som flourescerar grönt om det är bundet till dubbelsträngat och därmed intakt DNA, och rött om det är bundet till enkelsträngat och därmed skadat DNA under mätning med hjälp av flödescytometri. Metoden som användes utvecklades först av Evenson et al. (1980), och har vidare beskrivits av Evenson & Jost (2000) och Januskauskas et al. (2001). Analyser med flödescytometri ger ett säkert mått på kromatinstabiliteten hos tusentals spermier på bara några minuter. Nackdelen med metoden är att den kräver en mkt dyrbar utrustning vilket begränsar dess användbarhet (Rodriguez-Martinez et.al. 1997).

Vid analys med SCSA flourescerar majoriteten av de normala spermierna (huvudpopulationen) vanligen grönt och bildar en eliptisk form till vänster i ett diagram. De spermier som flourescerar rött syns till höger om huvudpopulationen i diagrammet och dessa presenteras som procent av hela spermapopulationen. Tidigare angavs detta värde som andelen COMP  $\alpha$  (cells outside the main population) . Termen  $\alpha$  anger andelen denaturerad DNA i förhållande till den totala mängden DNA i spermiepopulationen. Resultatet av analysen för  $\alpha$  är beräknad för varje spermie i provet och därför presenteras resultatet som X-  $\alpha$  (medelvärde) och SD-  $\alpha$  (standardavvikelsen). COMP  $\alpha$  (cells outside the main population). har nyligen ändrats till DFI (DNA Fragmentation Index). Dessutom anger man X-DFI och SD-DFI.

DFI är alltså ett mått på hur stor andel av spermier som har skadat DNA, angivet i procent. De celler som hamnar utanför huvudpopulationen i diagrammet är DFI (se figur 1). Om dessa utgör en större mängd syns dessa celler som en liten ”kulle” till höger om huvud peaken i  $\alpha$  diagrammet (Evenson & Wixon, 2005).

### **Målsättning**

Detta EEF arbete är en del i ett projekt som genomförts i samarbete mellan SLU och Flyinge AB. Projektets övergripande mål är att utvärdera och vidareutveckla metodik för kvalitetsbedömning av hingstesperma avsedd för hästsemin och det innehåller flera delstudier. Den delstudie som detta EEF arbete ingår i, har som målsättning att utveckla och värdera en metodik för att selektera fram de bästa spermierna med hjälp av centrifugering av sperma genom olika täthetsgradienter av silantäckta silikatsfärer (Morrell et al 2004). Före och efter selektion undersöks spermernas koncentration och motilitet samt som en kvalitetsbedömning av spermierna en test av deras kromatinstabilitet.

Målsättningen med detta EEF arbete var att undersöka:

- om det finns individuella skillnader mellan hingstar vad gäller spermernas kromatinstabilitet
- om det finns en korrelation mellan subjektivt bedömd spermimotoilitet och spermiekromatinstabilitet
- om kromatinstabiliteten hos spermier förändras efter centrifugering genom single layer och gradient dvs använda kromatinstabilitetsanalysen som ett mått på hur selektionsmetoden fungerar

## MATERIAL OCH METODER

Det material som använts i studien var sperma från 10 varmblodshingstar i åldrarna 4-23år, godkända för avel. Dessa hingstar stod stationerade på Flyinges hingststation. Sperma samlades måndag, onsdag och fredag under treveckorsperioden 7-21 juni 2006 vid totalt 7 tillfällen. Sammanlagt var det 35 ejakulat som undersöktes, 4 ejakulat från 5 av hingstarna och 3 ejakulat från 5 hingstar. Ejakulaten kodades.

Metoden med centrifugering av hingstsperma (MacPherson et al., 2002, Morrell & Geraghty, 2006) liknar den som används vid fertilitetskliniker för humansperma (Morrell et al., 2004). Spermadoserna preparerades som "split-samples" för att samma sperma under olika förhållanden skulle kunna jämföras.

Spermans koncentration mättes på råsperma i en "spermacue". Därefter späddes sperman 1:1 med Kenny's medium och koncentrationen räknades manuellt i Bürkerkammare. Motiliteten bedömdes subjektivt i ljusmikroskop. Ett nollprov för kromatinanalys dvs före centrifugering togs ut genom att 500µl sperma och 500 µl TNE buffert (Triss Natrium EDTA) blandades i ett eppendorf rör som direkt frystes in i flytande kväve.

En täthetsgradient förbereddes (ett rör per spermieprov) genom att 2 ml av den högre täthetskolloiden överfördes med pipett som ett bottenlager i ett centrifugrör och sedan pipetterades försiktigt 2 ml av den lägre täthetskolloiden som ett lager ovanpå. 1,5 ml av det spädda ejakulatet (som innehöll ca 100 miljoner sperma per ml) pipetterades ovanpå gradienten. Gradienten centrifugerades sedan vid 300 g i 20 minuter. Därefter sögs sädesvätskan och det mesta av kolloiden bort. Den sperma "pellet" som blev kvar i centrifugröret överfördes till ett rent centrifugrör med 5 ml spädningssväska i, för att genom att centrifugera provet vid 500 g i 10 minuter, tvätta bort silikatpartiklar som kunde vara kvar. Efter tvättning, blandades spermorna med färsk spädningssväska (Kenny's) för koncentrationsbedömning i Bürkerkammare.

Single layer preparationen (ett rör per spermieprov) utfördes på samma sätt som gradientcentrifugeringen med 4 ml av den högre täthetskolloiden och ingen lägre kolloid använd.

Båda typerna av prov ("gradient" och "single layer") bedömdes subjektivt i ljusmikroskop och därefter togs 500 µl sperma från respektive prov och blandades med 500 µl TNE buffert i eppendorf rör för kromatinstabilitetsanalys. Proven märktes och frystes in i flytande kväve på samma sätt som den ocentrifugerade sperman.

Alla rören märktes med respektive hingsts kod, datum, före eller efter centrifugering (gradient eller single layer).

De frysta proverna förvarades under vistelsen i Flyinge samt under transporten till Uppsala i flytande kväve i en DRY SHIPPER termos. I Uppsala förvarades sedan proverna i -70 °C i en frys på inst. för kliniska vetenskaper vid SLU fram till att de skulle analyseras med hjälp av Flödescytometri vid inst. för anatomi och fysiologi vid SLU. Proven tinades upp på isbädd i rumstemperatur någon timma innan de skulle analyseras. Varje prov märktes med ett nummer.



### **Kromatinstabilitetsanalys**

20 µl av varje spermaprov blandades med 180 µl TNE buffert vilket gav en spädning 1:10. Därefter blandades denna spädning med 400 µl Triton Acid Detergent Solution vilket har ett pH 1,39 som sprängde cellmembranet på spermerna vilket ledde till att DNAt exponerades. Efter 30 sekunder tillfördes 1200 µl Acridin-orange till spädningen vilket färgade DNAt och därefter analyserades proverna med hjälp av flödescytometri. Analysen måste göras inom 3-5 minuter efter att Acridin-orange tillförts annars förstörs proverna. Flödescytometrianalysen utfördes av Anders Johannisson med hjälp av FACStar (PLUS) FCM (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) utrustad med standard optik.

Flödescytometri analysen visade hur stor andel av spermerna i provet som flourescerar grönt respektive rött. Datorn analyserade 10000 spermier ur varje prov. Resultaten presenterades som ett diagram med plottar där varje plott motsvarar en spermie och utifrån detta utvärderas hur stor andel av spermerna som hade ett intakt kromatin och därmed flourescerar grönt, respektive skadat kromatin och därmed flourescerar rött. Den röda flourescensen representerades på X-axeln och den gröna flourescensen representerades på Y-axeln i diagrammet (se fig 1).

I denna studie har tre parametrar använts som mått på kromatinstabilitet:

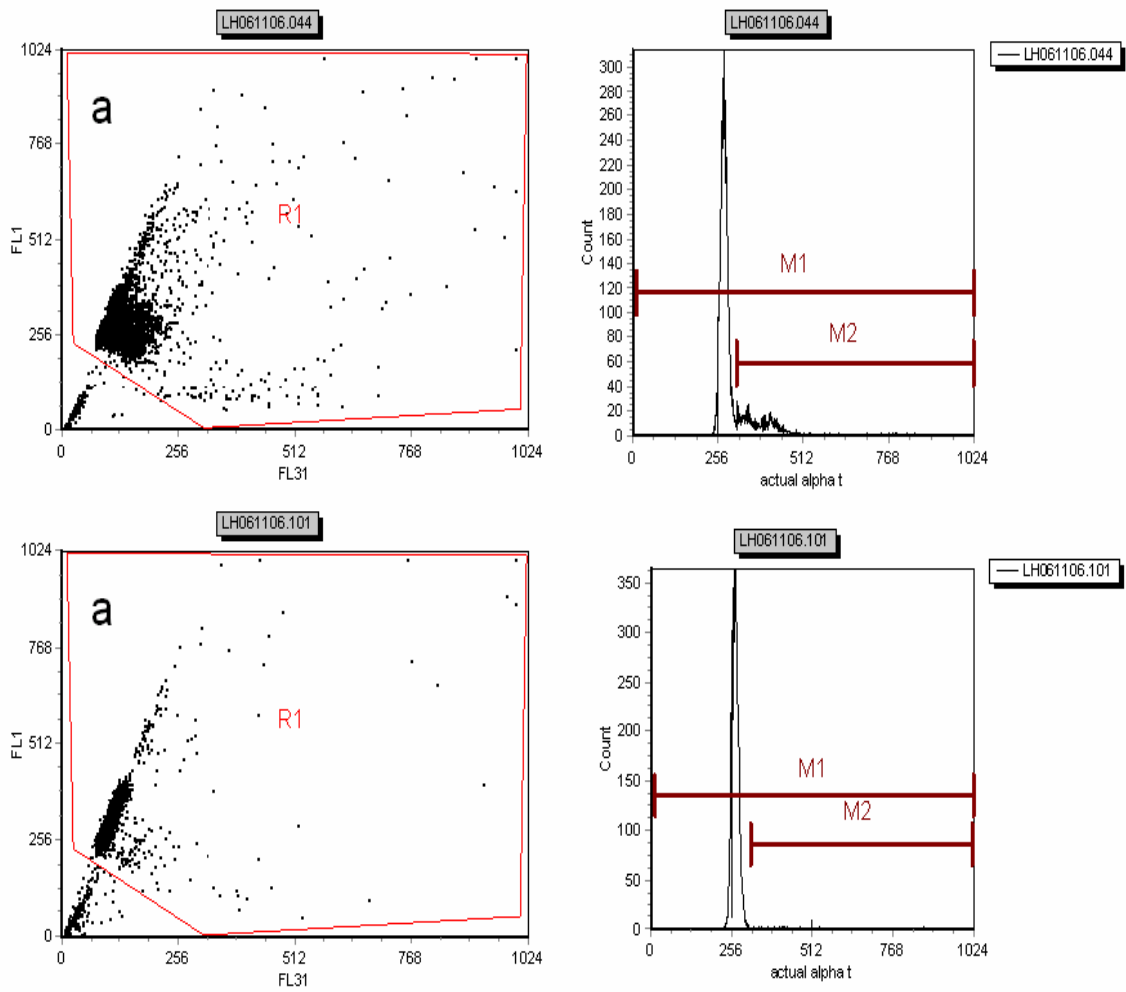
DFI = DNA Fragmentated Index

SD-DFI = Standardavvikelsen för DFI

X-DFI = Medelvärde för DFI

### **Statistisk analys**

Data från de olika parametrarna överfördes till Microsoft Excelfiler och sedan till Statistical Analysis Systems software Version 9 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) för variansanalys med hjälp av PROC MIXED. Den statistiska modellen inkluderade den fixa effekten av behandling (tre klasser; före centrifugering, efter single layer centrifugering, samt efter gradient centrifugering), samt de slumpmässiga effekterna av hingst samt samlingsdatum inom hingst. Variationen mellan hingstar analyserades med hjälp av variansanalys (PROC GLM) per behandling, där den statistiska modellen endast innehöll den fixa effekten av hingst. Därtill beräknades korrelation (Spearman rang-korrelation) per behandling mellan kromatinstabilitetsmått och spermans motilitet. Den statistiska analysen utfördes av docent Nils Lundeheim, inst. för husdjursgenetik.



Figur 1. Diagram som visar exempel på data från SCSA. Figur a i övre och undre raden visar plottar med grön (dubbelsträngat DNA) vs röd (enkelsträngat DNA) flourescens. Actual alpha t histogrammen till höger motsvarar plotten till vänster. Om DFI är högt bildas en liten "kulle" bestående av celler med fragmenterat DNA till höger om huvudpeaken i alpha t histogrammet (se övre raden).

## RESULTAT

Resultatet av kromatinstabilitetsanalysen sammanfattas av tabell 1 DFI, tabell 2 SD-DFI och tabell 3 X-DFI. Varje tabell anger medelvärdet före centrifugering samt efter gradientcentrifugering och single layer centrifugering. DFI, SD-DFI och X-DFI anges i %. Det första värdet är medelvärdet och värdena inom parenteserna lägsta och högsta värde för respektive mått.

Tabell 1. DFI värden före och efter centrifugering (gradient eller single layer)

Hingst (antal ejakulat)	DFI före centrifugering medelvärde och range	DFI Gradient centrifugering medelvärde och range	DFI Single layer centrifugering medelvärde och range
A (3)	5,35 (4,88-5,87)	1,63 (1,33-2,11)	3,11 (2,40-3,52)
F (4)	8,28 (4,78-12,47)	5,36 (1,96-10,00)	2,4 (1,71-4,14)
H (3)	17,90 (12,95-21,80)	4,61 (3,50-5,33)	7,19 (6,52-8,49)
K (4)	12,52 (10,22-16,37)	4,85 (2,56-8,50)	6,29 (2,44-15,46)
Q (3)	5,75 (5,05-7,02)	3,63 (1,85-4,81)	3,3 (1,54-5,31)
R (3)	8,37 (5,00-12,12)	4,66 (2,98-7,00)	5,52 (4,38-7,77)
T (4)	11,15 (5,79-18,33)	3,02 (2,06-4,04)	14,43 (4,00-43,09)
W (3)	13,94 (10,77-16,73)	4,26 (2,47-5,54)	4,30 (3,10-5,27)
Y (4)	12,56 (9,54-16,12)	5,19 (2,20-8,65)	5,32 (3,96-5,98)
Z (4)	11,45 (10,03-12,45)	7,34 (4,04-10,91)	3,87 (2,40-6,00)

Tabell 2. SD-DFI värden före och efter centrifugering (gradient eller single layer)

Hingst (antal ejakulat)	SD-DFI före centrifugering medelvärde och range	SD-DFI Gradient centrifugering medelvärde och range	SD-DFI Single layer centrifugering medelvärde och range
A (3)	47,74 (41,50-55,29)	29,18 (28,29-30,56)	37,46(33,05-41,89)
F (4)	48,60 (43,05-57,18)	44,33(30,19-52,85)	33,09(28,66-40,91)
H (3)	64,04 (54,03-69,92)	41,41(37,26-46,51)	47,64(40,04-53,20)
K (4)	58,69(54,80-63,95)	41,99(34,08-50,40)	41,37(30,06-57,25)
Q (3)	46,45(43,40-48,17)	38,76(28,16-45,15)	37,85(26,17-47,70)
R (3)	54,66 (48,76-61,40)	49,59(44,13-54,44)	53,73(51,02-55,80)
T (4)	75,09 (50,40-60,44)	35,25(29,79-38,38)	40,4(35,96-43,79)
W (3)	86,5 (72,25-98,89)	53,67(41,63-60,36)	53,87(49,20-56,20)
Y (4)	56,65 (52,69-62,12)	42,47(32,78-49,41)	49,77(40,31-59,47)
Z (4)	68,34 (63,68-72,63)	59,16(43,05-71,43)	40,16(31,02-53,87)

Tabell 3.X-DFI värden före och efter centrifugering (gradient eller single layer)

Hingst (antal ejakulat)	X-DFI före centrifugering medelvärde och range	X-DFI Gradient centrifugering medelvärde och range	X-DFI Single layer centrifugering medelvärde och range
A (3)	277,23(267,69-284,05)	260,22(243,99-269,82)	266,19(257,07-274,93)
F (4)	280,17(265,10-301,93)	274,45(259,56-283,57)	259,81(249,96-267,34)
H (3)	291,65(276,53-299,61)	261,27(253,40-268,42)	263,8(258,60-268,11)
K (4)	287,15(279,62-293,77)	268,45(263,00-272,42)	266,97(248,0-294,57)
Q (3)	282,6(279,28-287,81)	277,76(273,01-284,40)	277,24(269,04-287,56)
R (3)	283,57(277,82-291,84)	274,89(254,46-286,01)	275,99(270,89-278,62)
T (4)	287,02(273,63-299,63)	262,37(244,08-271,96)	258,15(252,82-263,07)
W (3)	302,49(293,35-319,54)	263,5(251,74-280,88)	262,98(247,81-275,74)
Y (4)	288,81(284,42-294,29)	275,54(253,03-288,25)	268,83(264,59-273,96)
Z (4)	297,94(287,58-310,85)	292,25(279,16-310,85)	269,81(258,98-277,91)

Tabell 4. Medelvärde samt variation (min och max) för respektive hingsts motilitet, före och efter centrifugering (gradient samt single layer)

Hingst (antal ejakulat)	Motilitet före centrifugering medelvärde och range	Motilitet Gradient centrifugering medelvärde och range	Motilitet Single layer centrifugering medelvärde och range
A (3)	86,6 % (85-90 %)	86,6 % (80-90 %)	83,3 % (75-90 %)
F (4)	72,5 % (70-75 %)	82,5 % (75-85%)	88,8 % (85-90 %)
H (3)	56,6 % (55-60 %)	65 % (50-80 %)	70 % (45-90 %)
K (4)	65 % (65-70 %)	67,5 % (60-75 %)	65 % (55-75 %)
Q (3)	73,3 % (65-80 %)	83,3 % (80-85 %)	75 % (65-85 %)
R (3)	65 % (60-70 %)	75 % (75 %)	83,3 % (75-95 %)
T (4)	81,3 % (75-90 %)	77,5 % (70-90 %)	81,3 % (70-90 %)
W (3)	63,3 % (55-75 %)	55 % (45-70 %)	— *
Y (4)	67,5 % (60-75 %)	75 % (50-90 %)	82,5 % (75-85 %)
Z (4)	72,5 % (70-75 %)	76,3 % (60-85 %)	80 % (70-90 %)

\* Provet inte medräknat pga fel i hanteringen.

Resultatet visade att det fanns en högre andel intakta spermier avseende kromatinstabiliteten efter båda centrifugeringsmetoderna (gradient och single layer) jämfört med den ocentrifugerade sperman (tabell 1 – 3). Den statistiska analysen av DFI, SD-DFI och X-DFI visade att det var skillnad i kromatinstabilitet efter centrifugering jämfört med före centrifugering ( $p < 0.0001$ ). Denna skillnad observerades för både single layer centrifugering och gradientcentrifugering. Det var dock ingen statistiskt säker skillnad i kromatinstabilitet vid jämförelse mellan de två centrifugeringsmetoderna.

Tabell 4 visar medelvärdet för spermimotilitet hos de olika hingstarna. Före behandling med centrifugering varierade motiliteten mellan 55-90%. Efter behandling var variationen i motilitet för gradient centrifugering 45-90% och för single layer centrifugering 45-95%. Det fanns en negativ korrelation mellan DFI och den subjektivt bedömda motiliteten för ejakulaten innan centrifugering, dvs att ejakulat med låg andel spermier med skadat kromatin hade en hög motilitet. Däremot fanns ingen korrelation (n.s.) mellan DFI, gradient

centrifugerad sperma och motilitet och inte heller för DFI ,single layer centrifugerad sperma och motilitet.

Det fanns en statistiskt signifikant skillnad mellan hingstar vad gäller kromatinstabilitet före centrifugering för DFI, SD-DFI och X-DFI men inte efter gradientcentrifugeringen (n.s) Efter single layer centrifugeringen fanns statistisk signifikant skillnad mellan hingstar för DFI och SD-DFI men ej för X-DFI.

## DISKUSSION

En av de stora fördelarna med semin är att ett enda ejakulat kan användas till flera ston så att hingstar med goda anlag kan utnyttjas i högre utsträckning jämfört med naturlig betäckning. En hingst kan under en säsong användas till ca 150-200 ston under förutsättning att han har god spermakvalitet. Det ställs högre krav på hingstens spermakvalitet vid insemination med kyld sperma än vid insemination med färsk sperma eller naturlig betäckning. Det beror på att spermakvaliteten påverkas negativt av nedkylning och förvaring. Det finns dock en variation mellan hingstar och därför är det viktigt att det finns fungerande kontrollmetoder för spermakvalitet.

Kromatinskador kan leda till att befruktningen misslyckas då spermies kärna inte dekonserveras normalt och det befruktade ägget dör eller till en felaktig embryoutveckling då genomet är skadat (letala rubbningar i den tidiga embryoutvecklingen eller felaktigheter i bildandet av placentan). Hos människa har fastställts ett samband mellan andelen spermier med förändrat kromatin och fertilitet. Om mer än 30 % av spermierna i ett humant spermprov har skador i kromatinet förväntas mannen ha låg fertilitet (Evenson & Jost 2000). Sambandet mellan kromatinstabilitet och fertilitet har även fastslagits inom flera djurslag inklusive häst. Love & Kenney (1998) visade att hingstar som hade en hög andel spermier med skadat kromatin också hade en lägre redovisad fertilitet i form av dräktighet/brunst. I denna studie fanns det en signifikant skillnad i spermie-kromatinstabiliteten mellan olika hingstar. Det hade därför varit intressant att också göra en jämförelse mellan kromatinstabiliteten och fruktsamheten för hingstarna. Detta är tyvärr inte gjort av tidsmässiga och praktiska skäl.

Hästaveln grundar sig på prestationsavel till skillnad från aveln på nöt och svin där fertiliteten är mycket viktig i selektionen av avelsdjur. Därför finns en större variation i spermakvalitet mellan hingstar än mellan galtar och tjurar som används i avel. Häst är dock unik ur ett diagnostiskt perspektiv eftersom individer med reducerad fertilitet inte tas ur avel utan tvärtom försöker man att underlätta för att maximera deras fertilitet (Love, 2005). Eventuellt skulle man kunna införa nationella regler om kvalitetsbedömning av hingstsperman innan den godkänns för avel med semin. Detta system finns redan i vissa länder t ex i Nederländerna, men inte i Sverige.

Enligt de statistiska resultaten i denna studie var selektionsmetoden effektiv när det gällde att selektera bort spermier med skadat kromatin. Dessutom fanns det ingen skillnad mellan de två selektionsmetoderna, gradient centrifugering och single layer centrifugering. Detta innebär att den enkla selektionsmetoden skulle kunna användas som en metod för att selektera fram en sperma med högre kromatinstabilitet vilket borde leda till en bättre fertilitet och därmed också

en högre fölningsprocent. Metoden måste dock utvärderas för större volymer av sperma för att den skall kunna användas i praktiken. Det skulle framförallt vara av intresse på så kallade problemhingstar som har en sämre spermakvalitet. Nackdelen är att man då i vissa fall skulle riskera att djur med ärftlig försämrad fertilitet används i avel.

I studier (Love, 2005) har man sett att spermier kan bibehålla normal motilitet och morfologi trots att de har kromatinskador, vilket sänker fertiliteten. Man har kommit fram till att olika delar av spermerna är olika känsliga för stress. Därför kan värdering av variabler som ej är motilitets- eller morfologiberoende vara av stort intresse. I denna studie fanns en negativ korrelation mellan motilitet och kromatinstabilitet, ju lägre motilitet desto högre DFI dvs högre andel spermier med skadat kromatin. Som nämnts ovan vore det intressant att jämföra kromatinstabiliteten och fruktsamheten för hingstarna och då även ta hänsyn till motilitet och morfologi.

Då kromatinstabilitetsanalysen med flödescytometri är en metod som bara utförs på vissa speciallaboratorier kan den inte användas rutinemässigt. Däremot skulle den kunna fungera bra som ett komplement i spermakvalitetsbedömningar t ex kan ett spermprov som frysts in direkt efter samling antingen som råsperma eller spädd sperma, skickas till laboratoriet för flödescytometrianalys av kromatinstabilitet. Då skulle ett spermprov kunna skickas på samma sätt som doserna normalt distribueras från stationen tex som kyld med vanlig postgång till laboratoriet för samma analys. Detta prov jämförs sedan med det prov som frystes in direkt efter samlingen. Om det skickade provet har hanterats korrekt skall det bara vara en liten eller ingen skillnad alls i kromatinkvalitet. Om en skillnad finns talar det i så fall starkt för att hanteringen av sperman inte varit optimal (Love,2005).

Man skulle även kunna använda sig av kromatinstabilitet som kvalitetskontroll av sperma i de fall man har hingstar som genomgått allvarlig sjukdom, medicinering eller på annat sätt kan tänkas ha drabbats av negativ påverkan på sin spermakvalitet.

I denna studie gjordes kromatinstabilitetsanalysen på färsk sperma men inte kyld pga begränsad tillgång på sperma. Det vore därför av intresse att fortsätta projektet med att jämföra kromatinstabilitet i färsk jämfört med kyld sperma.

## **Tack**

Ett stort tack till Flyinges personal för ett vänligt bemötande och stor hjälpsamhet, Ni gjorde att vi kände oss välkomna under våra veckor på Flyinge hingststation. Ett särskilt tack till Thomas Sandebert för handledning på hästkliniken och inom seminverksamheten på Flyinge.

Ett stort tack till min handledare Anne-Marie Dalin för en engagerad insats och goda synpunkter.

Ett stort tack till mina biträdande handledare Anders Johannisson, Jane Morrell och Heriberto Rodriguez-Martinez som bidragit med sitt kunnande.

Ett stort tack till Nils Lundeheim som hjälpt mig med statistiken.

Ett stort tack till personalen, Annika Rikberg och Karin Selin-Wretling på spermalaboratoriet, inst. för kliniska vetenskaper, avd. för reproduktion, SLU.

Sist men inte minst ett stort tack till min kursare Jessica Petterson som förgyllde tillvaron i Flyinge.

## REFERENSER

- Dahlsten, A. (2006) Fertilitet hos svenska halvblodshingstar betäckningssäsongen 2004 - en pilotstudie. Examensarbete vid fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, SLU, veterinärprogrammet, sidor 1-25.
- Couto, M.A. & Hughes, J.P. (1993). Sexually transmitted (veneral) diseases of horses. In *Equine Reproduction*, ed. Mc Kinnon, A.O. & Voss, J.L. Lea & Febiger, Philadelphia, s. 845-854.
- De Ambrogi, M., Bellester, J. , Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M., Rodriguez-Martinez, H. (2006). Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International journal of andrology* ISSN 0105-6263, s. 1-10
- Dott, H.M. & Foster, G.C. (1997). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *J Reproduction Fertil*; 55:161-166.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z. & Melamed, M.R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210. s 1131-1133
- Evenson, D.P. & Jost, L.K. (2000). Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. In: *Current Protocols in Cytometry*, vol. 1 (ed. P. Robinson), unit 7.31.1 to 7.13.28. Wiley, New York, NY, s.169-189
- Evenson, D.P. & Wixon, R. (2005). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979-991
- Januskauskas, A, Johannisson, A. & Rodriguez-Martinez, H. (2001). Assesment of sperm characteristics quality through flourometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55. s. 948-961
- Love, C.C. & Kenney, R.M., (1998). The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 57 s. 955-972
- Love, C.C. (2005). The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. In: *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Stallion Reproduction*. Elsevier B.V., s 39-45
- Macpherson, M., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, S.P., Thompson, J.A. & Varner, D.D. (2002). Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology* 58, 317-320.
- Morrell, J.M., O. Moffatt, D. Sakkas, G.C. Manicardi, D. Bizzaro, M. Tomlinson, H. Nilsson & P.V. Holmes, (2004). Reduced senescence and retained nuclear DNA integrity in human spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *J. Assist. Reprod Genetics.*, 21, 217-222.



Morrell, J.M. (2006). Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Dom Anim.* 40, 1-5

Morrell, J.M. & Geraghty, R.J. (2006). Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Veterinary Journal* 38, 224-229.

Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Pertoft, H. (1997) Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* 9., s 298-307

Quintero-Moreno, A., Mirò, J. Teresa Rigau, A. , Rodriguez-Gil, J.E. (2003) Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59 1973-1990.