

# **Utvärdering av viabilitet hos selekterad hingstsperma med hjälp av fluorometri**

**Hanna Björk**

**Handledare: Anders Johannisson  
Inst. för anatomi, fysiologi och biokemi, SLU  
Biträdande handledare: Anne-Marie Dalin,  
Jane Morrell samt Heriberto Rodriguez-Martinez  
Inst. för kliniska vetenskaper, avd. för reproduktion, SLU**



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Abstract.....	1
Inledning.....	2
Avel i Sverige idag – artificiell insemination.....	2
Kylt transportsperma.....	2
Fertilitet.....	2
Spermakvalitet.....	3
Datoriserad fluorometri.....	4
Single Layer Centrifugering.....	4
Målsättning.....	4
Material och metoder.....	5
Djurmaterial.....	5
Experimentell design.....	5
Centrifugering.....	5
Fluorometri.....	6
Statistisk analys.....	6
Resultat.....	7
Motilitet.....	7
Fluorometri.....	8
Korrelation viabilitet-motilitet.....	10
Diskussion.....	10
Tack.....	13
Litteraturförteckning.....	14

## **SAMMANFATTNING**

Hästaveln är inriktad på prestation vilket medför att det är stor variation på spermakvaliteten och fertiliteten hos de hingstar som används i avel. Den ökade användningen av kyld transportsperma vid artificiell insemination har resulterat i sjunkande dräktighetsresultat. Detta gör att det finns ett behov av att utvärdera och utveckla nya metoder för att kvalitetsbedöma samt kvalitetssäkra hingstsperma avsedd för semin. Denna studie är en del av ett större forskningsprojekt med just detta ändamål. Projektet drivs av SLU med bland annat Flyinge AB som samarbetspartner. Tio hingstar stationerade på Flyinge ingick i studien och från vardera hingst togs tre ejakulat. Ejakulaten analyserades totalt tio gånger vid olika tidpunkter, förvaringstemperatur samt med eller utan selektion. Selektion skedde genom Single Layer Centrifugering. Metoden som användes vid analys av sperman var datoriserad fluorometri med Hoechst 33258 som färgmarkör. Syftet med studien var att

- utvärdera spermernas viabilitet med respektive utan selektion av spermerna, vid olika tidpunkter och vid olika förvaringstemperatur.
- utvärdera om det finns någon korrelation mellan viabilitet och subjektiv motilitet.

Resultaten i denna studie vad gäller selektionsmetoden är intressanta. Den selekterade sperman har en högre motilitet och viabilitet över tid, framför allt efter 48h, än den oselekterade sperman ( $P < 0,0001$ ). Metoden att analysera viabiliteten hos hingstsperma med hjälp av datoriserad fluorometri är dock tveksam. Resultaten är ojämna och korrelation med motiliteten är totalt sett stark ( $r = -0,59$ ,  $P < 0,0001$ ) men saknas helt vid vissa tidpunkter och vissa behandlingar.

## **ABSTRACT**

There is considerable variation between stallions in semen quality and fertility due to the fact that selection of stallions for breeding is not based on fertility or semen quality but on performance. The increasing use of cooled semen for artificial insemination has resulted in decreasing pregnancy rates. Therefore the equine breeding industry needs new methods for evaluation and development of sperm quality and fertility. This study is a part of such a project and is performed by SLU in cooperation with Flyinge AB. Ten stallions at the Flyinge National Stud were used in the study and three ejaculates were collected from each stallion. The ejaculates were analyzed ten times under different conditions, such as time, storing temperature and with/without selection. The selection was carried out by Single Layer Centrifugation. The method for analysis of the spermatozoa was computerized fluorometry of Hoechst 33258-stained semen samples. The objective of the study was to:

- evaluate the viability with/without selection, at different times and at different storage temperatures.
- evaluate if there is correlation between viability and subjective motility.

The results of the selection experiments were interesting. Selected spermatozoa had a higher motility and viability after storage, especially after 48 h, than the unselected spermatozoa ( $P < 0,0001$ ). The method to evaluate stallion spermatozoa viability by computerized fluorometry showed various results and correlation between viability and motility was over-all significant ( $r = -0,59$ ,  $P < 0,0001$ ) but not significant under certain conditions.

## INLEDNING

### Avel i Sverige idag – artificiell insemination

Inom svensk hästavel, framför allt inom raserna svenskt halvblod och varmblodig travare, används artificiell insemination (AI) i stor utsträckning. Enligt ASVH (avelsföreningen för den svenska varmblodiga hästen) användes AI till 92 % av alla betäckta svenska halvblodsston i Sverige år 2006. Motsvarande siffra från STC (svenska travsportens centralförbund) beträffande varmblodiga travarston var 94 %. Fördelarna med AI är många, man minskar risken för skador vid betäckning samt risken för smittspridning eftersom hästarna inte behöver träffas. Dessutom kan man utnyttja en populär hingst till fler ston än vad som är möjligt vid naturlig betäckning. AI görs antingen direkt med färsk spädd sperma, med kyld transportsperma inom ett cirka dygn efter samling (TAI) eller med fryst sperma som kan förvaras en längre tid innan upptining och insemination. De två sista alternativen medför dessutom att man slipper transportera stoet någon längre sträcka samt att man kan använda hingstar från andra länder. De senaste åren har användningen av TAI ökat. År 1995 inseminerades 30 % av de svenska halvblodsstona, enligt ASVH, och 23 % av travarstona, enligt STC, med kyld transportsperma och motsvarande siffror år 2006 var 63 % respektive 33 %. I takt med denna ökning har man sett sjunkande dräktighetsresultat. De sjunkande dräktighetsresultaten kan ha flera orsaker, dels att den kylda spermans kvalitet försämras över tid men även felaktig hantering av sperman och förseningar vid transport. Dessutom kan inseminationen ske vid en icke optimal tidpunkt i stoets brunst då spermasamlingen vanligtvis sker varannan dag. Många hingststationer har som rutin att samling sker måndag, onsdag, fredag vilket gör att sperman endast finns tillgänglig för insemination tisdag, torsdag och lördag.

### Kyld transportsperma

Efter samling försämras spermakvaliteten snabbt och om man inte späder ejakulatet dör spermerna inom ett par timmar. Ska sperman inte insemineras direkt utan transporteras kyls den också ned för att förlänga överlevnaden. Kylningen är inte helt oskadlig för spermerna och kylförvaringen leder ofta till nedsatt fertilitet (Demick *et al.*, 1976). Om hanteringen av sperman vid samling, kylning och transport görs på rätt sätt kan TAI dock fungera lika bra som AI med färsk spädd sperma (Katila *et al.*, 1997). Dock tål vissa hingstars sperma kylningen sämre än andras (Jasko *et al.*, 1991) och dessa kan då vara svåra att få att fungera med TAI. Andra metoder som provats för att förlänga överlevnaden hos kyld sperma är bland annat att centrifugera sperman (Sieme *et al.*, 2004). Seminalplasmans inverkan på spermernas överlevnad har också diskuterats eftersom den till viss del kan ha en negativ effekt. Brinsko *et al.* (2000) menar att det är mest fördelaktigt att ta bort stora delar av seminalplasman men att inte avlägsna den helt. En koncentration på mer än 20 % seminalplasma försämrar spermiekvaliteten (Jasko *et al.*, 1991). De rutinmässiga spädningen, samt olika centrifugerings-tekniker resulterar i en sänkt seminalplasmakoncentration.

### Fertilitet

Inom hästaveln finns inte fertilitet med som ett huvudsakligt avelsmål, till skillnad från i aveln med lantbrukets djur. Hästaveln bygger i stället på prestation och

exteriör vilket gör att det föreligger stor variation mellan olika hingstars fertilitet (Malmgren, 1997). Även individer med lägre fertilitet än kanske önskvärt används i aveln om deras prestationer och fenotyper anses vara tillräckligt värdefulla att avla på (Colenbrander *et al.*, 2003). I bedömningen av en hingsts fertilitet används statistik från en betäckningssäsong i form av till exempel procentandel levande födda föl eller konstaterade dräktigheter per säsong. Nackdelen med denna statistik är att den till viss del beror på stonas fertilitet samt på skötsel och hantering av stona under dräktigheten. Använder man sig i stället av dräktighet per brunst får man ett säkrare mått på hingstens fertilitet även om andra påverkande faktorer inte helt utesluts eftersom stoets fertilitet fortfarande spelar in (Colenbrander *et al.*, 2003). Denna bedömning av fertilitet förutsätter att hingsten redan satts in i avel och det optimala vore att på förhand kunna bedöma en hingst fertilitet. Fertiliteten hos en hingst beror på en mängd olika faktorer såsom hingstens libido, hantering av hingsten, om den används vid naturlig betäckning eller via insemination, hur ofta den betäcker och kanske framför allt spermakvaliteten (Malmgren, 1997).

### **Spermakvalitet**

Spermakvaliteten i ett ejakulat bedöms med avseende på kvalitativa och kvantitativa egenskaper såsom totalvolym, spermiekoncentration, totalantal spermier och procentandel motila spermier. Man kan också bedöma spermimorfologin, hur länge spermerna är motila och bakteriologisk status (Malmgren, 1997). En hingst med dålig spermakvalitet enligt denna bedömning har också en låg fertilitet men en hingst med bra spermakvalitet behöver inte nödvändigtvis ha en god fertilitet (Voss *et al.*, 1981, Colenbrander *et al.*, 2003). Bland dessa faktorer är det framför allt motiliteten som används i praktiken för att bedöma kvaliteten på sperman. Det görs i ett faskontrastmikroskop där man tittar på droppe spädd sperma och bedömer hur stor andel av spermerna som rör sig progressivt. Det blir därför en subjektiv bedömning vilket gör att träning krävs och att den inte är helt tillförlitlig. Metoder för att mäta motiliteten objektivt finns, bland annat CASA (computer-assisted semen motility analysis), men det rör sig om dyra och avancerade mätinstrument som det kanske inte är realistiskt att använda i praktiken ute på hingststationerna. En ny variant av CASA för att mäta motiliteten objektivt är Qualisperm som består av ett faskontrastmikroskop kopplat till en kamera och en dator. Denna metod är fortfarande på utvecklingsstadiet. Andra metoder för kvalitetsbedömning av spermier är membranintegritet mätt med flödescytometri och sperm chromatin structure assay (SCSA). Membranintegritet mätt med flödescytometri går ut på att man tillsätter olika fluorescensfärgämnen till sperman och sedan mäter fluorescensen. Färger som används är bland annat SYBR-14 som färgar in levande spermier och fluorescerar grönt samt propidiumjodid (PI) som färgar in spermier vars membranintegritet gått förlorad och fluorescerar rött (Garner *et al.*, 1994). SCSA används för att bedöma andelen spermier med normalt respektive skadat kromatin i ett ejakulat. Kromatinet finns i spermiekärnan och innehåller spermens DNA som normalt skall vara dubbelsträngat men vid kromatinskador är enkelsträngat. Även här används en infärgning, acridin-orange, som färgar in DNA och fluorescensen mäts sedan med hjälp av en flödescytometer (Morrell *et al.*, 2008). Flödescytometern är en dyr och avancerad utrustning som inte är möjlig att använda rutinmässigt i fält. Hästaveln skulle behöva fler och enklare metoder för

att kunna bedöma och förbättra spermernas kvalitet och därmed hingstarnas fertilitet.

### **Datoriserad fluorometri**

SLU driver ett forskningsprojekt som finansieras av Stiftelsen för svensk hästforskning där syftet är att få fram bra kvalitetssäkringsmetoder. Detta EEF-arbete är en del av detta projekt och i studien utvärderades spermieviabilitet med hjälp av datoriserad fluorometri. Analysen liknar flödescytometri och bygger på att man med hjälp av en fluorometer mäter fluorescensen i provet efter tillsats av en färgmarkör, Hoechst 33258. Därefter jämförs den med fluorescensen i kontrollprover med avdödade spermier och på så sätt kan andelen levande spermier räknas ut. Färgmarkören som används fluorescerar när den binder till DNA. Den kan inte penetrera intakta membran utan färgar endast in om membranet är skadat eller cellen död. Kontrollproverna består av sperma i olika koncentration som avdödas genom frysning. Fluorescensen mäts sedan samtidigt i provet och kontrollproverna varefter fluorescensvärdena användes för uträkning av viabilitet. Denna metod har tidigare använts till tjursperma (Januskauskas *et al.*, 2000). Då jämfördes viabiliteten från fluorometern med viabiliteten bedömd på infärgad sperma i mikroskop vilka visade sig korrelera väl samt ha ett gott samband med fertiliteten. Detta indikerar att metoden är tillförlitlig och ett bra komplement till andra bedömningsmetoder. Att med hjälp av fluorometri bedöma viabiliteten hos hingstsperma har tidigare gjorts i ett annat examensarbete vid SLU (Sundén, 2003). Resultat från detta visade att det fanns ett signifikant samband mellan viabilitet och motilitet vid analys direkt efter samling.

### **Single Layer centrifugering**

I studien ingick också att utvärdera en metod för selektion av spermier. Denna selektion skedde genom Single Layer centrifugering (Morrell, 2006). Metoden bygger på att spermerna centrifugeras genom en kolloid vilket resulterar i en selektion där endast motila spermier med normalt DNA och normal morfologi tar sig igenom gradienten och samlas i pelleten. Onormala spermier, övriga celler, seminalplasma med dess innehåll samt mikroorganismer tar sig inte igenom utan sugs bort tillsammans med kolloiden efter centrifugeringen. Liknande metoder används på fertilitetskliniker inom humanmedicinen med gott resultat (Morrell, 2006).

### **Målsättning**

Syftet med detta EEF-arbete var att

- utvärdera spermernas viabilitet hos de olika hingstarna utan respektive med selektion (centrifugering genom en kolloid) av spermerna, vid olika tidpunkter och vid olika förvaringstemperatur.
- utvärdera om det finns någon korrelation mellan viabilitet och subjektiv motilitet.

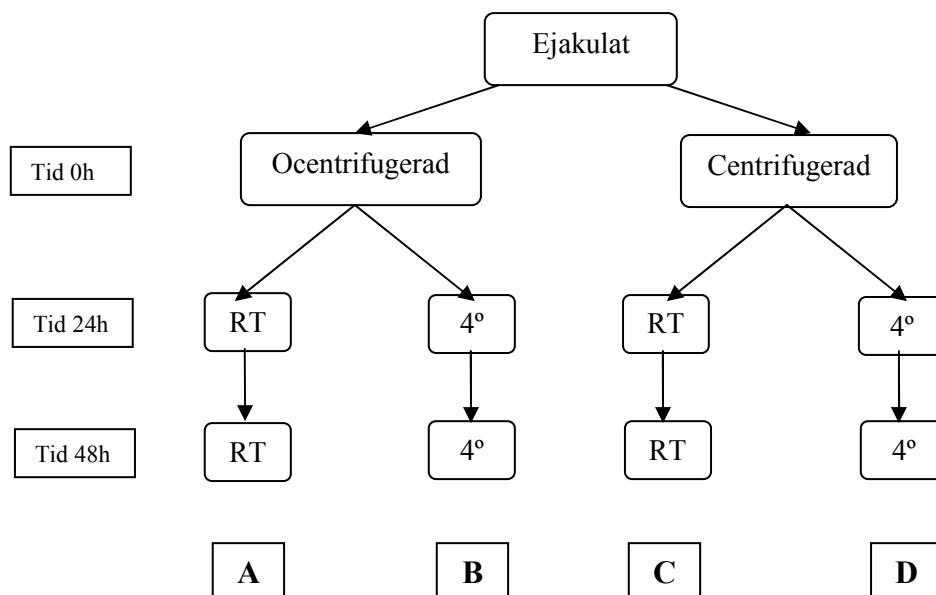
## MATERIAL OCH METODER

### Djurmateriel

I studien ingick sperma från nio halvblodshingstar samt från en ponnyhingst. Hingstarna var mellan 4 och 23 år gamla och var stationerade på Flyinge. Varje hingst samlades tre till fyra gånger under en period om två veckor i juni 2007. Tre ejakulat per hingst användes sedan i studien. Varje hingst kodades med en bokstav. Etiskt tillstånd från den försöksdjursetiska nämnden hade erhållits innan försöket påbörjades.

### Experimentell design

Varje ejakulat analyserades med fluorometri vid tre tillfällen, direkt efter samling dvs 0 h, efter 24 h och efter 48 h. Efter samlingen späddes ejakulatet med Kenneys lösning (100 ml sterilt vatten, 4,9 g glukos, 2,4 g mjölkpulver, 0,15 g dihydrostreptomycin, 0,15 g penicillin)(Kenneys *et al.*, 1975) och delades sedan upp, hälften av det centrifugerades och den andra hälften var obehandlad. Vid 0 h analyserades alltså 2 prover per ejakulat. Dessa 2 prover delades sedan upp varav hälften förvarades i kyl (4°C) och hälften i rumstemperatur (RT). Vid analyserna efter 24 h och 48 h analyserades därför 4 prover per ejakulat. Se figur 1 nedan. Totalt analyserades 10 prover per ejakulat, 30 prover per hingst samt 300 prover i hela studien. Koncentrationen i varje ejakulat räknades manuellt i en Bürkerkammare. Motiliteten bedömdes subjektivt i ett faskontrastmikroskop av en och samma person för varje prov vid varje analystillfälle, samt även objektivt med ovan nämnda Qualisperm-utrustning. Resultaten vad gäller Qualisperm redovisas i ett annat EEF-arbete (Strutz, 2007).



Figur 1. Flödesschema för analys av ett ejakulat

### Centrifugering

Kolloiden som användes var en silantäckt silikatkolloid i buffrande saltlösning som tillverkades av Jane Morrell, forskare vid SLU. Av denna pipetterades 4 ml i



ett centrifugrör varpå 1,5 ml spädd sperma pipetterades ovanpå. Spermiekoncentrationen var ca  $100 \times 10^6$ /ml. Efter centrifugering vid 300 g i 20 min pipetterades kolloiden och sädesvätskan bort och sperma-pelleten späddes sedan i 1 ml Kenneys i ett nytt rör.

## Fluorometri

Färgmarkören, Hoechst 33258 (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA), var utblandad i destillerat vatten i koncentrationen 1 mg/ml och steriliserad genom filtrering genom ett 0,22  $\mu$ m filter. Den förvarades i kylskåp i en ljusskyddad behållare. Varje dag späddes färgmarkören till en arbetslösning. Denna bestod av Hoechst och en buffert, triscitratfruktos (Tris) (500 ml destillerat vatten, tris-hydroxymetylaminometan 15,14 g, citrat 8,5 g, fruktos 6,25 g, dihydrostreptomycin (D-7253) 0,5 g, benzylpenicillin 0,4g) i förhållandet 1:25. Trisbufferten förvarades också i kylskåp. Vid analyserna var arbetslösningen rumstempererad. För avdödning av spermier till kontrollproverna pipetterades 250-300  $\mu$ l av det aktuella provet över i ett eppendorfrör. Detta sänktes sedan ned i flytande kväve i ca 5 sekunder varefter det direkt värmdes upp under rinnande ljummet ( $\sim 37^\circ\text{C}$ ) vatten. Detta upprepades totalt 3 gånger för att säkerställa att alla spermier i provet skadats och dött. Provet med spermier och provet med avdödade spermier fördelades i brunnar på en fluorometerplatta (Costar Black Opaque, 96 brunnar, No. 13300030, Corning Incorporated, NY, USA) enligt följande. Av provet med levande spermier pipetterades 50  $\mu$ l ner i tre brunnar. Av provet med avdödade spermier pipetterades också 50  $\mu$ l ner i tre brunnar men dessutom pipetterades även 25  $\mu$ l ner i tre brunnar. Till dessa pipetterades även 25  $\mu$ l Tris vilket gav en halverad koncentration. Detta för att kunna få en enkel standardkurva. Ytterligare 3 brunnar fylldes med 50  $\mu$ l Tris, en så kallad blank, för att få ett värde på bakgrundsfluorescensen att relatera till. Pipettspetsar byttes mellan de olika proverna men inte mellan respektive tre brunnar med samma innehåll. Till alla brunnarna tillsattes sedan 150  $\mu$ l arbetslösning.

Två eller fyra olika spermaprover preparerades på samma platta innan den fördes in i fluorometern. Där inkuberades proverna i 5 min i  $37^\circ\text{C}$  innan de skakades för en jämn fördelning av innehållet i brunnarna. Därefter påbörjades avläsningen.

Fluorometern som användes var en BioTek FL600 fluorescent plate reader (Boule Nordic AB, Stockholm). Den är automatiserad och datoriserad med programmet KC4 (version 2,6, Bio-Tek Instruments, Inc) och skapar ett kvantitativt protokoll för varje prov. Inställningarna som användes var följande: optisk avläsning från toppen, "static sampling", 0,35 sekunders fördröjning, 10 avläsningar per brunn, sensitivitet 60, bandbredd på exciteringsfiltret var 360/40 nm och på emissionsfiltret 460/40 nm.

Viabiliteten beräknades sedan utifrån ett medelvärde från respektive prov och kontrollprovs tre brunnar. Från dessa värden drogs sedan medelvärdet för blankproverna. Det levande provets värde relaterades sedan både till det avdödade provet med 100 % spermier och det med 50 % spermier genom linjär regression för att på så sätt få fram ett värde på procent skadade/döda spermier och i förlängningen på procent viabla spermier.

## Statistisk analys

Data från studien analyserades statistiskt med hjälp av SAS (Statistical Analysis Systems package, SAS institute incorporated, Cary, NC, USA, 1989). Analysen

inkluderade en variansanalys (the Mixed procedure) av effekt av behandling (ej selekterad/selekterad sperma samt förvaring i rumstemperatur/i kyl 4°C) och effekt av tid. Dessutom gjordes en korrelationsanalys (Spearman, the CORR Procedure) av viabilitet och motilitet.

Signifikans föreligger om  $p < 0,05$ . Den statistiska analysen utfördes av docent Nils Lundeheim, inst. för husdjursgenetik, SLU.

## RESULTAT

### Motilitet

I tabell 1 redovisas medelvärdet för de olika provernas subjektivt bedömda motilitet per hingst. Genomgående ses att motiliteten inom varje behandling sjönk över tid. Skillnad mellan de olika behandlingarna sågs, redan vid 24 h men framför allt vid 48 h, då den selekterade sperman förvarad i kyl (d) var överlägsen de andra behandlingarna och fortfarande hade en relativt hög motilitet. Värt att notera är också att den oselekterade sperman förvarad i kyl efter 24 h (b, motsvarar transportsperma) hade sämre motilitet än den selekterade sperman förvarad i rumstemperatur (c) för de flesta hingstarna, samt att den hade mycket sämre motilitet jämfört med den selekterade sperman förvarad i kyl (d) för samtliga hingstar.

*Tabell 1. Medelvärden %- andel motila spermier per hingst. Behandling a var ocentrifugerad sperma förvarad i rumstemperatur (RT), behandling b var ocentrifugerad sperma förvarad i kyl, behandling c var centrifugerad sperma förvarad i RT och behandling d var centrifugerad sperma förvarad i kyl*

Hingst	t = 0		t = 24				t = 48			
	a	c	a	b	c	d	a	b	c	d
G	47	58	22	38	38	68	5	10	16	35
J	48	88	12	43	70	80	0	3	33	72
K	58	83	3	30	50	72	0	5	24	65
L	77	87	30	63	60	82	7	33	18	73
P	48	83	18	25	50	73	2	7	15	57
Q	65	78	32	58	53	78	15	25	33	68
R	57	87	5	35	42	78	0	3	8	68
S	53	88	12	40	55	75	1	12	17	58
V	58	82	11	37	62	75	0	13	12	60
Y	72	87	13	55	63	83	0	40	15	70

## Fluorometri

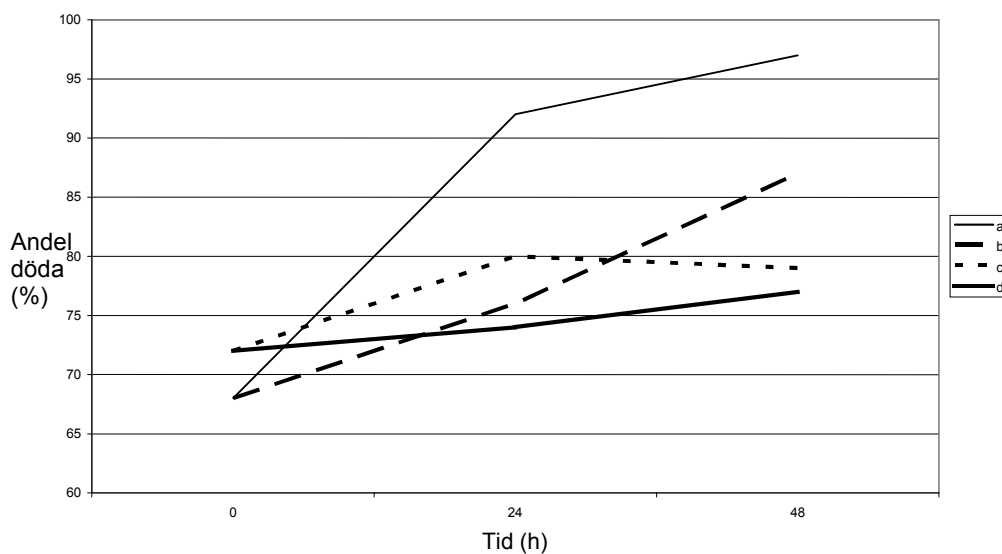
I tabell 2 redovisas de olika provernans medelvärde av %-andel döda/skadade spermier per hingst mätt med fluorometri. Genomgående ses att andelen döda/skadade spermier ökade med tiden. Efter 48 timmar i rumstemperatur utan selektion (a) var andelen levande spermier mycket låg. Vissa värden avvek eftersom de över tid förbättrades vilket inte är rimligt. Skillnaden mellan de olika behandlingarna är här inte lika enhetlig och tydlig som för motiliteten i tabell 1.

*Tabell 2. Medelvärden %-andel döda/skadade spermier per hingst mätt med fluorometri. Behandling a var ocentrifugerad sperma förvarad i rumstemperatur (RT), behandling b var ocentrifugerad sperma förvarad i kyl, behandling c var centrifugerad sperma förvarad i RT och behandling d var centrifugerad sperma förvarad i kyl*

Hingst	t = 0		t = 24				t = 48			
	a	c	a	b	c	d	a	b	c	d
G	53,1±	66,9±	94,0±	68,7±	81,5±	77,3±	94±	88,9±	76,7±	75,9±
	9,3	8,7	10,4	7,3	4,8	9,8	9,6	10,0	4,0	3,8
J	65,7±	69,6±	100±	74,2±	84,4±	76,3±	100±	92,5±	77,7±	76,2±
	7,1	6,4	0	5,2	4,6	8,5	0	5,0	6,4	3,3
K	77,1±	63,6±	91,9±	76,1±	71,9±	68,2±	95,5±	86,1±	73,9±	68,1±
	8,0	6,3	8,2	5,6	6,3	10,5	7,9	3,5	6,9	5,0
L	63,2±	59,9±	94,8±	67,7±	65,8±	64,4±	99,6±	80,5±	71,9±	64,5±
	0,5	6,6	4,2	5,2	4,6	6,0	0,7	19,0	6,5	13,4
P	69,8±	79,3±	78,4±	79,9±	94,0±	87,9±	94,0±	88,2±	90,7±	89,4±
	8,7	5,5	6,6	10,4	4,8	3,6	3,6	10,6	13,1	6,7
Q	62,4±	70,1±	84,7±	70,7±	75,0±	71,4±	93,8±	84,6±	80,1±	71,3±
	2,8	8,1	7,6	5,5	7,2	21,7	6,4	11,2	14,3	0,9
R	71,1±	75,6±	92,3±	80,8±	77,3±	80,7±	98,6±	92,3±	76,4±	76,0±
	6,1	10,6	10,9	7,0	2,8	2,4	2,4	7,0	6,5	6,3
S	79,7±	81,5±	94,3±	92,0±	88,3±	71,6±	99,3±	93,7±	89,1±	91,0±
	12,3	7,9	9,9	8,5	2,1	25,1	1,2	5,9	3,9	7,2
V	75,6±	73,7±	89,8±	86,4±	87,4±	76,4±	94,5±	90,1±	86,2±	92,5±
	4,4	4,7	8,3	7,4	7,2	8,4	6,0	9,8	12,3	7,8
Y	66,5±	71,9±	94,1±	66,3±	76,9±	69,3±	98,4±	74,3±	74,2±	68,6±
	2,6	4,7	3,1	1,6	6,1	7,7	2,4	2,4	3,7	6,1

En variansanalys av medelvärden för alla hingstar, vilka redovisas i figur 2, visade på en signifikant effekt av behandling och tid. I analysen jämfördes de olika behandlingarnas värden med varandra vid de olika tidpunkterna. Inom samma behandling jämfördes också värdena vid de olika tidpunkterna. I tabell 3 och 4 redovisas de signifikanta skillnaderna i figur 2.

Resultaten visade att vid tid 0 och tid 24 skiljde sig inte centrifugerad sperma från ocentrifugerad kyld, oavsett förvaringstemperatur. Förvaringstemperaturen påverkade dock signifikant de båda centrifugerade proven efter 24 timmar. Vid tid 48 skiljde sig den centrifugerade sperman från den ocentrifugerade oavsett förvarings-temperatur.



Figur 2. Medelvärden av %- andel döda/skadade spermier för alla hingstar. Behandling a var ocentrifugerad sperma förvarad i rumstemperatur (RT), behandling b var ocentrifugerad sperma förvarad i kyl, behandling c var centrifugerad sperma förvarad i RT och behandling d var centrifugerad sperma förvarad i kyl

Tabell 3. Signifikanser vid jämförelser mellan behandlingar vid de olika tidpunkterna.  
 \* =  $\leq 0,05$ , \*\* =  $\leq 0,01$  och \*\*\* =  $\leq 0,001$

	t = 0	t = 24	t = 48
a jfr b	ns	***	***
a jfr c	ns	***	***
a jfr d	ns	***	***
b jfr c	ns	ns	***
b jfr d	ns	ns	***
c jfr d	ns	**	ns

Tabell 4. Signifikanser vid jämförelser mellan tidpunkterna inom de olika behandlingarna. \* =  $\leq 0,05$ , \*\* =  $\leq 0,01$  och \*\*\* =  $\leq 0,001$

	a	b	c	d
0 jfr 24	***	***	***	ns
0 jfr 48	***	***	***	**
24 jfr 48	***	***	ns	ns

### Korrelation viabilitet-motilitet

I tabell 5 visas korrelationen mellan %-andel döda/skadade och den subjektivt bedömda motiliteten för de olika behandlingarna och tidpunkterna samt för alla behandlingar och tidpunkter tillsammans.

Tabell 5. Korrelation mellan %-andel döda/skadade och subjektivt bedömd motilitet

beh	t = 0	t = 24	t = 48	alla t
a	0,04 <sup>ns</sup>	(-)0,17 <sup>ns</sup>	(-)0,17 <sup>ns</sup>	(-)0,77***
b		(-)0,50*	(-)0,80***	(-)0,79***
c	0,03 <sup>ns</sup>	(-)0,06 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	(-)0,28**
d		(-)0,02 <sup>ns</sup>	(-)0,56**	(-)0,28*
alla beh	0,12 <sup>ns</sup>	(-)0,48***	(-)0,66***	(-)0,59***

Den negativa korrelationen mellan %-andel döda/skadade och subjektivt bedömd motilitet var totalt hög ( $r = -0,59$ ,  $P < 0,0001$ ) vilket betyder att en låg andel döda/skadade ger en hög motilitet medan en hög andel döda/skadade ger en låg motilitet. Dock var det ingen signifikant korrelation inom behandling vid vissa tidpunkter, framför allt direkt efter samling och vid 24 timmar.

## DISKUSSION

I denna studie har en selektionsmetod av sperma utvärderats genom metoden att analysera spermaviabiliteten med hjälp av automatiserad datoriserad fluorometri. Fluorometri är endast använd på hingstesperma i ett tidigare försök (Sundén, 2003) men bedömdes då tillförlitlig vid analys direkt efter samling/uppäckning. Den har tidigare använts på tjursperma (Januskauskas *et al.*, 2000, Alm *et al.*, 2001) med

gott resultat. Januskauskas *et al* jämförde fluorometerbedömd viabilitet med viabilitet bedömd via mikroskop samt fertilitet enligt non return rates (icke omlöpning) och fick fram ett signifikant samband. Alm *et al* jämförde viabiliteten med fertilitet (också enligt icke omlöpning) och fick fram ett lågt men signifikant samband. Vidare har den använts i försök med baggar (Martinez-Pastor *et al.*, 2004) då man fick ett mycket varierat resultat och ingen korrelation till de andra parametrarna som bedömdes. År 2005 användes metoden i ett försök med galt sperma (Sutkeviciene *et al.*) där man jämförde ett antal parametrar med non return rates och kullstorlek som ett mått på fertilitet och resultatet var att den enda av spermaparametrarna som korrelerade signifikant med fertiliteten var fluorometerbedömd viabilitet hos sperma som lagrats i sju dagar.

Resultaten i denna studie avviker delvis från det förväntade. Procentandelen döda/skadade celler var hög redan vid tid 0 vilket var oväntat. I studien gjord av Januskauskas *et al* (2001) på tjur erhöles liknande höga värden på %-andel döda/skadade celler men där gjordes studien på tinad fryst sperma. Viabiliteten borde överensstämma med motiliteten vilket den inte gjorde enligt korrelationsanalysen. Totalt sett och efter 48h fanns en korrelation men inte vid 0 och 24 h. Detta skiljer sig också från resultatet Sundén fick (2003). Eventuellt skulle det kunna förklaras om spermier, med lindrigt skadat cellmembran, vilket gör att de färgas in, fortfarande kan vara motila. I takt med att de dör av och motiliteten sjunker så korrelerar den med värdet för andelen skadade/döda. Jämför man resultaten med resultat från ett annat EEF-arbete (Strutz, 2007) som genomfördes samtidigt och med samma sperma så fanns skillnader. I den studien analyserades sperman med hjälp av Qualisperm (se avsnittet spermakvalitet i inledningen) och den objektivt bedömda motiliteten jämfördes med den subjektivt bedömda motiliteten med goda resultat. Där sågs större skillnader mellan den selekterade sperman och den oselekterade sperman och redan vid tid 0.

Varför dessa resultat fås kan man bara spekulera i. Binds kemiska ämnen i fluorescensfärgen, Hoechst 33258, till något annat i proverna, är någon ingående analyskomponent skadlig för spermerna eller är metoden inte tillräckligt känslig? Att Hoechst 33258 skulle kunna binda till andra celler är möjligt men de borde finnas i samma koncentration i prov respektive kontrollprov så att ingen påverkan på resultatet fås. Vad gäller skadlig inverkan på spermerna så finns inget beskrivet i litteraturen vad gäller Hoechst 33258. Färgen är använd i en studie på hingst 1997 av Papaioannou *et al.* Där jämfördes viabiliteten bedömd i mikroskop efter färgning med Hoechst 33258 med viabiliteten från flödescytometri efter färgning med propidiumjodid (PI) och ett signifikant samband sågs. I den studien användes dock en lägre koncentration av Hoechst 33258 än i mitt försök. Hoechst 33258 är också använd i en annan studie (Neild *et al* 2003) på hingst där membranförändringar under frysförvaring studerades. Viabiliteten bedömdes i mikroskop och jämfördes med andra infärgningar, bland annat chlortetracycline (CTC), med bra resultat. Vad gäller övriga ingående komponenter, TRIS och Kenneys, så är dessa välbeprövade. Metodens känslighet kan dock diskuteras. Under studien gjordes en upprepad analys av samma sperma. Åtta gånger analyserades sperman och resultatet varierade mellan 61 % och 75 % döda/skadade celler vilket indikerar ett ojämnt analysresultat. Trots detta finns statistisk signifikans som gör att man kan dra vissa slutsatser av studien.

Transportsperma motsvaras av behandling b i denna studie. Resultaten i variansanalysen av medelvärdena visar på att den selekterade sperman är viabel längre tid än den oselekterade sperman. Detta öppnar för möjligheter att dels klara av förseningar vid transport och dels att bättre kunna optimera tidpunkten för insemination till ovuleringstidpunkten. Det vore intressant med vidare studier på viabilitet över tid hos single-layer-centrifugerad sperma, vid exempelvis 72 och 96 timmar efter samling. Att den selekterade sperman som förvarats i rumstemperatur inte skiljde sig statistiskt från den selekterade sperman som kylförvarats var ett intressant resultat. Detta skulle kunna innebära att man med hingstar där kylningen är ett problem, och man därför bara tillämpar färsk insemination, skulle kunna skicka transportsperma utan kylning. Man skulle också kunna tänka sig att sänka semidoserna om man skickar selekterad sperma vilket kanske skulle kunna få ejakulatet att räcka till fler ston.

Denna studies resultat tyder på att datoriserad fluorometri var en tveksam metod för bedömning av viabilitet hos hingstsperma. Metoden tycks inte vara tillräckligt känslig och analysresultaten är ojämna. Dock skulle den kanske kunna fylla en funktion, om man vet om dess svagheter, eftersom den är relativt enkel och billig jämfört med andra tillgängliga metoder för analys av membranstabilitet. Ytterligare studier beträffande vilken koncentration av Hoechst 33258 man bör använda kan vara av värde.

Vad gäller metoden att selektera spermier genom en täthetsgradient så var resultaten mycket intressanta. Den skulle kunna innebära en kvalitetshöjning av sperman med bättre dräktighetsresultat som följd, framför allt för hingstar med låg fertilitet. Dock skulle man behöva utvärdera metoden med större volymer för att det skulle vara praktiskt genomförbart och dessutom skulle man behöva följa upp dräktighetsresultat.

## **TACK**

För och främst vill jag tacka min huvudhandledare Anders Johannisson för hans engagemang, goda råd och stöd i utförandet av studien och författandet av rapporten.

Sedan vill jag även tacka mina biträdande handledare, Anne-Marie Dalin, Jane Morrell och Heriberto Rodriguez-Martinez för deras engagemang.

Tack även till personalen på Flyinge samt personalen på spermalab, SLU för trevligt bemötande och hjälp att genomföra denna studie.

Tack till Nils Lundeheim för hjälp med den statistiska bearbetningen.

Sist men inte minst tack till min kursare Hanna Strutz och återigen tack till Jane för trevligt sällskap nere i Flyinge.



## LITTERATURFÖRTECKNING

- Alm, K, Taponen, J, Dahlbom, M, Tuunainen, E, Koskinen, E, Andersson, M. 2001. A novel automated fluorometric assay to evaluate viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology* 56, 677-684.
- Brinsko, SP, Varner, DD. 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54, 129-136.
- Colenbrander, B, Gadella, BM, Stout, TAE. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod Dom Anim* 38, 305-311.
- Demick, DS, Voss, JL, Pickett, BW. 1976. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *J Anim Sci* 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. *J of andr* 15, 6, 620-629.
- Januskauskas, A, Johannisson, A, Rodriguez-Martinez, H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55, 947-981.
- Jasko, D.H., 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, Combes, GB, Varner, DD, Blanchard, TL. 1997. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology* 48, 1085-1092.
- Kenney, R.M, Bergman, R.N, Cooper, W.L, Morse, G.W. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares. Technique and preliminary findings. *Proc Am Assoc Eq Pract* 21, 327-336.
- Malmgren, L. 1997. Assessing the quality of raw semen: A review. *Theriogenology* 48, 523-530.
- Martinez-Pastor, F, Johannisson, A, Gil, J, Kaabi, M, Anel, L, Paz, P, Rodriguez-Martinez, H. 2004. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 84, 121-33.
- Morrell, J.M. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Dom Anim* 41, 63-67.
- Morrell, J.M, Johannisson, A, Dalin, A-M, Hammar, L, Sandebert, T, Rodriguez-Martinez, H. 2008. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta vet scand* 50,2.
- Neild, D.M, Gadella, B.M, Chaves, M.G, Miragaya, M.H, Colenbrander, B, Agüero, A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59, 1693-1705.
- Papaioannou, K.Z, Murphy, R.P, Monks, R.S, Hynes, N, Ryan, M.P, Boland, M.P, Roche, J.F. 1997. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology* 48, 299-312.

- Sieme, H, Katila, T, Klug, E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61, 769-784.
- Strutz, H. 2007. Objektiv motilitetsbedömning av färsk och kyld samt selekterad hingstsperma med hjälp av Qualisperm. EEF-arbete 2007:79 vid Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU.
- Sundén, C. 2003. Utvärdering av viabilitet hos hingstsperma med hjälp av datoriserad fluorometri. Examensarbete 2003:39 vid Veterinärmedicinska fakulteten, SLU.
- Sutkeviciene, N, Andersson, M.A., Zilinskas, H, Andersson, M. 2005. Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. *Theriogenology* 63, 739-747.
- Voss, J. L, Pickett, B. W, Squires, E. L. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *JAVMA* 178: 3, 287-289.