

**Kvalitetsbedömning av selekterad och oselekterad
hingstsperma med hjälp av flödescytometri och
fluorometri, före och efter seminsäsongen.**

Lotten Bäckgren

Handledare: Anders Johannisson

Inst. För anatomi, fysiologi och biokemi, SLU

Biträdande handledare: Anne-Marie Dalin och Jane Morrell

Inst. För kliniska vetenskaper, avd. för reproduktion, SLU

Sveriges Lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och

husdjursvetenskap

Veterinärprogrammet

Examensarbete 2008:70

ISSN 1652-8697

Uppsala 2008

INNEHÅLL

| | |
|---|----|
| SAMMANFATTNING | 1 |
| ABSTRACT..... | 1 |
| INLEDNING | 2 |
| Halvblodsaveln idag..... | 2 |
| Spermahanteringen på stuteri..... | 3 |
| Fertilitet..... | 3 |
| Fluorometri..... | 3 |
| Flödescytometri..... | 4 |
| Single Layer Centrifugering..... | 4 |
| Syfte | 5 |
| MATERIAL OCH METODER..... | 6 |
| Hingstar och spermasamling..... | 6 |
| Experimentell design..... | 7 |
| Fluorometri – selekterad och oselekerad sperma..... | 7 |
| Flödescytometri..... | 8 |
| RESULTAT | 9 |
| Flödescytometri..... | 11 |
| Fluorometri..... | 11 |
| DISKUSSION..... | 13 |
| TACK! | 16 |
| LITTERATURFÖRTECKNING..... | 17 |

SAMMANFATTNING

En stor del av den svenska halvblodsaveln utförs idag med artificiell insemination (AI). Kvalitetskontrollen består i den subjektiva motilitetsbedömning som görs efter samling. Här finns ett behov av att på ett säkrare sätt kunna uttala sig om viabiliteten hos sperman. I den här studien jämfördes fluorometri med flödescytometri. I studien ingick tre hingstar stationerade på Markebäcks Gård, Askersund. Hingstarna samlades tre gånger under v 15 och under v 34 2008. Proverna analyserades vid 4 och 24 timmar. Studien är en del i ett större forskningsprojekt inom SLU för att utveckla alternativa metoder för kvalitetsanalyser samt att höja viabiliteten och överlevnadstiden på sperma med hjälp av selektering, så kallad Single Layer Centrifugering. Studiens syfte var:

- att jämföra fluorometri med flödescytometri när det gäller kvalitetsbedömning av oselekerad och selekterad hingstsperma
- att jämföra viabilitet hos tre hingstar före och efter seminsäsong

Resultaten visar inte någon signifikant skillnad på spermiernas viabilitet före och efter säsong. De två analysmetoderna korrelerade bättre vid analys av oselekerad sperma än med selekterad. Fluorometriresultaten visade genomgående på för hög viabilitet hos spermier av sämre kvalitet. Fluorometri som metod verkar fungera bättre på sperma av mycket bra kvalitet. Selektion har god effekt på sperma av sämre kvalitet, framför allt förbättras lagringsegenskaperna.

ABSTRACT

Most Swedish Warmbloods are bred by artificial insemination (AI). Quality control of the semen consists of the subjective evaluation of motility. There is a need for a more accurate and objective method of rating the semen. In this study we compared fluorometry with flowcytometry as a method for evaluating sperm viability. Semen was collected from three stallions, stationed at Markebäcks Gård, Askersund, three times during week 15 and week 34, 2008. The semen was analyzed at 4 hour and 24 hour. This study is a part of a larger project at SLU to evaluate alternative methods for semen quality analysis and ways to improve viability and time of survival for semen by selection, so called Single Layer Centrifugation. The purpose of this study was:

- to compare two methods, fluorometry with flowcytometry in unselected and selected stallion semen
- to compare viability of the semen of three stallions before and after the breeding season

The result does not show any significant difference in sperm viability before and after the season. The two methods correlated better for unselected semen than for selected. With fluorometry the viability result was too high in semen of inferior quality. In this study, fluorometry as a method works better when analyzing

semen of high quality. There is a good outcome of centrifugation with semen of inferior quality after 24 hours.

INLEDNING

Halvblodsaveln idag

Hästaveln i Sverige idag utförs framför allt med artificiell insemination (AI). Både färsk sperma (AI) och kyld transportsperma (TAI) används. Detta innebär att hingstar tappas på sperma och stoet semineras samma dag på hingst/seminstationen, alternativt skickas sperman kyld med postpaket över natten till en mottagarstation där stoet semineras dagen efter. Idag tillämpas ett system där hingststationerna samlar sperma från sina hingstar måndag, onsdag och fredag. Det gör att transporterad sperma levereras tisdag, torsdag och lördag. Idag skickas sperma inte bara inom landet, även importsperma från Holland, Belgien, Tyskland och Danmark används. Fryst sperma (FAI) används också. Fryst spermas hållbarhet är mycket lång men livslängden efter upptining är kortare än för färsk sperma (Söderquist *et al*, 2004). Detta kräver mer när det gäller transport av sperma i kärl med flytande kväve och ställer dessutom högre krav på frekvens och kunnande vad det gäller undersökning och insemineringstidpunkt för stoet. Sammantaget leder det till att användandet av fryst sperma är dyrare för stoägarna, trots detta är användandet av fryst sperma relativt vanligt på travarsidan, 18% 2007 (A-M Dalin, personligt meddelande). Vad det gäller halvblod är det dock fortfarande avel med kyld sperma som är vanligast. År 2007 var totalt 216 hingstar aktiva inom halvblodsaveln i Sverige. Av dessa gick 26 på naturlig betäckning (12%). Totalt betäcktes 5560 ston med halvblodshingstar 2007, 477 av dessa ston betäcktes naturligt (8,6%). Det innebär att 91,4% av alla ston i avel 2007 inseminerades med färsk eller transporterad kyld sperma alternativt fryst sperma (www.asvh.se). Att andelen AI ston är så pass hög är inte anmärkningsvärt, vinsterna med AI överstiger vida eventuella fördelar med naturlig betäckning. AI ger bättre hygien och därmed minskad risk för smittspridning mellan hingst och sto och även mellan ston som betäcks med samma hingst. En och samma hingst kan användas till fler ston om ett ejakulat späds och fördelas. Skaderiskerna för både stoet och personalen minskar avsevärt med AI istället för naturlig betäckning. En hingst i full tävlingskondition kan betjäna ston under pågående tävlingssäsong, detta är knappast möjligt om hingsten ska betäcka naturligt varannan dag. Stoägarna behöver heller inte transportera sina ston till hingsten utan kan köra dem till närmaste mottagarstation vilket underlättar för både sto och stoägare. På detta sätt främjar man aveln i områden där det inte är lika hästtätt. Det är inga problem att använda en hingst i södra Skåne även om stoet befinner sig långt mer norrut i landet. En eventuell nackdel med AI är att variationen på avelsmaterialet minskar då en och samma hingst i praktiken kan betjäna över 200 ston på en säsong. Inom travet har man en begränsning på 150 ston per hingst för att undvika överanvändning.

Då selekteringen av avelshingstar främst görs utifrån förmåga och teknik inom gångarter eller hoppning, exteriör och prestationer, antingen i form av egna tävlingsmeriter eller i en välmeriterad stamtavla, och inte utifrån fertilitet kan kvalitén på sperman variera mycket. Det enda som kontrolleras innan hingsten går

in i aveln är att testiklarna vid klinisk undersökning är utan anmärkning. Det görs ingen analys på spermimorfologi eller spermieviabilitet. Innan avelssäsongen börjar tas spermaprover för CEM (contagious equine metritis) och EVA (equine viral arteritis). Dessa prov ska vara negativa för att hingsten skall få användas i avel (www.sjv.se).

Spermahanteringen på stuteri

Efter samling kontrolleras gelfri volym, koncentration och initial motilitet. Utifrån koncentration och initial motilitet räknas sedan dosvolymen ut, det vill säga den volym spädd sperma med rätt mängd motila spermier per dos. Vid användning av transportsperma ska man skicka $>1 \times 10^9$ motila spermier per dos. Vid seminering på station (färsk sperma) skall dosen innehålla $>0,5 \times 10^9$ motila spermier. Då man väger in den subjektivt bedömda motiliteten i dosberäkningen är det av vikt att den bedöms så riktigt som möjligt. Att lära sig bedöma motilitet på ett bra sätt tar tid och kräver mycket träning. Efter att analyserna på råsperman är gjorda späds sperman med en speciell spädningssväska innehållande bland annat glukos, mjölkpulver och antibiotika, för att skapa en god miljö och förlänga överlevnaden hos spermerna. Det är viktigt att temperaturkurvan sjunker successivt. När beräkningar och spädning är gjorda ställs sperman mörkt och i rumstemperatur innan seminering eller packning för transport, allt för att optimera miljön för spermerna (Söderquist *et al*, 2004).

Fertilitet

I hingstkalendern anges hingstens fertilitetsresultat som följande, 100/80, där den första siffran anger antal betäckta ston och den andra siffran anger antal födda föl året efter dvs fölningsprocent. Detta säger givetvis en del om hingstens fertilitet men här skall också stoets fertilitet, kondition, handhavande av sperma, seminstitutionsrutiner och inte minst veterinärens kompetens vägas in. Utifrån detta kan man förstå att det är svårt för stoägare att skapa sig en rättvis bild av hur bra sperma en viss hingst har. Spermakvalité bör vara en viktig parameter i val av hingst då det ofta är kostsamt att under en hel säsong skicka och seminera med sperma av dålig kvalité. Då man idag nästan uteslutande använder sig av AI ställs större krav på spermans kvalité än vid naturlig betäckning.

Fluorometri

Fluorometri är en teknik som används för att objektivet bedöma viabiliteten hos sperma. Metoden för att mäta membranintegritet innebär att med hjälp av fluorometer mäta fluorescensen efter tillsats av en färg som markör för icke viabla spermier. Färgen som används är Hoechst 33258. Färgen kan inte penetrera intakta cellmembran och binder därmed inte in till normala viabla spermier. Färgen fluorescerar när den binder till DNA vilket är möjligt i skadade och döda celler vars membran är trasigt. Kontrollproverna bestod av kända koncentrationer med döda spermier. Kvalitetsbedömning av sperma med hjälp av fluorometri har

tidigare gjorts på tjursperma (Januskauskas *et al*, 2000) samt på hingstspärma under ett EEF-projekt på SLU (Björk, 2007). Den förra studien visade att fluorometri var en tillförlitlig teknik och ett bra komplement till andra metoder för bedömning av spermakvalité medan den senare studien inte kunde stödja detta. Fluorometri är en enklare och billigare analysmetod än flödescytometri. Instrumentet som används är av bärbar storlek och skulle därför kunna nyttjas praktiskt ute på stuterierna om den visar sig vara pålitlig som metod för viabilitetsanalyser.

Flödescytometri

Metoden liknar den för fluorometri. Plasmamembranintegriteten mäts genom att cellerna färgas in med två olika typer av färgmarkörer. Dessa färger fluorescerar när de binder in till nukleinsyran i DNA i cellen. Detta kan mätas med en flödescytometer. Färgerna som används är SYBR-14 och Propidiumjodid (PI). SYBR-14 penetrerar membranet på intakta levande celler och tränger in i kärnan där färgen binder till nukleinsyran i DNA. Vid bindning till DNA fluorescerar färgen grönt. Även propidiumjodid binder in till DNA men kan inte penetrera intakta cellmembran, cellen måste vara död och därigenom ha ett trasigt cellmembran för att färgen ska kunna binda in. Vid bindning till DNA fluorescerar Propidiumjodid rött. Metoden har använts för att utvärdera relationen mellan motilitet och viabilitet hos hingstspärma (Love *et al*, 2003).

Single Layer Centrifugering

Ett sätt att förbättra spermakvaliteten och därmed öka förutsättningen för dräktighet är att selektera ut de levande och befruktningsdugliga spermerna innan seminering. I ett ursprungligt ejakulat är de levande och friska spermerna blandade med döda och döende spermier, seminalplasma samt celler av andra slag. Aktiva och rörliga spermier i rumstemperatur har en hög metabolism. Den stora energiåtgången resulterar i en ökning av metaboliska produkter som i sin tur leder till en pH-sänkning i seminalplasman. Ett sänkt pH påverkar spermerna negativt. Spädningen med spädningssvätskan är en del i att motverka detta. Genom att selektera ut de viabla spermerna från de icke viabla kan man öka livslängden hos de viabla spermerna och därmed öka chansen till dräktighet (Morrell *et al*, 2008 a, Morrell *et al*, 2008 b). Selektionen görs genom så kallad single layer centrifugering. Spermerna centrifugeras genom en kolloid som endast låter motila spermier med normalt DNA passera, dessa hamnar i pelleten. Döda eller onormala spermier samt celler av annat slag kan inte passera kolloiden. De kan efter centrifugering avlägsnas tillsammans med kolloiden. Kvar i pelleten blir viabla spermier med normalt DNA. Metoden single layer centrifugering har utvärderats i en jämförande studie med en densitetsgradient som selektionsmetod (Morrell *et al*, 2008 b).

Målsättningen med den här studien var 1) att utvärdera fluorometri som alternativ till den mer säkra flödescytometrin som metod för att analysera viabilitet hos oselekerad och selekerad hingstspärma. 2) att jämföra spermakvaliteten gällande viabilitet hos tre hingstar före och efter seminsäsong. Att jämföra sperman före

och efter säsong kan vara av intresse för att se eventuella skillnader i kvalitén och om det kan vara av betydelse när på säsongen man lämnar sitt sto för inseminering. Studien är en del i ett större projekt för att utvärdera och vidareutveckla metoder för kvalitetsbedömning av hingstsperma. Detta projekt finansieras med forskningsmedel från Stiftelsen Svensk Hästforskning.

Syfte

Syftet med den här studien var

- att jämföra fluorometri med flödescytometri gällande kvalitetsbedömning av oselekerad och selekerad hingstsperma
- att jämföra kvalitet gällande viabilitet hos sperma från tre hingstar före och efter seminsäsong

MATERIAL OCH METODER

Hingstar och spermasamling

I studien ingick sperma från tre hingstar mellan 10 och 19 år gamla, halvblodshingstarna Lasandos och Friendship och lippizzanerhingsten Maestoso Romida. Hingstarna var stationerade på Markebäcks Gård, Askersund. Hingstarna samlades på sperma under v 15 och v 34 på måndag, onsdag och fredag morgon i en tappningshall i direkt anslutning till hingststallet. Fantomen som hingstarna hoppade på kläddes med plast, ny för varje hingst. Den artificiella vagina som användes var av typen "Colorado" (Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA). Vaginan fylldes med 2 liter kokvatten samt 2 liter varmvatten direkt från kranen. En särskild engångs "liner" i plast användes till varje hingst. Inuti smörjdes vaginan med vitt vaselin. Ejakulatet passerade ett filter innan det samlades upp i en förvärmad plastflaska. Filtret var ett rörformat mjölkfilter (mjölkfilter, Euro Farm 320x58 mm, sydda kanter). Flaskan hölls varm med hjälp av en isolerande hätta. Efter samling placerades flaskan i värmeskåp och gelfri volym avlästes och noterades. Initial motilitet bedömdes i ljusmikroskop med råsperma. En droppe placerades på objektglas med täckglas. Koncentrationen av sperman kontrollerades med "Spermacue" (Minitüb Abfüll- und Labortechnik, Tiefenbach b. Landshut, Tyskland). Efter analyserna späddes sperman 1:1 med Inra 96, en "ready to use" spädningssvetska innehållande bland annat penicillin, gentamicin och amphotericin B (fungicid) (imv Technologies, L'Aigle Cedex, Frankrike). Efter spädning fördelades sperman från varje hingst på fyra 20 ml sprutor. Två av sprutorna placerades i en transportlåda utan kylklamp och två i en transportlåda med kylklamp. Detta gav spermaprover i rumstemperatur som vid användning av färsk sperma på seminestation samt spermaprover kyllda över natten som vid transporterad sperma. Lådorna kördes sedan direkt till SLU, Uppsala, för analyser under eftermiddagen samma dag (4 h) samt förmiddagen påföljande dag (24 h). Uppgifter med klockslag för tappning, initial motilitet och koncentration bifogades varje hingsts spermaprover.



Bild 1. Spermasamling från Lasandos 922 i tappningshallen, Markebäcks Gård.

Experimentell design

Varje hingsts ejakulat analyserades vid fyra tillfällen. Ett prov med oselekerad sperma samt ett med selekterad sperma, båda rumstempererade, analyseras samma dag som samling (4 h). Ett prov med oselekerad sperma samt ett med selekterad sperma som varit kyld under natten analyseras morgonen efter samling (24 h).

Single Layer Centrifugering

Kolloiden som användes var en silantäckt silikatkolloid i buffrande saltlösning (Androcoll-ETM, SLU; patent applied for). 4 ml av kolloiden pipetterades till ett centrifugrör. Ovanpå kolloiden pipetterades 1,5 ml spädd sperma innehållande $\leq 100 \times 10^6$ spermier/ml. Röret centrifugerades i 300 g under 20 minuter. Efter centrifugering sögs supernatanten och det mesta av kolloiden bort. Kvar blev pelleten med de framselekerade spermerna, denna späddes sedan med 1 ml INRA 96. (Morrell *et al*, 2008).

Fluorometri – selekterad och oselekerad sperma

Färgmarkören som användes var Hoechst 33258 (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA) i koncentrationen 1 mg/ml spädd i destillerat vatten och sterilfiltrerad genom ett 0,22 μm filter. Färgmarkören förvarades i ljusskyddad behållare i kylskåp. Varje dag späddes färgmarkören till en arbetslösning med koncentrationen 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i tricitratfruktosbuffert (500 ml destillerat vatten, trishydroxymetylaminoetan 15,14 g, citrat 8,5 g, fruktos 6,25 g, dihydrostreptomycin (D-7253) 0,5 g, benzylpenicillin 0,4 g). Bufferten förvarades i kylskåp efter upptining. Arbetslösningen förvarades i ljusskyddade 12 ml rör i rumstemperatur under arbetsdagen.

För kontrollproverna pipetterades 400 μl sperma i ett eppendorfrör. Denna sperma avdödades genom att röret sänktes ned i flytande kväve i cirka fem sekunder för att sedan tinas upp under fingervarmt rinnande vatten. Denna procedur upprepades fyra gånger för att säkerställa att alla spermier dött. Provet med de avdödade och levande spermerna pipetterades sedan ut på 96-hålsplatta i triplikat (Costar Black Opaque, 96 brunnar, No 13300030, Corning Incorporated, NY, USA) enligt följande schema: Brunn 1-50 μl trisbuffert (blank). Brunn 2-5 μl avdödat prov samt 45 μl trisbuffert (10 % döda). Brunn 3-12,5 μl avdödat prov samt 37,5 μl trisbuffert (25 % döda). Brunn 4-25 μl avdödat prov samt 25 μl trisbuffert (50% döda). Brunn 5-50 μl avdödat prov (100% döda). Brunn 6-50 μl levande prov (provet som ska avläsas). Till alla brunnar tillsattes sedan 150 μl färglösning. Plattan inkuberas i 5 minuter i 37 °C i fluorometern innan avläsning. Fluorometern som användes var en BioTek FL600 fluorescent plate reader (Boule Nordic AB, Stockholm). Fluorometern är automatiserad och datoriserad med programmet KC4 (version 2,6, Bio-Tek instruments, Inc) och skapar ett kvantitativt protokoll för varje prov. Följande inställningar användes: 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 genom att

medelvärde från de tre brunnarna med levande prov sattes in i ekvationen för den kurva som fås genom de avdödade provens kända koncentrationer.

Flödescytometri

En färgkombination av SYBR-14 och Propidiumjodid (PI) (Live/Dead® Sperm Viability Kit L-7011; invitrogen™, Inc., Eugene, OR, USA) användes. Från varje spermprov överfördes 300 µl spädd sperma till olika typer av plaströr. SYBR-14 lösningen späddes med Cellwash i proportionerna 1:50. 1,5 µl av denna lösning samt 1,5 µl av Propidiumjodid tillsattes till varje prov. Proverna inkuberades i i mörker under 10 minuter i 37 °C. Efter inkubation förvarades proverna i mörker i rumstemperatur (22 °C) till dess att analysen gjordes (1-30 minuter). Flödescytometeranalys gjordes i en LSR flödescytometer utrustad med standardoptik (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Grön (FL1) och röd (FL3) fluorescens mättes för varje spermie. FL1 är ett mått på SYBR-14-positiva spermier och FL3 ett mått på PI-positiva spermier. Genom den här infärgningskombinationen kan spermerna delas in i tre grupper; levande celler (SYBR-14 + / PI -), döende celler (SYBR-14 + / PI +) samt döda celler (SYBR-14 - / PI +). Upp till 50 000 spermier analyserades från varje prov. Resultaten presenterades i procent av totalantalet analyserade spermier.

Statistisk analys

Resultaten från projektet analyserades statistiskt med hjälp av SAS – programmet (Ver. 9, Statistical Analysis System, SAS institute incorporated, Cary, NC, USA).

Viabiliteten mätt med fluorometri och flödescytometri analyserades med hjälp av variansanalys. I den statistiska modellen inkluderades de fixa värdena av hingst, samlingsmånad (april eller augusti), behandling (selektering eller ej), provtidpunkt (4 eller 24 timmar), samt samspel mellan behandling och provtidpunkt. Därtill inkluderades i den statistiska modellen den slumpmässiga effekten av ejakulat (inom hingst). Signifikans ansågs föreligga om $p < 0,05$. Därtill beräknades korrelation mellan de två måtten på spermans viabilitet. Den statistiska bearbetningen utfördes av docent Nils Lundeheim, Institutionen för husdjursgenetik, SLU.

RESULTAT

Jämförelsen mellan april och augusti gällande spermans viabilitet hos de tre hingstarna som ingick i projektet visade inte på någon signifikant skillnad före och efter seminsäsong.

Diagram 1, 2 och 3 visar medelvärdet av viabiliteten från fluorometri och flödescytometrianalyserna vid tid 4 h och 24 h hos oselekerad och selekterad sperma för var och en av hingstarna i projektet.

Diagram 1.

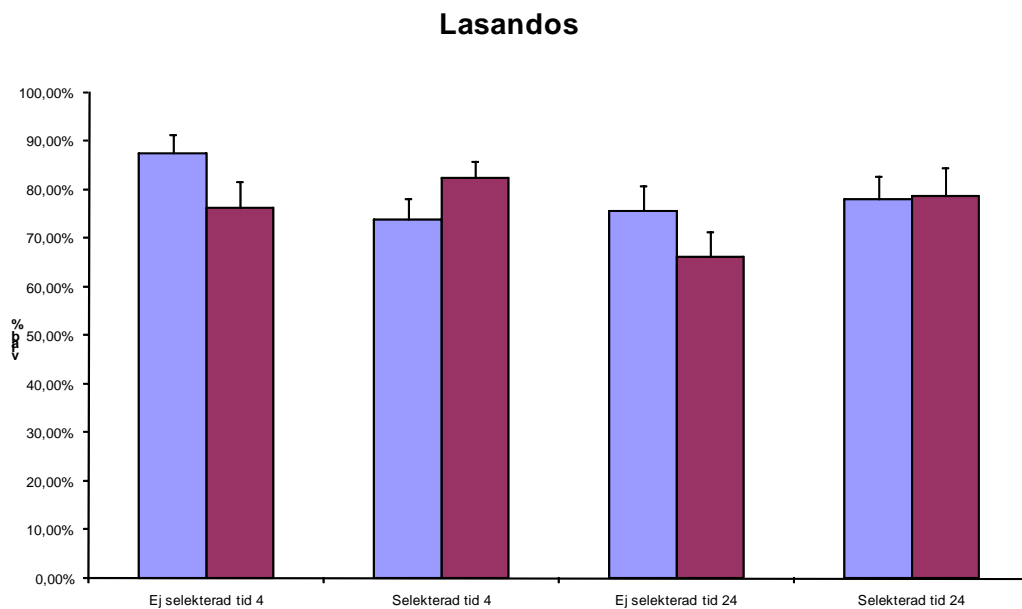


Diagram 1, Lasandos. Diagrammet visar medelvärden av spermernas viabilitet vid tiden 4 h och 24 h samt hos oselekerad och selekterad sperma analyserad med fluorometri ■ och flödescytometri ■.

Diagram 2.

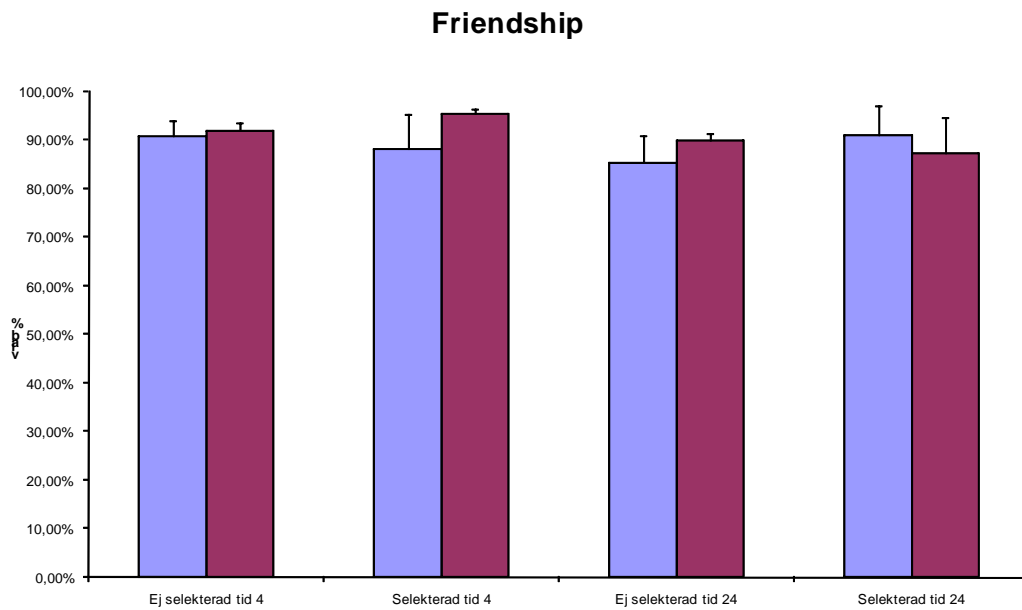


Diagram 2, Friendship. Diagrammet visar medelvärden av spermernas viabilitet vid tiden 4 h och 24 h samt hos oselekerad och selekterad sperma analyserad med fluorometri ■ och flödescytometri ■.

Diagram 3.

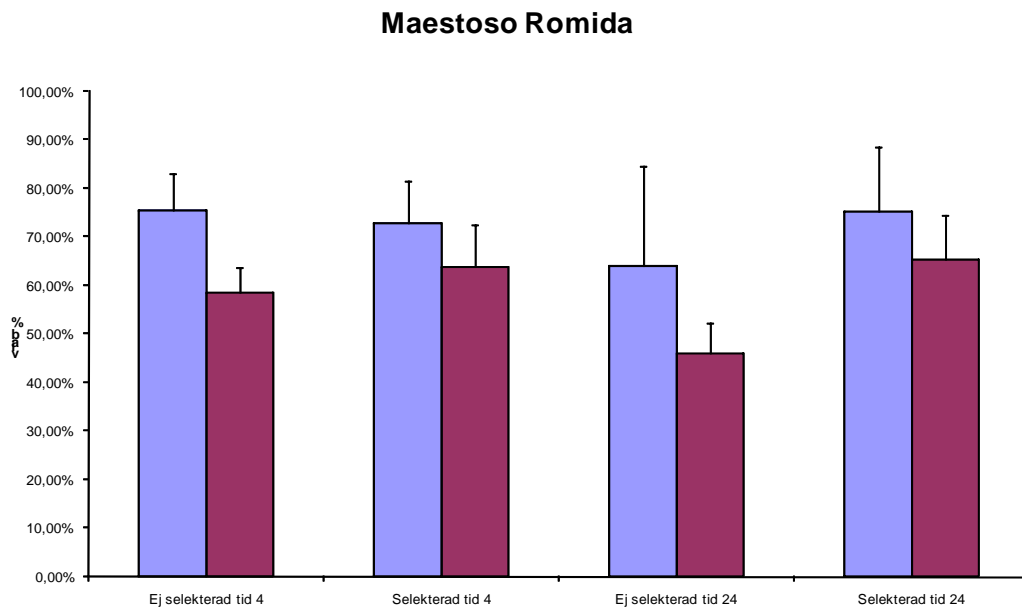


Diagram 3, Maestoso Romida. Diagrammet visar medelvärden av spermernas viabilitet vid tiden 4 h och 24 h samt hos oselekerad och selekterad sperma analyserad med fluorometri ■ och flödescytometri ■.

Flödescytometri

Viabiliteten var i medeltal för de tre hingstarna 75,5 % för oselekerad sperma vid tiden 4 h. För selekterad sperma vid samma tidpunkt var medeltalet 80,5 %. Vid 24 h hade den oselekerade sperman en genomsnittlig viabilitet på 67,3 %, medan den selekterade hade en genomsnittlig viabilitet på 77 %.

Fluorometri

Medelvärden hos de tre hingstarna tillsammans visade en viabilitet på 84,6 % hos oselekerad sperma vid tiden 4 h. Den selekterade sperman hade vid samma tid en viabilitet på 78,5 %. Vid 24 h låg den oselekerade sperman på 75 % medan den selekterade låg på 81,2 %.

Tabell 1 visar dräktighetsresultaten för hingstarna i projektet under seminsäsongen 2008. Noteras bör att Maestoso Romida endast hade åtta ston under säsongen.

Tabell 1.

| | Lasandos | Friendship | Maestoso Romida |
|------------------|----------|------------|-----------------|
| Tot. antal ston | 20 | 38 | 8 |
| Antal DR ston | 16 | 31 | 8 |
| % DR tot | 80,0% | 81,6% | 100,0% |
| % DR 1:a brunst | 68,8% | 74,2% | 87,5% |
| % DR 2:a brunst | 25,0% | 19,4% | 0,0% |
| % DR 3:e brunst | 6,3% | 6,5% | 12,5% |
| Antal på station | 16 | 6 | 3 |
| % DR station | 93,8% | 100,0% | 100,0% |
| Antal ston skick | 4 | 32 | 5 |
| % DR skick | 25,0% | 78,1% | 100,0% |

Resultaten från variansanalysen (tabell 2) visar att för de bägge viabilitetsmåttan hade hingsten hade en signifikant inverkan. Selektion och provtagningstidpunkt hade en signifikant inverkan på viabiliteten mätt med flödescytometri. Samspelet mellan selektion och provtagningstidpunkt var signifikant för viab-1 men ej för viab-2.

Tabell 2.

| | viab 1-fluorometri | viab 2- flödescytometri |
|------------------|--------------------|----------------------------|
| Hingst | 0,0009 | <0,0001 |
| Selekt | 0,9143 | <0,0001 |
| Tid | 0,1554 | 0,0001 |
| tid*centr | 0,0065 | 0,1029 |

Korrelationen mellan viabiliteten mätt med de två analysmetoderna fluorometri och flödescytometri var i totala data (72 ejakulat) $\pm 0,58$. Korrelationen hos alla prover vid tid 4 h låg på 0,55 och motsvarande siffra vid 24 h var 0,57. Hos de oselekerade proverna, alla tider, låg korrelationen på 0,67. Motsvarande siffra hos de selekerade proverna var 0,48. Hos de oselekerade proverna, tid 4 h låg korrelationen på 0,71. Hos samma prover, vid tiden 24 h var värdet 0,61. De selekerade proverna tid 4 h hade en korrelation på 0,57. Hos samma prover tid 24 h var siffran 0,42.

DISKUSSION

I denna studie jämfördes metoderna fluorometri och flödescytometri för bedömning av spermakvaliteten mätt som spermans viabilitet, vid olika hantering av sperman samt vid olika tidpunkter. Oselekerad sperma jämfördes med selekterad sperma vid tidpunkterna 4 timmar och 24 timmar. Spermaproverna kom från tre olika hingstar stationerade på samma hingststation. Fluorometri som metod att kvalitetsbedöma hingstsperma har använts två gånger tidigare vid institutionen. Vid det första försöket ansågs fluorometri vara en tillförlitlig metod för analys på sperma i direkt anslutning till samling/uppackning (Sundén, 2003). I den senaste studien (Björk, 2007) visade dock resultaten en oväntat hög andel döda/skadade celler vid tid 0 h. En korrelation till motiliteten kunde endast ses vid 24 och 48 h.

För att bedöma hur väl de två metoderna stämmer överens gjordes en korrelationsanalys. De tre högsta korrelationskoefficienterna mellan viabilitet-fluorometri och viabilitet-flödescytometri hos de tre hingstarna tillsammans sågs hos oselekerad sperma. Högst var korrelationen hos oselekerad sperma vid 4 timmar (0,71). Det verkar alltså som att de två metoderna stämmer bäst överens när sperman är obehandlad. Lägst korrelation sågs hos selekterad sperma vid 24 timmar (0,42). En tänkbar förklaring till att de två metoderna har högre korrelation vid analys av obehandlad sperma kan vara att koncentrationen hos den selekterade sperman ej undersöktes i studien. Den kan ha varierat en del mellan hingstarna och proverna. Detta kan ha lett till att resultaten från den selekterade sperman blev ojämna och därför korrelerar sämre än resultaten från analyserna av den oselekerade sperman.

Enligt diagrammen för varje enskild hingst tycks samstämmigheten mellan viabilitet-fluorometri och viabilitet-flödescytometri vara bäst hos hingsten med genomgående högst viabilitet på sin sperma, Friendship.

Hos den hingst med genomgående lägst viabilitet på sin sperma, Maestoso Romida, stämmer de två metoderna sämre överens. Här ligger viabilitet-fluorometrivärdet genomgående högre än för viabilitet-flödescytometri.

Vid jämförelsen för total viabilitet för de tre hingstarna tillsammans mellan flödescytometri och fluorometri som metoder kan noteras att viabiliteten för oselekerad sperma vid tid 4 h enligt fluorometrianalysen låg markant högre än för samma prov med flödescytometri. Den oselekerade sperman vid tid 0 h hade även högre viabilitet i fluorometrianalysen än den selekterade sperman vid 4 h i flödescytometrianalysen. Av detta kan man dra slutsatsen att fluorometrivärdena genomgående var för höga i analyserna. Då flödescytometri är en säker och väl beprövad metod i sammanhanget kan man utgå från att dessa värden är de mest tillförlitliga. Varför viabilitetvärdena från samma prov blir högre med fluorometrimetoden, speciellt på sperma av något lägre kvalitet är svårt att förklara. Detta går tvärt emot resultatet från den senaste studien (Björk, 2007). Där diskuterades det om färgen, Hoechst 33258, på något vis kunde vara skadlig

för sperman. I denna studie är problemet det omvända då andelen levande/viabila snarare ligger för högt jämfört med samma prov i flödescytometern. En viktig skillnad mellan Björks studie och den här studien är koncentrationen på färgen. Björk använde en arbetslösning med koncentrationen 40 µg/ml för att färga in cellerna med. I den här studien användes en koncentration på 2 µg/ml. Björk diskuterade om färgen kunde vara toxisk för cellerna då viabiliteten var så låg. I denna studie kan det vara så att färgen var för svag, den räckte inte för att färga in allt DNA i proverna hos de skadade/döda cellerna. Att det var speciellt tydligt i sperma med högre andel icke viabila celler (Maestoso Romida) stärker denna hypotes. Om det sedan bara berodde på färgkoncentrationen, färgningstiden eller en kombination av dessa två är svårare att uttala sig om. Då färgningen verkar fungera bra på sperma av avsevärt god kvalitet (Friendship) torde detta tyda på en väl avvägd färgkoncentration i just det fallet. För att få färgen att fungera lika bra på sperma av sämre kvalitet bör tester med en något högre koncentration göras. Försök med en färgkoncentration på 8 µg/ml har gjorts, även denna koncentration visade en onormalt hög andel döda och skadade celler. Färgkoncentrationen ansågs fortfarande vara för hög. (A. Johannisson, personligt meddelande). Ett försök med en färgkoncentration på 4 µg/ml kan vara en idé. Ett annat sätt att påverka infärgningen kan vara att förlänga inkubationstiden. Öka dagens fem minuter till sju eller tio minuter. En risk med detta är dock att man påverkar spermakvaliteten negativt.

Ett annat syfte med studien var att undersöka eventuella skillnader i spermakvalité (viabilitet) före och efter seminsäsong. Här sågs ingen signifikant skillnad hos de tre hingstarna i studien. Även om ingen av hingstarna haft ston i mängden uppåt hundratalet så har sperma samlats från två av tre hingstar, Lasandos och Friendship, tre dagar i veckan under hela säsongen med undantag för någon vecka i slutet av sommaren. Då de tre hingstarna som ingick i den här studien alla varit stationerade på Markebäcks Gård sedan seminsäsongen 2007, det vill säga att de varit uppstallade på samma ställe och tillsammans i över ett år, kan man utgå från att alla eventuellt påverkande faktorer från omgivningen varit densamma för alla tre. Utgångspunkten för studien ur ett fysiologiskt och miljömässigt perspektiv borde därför vara optimal. En helt optimal kartläggning av spermans viabilitet under säsongen hade även innefattat en analysvecka i början av juni, mitt under högsäsong. Men då dräktighetsresultaten var så höga, speciellt med avseende på dräktighetsprocent per brunst, finns dock ingen anledning att tro att sperman skulle varit annorlunda under den perioden.

Utifrån diagrammen och flödescytometrianalyserna framgår att selektering av sperma av normal och något sämre kvalitet förbättrar viabiliteten efter 24 timmar. Hos Maestoso Romida är skillnaden stor, oselecterad sperma vid 24 timmar hade ett lägre värde än selecterad sperma vid samma tidpunkt. Här kan man tydligt se att selekteringen hade effekt. Även hos Lasandos sågs en förbättring vid 24 timmar med selektering. Att skillnaden blir större hos Maestoso Romida beror på att hans sperma hade en lägre viabilitet att från början, effekten blir därför mer tydlig efter selektering. Detta förklarar också varför effekten helt uteblir hos

Friendship. Hans sperma hade från början en viabilitet på över 90%. Denna höga spermakvalité är svårt att förbättra med hjälp av selektering. Syftet med att selektera sperma är att förbättra kvalitén och därmed fertiliteten hos hingstar med sämre viabilitet, därför är det inte intressant att sperma med mycket hög viabilitet ej förbättras via selektering.

Resultaten i studien visar fördelarna med att selektera sperma från hingstar med nedsatt spermieviabilitet för att öka chanserna till dräktighet, speciellt vad avser transporterad sperma då transporten och tiden i sig ytterligare kan försämra kvalitén.

Variansanalysen visade att för den vedertagna och säkra metoden flödescytometri (med SYBR-14/PI) hade hingst, selektering och tid var för sig en signifikant inverkan på resultatet. Detta var väntat och visar varför metoden är pålitlig. För fluorometrimetoden var siffrorna något annorlunda. Hingst hade även här signifikant inverkan på resultatet, vilket var väntat. Med fluorometrianalysen sågs ingen påverkan av selektion och tid på resultatet. Däremot sågs en signifikant inverkan av samspelet mellan tid och selektering, detta innebar att skillnaderna mellan tiderna 4 h och 24 h var olika för oselekerad och selekerad sperma. Fluorometri är alltså en mindre tillförlitlig metod.

Sammanfattningsvis kan sägas att selektering av sperma med nedsatt kvalitet kan göra relativt stora skillnader i viabilitet efter 24 timmar, samt att fluorometri som metod inte är tillförlitlig annat än vid analys av mycket bra sperma. Metoden behöver omarbetas för att fungera på alla typer av sperma. Då problemet troligen ligger hos färgkoncentrationen bör nya analyser med en något högre koncentration utföras. Får man fram en väl avvägd och icke toxisk färgkoncentration borde korrelationen mellan flödescytometri och fluorometri öka och även den senare kan anses tillförlitlig.

Studien visar även att viabiliteten i sperman hos de hingstar som ingick inte förändras avsevärt under seminsäsongen. Möjligheten till dräktighet, utifrån hingsten, bör alltså vara lika stor under hela säsongen. Det statistiska underlaget i den här studien kan självfallet ifrågasättas då det bara rör sig om tre hingstar, även om antalet analyser på dessa tre är relativt högt. En optimal studie skulle ha innefattat ett större antal hingstar.

TACK!

Tack till Anders Johannisson, min huvudhandledare, för all hjälp, engagemang och framför allt tålamod under skrivandet av den här studien!

Även tack till Jane Morrell och övrig personal på spermalab för trevligt bemötande och tålamod med alla mina frågor under veckorna för det praktiska arbetet.

Tack också till Anne-Marie Dalin för hjälp med upplägg och utförande av den här studien samt för svar på frågor längs vägen.

Stort tack till Kalle, min sambo, för all hjälp med diagram, tabeller och bilder samt all övrig datasupport!

Även tack till Nils Lundeheim för hjälp och genomgång av den statistiska bearbetningen.

Tack till min mamma, Annika Bäckgren, för listor med dräktighetsresultat för våra hingstar samt övrig hjälp med bilder och annat!

Tack till Madelene Johansson, stallchef på Markebäcks Gård, för trevligt sällskap och gott samarbete under dagarna för spermasamling på våra hingstar.

LITTERATURFÖRTECKNING

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 – 961.

Love, C.C, Thompson, 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.

Morrell, J, Dalin, A-M, Rodriguez-Martinez, H. 2008 a). Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Veterinary Journal in press*.

Morrell, J, Johannisson, A, Dalin, A-M, Rodriguez-Martinez, H. 2008 b). Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reproduction of Domestic Animals in press*.

Björk, H. 2007. Utvärdering av viabilitet hos selekterad hingstsperma med hjälp av fluormetri. EEF-arbete 2008:22 vid institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, SLU.

Söderquist, L. 2004, Artificial insemination ed. Dalin, A-M och Malm, L. Compendium in Equine Reproduction, 4:e upplagan, Institutionen för Obstetrik och Gynekologi, SLU, Uppsala, Sverige.

<http://www.asvh.se/document/betackning07.htm>

<http://www.sjv.se/amnesomraden/djurveterinar/avel/seminverksamhet/hast.4.7502f61001ea08a0c7fff35428.html>