



Effekt av tid mellan avlivning och spermieextraktion

– om spermiekvalitet hos tjurens
bitestikelspermier

*Effect of time between euthanasia and sperm extraction on
sperm quality of bull epididymal sperm*

Alexandra Walfridsson

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2021



Effekt av tid mellan avlivning och spermieextraktion – om spermiekvalitet hos tjurens bitestikelspermier

Effect of time between euthanasia and sperm extraction on sperm quality of bull epididymal sperm

Alexandra Walfridsson

Handledare:	Theodoros Ntallaris, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Jane Morrell, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Anders Johannisson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Prof Eduardo Aisen, Theriogenology Laboratory, National University of Comahue, Argentina
Examinator:	Ann-Sofi Bergqvist, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX0869
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2021
Omslagsbild:	Michaela Österman

Nyckelord: Tjur, bitestikel, motilitet, spermier, *post mortem*.

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Avdelningen för reproduktion

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Uppsamling av spermier från bitestikeln *post mortem* är en bra teknik för att bevara viktigt genetiskt material från individer som är värdefulla ur avelssynpunkt och/eller vilda djur. Djur dör dock inte nödvändigtvis i nära anslutning till ett laboratorium med rätt utrustning och resurser för att ta till vara materialet. Denna studie syftar därför till att undersöka vilken effekt förvaring av testiklar har på bitestikelspermernas motilitet, viabilitet och kromatinintegritet. Detta för att metoden skall kunna användas som en modell för konservering av spermier från vilda arter.

Spermieprover samlades vid fyra tillfällen (dag 0; dag 1; dag 2 och dag 3 efter första provtagning) från bitestiklar ifrån 13 tjurar där en testikel från varje tjur användes som kontroll och förvarades orörd i 5°C till sista dagen. Prover samlades genom att med ett skalpellblad göra ett litet snitt i *cauda epididymis*, spermier samlades upp i en pipett och späddes sedan med Optixcell. Samtliga prover utvärderades avseende motilitet och kinematik med hjälp av datorassisterad spermieanalys (CASA). Plasmamembranintegritet mättes med en infärgningsteknik där antalet levande, döende och döda spermier utvärderades med flödescytometri. Kromatinintegritet mättes med hjälp av metoden spermiekromatinanalys (SCSA) som utvärderades med hjälp av flödescytometri.

Resultatet visar på en signifikant minskning av både total motilitet och progressiv motilitet ($p < 0,0001$) med tid. Det fanns däremot ingen signifikant skillnad avseende levande och döda spermier då plasmamembranintegritet mättes, däremot hade antalet döende spermier ökat signifikant från dag 1 och 2 jämfört med dag 3. Det fanns inte heller någon signifikant skillnad avseende % DFI, siffrorna var även låga vilket visar på en låg andel spermier med skadat DNA. För % HDS däremot kunde en signifikant ökning ($p < 0,0001$) med tid iakttas.

Resultatet från studien indikerar att bitestikelspermier blir påverkade av hur lång tid testikelvävnaden förvaras *post mortem*. Uppföljande studier behövs för att utvärdera om spermerna är kapabla att befrukta oocyter och utvecklas till blastocyster.

Nyckelord: Bitestikel, spermier, tjur, post mortem, motilitet

Abstract

Post mortem recovery of epididymal spermatozoa is a valuable technique to preserve gametes from genetic valuable individuals and/or wild animals. However, animals do not necessarily die within easy access to laboratories with the equipment needed to process semen. Therefore, the purpose of this study was to determine the effect of storage time of tissue *post mortem* on motility, viability and chromatin integrity of bull epididymal spermatozoa, as a model for wild species.

Sperm samples from cauda epididymis were collected at four times (Day 0; day 1; day 2 and day 3 after the first sampling) from 13 bulls where one testis from each bull were used as a control and was stored untouched in 5°C until the last day of sampling. Samples were collected by making a small incision in the cauda epididymis with a scalpel blade; epididymal spermatozoa were recovered using a pipette and then extracted into Optixcell semen extender. All the samples were then evaluated for motility and kinematics using computer assisted sperm analysis (CASA); plasma membrane integrity, was evaluated with a staining technique evaluating the numbers of living, dying and dead spermatozoa by flow cytometry. Chromatin integrity was evaluated in the sperm chromatin structure assay (SCSA) by flow cytometry.

The results show a significant decrease in both total motility and progressive motility ($p < 0.0001$) with increasing time since slaughter. However, there was no significant difference for alive and dead spermatozoa when plasma membrane integrity was evaluated, although there was a significant increase of dying spermatozoa from day 1 and 2 compared to day 3. There was no difference in the DNA fragmentation index (%DFI); the proportions of spermatozoa with damaged chromatin were low. For %HDS however there was an increase over time ($p < 0.0001$).

The results of this study indicate that epididymal spermatozoa are affected by the storage time of tissue *post mortem*. Additional studies are needed to evaluate whether the spermatozoa are capable of fertilizing an oocyte and developing into a blastocyst.

Keywords: Epididymis, spermatozoa, bull, post mortem, motility

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning	11
2. Litteraturoversikt	12
2.1. Reproduktionsanatomi.....	12
2.1.1. Testikel (testis)	12
2.1.2. Bitestikel (epididymis)	13
2.1.3. Accessoriska könskörtlar	14
2.2. Spermatogenes	15
2.2.1. Spermiogenes.....	18
2.3. Kapaciteringsprocessen	19
2.4. Akrosomreaktionen.....	20
2.5. Könsmognad	20
3. Material och metoder	22
3.1. Litteraturgenomgång	22
3.2. Uppsamling av testiklar	22
3.3. Spermieextraktion.....	22
3.4. Behandling av spermieceller	23
3.5. Spermieutvärdering	23
3.5.1. Datorassisterad spermieanalys (CASA)	23
3.5.2. Flödescytometri.....	24
3.5.3. Statistisk analys	27
4. Resultat.....	29
4.1. CASA	29
4.1.1. Motilitet.....	29
4.2. Flödescytometri	32
4.2.1. Plasmamembranintegritet.....	32
4.2.2. SCSA	33
5. Diskussion.....	35
6. Konklusion	38

Referenser.....	39
Tack	43
Populärvetenskaplig sammanfattning	44

Förkortningar

AGF	“Accessory sex gland fluids”, Accessoriska könskörtelvätskor
ALH	Amplitude of lateral head displacement
AO	Akridin-orange
AR	Autoregressiv
ART	Assisterad reproduktionsteknik
AI	Artificiell insemination
BCF	Beat cross frequency
Ca ²⁺	Kalcium
cAMP	Cykliskt adenosinmonofosfat
CASA	Datorassisterad spermieanalys
DFI	DNA fragmentation index
DNA	Deoxiribonukleinsyra
EDTA	Etylendiamintetraättiksyra
FSH	Follikelstimulerande hormon
GnRH	Gonadotropinfrisättande hormon
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HDS	High DNA stainability
ICSI	Intracytoplasmatisk spermieinjektion
IVF	In vitro-fertilisering
LH	Luteiniserande hormon
LIN	Linearity
LSM	Minstakvadrat-medelvärde
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumvätefosfat
NaCl	Natriumklorid
PBS	Fosfatbuffrad saltlösning
PKA	Protein kinase A

PI	Propidiumjodid
SACY	Adenylylcyklas
SCSA	Spermiekromatinstrukturanalys
SEM	Medelvärdets medelfel
STR	Straightness
TCJ	”Tight cell junctions” – täta fogar mellan celler
TNE	Tris–sodium chloride–ethylenediaminetetraacetic acid
HCL	Saltsyra (Väteklorid)
VAP	Average path velocity
VCL	Curvilinear velocity
VSL	Straight line velocity
WOB	Wobble

1. Inledning

Uppsamling av spermier *post mortem* är en viktig teknik för att bevara arvs massa från genetiskt värdefulla djur eller utrotningshotade arter, vilken annars hade kunnat gå förlorad (Kaabi *et al.* 2003; Cocchia *et al.* 2009). Efter att djuret dör finns möjligheten att rädda genetiskt material i form av spermier från bitestikeln hos handjur (Cocchia *et al.* 2009). Djur dör dock inte nödvändigtvis lättillgängligt till laboratorier med adekvat utrustning för att ta hand om spermier. Organ kan kylas och transporteras till laboratorier för behandling, men det är inte känt vilken effekt förvaringstiden har på de spermieprover som extraheras från dessa organ.

Det finns flera studier om spermieuppsamling från bitestikeln beskriven på olika arter (Fournier-Delpech *et al.* 1977; Gilmore *et al.* 1998; Lambrechts *et al.* 1999; Hewitt *et al.* 2001). Likt spermier i ejakulat kan spermier från bitestikeln bevaras för att användas i assisterad reproduktionsteknik (ART) som artificiell insemination (AI) (Pavlok 1974; Nagai *et al.* 1988; Tsutsui *et al.* 2003), *in vitro*-fertilisering (IVF) (Ogawa *et al.* 1972; Pavlok 1974; Niwa *et al.* 1985; Nagai *et al.* 1988; Lengwinat & Blottner 1994; Blash *et al.* 2000) och intracytoplasmisk spermieinjektion (ICSI) (Bogliolo *et al.* 2001).

I en studie gjord av Christian *et al.* (1993) förvarades muskadaver i rumstemperatur i upp till 24 h varefter uppsamling av spermier från bitestikel utfördes. Studien visade att spermier uppsamlade 15 h *post mortem* var kapabla att befrukta åtminstone 25 % av oocyterna *in vitro*. Majoriteten av de befruktade äggen utvecklades till blastocyster, vilket kan indikera att spermierna bibehåller sin befruktningsförmåga en tid efter döden (Christian *et al.* 1993).

Syftet med denna studie är att avgöra vilken effekt förvaringstiden av testikelvävnad *post mortem* har på motilitet, viabilitet och kromatinintegritet på bitestikel-spermier från tjur. Detta för att kunna användas som en modell för konservering av spermier för exempelvis vilda arter.

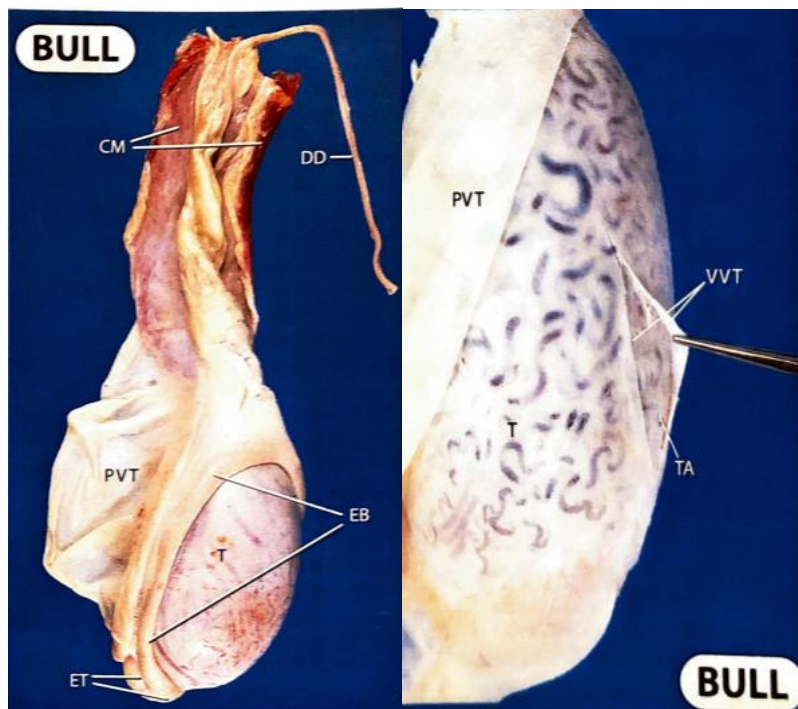
2. Litteraturöversikt

2.1. Reproduktionsanatomi

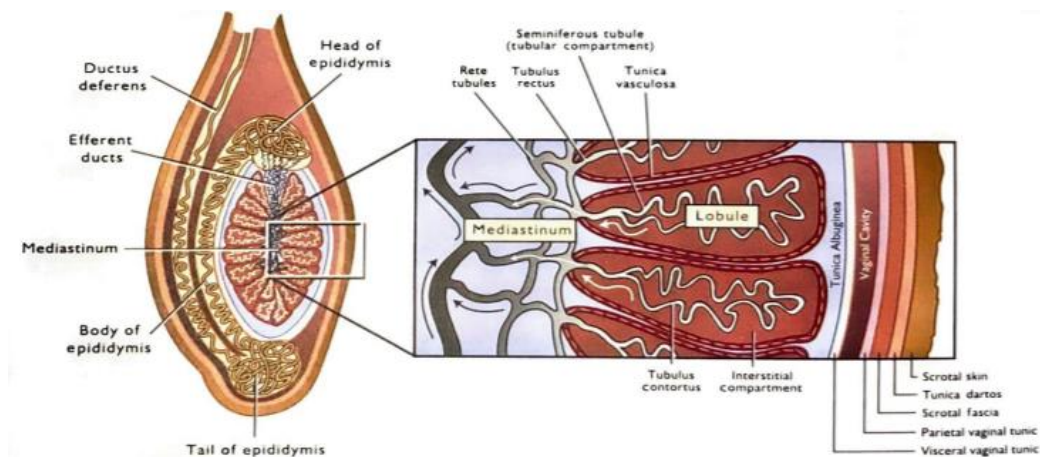
2.1.1. Testikel (testis)

Tjurtestikeln är oftast äggformad med längsta axeln i dorsoventral riktning (Fayrer-Hosken 1997). Testiklarna varierar i storlek beroende på ålder, ras och genetik men är vanligtvis 8 – 16 cm långa och 5 – 10 cm i diameter. Storleken på testikeln speglar hur stor spermieproduktionen är och bedöms genom att mäta omkretsen, ju större omkrets desto högre spermieproduktion (Fayrer-Hosken 1997). Dock kan testikelns omkrets även öka till följd av exempelvis testikelinflammation (Zachary 2017) och hull (Fayrer-Hosken 1997). Om det förekommer mycket fett i *scrotum* ökar både omkretsen och det påverkar temperaturregleringen negativt vilket även kan ha en negativ påverkan på spermatogenesisen (Senger 2003).

Varje testikel hänger separat i pungen fastsittande med varsin funikel på testikelns dorsala pol. Funikeln är en samling strukturer innefattande sädesledaren, kärl och nerver som är inneslutna i dubbla lager av *peritoneum* (Dyce *et al.* 2017). Funikelns funktion är att bidra med vaskulär, lymfatisk och neural kontakt till kroppen, bidra med värmereglering och hysa kremastermuskeln (Senger 2003). Testiklarna separeras från varandra med hjälp av en septumvägg bestående av *tunica dartos*, vilken delar *scrotum* i två halvor (Fayrer-Hosken 1997). *Tunica dartos* är ett glatt muskel-lager som ligger precis under huden på *scrotum* (Senger 2003). Graden av kontraktion i muskeln varierar som respons till förändrad skrotal hudtemperatur (Senger 2003). Testiklarna täcks av två lager *peritoneum* (Figur 1). Det yttersta lagret är *tunica vaginalis*, vilken har ett visceralt och ett parietalt blad och det innersta lagret är en tjock fibroelastisk kapsel, *tunica albuginea*. *Tunica albuginea* förlänger sig in i testikeln till mediastinum och bildar lobber (Figur 2) (Fayrer-Hosken 1997; Senger 2003). Den inre ytan av *tunica albuginea* och ”septal division”, vilka tillsammans formar lobberna, är väl vaskulariserade och kallas därför *tunica vasculosa* (Senger 2003).



Figur 1. Testikel med dess hinnor och översiktliga delar. CM = Kremastermuskel, DD= Ductus deferens, T = Testikel, PVT = Tunica vaginalis parietala blad, EB =Bitestikelkropp, ET = Bitestikelsvans, VVT = Tunica vaginalis visceralis blad & TA = Tunica albuginea. With permission: Reprinted from *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd ed. from Current Conceptions, Inc. (Senger 2003).



Figur 2. Schematisk illustration av scrotum, bindvävsstödande strukturer och de tubulära vägarna i den typiska däggdjurstestikeln. With permission: Reprinted from *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd ed. from Current Conceptions, Inc. (Senger 2003).

2.1.2. Bitestikel (epididymis)

Bitestikeln är fäst kaudomedialt på tjurens testikel och delas in i tre succesivt övergående delar; huvud (*caput*), kropp (*corpus*) och svans (*cauda*) (Dyce *et al.* 2017).

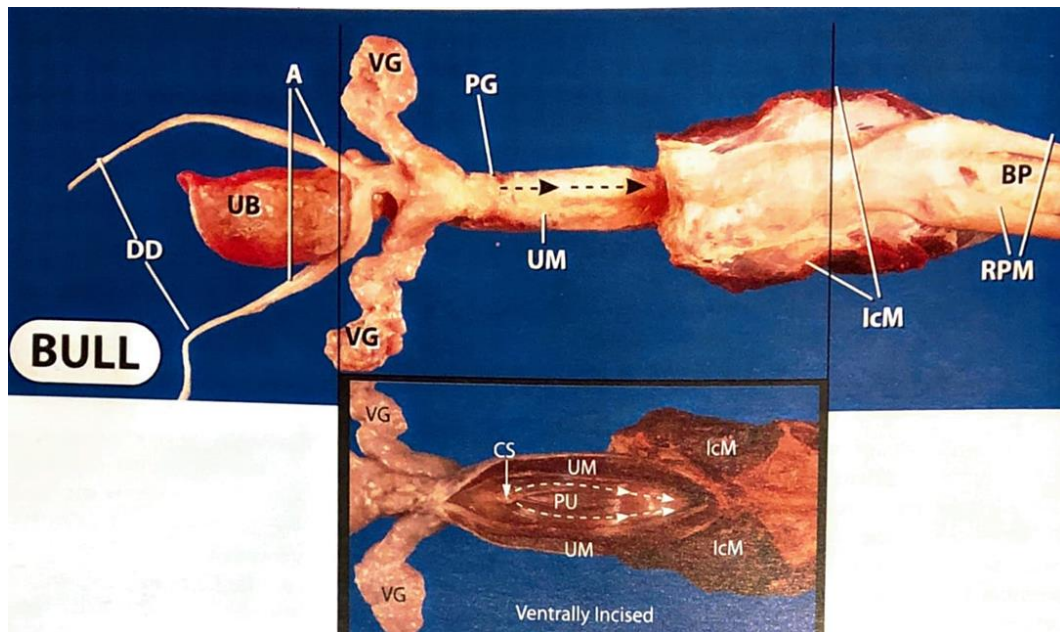
Bitestikelnns huvudsakliga funktion är att bidra med en gynnsam miljö där den slutgiltiga mognaden av spermier kan ske, men även att fungera som reservoar för spermier (Senger 2003). Huvudet är stadigt fäst till testikelns kapsel. Där samlas de efferenta ductuli (Figur 2), vilka förenas och bildar den bredare bitestikelgången. Kroppen är inte lika kraftigt fäst till testikelns yta och bildar ett mellanliggande område kallat testikelbursan. Svansen fäster stadigt in till *ligamentum proprium* och till det parietala bladet av *tunica vaginalis*. Svansen smalnar sedan av och övergår i *ductus deferens* (Dyce et al. 2017).

Bitestikelgången är en enda lång och mycket veckad kanal (Senger 2003). Den är omgiven av glatt muskulatur vars rytmiska sammandragningar av kanalen tvingar spermier att transporteras längs kanalen mot bitestikelsvansen (Senger 2003).

Bitestikeln är inte bara ansvarig för lagring och mognad av spermier utan även att spermier ska kunna lämna det hanliga reproduktionsorganet (Senger 2003). När sexuell stimulering inträffar börjar den glatta muskulaturen i den distala bitestikelsvansen att kontrahera kraftigt, vilket förflyttar spermier in i *ductus deferens*. Även utan sexuell stimulering behöver bitestikeln avge spermier för att förhindra överfyllnad med ett förmodat högt tryck som påföljd. Avlägsnandet av spermier sker genom periodvisa kontraktioner av bitestikel och *ductus deferens*, vilket resulterar i att spermier gradvis förflyttas från svansen, genom *ductus deferens*, vidare via ampulla som är en förstoring av *ductus deferens*, ut i urinröret där de sedan utsöndras i samband med urinering (Senger 2003).

2.1.3. Accessoriska könskörtlar

Avsöndringen från de accessoriska könskörtlarna är essentiellt för initieringen av spermernas motilitet samt bistår med en stödjande och nutritionsrik miljö för spermier (Fayrer-Hosken 1997). De accessoriska könskörtlarna på tjur består av sädesblåsor, prostata, ampulla och bulbourethralkörtlar (Figur 3). Sädesblåsorna är multilobulära körtlar belägna lateralt på intrapelviska delen av urinröret kranialt om prostatan. Sädesblåsorna är vanligtvis 8–15 cm långa och 2–4 cm i diameter, dock är storleken relaterad till ålder på tjuren. Prostatan är en rund körtel belägen i slutet på den intrapelviska delen av *urethra* (Fayrer-Hosken 1997). Bulbourethralkörtlarna är pariga belägna på var sida om intrapelviska *urethra* nära bäckenbotten (Senger 2003). Ampulla är en förstoring av *ductus deferens* vilken sedan mynnar direkt in i intrapelviska delen av *urethra* (Senger 2003).



Figur 3. Dorsal och ventral vy på accessoriska könskörtlar. A = Ampulla, BP = Penisens bas, CS = Colliculus seminalis, DD = Ductus deferens, IcM = Ischiokavernös muskel, PG = Prostata, PU = Intrapelviska urethra, RPM = Retraktormuskel, UB = Urinblåsa, UM = Urethralis muskel & VG = Sädesblåsor. With permission: Reprinted from *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd ed. from Current Conceptions, Inc. (Senger 2003).

2.2. Spermatogenes

Spermatogenesen defineras av den sammanlagda processen av spermatocytogenes och spermiogenes (Fayrer-Hosken 1997). Spermatocytogenesen är när primära och sekundära spermatocyter bildas från spermatogonier. Från spermatocyterna bildas därefter spermater. Spermiogenes är bildningen av spermier från spermater (Fayrer-Hosken 1997).

Spermatogenesen är den grundläggande processen för hanlig reproduktion, vilken resulterar i produktion av spermier (Noakes *et al.* 2018). Processen pågår i sädeskanalerna i den mogna testikeln och består av tre huvudprocesser: mitotisk replikering av spermatogonier, meios och postmeiotisk differentiering till spermier. Processerna återspeglas i den funktionella morfologin av sädeskanalerna. Sädesepitelet består av koncentriska lager av spermatogonier, spermatocyter och spermater, med karakteristiska sammansättningar mellan cellgenerationer genom hela sädesepitelet (Noakes *et al.* 2018; Staub & Johnson 2018). Detta sker då nya generationer av spermieceller går från spermatogonier till spermier och fortsätter genom den inre ytan av sädeskanalernas membran, utan att invänta att föregående generationer slutför sin utveckling och försvinner in i kanalernas lumen (Staub & Johnson 2018). Cellgenerationernas sammansättning klassificeras generellt i två typer. Typ

I där två generationer av primära spermatocyter och en spermatid finns närvarande samt Typ II där enbart en generation av spermatocyter men två spermatider förekommer (Noakes *et al.* 2018). Övergången mellan Typ I och Typ II inträffar efter mognadsfasen. Typ II övergår till Typ I då frisättning av spermier sker i samband med ankomsten av en ny generation spermatocyter från den senaste spermatogonala uppdelningen. Varje generation av spermatogenetiska celler är länkade med cytoplasmatiska bryggor, så att utvecklingsstadierna är synkrona mellan varje generation så att vissa områden av sädesepitelet uppvisar celler vid ett liknande utvecklingsstadium. Fibroblaster och myoida celler omger sädeskanalernas basalmembran utvändigt. Blodförsörjningen begränsas av basalmembranet och passerar inte in i själva kanalen. Inuti kanalen finns somatiska sertoliceller och de olika stadierna av spermatogenetiska celler, vilka tillsammans bildar sädesepitelet (Noakes *et al.* 2018).

Sädeskanalen delas in i basala och luminära avdelningar av så kallade täta fogar (Tight cell junctions, TCJ) mellan intilliggande sertoliceller. Dessa fogar bildar blod-testisbarriären, vilken upprätthåller den specialiserade miljön i *tubuli seminiferi* och separerar meiotiska och postmeiotiska (haploida) celler från immunsystemet (Noakes *et al.* 2018).

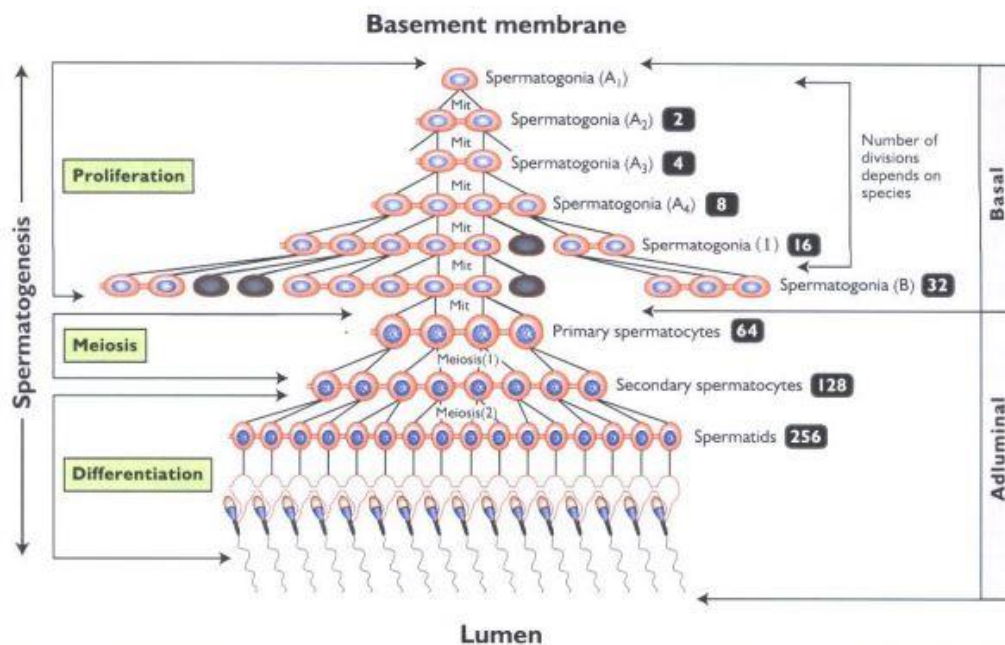
Hos tjur pågår sädesepitelets cykel i 13,5 dagar och den totala durationen av spermatogenesen är 61 dagar, vilket motsvarar 4,5 gånger durationen av sädesepitelets cykel (Staub & Johnson 2018).

Follikelstimulerande hormon (FSH) och testosteron är essentiella för sertolicellernas normala aktivitet, men det huvudsakliga hormonet för upprätthållande av spermatogenesen i det postpubertala djuret är testosteron (Noakes *et al.* 2018).

Primordiala könsceller börjar utvecklas tidigt i embryonalstadiet där ett litet antal migrerar från gulesäcken till könsliden. Där avslutar de sin migration, aggregerar tillsammans och påbörjar en period av mitotisk celldelning samt differentieras till spermatogonier (Wilhelm *et al.* 2007; Noakes *et al.* 2018). I det vuxna djuret delas spermatogonier in i A-, intermediära och B-klasser, vilka ytterligare delas in i underklasser beroende på morfologi och grad av differentiering. Hos tjur finns A₀, A₁, A₂, A₃, intermediära, B₁ och B₂ spermatogonier. A-klassen är de spermatogonier som är minst differentierade och bildar en reservoar av stamceller i sädeskanalerna. Alla spermatogonier bibehåller sin kontakt med basalmembranet, men kontaktytan är avsevärt mindre för B-spermatogonier. Den sista mitotiska celldelningen av spermatogonierna ger upphov till de primära spermatocyterna (Figur 4) och cytoplasman hos sertolicellerna intervenerar mellan basalmembranet och de primära spermatocyterna.

Under den första meiotiska delningen genomgår cellerna två känsliga faser, zygoten- och pachytensteget. Pachytensteget är särskilt känsligt för skadlig påverkan som hög testikeltemperatur eller otillräcklig hormonell tillförsel. Under den första meiotiska delningen förflyttar sig cellerna djupare in i sädesepitelet och sertolicellernas TCJ bildas under spermatocyterna samt bryts ner ovanför dem. Detta så att cellerna effektivt kan passera genom blod-testisbarriären. De sekundära spermatocyterna vilka blir produkten av den första meiotiska delningen, flyttas från basalmembranet till det luminala "facket" av sädesepitelet och separeras därefter från den allmänna vävnadsvätskans avdelning.

Den andra meiotiska delningen producerar spermatider vilka inte delar sig ytterligare. I slutet av meiosen är spermatiderna runda celler med en rund kärna. Därefter genomgår de stora förändringar i cellfunktion och morfologi under differentieringen till spermier, vilket benämns spermiogenesis (Noakes *et al.* 2018).



Figur 4. Spermatogonier (A1-A4, I och B) genomgår en rad mitotiska delningar (Mit), där sista mitotiska delningen ger upphov till primära spermatocyter vilka påbörjar meiosen. Denna serie av mitotiska delningar möjliggör fortsatt proliferation av spermatogonier. Efter meiosen differentierar haploida sfäriska spermatider till spermier. Varje generation av celler sitter sammanlänkade med intercellulära cytoplasmatiska bryggor. Varje generation delas därför synkront i grupper. Vissa celler (svarta) degenerera under processen. Talen indikerar ett teoretiskt antal celler genererade av varje delning. With permission: Reprinted from Pathways to Pregnancy and Parturition, 2nd ed. from Current Conceptions, Inc. (Senger 2003).

2.2.1. Spermiogenes

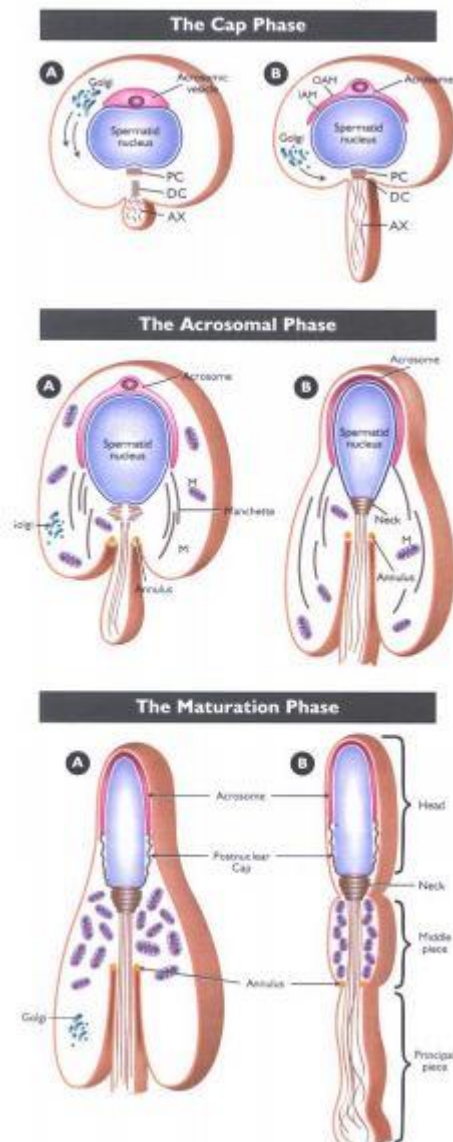
De runda spermatiderna som bildas genom den andra meiotiska delningen, genomgår flera steg av cytologiska förändringar vilket resulterar i bildandet av spermier (de Kretser *et al.* 1998). Spermiogenesen även kallad differentialfasen (Senger 2003) är en cellulär transformation i 4 steg där huvud, mellanstycke och svans på spermien bildas och där den slutgiltiga produkten är en spermiecell med ett huvud med en akrosom, ett mellanstycke med en mitokondriehelix och en svans med axiellt filament (Fayrer-Hosken 1997). Det sker ingen ytterligare delning under denna fas (Senger 2003; Staub & Johnson 2018).

De fyra stegen i differentieringen består av golgifasen, capfasen, akrosomfasen och mognadsfasen (Figur 5) (Senger 2003). I golgifasen bildas akrosomen (Senger 2003). Först bildas proakrosomiska vesikler vilka sedan sammansmälter till en större vesikel vid sidan av kärnan (Senger 2003; Dunleavy *et al.* 2019). Vesikeln innehåller tätt packat akrosomgranulat. Små golgivesikler tillkommer varvid akrosomvesikeln växer ytterligare. Samtidigt migrerar centriolerna från cytoplasman till kärnans bas. Den proximala centriolen utgör sedan platsen för implantationsapparaten vilken möjliggör för flagellen att fästa till kärnan (Senger 2003).

Under capfasen formas akrosomen till en distinkt hatt (cap) över den främre delen av kärnan. Golgiapparaten som slutfört packningen av akrosomen flyttar sig nu bort från kärnan mot spermatidens kaudala del för att sedan försvinna helt. En primitiv flagell (svans) som bildats från den distala centriolen börjar växa ut från spermatiden mot lumen på sädeskanalen.

Akrosomen fortsätter att sprida sig tills den täcker ungefär två tredjedelar av kärnans främre del. Detta sker under akrosomalfasen. Kärnan börjar bli elliptisk till formen och förflyttas mot kanten i cellen. Under akrosomalfasen bäddas spermatiderna in djupt i sertolicellerna med svansarna utstickande i sädeskanalernas lumen.

Under mognadsfasen migrerar och samlas mitokondrierna runt flagellen, från kärnans bas till svansens övre tredjedel. Mitokondrierna formerar sig spiralformat och bildar mittendelen av den färdigutvecklade spermien. Flagellens täta yttre fibrer och det fibrösa höljet bildas och spermies uppbyggnad är då komplett (Senger 2003).



Figur 5. De tre sista stegen (capfasen, akrosomfasen och mognadsfasen) under differentieringen av spermatiden. With permission: Reprinted from *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd ed. from Current Conceptions, Inc. (Senger 2003).

2.3. Kapaciteringsprocessen

Spermier från däggdjursjakulat behöver befinna sig i det honliga reproduktionsorganet i flera timmar innan de förvärvar förmågan att befrukta ett ägg (Austin 1952; Ickowicz *et al.* 2012). Spermerna behöver genomgå en serie molekylära förändringar innan de blir fertila vilket kallas för kapaciteringsprocessen (Breitbart 2002; Stival *et al.* 2016).

Aktivering av spermimotoilitet är ett tidigt steg av kapaciteringen (Visconti 2009). Spermier lagras i *cauda epididymis* och förbrukar där syre i hög omfattning, dock är de fortfarande inte motila, utan det sker först när spermerna kommer i kontakt

med seminalplasman vilken innehåller hög koncentration av bikarbonat (HCO_3^-) och kalcium (Ca^{2+}). I samband med kapaciteringen sker en intracellulär pH-ökning, till följd av transcellulär förflyttning av HCO_3^- . Både HCO_3^- och Ca^{2+} är viktiga för stimuleringen av adenylylcyklas (SACY) vilket i sin tur reglerar metabolismen för cykliskt adenosinmonofosfat (cAMP). De ökade intracellulära nivåerna av cAMP leder i sin tur till aktivering av Protein kinase A (PKA). Protein kinase A är ansvarig för fosforylering av flera mottagarproteiner vilka antas initiera flera signalvägar i spermier vilket leder till en ökad motilitet som benämns hyperaktivitet (Visconti 2009). Hyperaktiva spermier tros underlätta för kontakten mellan spermie och oocyt (Senger 2003). Spermernas plasmamembran som ligger över akrosomen har specifika proteiner på ytan vilka binder specifikt till *zona pellucida* proteiner. Dessa zonabindande proteiner på plasmamembranet måste exponeras under kapaciteringen innan en bindning till *zona pellucida* kan ske. När bindningen mellan spermien och *zona pellucida* sker initieras akrosomreaktionen (Senger 2003).

2.4. Akrosomreaktionen

Akrosomen och dess tillhörande plasmamembran är viktiga för interaktionen mellan spermie och oocyt (Fayrer-Hosken 1997). Akrosomen möjliggör även för spermien att penetrera *zona pellucida* på oocyten (Fayrer-Hosken 1997).

Det finns två syften med akrosomreaktionen. Reaktionen möjliggör för spermien att penetrera *zona pellucida* och exponerar spermies ekvatoriella segment vilket senare smälter samman med oocyten plasmamembran (Senger 2003).

Akrosomreaktionen initieras direkt efter att primär bindning mellan spermie och oocyt skett (Gadella *et al.* 2001). Spermies plasmamembran bildar då flera fusionsplatser med det yttre akrosommembranet (Gadella *et al.* 2001; Senger 2003). När de två membranen sammansmälter bildas flera vesiklar och detta benämns vesikuleringen. Därefter skingras akrosomens innehåll och spermies kärna är kvar, omsluten av det innersta akrosommembranet. Genom porerna passerar akrosomens enzymer vilka gör det möjligt för spermien att penetrera *zona pelucida* (Senger 2003).

2.5. Könsmognad

En tjur blir könsmogen mellan 7–18 månaders ålder (Senger 2003). Puberteten startar då Gonadotropinfrisättande hormoners (GnRH) neuroner kan svara på positiv och negativ feedback. Hos det hanliga djuret sker enbart en negativ feedback av mestadels östrogen och till viss del även testosteron, som genom aromatisering i

hjärnan konverteras till östrogen. Hos handjuret blir GnRH-neuronen mindre känsliga för den negativa feedbacken av testosteron och östrogen när puberteten närmar sig. Det innebär att ökande mängd testosteron och östrogen behövs för att hämma GnRH-neuronerna. Med den minskade känsligheten för den negativa feedbacken svarar hypotalamus genom att producera mer GnRH och därmed även mer luteiniserande hormon (LH) och FSH. Handjuret når i detta skede puberteten (Senger 2003).

Starten av puberteten kan definieras på flera sätt (Senger 2003), exempelvis som åldern då beteenden relaterade till könsmognad uttrycks, åldern vid första ejakulationen, åldern då spermier förekommer i ejakulatet, åldern då spermier förekommer i urinen eller åldern då ejakulatet innehåller ett visst antal spermier (Senger 2003).

3. Material och metoder

3.1. Litteraturgenomgång

Genomgång av relevant litteratur genomfördes genom användning av sökmotorer som Pubmed, google scholar och SLU-bibliotek (primo). För att söka relevant litteratur från de senaste 70 åren användes olika kombinationer av ord och begrepp (på engelska) som; Bitestikel, spermier, tjur, *post mortem*, spermatogenes, motilitet, anatomi med flera.

3.2. Uppsamling av testiklar

I denna studie användes 26 testiklar från 13 slaktade tjurar av raserna svensk Holstein (två st.) och SRB (11 st.). Dessa upphämtades från slakteriet i tre omgångar (5 st. + 5 st. + 3 st. par) och placerades i kyllåda för transport och förvarades där i ca en timme tills dess att provtagning kunde ske. Under hela experimentet förvarades testiklarna vid en temperatur av 5°C.

3.3. Spermieextraktion

Spermieprover från bitestikeln samlades genom att ett litet snitt anlades i *cauda epididymidis* med ett skalpellblad. En droppe spermier från bitestikeln tillvaratogs genom att applicera tryck mot bitestikeln bas med en pipett. Totalt gjordes fyra provtagningstillfällen på en av tjurens testiklar vid flera tidpunkter efter slakt med följande intervall; Dag 0 (vid ankomst till laboratoriet), dag 1 (efter 24h), dag 2 (48h) och dag 3 (72h). Vid sista provtagningstillfället (dag 3) togs prov från båda testiklarna från respektive tjur för att kunna jämföra om vävnaden påverkats av upprepade provtagningar i samma testikel och i sin tur affekterat spermier negativt (kontroll).

Efter varje provuppsamling skyddades incisionen med Opsite-spray (Smith & Nephew, London, United Kingdom) och organen placerades i en bägare med fosfatbuffrad saltlösning (PBS) för vidare förvaring i kyl (5°C).

3.4. Behandling av spermieceller

Extraherade spermier späddes under en del av studien i två provrör och i en del i ett provrör där ena späddes med 1 ml Optixcell (IMV Technologies, l'Aigle, France) och den andra med 1 ml mjölkspädningsvätska bestående av fruktos och mjölkpulver. En mindre mängd provmaterial fördes över till ett nytt rör för analys av flödescytometern. Provrören placerades i en inkubator i 38°C för aktivering. Proverna analyserades sedan efter både 20 och 30 minuters inkubation med datorassisterad spermieanalys (CASA).

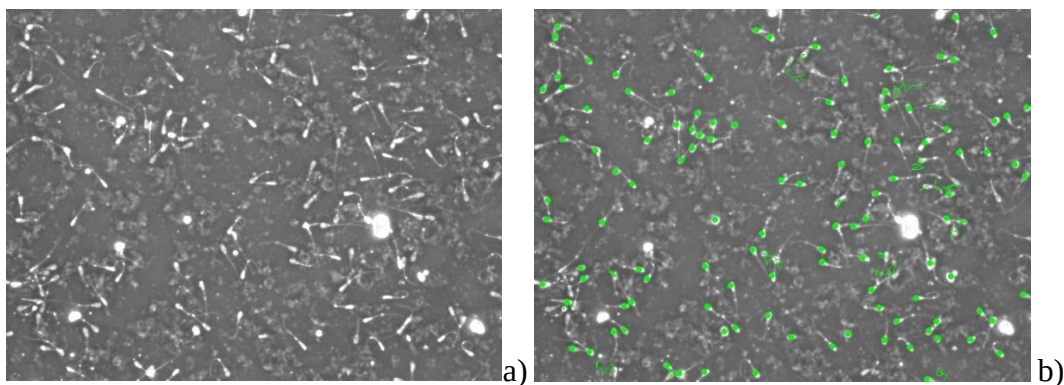
En omgång prover (n=5) från dag 0 utgick på grund av byte av spädningsvätska och inkubationstid. Kontrolltestikel nr 13 utgick dessutom på grund av för låg koncentration av spermier i provet för att kunna mätas.

3.5. Spermieutvärdering

Samtliga spermieprover utvärderades avseende motilitet, plasmamembranintegritet och kromatinintegritet med hjälp av datorassisterad spermieanalys (CASA) och flödescytometri med två olika infärgningstekniker.

3.5.1. Datorassisterad spermieanalys (CASA)

Spermiernas kinematik utvärderades med Datorassisterad spermieanalys (CASA), varvid proportionen av motila spermier och spermiernas motilitetsmönster mättes med fasmikroskop vid temperaturen 38°C. Det inkuberade spermieprovet blandades varefter en droppe med volymen 5 µl applicerades på ett objektglas. Eventuella bubblor punkterades så gott det gick och ett täckglas placerades ovanpå droppen. Spermiernas motilitet och motilitetsmönster mättes på 8 synfält i varje prov (Figur 6).



Figur 6. Motiliteten mätt med Datorassisterad spermieanalys (CASA). Samma synfält visat före och efter analys. Tekniken upprepas på 8 slumpmässigt valda synfält för att få ett medelvärde. Stillbild tagen på spermier i rörelse (a), bild tagen efter analys (b.)

Förkortningarna för rörelsemönstren som mättes med CASA var problematiska att översätta till svenska och behölls därför på originalspråket engelska. De inkluderade rörelsemönstren var; Curvilinear Velocity (VCL: medelhastigheten för spermien mätt efter cellens faktiska väg från punkt till punkt), Straight Line Velocity (VSL: medelhastigheten för spermien mätt som en rak linje från början till slutet av banan), Average Path Velocity (VAP: medelhastighet för medelvägen mellan VCL och VSL, Straightness (STR: Medelvärde av förhållandet mellan VSL/VAP), Linearity (LIN: Medelvärde av förhållandet mellan VSL/VCL), Wobble (WOB: den genomsnittliga svängningen av den krökta banan - VAP/VCL), Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH: vidden av laterala förflyttningen av huvudrörelser) och Beat Cross Frequency (BCF: frekvensen av hur ofta spermiehuvudet korsar spermies genomsnittliga väg).

3.5.2. Flödescytometri

Alla prover utvärderades med två färgningstekniker för flödescytometri där plasmamembranintegritet och kromatinstruktur undersöktes.

Plasmamembranintegritet

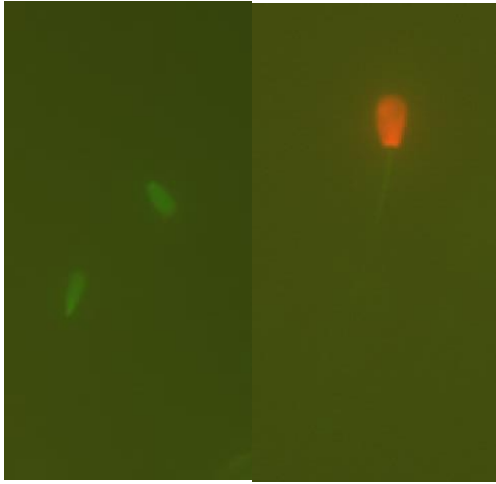
Plasmamembranintegritet utvärderades genom att färga med SYBR®14 och propidiumjodid (PI) från Live/Dead® Sperm Viability Kit L-7011 (Thermofisher, Invitrogen™ Molecular Probes™, Eugene, Oregon, USA). Spermerna späddes till koncentrationen $2 \times 10^6/\text{ml}$ med Cellwash (BDBiosciences, San José, CA, USA). Därefter tillsattes 1 μl SYBR-14, spädd 1:50 i Cellwash samt 3 μl PI. Proverna inkuberades 10 minuter i 37 °C. Grön och röd fluorescens utvärderades med en FACSVerse flödescytometer (BDBiosciences). Grön fluorescens detekterades med ett FL1 band-pass filter (527/32 nm), medan röd fluorescens mättes med hjälp av

ett FL3 band-pass filter (700/54 nm). Därefter klassificerades spermerna enligt följande (Se även figur 7 och 8):

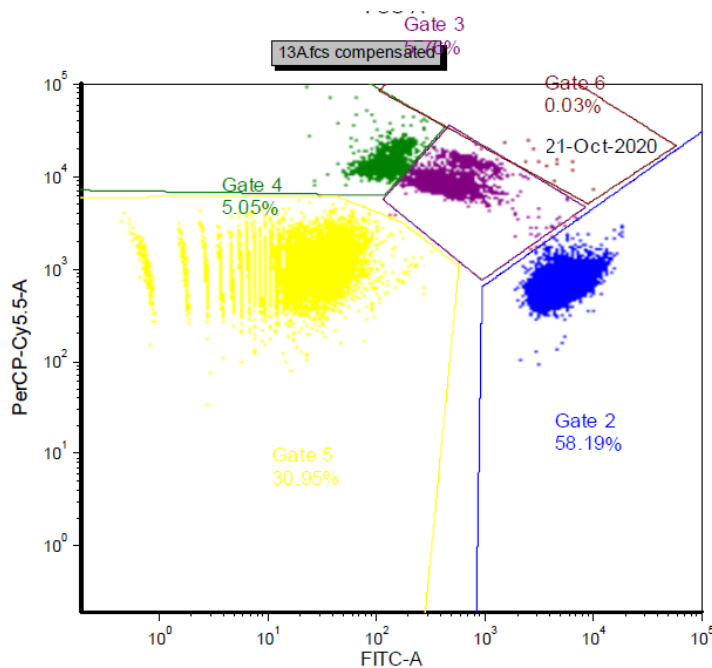
Levande, (SYBR®14-positiv/PI-negativ)

Död, (SYBR®14-negativ/PI-positiv)

Döende, (SYBR®14-positiv/ PI-positiv)



Figur 7. Fluorescensmikroskopibilder av spermier där grön fluorescens motsvarar SYBR14-positiv, levande och röd fluorescens motsvarar PI-positiv, död.

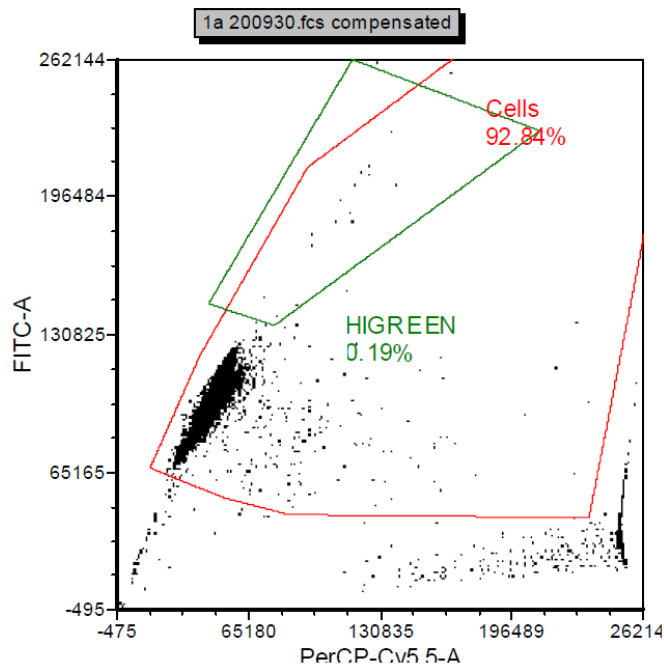


Figur 8. Exempel på graf från flödescytometrimätning, där Gate 2 motsvarar andel levande, Gate 3 motsvarar andel döende och Gate 4 motsvarar andel döda. Grön fluorescens på X-axeln, röd fluorescens på Y-axeln.

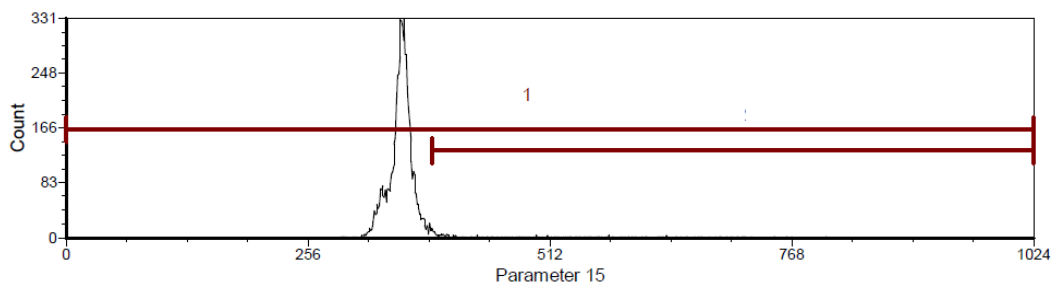
Spermiekromatinstrukturanalys - SCSA

SCSA utfördes genom att använda en aliquot från varje spermaprov, vilka spädades 1:1 med Tris-sodium chloride-ethylenediaminetetraacetic acid (TNE) buffert (0,5 M natriumklorid (NaCl), 0,01 M Tris-saltsyra (HCl), 1 mM Etylendiamintetra-ättiksyra (EDTA); pH 7,4) och därefter omedelbart frystes i flytande kväve och förvarades i -80°C fram till utvärdering. Vid analys tinades proverna på krossad is; en aliquot av provet blandades med TNE-buffert (0,5 M NaCl, 0,01 M Tris-HCL, 1 mM EDTA; pH 7,4) till en koncentration av $\approx 2 \times 10^6$ spermier/ml. Sedan tillsattes 200 μ l av en sur lösning innehållande HCl och Triton X-100 (0,17% Triton X-100, 0,15 M NaCl och 0,08 M HCl; pH 1,2), vilken fick verka i 30 sekunder innan 600 μ l av akridinorangelösning (AO) (6 μ g/ml i 0,1 M citronsyra, 0,2 M Dinatriumvätefosfat (Na_2HPO_4), 1 nM EDTA, 0,15 M NaCl; pH 6,0) tillsattes. Proverna analyserades inom 3 - 5 minuter med flödescytometri (FACSVerse). Grön och röd fluorescens utvärderades. Alla spermieceller har en viss del grön respektive röd fluorescens, men något förenklat motsvarar normal grön fluorescens oskadade spermier och röd fluorescens motsvarar skadade spermier. Likadana filter som för plasmamembranintegritet användes. De insamlade filerna utvärderades med FCSExpress (DeNovo software, Glendale, CA, USA) där Deoxiribonukleinsyra (DNA)-fragmentations index (% DFI) beräknades (Figur 10), dvs förhållandet mellan celler med denaturerat, enkelsträngat DNA och totala antalet celler. Även andelen omogna spermiekärnor med hög grön fluorescens (High DNA stainability; %

HDS) utvärderades (Figur 9), vilket beskriver graden av spermiekromatin-kondensation.



Figur 9. Exempel på graf för flödescytometri avseende SCSA. Grön fluorescens på Y-axeln, röd fluorescens på X-axeln.



Figur 10. Exempel på histogram från flödescytometri, SCSA, för utvärderingen av %DFI

3.5.3. Statistisk analys

Resultaten sammanställdes först i en Excel-fil (Microsoft Excel, 2018, New Mexico, U.S.A). Alla statistiska analyser utfördes med SAS®-programvara (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). Beskrivande statistik (medelvärde, standardavvikelse, median) beräknades med användning av FREQ-proceduren i programvaran.

Mixed proceduren för linjära modeller användes för att analysera insamlade data. Uppgifterna analyserades som data om upprepade värden. Den fasta delen av modellerna inkluderade effekten av dag, spädningssväska (bara för 5 prover från dag 0) och inkubationstid (bara för 5 prover från dag 0). Tjur sattes som en slump-

mässig faktor (*random effect*). Förhållandet mellan tidpunkter för varje parameter modellerades med hjälp av autoregressiv AR (1) kovariansstruktur. Frihetsgraderna bestämdes enligt Kenward & Roger (1997).

Alfavärdet för detta experiment valdes till 5 % (experimentet är säkert på 95 %) och p-värden jämfördes baserat på det valda alfavärdet.

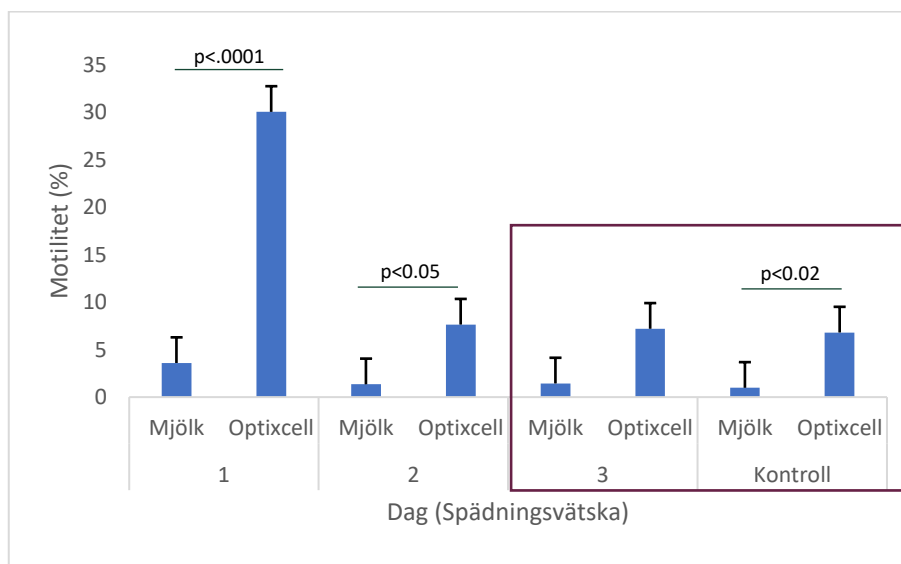
Scheffe post hoc test (eftertest) användes för att kontrollera risken för Typ I fel. Resultaten representeras som minstakvadrat-medelvärde (least squares means; LSM) $\pm$ medelvärdets medelfel (standard error of the mean; SEM). Om $p \leq 0,05$ ansågs resultaten vara signifikanta. Skillnader mellan $0,05 < p \leq 0,10$ betraktades som tendenser.

4. Resultat

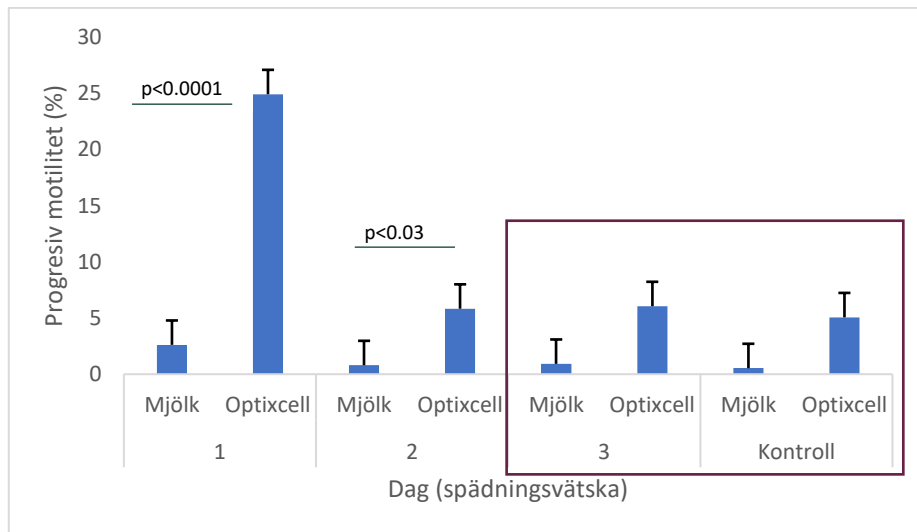
4.1. CASA

4.1.1. Motilitet

En signifikant ($p < 0,0001$) skillnad kunde observeras mellan mjölkspädningsvätskan och Optixcell för samtliga dagar samt kontroll avseende total- och progressiv motilitet (Figur 11 och 12). I Optixcell hade spermerna signifikant högre motilitet än i mjölkspädningsvätskan samtliga dagar. Dag 0 är undantagen då enbart prover med mjölkspädningsvätskan förekom och ingen jämförelse kunde göras.

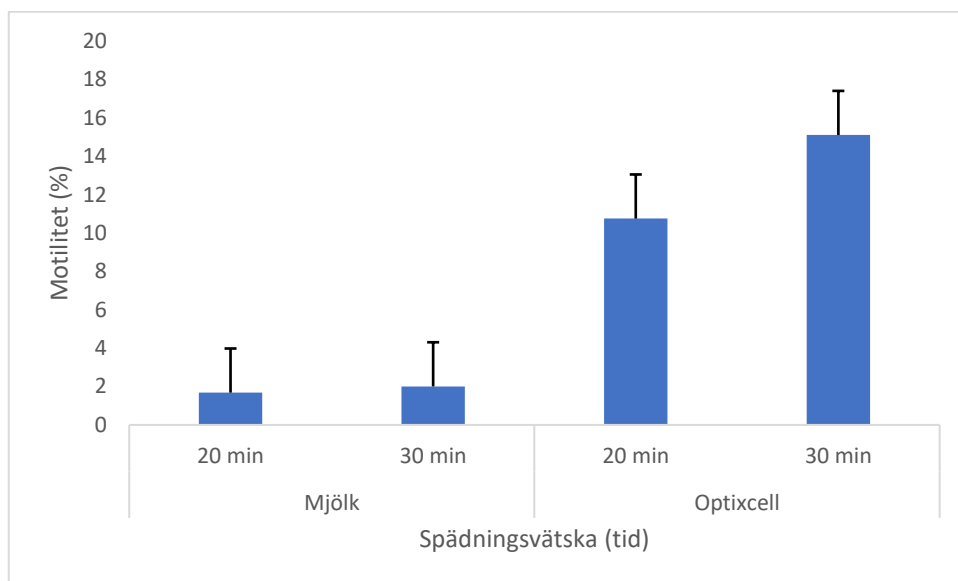


Figur 11. Total motilitet (LSMeans +SEM; %) i två olika spädningsvätskor under en tredagarsperiod. Kontroll är gjord Dag 3 vilket rektangeln illustrerar.

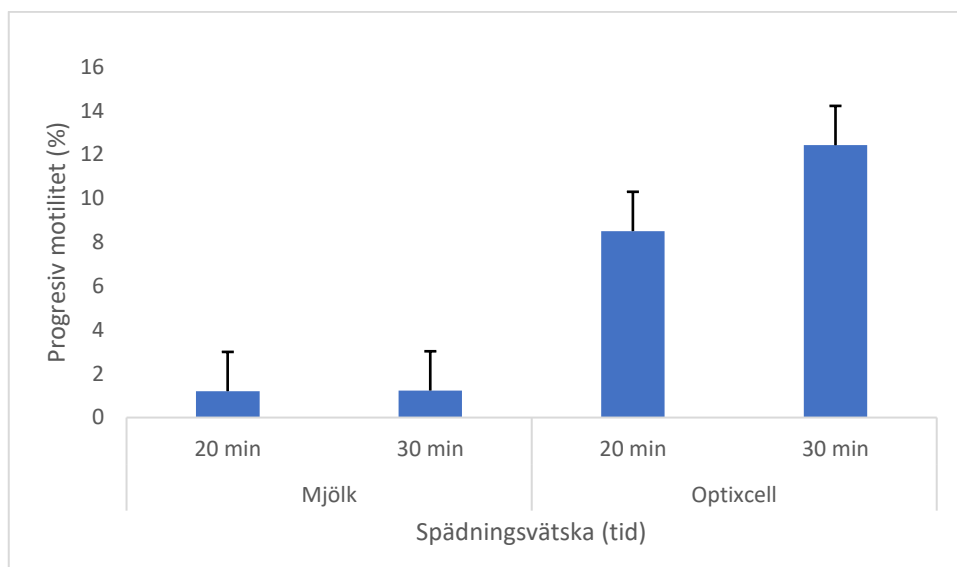


Figur 12. Progressiv motilitet (LSMeans +SEM; %) i två olika spädningsvätskor under en tredagarsperiod. Kontroll är gjord Dag 3 vilket rektangeln illustrerar.

Då inkubationstiderna 20 respektive 30 minuter jämfördes kunde ingen signifikant skillnad ses för varken motilitet eller progressiv motilitet för båda spädningsvätskorna (Figur 13 och 14).



Figur 13. Total motilitet (LSMeans +SEM; %) för 2 olika inkubationstider i två olika spädningsvätskor.



Figur 14. Progressiv motilitet (LSMeans +SEM; %) för 2 olika inkubationstider i två olika spädningsvätskor.

En signifikant ($p < 0,0001$) minskning av motilitet och progressiv motilitet kunde observeras (Tabell 1), vilka succesivt sjönk ju längre tid förvaringen av testiklarna fortlöpte (tabell 1). Det fanns en signifikant minskning för både total motilitet och progressiv motilitet efter dag 2 och 3 jämfört med dagen för insamling (dag 0) och dagen efter (dag 1). Kontrollerna visade också en signifikant minskning av total och progressiv motilitet efter tre dagars lagring jämfört samtliga dagar. Dock fanns ingen skillnad mellan kontroll och dag 0 och dag 1.

Tabell 1. Motilitet och progressiv motilitet (LSMeans $\pm$ SEM) för dag 0 - dag 3 + kontroll. Skillnader i variabler anges med likadana bokstäver ($p \leq 0,05$). Kontroll är gjord dag 3.

Dag	0		1		2		3		Kontroll		p-värde
Motilitet	39,3	$\pm 4,8^a$	30,5	$\pm 4,5^b$	17,8	$\pm 4,5^{a,b}$	16,1	$\pm 4,5^{a,b}$	18,7	$\pm 4,6^{a,b}$	<.0001
Progressiv	35,2	$\pm 4,1^a$	25,3	$\pm 3,9^b$	13,9	$\pm 3,9^{a,b}$	12,8	$\pm 3,9^{a,b}$	14,8	$\pm 3,9^{a,b}$	<.0001

Avseende spermernas kinematik fanns signifikanta resultat för samtliga parametrar förutom för ALH (Tabell 2). Det var en signifikant skillnad mellan dag 0 och kontrollen samt mellan dag 1 och kontrollen avseende VCL. För STR fanns en signifikant skillnad mellan dag 2 samt dag 3 mot kontrollen. För LIN fanns en signifikant skillnad mellan dag 2 och kontrollen samt mellan dag 3 och kontrollen. För BCF fanns en signifikant skillnad mellan dag 1 och dag 3.

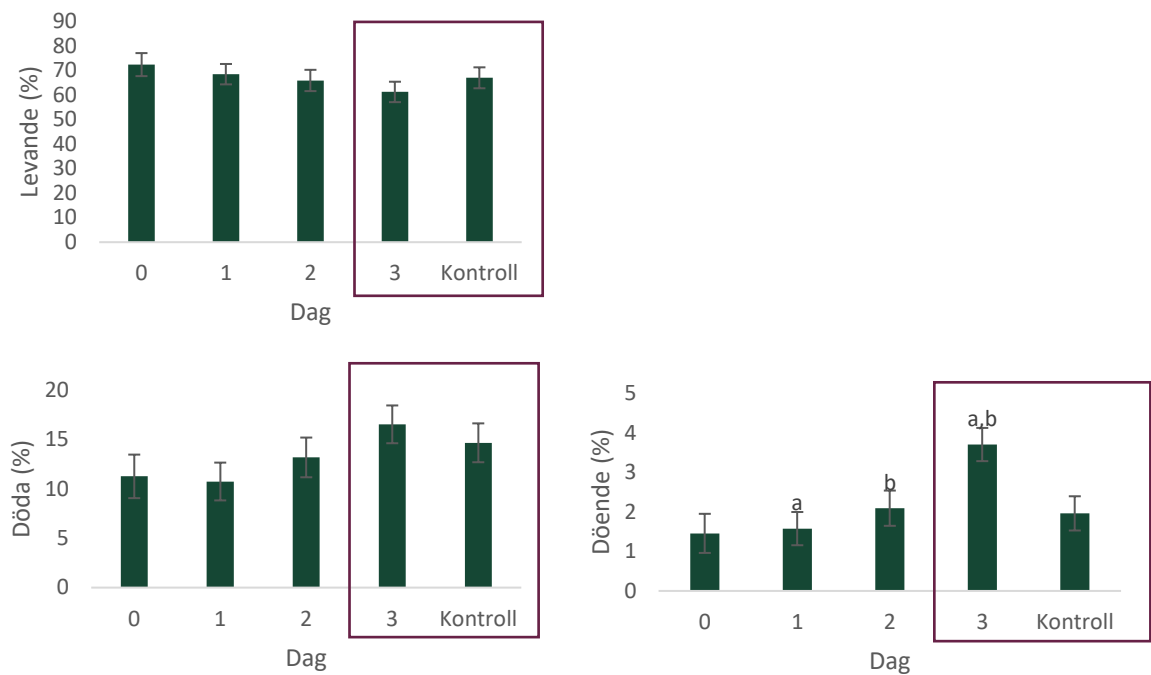
Tabell 2. Kinematik (LSMeans $\pm$ SEM) för Dag 0 - dag 3 + kontroll, där dag 3 och kontroll analyserades samma dag.

Dag	0		1		2		3		kontroll		p-värden	
CASA												
VAP (µm/s)	56,4	± 5,0 ^A	52,5	± 4,4	50,3	± 4,4	45,4	± 4,4	41,2	± 4,5 ^A	0,02	
VCL (µm/s)	104,0	± 5,0 ^a	98,7	± 8,5 ^b	92,7	± 8,5	84,0	± 8,5	72,2	± 8,7 ^{a,b}	<0,01	
VSL (µm/s)	40,8	± 3,4 ^A	35,1	± 3,0	32,6	± 3,0	30,4	± 3,0	29,3	± 3,0 ^A	0,03	
STR (VSL/VAP)	0,7	± 0,1	0,6	± 0,04 ^A	0,6	± 0,04 ^a	0,6	± 0,04 ^b	0,6	± 0,04 ^{A,a,b}	<0,001	
LIN (VSL/VCL)	0,4	± 0,04	0,3	± 0,03	0,3	± 0,03 ^a	0,3	± 0,03 ^b	0,4	± 0,03 ^{a,b}	<0,001	
WOB (VAP/VCL)	0,5	± 0,05	0,5	± 0,04 ^A	0,5	± 0,04	0,5	± 0,04	0,5	± 0,04 ^A	0,03	
ALH (µm)	3,9	± 0,4	4,0	± 0,4	4,2	± 0,4	3,6	± 0,4	3,2	± 0,4	0,06	
BCF (Hz)	23,0	± 1,8 ^A	20,7	± 1,5 ^a	19,0	± 1,5	17,3	± 1,5 ^{A,a}	17,6	± 1,5	<0,01	
Skillnader mellan variabler anges med samma bokstäver (små bokstäver p≤0.05, stora bokstäver 0,05<p <0,10)												

4.2. Flödescytometri

4.2.1. Plasmamembranintegritet

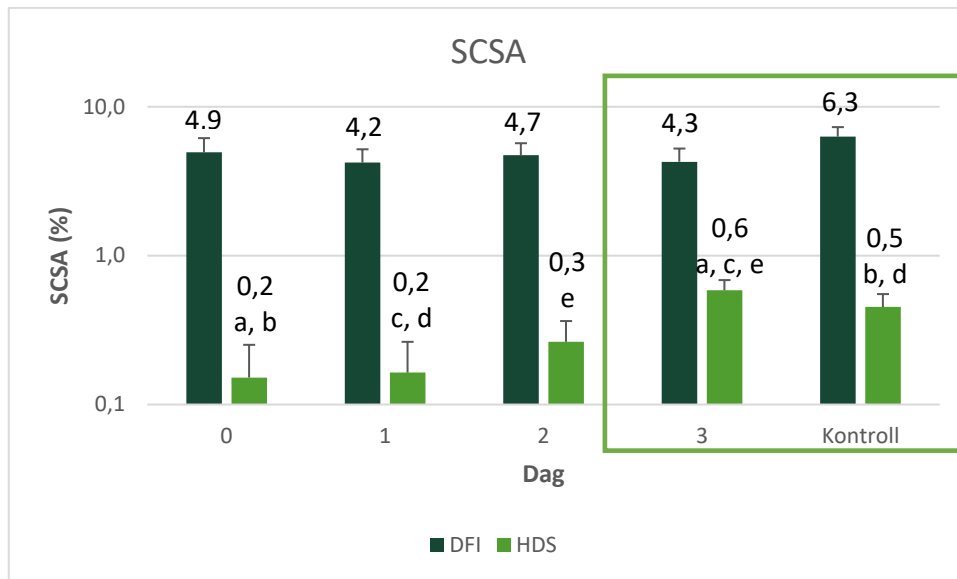
Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan dagarna för levande och döda spermier. Enbart signifikanta värden för döende spermier kunde ses, där det var en signifikant ökning mellan dag 1 mot dag 3 och mellan dag 2 mot dag 3. (Figur 15)



Figur 15. Plasmamembranintegritet (LSMeans $\pm$ SEM; %). Andelen levande, döende och döda spermier mättes med flödescytometri. Kontroll provtogs och analyserades dag 3, vilket rektangeln illustrerar. Signifikanta ($p \leq 0,05$) skillnader inom samma parameter anges med likadana bokstäver.

4.2.2. SCSA

Det förekom ingen signifikant skillnad mellan dagar och kontroll avseende % DFI. Resultatet visade en generellt låg procent av spermier som hade skadat DNA (% DFI) i förhållande till totala antalet celler. Antalet omogna spermieceller (% HDS) hade ökat signifikant mellan dag 0 och dag 3 samt mellan dag 0 och kontroll, det var även en signifikant ökning mellan dag 1 och kontroll samt mellan dag 2 och 3. (Figur 16)



Figur 16. SCSA. % DFI och % HDS mättes och jämfördes (LSMeans +SEM; %) över tid. Kontroll undersöktes dag 3, vilket rektangeln illustrerar. Signifikanta ($p \leq 0,05$) skillnader inom samma parameter anges med likadana bokstäver.

5. Diskussion

Syftet med denna studie var att undersöka vilken effekt förvaringstiden av testiklar i kylt tillstånd (5°C) hade på bitestikelspermiers motilitet, viabilitet och kromatinintegritet. Detta för att kunna användas som en modell för konserveringen av spermier från vilda arter. Metoden som användes fungerade tillfredställande, men förbättringspotential finns. Effekten av lagringstiden på spermiefunktionen utvärderades med hjälp av CASA och flödescytometri. Analyser gjordes vid fyra tidpunkter; vid ankomst till laboratoriet (dag 0), dag 1, dag 2 och dag 3. Betydande skillnader observerades i total och progressiv motilitet och % HDS. Men plasmamembranintegritet och DNA-fragmentering visade inte någon skillnad över tid.

Studier där bitestikelspermiers fertila förmåga har utvärderats, har tidigare utförts på andra djurslag (Ogawa *et al.* 1972; Pavlok 1974; Kann & Raynaud 1982; Christian *et al.* 1993; Lengwinat & Blottner 1994; Blash *et al.* 2000). I en studie Christian *et al.* (1993) undersöktes befruktningsförmågan hos spermier från bitestikeln från muskadaver vilka förvarats i rumstemperatur i upp till 24h, där åtminstone 25 % av oocyterna blev befruktade *in vivo* då uppsamlingen av spermier skedde 15h *post mortem*. Detta kan indikera att spermerna har en förmåga till befruktning även en tid efter döden (Christian *et al.* 1993). Mössen i tidigare nämnd studie förvarades i rumstemperatur, det är känt att vävnadsnedbrytning går fortare vid högre temperaturer. Exempelvis nämns det att inom organtransplantationer kan den skadliga anaeroba metabolismen i organen minskas avsevärt om vävnaderna förvaras hypotermiskt (ca 4°C) (Hoffmann & Minor 2015). Det kan därför antas att om möjligheten att kyla organen finns och därmed minska förruttnelsen av vävnaderna, kan potentialen för att spermerna överlever längre förbättras.

Under normala omständigheter blandas bitestikelspermier vid en ejakulation med vätskor från accessoriska könskörtlarna så kallad seminalplasma. *In vitro* studier av Henault *et al.* 1995 har visat att spermier från *cauda epidymidis* som inkuberats i accessoriska könskörtelvätskor (accessory sex gland fluids, (AGF) uppvisade en ökad förmåga att penetrera oocyter från nötkreatur. En annan studie visar att *in vitro* fertiliseringsgraden är högre för bitestikelspermier än för spermier i ejakulat (Brackett *et al.* 1978 se Way *et al.* 2000). Medan andra studier visar att det inte förekommer någon skillnad på befruktningsförmåga mellan ejakulerade spermier

och bitestikelspermier *in vivo* (Lardy & Ghosh 1952 se Way *et al.* 2000; Amann & Griel 1974) och *in vitro* (Hosoi *et al.* 1981). Det kan därför vara möjligt att den huvudsakliga funktionen för sekretionen från de accessoriska könskörtlarna är som transportmedel för spermerna i de honliga reproduktionsorganen och att komponenter i AGF inte är essentiella för befruktning *in vivo* (Way *et al.* 2000). Dock har det visats i *in vitro* studier att när tjurspermier från *cauda epidymidis* med lägre fertilitet inkuberas med AGF från en tjur med högre fertilitet förbättras penetrationen av oocyterna (Henault *et al.* 1995). Detta kan användas som argument för betydelsen av AGF inom nötkreaturs reproduktion (Way *et al.* 2000). Dessutom är AGF viktig för att aktivera spermernas motilitet. I bitestikeln är spermerna orörliga men när de kommer i kontakt med AGF börjar svansarna röra sig kraftigt (Visconti 2009).

Som väntat sjönk både total motilitet och progressiv motilitet signifikant ju längre tid förvaringen av testiklarna fortlöpte i denna studie. Däremot fanns det ingen signifikant minskning mellan dagarna avseende levande spermier då plasmamembranintegritet mättes. Det fanns inte heller någon signifikant skillnad i % DFI vilket tyder på att antalet spermier med skadat DNA förblivit oförändrat under förvaringstiden. Procent DFI kan användas för att undersöka graden av skadat DNA hos spermerna och kan direkt associeras med fertilitet (Yang *et al.* 2019). Däremot finns en signifikant skillnad för % HDS i denna studie vilket innebär att omogna spermieceller ökade signifikant dag 3 jämfört med dag 0. Även i kontrollen ökade andelen omogna spermieceller signifikant fast vid jämförelse med dag 1. Detta var oväntat då antalet omogna spermier inte borde öka vid förvaring. I en nyligen publicerad studie av Mohammadi *et al.* (2020) undersöktes huruvida % HDS verkligen mäter det man tidigare trott, det vill säga graden av omogna kärnor hos spermier. Resultatet i den studien visade att HDS tycks vara en opålitlig indikator för att mäta omogna spermiekärnor. Den tidigare nämnda studien av Mohammadi *et al.* (2020) kan därför styrka att den signifikanta ökningen som sågs i denna studie inte beror på omogna spermier, utan har mätt något annat, vilket lämnar utrymme för nya studier inom området. Att spermerna i hög grad är levande i flera dagar och att DNA-skadorna är fortsatt låga kan antas vara positivt för användbarheten i assisterad reproduktionsteknik. Dock minskar motiliteten över tid vilket skulle kunna tala emot detsamma.

Motiliteten hos spermier är den mest använda metoden för att utvärdera spermakvalité (Graham 2001; Morrell *et al.* 2018). Enligt Senger (1997) bör inte motiliteten fastställas från endast ett ejakulat. För att få en bättre bild av motiliteten hade därför utvärdering av mer än ett spermieprov per dag och bitestikel varit att föredra. I en annan studie gjord av Morrell *et al.* (2018) såg man att spermernas motilitet i CASA:n inte var signifikant relaterad till dräktighet hos nöt. Enligt Graham (2001)

kan motiliteten användas för att avgöra om ett spermaprov har en låg befruktningsförmåga (om motiliteten är låg), men det går däremot inte att avgöra om provet kommer vara fertilt. Exempelvis kan alla motila spermier i ett prov också ha skadade akrosomer och är då infertila och bidrar då till att sambandet mellan motilitet och fertilitet kan vara lågt (Graham 2001).

För att ytterligare kunna utvärdera användbarheten av spermier i enlighet med denna studie behöver man även undersöka andelen spermier med avvikande morfologi, till exempel huvud och svans avvikelser vilket inte gjorts här. Exempel på sådana defekter kan vara kärnsäckar, ihoprullad eller vikt svans etc. (Senger 2003). I ett ejakulat kan en viss andel (5 – 15%) defekta spermier förekomma, vilket anses acceptabelt, men nedsatt fertilitet anses uppstå då andelen defekta spermier uppgår till 20 % och mer (Senger 2003).

Studien har en del förbättringspotential. Ett annat sätt att försluta snitten hade varit att föredra, då Opsite som användes i detta projekt lätt lossnade från vävnaden då testiklarna förvarades i vätska (PBS). Huruvida ofullständigt förslutna snitt i bitestikeln har haft negativ påverkan på resultatet är svårt att säga. Förslagsvis hade vävnadslim varit ett bättre alternativ men det är dyrare. I det initiala skedet av studien användes en mjölkbaserad spädningsvätska vilken innehåller fruktos och mjölkpulver. Spermernas motilitet och kinematik visade sig påverkas negativt varför spädningsvätskan byttes ut mot Optixcell. Vid en jämförelse kunde en signifikant ökning av både total och progressiv motilitet ses hos prover spädde med Optixcell jämfört med mjölkspädningsvätskan. Däremot hade mjölkspädningsvätskan inte någon negativ effekt på spermieprover från ejakulat undersökta på laboratoriet (A. Cojkic, personligt meddelande), vilket kan tyda på att spädningsvätskan är olämplig för spermier från bitestikeln. Spermiers förmåga att röra sig och andelen levande spermier i provet ger inte en fullständig förutsägelse för huruvida spermerna har förmågan att befrukta oocyter eller inte. Därför skulle ett uppföljande försök för att undersöka om oocyter befruktade med bitestikelspermier från tjur kan utvecklas till blastocyster vara ett lämpligt nästa steg.

6. Konklusion

Sammanfattningsvis sjönk spermiemotiliteten relativt snabbt över tid, vilket även kunde ses för flera kinematiska parametrar i CASA. Däremot var plasmamembranintegriteten fortsatt hög under hela studien och en hög andel levande spermier kunde ses. Det förekom inte heller någon skillnad i DNA fragmentationsindex som hade låga nivåer under hela försöket. Det kunde däremot ses en ökning i spermiekromatinkondensation (% HDS). Sammantaget skulle motiliteten kunna indikera att spermier kan ha mindre chans att befrukta en oocyt, ju längre tid som går från djurets död fram tills spermieextraktion sker. Plasmamembranintegriteten och DNA-fragmentationsindexet är däremot intakta. För att kunna undersöka detta vidare hade en uppföljande studie som undersöker huruvida spermier är kapabla att befrukta en oocyt och utvecklas till en blastocyst vara en bra idé.

Referenser

- Amann, R.P. & Griel, L.C. (1974). Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen. *Journal of Dairy Science*, 57 (2), 212–219. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84862-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)84862-9)
- Austin, C.R. (1952). The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature*, 170 (326), 326–326. <https://doi.org/10.1038/170326a0>
- Blash, S., Melican, D. & Gavin, W. (2000). Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, 54 (6), 899–905. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00400-3)
- Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S., Zedda, M., Carluccio, A. & Pau, S. (2001). Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 56 (5), 955–967. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00621-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00621-5)
- Brackett, B.G., Hall, J.L. & Oh, Y.-K. (1978). In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal, and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 29 (5), 571–582. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43288-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43288-7)
- Breitbart, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187 (1), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00704-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00704-3)
- Christian, C., Songsasen, N. & Leibo, S.P. (1993). Presence of motile sperm in mice 24 hours postmortem. *Theriogenology*, 39 (1), 201. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90056-B](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90056-B)
- Cocchia, N., Ciani, F., El-Rass, R., Russo, M., Borzacchiello, G., Esposito, V., Montagnaro, S., Avallone, L., Tortora, G. & Lorizio, R. (2009). Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote*, 18 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0967199409990256>
- Dunleavy, J.E.M., O'Bryan, M.K., Stanton, P.G. & O'Donnell, L. (2019). The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction*, 157 (2), 53–72. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0457>
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (2017). *Textbook of Veterinary Anatomy*. 5. uppl. Amsterdam: Saunders Elsevier.
- Fayrer-Hosken, R. (1997). Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13 (2), 195–202. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30335-2](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30335-2)
- Fournier-Delpech, S., Colas, G., Courot, M. & Ortavant, R. (1977). Observations on the motility and fertilizing ability of ram epididymal spermatozoa. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 17 (6), 987–990. <https://doi.org/10.1051/rnd:19770804>

- Gadella, B.M., Rathi, R., Brouwers, J.F.H.M., Stout, T.A.E. & Colenbrander, B. (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, 68 (3), 249–265. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00161-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00161-0)
- Gilmore, J.A., McGann, L.E., Ashworth, E., Acker, J.P., Raath, J.P., Bush, M. & Critser, J.K. (1998). Fundamental cryobiology of selected african mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Animal Reproduction Science*, 53 (1), 277–297. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00118-3)
- Graham, J.K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68 (3), 239–247. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00160-9)
- Henault, M.A., Killian, G.J., Kavanaugh, J.F. & Griel, L.C. (1995). Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 52 (2), 390–397. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.390>
- Hewitt, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M. & England, G.C.W. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67 (1), 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00090-2)
- Hoffmann, T. & Minor, T. (2015). New strategies and concepts in organ preservation. *European Surgical Research*, 54 (3–4), 114–126. <https://doi.org/10.1159/000369455>
- Hosoi, Y., Niwa, K., Hatanaka, S. & Iritani, A. (1981). Fertilization in vitro of rabbit eggs by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Biology of Reproduction*, 24 (3), 637–642. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.3.637>
- Ickowicz, D., Finkelstein, M. & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*, 14 (6), 816–821. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.81>
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraez, P. & Anel, L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, 60 (7), 1249–1259. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00139-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00139-0)
- Kann, M.L. & Raynaud, F. (1982). In vivo fertilization after initiation of sperm motility in the hamster epididymis. *Reproduction Nutrition Développement*, 22 (3), 455–463
- Kenward, M.G. & Roger, J.H. (1997). Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, 53 (3), 983–997. <https://doi.org/10.2307/2533558>
- de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13 (1), 1–8. https://doi.org/10.1093/hum-rep/13.suppl_1.1
- Lambrechts, H., van Niekerk, F.E., Coetzer, W.A., Cloete, S.W.P. & van der Horst, G. (1999). The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology*, 52 (7), 1241–1249. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00201-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00201-0)
- Lardy, H.A. & Ghosh, D. (1952). Comparative metabolic behavior of epididymal and ejaculated mammalian spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55 (4), 594–596. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26579.x>
- Lengwinat, T. & Blottner, S. (1994). In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 35 (3), 291–301. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90044-2)

- Mohammadi, Z., Tavalaei, M., Gharagozloo, P., Drevet, J.R. & Nasr-Esfahani, M.H. (2020). Could high DNA stainability (HDS) be a valuable indicator of sperm nuclear integrity? *Basic and Clinical Andrology*, 30 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12610-020-00110-8>
- Morrell, J.M., Valeanu, A.S., Lundeheim, N. & Johannisson, A. (2018). Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60 (41). <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0396-2>
- Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. & Hanada, A. (1988). In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *Reproduction*, 84 (2), 585–591. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840585>
- Niwa, K., Ōhara, K., Hosoi, Y. & Iritani, A. (1985). Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *Reproduction*, 74 (2), 657–660. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0740657>
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J. & England, G.C.W. (2018). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10. uppl. Amsterdam: Elsevier Health Sciences.
- Ogawa, S., Satoh, K., Hamada, M. & Hashimoto, H. (1972). In vitro culture of rabbit ova fertilized by epididymal sperms in chemically defined media. *Nature*, 238 (5362), 270–271. <https://doi.org/10.1038/238270a0>
- Pavlok, A. (1974). Development of the penetration activity of mouse epididymal spermatozoa in vivo and in vitro. *Reproduction*, 36 (1), 203–205. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0360203>
- Senger, P.L. (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2. uppl. Pullman, Washington: Current conceptions. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19982206441>
- Staub, C. & Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 12 (1), s27–s35. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>
- Stival, C., Puga Molina, L. del C., Paudel, B., Buffone, M.G., Visconti, P.E. & Krapf, D. (2016). Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. I: Buffone, M.G. (red.) *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Cham: Springer International Publishing, 93–106. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_5
- Tsutsui, T., Wada, M., Anzai, M. & Hori, T. (2003). Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65 (3), 397–399. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.397>
- Visconti, P.E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (3), 667–668. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811895106>
- Way, A.L., Griel, L.C. & Killian, G.J. (2000). Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *Journal of Andrology*, 21 (2), 213–219. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02098.x>
- Wilhelm, D., Palmer, S. & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews*, 87 (1), 1–28. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2006>
- Yang, H., Li, G., Jin, H., Guo, Y. & Sun, Y. (2019). The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Translational Andrology and Urology*, 8 (4), 356–365. <https://doi.org/10.21037/tau.2019.06.22>

Zachary, J.F. (2017). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 6. uppl. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Tack

Jag vill rikta ett stort tack till personalen på Lövsta slakteri AB som hjälpt mig och bistått med mitt provtagningsmaterial, vilket gjorde denna studie möjlig och tack till Dennis Larsson på KV-stall som skött kontakten med slakteriet. Jag vill också tacka mina handledare, Theodoros Ntallaris, Jane Morrell och Anders Johannisson som stöttat, peppat och hjälpt till med diverse uppkomna svårigheter under projektets gång. Tack också till Dr. Eduardo G. Aisen för tillåtelsen att få utföra projektet baserat på hans idé.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Uppsamling av spermier från bitestikeln efter döden är en värdefull teknik för att kunna bevara viktigt genetiskt material från djur som antingen är värdefulla avelsdjur eller tillhör utrotningshotade arter. Genetiskt material som annars hade kunnat gå förlorat. Däremot dör inte djur nödvändigtvis lättillgängligt till laboratorier med rätt utrustning för att kunna ta till vara spermier. Som alternativ kan organen kylas och transporteras till laboratorier där spermier kan tas tillvara. Denna studie syftar på att undersöka vilken effekt förvaringstiden av tjurtestiklar efter döden har på bitestikelspermiernas rörelseförmåga, överlevnad och DNA-sönderfall. Detta för att kunna användas som en modell för att bevara spermier från vilda arter.

Tjurens testikel är äggformad och är placerad med sin längsta axel i lodrät riktning. Testikelns storlek varierar beroende på ålder, ras och genetik och speglar hur stor spermieproduktionen är. Spermieproduktionen bedöms genom att mäta omkretsen, ju större omkrets desto högre spermieproduktion. Spermier bildas inuti testikelvävnaden vilket kallas för spermatogenesen och förflyttar sig senare vidare till bitestikeln.

Fäst mellan testikelns båda poler sitter bitestikeln som är uppdelad i tre otydligt avgränsade delar. Bitestikeln delas in i huvud, kropp och svans, där huvudet sitter på testikelns pol som är uppåt, svansen är fäst på testikelns pol som är nedåt och kroppen är delen däremellan. Bitestikels huvudsakliga funktion är att bidra med en gynnsam miljö där spermiernas sista steg av mognad kan ske, men dessutom att fungera som en förvaringsplats för spermier. Inuti bitestikeln går en enda lång vindlande kanal som kallas för bitestikelkanalen. Bitestikelkanalen är omgiven av glatt muskulatur vilket möjliggör att kontraktioner kan förflytta spermier framåt i kanalen.

I denna studie undersöktes hur spermierna påverkades av förvaring då organen uppsamlats efter döden. Till studien användes 26 testiklar från 13 slaktade tjurar från ett närliggande slakteri. Testiklarna förvarades i kyllåda i ca 1 timme vid en temperatur av 5°C under hela projektet. Spermieprover samlades sedan från bitestikelsvansen och spermier utvärderades avseende rörlighet, överlevnadsgrad och

DNA-fragmentering. Provtagningen upprepades på samtliga testiklar i 4 fort-löpande dagar enligt följande intervall; vid ankomst till laboratoriet (dag 0), efter 1 dag, 2 dagar och 3 dagar.

Resultatet visade på en minskad spermierörlighet över tid. Däremot kunde det inte observeras någon skillnad i överlevnad mellan de olika dagarna. Det förekom inte heller någon skillnad i DNA-fragmentering och nivåerna av detta var låga samtliga dagar. Däremot kunde en ökning i antalet omogna spermieceller observeras över tid.

Slutligen kan resultatet från studien indikera att bitestikelspermier blir påverkade av hur lång tid testikelvävnaden förvaras efter döden. Uppföljande studier behövs dock för att utvärdera om spermerna är kapabla att befrukta honliga könsceller (äggceller) och utvecklas vidare.