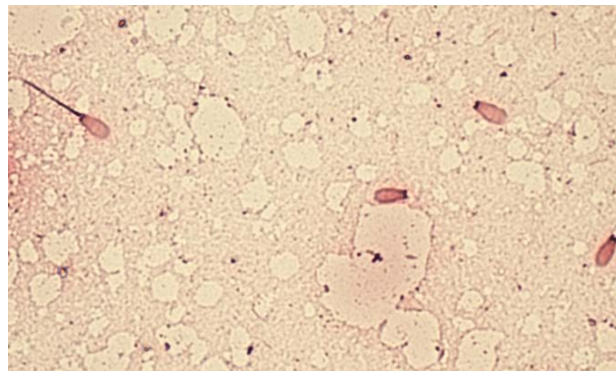


# Effekt av tid och temperatur på homogeniseringsresistenta spermatiser



*Caroline Stålheim*

*Uppsala  
2018*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2018:86*



# Effekt av tid och temperatur på homogeniseringsresistenta spermatider

## Effect of time and temperature on homogenization- resistant spermatids

*Caroline Stålheim*

*Handledare: Sara Persson, institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Ulf Magnusson, institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0830

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2018

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2018:86

**ISSN:** 1652-8697

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** homogeniseringsresistenta spermatider, förvaringstid, temperatur, testikelvävnad, tjur

**Key words:** homogenization-resistant spermatids, storage time, temperature, testicular tissue, bull

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## **SAMMANFATTNING**

Bedömningar av reproduktionstoxicitet görs på både tama och vilda djur, ibland används djurarter som så kallade indikatorarter. En indikator kan beskrivas som en icke-mänsklig organism vilken kan reagera på en miljöförorening innan föroreningen påverkar människor. Konceptet är inte nytt och används i syfte att förvarna människan innan föroreningen kommer att drabba den humana populationen eller bli ett miljömässigt problem. Användandet av indikatorarter ger också en uppfattning över artens reproduktiva förmåga och dessa djurarter kan givetvis även studeras enbart i syfte för artens egen skull. Studier på vilda djur står inför flera praktiska problem och tiden mellan avlivning och provtagning utgör en betydande faktor för kvaliteten på proverna. Detta påverkar inte bara vilka undersökningar som kan genomföras utan också resultaten av dessa.

Även om vävnaden förvaras under så optimala förhållanden som möjligt så kan den till slut komma att påverkas. Temperatur och tid är två faktorer som har visat sig spela betydande roll för förvaring av testikelvävnad. Hur stor deras påverkan på vävnaden är och hur detta i sin tur påverkar olika typer av undersökningar är ännu inte helt fastställt. Aspekterna tid och temperatur har därför varit av intresse i denna studie. Studiens mål var att simulera ett antal suboptimala fältlika förhållanden med olika temperatur och under olika långa förvaringsperioder. En vanligt förekommande metod för utvärdering av hanlig reproduktions-toxicitet vid experimentella studier är kvantifiering av homogeniseringsresistenta spermatider. Denna metod har valts i denna studie och 68 vävnadsprover ifrån testiklarna till en tjur har homogeniserats varefter antalet spermatider har räknats manuellt med hjälp av en räknekammare.

Resultaten tydde på att kylförvaring av testikeln under några dagar innan kvantifiering är möjlig. Även förvaring i rumstemperatur är möjlig inom ett par dygn. Proverna kan också frysas om direkt bedömning inte är genomförbar, infrysningen kan ske direkt eller efter kylförvaring men frysta prover som har tinats bör inte frysas på nytt för att användas vid ett senare tillfälle. Frysta prover hade inte signifikant lägre antal homogeniseringsresistenta spermatider, men medelvärdena låg konstant lägre jämfört kylförvarade prover, vilket är ett observandum om metoden ska användas på arter med känsligare spermatider än tjur. Då spermatiderna är fortsatt motståndskraftiga mot homogenisering trots förvaring i olika temperaturer över tid så har metoden goda förutsättningar att fungera på vilda djur.

## **SUMMARY**

Reproduction toxicity assessments are made on both domestic and wild animals, sometimes animal species are used as so-called indicator species. An indicator can be described as a non-human organism which can respond to an environmental pollution before pollution affects people. The concept is not new and have long been used to warn humans against contamination that will affect the human population or become an environmental problem. The use of indicator species also gives an idea of the species own reproductive capacity, and of course these species can also be studied whit this as the only objective. However, studies that include wild animals face several practical problems, the time between death and tissue collection is a significant factor when it comes to the quality of the samples. This does not only affect the type of analysis that can be carried out but also the results of those analyses.

Although the tissue is stored under optimal conditions, eventually it will be affected. Temperature and time are two factors that have been shown to play a significant role in the storage of testicular tissue. The extent of the impact on the tissue and in turn how this affects different types of investigations is not yet fully established. The aspects of time and temperature have therefore been of interest in this study. The aim of this study was to simulate, a number of less optimal, field-like conditions with different temperatures and different storage time. A commonly used method for evaluating male reproduction toxicity in experimental studies is the quantification of homogenization resistant spermatid heads. This was chosen for this study and 68 tissue samples from the testicles of a bull were homogenized, after which the number of spermatids was quantified manually with the help of a counter chamber.

The results indicated that cold storage of the testicle for a few days before quantification is possible. Storage at room temperature is also possible during a couple of days. The samples can also be frozen if direct assessment is not feasible. Freezing can be done directly or after cold storage but frozen specimens that have been thawed should not be frozen again for use at a later date. Frozen specimens did not have significantly lower numbers of homogenization-resistant spermatids, but the mean values were constant lower compared to refrigerated samples, which is an observation if the method is to be applied to species with more sensitive spermatids than bull. As the spermatids are still resistant to homogenization despite storage at different temperatures over time, the method has good possibilities to work on wild animals.

## INNEHÅLL

[\\_Toc504124473](#)

INLEDNING .....	1
Syfte och mål .....	2
LITTERATURÖVERSIKT .....	3
Utvärdering av hanlig reproduktionstoxicitet .....	3
Beräkning av spermatozoer och homogeniseringsresistenta spermatider .....	4
<i>Manuell kvantifiering</i> .....	4
<i>Räknekammare</i> .....	4
<i>Typer av räknekammare</i> .....	5
Datorassisterad kvantifiering .....	6
Förvaring av testikelvävnad .....	7
Kylförvaring och medium .....	7
Förvaring i högre eller lägre temperaturer än kylskåp .....	8
Kunskapsläget idag .....	9
MATERIAL OCH METODER .....	10
Utrustning och användning .....	10
Pilotstudie .....	10
<i>Resultat från pilotstudie</i> .....	11
Huvudstudie .....	11
<i>Provtagning</i> .....	11
Bearbetning av data .....	13
RESULTAT .....	14
<i>Effekt av kylförvaring</i> .....	14
<i>Effekt av frysning</i> .....	15
<i>Effekt av förvaring i rumstemperatur</i> .....	16
<i>Jämförelser mellan förvaringar och effekt av upprepad frysning av prover</i> .....	16
Precision .....	17
DISKUSSION .....	18
<i>Kylförvaring</i> .....	18
<i>Frysning av prover</i> .....	18
<i>Förvaring i rumstemperatur</i> .....	19
<i>Frysning följt av upptining och frysning igen</i> .....	19

<i>Inverkan av studiedesign</i> .....	20
Slutsats.....	21
Tack .....	21
REFERENSER.....	22



## INLEDNING

Utvärdering av hanlig reproduktionstoxicitet kan göras på flera sätt och ställas upp med flera olika kriterium, ett viktigt sådant kriterium är kvantifiering av spermieproduktion. Spermieproduktionen kan exempelvis utvärderas genom spermaprov, genom att väga testiklarna eller genom att mäta antalet lyckade utfall av parningar efter att handjurets testiklar utsatts för toxiska ämnen. (Ban *et al.*, 1995). Kvantifiering av homogeniseringsresistenta spermatidhuvuden är ett annat exempel på en metod som kan användas för att uppskatta spermieproduktion (Choi *et al.*, 2008). Homogenisering av testikelvävnaden innebär att vävnaden mekaniskt finfördelas och blandas med en spädningslösning så att en suspension bildas. Spermatiderna är, tack vare det hårt packade kromatinet som finns i dem, motståndskraftiga emot homogenisering. Andra komponenter av testikelvävnaden är inte lika motståndskraftiga emot homogenisering utan förstörs istället utav sådan behandling, homogenisering möjliggör på så sätt utskiljning och beräkning utav spermatiderna (Amann & Almquist, 1962). Med hjälp av en räknekammare (ex en hemocytometer) så kan sedan spermatiderna sedan kvantifieras. Kvantifieringen kan utföras manuellt eller datorassisterat (Choi *et al.*, 2008).

Vid bedömning av reproduktionstoxicitet så kan både tama och vilda djur komma att användas, ibland som så kallade indikatorarter. En indikatorart kan beskrivas som en icke-mänsklig organism vilken kan reagera på en miljöförorening innan föroreningen påverkar människor. Konceptet är inte nytt och det mest kända exemplet är kanske de kanariefåglar som användes i gruvorna för att varna arbetar för höga halter av kolmonoxid. Ett mer aktuellt exempel är de reproduktionsstörningar som uppstått hos fiskar, fåglar och vattenlevande reptiler och däggdjur som följd av de hormonstörande kemikalier som läckt ut i miljön, kemikalier som så småningom även kan komma att affektera den humana populationen (van der Schalie *et al.*, 1999).

Användandet av indikatorarter ger en uppfattning inte bara över artens egen reproduktiva förmåga utan också en indikation om att miljön har förändrats på ett negativt sätt, vilket kan komma att vara intressant även ur ett miljömässigt och humant perspektiv. Det gör indikatorer användbara inom miljöövervakningen. När det gäller denna typ av studier, och särskilt de med vilda djur, så utgör dock tiden mellan avlivning och provtagning en betydande faktor för kvaliteten på proverna, vilket påverkar vilka undersökningar som kan genomföras. Dessutom kan det vara mycket svårt eller rent av omöjligt att ha utrustningen i närheten av den plats där sövningen eller avlivningen äger rum. Andra exempel som ytterligare försvåra saken är förvaring av jaktbyten i utomhustemperatur liksom djur fångade i direktdödande fällor i vilka förvaras utomhus under en okänd tidsperiod innan insamling, vilket kan medföra att djurkroppen fryser eller förvaras varmt under flera timmars tid.

Det bör nämnas att trots att vävnaden förvaras under så optimala förhållanden som möjligt så kan den tillslut komma att påverkas. Temperatur och tid är två faktorer som har visat sig spela betydande roll för förvaring av testikelvävnad. Hur stor deras påverkan på vävnaden är och hur detta i sin tur påverkar olika typer av undersökningar är ännu inte helt fastställt (Tittarelli *et al.*, 2006; Faes & Goossens, 2017). Dessa aspekter är därför av intresse för vidare utvärdering. En

typ av mindre optimala förutsättningar som är relevanta för flertalet studier är de som uppstår under fältmässiga förhållanden.

### **Syfte och mål**

Denna studie har som mål att undersöka hur temperatur och tid påverkar antalet homogeniseringsresistenta spermatiser. Kylförvaring i kylbox och flytt till kylskåp får anses som förhållandevis enkla förvaringsmetoder vilka torde därför kunna nyttjas under mera fältmässiga förhållanden varför det är intressant att utvärdera dess påverkan på proverna. Denna studie har därför i huvudsak fokuserat på prover förvarade i kylskåp, men även prover som frysts efter viss tid i kylskåp och prover som förvarats i rumstemperatur har ingått i studien. Syftet med studien är att ta fram grundläggande underlag och referensuppgifter för framtida studier av reproduktionstoxicitet på vilda djur, exempelvis inom miljöövervakning.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Utvärdering av hanlig reproduktionstoxicitet

Det finns flera sätt att utvärdera hanlig reproduktionstoxicitet och ett viktigt kriterium vid sådana studier är kvantifiering av spermieproduktionen. Ett snabbt och enkelt sätt är att väga testiklarna, där viktförlust indikerar att testiklarna skadats och att produktionen blivit nedsatt. Den största nackdelen med denna metod är att den egentliga vikten kan maskeras av samtidiga förändringar i testikelvävnaden, exempelvis ödem, inflammation eller hyperplasi av interstitialceller (Ban *et al.*, 1995). Kvantifiering av spermier är en mycket vanlig förekommande metod som kan användas för att uppskatta spermieproduktion (Prathalingam *et al.*, 2006). Vid kvantifiering av det epididymala spermatidantalet så är tillvägagångssättet liknande (Strader *et al.*, 1996). Vanligt är användandet av en räknekammare (t.ex. hemocytometer) för manuell räkning med mikroskop och/eller datorassisterade spermieanalys system (på engelska CASA, computer-assisted semen analysis) (Choi *et al.*, 2008).

Utvärderingar av hanlig reproduktionstoxicitet kan även ha stor nytta av en histopatologisk undersökning av testiklarna och bitestiklarna vilken syftar till att påvisa förändringar i vävnaden på en mikroskopisk nivå. Särskilt hjälpsam är en histopatologisk undersökning i de fall där specifika celltyper tros ha påverkats (exempelvis Sertoli celler, Leydig celler, seminefrös epitel) eller vid misstanke om påverkad spermatogenes (Ban *et al.*, 1995). Vid en histopatologisk undersökning måste både fixering och infärgning ske under tillräckligt lång tid vilket ofta gör att undersökningarna tar flera veckors tid (Lanning *et al.*, 2002).

För kvantifiering av antalet homogeniseringsresistenta spermatider hos råttor så nyttjas vävnad ifrån epididymis och/eller testiklar. Då testerna utförs på råttor så är det vanligast att man använder cauda epididymis men även enbart caput eller hela epididymis kan också nyttjas (Seed *et al.*, 1996). Det bör dock beaktas att vid användandet av bitestikeln så spelar kondition och position av spermier roll då detta är faktorer som kan ge upphov till variation (Strader *et al.*, 1996). Rekommendationerna som gäller för råttor har också visat sig applicerbara på andra djur, exempelvis kaniner och hundar men med skillnaden att det från dessa djur även går att samla in upprepade spermaprover med hjälp av en artificiell vagina och då beräknas istället vanligen antalet spermatozoer (Seed *et al.*, 1996). Kvantifiering av homogeniseringsresistenta spermatidhuvuden i testiklar och bitestiklar kan behöva kompletteras med histologisk undersökning för att studera specifika celltyper (ex Sertoli- eller Leydig-celler) samt för att utvärdera eventuell åverkan på spermatogenesen (Ban *et al.*, 1995). För att bli så heltäckande som möjligt så delas en undersökning av spermatozoer vanligtvis in i tre delar, spermieantal, motilitet och morfologi (Seed *et al.*, 1996). Undersökning av homogeniseringsresistenta spermatider görs på liknande sätt men av förklarliga skäl kommer flera parametrar så som motilitet och velocitet inte att kunna bedömas i det homogeniserade provet. Dessutom kan morfologiska undersökningar på homogeniserade spermatider bli missvisande då homogeniseringen kan påverka spermatidernas form och därför görs den typen av undersökningar istället med fördel på icke homogeniserade prover. (Ban *et al.*, 1995; Strader *et al.*, 1996).

Kvantifiering av spermatider kan liksom kvantifiering av spermatozoer göras manuellt eller datorassisterat och med en rad olika kammare. Dessutom kan man vid datorassisterade beräkningar även använda olika märkningar av spermatiderna för att underlätta processen (Seed *et al.*, 1996; Strader *et al.*, 1996; Zinaman *et al.*, 1996). För att minska de störningarna som uppstår på grund av cellkontamination kan man även låta homogenatet genomgå filtrering och cellysering. Detta ger ett mer korrekt resultat och trots extra arbetssteg så bedöms sådana metoder som effektiva (Choi *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2012).

## **Beräkning av spermatozoer och homogeniseringsresistenta spermatider**

### ***Manuell kvantifiering***

Manuell kvantifiering av spermatozoer och senare även spermatidhuvuden med hjälp av räknekammare är ett av de äldsta och enklaste sätten att kvantifiera spermatozoer/spermatider och ofta jämförs eller kalibreras andra metoder emot denna metod (Strader *et al.*, 1996). Den manuella kvantifieringen av spermatozoer går ut på att provet, spätt eller outspätt, placeras i en räknekammare och under mikroskopisk granskning så räknas antalet spermatozoer. Även andra parametrar så som motilitet och morfologi kan bedömas i samband med kvantifieringen. Vid manuell kvantifiering av spermatider så homogeniseras först provet och därefter räknas antalet spermatidhuvuden på samma sätt som antalet spermatozoer (Seed *et al.*, 1996). Metoden att manuellt kvantifiera spermatider har trots sitt spridda användande flera nackdelar, det är tidskrävande, utsatt för variation av genomsnittet och dessutom påverkbar genom bias (Pacheco *et al.*, 2012). Till detta bör läggas problem så som agglutination i spermaprovet, otillräcklig homogenisering av vävnadsprovet eller utmattning av laboratoriepersonalen vilka alla ger upphov till variation av resultatet (Choi *et al.*, 2008). Det bör dock nämnas att precisionen ökar om ett stort antal spermatidhuvuden räknas (minst 300-400) men detta gör metoden ännu mer tidskrävande och utesluter inte bias (Prathalingam *et al.*, 2006). Problemet med att debris räknas som spermatidhuvuden eller att överlappande huvuden inte räknas alls uppstår inte i samma utsträckning vid manuell kvantifiering som vid exempelvis CASA (Strader *et al.*, 1996). Den manuella kvantifieringen kan ytterligare försvåras av användandet av olika räknekammare vilka kan ge upphov till variation i resultat (Seaman *et al.*, 1996).

### ***Räknekammare***

Användandet av olika räknekammare kan vara ett upphov till variation i resultat särskilt då pålitlighet och noggrannhet inte är ordentligt utvärderad (Seaman *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2015). Sådan utvärdering av räknekammare är problematisk då man i förväg ofta inte vet spermiekoncentrationen i sina prover. För att hantera detta så används i många studier kommersiella lösningar innehållande en förutbestämd koncentration latexkulor vilka är uniforma och identiska. I vissa fall kombineras latexkulorna med spermaprover för att kunna fastställa spermaprovet's egentliga koncentration (Prathalingam *et al.*, 2006). Latexkulor har fördelen att de är lättare att räkna med större noggrannhet samt att de har en längre hållbarhet och därför kan förvaras i månader mellan användningarna och på så vis kan samma kulor användas till ett större antal prover (Peng *et al.*, 2015; Prathalingam *et al.*, 2006).

Vid mätning av spermiekoncentrationen samt vid mätning av koncentrationen med latexkulor så har Maklers flergångs räknekammare en större variation och överskattar signifikant resultatet jämfört med flertalet engångs räknekamrar (CELL-VU, Nificro-CeU, GoldCyto och Leja) (Peng *et al.*, 2015). Men vid jämförelse av Makler emot en hemocytometer så har Maklers rapporterats visa konsekvent lägre antal spermatider i spermaprover än hemocytometern (Tomlinson *et al.*, 2001). Och hemocytometern har bedömts vara mer exakt än Maklers kammare när det gäller bedömning av spermakoncentration, särskilt vid låg spermiekoncentration/oligozoospermi (Marchlewska *et al.*, 2010). Dessutom har engångsräknekammare (Microcell, Leja och CELL-VU) vid jämförelse med hemocytometern visat lägre spermakoncentration än denna och särskilt stor har skillnaden varit om spermiekoncentrationen i provet har varit hög (Tomlinson *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006). Spermiernas motilitet tycks vara högre i de räknekamrar som dropp-fylls än de som fylls med hjälp av kapillärkraft. Vid användandet av engångsräknekamrar kan spermierna och deras motilitet dessutom påverkas av klister, bläck eller annan beläggning (Seaman *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2015). En grund räknekammare kan användas för att minska risken att två spermatider överlappar varandra och därmed underlätta beräkningen (Strader *et al.*, 1996). Grunda räknekammare som fylls med kapillärkraft kan dock råka ut för att spermatiderna skjuts emot kammarens ytterkanter (via Segre-Silberbergs effekt och Poiseilles lag) och därmed fördelar sig ojämnt i räknekammaren (Peng *et al.*, 2015). Ojämn fördelning av spermatiderna i räknekammaren kan också ses om kammaren inte fylls helt och ger upphov till variation i resultatet (Strader *et al.*, 1996).

Viktigt för ett jämt resultat tycks vara användandet av samma metod med samma typ av utrustning vid alla försök. Dessutom så bör ett standardiserat förfarande tas fram och detta bör inkludera vilken typ av räknekammare som skall användas, vilken typ av räknekammare som kommer närmast det sanna spermatidantalet är inte ännu fastställt (Seaman *et al.*, 1996; Strader *et al.*, 1996; Krause & Viethen, 1998; Tomlinson *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2015).

## **Typen av räknekammare**

### *Hemocytometer*

Hemocytometern är en typ av räknekammare som från början togs fram för att kunna räkna blodceller. Spermaprover måste därför spädas för att kunna räknas i denna typ av kammare, kammaren har dock funnits länge och varit accepterad som en sorts standard för kvantifiering av spermatider. Dess generella uppbyggnad består av en basplatta i optiskt glas med frästa spår i plattan vilka formar ett H. De två utrymmena som bildas mellan de frästa spåren i H:et är någon tiondels millimeter lägre än de omgivande delarna av basplattan vilket möjliggör att ett täckglas placeras över mittdelarna med ett visst utrymme emellan (vanligen 0,1mm) och därmed bildas en kammare. På den yta på basplattan som utgör kammaren så hittas ett rutnät vilket kan variera beroende på hemocytometer-modell (Seaman *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2006; Marchlewska *et al.*, 2010; Brand, 2017). Till de vanliga rutnäten hör Neubauer, Improved Neubauer, Thoma, Bürker, Fuchs-Rosenthal, Malassez och Nageotte. Antalet linjer och därmed även antalet rutor i rutnätet varierar beroende på typ av mönster liksom även storleken på rutorna och volymen som kan administreras i kammaren. Detta gör givetvis de olika kamrarna lämpliga för olika typer av användningsområden, exempelvis räknande av trombocyter,

erythrocyter, nematoder, celler i cerebrospinal vätska eller räknandet av spermier i spädda lösningar (Prathalingam *et al.*, 2006; Marchlewska *et al.*, 2010; Brand, 2017).

Bürkerkammarens rutnät består av tredubbla linjer som delar kammaren i nio större rutor, varje sådan ruta delas sedan av dubbla linjer i sexton mindre rutor. Varje liten ruta är 0,2x0,2 mm och kammarens höjd är 0,1mm vilket ger kammaren över rutnätet en volym på 0.576mm<sup>3</sup> (Brand, 2017).

### *Makler*

Maklers kammare togs fram för bedömning av motila spermier samt för beräkning av spermiekoncentration i utspädd sperma. Kammaren består av två optiska glas, det ena utgör en basplatta och det andra ett täckglas. Täckglaset vilar på fyra stift 0,01mm ovanför basplattan vilket gör kammaren en tiondel så djup som den hos en traditionell hemocytometer. Rutnätet är placerat på täckglaset och består av 100 rutor vilka är 0,1x0,1mm stora. Till Makler kammarens stora fördelar hör att man kan använda utspädda spermaprover samt att kammarens djup är så pass grunt att suddighet som exempelvis kan uppstå i den djupare hemocytometern försvinner (Seaman *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2006; Marchlewska *et al.*, 2010; New York Microscope Company, 2017).

### *Räknekammare av engångstyp*

Förutom de räknekammare som är av flergångstyp så som hemocytometern och Maklers kammare så finns även flertalet räknekammare för engångsbruk på marknaden. Dessa kan komma i något varierande utföranden, exempelvis med fast eller löst täckglas samt med eller utan rutnät. Till de vanligare varianterna hör CELL-VU, Micro-CeD och Leja, dessa ses ofta på laboratorier som sysslar med in vitro fertilisering. Som tidigare nämnts kan spermatiderna i engångsräknekammare påverkas av klister, bläck eller annan beläggning vilket inte finns i flergångsräknekammare (Seaman *et al.*, 1996; Tomlinson *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2015). Tillverkarna själva lyfter däremot fram att engångsräknekammare har flera fördelar gentemot flergångskammare. Till de mest framhållna egenskaperna hör minskad rengöringstid och minskad risk för kontamination mellan proven på grund av dålig rengöring, därtill läggs även minskad exponering och minskad risk för kontamination i laboratoriet (Vitrolife, 2015; Millenium Sciences, Inc., 2016).

## **Datorassisterad kvantifiering**

För datorassisterad kvantifiering så används ett system som kallas CASA. CASA står för Computer Assisted Semen Analysis. Metoden har tagits fram och utvecklats sedan 80-talet men det var först 1995 som metoden kom att bli tillförlitlig nog att använda i laboratoriemiljö. Via en videokamera så skickas bilder från mikroskopet till en dator och datorn identifierar spermier och deras position i bilden. Genom att följa spermierna över flera bilder kan även motilitet och även typ av rörelsemönster identifieras (Krause & Viethen, 1998; Mortimer, 2000). CASA är därmed överlägset bättre än andra metoder när det gäller bedömning av motilitet och dokumentering av resultaten, vilket sker automatiskt. Tyvärr saknas en standardiserad metod vilket ger en ökad risk för missvisande resultat, särskilt om kompetensen hos utövarna är låg (Krause & Viethen, 1998; Peng *et al.*, 2015).

Till CASA kan dessutom ett flertal automatiska system adderas för att göra resultaten mer exakta och för att kunna identifiera flera parametrar. Ett vanligt sådant tillägg är IDENT där spermier märks med ett ämne som fluorescerar under belysning, ämnet fäster inte till debris och gör det därmed enkelt för datorn att skilja spermier och debris åt. Vanlig CASA kan ha svårigheter att skilja debris ifrån spermatider och därmed ge missvisande höga resultat, en risk vilken kan minskas med användandet av IDENT (Strader *et al.*, 1996; Zinaman *et al.*, 1996). Användningen av CASA eller CASA tillsammans med IDENT leder bägge till stora tidsvinster jämfört med manuell kvantifiering (Pacheco *et al.*, 2012). Utöver IDENT så har tillverkarna varit flitiga på att ta fram andra märkningar som kan användas i kombination med CASA och underlätta denna (Hamilton Thorne, Inc, 2013. Microptics S.L., u.å.).

## **Förvaring av testikelvävnad**

Vid studier, särskilt de som inkluderar vilda djur, så kan praktiska hinder påverka tiden mellan avlivning och hantering av materialet. Exempel på sådana hinder är avlivning genom direktdödande fällor, dåligt väder, valet av transportsätt samt långt avstånd mellan avlivningsplatsen och laboratoriet. Vävnaden bör därför förvaras och även transporteras på ett sätt så att så liten påverkan som möjligt uppstår. Men även en bra förvaring kan leda till förändring på vävnaden, vilken vävnad som används och vilket medium som vävnaden förvaras i spelar roll för hållbarheten (Filliers *et al.*, 2006; Faes & Goossens, 2017). Även temperatur, tid och förvaringsmiljö tycks spela en avgörande roll för hållbarheten (Tittarellie *et al.*, 2008; Faes & Goossens, 2017). Det bör påpekas att storleken på vävnadsprovet inte tycks påverka graden apoptotiska celler i vävnaden men att histologiska undersökningar av vävnadsmorfologin underlättas i de fall då vävnaden inte har dissekerats ner i mindre fragment. Större vävnadsprover hade generellt sätt bättre struktur med mindre rupturer, lägre svullningsgrad och färre cellförluster, det bedömdes dock i studien att flera undersökningar behövdes för att fastställa en statistiskt signifikant skillnad mellan olikstora vävnadsprover. (Faes & Goossens, 2017). Hänsyn bör även tas till morfologiska förändringar som uppstår på grund av fördröjd fixering, som vid histopatologisk undersökning kan feltolkas som toxiskskada och därmed ge ett felaktigt resultat (Spörndly-Nees *et al.*, 2015).

## **Kylförvaring och medium**

Motiliteten hos spermatiderna är inte helt oväntat den parameter som påverkas kraftigast vid kylförvaring (+4°C). Epididymal sperma från katt, som förvarats i kylskåp i upp till tio dagar, visade en minskad motilitet och velocitet jämfört med färsk prover (Filliers *et al.*, 2008). Även kylförvaring i 3 dagar av epididymal sperma från hund och katt uppvisar framförallt nedsatt motilitet men även nedsatt velocitet jämfört med epididymal sperma som kylförvarats i endast 24 timmar (Tittarelli *et al.*, 2006). Epididymal sperma från kronhjort som kylförvarats (+5°C) i två dagar uppvisade nedsatt motilitet jämfört med epididymal sperma som kylförvarats i endast 3 timmar. Fortsatt kylförvaring i 1-2 dagar ledde till ytterligare minskning av motiliteten (Soler *et al.*, 2003). Motiliteten hos epididymala spermatozoer från möss avtar liksom hos andra studerade djurslag gradvis och det kan dröja upp till 15 dagar innan inga aktivt motila spermier hittas. Värt att notera är att trots detta så kan spermatozoerna efter upp till 20 dagars kylförvaring fortfarande innehålla spermier som vid direkt injektion i oocyter ger upphov till

utvecklingen av levande foster dock i betydligt mindre grad än om färskt material nyttjas. (Kishikawa *et al.*, 1999). Testikelvävnad från svin som förvarats i kylskåp (+4°C) visade inte någon sänkt cellviabilitet, överlevnadschans eller utvecklingspotential när den efter 48 timmar transplanterades till möss (Zeng *et al.*, 2009).

Flertalet studier enas alltså om att kylförvaring minskar spermatozoernas motilitet. Tiden som det tar för motiliteten att minska varierar däremot mellan olika studier och en tänkbar anledning som föreslagits är användandet av olika medium i de olika studierna (Filliers *et al.*, 2008).

Det är därmed inte sagt att alla medium spelar roll vid kylförvaring av spermatozoer. Vid kylförvaring av epididymal sperma från kronhjort så syntes efter både tre och fyra dagar liknande resultat oavsett om Triladyl användes som medium eller inte (Soler *et al.*, 2003). Vissa medium spelar dock roll vid förvaring i kylskåp. Epididymal sperma (från katt) som förvarades i Tris–glucosecitrate extender innehållande äggula i kylskåp (+4°C) i upp till tio dagar visade förändringar jämfört med färska prover (Filliers *et al.* 2008). Det är inte heller sagt att alla medium fungerar lika för alla djurslag. Vid kylförvaring av sperma ifrån hund och katt vilka förvarades i isotonisk saltlösning (SAL) eller i Tris-egg yolk (TEY) så syntes skillnader inte bara mellan de djurslagen utan även djurslagskillnader mellan de två mediumerna (Tittarelli *et al.*, 2006). Förklaringen mellan ovanstående studier kan ligga i användandet av olika medium och utvärderandet av olika djurslag. Det är inte omöjligt att tänka sig att liknande effekter kan ses vid utvärdering av homogeniserad testikelvävnad varför jämförande studier bör göras.

### **Förvaring i högre eller lägre temperaturer än kylskåp**

Testikelvävnad från mink (*Neovison vison*) som förvarats i rumstemperatur (21°C) i 6 timmar och sedan fixerats i modifierad Davidson's fluid uppvisar vid histopatologisk undersökning påverkan på epitelets höjd, på sertoliceller märkta med Gata-4 samt på cellernas morfologi jämfört med färskt material. Däremot så kunde det efter 30 timmar fortfarande inte ses några tydliga förändringar vad gäller area och diameter hos seminiferösa tubuli eller vad gäller testiklarnas längd och vikt, och inte heller några förändringar avseende längd eller vikt av akrosomer som märktes med Gata-4 (Spörndly-Nees *et al.*, 2015). Testikelvävnad (human) som sköljts och förvarats i DEME/F12 uppvisade efter förvaring i kroppstemperatur (37°C) i tre dagar ett ökat antal apoptotiska celler jämfört med färsk vävnad, däremot syntes inga skillnader vad gäller vävnadsmorfologi, sertolicells morfologi eller antalet spermatogonier (Faes & Goossens, 2017).

Vid frysning av epididymal sperma från hund har framförallt nedsatt motilitet noterats. Det bör dock noteras att vid frysning av epididymal sperma så syntes inga noterbara skillnader hos vävnaden om denna först kylförvarades (+5°C) i fyra dagar eller om den frystes direkt (Ponglowhapan *et al.*, 2006). Frysning före fixering påverkar de flesta nyckelpunkter som utvärderas vid histopatologisk undersökning (Spörndly-Nees *et al.*, 2015).

Skador vid frysning skulle även kunna uppstå då hypo-osmotisk vätska diffunderar in i cellerna och vid frysning får membranet att expandera. Frysning och upptining ökar permeabiliteten så att vätska då kan diffundera ytterligare längre in i vävnaden och orsaka större skada (Ando *et al.*, 2009). Membranets expansion vid vätskeinträde har hos spermier noterats vara större vid



bedömning av svansen än vid bedömning huvudet men expanderings förekommer även av huvudet. Skillnaden kan bero på att membranet på svansen inte är lika starkt fäst vid de underliggande strukturerna eller så kan det bero på att det i spermiehuvudet endast finns en mindre vätskeficka (Jeyendran *et al.*, 1984).

## **Kunskapsläget idag**

I dagsläget så är spermieproduktionen ett av de viktigaste kriterierna vid utvärdering hanlig reproduktionstoxicitet och det finns flertalet sätt att mäta denna på. Kvantifiering av homogeniseringsresistenta spermatidhuvuden är en vanligt förekommande metod och kunskap om hur framförallt spermier men även spermatider ska kvantifieras har funnits under flera år. I dagsläget används ett fåtal sätt att utföra kvantifieringarna på och till dessa har flertalet hjälpmedel tagits fram. Tekniska framsteg har dessutom gjort kvantifieringen mindre tidskrävande och inte lika utmattande för laboratoriepersonalen men har samtidigt ställt högre krav på teknisk kompetens hos personalen och på bättre ekonomiska förutsättningar hos laboratoriet.

Prover som inte kan studeras på en gång, exempelvis de ifrån vilda djur, måste förvaras med lämplig metod. När det gäller sperma så finns det mycket kunskap om hur denna ska förvaras i de fall då den inte kan användas/studeras omgående. Huvuddelen av den forskning som är gjord när det gäller förvaring av sperma är dock gjord med huvudsyfte att vid senare tillfälle kunna använda sperman för en senare insemination eller provrörsbefruktning och förvaringsmetoder för sperma är inte alltid direkt användbara för testikelvävnad. Vid förvaring av testikelvävnad så har framförallt morfologiska förändringar i vävnaden studerats vid histologiska undersökningar. Det har noterats att olika aspekter av vävnaden påverkas olika fort vid samma typ av förvaringsmetod. För att komplicera saken ytterligare så föreligger det i vissa fall dessutom djurslagskillnader vid förvaring av spermatozoer i samma temperatur och/eller i samma typ medium. De flesta studier är dock överens om att tid och temperatur tycks vara två av de viktigaste parametrarna för hur stor eller liten påverkan förvaringen kommer att ha på vävnaden.

Hur förvaring vid olika temperaturer och under olika lång tid kan komma att påverka antalet homogeniseringsresistenta spermatider som kan kvantifieras finns det däremot lite kunskap om. Den här studien syfte är därför att ta fram ett grundläggande underlag när det gäller förvaringstid och temperatur för vävnadsprover ifrån testiklar som av en eller flera anledningar inte kan komma att undersökas med en gång.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Utrustning och användning**

För homogeniseringen så användes Omni Tissue Homogenizer (Omni TH) med tillhörande plastspetsar (patented Omni Tip™ Plastic Homogenizer Probes for soft tissue). Spetsarna skiftades mellan de olika proven, rengjordes mellan de olika provtagningstillfällena och tilläts torka helt innan de användes på nytt.

Tritonlösningen som användes förbereddes i förväg enligt följande; 1000 destillerat vatten + 9g NaCl + 500µl Triton-X Mix. Lösningen blandades i ca 1 timme med hjälp av en magnetisk omrörare och förvarades sedan i kylskåp. Samma tritonlösning användes under både pilotförsöket och huvudförsöket.

För mikroskoperingen användes ett Olympus BHS (BH-2) System Mikroskop med 40gångers förstoring och till detta användes fem lika stora Bürkerkammare vilka tvättades och torkades mellan varje användning.

### **Pilotstudie**

Innan huvudförsöket startade så utfördes ett pilotförsök med avseende att utvärdera metod och utrustning inför huvudförsöket. I pilotförsöket så användes testiklar som dissekerades fram ifrån en mink förvarad i fryn och därefter tinad. Minken hade samlats in i ett projekt inom SLUs fortlöpande miljöanalys (program Giftfri miljö). Inget etiskt tillstånd behövdes. Testiklarna vägdes och bitestiklarna avlägsnades som en del i ett annat försök i vilken minken ingick. Därefter transporterades testiklarna till laboratoriet. En testikel delades med hjälp av skalpell i mindre bitar och testikelvävnad till en ungefärlig vikt av 1,5g placerades i ett provrör tillsammans med 10ml tritonlösning. Testikelvävnad och tritonlösning homogeniserades vartefter 100µl av den homogeniserade lösningen späddes med ytterligare 900µl tritonlösning och granskades i Bürkerkammare under mikroskop med 40 gångers förstoring.

Den mikroskopiska granskningens huvudsyfte i pilotstudien var inte att räkna antalet homogeniseringsresistenta spermatider utan att bedöma svårigheten i att utskilja dessa ifrån andra cellrester samt att nå fram till en optimal tid och en optimal hastighet för homogeniseringen. I tidigare studier så har ofta så hög rpm som homogeniseringsutrustningen tillåter används och tiden har varierat mellan ca 1-5min. Pilotförsöket inleddes därför med medelhastighet (20 000 rpm) och den kortaste avsatta tiden (1 minut) för att sedan succesivt stegras och därmed möjliggöra att samma prov användes till flera tidsintervall under samma hastighet. Efter varje tidsintervall så granskades resultatet av homogeniseringen med hjälp av mikroskop så som tidigare beskrivits.

Hastigheterna som prövades var medelhastighet (20 000rpm) respektive maxhastighet (35 000rpm) och tiden som började med 1 minut utökades med 15 sekunder för varje homogeniseringstillfälle tills tiden nådde 5 minuter.

## **Resultat från pilotstudie**

Under pilotstudien så visade det sig att homogenisering på medelhög hastighet (20 000rpm) gav mycket debris och framstegen när tiden ökades var långsamma. Homogenisering på max hastighet (35 000rpm) visade betydligt bättre resultat. Efter tidsintervall på 2 respektive 2½ minuter så hade förekomsten av andra cellrester minskat och spermatiderna kunde utan större svårigheter utskilja. Homogenisering i 3 minuter eller mer visade inga betydande förändringar, även om cellresterna minskade ytterligare vid högre homogeniseringstider så hjälpte detta föga när det gällde utskiljningen av spermatider.

Slutsatsen av pilotförsöket blev att det under huvudförsöket skulle användas maxhastighet (35 000rpm) i 2:15 minuters tid.

## **Huvudstudie**

Tjurtestiklar ifrån en ungtjur samlades in ifrån Lövsta slakteri, Uppsala, direkt efter normalslakt och därför behövdes inget etiskt tillstånd. Tjuren bedömdes i samband med slakten att vara frisk. Tjurens testiklar med bitestiklar vägde 276 respektive 281g, vilket gjorde det möjligt att ta alla proverna ifrån ett och samma djur och djuret kom därmed att bli sin egen kontroll under hela försöket vilket effektivt eliminerar den variation som kan uppstå om vävnad ifrån flera individer används. Alla proverna togs ifrån den större testikeln och är därmed inte med säkerhet representativa för hur många spermier som normalt finns testikelvävnad hos tjur eftersom viss individuell variation antas förekomma inom populationen. Tjuren valdes slumpmässigt ifrån slakteriet. Testiklarna förvarades under transporten mellan slakteriet och laboratoriet i en kylbox, försöket påbörjades vid ankomst till laboratoriet. Tiden mellan slakt och starten på försöket var ca 40min.

## **Provtagning**

Testikeln som användes för provtagning kom i huvudsak att kylförvaras (+5°C) men ett antal prover förvarades även i rumstemperatur (+20°C), ytterligare andra prover frystes (-20°C) efter ett antal timmars/dygns förvaring i kylskåp och förvarades i frys under 2-3 dagar och tinades i kylskåp. Några av dessa tinades för att sedan frysas på nytt och slutligen tinas igen och homogeniseras.

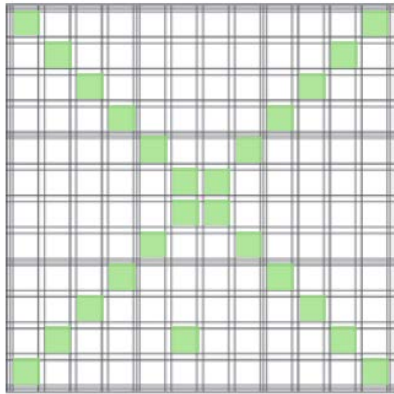
Provtagning gjordes enligt ett förutbestämt schema med minst 6 timmar och som mest 3 dygn mellan provtagningstillfällena, se Tabell 1. Varje prov gav upphov till två observationer, vilket resulterade i totalt 136 observationer.

Tabell 1. *Provtagningschema under huvudstudien som visar antal prover per tidpunkt*

Tid (h)	Grupp 1 (kyl)	Grupp 2 (frys)	Grupp 3 (rumstemp)	Grupp 4 (frys x2)
0h	3 prover	2 prover		
6h	2 prover	2 prover	1 prov	2 prover
12h	1 prov			
24h (1 dygn)	3 prover	2 prover	1 prov	
30h	2 prover	1 prov	1 prov	2 prover
36h	2 prover	1 prov		
48h (2 dygn)	3 prover	1 prov	1 prov	
60h	2 prover	2 prover		
72h (3 dygn)	3 prover	2 prover	1 prov	
84h	2 prover	2 prover		
96h (4 dygn)	3 prover	2 prover		
120h (5 dygn)	3 prover	2 prover		
144h (6 dygn)	3 prover	2 prover		
216h (9 dygn)	6 prover			

Alla prover togs ifrån testikelvävnad (inte bitestikel) och därefter finfördelades varje prov i mycket små bitar med hjälp av skalpell innan vägning. Vid vägningen uppmätte varje prov en vikt på 1,5g, där en variation mellan 1,490-1,530g tilläts. Proverna för samma tillfälle vägdes samtidigt och förvarades i kylskåp under den väntetid (max 12min) som uppstod fram tills att de skulle användas. De prover som frystes efter en viss tid i kylskåp vägdes upp direkt innan infrysningen och frystes in enskilt i lufttäta provrör. Proverna som förvarades i rumstemperatur vägdes upp och finfördelades i samband med ankomst till laboratoriet (0h) och förvarades sedan enskilt i lufttäta provrör i rumstemperatur fram tills dess att de homogeniserades och analyserades. I början av varje dygn när flera kylförvarade prov togs (0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h och 216h) så lades extra stor vikt vid att proverna kom ifrån olika ställen av testikeln så att så god variation som möjligt mellan proverna skulle uppnås.

I enlighet med pilotförsöket så homogeniserades 1,5g testikelvävnad tillsammans med 10ml tritonlösning i 2,15 minuter med homogeniseringsutrustningen på högsta hastighet (35 000rpm). Efter homogenisering så späddes 100µl av homogenatet i ytterligare 900µl tritonlösning, provet blandades med hjälp av en vortex mixer direkt innan pipettering till en Bürkerkammare med två fält. Provet tilläts sätta sig i kammaren i ½-1minut innan spermatiderna räknades. I varje fält på Bürkerkammaren så räknades 25 rutor i ett förutbestämt korsvis mönster (se Figur 1). I de få fall där en ruta inte kunde användas exempelvis på grund av störningar eller smuts i glaset så räknades i förstahand rutan till höger om den egentliga rutan och i andrahand rutan till vänster om den egentliga rutan. Spermatider som låg på en linje räknades om de i övrigt låg innanför linjen. Spermatider som låg på en linje men i övrigt låg utanför linjen räknades om de låg på den övre eller högra linjen medan om de låg på den nedre eller vänstra linjen så räknades de inte. Båda fälten i Bürkerkammaren räknades vid varje prov och därmed erhöles två observationer för varje prov.



Figur 1. Mönster enligt vilket beräkning i Bürkerkammare skedde.

## Bearbetning av data

Antalet homogeniseringsresistenta spermater presenterade i gram per testikelvävnad vilket beräknades enligt följande formel:

$$\frac{N * S * K}{a} = \text{spermier per ml}$$

Där: N = antalet spermier i alla räknade rutor, a = antalet räknade rutor (här 25st), S = spädningsgraden. K = multiplikationsfaktor för volymförstoring (här  $1000 \mu\text{l}/4 \mu\text{l}=250$ ) Den totala spädningsgraden beräknades till 76,67. En ml av det spädda provet antas väga 1 gram.

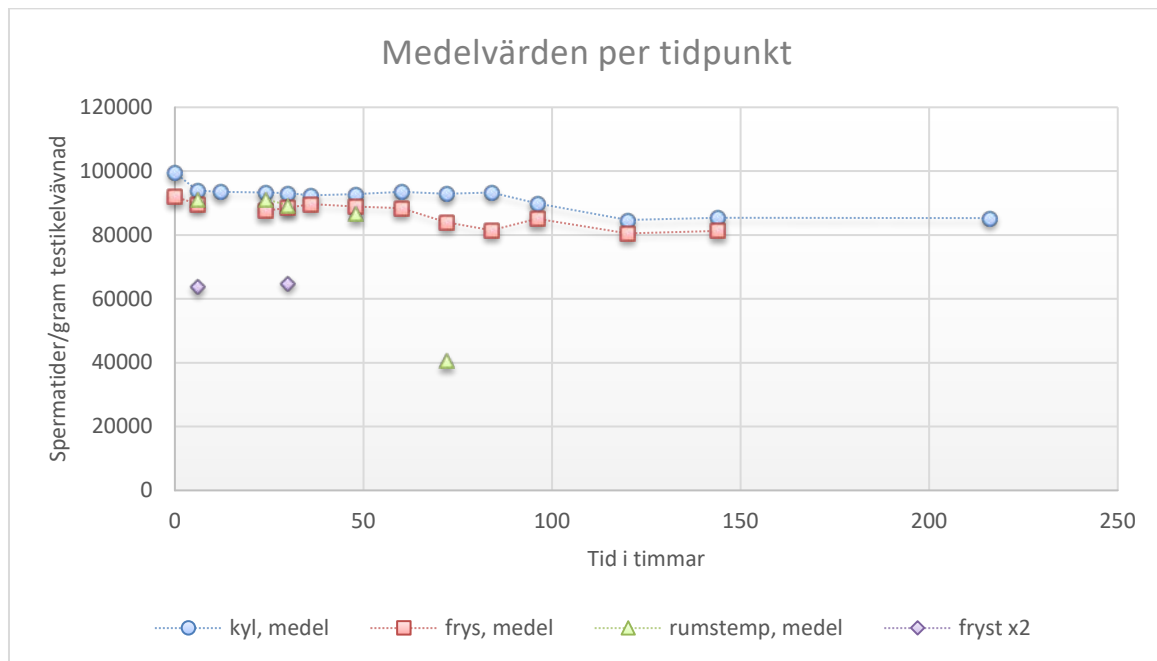
För att undersöka effekten av olika förvaringsmetoder på antalet spermater användes för varje förvaringsmetod en linjär regression (Proc GLM i SAS, Milltown USA), med tid som en kvalitativ variabel, där parvisa jämförelser med mätvärdet för tidpunkt noll gjordes med t-test och Tukey-Kramers korrektionsmetod för masssignifikanser. För att möta antagandet om oberoende observationer utfördes beräkningarna på medelvärden av de två beräkningarna som gjordes på varje prov, men för att kunna räkna på proverna förvarade i rumstemperatur användes i det fallen de två mätningarna som individuella observationer.

För att jämföra resultaten mellan förvaringsmetoder användes även då en multipel linjär regression med tid och förvaringsmetod som kvalitativa variabler inklusive en interaktion mellan de två variablerna, återigen med t-test för parvisa jämförelser och korrektion med Tukey-Kramer. För att jämföra kylförvarade prover med frysta prover analyserades data som upprepade mätningar med Proc GLM (repeated statement). Resultat bedömdes vara signifikanta vid p-värden  $<0.05$ . Variationskoefficienten (coefficient of variation) räknades ut genom att dividera standardavvikelsen med medelvärdet, för att sedan multiplicera med 100. Beräkningarna gjordes med Microsoft Excel.

## RESULTAT

Testiklarna ifrån en vuxen yngre tjur som bedömds fullt frisk användes för samtliga prover, totalt togs 68 prover. Antalet spermatiser varierade under experimentets gång mellan 108 100 och 39 100 homogeniseringsresistenta spermatiser per gram testikelvävnad. Det enskilt största värdet uppmättes vid nollprovet och det enskilt lägsta värdet uppmättes efter 72 timmars förvaring i rumstemperatur.

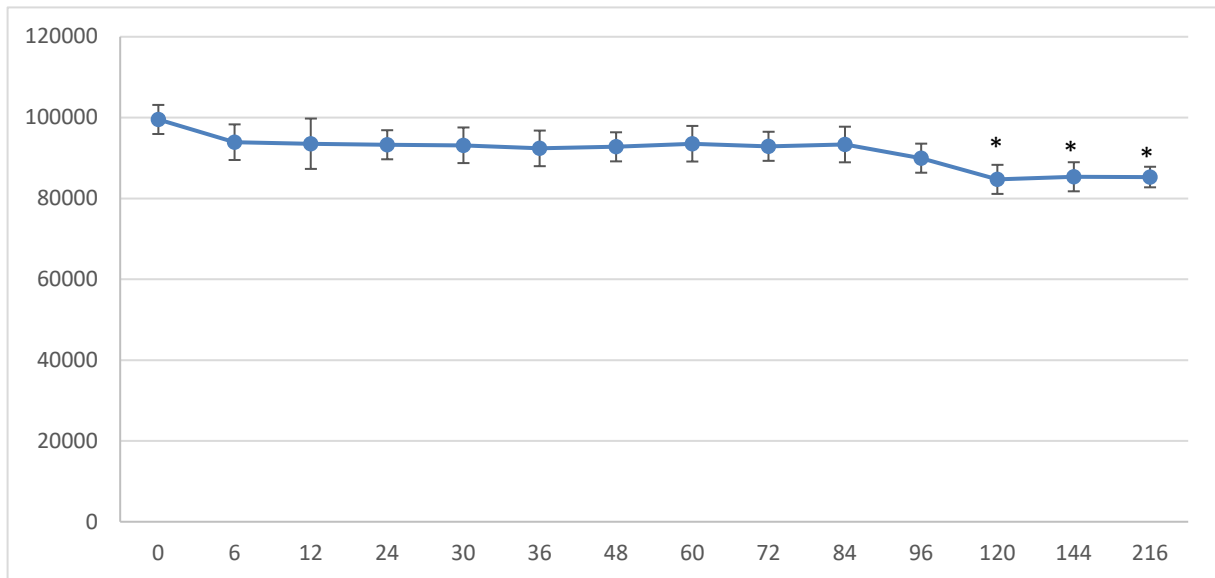
De tre prover som togs direkt vid ankomst till laboratoriet var de närmsta man i experimentet kom ett levande eller nyligen avlivat djur och därmed utgjorde dessa tre mätvärden ett nollprov mot vilka de övriga proverna jämfördes med för att mäta förändring över tid. Medelvärdet för nollprovet var 99 539 homogeniseringsresistenta spermatiser per gram testikelvävnad.



Figur 2. Medelvärden för olika förvaringsmetoder över tid.

### Effekt av kylförvaring

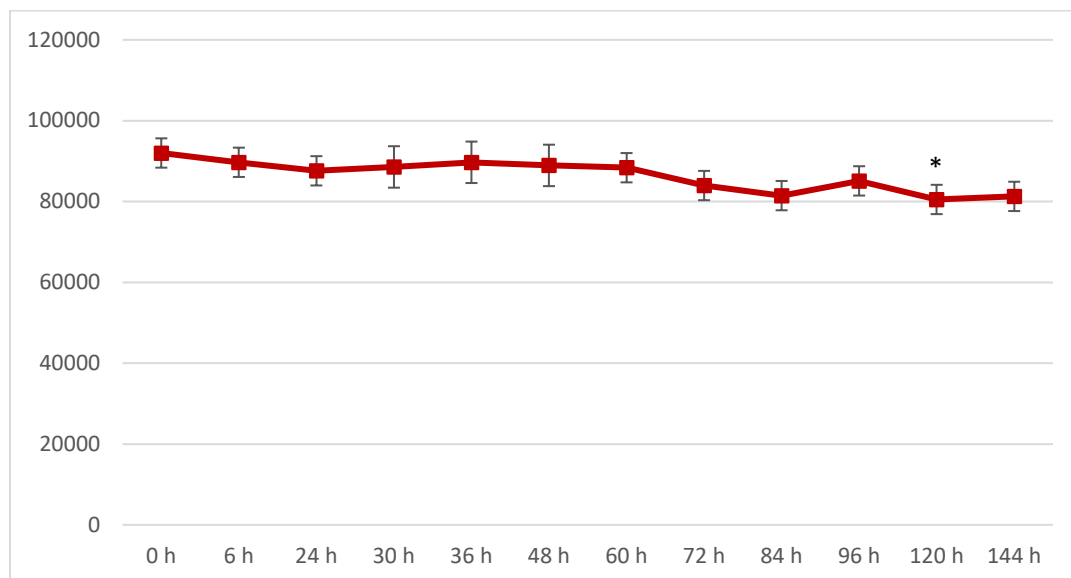
Vid nollprovet samt vid ytterligare tretton tillfällen därefter så togs prover för att bedöma effekten vid kylförvaring. En nedåtgående trend av antalet spermatiser syntes under perioden men viss variation mellan dagarna förelåg (Figur 3). Jämförelser med nollpunkten (då medelvärdet var 99 539 spermatiser) visar att det blev en signifikant skillnad i antalet spermatiser först vid 120 timmar, då medelvärdet var nere på 84 717 spermatiser.



Figur 3. Kylförvaring, medelvärde och 95 % konfidensintervall. Mätpunkter med asterisk (\*) indikerar signifikant skillnad emot värdet vid tidpunkten 0 timmar.

### Effekt av frysning

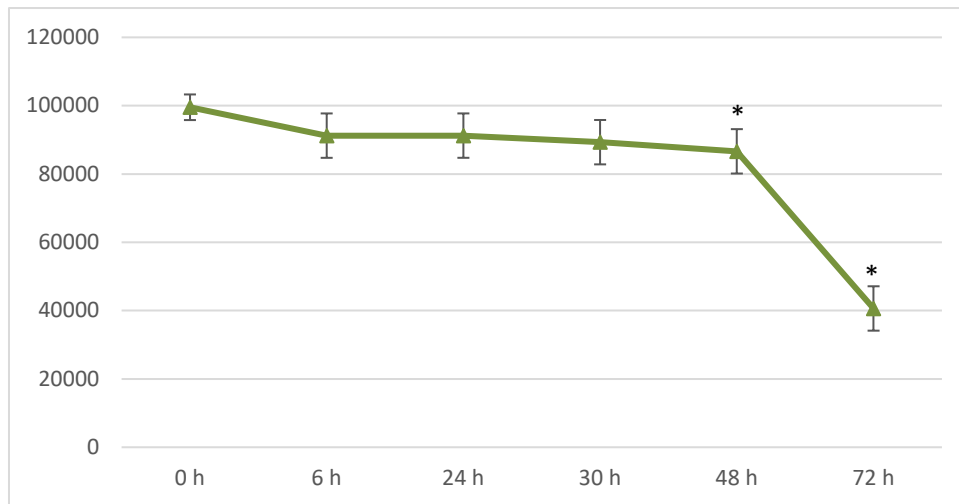
Prover tagits från testikeln efter förvaring under olika tidsintervall tinades och homogeniserades efter att ha varit frysta i 2-3 dygn. Även här syntes en nedåtgående trend av antalet homogeniseringsresistenta spermatiser (Figur 4), men en signifikant skillnad ifrån nollprovet syntes först efter 120 timmar. Ett dygn senare, vid 144 h, var det dock återigen ingen signifikant skillnad.



Figur 4. Förvaring i frys, medelvärde och 95 % konfidensintervall. Mätpunkter med asterisk (\*) indikerar signifikant skillnad emot värdet vid tidpunkten 0 timmar.

### **Effekt av förvaring i rumstemperatur**

Vid förvaring av prover i rumstemperatur syntes också en nedåtgående trend, med en signifikant nedgång i antalet spermatider efter 48 timmar (Figur 5).



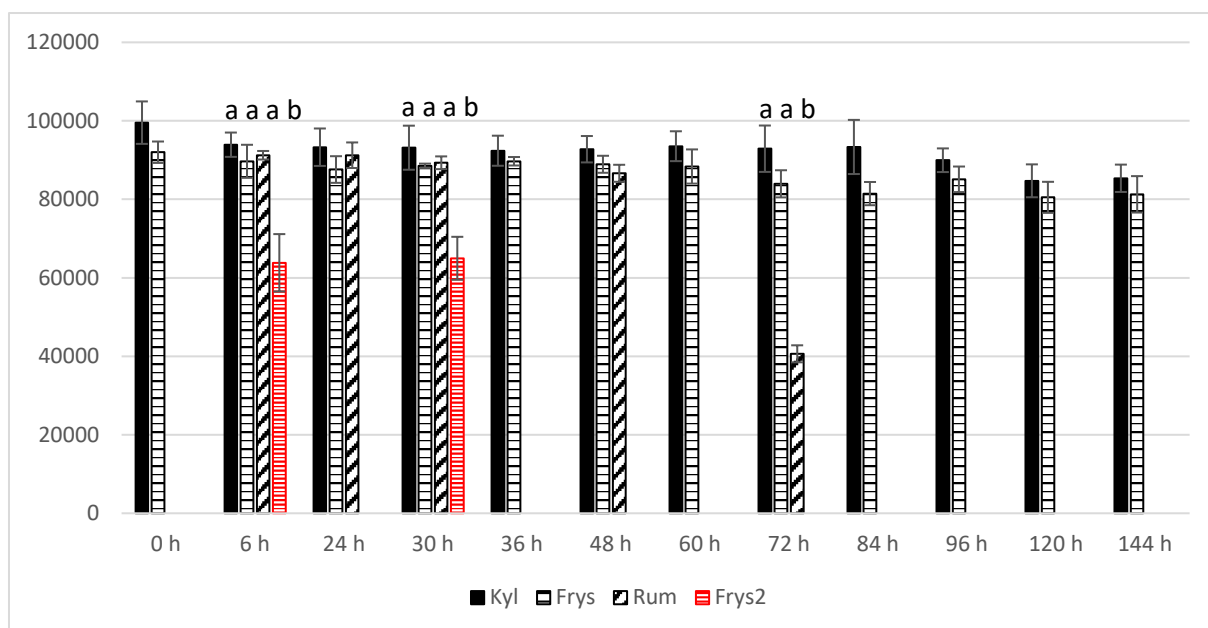
Figur 5. Förvaring i rumstemperatur, medelvärde och 95 % konfidensintervall. Mätpunkter med asterisk (\*) indikerar signifikant skillnad emot värdet vid tidpunkten 0 timmar.

### **Jämförelser mellan förvaringar och effekt av upprepad frysning av prover**

Vid två tillfällen så tinades prover avsiktligt ifrån frysning för att sedan på nytt frysas och sedan åter igen tinas och homogeniseras. Dessa prover visade betydligt färre antal homogeniseringsresistenta spermatider än vad alla prover vid både kylförvaring och enkel frysning gjorde. Hos prover som tagits efter 6 respektive 30 timmars kylförvaring följt av två frysningar vardera var antalet spermatider signifikant lägre än antalet spermatider i de prover som bara förvarats i kyl. Antalet spermatider var också lägre jämfört med prover som förvarats i rumstemperatur och de prover som frysts endast en gång (Figur 6).

Frysförvaring ger ett konstant lägre antal spermatider än kylförvaring, men ingen signifikant skillnad syntes förrän efter 84 timmars förvaring i kylskåp innan frysning. Även de prover som förvarades i rumstemperatur hade ett konstant lägre antal spermatider än de kylförvarade prover men blev signifikant lägre först efter 72 timmar. Under de 30 första timmarna så syntes ett något högre antal spermatider vid förvaring i rumstemperatur än hos de prover som frystes under samma tidsperiod, antalet var dock inte signifikant.





Figur 6. Jämförelse mellan förvaringsmetoder över tid, minsta kvadratmedelvärde och 95 % konfidensintervall. Staplar med olika bokstäver inom samma tidpunkt skiljer sig signifikant mot varandra.

## Precision

Eftersom varje prov räknades två gånger kunde variationskoefficienten (C.V.) beräknas för metoden, se tabell 2.

Tabell 2. Variationskoefficienten (%) beräknad per prov

	N	Medel	Min	Max
Kylförvaring	38	3,4	0,6	10,0
Frysförvaring	21	3,4	0,6	8,1
Rumstemperatur	5	2,9	1,2	5,3
Frysta 2 ggr	4	9,2	5,7	12,1

Även variationen mellan proverna från olika delar av testikeln beräknades. Reproducerbarheten vid olika typer av förvaring redovisas i tabell 3.

Tabell 3. Variationskoefficienten (%) över tid

Tid i timmar	Kylförvaring	Frysta prover	Frysta 2 ggr
0	3,7	2,9	
6	3,5	5,4	9,5
24	4,5	0,9	
30	1,2		8,9
36	4,1		
48	2,9		
60	4,6	4,1	
72	6,8	3,2	
84	0,3	4,3	
96	3,4	3,2	
120	4,3	5,4	
144	4,0	4,1	
216	3,6		

## **DISKUSSION**

I denna studie så var målet att studera hur temperatur och tid påverkade antalet homogeniseringsresistenta spermatiser i testikelvävnad. Vid all typ av förvaring syntes en nedåtgående trend där testikelvävnad som förvarats under längre tid uppvisade ett lägre antal homogeniseringsresistenta spermatiser. Metoden uppvisar låg variation i antal spermatiser för förvaringsmetoderna kyl, frys och rumstemperatur. Hos dessa låg medelvärdet för variationskoefficienten (coefficient of variation, C.V) mellan 2,9 och 3,4 % vilket indikerar en god reproducerbarhet. För proverna som tinats och sedan på nytt frysts så var variationen i C.V. något högre i medeltal (9,2 %).

Viss varians föreligger mellan de två beräkningar som gjordes på varje prov och även mellan de prov som togs och det är därför att rekommendera att man tar åtminstone ett par prover per testikel för att få ett mer korrekt medelvärde. Då större djur studeras så kan ett antal mindre prover tas ifrån samma testikel, alternativt skulle ett enda större prov kunna tas men detta kan påverka provets spridning och skulle om det homogeniseras vid ett tillfälle också komma att påverka tiden för homogeniseringen. I de fall då man studerar mindre djur exempelvis mink så kan hela testikeln homogeniseras och för att få flera värden så kan flera observationer ifrån samma prov göras.

### ***Kylförvaring***

Först efter 120 timmars kylförvaring så syntes en signifikant skillnad emot nollprovet. Att spermatiserna klarar en längre tids kylförvaring stämmer överens med att man i tidigare studier inte sett några förändringar i spermatisernas plasmamembranintegritet efter 4 respektive 10 dagar kylförvaring (Solers *et al.*, 2003; Filliers *et al.*, 2008). Och inte heller förändringar av akrosomernas status eller av DNA-sönderfallet (Filliers *et al.*, 2008). Man har dock vid kylförvaring av spermatiser efter 10 dagar tid sett en minskning av antalet spermatiser med normal morfologi, förändringarna inkluderade spermatiser med onormala spermiehuvuden (Filliers *et al.*, 2008). Om det finns något samband mellan sådana förändringar och spermatisernas känslighet för homogenisering är något som kräver ytterligare studier för att utvärderas.

### ***Frysning av prover***

Vid förvaring i frys så syntes en signifikant skillnad emot nollprovet först efter 120 timmar. Detta stämmer överens med att epididymal sperma i tidigare studier inte har uppvisat någon vävnadsskillnad oavsett om den kylförvaras i fyra dagar innan frysning eller om den fryses direkt (Ponglowhapan *et al.*, 2006). Längre kylförvaring innan frysning kan dock komma att påverka vävnaden, vilket skulle kunna göra den känsligare för homogenisering och/eller för frysning. Vid jämförelse mellan kyl- och frysförvarade prover fanns ingen statistisk skillnad, men eftersom medelvärdet för frysförvarade prover låg konstant lägre så bör försiktighet iakttagas och direkta jämförelser kan behöva korrigeras för förvaringsmetod i en statistisk modell.

## **Förvaring i rumstemperatur**

Anmärkningsvärt vid förvaring i rumstemperatur är att under de 30 första timmarna så syntes ingen signifikant skillnad av antalet spermatider jämfört med kyl/frysförvarade prover. Däremot så såg en kraftig minskning av antalet homogeniseringsresistenta spermatider vid 72 timmar. Anledningen till den kraftiga minskningen av spermatider skulle kunna förklaras av det stora antal bakterier som etablerat sig i provet under förvaringstiden och som kunde ses vid den mikroskopiska beräkningen. Bakterier hade noterats redan efter 30 timmars förvaring i kylskåp, bakterierna räknades inte men mängden uppskattades ha ökat kraftigt i det prov som togs vid 72 timmar. Det får anses mer eller mindre ofrånkomligt med bakteriell kontamination vid fältnässiga eller icke sterila förhållanden och detta är givetvis en faktor som kan komma att påverka proverna och göra dem mindre tillförlitliga. Testiklar som inte avlägsnats ifrån ett avlivat djur kan dock komma att ligga mer skyddade emot bakteriella angrepp än de testiklar som avlägsnats och flåtts.

De prover som förvarades i rumstemperatur hade som tidigare nämnts finfördelats innan de placerades i provrör för förvaringen. En sådan finfördelning kan ha lett till att eventuell kontamination ifrån annan utrustning kom att spridas i provet. Kontamineringen kan ha spridits i proverna likt den bakteriespridning som kan ses vid köttfärdstillverkning när bakterierna sprids över en större yta och blandas med vävnaden på ett sätt som inte förekommer vid hela vävnadsprover (Jay, 1996). En sådan spridning av bakterier är mindre trolig i fall av vilda djur eftersom hanteringen vanligtvis inte sker på det sättet och i efterhand hade en hel testikel som förvarats i rumstemperatur eller åtminstone hela vävnadsprover ifrån testikeln varit ett mer realistiskt scenario.

## **Frysning följt av upptining och frysning igen**

Anledningen till att färre homogeniseringsresistenta spermatider syntes i alla de prover som tinats och sedan frysts på nytt jämfört med de övriga proverna beror troligen att cellmembranen sprängts sönder i samband med frysningen. Vätska som diffunderar in i cellerna gör att membranet expanderar vilket vid frysning vilket leder till skada på cellerna (Ando *et al.*, 2009). Svullnad av spermier efter vätskediffusion kan användas för att identifiera funktionsodugliga spermier trots att man vid histologisk undersökning inte kan se om cellmembranet är intakt eller ej (Jeyendran *et al.*, 1984). Spermatider skulle mycket väl kunna ta in vätska och svullna på samma sätt som spermier. Det är högst troligt att en sådan svullnad skulle kunna, även om den vid frysning inte direkt förstör cellmembranet, göra det känsligare för homogenisering. Prover som tinats vid två tillfällen blir utsatta för expansion och frysskada och vätskan kan då vid det andra infrysningstillfället diffundera ytterligare längre in och därmed göra spermatiderna känsligare för homogenisering. Detta skulle kunna förklara varför antalet spermatider kraftigt minskar i de fall där vävnaden tinats och sedan fryses på nytt innan den slutligen tinats och homogeniseras. Rent teoretiskt skulle detta betyda att prover som tinats och fryses ytterligare upprepade gånger också kommer ha betydligt färre homogeniseringsresistenta spermatider.

## ***Inverkan av studiedesign***

Den här studien kan då jag använt manuell kvantifiering av de homogeniseringsresistenta spermatiderna ha varit utsatt för felberäkningar. Felberäkningar har nämnts i tidigare studier som en av de större nackdelarna med manuell kvantifiering och kan bero på utmattning av personalen men också på otillräcklig homogenisering av provet eller agglutination i proverna (Chio *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2012). För att minska risken för utmattning så avlästes de frysta proverna efter 2-3 dygn i frys istället för att samla alla dessa vid ett och samma tillfälle. Avläsning vid samma tillfälle skulle förutom olika lång frysperiod även ge en större arbetsbelastning vid ett tillfälle. Manuell kvantifiering kan dessutom orsaka variation i resultatet vid användandet av olika räknekammare (Seaman *et al.*, 1996). I den här studien användes därför fem stycken räknekammare av flergångstyp, vilka tvättades och återanvändes för nya prover.

Eftersom jag innan studien saknade erfarenhet av att urskilja och kvantifiera homogeniseringsresistenta spermatider så fick jag hjälp av personal på SLU:s spermalabb vilka har mångårig vana av att undersöka spermier. Dessa personer instruerade mig under pilotförsökets början i hur spermatiderna skulle räknas i en Bürkerkammare. För att bli säkrare på min egen förmåga så räknade jag sedan ett antal rutor i en Bürkerkammare och kontrollräknade därefter samma rutor en gång till, detta upprepades flertalet gånger. Trots dessa förberedelser så är det givetvis ändå möjligt att räkna fel i någon av de 25 rutor som varje prov utgör och detta skulle kunna vara en källa till variation. Celler som inte homogeniserats ordentligt kan ha bildat debris som stört räkningen liksom ludd som fastnat på Bürkerkammarens täckglas. Rutor med kraftiga störningar har dock som tidigare nämnts inte räknats utan istället har en annan ruta räknats, sådana rutor var färre än 1,7 % av totalt antalet räknade rutor.

Det bör noteras att denna studie är gjord på testikelvävnad från tjur (nötboskap) och att testikelvävnad samt spermatider ifrån andra djurarter möjligtvis kan komma att bete sig annorlunda vid de olika förvaringsmetoderna. Vid tidigare studier så har det exempelvis visat sig att olika medium spelar olika stor roll för förvaringen av epididymala spermatozoer ifrån olika djurslag (Tittarelli *et al.*, 2006). Och vissa förvaringsmetoder kan påverka spermatozoer olika (Kishikawa *et al.*, 1999). Fler studier skulle kunna klargöra vilka, om några, skillnader som föreligger mellan olika djurarter. Sådana studier kan med fördel också följas över tid. I de fall där flertalet testiklar studeras över en längre tidsperiod så kan en automatisk metod för kvantifiering och en snabbare metod för homogenisering kan vara att föredra. Sådana metoder är dock ofta både dyrare och mer tekniskt komplicerade (Choi *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2012).

## **Slutsats**

Testikelvävnad som skall användas för att kvantifiera homogeniseringsresistenta spermatider kan, om direkt bedömning inte är möjlig, kylförvaras under några dagars tid innan kvantifiering. Proverna kan också frysas om direkt bedömning inte är möjlig, infrysningen kan ske direkt eller efter några dygns kylförvaring men frysta prover som har tinats bör inte frysas på nytt för att användas vid ett senare tillfälle. Prover som förvaras i rumstemperatur kan möjligtvis användas under de två första dyggen. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan kylförvaring och frysförvaring, men frysförvarade prover hade ett konstant lägre medeltal varför viss försiktighet bör vidtas vid direkta jämförelser av prover där olika förvaringsmetoder använts.

Metoden i denna studie är ett fördelaktigt val då den är enkel och förhållandevis billig. Metoden har dessutom goda förutsättningar att fungera även på vävnad som frysts eller som inte är helt färsk och i fall där allt man har är en ungefärlig tid efter döden.

## **Tack**

Jag vill passa på att tack Karin Sellin-Vretling och Ann-Louise Jansson på institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, för all hjälp som de bistod med på spermalab och för utlånande av mikroskop.

Tack till Fredrik Granberg, SLU, för utlånande av homogeniseringsapparat.

Tack till Lövsta slakteri som ställt upp med material till studien.

Slutligen vill jag även ge ett stort tack till min handledare Sara Persson för all hjälp, med statistiken, arbetet och för alla goda råd.

## REFERENSER

- Amann, R. P. & Almquist, J. O. (1962). Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *Journal of Dairy Science*, 45 (6), ss 774-781. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89487-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89487-9)
- Ando, H., Fukuoka, M., Miyawaki, O., Watanbe, M. & Suzuki, T. (2009). PFG-NMR study for evaluating freezing damage to onion tissue. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 37 (6), ss 1257-1261. <https://doi.org/10.1271/bbb.80681>
- Ban, Y., Komatsu, T., Kemi, M., Inagaki, S., Nakatsuka, T. & Matsumoto, H. (1995). Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. *Experimental Animals*, 44 (4), ss. 315-322. <http://doi.org/10.1538/expanim.44.315>
- Brand (2017). *Counting Chambers*. file:///E:/artiklar/1%20-%20Spermcount/01%20faktablad%20counting%20chambers.pdf [2017-10-26].
- Choi, E-K., Tsunekawa, N., Kanai, Y. & Kurohmaru, M. (2008). A new preparation protocol for measurement of testicular sperm production. *Journal of Reproduction and Development*, 45 (1), ss. 90-93. <http://doi.org/10.1262/jrd.19123>
- Faes, K. & Goossens, E. (2017). Short-term storage of human testicular tissue: effect of storage temperature and tissue size. *Reproductive BioMedicine Online*, 35 (2), ss 180-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.04.011>
- Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, T., De Causmaecker, V., Dewulf, J., Pope, C. E. & Van Soom, A. (2008). Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 8C) on sperm quality. *Theriogenology*, 70 (9), ss 1550-1559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.004>
- Hamilton Thorne, Inc (2013). *Sperm Analyzer Options*. <http://www.hamiltonthorne.com/index.php/products/sperm-analyzer-options> [2017-10-30].
- Jay, J. M. (1996). Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science*, 43 (1), ss 59-66. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(96\)00055-1](https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)00055-1)
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G. & Zaneveld, L.J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70 (1), ss 219-228. doi: 10.1530/jrf.0.0700219
- Kishikawa, H., Tateno, H. & Yanagimachi, R. (1999). Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 degrees C. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116 (2), ss 217-222. doi: 10.1530/jrf.0.1160217
- Krause, W. & Viethen, G. (1998). Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologica*, 31, ss. 125-129. doi:10.1111/j.1439-0272.1999.tb01398.x
- Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K.S. & Goodman, D. G. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30 (4), ss 507-520. doi: 10.1080/01926230290105695

- Lu, J-C., Chen, F., Xu, H-R., Huang, Y-F. & Lu, N-Q. (2006). Comparison of three sperm-counting methods for the determination of sperm concentration in human semen and sperm suspensions. *Laboratory Medicine*, 38 (4), ss. 232-236.  
<https://doi.org/10.1309/1CWDWU8EP86HBJ0R>
- Marchlewska, K., Filipiak, E., Oszukowska, E., Walczak-Jedrejowska, R., Krzysztof, K. & Slowikowska-Hilczer, J. (2010). Comparison of the precision in determination of human sperm concentration between an improved Neubauer haematocytometer and Makler counting chamber. *Clinical and Experimental Medical Letters*, 51 (2), ss. 131-134. <http://www.ceml-online.com/fulltxt.php?ICID=881257>
- Microoptics S.L. (u.å.). *Sperm Class Analyser® CASA System*.  
<http://www.microopticsl.com/products/sperm-class-analyzer-casa-system/> [2017-10-30].
- Millenium Sciences, Inc. (2016). *DRM-600 CELL-VU® Sperm Counting Chamber*.  
<http://cellvu.com/products/drm-600-cell-vu-sperm-counting-chamber/> [2017-10-27].
- Mortimer, S. T. (2000). CASA – Practical aspects. *Journal of Andrology*, 21 (4), ss. 515-524.  
 doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x
- New York Microscope Company (2017). Makler counting chamber.  
<https://www.microscopeinternational.com/product/makler-counting-chamber/> [2017- 10-27].
- Pacheco, S. E., Anderson, L. M., & Boekelheide, K. (2012). Optimization of a filter-lysis protocol to purify rat testicular homogenates for automated spermatid counting. *Journal of Andrology*, 33(5), 811–816. <http://doi.org/10.2164/jandrol.111.015131>
- Peng, N., Zou, X. & Li, L. (2015). Comparison of different counting chambers using a computer-assisted semen analyzer. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61 (5), ss. 307-313.  
 doi:10.3109/19396368.2015.1063175
- Ponglowhapan, S., Chatdarong, K., Sirivaidyapong, S. & Lohachit, C. (2006). Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology*, 66 (6-7), ss 1633–1636. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.01.032
- Prathalingam, N. S., Holt, W. W., Revell, S. G., Jones, S. & Watson, P. F. (2006). The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*, 27 (2), ss. 257-262. doi:10.2164/jandrol.05112
- van der Schalie, W. H., Gardner, H. S., Bantle, jr, J. A., De Rosa, C. T., Finch, R. A., Reif, J. S., Reuter, R. H., Backer, L. C., Burger, J., Folmar, L. C. & Stokes, W. S. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107(4), ss 309-315.
- Seaman, E. K., Goluboff, E., BarChama, N. & Fisch, H. (1996). Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads\*. *Fertility and Sterility*, 66 (4), ss. 662-665.  
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)58587-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58587-2)
- Seed, J, Chapin, R.E., Clegg, E.D., Dostal, L.A., Foote, R.H., Hurtt, M.E., Klinefelter, G.R., Makris, S.L., Perreault, S.D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K.A., Veeramachaneni, D.N. & Wise, L.D. (1996). Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. *Reproductive Toxicology*, 10 (3), ss. 237-244. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(96\)00028-7](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00028-7)

- Soler, A. J., Pérez-guzmán, M. D. & Garde, J. J. (2003). Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: Effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. *Journal of Experimental Zoology*, 295A (2), ss 188-199. doi: 10.1002/jez.a.10194
- Spörndly-Nees, E., Ekstedt, E., Magnusson, U., Fakhrzadeh, A., Luengo Hendriks, C. L. & Holm, L. (2015). Effect of pre-fixation delay and freezing on mink testicular endpoints for environmental research. *PLoS ONE*, 10 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125139>
- Strader, L. F., Linder, R. E. & Perreault, S.D. (1996). Comparison of rat epididymal sperm counts by IVOS HTM-IDENT and hemacytometer. *Reproductive Toxicology*, 10 (6), ss. 529-533. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(96\)00140-2](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(96)00140-2)
- Tittarelli, C., Savignone, C. A., Arnaudín, E., Stornelli, M. C., Stornelli, M. A. & de la Sota, R. L. (2006). Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, 66(6-7), ss 1637-1640. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.021
- Tomlinson, M., Turner, J., Powell, G. & Sakkas, D. (2001). One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods? *Human Reproduction*, 16 (1), ss. 121-124. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.1.121>
- Vitrolife AB (2015). *MICROCELL & ACCESSORIES*. <http://www.vitrolife.com/sv/Products/Sperm-processing/MicroCell/> [2017-10-27].
- Zeng, W., Snedaker, A. K., Megee, S., Rathi, R., Chen, F., Honaramooz, A. & Dobrinski, I. Preservation and transplantation of porcine testis tissue. *Reproduction, Fertility and Development*, 21 (3), ss 489-497. <https://doi.org/10.1071/RD08235>
- Zinaman, M. J., Uhler, M. J., Vertuno, E., Fischer, S. G. & Clegg, E. D. (1996). Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*, 17 (3), ss. 288-292. doi:10.1002/j.1939-4640.1996.tb01784.x