

# **Tidiga membranförändringar i hingstsperma som används för artificiell insemination**

**Pia Nilsson**

Handledare:

Heriberto Rodriguez-Martinez  
Institutionen för obstetrik och gynekologi

Biträdande handledare:

Lena Malmgren  
Schering-Plough Animal Health

Examensarbete 2004:31

Veterinärprogrammet  
Veterinärmedicinska fakulteten

SLU

ISSN 1650-7045

Uppsala 2003



## Abstract

The Annexin-V/propidium iodide (AV/PI) assay detects early membrane changes in spermatozoa and viability using flow cytometry. It is an objective method that evaluates a much larger number of single spermatozoa compared with the usual estimation of motility, the most commonly used method for routine sperm evaluation. In the present study four ejaculates from four stallions were used in a split-sample design to investigate whether and how the number of intact spermatozoa is affected over time and after incubation at different temperatures, either those recorded during shipment of stallion semen for AI (9 or 5°C) or room temperature (20°C). The Annexin-V results did not reflect the motility results that were monitored in parallel. While motility decreased over time, the number of spermatozoa with intact membranes (viable) remained unchanged for at least 21 hours following a short period of initial instability. Sperm motility was better and the percentages of viable spermatozoa were higher in the samples stored at 20° C samples than in the 5°C or 9°C samples. Significant differences between stallions and between ejaculates from the same stallion were also detected. One stallion had very low fertility results but did not differ from the others in terms of either viable or motile spermatozoa. In conclusion, the use of Annexin-V-PI assay combined with flow cytometry is a suitable method, albeit not for routine use, for assessment of early membrane changes in stallion spermatozoa. The method will however not identify all subfertile stallions or predict fertility, but it might, after further studies, be of use as an alternative assay for identifying subfertile stallions.

## Innehåll

### **Inledning, 4**

### **Material och metoder, 6**

Pilotstudien, 6

Huvudstudien, 7

*Hingstarna, 7*

*Provinsamlingen, 7*

*Laboratorieanalyserna, 7*

*Flödescytometri med Annexin-V/PI, 7*

*Motilitet, 8*

*Fertilitet, 8*

### **Resultat, 8**

Annexin V/PI och motilitet, 8

Fertilitet, 10

### **Diskussion, 10**

### **Slutsatser, 12**

### **Referenser, 12**

### **Tackord, 13**

## Inledning

Inom hästaveln liksom inom övrig husdjursavel är det av största intresse att kunna göra en säker bedömning av handjurets potentiella fertilitet. Bristande fertilitet hos en hingst får av naturliga skäl betydligt mer långtgående konsekvenser på kort och lång sikt än hos ett sto då hingsten kommer att bli den bristande faktorn i ett så mycket större antal parningar eller semineringar. Det ultimata vore om det fanns en metod som enkelt, billigt och tillförlitligt kunde användas på hingsstationen för att efter varje samling kunna bedöma befruktningspotentialen hos varje ejakulat eller semindos. Tyvärr befinner vi oss ännu så länge långt därifrån. Den metod som är enkel och billig nog för att rutinmässigt användas ute i fält är i dagsläget mikroskopisk bedömning av spermimotoiliteten. Nackdelarna med metoden är att den är subjektiv (operatorbaserad) och att endast en mycket liten del (några hundra spermier) av det totala spermieantalet ingår i bedömningen. Detta gör att resultaten bli osäkra, i synnerhet om bedömaren är oerfaren. Dessutom garanterar en motilitet som initialt är god inte att hingstens fertilitet är god eller att sperman klarar att kylas och transporteras, utan syftet med motilitetsbestämning är snarare att genom minimikrav gallra ut hingstar med uppenbart dålig spermakvalitet eller att indikera att någonting har hänt med en hingst som gör att hans spermakvalitet försämrats. Man kan också göra en grundligare undersökning av sperman avseende kvantitet, motilitet, morfologi och förekomst av främmande celler även om detta är dyrare och mer tidskrävande och därför mindre lämpat för rutinmässiga täta undersökningar (Kenney et al., 1983). En enligt dessa kriterier god spermakvalitet är tyvärr heller ingen garanti för god fertilitet även om många subfertila hingstar kan identifieras (Graham, 2001). Det går också att retrospektivt räkna ut en hingsts befruktningspotential, något som förutom att man får ett slutgiltigt svar först då hingsten redan betäckt nästan två säsonger, dessutom influeras av bl a stomaterialet, skickligheten hos stuteriepersonalen med mera. Stor möda har genom åren lagts ned på att ta fram mer avancerade metoder för att kunna förutsäga befruktningförmågan hos sperma från ett visst handjur. Tyvärr finns det ännu ingen av dessa metoder som säkert visat sig kunna förutsäga fertilitet, och den viktigaste anledningen till detta är troligen att man mäter *en* specifik egenskap hos spermien, medan det krävs en mängd olika egenskaper för att spermien ska bli befruktning duglig, såsom progressiv motilitet, förmåga att genomgå kapacitering och akrosomreaktion med mera (Rodriguez-Martinez, 2003). Utvecklingen går dock ständigt framåt och nya intressanta metoder dyker upp (Colenbrander, Gadella & Stout, 2003; Rodriguez-Martinez, 2003).

Flödescytometriska undersökningar är snabba och objektiva och tillåter utvärdering av stora mängder enskilda spermier (Graham, 2001). Dessutom kan man kanske genom att kombinera utvärderingen av flera olika parametrar öka möjligheterna att kunna förutsäga fertilitet. Utrustningen är än så länge skrymmande och dyr, men kanske kommer det inom en inte alltför avlägsen framtid billigare och smidigare apparater som möjliggör användning inte bara på forskningsnivå. En möjlighet är att kunna undersöka tidiga membranförändringar

på spermier som ska användas för artificiell insemination. Ett intakt plasmamembran är av största betydelse för att en spermie ska kunna överleva och vara befruktningsduglig. Membranet hjälper till att bibehålla intracellulär homeostas, skyddar mot yttre påverkan från t ex spändningsvätskor och miljö och spelar en viktig roll vid bl a kapaciteringsprocessen, akrosomreaktionen, bindningen till zona pellucida och sammansmältningen av gameterna (Colenbrander et al, 1992). Därför är utvärdering av spermimembranets integritet mycket intressant då det gäller att bedöma den potentiella fertiliteten hos den sperma som används.

En ny metod att i sperma exklusivt kunna detektera spermier i ett mycket tidigt skede av apoptos (programmerad celldöd) med hjälp av flödescytometri efter märkning med hjälp av ett protein, Annexin V, beskrevs 1995 (Vermees et al., 1995). Under apoptosens tidiga skeden förlorar cellens lipidmembran sin assymetri, vilket resulterar i att fosfatidylserin (PS), en molekyl som normalt är belägen på cellmembranets inre yta, translokeras till membranets utsida. Det har visats att denna translokation sker tidigt under den apoptotiska processen och att den sker oberoende av vilket stimulus som initierat apoptosen (Martin et al., 1995).

Annexin V är ett fosfolipidbindande protein som har hög affinitet för PS, och alltså gärna binder till celler som börjat genomgå apoptos. Om man till Annexin V kopplar en fluorescerande markör, exempelvis FITC (fluorescein-isothiocyanit), kan man därefter med hjälp av flödescytometri identifiera de celler till vilka Annexin V bundit, d v s de som börjat genomgå apoptos. Annexin V binds dock också till nekrotiska celler genom att deras cellmembran börjat läcka och falla sönder så att PS kan nås utan att det först translokerats. Därför gör man samtidigt en färgning med probidiumjodid (PI) som färgar DNA i spermiekärnan men som inte kan penetrera ett intakt spermimembran, d v s används som markör för döda celler (Vermees et al., 1995). På detta sätt kan man i en population urskilja 4 subpopulationer: intakta celler ( $AV^-/PI^-$ ), tidigt apoptotiska celler ( $AV^+/PI^-$ ), sent apoptotiska eller tidigt nekrotiska celler ( $AV^+/PI^+$ ) samt sent nekrotiska celler ( $AV^-/PI^+$ ) (Pena et al., 2003). Inom reproduktionen har metoden använts i försök att utvärdera spermiekvalitet bl a på människa (Oosterhuis et al., 2000), tjur (Anzar et al., 2002; Januskauskas, Johannisson & Rodriguez-Martinez, 2003) och galt (Pena et al, 2003). Den är inte den enda tillgängliga metoden för att detektera apoptotiska förändringar hos spermier, men i en studie av Overbeeke et al. (1998), där Annexin V-metoden jämfördes med tre andra metoder (TUNEL-assay, DNA-fragmentation assay och phycoerythrin-labelled APO2.7-assay) visade det sig att den var både den mest specifika, den mest sensitiva och den enklaste metoden att använda.

Anzar et al. (2002) visade att färsk tjursperma innehåller mellan 10- 20 % apoptotiska spermier. Han fann också signifikanta skillnader i andelen apoptotiska spermier hos de olika tjurarna och att fertilitetsresultaten efter AI med fryst sperma var signifikant relaterad till andelen viabla eller apoptotiska spermier i den färska sperman. Han drar av detta slutsatsen att hög närvaro av apoptotiska celler i sperman kan vara en av orsakerna till dålig fertilitet hos avelstjurar. Pena et al.

(2003) undersökte om metoden kunde användas för att detektera skillnader i membranintegritet mellan två olika fraktioner av galtsperma efter frysning och upptining, och fann signifikanta skillnader som tydde på olika förmåga att klara frysning. En annan studie jämförde subletala förändringar i tjursperma efter frysning med 56 dagars NRR efter ett stort antal AI (6900). I den fann man att efter frysning var det endast andelen AV-/PI+ (döda, sent nekrotiska celler) som korrelerade signifikant med fertiliteten (Januskauskas, Johannisson & Rodriguez-Martinez, 2003). Å andra sidan saknar tjur- och galtspermier de enzymer (kaspaser) som anses behövliga för att apoptos skall kunna ske vilket därmed skuggar hur denna process kan ske i en terminal cell som spermien är. Hur som helst är Annexin-V en mycket bra metod för att detektera tidiga förändringar i membranstabilitet och representerar därmed ett mycket värdefullt vertyg för att bedöma antal viabla (d v s Annexin-negativa/PI negativa) spermier i ett spermprov. Hingstperma har hittills inte blivit undersökt med denna metod.

Syftet med den här studien var att undersöka hur tidigt membranförändringarna inträder hos hingst efter kylning till olika temperaturer, samt att se hur stora skillnaderna var mellan olika hingstar och mellan olika ejakulat från samma hingstar, samt att jämföra om samma förändringar kunde följas med subjektiv motilitet, vilket använts som kontrollmetodik. Man genomförde en pilotstudie vars syfte var att ge en grov översikt över var i tiden eventuella förändringar sker samt vilka metodologiska krav som kunde ställas vid den flödescytometriska analysen för att utifrån detta kunna bestämma upplägget av huvudstudien.

## **Material och metoder**

### **Pilotstudien**

Till pilotstudien användes en nio år gammal varmblodig travarhingst. Hingsten används inte i avel men samlas på sperma regelbundet i undervisnings- och forskningssyfte. Han har en normal spermabild enligt upprepade undersökningar gjorda vid Institutionen för obstetrik och gynekologi.

Tre ejakulat samlades med ett dygns mellanrum, späddes med Kenney's extender i proportionerna 1:1 och analyserades avseende motilitet och membranförändringar efter inmärkning med Annexin V/PI vid 0, 3, 6, 9, 12 och 24 timmars inkubering, uppdelat i ett kylt respektive ett rumstempererat prov. Det visade sig dock att extendern (Kenney's) störde den flödescytometriska analysen genom att den tog upp Annexin V och propidiumjodid (färgmarkörerna). För att komma till rätta med problemet måste spermerna "tvättas" (beskrivning nedan) för att inte få med extendern i analysen. I den sista analysserien på tvättad sperma lade vi dessutom till en negativ kontroll i form av ett prov som förvarades i värmeskåp vid 38°. Utifrån resultaten bestämde vi oss för att i huvudstudien efter tvättning analysera proverna efter 0, 3-6, samt 24 timmars inkubering.

## Huvudstudien

### *Hingstarna*

Till huvudstudien användes 4 st halvblodshingstar, 6-14 år gamla och stationerade på hingststationerna Gurresta och Lövsta. De användes i år till mellan 8-24 ston var för artificiell insemination med färsk sperma eller kyld transportsperma.

### *Provinsamlingen*

Hingstarna samlades med artificiell vagina av ordinarie personal vid sina respektive hingststationer. Från varje hingst användes fyra prover från ejakulat samlade under slutet av maj och början av juni, d v s högsäsong. Till varje prov användes ca 2,5 ml råsperma, resterande del av varje ejakulat användes för AI (färsk samt kyld transporterad sperma). Koncentration bestämdes på hingststationen med hjälp av hematocytometer och sperman späddes i en skummjölsbaserad extender (Kenney et al. 1975), 1:2 eller 1:3 beroende på ursprunglig koncentration. Spädningsgraden av proverna för studien var densamma som för den delen av sperman som användes för AI. Proverna förvarades i en stängd frigolitulåda för att skydda från ljus och temperaturväxlingar under transporten till laboratoriet. Beroende på schemat på hingststationerna tog det mellan ½ och 3 ¼ timme innan proverna var framme på laboratoriet.

## Laboratorieanalyserna

Direkt vid ankomsten till laboratoriet kördes flödescytometri med Annexin-V/PI-färgning, samt bedömdes motilitet i ljusmikroskop (0-prov). Därefter delades proverna upp i tre delar (split-sample design) och förvarades vid 3 olika temperaturer; 20° (rumstemperatur), 5° (kylskåp) och ca 9° (samma frigolitulåda med kylklamp som används av hingststationerna för att skicka transportsperma). Den flödescytmetriska mätningen och motilitetsbedömningen upprepades sedan efter 3 och efter 24 timmar för respektive prov. I upplägget hade vi tillåtit att tiden för den andra analysen varierade mellan 3-6 timmar, men i praktiken analyserades alla proverna efter 3 timmar.

### *Flödescytometri med Annexin-V/PI*

Utspädd sperma, 500 µl, blandades med 2500 µl CELLWASH (Becton Dickinson, San José, CA, USA) och centrifugerades i 400 x g, 10 min för att tvätta spermerna fri från extendern. Efter avlägsnande av supernatanten resuspenderades bottenpelletten i 1 ml CELLWASH. Därefter buffrades 10 µl tvättad sperma i 90 µl bindningsbuffert från Annexin V-kit (Becton Dickinson), varefter 5 µl FITC-konjugerad Annexin V (Becton Dickinson) och 2 µl PI (Probidiumjodid, Sigma, St. Louis, USA). Blandningen fick därefter inkubera i rumstemperatur i 15 minuter innan den späddes med ytterligare 400 µl bindningsbuffert. Mätningarna gjordes med en LSR flödescytometer (Becton Dickinson), och för datainsamling användes mjukvaran CellQuest 3.3 (Becton Dickinson). Partiklar mindre än en spermie samt aggregat av celler eliminerades från mätningen med hjälp av deras storlek och

granulering. För varje prov registrerades data från 10 000 händelser (celler och partiklar) avseende storlek, granulering, röd och grön fluorescens.

### *Motilitet*

Subjektiv bedömning av progressiv motilitet gjordes i faskontrastmikroskop vid 200x förstoring. Mikroskopet var försett med värmeplatta (38°) och objektglaset förvärmades i värmeskåp till samma temperatur.

### *Fertilitet*

Hingstarnas dräktighetsresultat beräknades retrospektivt på hösten efter den aktuella säsongen 2003. Resultaten baserades på dräktighetsundersökning av stona med ultraljud 16-17 dagar efter insemination.

## **Resultat**

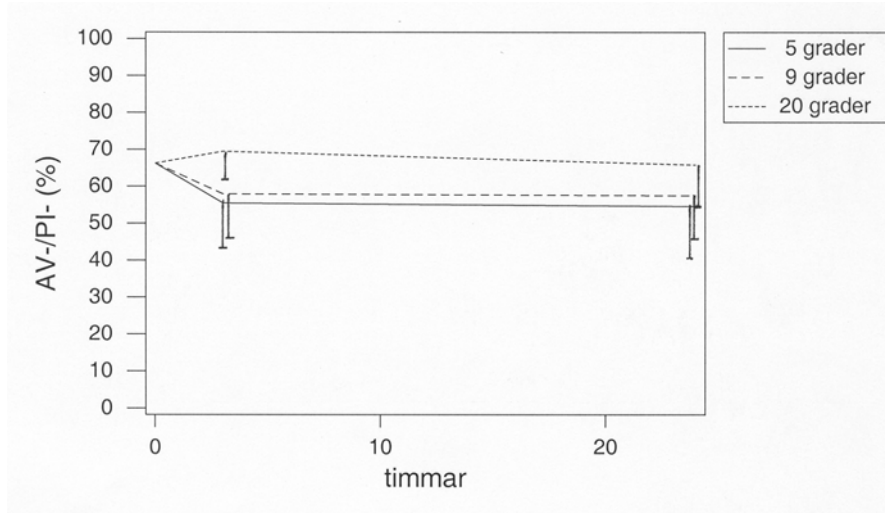
### **Annexin V/PI och motilitet**

Minskning av andelen AV-/PI- (viabla) spermier, visade sig ske mycket tidigt under inkubationen (< 3 timmar). Därefter låg antalet i stort sett konstant åtminstone under det följande dygnet. Motiliteten sjönk, å andra sidan, gradvis under hela förvaringstiden, men även här inträdde de kraftigaste förändringarna under de första timmarna. Man kunde konstatera dock att Annexin-V kunde detektera förändringar i spermieviabilitet tidigare än förändringar i motiliteten kunde ses. Tiden påverkade andelen motila spermier signifikant ( $p < 0.0001$ ), men påverkade inte andelen viabla spermier för hela populationen.

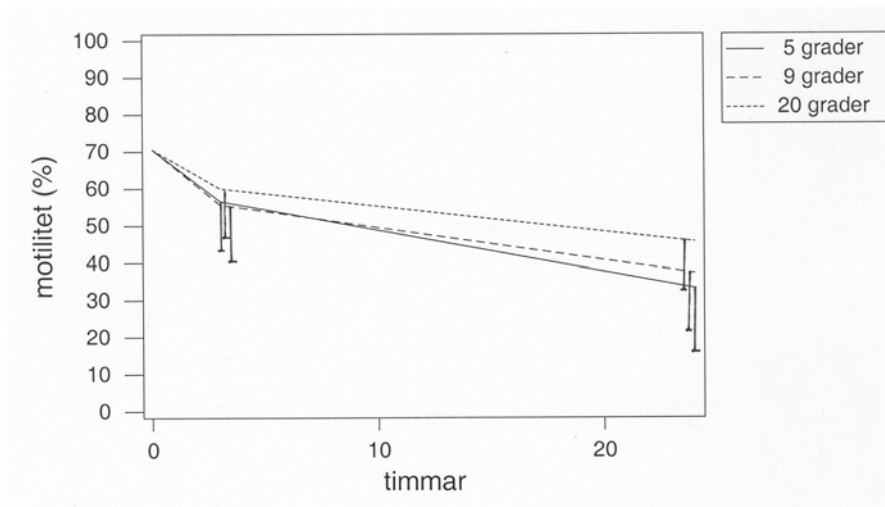
Det fanns signifikanta skillnader ( $p < 0.0001$ ) mellan olika replikat från samma hingst samt mellan de olika hingstarna både avseende antal viabla (AV-/PI-) och motila spermier (se diagram 1 och 2). Standardavvikelserna inom data från varje hingst avseende AV-/PI- (viabla) varierade mellan 2.5- 11.9 enheter. Avseende motilitet var standardavvikelserna ännu större (0-19 enheter).

Temperaturen påverkade såväl andelen viabla spermier ( $p < 0.0001$ ) som andelen motila spermier ( $p = 0.0041$ ) signifikant för hela populationen. Andelen viabla respektive motila spermier var högst i den varmaste förvaringstemperaturen (20°) och lägst i den kallaste (5°). Det fanns inga signifikanta interaktioner mellan tid och temperatur vare sig avseende andelen viabla eller motila spermier för hela populationen. Sett för varje individ fanns dock signifikanta effekter av samtliga variabler (tid, temperatur samt interaktioner mellan tid och temperatur).





**Diagram 1:** Spermieviabilitet (procent av spermier Annexin-V negativ/Propidiumjodid negativa spermier [AV-/PI-]) i hingstsperma som förvarades i 5-, 9 respektive 20 grader C under 24 timmar efter ankomst till laboratoriet. (Data avser medelvärdet för samtliga hingstar och ejakulat).



**Diagram 2:** Spermie motilitet (procent av spermier med progressiv motilitet) i hingstsperma som förvarades i 5-, 9 respektive 20 grader C under 24 timmar efter ankomst till laboratoriet. (Data avser medelvärdet för samtliga hingstar och ejakulat).

## Fertilitet

Hingstarnas dräktighetsresultat beräknades retrospektivt på hösten efter den aktuella säsongen 2003. Resultaten grundar sig på dräktighetsundersökning av stona med ultraljud 16-17 dagar efter insemination.

Tabell 1. Dräktighetsresultat för respektive hingst per brunst och säsong (2003) efter artificiell insemination med färsk (AI) och kyld transporterad (TAI) sperma.

	Antal ston	Dräktiga/brunst	Dräktiga/säsong
Hingst nr 1	AI 3 st	83 %	100 %
	TAI 5 st	60 % (100%)*	60 % (100%)*
Hingst nr 2	AI 3 st	0 %	0 %
	TAI 6 st	20 %	33 %
Hingst nr 3	AI 8 st	81 %	88 %
Hingst nr 4	AI 6 st	71 %	100 %
	TAI 18 st	38 %	67 %

\*Hingst nr 1 avbröt säsongen p g a tävling samt en allmäninfektion. De 2 ston som då inte var färdigseminerade blev dräktiga med andra hingstar.

## Diskussion

De resultat som utgick från denna studie visar att andelen viabla spermier inte alls följer andelen motila spermier, utan är i stort sett konstant över tiden efter att den initialt fått stabilisera sig. Man kunde därigenom också konstatera att Annexin V detekterar försämringar i spermieviabilitet tidigare än motilitetsbedömning.

Förvånansvärt nog sågs en ökning av andelen viabla spermier under de första timmarna i 20°. Detta skulle kunna förklaras med att translokationen av fosfolipider såsom fosfatidylserin till följd av förlorad membranassymmetri till viss del är reversibel så länge membranet är intakt (Müller et al., 1994). Stress som spermier utsätts för i samband med transport och hantering fram till samt nedkylningen på laboratoriet kan tänkas orsaka reversibla såväl som irreversibla skador. De spermier som inkuberades i 20° slapp den stress som nedkylning innebär och hade därmed chans att återhämta sig. Detta förklarar också till viss del varför de förändringar som skedde inträffade under de första timmarna.

Generellt verkade det som att spermier efter våra parametrar trivdes klart bättre i rumstemperatur än i kyla. Sämst mätte de i kylskåpstemperatur, men skillnaden var inte så stor jämfört med frigolitboxen, som motsvarar de verkliga förhållanden som transportsperma utsätts för. Det är sedan länge känt att spermier påverkas negativt av kyla och f f a för snabb nedkylningshastighet, "cold-shock" (Söderquist, 2000). Troligen kylde sperman snabbare i kylskåpet respektive frigolitlådan än den skulle göra i verkligheten eftersom provrören som användes i studien var smalare och innehöll en mycket mindre mängd sperma än de normala

AI-doserna. Man kan alltså tänka sig att de blev lite mer illa åtgångna i studien än i verkligheten. Det är dock viktigt att undvika att kyla spermerna för hastigt och för kraftigt. I praktiken måste man förstås också ta hänsyn till att spermans hygieniska kvalitet försämras genom bakterietillväxt om den förvaras för varmt.

Det fanns stora standardavvikelser inom data för a beträffande motilitet. En viktig orsak till detta är att själva bedömningen av motiliteten är subjektiv. En ytterligare osäkerhetsfaktor är att efterhand som spermerna åter värms upp efter att ha varit kylda återtar de till viss del sin motilitet. Därför kan resultaten variera lite beroende på hur länge de får ligga på mikroskopets värmeplatta innan bedömningen görs. I detta ligger också fördelen med flödescytometri som analysmetod, i och med att den mänskliga faktorn till största delen elimineras. Dessutom baserar sig den flödescytometriska analysen på ett betydligt större antal spermier (10 000-tals jämfört med 100-tals), vilket ger en sannare återgivning av verkligheten. Tyvärr utvisade studien inget som tydde på att Annexin V-metoden skulle vara bättre än motilitetsbedömning för att identifiera subfertila hingstar, och därmed förlorade den sin vikt som analysmetod, då motilitetsbedömning är det överlägsna ur kostnadssynpunkt.

När man tittade på de individuella hingstarna, avvek hingst nr 4 genom att han har en klart lägre proportion av både viabla respektive motila spermier än hingstarna 1 och 3, vilket var en intressant iakttagelse. Tyvärr avvek hingst nr 2, vars dräktighetsresultat var mycket dåliga, inte från någon av parametrarna. Detta gör att man kan dra slutsatsen att Annexin V-metoden inte fångar upp alla subfertila hingstar. Det är dock inte omöjligt att den fångar upp fler subfertila hingstar än den gängse motilitetsbedömningen, men det krävs i så fall betydligt större studier för att utröna detta. Tyvärr var antalet semineringar också för få för att det skulle gå att göra några statistiska analyser av hur Annexin V-metoden eventuellt kan korrelera med fertiliteten, vilket hade varit av största intresse. Den hingst som har bäst dräktighetsresultat, nr 3, har också bäst motilitet i 5° och 9°, och ligger i topp tillsammans med hingst 1 (näst bäst dräktighetsresultat) vad gäller andel viabla celler. Det finns dock inget som tyder på att metoden skulle kunna användas för att förutsäga fertilitet. Vid tolkningen av resultaten måste också hänsyn tas till att hingstmaterialet (4 hingstar x 4 replikat) är mycket begränsat.

Utökade studier kan kanske visa att liksom ett flertal andra metoder kan Annexin-V användas för att selektera bort hingstar som av specifika anledningar har sämre fertilitet. Kanske kan man tänka sig att metoden någon gång i framtiden skulle kunna användas som en av flera parametrar i en panel av flödescytometriska analyser som tillsammans ger en fullständigare bild.

## Slutsats

Med Annexin V-metoden kan man bedöma försämringar i spermieviabilitet tidigare än man kan se försämringar i motilitet. Fördelarna med metoden är också att den är objektiv och att den baseras på en analys av ett mycket större antal enskilda spermier än vid en motilitetsbedömning. Annexin V-metoden identifierar inte samtliga subfertila hingstar och det finns heller inget som tyder på att metoden skulle kunna användas för att förutsäga fertiliteten hos ett visst djur. Studien visade inget som tydde på att Annexin V-metoden skulle vara bättre än motilitetsbedömning för att identifiera subfertila hingstar, och därmed förlorade den sin vikt som analysmetod.

Ytterligare studier behövs för att fastställa eventuella korrelationer med fertilitet och för att utröna om metoden möjligtvis identifierar fler subfertila hingstar jämfört med motilitetsbedömning.

## Referenser

- 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
- Colenbrander, B., Gadella, B.M. & Stout TA. 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 Veterinaria Scandinavica Suppl.* 88, 49-58
- Graham, J., 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68, 239-247
- Januskauskas, A., Johannisson, A. & Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60, 743-758
- Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper, W.L. & Morse, G.W. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *Proceedings of the 21th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 327-336
- Kenney, R.M., Hurtgen, J., Pierson, J., Whitterspoon, D. & Simons, J., 1983 Theriogenology and the Equine, Part II, The Stallion, Semen examination. *Journal of the Society of Theriogenology* 9, 1-100
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., MacGahon, A.J., Raader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. & Green, D.R. 1995 Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1545-1556
- Müller, K., Pomorski, T., Müller, P., Zachowski, A. & Herrmann, A. 1994. Protein-Dependent Translocation of Aminophospholipids and Asymmetric Transbilayer Distribution of Phospholipids in the Plasma Membrane of Ram Sperm Cells. *Biochemistry* 33, 9968-9974
- Oosterhuis, G.J., Mulder, A.B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C.B., Schoemaker, J. & Vermes, I., 2000 Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility* 74, 245-250

- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C. & Haanen, C., 1998. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis* 3 115-121
- Pena, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M. & Rodriguez-Martinez, H., Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60, 677-89
- Rodriguez-Martinez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals* 38, 312-318.
- Söderquist, L., 2000 *Compendium on Equine Reproduction*. Tredje upplagan. Sveriges Lantbruksuniversitet. Uppsala, Sverige. 174pp
- 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.

## Tackord

Jag vill rikta ett stort tack till Björn Andersson på Gurresta Hingststation och Ove Stenson på Lövsta stuteri som låtit mej få spermaprover till studien, och som hela tiden varit så trevliga, positiva och hjälpsamma.

Ett stort tack också till Szabolcs Nagy, som ställt upp och kört flödescytometrin på alla möjliga konstiga tider, och till Anders Johannisson som också hjälpt till.

Tack Nils Lundeheim, som bistått med den statistiska analysen.

Jag vill också tacka Wolfgang för tålmodig hjälp med trilskande datorer, Patrik Öhagen som invigt mig i Minitabs mysterier och alla hjälpsamma bibliotekarier, särskilt Cecilia Petersson på KC-biblioteket.

Sist men inte minst vill jag tacka mina tålmodiga handledare Heriberto och Lena som hjälpt mig med små och stora problem.