

Utvärdering av förbättrad metod för objektiv kvalitetsbedömning av spermimotoilitet hos hingst

Jessica Petterson

**Handledare: Heriberto Rodriguez- Martinez
Inst. för Kliniska Vetenskaper; SLU
Biträdande handledare: Jane Morrell
Inst. för Kliniska Vetenskaper; SLU**

Inledning	1
Material och metoder	2
Djurmaterial	2
Hantering av sperma	2
Bedömning av motilitet	3
Experimentell design	3
Statistik analys	4
Resultat	5
Spermiekoncentration; tabell 1	5
Spermiemotilitet; tabell 2	6
Diskussion	7
Sammanfattning	9
Referenser	10
Acknowledgments	11

Utvärdering av förbättrad metod för objektiv kvalitetsbedömning av spermimotoilitet hos hingst

Introduktion

Utvalda avelshingstar blir framförallt selekterade på prestations- och exteriöra meriter. Detta har lett till att hästaveln ligger efter övriga djurslag, som nöt, vad gäller kraven på att uppnå goda dräktighetsresultat. Att en individ inte har fullgod förmåga att få ston dräktiga anses idag inte som en komplett anledning att utesluta denne ur aveln. Istället leder detta ofta till fler betäckningar/insemineringar än nödvändigt och- eventuellt- en försämrad dräktighetsprocent. Avkommer till hingstar med sämre fertilitet kan även föra dessa gener vidare, ett icke önskat resultat. Om man kunde få fram en billig och fungerande metod för kvalitetsbedömning av sperma hos hingst som lätt kan användas på stationer runt om i landet skulle detta löna sig både ekonomiskt och kvalitetsmässigt.

I dagens hästavelsarbete använder man sig främst av framförallt subjektiva bedömningar när det gäller hingstpermier och dess kvalitet. De flesta undersökningar av ejakulat baseras på manuella metoder, som granskning av spermier i mikroskop utrustat med speciella visuella hjälpmedel. De parametrar som undersöks är framförallt motiliteten, men även koncentration och morfologi har en stor betydelse. Ett problem som uppstår är skillnaden mellan olika bedömare- upp till 60 % i variation i resultat har noterats vid undersökning av samma ejakulat (1).

För att mer exakt kunna fastställa kvaliteten hos hingstarnas spermier behövs det fler pålitliga objektiva metoder. Det som i flera år har funnits och som till stor del har använts inom bland annat humanmedicinen är CASA, Computer- Assisted Semen Analyzers. Denna metod utarbetades först av Dott och Foster- detta för ett tjugotal år sedan (2). Utvecklingen har gått framåt och används främst på humana fertilitetskliniker, men även en viss del inom veterinär andrologi. Man har använt det på tjur, hund, hingst och laboratoriedjur, då mest i forskningssyfte. Utvecklingen inom det kliniska veterinära området har fått fart först de senare åren. Dessvärre finns det få undersökningar gjorda gällande hingstosperma och CASA.

CASA- instrumenten är från början utvecklade för att ge en objektiv bedömning av kvaliteten på sperma. De kan mäta en större andel spermier än det antal som man kan bedöma okulärt. Detta innebär att man nu kan kontrollera cirka 100- 150 spermier per prov, vilket naturligtvis innebär en begränsning med tanke på det antal spermier som förekommer i ett ejakulat, det vill säga flera miljarder. CASA- instrumenten fotograferar spermier i rörelse- men som nämnts ovan har de tidigare haft en begränsning i antalet analyserade celler samt att de fotograferar även orörliga sådana.

Alternativa metoder har tagits fram, som QualispermTM (Biophos AG, Switzerland) där mjukvara räknar algoritmer av partikel koncentrationen och den relativa motiliteten, för att därefter klassa resultaten i olika subpopulationer av spermier. Dessa subpopulationer har karaktäristiskt skilda motilitetsmönster, vilket borde kunna avslöja intressanta data om deras befruktningsskicklighet (3).

Ytterligare skillnad mellan tidigare CASA- system och Qualisperm™ är att CASA fotograferar och analyserar egenskaper hos den enskilda spermien medan Qualisperm™ tar bilder på olika fält. Därefter räknar den variationen i pixlar. Metoden fotograferar upp till 50 fält per gång under fyra sekunder, vilket ger ett högre antal analyserade spermier. Detta torde leda till en högre precision i mätningarna.

Systemen innebär givetvis inte bara fördelar- mjukvaran måste programmeras noggrant så att den kan appliceras på djurslaget i fråga- dessutom skall den vara utprovad och standardiserad för flera olika djurslag för att man skall veta att resultaten är korrekta. Övriga nackdelar med utrustningen är att den är kostsam och kräver träning av användaren. Dessutom behövs för vissa parametrar en jämförelse med manuella metoder, exempelvis koncentrationsbestämning i Bürkerkammare, för att få pålitliga resultat (1). Den största nackdelen är att antalet spermier som undersöks (räknas) är ganska begränsad. En tio- eller hundratal större andel behövs för att kunna ha en mer rättvis bild av hela spermiepopulationen.

Att kunna få fram en metod som kan användas på hingst- och seminestationer runt om i landet skulle innebära ett stort framsteg för kvalitetssäkringen inom hästaveln. Syftet med detta försök var att se om Qualisperm kan fylla en funktion som skulle vara till stor hjälp för att analysera hingstesperma på ett ganska enkel och snabbt sätt, ungefär lika snabbt som subjektiv bedömning av spermierörlighet. Avsikten var att kunna kvalitetssäkra motilitetsbedömningen.

Material och metoder

Djurmaterial

Hingstarna (n= 10) som användes i studien var alla av halvblodstyp och mellan 4 och 23 år. Sperman användes på Flyinge hingststation under juni 2006. Sperma samlades via en artificiell vagina. Hingstarna samlades i genomsnitt varannan dag. Totalt analyserades 30 ejakulat.

Hantering av sperma

Den färska sperman späddes med Kenney´s lösning tillverkad på Flyinge hingststation. Denna består av 5,9 g glukos, 2, 4 g mjölkpulver, 0, 15g penicillin, 0, 15 g dihydrostreptomycin samt 100 ml vatten för 1 l färdigt medium. Ett fåtal av ejakulaten späddes med äggulebaserad lösning, så kallad Nørlunds lösning. Denna lösning beställdes enligt utsago frusen i burkar direkt från Nørlunds Equine Hospital, Rue de Lund, 8653 Them, Danmark. Skillnaden skulle enligt användarna endast ligga i att den var äggulebaserad istället för mjölkpulverbaserad.



Bedömning av motilitet

”QualispermTM”, (Biophos AG, Switzerland) som använts i detta försök, använder en ny mjukvara som inte baseras på identifikation av spermernas rörelsebanor. Programmet delar upp det mikroskopoptiska fältet (frames) i rutor och identifierar alla spermier inom rutorna medan den även räknar de spermier som rör sig till andra rutor i fältet. Den procentuella motiliteten och även hastigheten på spermier kalkyleras utifrån denna nya metod. Ramarna fotograferas/filmas av en avancerad digital höghastighets- och högupplösnings- videokamera (Photonfocus). Denna arbetar med 50 ramar per sekund, vilket är en större kapacitet än vad tidigare CASA- system har haft. Detta verkar ske utan att kvaliteten undermineras (4). Arealen på det våta utstryk som skall fotograferas är stor, och tiden för fotograferingen/inspelningen har utökats till fyra sekunder- vilket ger en ökad mängd spermier per undersökning samt torde leda till en ökad precision på mätningarna (1).

Experimentell design

Ejakulaten förvarades i värmeskåp som höll 37°C. Ett prov från ejakulatet späddes (1:2) med Kenney’s eller Nørlunds medium. En droppe a`5 µL lades i en Maklerkammare. Kammaren var föruppvärmd till 37°C- denna temperatur hölls under alla mätningar. Spermierörelserna observerades i ett fas- kontrast system i ett Nikon E200 mikroskop (Tokyo, Japan) i 100x förstoring försett med värmeplatta och filmades/ fotograferades i en sektor vid ett värde av 50 frames per sekund (totalt 200 frames) med hjälp av en MV- D640- 48- U2- 10 Photon Focus Camera (Photon Focus, AG, Lachen, Switzerland). Koncentrationen, den procentuella spermimotiliteten samt hastigheten på spermier analyserades. Analyserna utfördes två gånger före centrifugering och en gång efter. Alla prover hanterades på samma sätt och under samma omständigheter. Motilitetsresultaten var alla uttryckta i procent.

Statistisk analys

Den statistiska analysen utfördes med hjälp av SAS (Statistical Analysis Systems package, version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA, 1989). Medelvärde och variationskoefficient räknades ut för CASA- parametrar, subjektiv bedömning av motilitet samt koncentrationsberäkning utförd i Bürkerkammare. Överensstämmelsen av resultat kontrollerades av Shapiro-Wilk test, och om inte resultaten distribuerades normalt utsattes de för en Willcoxon-test för att uppskatta differensen av medelvärdena. Distribuerades värdena på ett normalt sätt utfördes ett Student T- test för att kontrollera differensen av dessa. Korrelationer mellan olika metoder av motilitetsmätning och mellan tekniker kalkylerades med hjälp av Spearman (CORR Procedure). För alla differenser sattes en signifikansnivå på $<0,05$.



Resultat

Spermiekoncentration

Medelvärdet på koncentrationerna varierade mellan 60 och 178, 67 miljoner spermier/ml, totalt medelvärde var 125, 93. Koncentrationen räknades i Burker och med hjälp av Spermacue. Standardavvikelsen låg mellan 20.30 och 72.35 %. Resultaten av korrelationen mellan subjektiv- och CASA- bedömning (Spearman Rank Coefficient) före behandling med gradient och single layer var 0, 22; efter gradient 0, 43 samt efter single layer 0, 15.

Tabell 1) Standardavvikelse (%) och medelvärde (%) av spermiekoncentration.

Hingstkod	Prov	a1	a2	a3	b1	b2	c1	c2
A	Average	145.00	72.50	10.52	58.00	18.67	32.33	42.33
	SD	55,64	27.83	9.92	31.05	4.16	19.01	26.72
K	Average	108.33	54.17	19.53	47.67	29.67	31.33	52.67
	SD	50.58	25.30	11.24	12.06	13.65	5.03	38.74
F	Average	109.67	54.83	20.50	32.67	20.83	41.00	18.27
	SD	72.35	36.17	5.77	19.35	9.93	31.32	8.61
Y	Average	178.67	89.33	24.50	35.00	15.67	34.67	26.33
	SD	63.77	31.88	8.50	5.00	2.52	24.42	19.86
H	Average	139.33	69.67	11.95	16.33	18.33	17.67	13.67
	SD	45.62	22.81	6.55	7.02	11.84	4.04	4.62
T	Average	139.33	69.67	46.33	58.33	38.67	40.00	40.67
	SD	41.67	20.84	11.09	39.46	16.04	12.49	17.10
Q	Average	135.67	67.83	22.82	39.33	15.00	33.33	22.33
	SD	38.53	19.26	13.50	35.23	3.61	26.16	4.51
Z	Average	151.33	75.67	32.17	51.00	20.27	37.33	30.00
	SD	66.42	33.21	12.17	14.52	16.19	12.86	15.88
R	Average	60.00	30.00	11.55	42.33	21.33	27.00	25.67
	SD	20.30	10.15	0.53	20.23	15.31	12.49	19.40
W	Average	92.00	46.00	17.83	35.33	12.67	26.67	8.47
	SD	21.93	10.97	2.57	12.86	4.73	13.65	2.34
Average %		125.93	62.97 ^a	21.77 ^b	41.60 ^a	21.11 ^b	32.13 ^a	28.04 ^b
Average SD		54.62	18.40	7.19	20.71	9.96	16.29	10.53
Average; miljoner spermier/ml SD; Standardavvikelse; %								
a1= Burker före behandling			b1= Burker efter gradient			c1= Burker efter singlelayer		
a2= Provets koncentration			b2= Qualisperm efter gradient			c2= Qualisperm efter SL		
a3= Qualisperm före behandling								
Gråfärgning= Ingen skillnad mellan mätresultaten.								
Vita fält= Signifikant skillnad förelåg mellan mätresultaten (P< 0, 05).								

Spermiemotilitet

Spermiemotilitetens medelvärde varierade mellan 56.73 och 69.77%. Standardavvikelsen visade på värden mellan 8.46 och 22,14 %. Signifikanta skillnader sågs i jämförelsen subjektiv- objektiv bedömning ($P < 0,05$), vilket kan innebära att den objektiva bedömningen överensstämmer mer med än den subjektiva gör, då bedömaren av den subjektiva delen lätt påverkas av olika faktorer.

Tabell 2) Standardavvikelse (%) och medelvärde (%) av spermiemotilitet.

Hingstkod		a1	a2	b1	b2	c1	c2
A	Mean	83.33	51.83	78.33	67.67	75.00	73.33
	SD	7.22	6.71	12.58	10.12	15.00	14.57
K	Mean	62.50	65.00	70.00	48.33	68.33	35.33
	SD	2.50	16.89	5.01	15.69	7.64	28.57
F	Mean	70.00	58.83	81.67	65.67	88.33	70.67
	SD	4.33	14.75	5.77	10.01	2.89	5.51
Y	Mean	65.00	53.50	65.00	52.33	81.67	67.67
	SD	2.50	13.61	13.23	16.92	5.77	15.14
H	Mean	55.83	45.50	65.00	24.33	70.00	55.33
	SD	3.82	6.08	15.00	17.67	22.91	0.58
T	Mean	77.50	54.50	68.33	78.00	70.00	74.67
	SD	6.61	22.09	7.64	12.49	5.00	7.24
Q	Mean	65.83	56.67	81.67	44.33	73.33	44.67
	SD	15.07	12.79	2.88	23.46	7.63	32.56
Z	Mean	61.67	70.33	73.33	69.33	56.00	69.00
	SD	18.93	7.00	16.07	4.04	42.76	5.57
R	Mean	63.33	62.00	80.00	71.33	81.67	77.33
	SD	3.82	2.78	8.66	7.23	7.64	13.58
W	Mean	63.33	51.00	55.00	46.00	33.33	16.33
	SD	10.41	11.26	13.23	7.55	30.55	7.37
Mean Average		66.83 ^a	56.92 ^b	71.83 ^a	56.73 ^b	69.77 ^a	58.43 ^b
SD		12.06	8.46	10.21	10.57	22.14	14.77
<p>SD(standardavvikelse), average= % a1= subjektiv bedömning före behandling b1= Subjektiv gradient a2= Qualisperm före behandling b2= Qualisperm gradient c1= Subjektiv single layer c2= Qualisperm single layer</p> <p>Signifikanta skillnader återfanns i alla mätresultat rörande subjektivt versus Qualisperm ($P < 0,05$).</p>							

Korrelationen mellan subjektiv bedömning och CASA- mätningar (Spearman Rank Correlation Coefficient) före behandling med gradient och single layer blev $-0,154$. Efter behandling med gradient blev resultatet $0,281$ samt avslutningsvis efter single layer $0,40$.



Diskussion

I försöket har vi sett att Qualisperm har vissa fördelar gentemot den subjektiva bedömningen. Den blir inte påverkad av olika faktorer som är fallet med den subjektive bedömaren- man känner till hingsten sedan tidigare, har sett tidigare ejakulat och så vidare. (5). De värden som den objektiva bedömningen presterat överensstämmer bättre med verkligheten än den subjektiva i försöket vad gäller motilitetsmätningarna. Nämnas bör att alla prover hanterats med extra omsorg under arbetet, det kan ju tänkas att vardagshantering av ejakulaten inte alltid kommer att vidhålla exakt samma rutiner och betingelser- detta kan ge ett mindre bra resultat från Qualisperm.

..
Hingstarna varierar enormt mycket i spermakvalitet, både sinsemellan och individuellt. Många försök har gjorts att hitta en standardiserad metod för att fastställa fruktsamheten men ingen har riktigt lyckats på grund av denna enorma variation (6). Det är därför mycket intressant att ha tillgång till denna teknik- som nämnts ovan påverkas man som subjektiv bedömare mycket lätt av det faktum att man känner till hingsten och dess ejakulat, baserat på tidigare resultat är det lätt att man undermedvetet modulerar motilitetsprocenten uppåt eller nedåt beroende på tidigare siffror från ejakulat från samma hingst.

Att CASA- metodiken utvecklats i positiv riktning är det inte någon tvekan om. Dock föreligger fortfarande brister hos QualispermTM, till exempel oförmågan att inte kunna känna igen flera på varandra följande mätningar av samma prov, som de äldre CASA- systemen (exempelvis SM- CASA) gör.

Ytterligare nackdelar som nämnts tidigare i försöket är att det är en förhållandevis dyr metod, vilket betyder att det krävs ett stort engagemang och intresse från hingststationens sida för att motivera sig att införskaffa Qualisperm. Dessutom är det ett måste med ordentlig utbildning och träning av användaren- annars kommer systemet inte till sin rätt. Risken är då att man lätt återgår till den gamla, subjektiva metoden.

Är hästaveln intresserad av utveckling? Svar ja- den seriöse hingsthållaren/seminstationen och de flesta stoägare borde inse att detta är en stor möjlighet till förbättring av genetiken på hästsidan. Förvisso föreligger det inga vetenskapliga bevis på sambandet prestation-spermakvalitet; då hästaveln idag är till fullo inriktat på prestation (med undantag för vissa raser) så kan det vara så att en viss tröghet kan finnas att vilja engagera sig i spermiekvaliteten. Det kan också ha betydelse att sambandet motilitet-fruktsamhet är signifikant men inte helt bevisat. På nötsidan föreligger tveksamhet framförallt vid motilitetsstal runt 50 % eller mer. Inom vissa populationer av nötkreatur har man heller inte funnit något samband alls (7). Det finns dock andra undersökningar inom nötområdet som tyder på ett signifikant samband mellan motilitetsgrad och fruktsamhet, resultaten fastställdes då genom jämförelser subjektivt-CASA (1, 8).

Hingstfertilitet är svår att mäta på grund av att den påverkas kraftigt av mer än just egna parametrar- en stor del av dräktighetsantalen beror på stomaterialet och dess kvaliteter (9).

Slutligen blir det så en avkomma från den superba hingsten med enormt scoop men med usel spermimotilitet- då blir denna avkomma hett eftertraktad på marknaden och får automatiskt ett högt avelsvärde. Stoägaren går back ekonomiskt på grund av upprepade inseminationer/betäckningar och så gör även hingstägaren- hingsten får dåligt rykte och utsätts för ett högre slitage samt att kompensationer för uteblivna dräktigheter inte leder till någon lönsamhet. Stoet löper högre risk att få infektioner och därmed försämras dräktighetsprocenten ytterligare. Avkomman går sedan (förmodligen med en viss möda) vidare inom aveln om den presterar bra inom sin gren och sprider på så sätt sina gener vidare i populationen, med risk för spridning av dålig reproduktionskapacitet. I tjurvärlden hade detta inte fått förekomma, där selekterar man sina avelstjurar noggrant med avseende på både exteriör, temperament, funktionalitet och dessutom reproduktionsförmåga (10). Även här använder man CASA-metoder, dock med vissa restriktioner- det har tidigare föreslagits att man endast skall använda CASA för värdering av kinetiken hos spermier- det vill säga motilitetsgrad och rörelsemönster- detta på grund av att tidigare exemplar av systemen har gett vissa felmätningar gällande koncentration och antalet spermier med ett visst rörelsemönster, så kallade subpopulationer (1, 5, 11).

Om hästaveln accepterar och visar intresse för denna utveckling av motilitetsbedömning så har den kommit ett stort stycke på vägen. Qualisperm skulle, om man ser på resultat från denna undersökning, visa sig kunna vara ett lämpligt instrument att använda i detta syfte. Möjligen krävs det fler utvärderingar av systemen i sammanhanget, men dessa resultat visar på en positiv utveckling inte bara i korrekthet i mätningar utan även i användarvänlighet.

Tidigare försök med CASA i samband med hingstpermier har gett resultat som inte haft någon statistisk förankring- därför har användningen av CASA inte blivit vanlig i det praktiska arbetet. Eftersom man då inte kunde fastställa sub-populationer av spermier på ett bra sätt fick systemen ingen förankring i verkligheten. Med de nyare CASA- metoderna, som exempelvis Qualisperm som använts i detta försök, är det möjligt att fastställa subpopulationerna- i en studie har man dragit slutsatsen att de flesta befruktning dugliga spermier i ett ejakulat tillhör sub-population 1. Kan man fastställa och spåra dessa spermiers karakteristiska rörelsemönster och övriga egenskaper kan systemet få en stor betydelse för analysmöjligheterna av hingstperma (3). Detta kan på sikt leda till ekonomiska framsteg samt naturligtvis en bättre avelsbas inom hästaveln.

Sammanfattning

I försöket utvärderades en möjlighet att med hjälp av Qualisperm™ få en fungerande objektiv metod för att bedöma motilitet hos hingstesperma. Ejakulatprover analyserades före och efter centrifugering av spermier. Motilitet och koncentration beräknades och analyserades statistisk. Jämförelser gjordes hela tiden parallellt med subjektiv bedömning.

Qualisperms fördelar gentemot sina äldre föregångare inom CASA- familjen är att den kan bedöma ett högre antal spermier samt klassa dessa i olika subpopulationer som i sig har olika egenskaper som avgör deras befruktningskapacitet.

Resultaten visade att den objektiva metoden mycket väl skulle kunna användas praktiskt med tanke på de resultat som uppvisades i försöket. Dock föreligger fortfarande vissa nackdelar så som kostnad av apparaturen men även rätt träning av användaren för att metoden skall komma till sin rätt.

Kan man i ytterligare försök och studier få relevanta statistiska resultat som bevisar nyttan av att använda Qualisperm istället för subjektiva bedömningar, så har man skaffat sig ett pålitligt instrument som kan assistera i försöken att få en bättre grund för hästaveln i Sverige, både kvalitets- och ekonomimässigt.

In this trial we used Qualisperm™ as an objective method of measuring stallion semen. Samples of semen were analyzed before and after centrifugation. Motility and concentration were statistically analyzed. During the trial all the objective measurements were compared to a subjective method.

The advantages of Qualisperm™ compared to older CASA- systems is it's ability of measuring a greater amount of spermatozoa while it also grades them into different subpopulations. These subpopulations have different qualities that decides their capacity of fertilization.

The results showed that this objective method might be used practically. Although, there are still some disadvantages, such as high costs and the necessity of accurate training of the handler.

If it's possible to prove further relevant results that also are statistically correct, this could prove the usefulness of Qualisperm™ as an objective measurement method in the daily work at gestuts and stallion stations, thus giving the staff a reliable instrument in assisting the work for an improved horse breeding in Sweden, improving both in quality and economically..



Referenser

- 1) J. Verstegen, M Iguer- Ouada, and K. Onclin. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149- 179, 2002.
- 2) Dott HM, Foster GC. 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* 1979; 55:161- 166.
- 3) A. Quintero- Moreno, J. Mirò, A. Teresa Rigau, J.E. Rodriguez- Gil. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59 (2003) 1973- 1990.
- 4) Owen DH, Katz DF, 1993: Sampling factor influencing accuracy of sperm kinematic analysis. *J Androl* 14, 210-221.
- 5) L. Malmgren. Assessing the quality of raw semen; a review. *Theriogenology* 48:523-530, 1997.
- 6) K. Merckies, T. Chenier, C. Plante och M.M Buhr. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology* 54:1215-1224, 2000.
- 7) H. Rodriguez- Martinez; 2000: Evaluation of Frozen Semen: Traditional and New Approaches. *IVIS; Topics in Bull Fertility*, Chenoweth P.J. (Ed.).
- 8) A. Januskauskas, A. Johannisson, H. Rodriguez- Martinez. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen- thawed semen from swedish AI bulls. *Theriogenology* 55:947-961, 2001.
- 9) B. Colenbrander, BM Gadella and TAE Stout. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod. Dom. Animals* **38**, 305-311 (2003).
- 10) Einarsson Stig et al; Nötkreaturens reproduktion. Institutionen för obstetrik och gynekologi, Veterinärmedicinska fakulteten, SLU, 12;2- 5 (reviderat 2004).
- 11) H. Rodriguez- Martinez, B. Larsson and H. Pertoft. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean- up. *Reprod. Fert. Dev.*, 1997, **9**, 297- 308.

Acknowledgments

Jag vill rikta ett stort tack till Flyinge hingstdepå och veterinärklinik med personal för ett mycket gott samarbete och stor hjälpsamhet under insamlandet av material till studien. Alla var väldigt tillmötesgående och gjorde vår vistelse i Flyinge mycket trevlig och lärorik.

Tack Jane Morrell för vänligt och kunnigt stöd och hjälp under arbetets gång, och tack till Linda Hammar- ett utmärkt sällskap vid mikroskoperna. Jag är även mycket tacksam gentemot Fernando Tejerina som ställt upp sedan projektets början och som hela tiden visat ett enormt tålamod trots en egen, ganska överväldigande, arbetsbörda. Ej att förglömma är personalen på spermallaboratoriet på före detta OG som tagit sig tid att bistå med stort kunnande inom det praktiska området.

Naturligtvis så vill jag även tacka min handledare Heriberto Rodriguez- Martinez som vänligt men bestämt styrt arbetet i rätt riktning. Tack även till Ann- Marie Dahlin för hjälp med arrangemanget av Flyingevistelsen och övrigt arbete.

