

Utvärdering av en ny selektionsmetod för hingstsperma

Med avseende på membranintegriteten och membranstabiliteten

Josefina Thorén

**Handledare: Anders Johannisson
Inst. för Anatomi, Fysiologi och Biokemi
Biträdande handledare: Anne-Marie Dalin, Jane Morrell &
Heriberto Rodriguez-Martinez
Inst. för Kliniska Vetenskaper,
Avd för Reproduktion**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
ABSTRACT.....	2
INLEDNING	2
Seminverksamheten i Sverige.....	3
Fertilitetsmått	3
Olika selektionsmetoder av sperma – för och nackdelar	4
Centrifugering	5
Självmigration (Swim-up)	5
Adherensteknik	5
Gradientcentrifugering.....	6
Single Layer Centrifugering	6
Färgningar	6
SYBR-14/PI.....	6
Annexin/PI.....	7
Syfte	7
MATERIAL OCH METODER	7
Hingstar och spermiesamling.....	7
Single Layer Centrifugering (SLC)	8
Laboratorieanalys / experimentell design	8
Integritet hos spermiernas plasmamembran	8
Stabilitet hos spermiernas plasmamembran.....	9
Statistisk analys.....	11
RESULTAT	11
Koncentration och subjektiv motilitet.....	11
Fertilitet.....	11
Hingstarna	11
Plasmamembranintegritet, SYBR-14/PI.....	13
Plasmamembranstabilitet, Annexin/PI.....	14
DISKUSSION.....	17
KONKLUSION	19
TACK.....	19
LITTERATURFÖRTECKNING.....	20

SAMMANFATTNING

Idag avlar man framförallt på prestation och exteriör inom hästaveln. Detta medför att fertiliteten varierar mycket mellan avelshästar med kännbara ekonomiska förluster som följd. Hästaveln är därför i behov av metoder för att kunna diagnostisera sperman med avseende på dess kvalitet och få fram de bästa spermerna att använda vid insemination. De vanligaste metoderna som finns idag för spermaselektion är *enkel centrifugering*, som innefattar spädning, centrifugering och återspädning, *själv migrering (swim-up)*, *adherensseparering* och *gradientcentrifugering*. Ingen av dessa används dock ute på hingststationer med seminverksamhet.

Syftet med studien var att utvärdera en ny selektionsmetod, Single Layer Centrifugering, SLC, med avseende på spermens viabilitet. Detta har gjorts genom att analysera membranintegriteten och membranstabiliteten på ejakulerade spermier före och efter SLC. Syftet var också att se hur kylförvaring vid 5°C påverkade centrifugerad och ocentrifugerad sperma med avseende på membranintegriteten och membranstabiliteten under 48 timmar.

SLC är en selektionsmetod som liknar gradientcentrifugering men endast ett lager kolloid används istället för två eller flera. De motila spermerna förflyttas genom kolloiden vid centrifugering och kan därför särskiljas från övrigt såsom eptielceller, immotila spermier, sädesvätska etc som fastnar och kan avlägsnas.

I studien ingick tre (3) varmblodiga travhingstar. 7-12 år gamla. Totalt tio ejakulat, tre från två av hingstarna och fyra från den tredje, samlades under våren 2007. Hingstarna ingick samtidigt i den reguljära seminverksamheten. Ejakulaten analyserades med avseende på koncentration och motiliteten bedömdes subjektivt innan SLC. Därefter analyserades spermernas membranintegritet och membranstabilitet, både i ocentrifugerade och centrifugerade prover, med hjälp av infärgningarna SYBR-14/PI respektive Annexin-V/PI i en flödescytometer vid tidpunkterna 0, 24 och 48h. Fyra grupper av spermier erhöles av Annexin-V/PI-analysen: levande spermier med stabilt membran (Annexin-V-negativa [AN-]/PI-negativa [PI-]), spermier med instabilt men helt membran (Annexin-V-positiva [AN+]/[PI-]), spermier med skadat cellmembran men som ej fullständigt gått i nekros ([AN+]/PI-positiva [PI+]) och de som hade helt skadat cellmembran (AN-/PI+). Tre grupper erhöles av SYBR-14/PI-analysen: levande celler (SYBR-14+/PI-), döende celler (SYBR-14+/PI+) och döda celler (SYBR-14-/PI+).

Resultatet visade att den centrifugerade sperman hade signifikant större andel levande spermier med avseende på membranintegritet än den ocentrifugerade sperman vid alla tre analys-tidpunkterna. För membranstabiliteten var skillnaden ej signifikant vid 0h och 24h. Vid 48h hade dock centrifugerad sperma signifikant fler levande spermier med stabilt membran än ocentrifugerad sperma. Resultaten visade också att ocentrifugerad sperma klarade sig sämre vid kylförvaring vid 5°C än centrifugerad sperma. Detta gör att man ej kan analysera ett ocentrifugerat spermprov 24h efter samling och få ett representativt värde på viabilitet.

ABSTRACT

Today, equine breeding is based on performance and conformation, resulting in a vast variation in fertility among different horses, with noticeable economic losses as a consequence. The horse breeding industry is therefore in need of methods that diagnose the spermatozoa concerning their quality and provide the best sperm for AI. The commonly used selection methods for sperm today are: centrifugation, where extender is added, the sample is centrifuged and then resuspended; swim-up self-migration; adherence separation; and density gradient centrifugation. However, none of these methods are in used routinely in practice before inseminating mares with fresh or cooled semen.

The aim of this study was to evaluate a new selection method, Single Layer Centrifugation (SLC), and its effect on sperm viability. The viability was analyzed with regard to membrane integrity and membrane stability of ejaculated spermatozoa. The aim was also to investigate how storage at 5°C affected non-centrifuged and centrifuged semen regarding sperm membrane integrity and stability during 48 h.

The SLC is a sperm selection method based on the principles of density gradient centrifugation but where only one layer of colloid is used instead of two or more layers of various densities. The motile spermatozoa traverse the colloid during centrifugation while epithelial cells, immotile spermatozoa, seminal plasma etc. are trapped i.e they do not pass and can thus be removed.

This study included (3) Swedish warmblood stallions, 7-12 years old. Ten ejaculates were collected in May 2007, three ejaculates from each of two stallions and four from the third. Ejaculates were collected from the stallions regularly during the breeding season as part of a commercial enterprise. After collection, sperm concentration and subjective motility were assessed before SLC. The membrane integrity and stability were evaluated with the fluorescent dyes SYBR-14/PI and Annexin-V/PI respectively using flow cytometry at 0h, 24h and 48h. Four groups of spermatozoa were obtained by the Annexin-V/PI-assay: intact, living spermatozoa (AN-/ PI-), spermatozoa with unstable membrane (AN+/ PI-), spermatozoa with damaged membrane but not entirely necrotic (AN+/ PI+) and dead spermatozoa (AN-/ PI+). Three groups of spermatozoa were obtained by the SYBR-14/PI-assay: living spermatozoa (SYBR-14+/PI-), moribund spermatozoa (SYBR-14+/PI+) and dead spermatozoa (SYBR-14-/PI+).

The results of the study showed that semen that had been centrifuged had a significantly greater proportion of living spermatozoa than non-centrifuged semen regarding membrane integrity at all three timepoints. The difference in results based on membrane stability was not significant at 0h or 24h. However, at 48h the proportion of living sperm was significantly larger in centrifuged semen than in non-centrifuged semen. This makes it unlikely that a non-centrifuged semen sample analyzed 24h after collection will get a true value regarding its viability.

INLEDNING

Bland de hingstar som är verksamma i avel idag har en del bättre och en del sämre kvalitet på sin sperma. Alla anses dock ha värdefulla arvbara egenskaper som vi vill föra vidare. Dessa egenskaper rör framförallt prestation och är bara delvis relaterade till fruktsamhet. För att öka fertiliteten även bland hingstar vars sperma

klaras sig sämre vid kylförvaring vore det bra med en selektionsmetod för att få fram så bra spermier som möjligt. En stor del av den artificiella inseminationen utförs idag med kyld sperma (Avelsföreningen Svenska Varmblodiga Hästen, 2007; B. Anderson, personligt meddelande, 2007) och det är då viktigt att denna klarar av att förvaras den tid det tar för eventuell transport från hingsten till stoet utan att spermier förlorar alltför mycket av sin befruktningsförmåga. Då hästen huvudsakligen avlas med avseende på härstamning och prestation föreligger en stor variation i fertiliteten mellan olika hingstar (Malmgren, 1994; Colenbrander *et al.*, 2003; Loomis, 2006). Detta kan bero på en mängd olika faktorer t.ex. hingstens libido, betäckningsmetod: naturlig eller artificiell insemination, hantering av hingsten och självklart även spermakvalitén (Malmgren, 1994).

En varmblodshingst producerar ca 4-6 miljarder spermier per dag. Produktionen varierar beroende på hingstens ålder och årstid (lägre produktion på vintern). Hingstar som producerar mindre än 3 miljarder spermier/dag anses ha låg spermieproduktion (Malmgren, 1994). Vad som är ett representativt mått på spermiekvalitet har diskuterats i flera studier (Malmgren, 1994; Graham, 2001; Colenbrander *et al.*, 2003). Det vanligaste är att man uppskattar spermernas motilitet med hjälp av ett faskontrastmikroskop som ett mått på kvaliteten. Detta tillsammans med koncentrationsbedömning och spädning är det enda som görs i praktiken ute på seminstationerna innan insemination med färsk eller kyld sperma. Nackdelen med motilitetsanalysen är att den är subjektiv och resultatet varierar beroende på vem som utför bedömningen (Malmgren, 1994).

Seminverksamheten i Sverige

Inom halvblod- och varmblodsaveln i Sverige används artificiell insemination i stor utsträckning. På ASVH's hemsida 2007 kan man läsa att 184 hingstar fanns tillgängliga via semin av totalt 210 verksamma hingstar inom halvblodsaveln 2006. Antalet inseminerade ston var 4944 stycken (92%) av totalt 5365 betäckta ston. Av dessa betäcktes 473 ston med sperma importerad från utlandet. År 2005 var 70% av de verksamma hingstarna inom halvblodsaveln tillgängliga via kyld transportsperma och 3116 ston inseminerades med kyld transportsperma från dessa. För de varmblodiga travarna hade 155 hingstar betäckningstillstånd 2006. Totalt antal betäckningar var 4700 varav endast 292 (6%) var med naturlig betäckning och 738 (16%) var med fryst sperma. Kyld transportsperma stod för 33% och färsk sperma stod för 45% av alla inseminationer (B. Andersson, personligt meddelande, 2007).

Fertilitetsmått

Nötkreatur har systematiskt avlats med hänsyn till exteriör och produktionsegenskaper men även fruktsamhetsmått har betydelse. Detta gör att tjurar som sätts in i avel i allmänhet har bättre fertilitet än avelshingstar. För att säkert kunna ange ett mått på en hingsts fertilitet krävs statistik från hingstens betäckningsverksamhet t.ex. antal levande födda föl eller antal dräktigheter per säsong. Dessa mått påverkas också av andra faktorer såsom stoets fertilitet och den veterinära kompetensen (Malmgren, 1994; Colenbrander *et al.*, 2003). Fertiliteten kan fastställas när hingsten varit verksam minst en säsong, alltså inte innan den sätts in i avel. Innan hingstens avelsverksamhet påbörjas utförs en avelsutvärdering där man undersöker hingstens libido, betäckningsförmåga, testikelstorlek, spermieproduktionskapacitet och spermiekvalitet (normal motilitet och morfologi). Denna undersökning bidrar framförallt till att upptäcka subfertila

hingstar eller hingstar som är direkt olämpliga till avel (Colenbrander *et al.*, 2003).

En spermie kan vara ej befruktningsduglig av en mängd olika anledningar, t.ex. att den har för dålig motilitet, skadat akrosommembran eller felaktigheter i kärnan (Graham, 2001). Spermien måste vara kompetent på alla sätt för att kunna befrukta ett ägg. Det räcker således inte att bara undersöka en av dessa egenskaper för att uttala sig säkert om fertiliteten. Ju fler egenskaper som undersöks, desto säkrare (färre falska fertila) fertilitetsresultat kan förutsägas (Amann & Hammerstedt, 1993).

I denna studie har membranintegriteten och membranstabiliteten undersökts. Dessa är båda ett mått på spermiers viabilitet. Membranintegriteten, mätt med SYBR-14/PI, har tidigare använts som viabilitetsmått för nötspermier (Garner *et al.*, 1994) och andra arter såsom gris, får, kanin, mus och människa (Garner & Johnson, 1995) samt för hingst spermier (Merkies *et al.*, 1998; Love *et al.*, 2003). Om cellmembranet på spermier skadas kan spermien ej upprätthålla den nödvändiga homeostasen i förhållande till sin omgivning. Den kommer då att läcka enzymer och metaboliter samtidigt som ämnen från sädesvätskan eller spädningssvätskan kan komma in i spermien (Colenbrander *et al.*, 1992). Detta gör att de ej kan fungera normalt och dör förr eller senare.

Även om cellmembranet är intakt kan dess stabilitet rubbas. Graden av stabilitet i framförallt cellens lipidkomponenter har analyserats med fluoroforena Annexin-V/PI hos människa (Vermees *et al.*, 1995) och flera djur (gris: Peña *et al.*, 2003; hingst: Nilsson, 2003 och träskbuffel: Koonjaenak *et al.*, 2007). Detta verkar identifiera vilka spermier som har intakta membran, d.v.s. levande, men som visar tidiga rubbningar i membranstabilitet och därmed kan få ett skadat cellmembran. Metoderna kompletterar således varandra.

Olika selektionsmetoder av sperma – för och nackdelar

Sieme *et al.* (2003) visade att separationstekniker där sperma delades upp i olika subpopulationer efter motilitet gynnade hållbarheten av sperma vid kylförvaring. Gruppen såg att separerad sperma hade bättre motilitet och membranintegritet efter 48h jämfört med enbart centrifugerad och spädd sperma. Detta stöds av tidigare studier av olika separationstekniker som visat att fria radikaler bildas i sperma som ej separerats före centrifugering. Den mekaniska påverkan som centrifugeringen innebär stimulerar frisättning av fria radikaler från vissa spermier som har nedsatt motilitet och kapacitering. De fria radikalerna perforerar membranet på närliggande celler som dör (Aitken & Clarkson, 1988). För att få bättre hållbarhet på sperma som skall kylförvaras vore det optimalt att kunna selektera fram den mest viabla subpopulationen spermier av ejakulatet.

Trokey & Merilan (1982) visade att döda spermier har negativ effekt på levande spermiers motilitet och överlevnad genom att tillsätta köldshocksavdödade spermier till viabla. För att förbättra överlevnaden vid förvaring av sperma finns det olika metoder att skilja sädesvätskan från spermier och att skilja ut de levande spermier från de döda eller skadade (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997). De vanligaste är:

- ◆ enkel centrifugering som innefattar spädning, centrifugering och återspädning
- ◆ självmigration genom swim-up

- ◆ adherensseparering
- ◆ gradientcentrifugering.

Centrifugering

Vid hantering av sperma som skall frysas centrifugeras ejakulatet för att få en högre koncentration av sperma för att kunna frysa in mindre volym, vanligen 0,5ml/strå (Squires, 2005). Centrifugering görs också för att få bort sädesvätskan som har en negativ inverkan på spermernas motilitet om den är kvar under frysförvaringen (Jasko, *et al.*, 1991). Brinsko *et al.* (2000) visade också att centrifugering inför kylförvaring var positivt för spermernas motilitet hos de hingstar vars sperma inte tålde kylförvaring. Efter centrifugeringen erhålls en pellet bestående av spermier, andra celler och övriga fragment. Sädesvätskan separeras som supernatant ovanpå och kan pipetteras bort. För hård centrifugering kan medföra att spermerna återhämtar sig sämre då de packas tätare. För lös centrifugering medför ökad risk att spermerna sugas bort tillsammans med supernatanten. För att få fler motila spermier efter centrifugering utvecklades en "kuddteknik" 1984 (Cochran *et al.*) där ett lager av en tätare lösning lades under ejakulatet som skulle centrifugeras för att skydda spermerna från för hård packning. Denna teknik medförde bättre återhämtning av spermernas motilitet. Olika lösningar har prövats som "kudde" och resultatet har varit bra framförallt för hingstar som har låg spermimotilitet ($\leq 35\%$) efter upptining (Knop *et al.*, 2005). Efter centrifugering spädes pelleten med lämplig spädningsvätska till önskad koncentration.

Självmigration (Swim-up)

För att separera motila spermier från resten av ett ejakulat kan man använda swim-up teknik. Man placerar ett lager av ett medium ovanpå ejakulatet i ett provrör och låter sedan provet inkubera i 37°C-39°C i upp till en timme. Därefter samlar man försiktigt upp mediet och centrifugerar detta, varefter ytterligare spädnings sker (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997; Hallap *et al.*, 2005; Loomis, 2006). De motila spermerna simmar in i mediet medan immotila spermier, andra celler och fragment blir kvar under mediet. Man skiljer emellertid inte ut spermier med morfologiska förändringar eller felaktigt DNA så länge de rör sig normalt (Morrell, 2006). Tekniken efterliknar verkligheten då endast de spermier som har bäst motilitet fullbordar migreringen från livmodern till äggladaren och invaderar äggladaren (Loomis, 2006). Endast små doser kan fås ut genom swim-up, därför lämpar sig tekniken bäst för in-vitro-fertilisering eller intracytoplasmic sperm injection, ICSI (Loomis, 2006).

Adherensteknik

Tekniken bygger på att skadade och döda spermier klistras fast på glasytor och binder till laddade sockerarter (Mortimer, 1994). Då levande och döda spermier har olika laddning på sina membraner kan de döda spermerna fångas upp i gelen (Loomis, 2006). Anzar och Graham (1993) analyserade tjursperma som filtrerats genom olika filterkombinationer. De kom fram till att en kombination av en gel gjord av sockerarter, Sephadex, och olika laddade celluloser gav bäst resultat vad gällde separationen av spermier med hög motilitet och viabilitet. En filtreringskolumn består av en spruta med glasfiber längst ner. Ovanpå denna läggs gelen och sist placeras sperman som skall filtreras. Med hjälp av pumpar

filtreras sedan sperman genom de olika lagren. Andra filtreringsgeler såsom Leucosorb® har senare utvärderats för spädd sperma med gott resultat vad gäller spermiers motilitet och membranintegritet (Sieme, 2003).

Gradientcentrifugering

Genom att centrifugera sperma genom lager av flera kolloider med olika densitet kan man få fram olika subpopulationer av sperma. De motila spermerna hamnar längst ned i pelleten medan immotila spermier och andra celler stannar i eller mellan kolloidlagren (Loomis, 2006; Morrell, 2006) Den mest använda kolloiden till in-vitro-försök är Percoll (Kabi-Pharmacia, Uppsala, Sverige) men då den har visat sig innehålla endotoxiner får den ej användas till insemination efter att in-vitro studier utförts på humanspermier (Mortimer, 1994). Avery och Greve (1995) såg i sin studie på tjursperma att det eventuellt finns en annan orsak till sämre fertilitetsresultat när Percoll används som separeringsmetod. De ansåg att polyvinylpyrrolidon, PVP, som täcker silikapartiklarna i kolloiden och förekommer fritt i viss mängd skulle kunna fastna på spermerna. Detta skulle därmed kunna hindra spermerna från att binda till oocyten med sämre fertilitetsresultat som följd. En annan täthetsgradient är EquiPure™ 100 (NidaCon International AB, Göteborg, Sverige) som testats för separering av hingstspermier med bra resultat vad gäller motilitet och morfologi (Macpherson *et al.*, 2003). Man såg då också att olika typer av morfologiska förändringar återfanns i de olika täthetsgradienterna, t.ex. fastnade spermier med lösa huvuden, proximala droppar eller prematura spermier i den 40 % kolloiden medan spermier med onormala huvuden, böjda svansar eller onormala mittstycken fastnade lika mycket i den 40 % kolloiden som i den 80 % kolloiden.

Single Layer Centrifugering

Centrifugeringsmetoden som användes i detta försök var Single Layer (SLC), en metod som separerar motila spermier från resten av ejakulatet. Den bygger på att man har ett lager av en viss täthetsgradient, en kolloid i ett centrifugrör. Ovanpå detta lager pipetteras försiktigt över en liten mängd av det spädda ejakulatet. Vid centrifugering kommer de levande motila spermerna att hamna i pelleten, d.v.s. längst ner i röret, pga att de förflyttas i riktning mot centrifugalkraften. Detta skiljer spermerna från epitelceller, vita blodkroppar, bakterier och celldebris som har en annan densitet. Sädessvåtskan hamnar längst upp i röret (Morrell, 2006).

Färgningar

För att analysera spermier med hjälp av en flödescytometer krävs att de färgas in med fluoroscerande ämnen. För att analysera spermiers plasmamembrans integritet kan SYBR-14 tillsammans med Propidiumjodid (PI) användas (Garner, 1994). Plasmamembranstabiliteten kan analyseras med hjälp av Annexin V-FITC tillsammans med PI (Vermees *et al.*, 1995).

SYBR-14/PI

Sybr-14 är en membranpermeabel färgning som tränger in i kärnan i levande (intakta) celler och binder till nukleinsyra i DNA. Vid bindning till DNA fluorescerar färgen grönt. Propidiumjodid är också en DNA-färgning med den tar sig endast in till kärnan på celler som är döda, d.v.s. med trasigt cellmembran (ointakta). PI fluorescerar vid bindning till DNA rött (Garner *et al.*, 1994). Tre olika grupper av celler kan erhållas med hjälp av infärgningskombinationen,

levande celler (SYBR-14+/PI-), döende celler (SYBR-14+/PI+) och döda celler (SYBR-14-/PI+) (Garner & Johnson, 1995).

Annexin/PI

Denna kombinationsfärgning består av Propidiumjodid som beskrivits ovan, och Annexin-V-fluorescein isothiocyanat (FITC). När ett cellmembran destabiliseras sker en del förändringar bland de fosfolipider som bildar membranet. Normalt skall bl.a. membranfosfolipiden fosfatidylserin (PS) finnas i cellmembranets insida. Vid förändringar i det stabila läget rör sig fosfolipider och då kan membranfosfolipiden fosfatidylserin (PS) flyttas från cellmembranets insida till dess utsida. Annexin-V binder till denna fosfolipid om den finns på utsidan och den fluorescerande markören FITC kan därmed analyseras i en flödescytometer. På detta sätt kan man detektera celler som befinner sig tidigt i destabiliseringsprocessen (Peña *et al.*, 2003). Annexin-V binder emellertid även till PS från döende eller döda celler som har skadat cellmembran och där läckage av intracellulära molekyler förekommer. Därför används Annexin-V tillsammans med PI som endast färgar in döda celler. På detta sätt kan man skilja ut celler som är levande och har stabilt membran (Annexin-V-negativa [AN-]/PI-negativa [PI-]) från de som precis påbörjat en destabilisering som kan leda till döden (Annexin-V-positiva [AN+]/[PI-]) och från de som har skadat cellmembran men ej har gått helt i nekros([AN+]/ PI-positiva [PI+]) och de som helt nekrotiserat (AN-/PI+) (Vermees *et al.*, 1995). Då Annexin V och PI till viss del färgar in andra fragment än celler används en tredje fluorescerande färg, Hoechst 33342. Hoechst 33342 har tidigare använts tillsammans med Annexin-V för att analysera träskbuffelspermier (Koonjaenak *et al.*, 2007) och galtspermier (Saravia *et al.*, 2007). Hoechst 33342 är en membranpermeabel fluorofor som färgar in doxyribonukleinsyra (DNA). Genom att bara inkludera de spermier som tagit upp Hoechst i dataanalysen utesluts det som ej är spermier men som eventuellt tagit färg av Annexin och/eller PI.

Syfte

Morrell (2006) har föreslagit att SLC skulle kunna användas inom artificiell insemination på djur då det är enklare och snabbare än gradientcentrifugering men ändå selekterar fram viabla spermier. I en tidigare delstudie i detta hingstprojekt framkom att det ej är någon skillnad mellan selektionsmetoderna SLC och gradientcentrifugering med avseende på spermiers motilitet (Pettersson, 2007) och kromatinstabilitet (Hammar, 2007). Nuvarande delprojekt är en fortsatt studie av SLC-metoden där spermiernas viabilitet i kyld sperma har analyserats. Syftet var att jämföra viabiliteten hos ocentrifugerad sperma med sperma som centrifugerats med SLC med avseende på plasmamembranintegritet och plasmamembranstabilitet. Denna studie ses som en del i utvärderingen av SLC för att få fram en metod för att förbättra kvalitén på oelekterad hingstesperma. Syftet var också att se hur kylförvaring under 24 och 48 timmar påverkade ocentrifugerad och centrifugerad sperma med avseende på plasmamembranintegriteten och plasmamembranstabiliteten.

MATERIAL OCH METODER

Hingstar och spermiesamling

Etiskt tillstånd hade erhållits från den Försöksdjursetiska nämnden innan försökets början. I studien användes sperma från tre olika hingstar av rasen varmblodig

travare. De tre hingstarna stod på Västerbo Stuteri, Heby och var mellan 7 och 12 år gamla. Samlingarna skedde i maj 2007. Totalt samlades tre ejakulat från vardera två hingstar och fyra ejakulat från en tredje hingst. Samlingarna utfördes alltid av samma person enligt gängse rutiner med en artificiell vagina. Ejakulaten kodades.

Det tillgängliga ejakulatet späddes 1:1 med Kenneys spädningsvätska (till 100ml vatten tillsattes 4,9 g glucose, 2,4 g skummjölkspulver, 0,15 g dehydrostreptomycin och 0,15 g penicillin)(Kenney *et al.*, 1975) som värmts till 37°C. Under transporten till laboratoriet vid SLU i Uppsala förvarades sperman i en frigolitlåda som skydd mot ljus och temperaturväxlingar. För att kontrollera att sperman hade normal andel motila spermier bedömdes spermernas motilitet subjektivt i ljusmikroskop med värmeplatta (37°C). Koncentrationen räknades i rå sperma med hjälp av Spermacue (Minitub, Tiefenbach, Tyskland) och i spädd sperma manuellt i en Bürkerkammare som grund för vidare spädnings för att få en optimal koncentration för SLC. Tiden från samling på stuteriet till analysstart på laboratoriet i Uppsala av membranintegritet och membranstabilitet i första provet var ca 2h.

Fertilitetsdata för de aktuella hingstarna tillhandahölls från Västerbo Stuteri under hösten 2007.

Single Layer Centrifugering (SLC)

Av det spädda ejakulatet som innehöll ca 100 miljoner spermier/ml centrifugerades 1,5ml med single-layer metoden enligt följande: först tillsattes 4 ml av en högdensitetskolloid (patentsökning pågår) i ett centrifugrör upp till 40 mm högt. Därefter pipetterades 1,5 ml av ejakulatet försiktigt ovanpå. Centrifugering skedde vid 300 x g i 20 minuter. Därefter avlägsnades sådesvätskan och det mesta av täthetsgradienten. Pelletten bestående av spermier överfördes till ett nytt rör och späddes med 1 ml Kenneys spädningsvätska. (Morrell & Geraghty, 2006).

Laboratorieanalys / experimentell design

Efter centrifugering erhöles ett spermieprov som analyserades. Även ett prov med ocentrifugerat ejakulat analyserades (spätt 1:1 med Kenneys buffertmedium). Analyserna genomfördes vid 0, 24 och 48 timmar efter centrifugering. Proverna förvarades mellan analystillfällena i Ellermanrör i kylskåp (5°C). Vid varje analystillfälle överfördes av varje prov 250µl till varsitt eppendorffrör. Dessa späddes sedan med 2750µl Cellwash (Becton Dickinson, San José, CA, USA) för att sedan centrifugeras i 10 min i 400 x g. Supernatanten hälldes bort och pelletten resuspenderades med 1 ml Cellwash.

Integritet hos spermernas plasmamembran

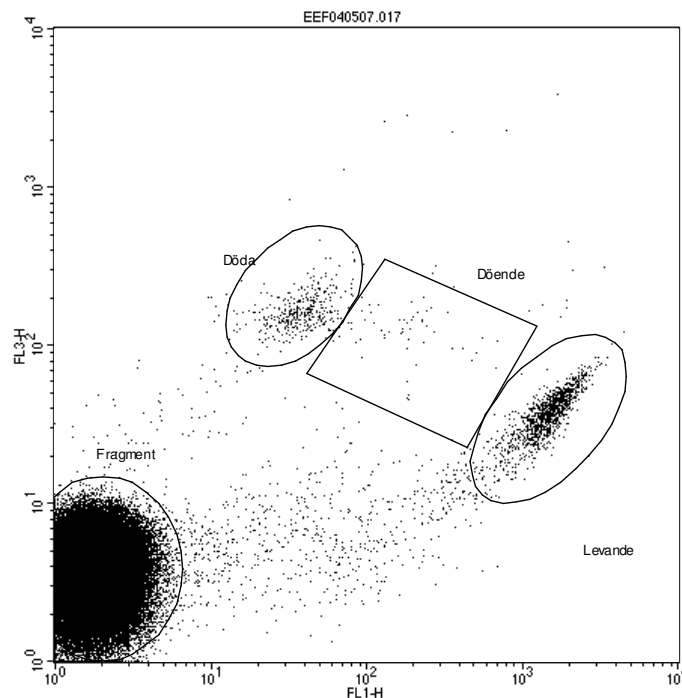
Av varje spermieprov överfördes 300 µl till olika plaströr. En färgkombination av SYBR-14 och Propidiumjodid användes (Live/Dead® Sperm Viability Kit L-7011; invitrogen™, Inc., Eugene, OR, USA). SYBR-14 lösningen späddes 1:50 med Cellwash innan 1,5µl av denna färg tillsattes proverna. Lika stor volym PI tillsattes proverna som sedan inkuberades 10 min i 37° i mörker. Därefter förvarades proverna i mörker i rumstemperatur (22°) fram till analys (1-30 min). Flödescytometeranalys utfördes i en LSR flödescytometer (Becton Dickinson, San José, CA, USA) utrustad med standardoptik. Grön fluorescens (FL1) och röd fluorescens (FL3) mättes för varje händelse (spermie). FL1 mättes som ett mått på

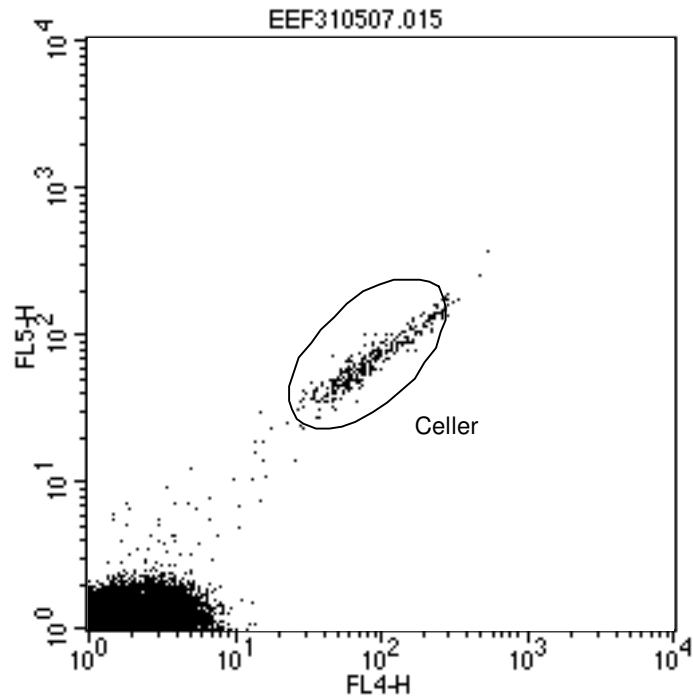
SYBR-14-positiva spermier och FL3 som ett mått på PI-positiva spermier. Från varje prov analyserades ca 10000 spermier och resultaten presenterades i % av totalantalet analyserade spermier. Resultaten delades in i levande celler (SYBR-14+/PI-), döende celler (SYBR-14+/PI+) och döda celler (SYBR-14-/PI+) se fig.1.

Stabilitet hos spermiernas plasmamembran

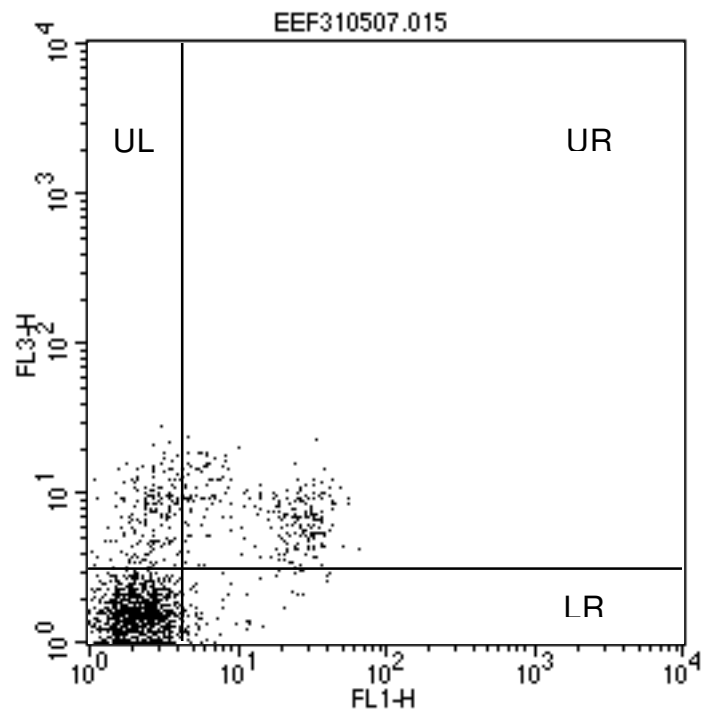
För analysen användes material från Apoptosis detection kit I (Pharmlingen, San Diego, CA, USA). Av spermieproven överfördes 30 µl till olika plaströr och sedan tillsattes 70 µl bindningsbuffert (spädd 1:10 med destillerat vatten). Därefter tillsattes 5 µl Annexin V, 2 µl PI (50µg/ml) och 2 µl Hoechst 33342 (1mg/ml) till alla rör. Som kontroller användes tre extrarör vid varje tillfälle och de tillsattes antingen Annexin V och Hoechst 33342, PI och Hoechst 33342 eller Hoechst 33342. Rören inkuberades i mörker i 15 min vid rumstemperatur. Därefter tillsattes 400µl bindningsbuffert till alla prover. De analyserades sedan inom 30 min. Analys skedde med laservåglängderna 488nm och 325 nm i en LSR flödescytometer (Becton Dickinson, San José, CA, USA). För varje cell mättes Annexin V-fluorescens (FL1), PI-fluorescens (FL3) och Hoechst 33342-fluorescens (FL4 och FL5). Allt som inte färgats in med Hoechst 33342 uteslöts som icke-spermier, fig 2a. Analyserna bearbetades i dataprogrammet CellQuest version 3.3 (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Utifrån kontrollproverna bestämdes kvadranter i ett plot-diagram, fig. 2b. Resultaten delades in i levande spermier med stabilt plasmamembran (AN-/PI-), spermier med instabilt men intakt plasmamebran (AN+/PI-) och spermier med skada på plasmamembranet (AN+/PI+ och AN-/PI+).

Figur 1. Exempel på dot-plot diagram från flödescytometrin för SYBR-14 (FL1-H) och PI (FL3-H). Områden som analyserats är inom markeringarna.





Figur 2.a) Exempel på dot-plot diagram från flödescytometri för Hoechst 33342 (FL4-H och FL5-H) där infärgade spermier är markerade



Figur 2b) Exempel på dot-plot diagram för Annexin-V (FL1-H) och PI (FL3-H). UL = AN-/PI+, UR = AN+/PI+, LR = AN+/PI- och LL = AN-/PI-.

Statistisk analys

Data analyserades statistiskt med SAS-programpaketet, version 9 (SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA). Analyserna av de 90 observationerna utfördes med hjälp av variansanalys (PROC MIXED). Den statistiska modellen inkluderade de fixa effekterna av hingst (n=3), tidpunkt (0h, 24h och 48h efter initial spädning), behandling (ocentrifugerad, och centrifugerad) samt samspelet mellan tidpunkt och behandling. Därtill inkluderades den slumpmässiga effekten av ejakulat (inom hingst) i modellen. För varje nivå av de fixa effekterna beräknades s.k. Least squares medeltal (=balanserade medeltal). Parvisa jämförelser (inkl. signifikanstester) av medeltalen gjordes, och differenserna ansågs vara signifikanta om $p < 0.05$. Den statistiska analysen utfördes av docent Nils Lundeheim, Institutionen för husdjursgenetik, SLU.

RESULTAT

Koncentration och subjektiv motilitet

Spermiekoncentrationen mätt med Spermacue låg mellan 100 – 200 miljoner spermier/ml för alla analyserade prover. Den subjektiva motiliteten bedömdes vara över 60 % i alla analyserade prover.

Fertilitet

De tre hingstarnas fertilitet var svår att bedöma då vissa av dem hade väldigt få ston under den aktuella månaden. Se tabell 1.

Tabell 1. Antal inseminerade och dräktiga ston för de olika hingstarna B, D och E för månaden maj 2007. AI = artificiell insemination med färsk sperma, TAI = artificiell insemination med transporterad kyld sperma.

	B	D	E
AI	1/3	13/18	11/14
TAI	1/2	1/3	9/10

Hingstarna

Den fixa effekten av enskild hingst påverkade ej resultatet av de olika variablerna signifikant, d.v.s. de tre hingstarna hade relativt lika resultat. Se tabell 2 som visar medelvärden på plasmamembranintegriteten för de olika hingstarna och tabell 3 som visar medelvärden på plasmamembranstabiliteten för de olika hingstarna.

Tabell 2. Plasmamembranintegritet: medelvärden av andel spermier för hingstarna B, D och E. Tidpunkterna 0h, 24h och 48h efter initial spädning för behandlingarna O = ocentrifugerad och C = centrifugerad.

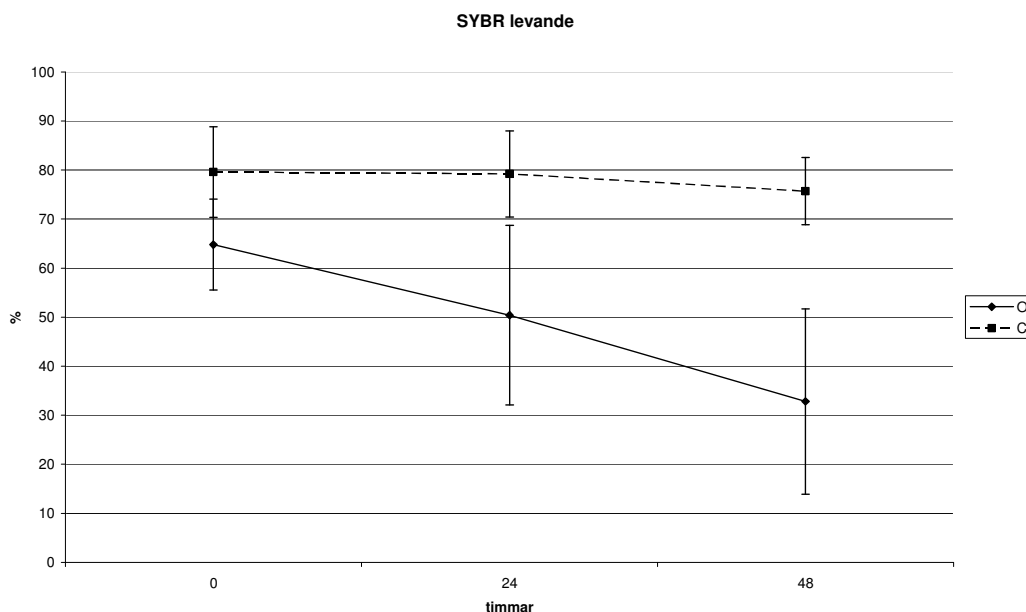
	Timmar	Behandl.	SYBR % levande	SYBR % döda	SYBR % döende
B	0	O	67,6	21,4	11,0
	24	O	64,0	20,5	15,5
	48	O	48,2	33,3	18,5
	0	C	77,7	18,4	3,9
	24	C	77,0	17,2	5,8
	48	C	74,6	19,7	5,6
D	0	O	69,2	25,5	5,3
	24	O	49,6	43,5	6,9
	48	O	25,3	69,2	5,5
	0	C	78,7	16,2	5,1
	24	C	76,1	17,5	6,4
	48	C	72,0	20,0	8,0
E	0	O	59,1	33,2	7,7
	24	O	40,7	51,1	8,2
	48	O	26,7	65,1	8,2
	0	C	81,4	15,2	3,4
	24	C	82,9	13,7	3,4
	48	C	79,1	16,3	4,6

Tabell 3. Plasmamembranstabilitet: medelvärden av andel spermier för hingstarna B, D och E. Tidpunkterna 0h, 24h och 48h efter initial spädning för behandlingarna O = ocentrifugerad och C = centrifugerad. (AN-/PI-) = levande spermier, (AN+/PI-) = spermier med instabilt membran, (AN+/PI+) = spermier med skadat membran, (AN-/PI+) = döda spermier

	Tid	Beh.	AN-/PI+	AN+/PI+	(AN+/PI+)+ (AN-/PI+)	AN- /PI-	AN+ /PI-	(AN+/PI+)+ (AN+/PI-)
B	0	O	19,1	2,9	22	76	2	5
	24	O	19,5	2,5	22	76,3	1,8	4,3
	48	O	29,8	2,6	32,4	66,2	1,3	4
	0	C	13,6	10,7	24,3	73,1	2,6	13,3
	24	C	12,8	11,4	24,2	71,6	4,2	15,6
	48	C	17,4	9,8	27,2	70,2	2,6	12,4
D	0	O	22,7	6,2	28,9	68,8	2,4	8,6
	24	O	30,3	2,5	32,7	32,7	1,8	4,3
	48	O	43,1	3,4	46,5	51,9	1,6	5
	0	C	14,9	10,4	25,4	71,6	3,1	13,5
	24	C	15,1	8,5	23,6	70,7	5,6	14,1
	48	C	18	6,4	24,4	73,3	2,3	8,7
E	0	O	28,4	5,2	33,7	64,7	1,6	6,8
	24	O	34,4	2,5	36,9	61,4	1,7	4,2
	48	O	43,1	3,1	46,2	52,9	1	4,1
	0	C	12,1	6,9	19	78	3	9,9
	24	C	11,7	4,8	16,4	78,5	5,1	9,9
	48	C	12,7	5,5	18,2	79,6	2,2	7,7

Plasmamembranintegritet, SYBR-14/PI

Det fanns ett signifikant samspel mellan tidpunkt och typ av behandling (ocentrifugerad och centrifugerad) Detta samspel påverkade andelen levande spermier signifikant ($p < 0.001$). Skillnaden mellan andel *levande spermier* (SYBR-14+/PI-) i det ocentrifugerade spermiprovet och i det centrifugerade var signifikant ($p < 0.01$) redan vid 0h. Då levde i medeltal 64,8 % av de ocentrifugerade (O) och 79,6% av de centrifugerade spermierna (C). Ingen signifikant skillnad vad gäller andel levande spermier i det centrifugerade provet sågs efter 24h eller 48h jämfört med vid 0h. I de ocentrifugerade proverna sjönk däremot andelen levande till 32,8% vid 48h vilket är signifikant färre levande än vid 0h för samma prov ($p < 0.001$). Se fig. 4.



Figur 4. Andelen levande spermier \pm standardavvikelser med SYBR-14/PI-färgning för de olika behandlingstyperna O = ocentrifugerad och C = centrifugerad vid 0, 24 och 48h.

Andel döende spermier (SYBR-14+/PI+) var signifikant fler från början i det ocentrifugerade provet än i det centrifugerade ($p < 0.01$). Samspelet mellan tidpunkt och typen av behandling hade ej signifikant effekt på andelen döende spermier. Utvecklingen med tiden var relativt lika för båda prover d.v.s. att andelen döende spermier ökade. Det var signifikant fler döende i det ocentrifugerade provet än i det centrifugerade vid alla tre tidpunkterna ($p < 0.01$). Se tabell 4.

De döda spermier påverkades signifikant av samspelet mellan effekterna tidpunkt och behandlingstyp ($p < 0.01$). Medelvärde för döda spermier (SYBR-14-/PI+) i det ocentrifugerade spermieprovet steg signifikant från 0h till 48h ($p < 0.001$). För det centrifugerade provet, som hade lägre andel döda spermier än det ocentrifugerade provet redan från början ($p < 0.05$), sågs ingen signifikant skillnad i döda spermier mellan analysiderna. Följaktligen sågs en signifikant skillnad mellan det ocentrifugerade provet och det centrifugerade provet vid 48h ($p < 0.001$) där det var färre andel döda i det centrifugerade provet. Se tabell 4.

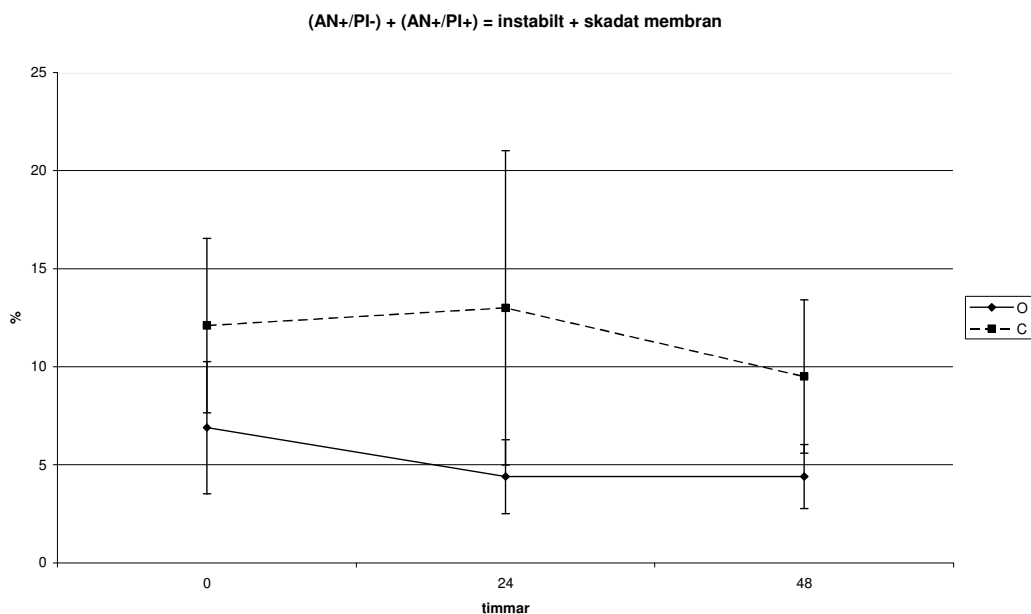
Plasmamembranstabilitet, Annexin/PI

För de spermier som ej färgat in alls (AN-/PI-) och därmed var *levande* med stabilt membran följdes de ocentrifugerade och de centrifugerade åt mellan 0h och 24h. Vid 24h sågs ingen signifikant skillnad i andelen levande spermier mellan det ocentrifugerade provet och det centrifugerade provet. Mellan 24h och 48h sjönk andelen levande spermier i det ocentrifugerade provet medan värdena i det centrifugerade ej ändrades signifikant. Detta medförde att det var signifikant fler levande i det centrifugerade provet efter 48h än i det ocentrifugerade provet ($p < 0.001$). Se tab. 4.

För de spermier som börjat få *instabilt men fortfarande hade intakt membran* (AN+/PI-) sågs ingen signifikant skillnad i det ocentrifugerade provet efter 48h

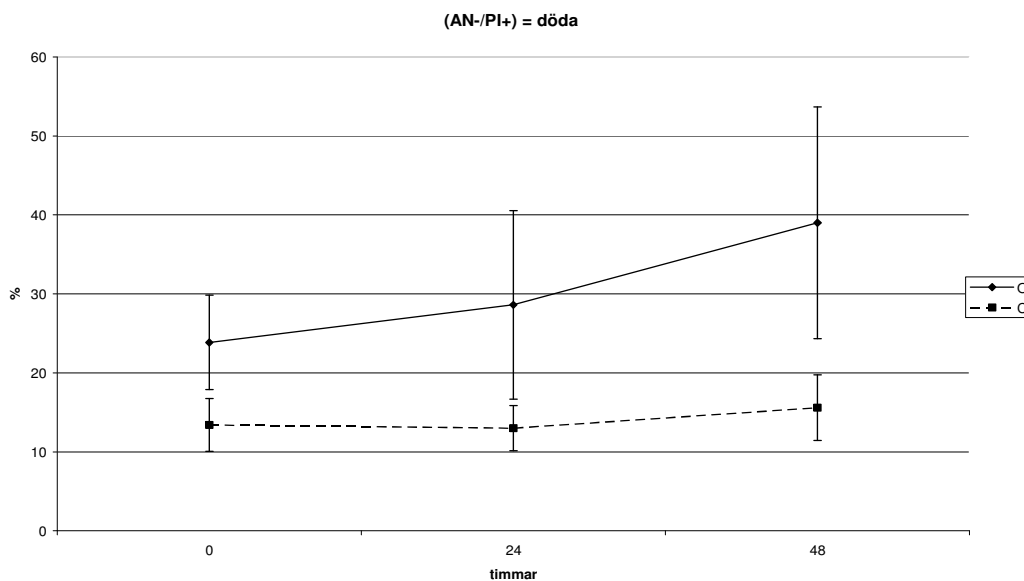
jämfört med vid 0h. Stora variationer i värdena förekom dock vid varje avlystillfälle (se tabell 4). Vid 24h hade andelen spermier med instabilt membran ökat i det centrifugerade så att det var signifikant skillnad jämfört med det ocentrifugerade provet ($p < 0.01$). Andelen instabila spermier sjönk åter vid 48h i det centrifugerade provet och det var ingen signifikant skillnad jämfört med det ocentrifugerade provet. Se tabell 4.

De spermier som hade *instabilt men intakt membran* (AN+/PI-) slogs ihop med de som börjat få *skadat membran* men ännu ej gått fullständigt i nekros (AN+/PI+) till en analysgrupp. Det centrifugerade provet låg signifikant högre generellt, dvs högre andel spermier befann sig ett stadium med instabilt alternativt skadat membran än i det ocentrifugerade provet vid alla tre tidpunkterna ($p < 0.05$). Ingen signifikant skillnad förelåg för det ocentrifugerade provet mellan 0h, 24h och 48h eller för det centrifugerade provet mellan samma analysstidpunkter. Se fig. 5.



Figur 5. Andel instabila (AN+/PI-) spermier och spermier med skadat membran men som ej gått fullständigt i nekros (AN+/PI+) \pm standardavvikelser för de olika behandlingstyperna O = ocentrifugerad och C = centrifugerad vid 0, 24 och 48h.

Döda spermier som gått fullständigt i nekros (AN-/PI+) återfanns i signifikant större andel i det ocentrifugerade provet än i det centrifugerade provet redan vid 0h ($p < 0.01$). Med tiden dog det av fler spermier i det ocentrifugerade än i det centrifugerade provet och efter 48h var skillnaden mer signifikant ($p < 0.001$). Se fig. 6. Detta var det enda provresultatet för membranstabilitet med signifikant påverkan av sambandet mellan tidpunkt och behandling ($p < 0.05$).



Figur 6. Andel döda spermier (AN-/PI+) ± standardavvikelser för de olika behandlingstyperna O = ocentrifugerad och C = centrifugerad vid 0, 24 och 48h.

Tabell 4. Medelvärden och standardavvikelser för de olika infärgningsvariablerna vid analysstidpunkterna 0, 24 och 48h. Levande spermier = (AN-/PI-), spermier med instabilt membran = (AN+/PI-), spermier med skadat membran = (AN+/PI+), döda spermier = (AN-/PI+), levande spermier = (SYBR-14+/PI-), döende spermier = (SYBR-14+/PI+), döda spermier = (SYBR-14-/PI+)

	O			C		
	0	24	48	0	24	48
AN-/PI-	69,2±8,2	67,0±12,2	56,5±14,7	74,5±7,6	74,0±10,4	74,8±5,5
AN+/PI-	2,0±0,5	1,7±0,9	1,3±0,8	2,9±0,5	5,0±3,7	2,4±1,5
AN+/PI+	4,9±3,3	2,6±1,3	3,2±1,1	9,2±4,4	8,0±5,6	7,2±2,9
AN-/PI+	23,9±6,0	28,6±11,9	39,0±14,7	13,4±3,3	13,0±2,8	15,6±4,2
(AN+/PI-)+ (AN+/PI+)	6,9±3,4	4,4±1,9	4,4±1,6	12,1±4,5	13,0±8,0	9,5±3,9
SYBR-14+ /PI-	64,8±9,3	50,4±18,3	32,8±18,9	79,6±9,2	79,2±8,8	75,7±6,8
SYBR-14+ /PI+	8,1±2,6	10,1±4,7	10,6±6,8	4,2±2,0	5,2±2,6	6,1±2,0
SYBR-14- /PI+	27,1±9,1	39,4±20,7	56,6±24,8	16,2±8,1	15,7±6,7	18,2±5,6

DISKUSSION

I denna studie användes två olika metoder för att bedöma spermiekvalitén. En metod analyserade spermiers membranintegritet och en metod analyserade spermiers membranstabilitet. Det centrifugerade provet hade genomgående bättre resultat med avseende på membranintegritet än det ocentrifugerade vid infärgning med SYBR-14/PI. Samspelet mellan tidpunkt och behandling påverkade alla analysresultat från SYBR-14/PI-infärgningen signifikant utom analysresultatet för döende spermier (SYBR-14+/PI+). Standardavvikelseerna var genomgående mindre för det centrifugerade provet än för det ocentrifugerade med SYBR-14/PI-färgning vilket visade att den centrifugerade sperman hade jämnare kvalitet än den ocentrifugerade.

Enligt Love et al. (2003) hade viabilitet (mätt med SYBR-14/PI) en hög korrelation till motiliteten hos hingst spermier. Motiliteten är det mått som används i störst utsträckning idag för att bedöma spermiers kvalitet på stuterier. Det är dock en väldigt subjektiv analysmetod då en person granskar spermier i faskontrastmikroskop och uppskattar motiliteten i procent. Inom forskningen används också CASA (computer-assisted sperm analysis) för en objektiv analys av spermiers motilitet. Eftersom motiliteten ej är ett säkert mått på spermiers fertilitet (Squires, 2005) undersöker man därför andra parametrar för att se om de har bättre korrelation till fertiliteten. I detta projekt har motiliteten analyserats med CASA men det ingår i en annan del av studien och redovisas ej här.

För analyserna som gjordes på Annexin/PI-färgade spermier är skillnaden mellan resultaten för ocentrifugerade och centrifugerade prover ej lika ofta signifikanta jämfört med skillnaden mellan resultaten för SYBR-14/PI. Generellt sågs dock att det centrifugerade provet hade fler levande spermier (AN-/PI-) än det ocentrifugerade och färre döda spermier (AN-/PI+). Resultatet för övergångsstadier med instabilt membran och skadat membran skulle kunna tolkas som att de centrifugerade spermier går i apoptos och dör av mer långsamt än de i det ocentrifugerade provet, därför sågs ökad andel av de centrifugerade spermier i dessa stadier (AN+/PI-) och (AN+/PI+) jämfört med i det ocentrifugerade provet. De spermier som genomgår SLC centrifugeras en gång mer än de som ej genomgår SLC. Detta kunde ej ses ha en negativ effekt på spermier då tendensen är att de centrifugerade proverna hade liknande eller bättre resultat som de ocentrifugerade vad gäller andel levande spermier. Det var dock fler spermier som var döda från början i det ocentrifugerade provet. En annan orsak till att resultatet av infärgningen med Annexin/PI gav större variationer och därmed lägre signifikansnivåer än SYBR-14/PI-färgningen kan vara att hingst spermier ej tål DNA-markören Hoechst 33342 eller att den tillsatts i för hög koncentration. I ett tidigare examensarbete om membranstabiliteten hos hingst spermier (Nilsson, 2003) fungerade metoden relativt bra men då användes ej Hoechst 33342 utan bara Annexin/PI för att färga spermier. Anzar et al. (2002) analyserade viabiliteten hos tjurspermier och visade att Annexin-V/PI-färgning hade lägre andel levande spermier än SYBR-14/PI-färgning. De antog att detta var för att Annexin-V/PI är en känsligare metod som skiljer på spermier i apoptos och helt levande spermier, vilket inte SYBR-14/PI gör. Det skulle kunna vara på samma sätt i vår studie då Annexin-V/PI har något lägre andel levande spermier än SYBR-14/PI. Anzar et al. (2002) visade också en hög korrelation mellan fertilitet och viabilitet mätt med Annexin-V/PI. I

vår studie är det svårt att dra några slutsatser mellan viabiliteten och fertiliteten då det är få hingstar med i försöket. De har dessutom haft väldigt få ston per hingst.

Om man centrifugerar ett ejakulat innan selektering av spermier får man alla komponenter i samma pellet, d.v.s. en blandning av fragment, döda och levande spermier och andra celler. Hingstspermiers plasmamembran innehåller mer omättade fettsyror än andra arters och är därför extra känsligt för oxidativ stress (Squires, 2005). Som tidigare nämnts drog Aitken & Clarkson (1988) slutsatsen i sin studie på humanspermier att det frigörs oxidativa ämnen från spermier med nedsatt motilitet och fertiliseringsförmåga vid centrifugering innan selektering. Dessa oxidativa ämnen, fria radikaler, påverkar de andra spermiernas funktion negativt. Resultatet av vår studie av SLC metoden stödjer teorin om att det är bra att selektera fram de mest viabla spermierna innan inseminering. Huruvida borttagandet av sädesvätskan är bra eller dåligt är omdiskuterat. Den har en naturlig funktion i att fungera som skydd till spermierna inne i livmodern (Loomis, 2006). Att ha kvar en del av sädesvätskan diskuteras också då den kan ha en stabiliserande effekt på spermiers plasmamembran och hindrar att spermien genomgår för tidig kapacitering under selekteringen (Maxwell *et al.*, 1997). Brinsko *et al.* (2000) såg att borttagandet av en del av sädesvätskan gav bättre motilitet efter förvaring än att ta bort all sädesvätska. Idag tillsätts alltid en spädningvätska till sperman inför kylning. Det är oftast en skummjölkbaserad lösning med Kenneys spädningvätska som grund och olika antibiotika tillsatt (Katila, 1997). Spädningvätskan skyddar spermierna mot sura nedbrytningsprodukter, hämmar tillväxt av bakterier och bidrar till en större inseminationsvolym. I en tidigare studie har man sett att spermiernas motilitet förbättrades efter ett dygn om sädesvätskan centrifugerats bort och skummjolkspädningvätska tillsatts direkt efter samling jämfört med om sädesvätskan fick vara kvar (Jasko *et al.*, 1991).

Det man vill uppnå med selektering av spermier är att få fram de mest fruktsamma spermierna. Vilka spermier som är mest fruktsamma går dock inte att svara på med endast en analyserad parameter då det är många olika egenskaper som spermien måste besitta för att vara fruktbar. T.ex. binder ej alla viabla spermier till zona pellucida på oocyten (Rodriguez-Martinez, 2003). Colenbrander *et al.* (2003) slår fast att en analys där flera parametrar analyseras på en gång skulle vara mer säkert i utvärderingen om en hingsts fertilitet. Vidare konstaterar de att idag finns det infärgningar för att analysera spermiers viabilitet, kapacitering, akrosom status, kromatinstabilitet och mitokondriefunktion i flödescytometer som går snabbt och mäter tusentals spermier per gång. Det gäller bara att utvärdera vilka som har högst korrelation till fertilitet.

Analys av spermieviabilitet kräver avancerad utrustning och kan därför inte göras ute på seminestationer. En frågeställning var därför hur ocentrifugerad kyld sperma påverkades av tiden, d.v.s. om det skulle vara möjligt att skicka in ett ocentrifugerat spermprov för analys av dess viabilitet och få ett sant resultat. Sperma som ej var centrifugerat innan kylförvaring vid 5° hade en sämre viabilitet efter 24 och 48h. I alla utförda analyser sjönk andelen levande spermier i det ocentrifugerade provet mellan 0h och 24h, tydligast var det dock med SYBR-14/PI-färgningen. Ett ocentrifugerat spermprov som skickas in för analys av dess viabilitet kommer inte att få ett sant resultat efter 24h, d.v.s. den tid som det skulle ta för ett prov att nå laboratoriet

Denna studie är gjord på relativt liten volym sperma. Det är självklart ett mål att även större ejakulatvolym vid SLC ger bra resultat. Detta för att metoden skall vara potentiellt användbar ute i fält, på stuterier där det ej är praktiskt möjligt ur en tidsmässig och resurskrävande aspekt att centrifugera så små volymer i taget som vi gjort här.

KONKLUSION

SLC med liten volym fungerade bra som selektionsmetod för hingstpermier då spermernas membranintegritet och membranstabilitet ej hade försämrats nämnvärt efter 48h jämfört med vid 0h. SYBR-14/PI-infärgningen gav ett resultat där centrifugerad sperma hade större andel levande permier än ocentrifugerad sperma. Annexin-V/PI-infärgningen gav ett resultat som hade något lägre andel levande permier än SYBR-14/PI-infärgningen men ändå större andel levande i det centrifugerade provet än i det ocentrifugerade. Kylförvaring påverkade ocentrifugerad sperma negativt då andelen levande permier sjönk markant efter 24h. Sperman som centrifugerats med SLC hade emellertid nästan lika hög viabilitet efter 24h som vid första analystillfället. Detta visar att man skulle ha bättre förutsättningar för befruktning om man selekterade sperman innan man skickade den kyld för insemination. Därför är även fertilitetsstudier på selekterad sperma av största intresse att utföra.

TACK

Tack till min huvudhandledare Anders Johannisson som funnits tillgänglig för diskussion och hjälp under hela projektperioden. Stundom med väldigt kort varsel!

Tack till biträdande handledare Anne-Marie Dalin och Jane Morrell för initiativ till projektet, diskussionsbollplank med mera! Även tack till kursare Maria Jönsson för sällskap vid spermatransport och diskussioner under arbetets gång.

Tack till biträdande handledare Heriberto Rodriguez-Martinez för konstruktiv kritik.

Tack till Nils Lundeheim för hjälp med den statistiska bearbetningen av provresultaten.

Tack till Susanne Demmers och Västerbo Stuteri för att vi fick tillgång till ejakulat från hingstarna.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aitken, R.J. & Clarkson, J.S. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9, 367-376.
- Amann, R.P. & Hammerstedt, R.H. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology*, 14, 397-406.
- Andersson, B. Avelsavdelningen, STC. 161 89, Stockholm, Sweden. E-mail: bjorn.andersson@travsport.se
- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G. & Pauls, K.P. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*, 66, 354-360.
- Anzar, M. & Graham, E.F. 1993. Filtration of bovine semen. I. Development of a Sephadex ion-exchange filter. *Animal reproduction science*, 31, 187-195.
- Avelsföreningen Svenska Varmblodiga Hästen. 2007-10-29 kl 11.34. http://www.asvh.se/avel/avel_info.htm, <http://www.asvh.se/document/betackningsaret06.htm>
- Avery, B. & Greve, T. 1995. Impact of Percoll® on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*, 44, 871-878.
- Brinsko, S.P., Crockett, E.C. & Squires, E.L. 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54, 129-136.
- Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P. & Pickett, B.W. 1984. Effect of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22, 25-38.
- Colenbrander, B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 305-311.
- Colenbrander, B., Fazeli, A.R., van Buiten, A., Parlevliet, J. & Gadella, B.M. 1992. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta vet. scand. Suppl.*, 88, 49-58.
- Garner, D.L. & Johnson, L.A. 1995. Viability assesment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* 53, 276-284.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Yue, S.T., Roth, B.L. & Haugland, R.P. 1994. Dual DNA - staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology*, Vol.15, No. 6, 620-629.
- Graham, J.K., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68, 239-247.
- Hallap, T., Negy, S., Håård, M., Jaakma, Ü., Johannisson, A. & Rodriguez-Martinez, H. 2005. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology*, 63, 1752-1763.
- Hammar, L. 2007. Kromatinstabilitet som grund för kvalitetsbedömning av hingstperma. Examensarbete vid Institutionen för Kliniska Vetenskaper, Fakulteten för Veterinärmedicin och Husdjursvetenskap, SLU. 1-15.
- Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E. & Squires, E.L. 1991. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, 35, 1059-1067.

- 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: technique and preliminary findings. *Proc.Am. Assoc.Equine Practice*, 327-336.
- Knop, K., Hoffmann, N., Rath, D. & Sieme, H. 2005. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Animal Reproduction Science*, 89, abstract 36, 294-297.
- Koonjaenak, S., Pongpeng, P., Wirojwuthikul, S., Johannisson, A., Kunavongkrit, A. & Rodriguez-Martinez, H. 2007. Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 67, 1424-1435.
- Loomis, P.R. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics Equine Practice*, 22, 663-676.
- Love, C.C., Thomson, J.A., Brinsko, S.P., Rigby, S.L., Blanchard, T.L., Lowry, V.K. & Varner, D.D. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 60, 1127-1138.
- Macpherson, M., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, Thompson, J.A. & Varner, D.D. 2003. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance semen quality of stallions. 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, Louisiana, USA. Internet publisher: International Veterinary Information Service (www.ivia.org), Ithaca; new York, USA. 21 nov 2003.
- Malmgren, L. 1994. Bedömning av hingstens fruktsamhet. Fakta Veterinärmedicin, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala. Nr 1.
- Maxwell, W.M., Welch, G.R. & Johnson, L.A. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, fertility and development*, 8, 1165-1178.
- Merkies, K., Chenier, T., Plante, C. & Buhr, M.M.2000. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology*, 54, 1215-1224.
- Morrell, J.M. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reproduction in Domestic Animals*, Vol.41, No. 1, 63-67.
- Morrell, J.M. & Geraghty, R.M. 2006. Effective removal of equine arteritis virus from stallion. *Equine Veterinary Journal* 38, 224-229.
- Mortimer, D. 1994. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 25-31.
- Nilsson, P. 2003. Tidiga membranförändringar i hingstesperma som används för artificiell insemination. Examensarbete vid Institutionen för Obstetrik och Gynekologi, Veterinärmedicinska fakulteten, SLU. 1-13.
- Peña, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M. & Rodriguez-Martinez, H. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 60, 677-689.
- Pettersson, J. Utvärdering av förbättrad metod för objektiv kvalitetsbedömning av spermimotoilitet hos hingst. 2007. Examensarbete vid Institutionen för Kliniska Vetenskaper, Fakulteten för Veterinärmedicin och Husdjursvetenskap, SLU. 1-11.

- Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B. & Pertoft, H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, fertility and development*, 9, 297-308.
- Rodriguez-Martinez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 312-318.
- Saravia, F., Hernández, M., Wallgren, M., Johannisson, A. & Rodriguez-Martinez, H. 2006. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *International journal of andrology*, 30, 485-499.
- Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R. & Klug, E. 2003. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 134-140.
- Squires, E.L. 2005. Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Animal Reproduction Science*, 89, 187-198.
- Trokey, D.E. & Merilan, C.P. 1982. Effect of added cold shocked cells upon the viability of pony stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 18, 723-725.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39-51.