

# **Effekt av spädningvätska på spermiemembranintegritet analyserad med NucleoCounter SP-100**

**Laura Junttila**

**Handledare: Anne-Marie Dalin  
Inst. för kliniska vetenskaper  
Biträdande handledare: Jane Morrell  
Inst. för kliniska vetenskaper  
Anders Johannisson  
Inst. för Anatomi, Fysiologi och Biokemi**

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING .....	1
ABSTRACT.....	2
INLEDNING .....	3
MATERIAL OCH METODER.....	6
Hingstmaterial.....	6
Flödesschema.....	6
NucleoCounter SP-100 .....	7
Single Layer Centrifugation.....	7
Flödescytometri .....	8
Koncentration.....	8
Statistisk analys.....	8
RESULTAT .....	8
Viabilitet .....	8
Jämförelse mellan viabilitet NucleoCounter SP-100 och flödescytometri.....	11
Koncentration.....	12
Dräktighetsresultat .....	13
Testmätning med NucleoCounter SP-100 .....	13
DISKUSSION.....	14
TACK.....	16
REFERENSER .....	17

## **SAMMANFATTNING**

Denna studie är en del av ett större projekt vars syfte har varit att undersöka metoder för att kunna kvalitetssäkra hingstesperma. Orsaken till detta är att en del hingstar som används inom hästaveln har nedsatt spermakvalitet. I och med den ökade användning av transportsperma krävs nya metoder för att kunna säkerställa spermans kvalitet.

I detta delprojekt undersöktes viabiliteten och koncentrationen hos färsk och kyld sperma med NucleoCounter SP-100. En jämförelse av två olika kommersiellt tillgängliga spädningvätskor, Kenney's och INRA 96, gjordes. Selektionsmetoden Single Layer Centrifugation (SLC) innefattades i studien och viabilitet jämfördes i de selekterade ejakulaten med de oselekterade. Eftersom NucleoCounter SP-100 är en relativt ny apparat gjordes en jämförelse mellan denna och flödescytometri beträffande viabilitet. Koncentration uppmätt med NucleoCounter SP-100 jämfördes med Bürkerkammarmetoden.

Resultaten visade att det inte förelåg någon statistisk skillnad i hur väl viabiliteten bevarades i de olika spädningvätskorna. Däremot hade SLC en statistiskt positiv effekt på spermernas viabilitet över tid ( $p < 0,0001$ ). Ett signifikant samspel förelåg mellan spädningvätska (Kenney's och INRA 96) och behandling (oselekterad och selekterad). Viabiliteten bevarades bäst i Kenney's selekterade och INRA 96 selekterade hade näst bäst förmåga att bevara viabilitet över tid. Sämst förmåga hade Kenney's oselekterade.

Jämförelsen av NucleoCounter SP-100 med flödescytometri vad gäller spermieviabilitet visade ingen korrelation. I denna del av studien jämfördes enbart 19 ejakulat och ett större provmaterial behövs för att kunna få tillförlitliga resultat.

Beträffande koncentrationsmätning korrelerade NucleoCounter SP-100 mycket väl med Bürkerkammare ( $r = 0,93$ ) och signifikansen var hög ( $p < 0,0001$ ).

Resultaten visar att SLC har god effekt på spermernas viabilitet över tid, medan val av spädningvätska inte har någon signifikant effekt. NucleoCounter SP-100 skulle mycket väl kunna användas på stuterier för koncentrationsbestämning men beträffande viabilitetsmätning krävs ett större studiematerial för utvärdering av apparaten.

## ABSTRACT

This study is a part of a larger project where the aim has been to evaluate different methods to assure the quality in stallion semen, due to the fact that some stallions in horse breeding have poor semen quality. The increased use of transport semen requires new methods to ensure good semen quality.

In this part of the project the viability and concentration in fresh and cooled semen was examined with NucleoCounter SP-100. A comparison between two different commercially available semen extenders, Kenney's and INRA 96, was made. The selection method Single Layer Centrifugation (SLC) was used in the study and the spermatozoal viability was compared between the selected and unselected semen. Since the NucleoCounter SP-100 is a relatively new machine a comparison was also made with flowcytometry regarding viability. Concentration measured with NucleoCounter SP-100 was compared by the use of manual counting with the Bürker chamber.

The results show that no statistical difference was detected between the two different extenders regarding spermatozoal viability. On the other hand SLC had a statistically positive effect on the viability of the spermatozoa over time ( $p < 0,0001$ ). A significant interaction was noticed between semen extender (Kenney's och INRA 96) and handling of semen (unselected and selected). Viability was best conserved in Kenney's selected and INRA 96 selected had the next best ability to conserve viability over time. Kenney's unselected had the lowest result of viability over time.

The comparison between NucleoCounter SP-100 and flowcytometry regarding spermatozoal viability didn't show any correlation. In this part of the study only 19 ejaculates were included and a greater number of stallions and ejaculates should be used for more accurate results.

Concerning the concentration measurement, the NucleoCounter SP-100 correlated very well with Bürker chamber ( $r = 0,93$ ) and the significance was high ( $p < 0,0001$ ).

The results show that SLC has a good effect on sperm viability over time while choice of semen extender does not have any significant effect. NucleoCounter SP-100 could be used at the studs for concentration measurement but regarding viability, a larger study should be made to evaluate the NucleoCounter machine.

## INLEDNING

Detta projekt är en del av ett större projekt som pågått under tre år vid Sveriges Lantbruksuniversitet. Projektet finansieras av Stiftelsen Svensk Hästforskning och syftet är undersöka olika metoder för att kvalitetssäkra hingstsperma. Anledningen till detta är den ökade användningen av kyld sperma det senaste decenniet samtidigt som man har sett en sjunkande fölningsprocent. Kyld sperma leder till en lägre fertilitet jämfört med färsk spädd sperma (Demick *et al* 1976, Dahlsten 2005).

Hästaveln fokuserar dessutom ffa på prestation och därmed accepterar man bland annat nedsatt spermakvalitet i jämförelse med t.ex. gris och nöt. Detta gör att hantering av sperma från en hingst med nedsatt spermakvalitet blir ännu viktigare. Idag använder man sig av flera olika parametrar för att kunna förutsäga spermernas befruktningförmåga bl.a. motilitet. Ingen av de använda variablarna har visat sig överensstämma helt med hingstens faktiska fertilitet.

Det finns olika beredningsformer av hingstsperma för artificiell insemination; färsk, kyld transportsperma samt fryst sperma. Vid användning av färsk sperma sker insemination kort efter samling. Stoet finns då på samma station som hingsten. Den kylda transportsperman förvaras vid 5°C och transporteras till det stuteri eller seminestation som stoet är uppstallat vid. Kyld transportsperma insemineras i regel nästpåföljande dag. Om transportsperman förvaras under längre tid än 24 timmar minskar motilitet och befruktningförmåga (Aurich *et al*, 2004). Statistik från ASVH (Avelsföreningen för svenska varmblodiga hästen) visar att kyld transportsperma användes till 63 % av halvblodsstona år 2007. Motsvarande siffra för varmblodiga travare var 32 % enligt STC (Svenska travsportens centralförbund).

För koncentrationsbestämning använder stuterierna SpermaCue som är en typ av fotometerapparat. Denna har sina begränsningar då den är osäker vid höga och låga koncentrationer. SpermaCuen har visat sig ge falskt höga koncentrationer i mer utspädd sperma och falskt låga koncentrationer vid mer koncentrerad sperma (Rigby *et al* 2001). Det är viktigt att kunna fastställa korrekt koncentration för hingstsperma eftersom sperman oftast skall fördelas i inseminationsdoser. Om värdet är falskt högt ger detta i sin tur för lågt antal spermier per inseminationsdos och därmed kan hingstens få en låg dräktighetsprocent. För att beräkna koncentration på ett noggrant sätt används Bürkerkammare, ett rutfält där man räknar spermerna i faskontrastmikroskop. Denna metod är för tidskrävande för att kunna användas vid det dagliga arbetet på stuterierna.

Idag är det vedertaget med en inseminationsdos med  $500 \times 10^6$  progressivt motila spermier vid insemination med färsk sperma. För kyld transportsperma är dosen  $1 \times 10^9$  progressivt motila spermier (Brinsko 2006). Stuterierna använder sig av bland annat subjektiv motilitet som bedöms med hjälp av faskontrastmikroskop. Den subjektiva motiliteten varierar beroende på vem som bedömer, men i gengäld är det en billig och snabb metod (Malmgren 1997).

Hanteringen av sperman från samling till insemination har betydelse för dess överlevnad. Spermier får inte utsättas för mekanisk skada, ljus, värme eller kyla.

Samling sker med hjälp av artificiell vagina. Sperman samlas upp i en förvärmad flaska och därmed minskas risken för köldchock av spermerna. Direkt efter samling späds sperman. Spermerna producerar bland annat mjölksyra p g a metabolism som minskar motiliteten och det är en av anledningarna till att den måste blandas med en spädningssväska (Katila 1997). Spädningssväska syfte är, förutom den buffrande egenskapen, även att skydda spermerna från att skadas vid nedkylning, minska tillväxt av bakterier, öka spermernas livslängd och öka inseminationsvolymen (Pickett *et al* 1987).

Det finns olika typer av spädningssväska för sperma. Mjolk och mjölkbaserade spädningssväska är de som används rutinmässigt inom hästaveln (Batellier *et al* 2001). Kenney's spädningssväska (Kenney *et al* 1975) är en spädningssväska som revolutionerade artificiell insemination inom hästaveln i västvärlden (Brinsko 2006). Vilka komponenter i mjölken som är fördelaktiga respektive skadliga för spermernas överlevnad undersöktes av Batellier *et al* (1997). De fann bland annat att nativt phosphocaseinate (NPPC), naturligt förekommande i skummjolk, hade gynnsam effekt vid förvaring av hingstsperma under längre tid och vid högre temperaturer. I denna studie har vi använt Kenney's spädningssväska samt en spädningssväska som heter INRA 96. INRA 96 innehåller bland annat mjölkfraktionen NPPC (Batellier *et al* 2001).

En hög koncentration d v s  $> 20\%$  seminalplasma har skadlig effekt på spermernas motilitet vid längre tids kylförvaring (Pruitt *et al* 1993). Man har även visat att total avsaknad av seminalplasma minskar spermernas motilitet (Jasko *et al* 1992). Plasmamembranintegriteten däremot har inte visat sig påverkas signifikant i närvaro eller frånvarå av seminalplasma (Karekoski *et al* 2006). Användning av spädningssväska minskar proportionen seminalplasma samtidigt som man minskar antal spermier per ml. Att spermiekoncentrationen minskar har sina fördelar. Varner *et al* (1987) visade att spermernas motilitet är högre vid en koncentration på  $25 \times 10^6$  spermier/ml jämfört med en koncentration på  $50 \times 10^6$  spermier/ml vid ett försök där motiliteten utvärderades efter 24 h vid  $25^\circ\text{C}$ . Spädning av sperma bevarar motiliteten, men för kraftig utspädning har däremot negativa effekter på fertiliteten (Brinsko *et al* 1992). En fördelning på minst 1:1 mellan sperma och spädningssväska rekommenderas.

Det finns olika sätt att minska andelen seminalplasma i ejakulatet. Spädning med spädningssväska, centrifugering eller fraktionering av ejakulatet (Katila 1997). Single Layer Centrifugation som användes i detta projekt innebär att man centrifugerar sperma genom en kolloid (Morrell 2006). Genom denna metod avlägsnas seminalplasman i ejakulatet. Syftet med centrifugering genom en kolloid är att man på så sätt avlägsnar celler som har en annan densitet än spermerna t.ex. bakterier, epitelceller och leukocyter. Vid centrifugeringen genom kolloiden stannar cellerna vid det område som motsvarar deras densitet. Då de motila spermerna tar sig snabbare till sin plats i kolloiden, kan man genom att styra centrifugeringstid och hastighet separera de motila från de icke-motila.

NucleoCounter SP-100 (NC) är en apparat som ger ett mått på spermernas membranintegritet samt räknar ut spermiekoncentrationen i ejakulatet. Membranintegritet kan analyseras på olika sätt (Aurich, 2005). Till början använde man spermieutstryk som färgades med eosin eller med en kombination av eosin och nigrosin. Idag används fluorescerande ämnen för färgning däribland propidium jodid, carboxyfluoresceindiacetat och SYBR-14. Utstyken läses sedan av en person men då bedömer man endast på en liten del av provet. Flödescytometri används numera för att avläsa de fluorescerande cellerna (Garner *et al*, 1994). Ett annat sätt att undersöka membranintegriteten är genom hypo-osmotic swelling test, men detta test har visat sig inte ha någon hög korrelation med fluoresceinfärgning (Aurich, 2005). I NucleoCounter SP-100 används propidium jodid (PI) som fluorescent. PI kan inte penetrera genom intakta cellmembran och därmed färgas enbart döda celler eller celler med skadat membran. Membranintegritet har visat sig ha en hög korrelation med motilitet och progressiv motilitet i både färsk och kyld hingstsperma analyserad m.h.a. carboxyfluorescein diacetat och propidiumjodid (Brinsko *et al* 2003). Man har även sett att viabiliteten analyserad med NC har en signifikant korrelation med morfologi (Johansson *et al* 2008). Vid jämförelse mellan NC och eosin-nigrosin färgning för bestämning av viabilitet i hingstsperma kunde man inte se någon signifikant skillnad mellan metoderna. Hansen *et al* (2006) visade att galtspermiekoncentration mätt med NC och flödescytometri hade en mycket hög korrelation. Membranintegritet har visat sig överensstämma bättre med hingstens fertilitet än vad motilitetsparametrar gjorde (Pillet *et al*, 2008).

Eftersom NC är en relativt ny metod för viabilitetsmätning ville vi jämföra den med flödescytometri. Vid flödescytometrin färgas cellerna in med två fluorescerande ämnen, SYBR-14 och propidiumjodid (Garner *et al* 1994). PI penetrerar genom skadade cellmembran som tidigare nämnt, medan SYBR-14 har förmågan att tränga in genom intakta cellmembran. De döda cellerna färgade med PI fluorescerar rött medan de levande färgade med SYBR-14 fluorescerar grönt ljus. På detta sätt får man ett mått på döda samt levande celler. Denna färgningskombination har visat sig ha en hög korrelation med motilitet (Magistrini *et al* 1996).

Vi ville även se hur väl koncentrationen uppmätt med NC SP-100 stämmer överens med manuell räkning med hjälp av Bürkerkammare. Detta för att se om NC skulle kunna ge säkrare värden än SpermaCuen.

Syftet med detta delprojekt var att:

- jämföra selekterade och oselekterade spermier m h a NucleoCounter SP-100
- jämföra sperma spädd med Kenney's spädningsvätska med sperma spädd med INRA 96.
- undersöka korrelationen mellan NucleoCounter SP-100 och Bürkerkammare beträffande koncentrationsmätning
- jämföra NucleoCounter SP-100 med flödescytometri vad gäller viabilitetsmätning

## MATERIAL OCH METODER

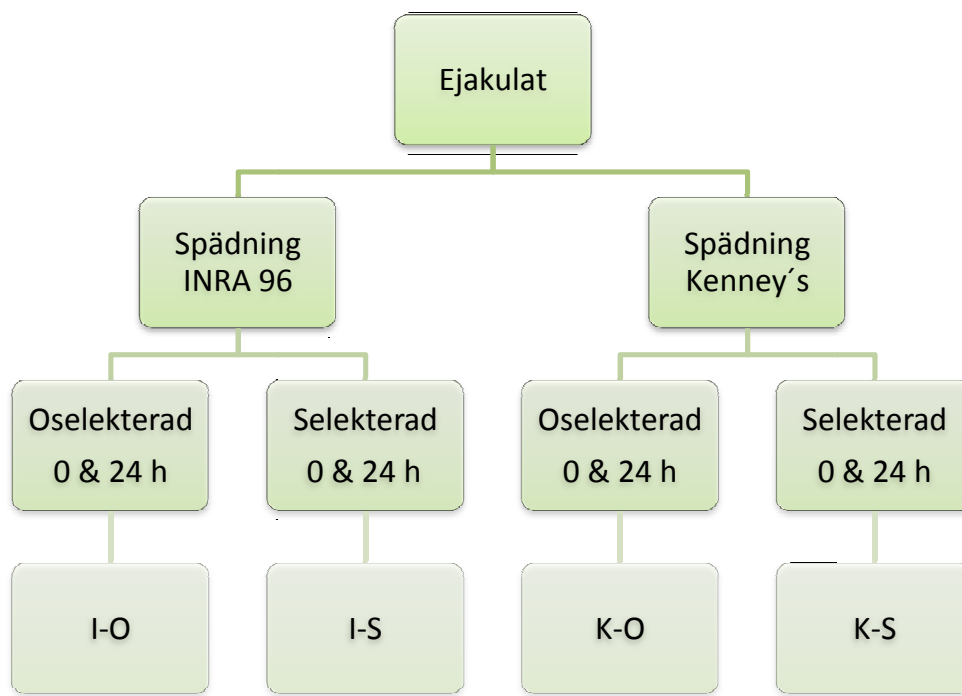
### Hingstmaterial

I delstudie I där koncentration och viabilitet analyserades användes sperma från 12 halvblodshingstar stationerade på Flyinge. Tre till fyra ejakulat samlades från varje hingst under en två veckors period i juni 2008 och totalt analyserades 45 ejakulat. Hingstarna samlades ungefär varannan dag och den sperma som inte levererades till olika stuterier och seminestationer användes i studien. Hingstarna har fått en bokstavskod för att inte kunna identifieras.

Delstudie II var jämförelsen mellan NC och flödescytometri och där användes 12 delvis andra Flyinge hingstar varav 8 hingstar även ingick i delstudie I och totalt analyserades 19 ejakulat från dessa.

### Flödesschema

Figur 1 visar flödesschema över hur de olika proverna bereddades. Efter samling spädades hälften av sperman med Kenney's till en lösning 1:1 och den andra hälften med INRA 96 till en lösning 1:1. Spädningsvätskorna förvarades i värmeskåp och var kroppstempererade vid spädningen. Efter spädning delades sperman upp i två delar där den ena delen var obehandlad och den andra delen centrifugerades genom kolloid.



Figur 1. Flödesschema för beredning av prov I-O, I-S, K-O och K-S för viabilitets- och koncentrationsmätning med NC.

Varje ejakulat analyserades med NucleoCounter SP-100 (NC) samma dag som provet samlades (tidpunkt 0 h) samt nästpåföljande dag (tidpunkt 24 h). Proven förvarades i kylskåp (5 °C) i centrifugrör mellan mätningarna.



## **NucleoCounter SP-100**

NucleoCounter SP-100 (ChemoMetec A/S, Allerød, Danmark) är ett integrerat fluorescensmikroskop som är mycket enkelt att använda. Provlösning aspireras i SP1-kassetten, sedan förs kassetten in i apparaten och mätning av koncentration alternativt viabilitet sker. Samma typ av kassett används till både koncentrations- och viabilitetsmätning. För att mäta viabiliteten krävs det dock att man alltid först måste mäta koncentrationen, dvs. för viabilitetsmätning går det åt två stycken SP1-kassetter. SP1-kassetterna innehåller fluorescensämnet propidium jodid (PI) som löses upp när kassetten laddas med provmaterial. PI passerar skadade cellmembran och färgar DNA i cellerna. För att mäta koncentrationen lyseras cellerna med Reagent S100 och PI färgar därmed alla cellers DNA. För att mäta viabiliteten krävs att koncentrationen mäts först och programvaran i NC lagrar detta resultat, vilket sker automatiskt. Därefter blandas ett nytt spermprov med PBS-buffert där enbart de icke-viabila cellerna reagerar med fluorescens. NC mäter därmed andelen icke-viabila celler och räknar därefter ut viabiliteten i procent tack vare den tidigare koncentrationen (www.chemometec.com).

Spermiekoncentrationen i provet analyserades genom att av 50 µl spermaprovet blandades med 5 ml rumstempererad reagent S 100. SP1-kassetten aspirerar ca 50 µl av provet och kassetten placerades i NC och koncentrationen mättes.

För att mäta viabiliteten pipetterades 50 µl av spermaprovet och blandades sedan med 5 ml rumstempererad PBS-buffert. SP1-kassetten aspirerar ca 50 µl av spermaprovet och detta analyseras i NC direkt efter tillblandning.

NucleoCounters inställningar skall ändras beroende på förväntad koncentration i provet. Man använder sig sedan av en dilutionsfaktor som ställs in på apparaten innan mätning. Dilutionsfaktor 101 användes för samtliga prover och denna faktor är optimal för koncentrationer som ligger mellan 125-500 miljoner/ml enligt tillverkaren.

Vid mätning av viabilitet på samlingsdagen förvarades vissa prov i kylskåp innan mätning. Detta för att rumstemperaturen inte skulle påverka viabiliteten negativt då alla prover inte kunde analyseras inom en kort tidsintervall. När dessa kylda prover därefter analyserades med NC observerades att viabiliteten var högre än i de som var rumstempererade. En jämförelse mellan fyra olika hingstar gjordes, där samma beredning analyserad först rumstempererad och sedan efter kylförvaring.

## **Single Layer Centrifugation**

Ejakulaten spädda med Kenney's respektive INRA 96 justerades så att de hade en koncentration av ca  $100 \times 10^6$  spermier/ml. 1,5 ml av provet fördes över i ett provrör med 4 ml av kolloiden Androcoll-E<sup>TM</sup>. Kolloiden tillverkas av Jane Morrell vid SLU. Sedan centrifugerades proverna vid 300 g i 20 minuter. Den s.k. spermapelleten på botten löstes därefter upp med 3 ml av respektive spädningsvätska. Prepareringen utfördes av Jane Morrell.

## **Flödescytometri**

Flödescytometrin utfördes på SLU, Uppsala av Anders Johannisson. Varje ejakulat uppdelades i selekterad och oselecterad form, d v s 38 prover analyserades med flödescytometrin. Spermaproverna skickades med post i en frigolitlåda med kylklamp. På stuteriet förvarades motsvarande prover i frigolitlådor med kylklamp för att sedan vid 24 h analyseras med NC. Analysen av dessa prover skedde enbart 24 h efter samling. Vid analysen med flödescytometern färgades spermerna med en kombination SYBR-14 och propidiumjodid (Live/dead® Sperm Viability Kit L-7011; invitrogen™, Inc., Eugene, OR, USA) Proverna inkuberades i 10 minuter vid 37 °C i mörker innan analys. Analysen utfördes i en LSR flödescytometer (Beaton Dickinson, San José, CA, USA). Ca 10 000 spermier analyserades från varje prov och de spermier som fluorescerade SYBR-14 men inte PI räknades som levande.

## **Koncentration**

Koncentration av spermier beräknades på samlingsdagen, förutom med NC, även manuellt med hjälp av Bürkerkammare. 1 ml sperma späddes med koksaltlösning (1:100). En droppe av provet lades sedan i Bürkerkammaren och spermerna i 25 rutor räknades. Räkandet av spermerna skedde i ett faskontrastmikroskop. Därefter räknades koncentrationen ut (antal spermier/ml). Detta moment utfördes av Jane Morrell.

## **Statistisk analys**

Den statistiska bearbetningen genomfördes av docent Nils Lundeheim vid Institutionen för husdjursgenetik, SLU. Analysen gjordes m h a variansanalys med SAS-programpaket (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Skillnaden mellan 0 h och 24 h beräknades ut för varje parameter som analyserades. Den statistiska modellen inkluderar de fixa effekterna av behandling (selekterad och icke-selekterad), spädningvätska (INRA 96 och Kenney's) samt samspelet mellan spädningvätska och behandling. Dessutom inkluderades den slumpmässiga effekten av ejakulat inom hingst.

## **RESULTAT**

### **Viabilitet**

Tabell 1 och 2 visar medelvärdet och standardavvikelsen för spermernas viabilitet i de olika spädningvätskorna, selekterade respektive oselecterade vid tidpunkt 0 h respektive 24 h. Vid en jämförelse mellan de oselecterade proverna hade alla utom en hingst lägre viabilitet efter 24 timmar. De selekterade proverna i INRA 96 hade samma eller lägre viabilitet efter 24 timmar än vid tidpunkt 0 h, vilket var att förvänta. Anmärkningsvärt var att majoriteten av hingstarna (9 av 12) i Kenney's selekterade prover hade en högre viabilitet efter 24 timmar jämfört med samlingsdagen, med skillnaden var inte statistiskt signifikant ( $p > 0,18$ ). Dessutom framgår att alla hingstar utom en hade bättre viabilitet vid 24 h till följd av selektering i både Kenneys och INRA 96, vilket var statistiskt signifikant ( $p < 0,0001$ ).

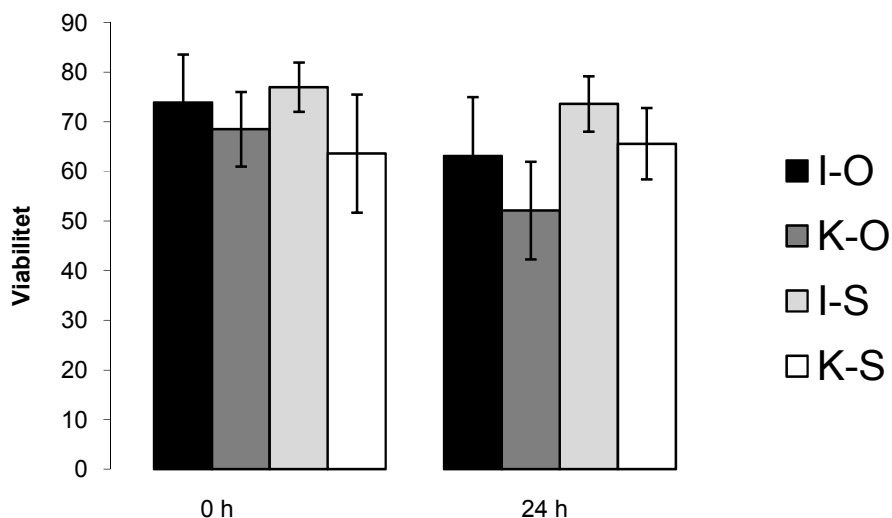
Tabell 1. Medelvärde samt standardavvikelse för viabilitet undersökt vid 0 h för varje enskild hingst

Hingst	Antal ejakulat	I-O	I-S	K-O	K-S
I	4	76,25 ± 4,6	77,50 ± 1,9	74,25 ± 3,1	67,75 ± 16,7
J	3	74,33 ± 1,5	67,67 ± 2,1	66,00 ± 2,0	52,33 ± 7,6
K	4	70,75 ± 4,5	76,50 ± 3,7	68,50 ± 9,5	68,50 ± 7,8
L	3	81,33 ± 5,5	80,30 ± 1,5	73,67 ± 6,1	71,00 ± 7,0
N	4	77,75 ± 3,3	79,00 ± 2,7	67,25 ± 3,9	59,25 ± 16,3
O	4	82,00 ± 4,2	78,00 ± 4,6	67,25 ± 12,3	66,00 ± 15,7
Q	4	65,00 ± 27,4	78,00 ± 3,9	72,25 ± 6,7	61,75 ± 16,9
R	4	77,25 ± 3,3	78,75 ± 6,6	76,00 ± 4,6	69,75 ± 9,1
T	3	69,00 ± 7,2	78,00 ± 2,0	64,00 ± 5,3	64,00 ± 7,0
U	4	71,50 ± 3,51	75,00 ± 5,8	64,25 ± 5,25	60,00 ± 6,7
AA	4	68,25 ± 4,4	77,50 ± 9,1	58,75 ± 8,3	58,25 ± 9,7
DD	4	74,25 ± 8,8	77,00 ± 4,3	69,00 ± 3,1	67,75 ± 15,8

Tabell 2. Medelvärde samt standardavvikelse för viabiliteten undersökt vid tidpunkt 24 h för varje enskild hingst

Hingst	Antal ejakulat	I-O	I-S	K-O	K-S
I	4	54,50 ± 24,6	70,75 ± 2,2	48,25 ± 15,3	68,50 ± 4,1
J	3	66,67 ± 5,7	57,67 ± 7,6	60,30 ± 8,0	58,00 ± 15,7
K	4	62,50 ± 5,8	73,50 ± 3,1	52,00 ± 6,2	65,00 ± 6,4
L	3	76,67 ± 6,7	77,00 ± 3,0	62,67 ± 6,0	73,33 ± 2,5
N	4	68,50 ± 4,0	73,50 ± 4,1	57,75 ± 4,8	68,25 ± 8,3
O	4	71,25 ± 5,9	75,25 ± 6,4	53,75 ± 2,9	63,50 ± 10,2
Q	4	70,75 ± 7,3	77,25 ± 2,1	54,25 ± 9,9	65,75 ± 3,33
R	4	62,50 ± 8,8	77,75 ± 3,7	46,50 ± 12,9	63,50 ± 4,2
T	3	56,00 ± 13,0	73,00 ± 3,6	40,33 ± 15,0	64,67 ± 2,9
U	4	60,50 ± 10,7	75,00 ± 3,7	55,50 ± 6,2	71,75 ± 1,9
AA	4	47,00 ± 3,7	67,25 ± 10,0	43,25 ± 5,4	60,50 ± 3,7
DD	4	63,25 ± 6,9	74,75 ± 6,2	52,00 ± 4,4	70,25 ± 5,0

Figur 2 visar medelviabiliteten vid tidpunkt 0 h samt vid 24 h för samtliga hingstar och ejakulat i delstudie I i beredningarna I-O, I-S, K-O och K-S. En försämring av viabilitet vid 24 h förelåg hos de icke-selektade proverna jämfört med 0 h och denna försämring var statistiskt signifikant ( $p < 0,0001$ ). Ingen statistiskt signifikant försämring skedde av de selekterade proverna över tid.



Figur 2. Medelvärde och standardavvikelse av viabilitet för alla hingstar.

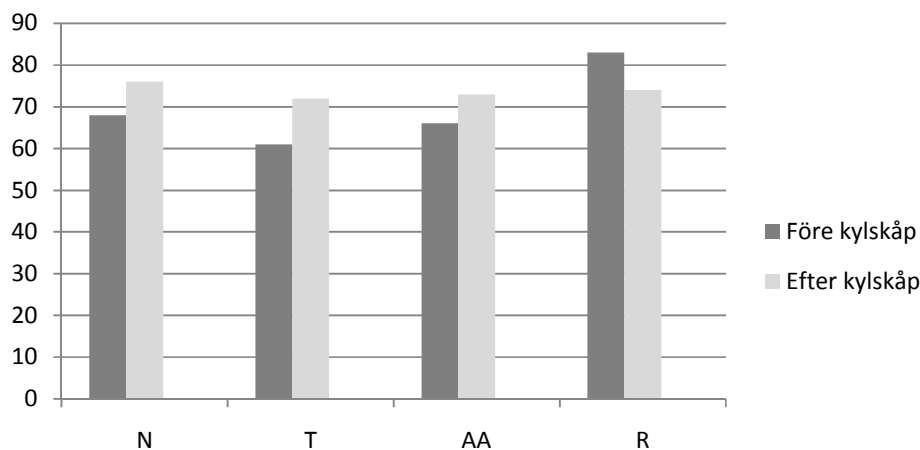
Av variansanalysen, som redovisas i tabell 3, framgår att det fanns ett signifikant samspel mellan spädningvätska och behandling (oselekterad och selekterad) mellan de olika beredningsformerna (I-S, I-O, K-S och K-O) för sperman efter 24 timmar. Variansanalysen är baserad på differensen av viabilitet mellan tidpunkterna 0 h och 24 h. Kenney's selekterade hade bäst förmåga att bibehålla viabilitet över tid. Sämst förmåga hade Kenney's oselekterade. Enligt variansanalysen hade behandling (oselekterad resp. selekterad) av spermaprovet signifikant effekt på viabiliteten men däremot utgjorde inte val av spädningvätska någon signifikant skillnad.

Tabell 3. Statistisk jämförelse av spermernas förmåga att bevara viabilitet över tid mellan de olika beredningsformerna \* =  $\leq 0,05$ , \*\* =  $\leq 0,01$  och \*\*\* =  $\leq 0,001$

	Signifikans
<b>K-S var bättre än I-O</b>	***
<b>K-S var bättre än I-S</b>	*
<b>K-S var bättre än K-O</b>	***
<b>I-S var bättre än K-O</b>	***
<b>I-S var bättre än I-O</b>	***
<b>I-O var bättre än K-O</b>	**

Jämförelse mellan spermaprover för 4 hingstar förvarade i kylskåp respektive rumstemperatur visas i figur 3. Beredning som användes vid denna jämförelse var

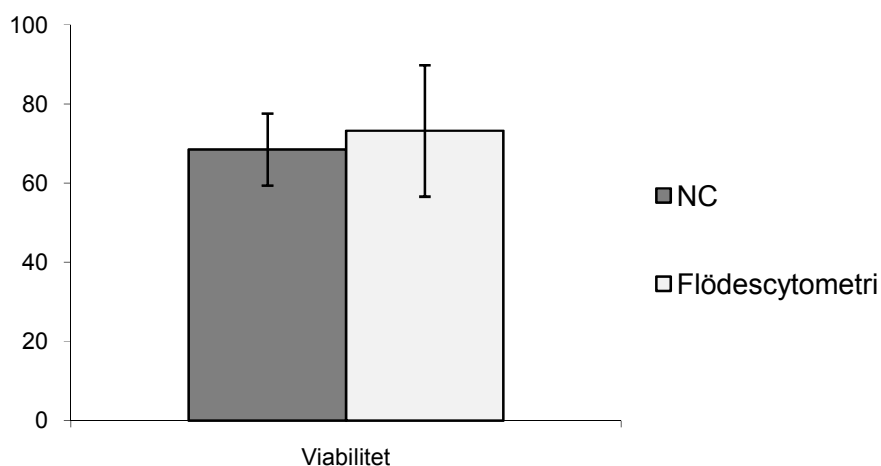
Kenney's selekterade. Resultatet visade att 3 av 4 hingstar hade högre viabilitet när provet hade förvarats i kylskåp innan mätning.



Figur 3. Jämförelse av fyra olika hingstar (N, T, AA och R) i Kenneys selekterade beredning före och efter kylskåpsförvaring på samlingsdagen.

#### Jämförelse mellan viabilitet NucleoCounter SP-100 och flödescytometri

Figur 4 visar medelvärdet av viabilitet för alla hingstar analyserad med både NC och flödescytometri. NC visade generellt en lägre viabilitet jämfört med flödescytometrin.

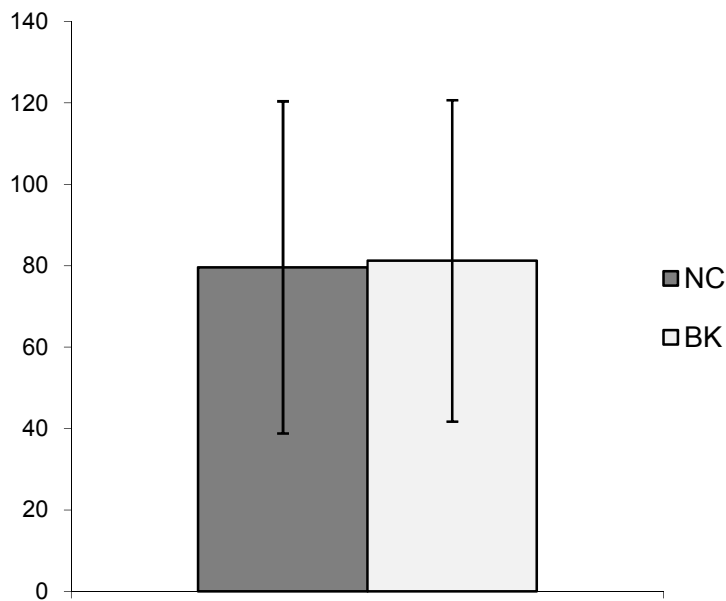


Figur 4. Medelvärde och standardavvikelse av viabilitet för hingstarna i delförsök II analyserad med NucleoCounter SP-100 respektive flödescytometri.

Korrelationskoefficienten mellan NC och flödescytometrin var 0,16, ej signifikant ( $p > 0,34$ ). Antalet observationer var dock endast 38.

## Koncentration

En hög korrelation, 0,93 fanns mellan de två olika metoderna för koncentrationsberäkning, NucleoCounter SP-100 och Bürkerkammare, och detta var statistiskt signifikant ( $p < 0,0001$ ). Medelvärdet av spermakoncentrationen för alla hingstar sammantaget redovisas i figur 5.



*Figur 5. Medelvärde och standardavvikelse för koncentration mätt med NucleoCounter SP-100 (NC) och Bürkerkammare (BK) för samtliga hingstar i delstudie I.*

## Dräktighetsresultat

Dräktighetsresultat för hingstarna i delstudie I redovisas i tabell 4. Dessa resultat är från tidsperioden 2 juni 2008 till 17 juni 2008, vilket motsvarar att stoet påbörjats insemineras under perioden för studien på Flyinge.

Tabell 4. Antal dräktiga ston av totalt antal inseminerade ston med kyld transportsperma (TAI) resp. färsk sperma (AI) redovisas för varje hingst i delförsök I

	TAI	AI
<b>I</b>	3/9	1/2
<b>J</b>	0/1	1/2
<b>K</b>	2/4	0/1
<b>L</b>	1/1	2/2
<b>N</b>	7/17	2/2
<b>O</b>	1/1	1/2
<b>Q</b>	2/2	-
<b>R</b>	2/2	2/3
<b>T</b>	2/4	2/3
<b>U</b>	7/12	4/9
<b>AA</b>	7/9	1/4
<b>DD</b>	5/5	2/2

## Testmätning med NucleoCounter SP-100

Testmätning av NC gjordes för att undersöka ifall apparaten överskattade koncentrationen och viabiliteten i ejakulaten. Vid testmätning undersöktes prover bestående av enbart Reagent S 100 respektive PBS-buffert, dvs helt utan spermier. I dessa prover förväntar man en mycket låg koncentration och ingen viabilitet.

Tabell 5. Mätning av koncentration och viabilitet i ren Reagent S 100 respektive ren PBS-buffert

	Koncentration (10 <sup>6</sup> /ml)	Viabilitet
<b>Mätning 1</b>	0,7	43 %
<b>Mätning 2</b>	0,2	< 0 %
<b>Mätning 3</b>	0,4	< 0 %

## DISKUSSION

Syftet med detta projekt var att jämföra två olika spädningsvätskor som används inom hästaveln och mäta spermernas viabilitet med NucleoCounter SP-100 både selekterade och oselecterade. Det finns få studier gjorda på hingstesperma analyserad med NC. Denna analysmetod är mycket enkel att använda och analyserar proverna snabbt. Nackdelen är dock priset både i inköp och priset för kassetterna som krävs för analysen.

Selekteringens syfte är att få fram de spermier som är mest fruktsamma och öka spermernas levnadslängd. I en studie nyligen genomförd jämförde man selekterad hingstesperma med oselecterad sperma och fann att den selekterade sperman hade bättre motilitet och överlevnad än den oselecterade (Morrell *et al* 2008). Macias *et al* (2007) har gjort en liknande studie med fryst hingstesperma och fann att sperman selekterad genom SLC hade signifikant bättre resultat jämfört med oselecterad sperma med avseende på alla parametrar ingående i försöket däribland viabilitet och motilitet. Man har visat att döda spermier har negativ effekt på levande spermiers membranintegritet (Brinsko *et al* 2003). Om man i nära anslutning till spermasamlingen kan reducera andelen döda spermier från ejakulatet m h a selektering skulle man därmed kunna få längre hållbarhet på transportsperman. Dock finns ännu inga studier utförda på den selekterade spermans befruktningsskapacitet.

Resultaten visar att det fanns signifikanta skillnader mellan de olika spermaberedningarna vid viabilitetsanalysen med NC. Medelvärdet för viabiliteten för Kenney's selekterade var högre efter 24 timmar än på samlingsdagen. Denna skillnad var dock inte signifikant men man kan fundera över varför värdet ökade istället för att rent logiskt sjunka. En förklaring kan vara att centrifugering initialt påverkar spermernas membran. Denna ökning av viabilitet över tid har dock inte observerats tidigare då man också använt sig av Single Layer Centrifugation och Kenney's spädningsvätska (Thorén 2007).

Enligt denna studie bevaras viabiliteten bättre i de selekterade proverna jämfört med de oselecterade. Enligt variansanalysen förelåg dock ingen statistisk skillnad mellan spädningsvätskorna.

Vissa av proverna förvarades i kylskåp innan analysering p.g.a. många hingstar samlades inom en kort tidsperiod och analysen hann inte genomföras direkt. Dessa prover verkade ha generellt högre viabilitet, men detta dokumenterades tyvärr inte förutom för några få ejakulat i beredning Kenney's selekterade. Eftersom kylförvaringen kan ha ökat viabilitet i de kylda proverna ger detta en felkälla. Alla prover vid 24 h analyserades omedelbart efter att de tagits ur kylskåp medan på samlingsdagen är det okänt vilka prover som analyserades rumstempererade respektive kylskåpskalla.

Att viabiliteten blev högre efter kylskåpsförvaring visades enbart med Kenney's selekterade prover. En möjlig förklaring till detta är som tidigare nämnt att cellmembranet påverkas initialt och blir genomträngligt för PI. Detta skulle leda till att viabiliteten är falskt låg direkt efter centrifugering.



Dräktighetsresultat (dräktighet per brunst) för TAI kan jämföras med viabilitet för INRA 96 oselektad efter 24 timmar, vilket motsvarar beredningen som Flyinge stuteri använder för TAI. Man kan notera att den hingst som hade sämst viabilitet hade endast 47 % viabla spermier vid 24 h (hingst AA). När man sedan jämför denna siffra med TAI kan man se att 7 av 9 ston blev dräktiga, vilket är en bra dräktighetssiffra. Eftersom dräktighetsresultaten gäller för ett mycket begränsat antal ston kan man inte dra några större slutsatser över hur väl viabilitetsmätning med NC förhåller sig till dräktighet per brunst. Ett större material behövs för att kunna få statistiskt säkerställda siffror beträffande om ett samband råder mellan dessa två parametrar.

Dilutionsfaktor 101, som användes vid analys av samtliga prover, är optimal för koncentrationer mellan 125 och 500 miljoner spermier/ml. De flesta av proverna som analyserades vid denna studie hade en koncentration under detta, vilket ger en osäkerhetsfaktor av mätningens precision. Trots detta korrelerade NC mycket väl med Bürkerkammare. Vid en undersökning utförd av Comerford *et al* (2008) konstaterade dessa att NC stämde väl överens med både flödescytometri och hemacytometri beträffande koncentrationmätning. Mätning av koncentration med NC skulle kunna ersätta mätning med SpermaCue på stuterier. Nackdelen är i dagsläget som tidigare nämnts priset för apparaten i inköp samt användningspriset för kassetterna.

Eftersom koncentrationmätningen står till grund för viabilitetsmätning påverkar valet av dilutionsfaktor även beräkning av viabilitet. Därmed föreligger en osäkerhetsfaktor även i viabilitetsmätningen.

En osäkerhetsfaktor som finns med NC är att viabiliteten i de rena vätskorna dvs. utan spermier vid ett tillfälle redovisade en viabilitet på 43 %, där den borde ha varit 0 %. Ytterligare två mätningar utfördes med enbart vätskor och dessa gav det förväntade värdet 0 % viabla celler. Koncentrationen i dessa prover var ändå som förväntat låg och man måste ta i beaktande att apparaten inte var inställd på att mäta koncentration respektive viabilitet på dessa låga nivåer. I ett normalt spermprov skulle koncentrationen aldrig ligga på dessa låga nivåer. Koncentrationmätningen står till grund för viabilitetsberäkningen. Detta kan förklara att man fick viabiliteten till 43 % i ett av proverna. Ett bättre alternativ för att kontrollera hur väl NC mäter viabilitet skulle vara att använda prover där man vet andelen avdöda spermier.

För att kunna säga om NC är en bra och säker metod för viabilitetsmätning krävs ett större provmaterial. Apparaten är utan tvekan mycket enkel att använda. Intressant vore att se om det finns ett samband mellan motilitet och NC viabilitet. I det fallet skulle man kunna ersätta den subjektiva motiliteten med viabilitetsresultaten, vilket skulle öka trovärdigheten eftersom en subjektiv bedömning är individberoende. Det mest intressant vore dock att göra en mer storskalig jämförelse av dräktighetsresultat med viabilitet mätt med NC. Det finns inte en tillförlitlig parameter idag som motsvarar spermernas fertiliseringskapacitet. Man använder sig av många olika parametrar däribland viabilitet. Ytterligare en mycket intressant sak att undersöka är de selekterade spermernas befruktningförmåga.

## **TACK**

Jag vill rikta ett stort tack till den hjälpsamma och trevliga personalen på Flyinge hingstdepå som gjort detta projekt genomförbart. Jag vill också tacka Kaisa Ryytty för ett mycket trevligt sällskap under tiden på Flyinge.

Dessutom vill jag tacka mina biträdande handledare Jane Morrell och Anders Johansson för hjälp med planering och genomförandet av detta examensarbete. Även ett tack till personalen på spermalaboratoriet på OG för hjälp med träning inför laborationsarbetet. Tack till Nils Lundeheim för all hjälp med statistiken.

Avslutningsvis vill jag tacka min huvudhandledare Anne-Marie Dalin för all hjälp och engagemang i samband med detta projekt.

## REFERENSER

- Aurich, C. (2005) Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89, 65-75
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J.M. & Magistrini, M. (2001) Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 68, 181-190
- Batellier, F., Magistrini, J., Fauquant, J. & Palmer, E. (1997) Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* 48, 391-410
- Brinsko, S.P. (2006) Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology* 66, 543-550.
- Brinsko, S.P. & Varner D.D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. *Vet cline eq prac* 8, 205-218.
- Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Rigby, S.L., Love, C.C. & Varner, D.D. (2003) Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored semen. *Theriogenology* 59, 735-742.
- Cromerford, K.L., Love, C.C., Brinsko, S.P., Edmund, A.J., Wait, J.A., Teague, S.R. and Varner, D.D. (2008) Validation of a commercially available fluorescent-based instrument to evaluate stallion spermatozoal concentration. *Animal Reproduction Science* (in press doi 10.1016/j.anireprosci.2008.05.093)
- Dahlsten, A. (2006) Fertilitet hos svenska halvblodshingstar betäckningssäsongen 2004 – En pilotstudie. EEF-arbete 2006:31 vid Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU.
- Demick, D.S., Voss, J.L. & Pickett, B.W. (1976) Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *Journal of Animal Science* 43, 633-637.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Yue, S.T., Roth, B.L. & Haughland, R.P. (1994) Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology* 15, 620-629.
- Hansen, C., Vermeiden, T., Vermaiden J.P.W., Simmet, C., Day, B.C. & Feitsma, H. (2006) Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, Spermvision, UltimMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology* 66, 2188-2194.
- Jasko, D.J., Hathaway, J.A., Schaltenbrand, V.L., Simper, W.D. & Squires, E.L. (1992) Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241-1252.
- Johansson, C.S., Matsson, F.C. & Lehn-Jensen, H. (2008) Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. *Animal Reproduction Science*. (in press doi 10.1016/j.anireprosci.2008.05.102)
- Karekoski, AM., Reilas, T., Andersson M. & Katila, T. (2006). Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractioned stallion ejaculates after storage. *Reprod Dom Anim.* 41, 33-38.
- Katila, T. (1997). Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*. 48, 1217-1227.
- Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper, W.L. & Morse, G.W. (1975) Minimal contamination techniques for breeding mares; Techniques and preliminary findings. *Proceedings of the 21<sup>st</sup> Annu Conv Am Assoc Equine Pract.* 327-336.

- Macias, B.G., Morrell, J.M., Fessusola, C.O., Fernandez-Gonzalez, L., Tapiam, J.A., Rodriguez-Martinez H. & Pena, F.J. (2007) Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen.thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science*. (in press doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.08.025)
- Magistrini, M., Vidament, M., Clement, F. & Palmer, E. (1996) Fertility prediction in stallions. *Animal Reproduction Science* 42. 181-188
- Malmgren, L. (1997) Assessing the quality of raw semen; A review. *Theriongenology* 48, 523-530.
- Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A.M. & Rodriguez-Martinez H. (2008) Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reprod Dom Ani*. (in press doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01265x)
- Morrell J.M. (2006) Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Dom Anim* 41. 63-67.
- Pickett, B.W. & Amann, R.P. (1987) Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. *Eq Vet Sci*, 289-301.
- Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Le Vern Y., Kerboeuf, S., Desherces, E., Schmitt E. & Magistrini, M. (2008) High fertility rates with stallion sperm cryopreserved in INRA 96 based extender are not predicted by in vitro parameters. *Animal Reproduction Science* (in press doi: 10.1016/j.anireprosci. 2008.05.116)
- Pruitt, J.A., Arns, M.J. & Pool, K.C. (1993) Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37 °C) and cold-storage (5°C). *Theriongenology* 39, 291.
- Rigby, S.L., Varner, D.D., Thompson J.A., Love, C.C., Brinsko, S.P. & Blanchard, T.L. (2001) Measurement of sperm concentration in stallion ejaculates using photometric or direct sperm enumeration techniques. *AAEP Proceedings*. 47, 236-238
- Thorén, J. (2007) Utvärdering av en ny selektionsmetod för hingstesperma. EEF-arbete 2007:31 vid Institutionen för Anatomi, Fysiologi och Biokemi, SLU.
- Varner, D.D., Blanchard, T.L., Love, C.L., Garcia, M.L. & Kenney R.M. (1987) Effects of semen fractionation and dilution ration on equine spermatozoa motility parameters. *Theriongenology* 28. 709-723.