



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Förekomst av reaktiva syreföreningar i transportperma från hingst

Annika Lundgren

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:28*

Förekomst av reaktiva syreföreningar i transportsperma från hingst

Annika Lundgren

*Handledare: Jane Morrell, Institutionen för kliniska vetenskaper avd för reproduktion
Bitr handledare: Anders Johannisson, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi
Bitr handledare: Anne-Marie Dalin, Institutionen för kliniska vetenskaper avd för reproduktion*

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: hingst, transportsperma, reaktiva syreföreningar, väteperoxid, superoxid

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:28*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Introduktion	6
Litteraturoversikt	7
Fria radikaler och reaktiva syreföreningar	7
Spermier och ROS	9
Färger som kan användas för att studera ROS	11
SYBR-14/Propidiumjodid	11
Hoechst 33258	11
Hydroethidine	12
Divätedichlorofluorescindiacetat	12
Ämnen som inducerar produktion av fria syreradikaler	12
Syfte med studien.....	12
Material och metoder	13
Hingstmaterial.....	13
Laboratorieanalys av viabilitet och ROS	13
Koncentration, motilitet, morfologi och kromatinstabilitet	16
Dräktighetsresultat	16
Statistisk analys.....	16
Resultat	17
Grundreproduktionsparametrar.....	17
Kromatinstabilitet	19
ROS.....	19
Väteperoxid.....	22
Diskussion.....	27
Slutsats	31
Tack!	31
Referenser	32

SAMMANFATTNING

Användningen av kyld transportsperma har ökat de senaste åren, den ökade användningen har skett till priset av sämre dräktighetsresultat. I en studie från 2006 visar Dahlsten att dräktighetsprocenten per brunst för kyld sperma var 53,9%, medan den var 65,6% för färsk sperma. Skillnaden kan bero på flera faktorer, en av dessa kan vara att spermerna utsätts för oxidativ stress under transport och förvaring. Vid oxidativ stress bildas reaktiva syreföreningar (ROS) som påverkar celler både positivt och negativt. Låga nivåer ROS är involverade i cellernas signalöverföring, medan höga nivåer är toxiska och kan skada DNA, RNA samt initiera apoptos. De viktigaste ROS är superoxid, väteperoxid och hydroxylradikaler. Vid metabolismen av syre sätts elektrontransportkedjan igång, när det blir elektronläckage från denna bildas superoxid. Superoxid har låg reaktivitet, men kan omvandlas till väteperoxid som är högttoxiskt för celler. Både superoxid och väteperoxid kan i sin tur omvandlas till hydroxylradikal som är extremt reaktiv. Flera studier har undersökt hur ROS påverkar spermernas funktion. Normalt är reaktiva syreföreningar involverade i signalöverföring under kapaciteringen, men när de utsätts för oxidativ stress kommer ROS påverka motiliteten, men påverkar även membranintegriteten som i sin tur leder till minskad spermiefunktion.

Transportspermadoser skickades från Flyinge till Uppsala för att därefter analyseras inom 24 h, totalt analyserades 45 prover. Till proverna tillsattes de fluorescerande färgämnen SYBR-14 (viabilitetsprov), propidiumjodid (viabilitetsprov), Hoechst 33258 (viabilitet i ROS prov), hydroethidine (ROS-prov), divätedichlorofluoresceindiacetat (ROS-prov). I ROS proverna kunde även väteperoxidproduktion urskiljas. Från varje transportspermados analyserades ett viabilitetsprov och två ROS prover, varav ett av ROS proverna fick tillsats av menadione, som inducerar ROS produktion. Analyserna utfördes vid 0h och 2h (inkubation i 37°C). Proverna kördes i flödescytometer och resultaten presenterades i dataprogrammet CellQuest. Även total motilitet, progressiv motilitet, morfologi, koncentration och kromatinstabilitet bestämdes, men endast för det ursprungliga transportspermaprovet. Dräktighetsresultaten från hela säsongen (total dräktighetsprocent och dräktighetsprocent transportsperma) erhöles från Flyinge. Resultaten överfördes till Excelfiler och statistisk analys gjordes med hjälp av SAS.

Den totala motiliteten var starkt korrelerad till dräktighetsprocent för transportsperman, $r = 0,8$ ($p 0,0009$). Vid jämförelse med den progressiva motiliteten och dräktighetsprocent för transportsperma var $r = 0,77$ ($p 0,002$). Halten ROS och väteperoxid varierade mellan hingstar, det var även variation mellan de olika transportspermadoserna från samma hingst främst med avseende på väteperoxidhalt. Generellt sågs en ökning av ROS + efter inkubering i 2 h, dock blev det ingen högre halt ROS i de inducerade proverna efter 2 timmars

inkubering. Ett samband mellan total motilitet och hur stor skillnad mellan provernas grundproduktion av ROS och inducerad ROS produktion sågs. Negativ korrelation med statistisk signifikans mellan total dräktighetsprocent och inducerad % ROS + observerades. Korrelation mellan koncentration och inducerad % ROS + vid 2 h var $r = 0,81$ ($p 0,0004$) samt mellan koncentration och inducerad % väteperoxid produktion från levande spermier var $r = 0,62$ ($p 0,017$). Slutsatser som kan dras av examensarbetet är att kvalitetsbedömning av sperma är svårt och flera olika faktorer spelar in. Statistiken visar att det finns flera samband med statistisk signifikans mellan de olika variablerna och detta kan vara till stor hjälp i framtida avelsarbete.

SUMMARY

The use of chilled transport sperm has increased in recent years, the increasing use has been at the expense of poor pregnancy rate. In a study from 2006 Dahlsten showed that the pregnancy rate for chilled semen was 53.9%, while it was 65.6% for fresh semen. The difference may be due to several factors, one of them being that sperm could be exposed to oxidative stress during transportation and storage. The oxidative stress produce reactive oxygen species (ROS), affecting cells both positively and negatively. Low levels of ROS are involved in cell signaling, whereas high levels are toxic and can damage DNA, RNA and initiate apoptosis. The major ROS is superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. During the metabolism of oxygen the electron transport chain starts and when it leaks electrons superoxide form. Superoxide has low reactivity, but can be converted into hydrogen peroxide which is highly toxic to cells. Both superoxide and hydrogen peroxide can in turn be converted to hydroxyl radical which is extremely reactive. Several studies have examined how ROS affect sperm function. Typically, ROS are involved in signal transmission during capacitation, but when exposed to oxidative stress, ROS will affect motility, but also affects the membrane integrity, which in turn leads to reduced sperm function.

Transport semen doses from Flying were sent to Uppsala and then analyzed within 24 h, a total of 45 samples being analyzed. The fluorescent dyes SYBR-14 (viability), propidium iodide (viability), Hoechst 33258 (viability of ROS samples), hydroethidine (ROS detection), it dihydrogendichloro-fluoreseindiacetate (ROS detection) were added to different samples. From each semen dose one viability examination and two ROS samples were analyzed, one of ROS samples being with the addition of menadione, which induces ROS production. Analyses were carried out at 0h and 2h (incubation at 37 ° C). Samples were run in the flow-cytometer and the results were presented in the software program Cell Quest. Total motility, progressive motility, morphology, concentration and chromatininstability were also analyzed, but only for the initial transport semen sample. Gestation results from the entire season were obtained from Flyinge (total pregnancy rate and pregnancy rate transported sperm). The results were transferred to Excel files and statistical analysis was done using the SAS.

Total motility was strongly correlated with conception rate for the transport sperm, $r = 0.8$ ($p 0.0009$). When the progressive motility was compared with the conception rate for the transport sperm, the correlation was $r = 0.77$ ($p 0.002$). The production of ROS and hydrogen peroxide varied between stallions, there was also variation between the different transport semen doses from the same stallion, particularly for hydrogen peroxide. Generally there was an increase in ROS + after incubation for 2 h, however the ROS levels in the induced samples after 2 h of incubation were not higher compared to ROS levels at 0 h. The results shows that the higher the difference between the basic production and ROS-induced production, the higher the motility. A negative correlation with statistical

significance between the overall conception rate and induced % ROS + was observed. The correlation between concentration and induced % ROS + at 2 h was $r = 0.81$ ($p 0.0004$), concentration and induced % hydrogen peroxide production from live sperm was $r = 0.62$ ($p 0.017$). A conclusion to be drawn from this study is that evaluation of semen quality is difficult and many factors affect the semen. Statistics show that there are several correlations with statistical significance between the different variables and this can be very helpful in future horse breeding.

INTRODUKTION

Artificiell insemination (AI) med färsk sperma introducerades i Sverige i slutet av sjuttioalet, transportsperma och fryst sperma började användas i mitten av åttioalet. (Söderquist, 2004) Sedan dess har användningen av AI inom hästaveln, framförallt svenska halvblod och varmblodiga travare, successivt ökat. Andel AI av totalt antal betäckta ston var år 2009 97 % för varmblodiga travare (STC) och 94 % för svenska halvblod (ASVH). Kyld transportsperma används i störst utsträckning, medan användningen av fryst sperma är mer sparsam (Söderquist, 2004). Flera studier visar att den ökade användningen av transportsperma inom hästaveln har skett på bekostnad av sämre dräktighetsresultat (Demick *et al.*, 1976, Dahlsten, 2006).

För att erhålla transportsperma måste de samlade ejakulaten spädas med spädningsvätska innehållande energisubstrat (mjölkproteiner eller äggula), antibiotika och antimykotika. Det är allmänt vedertaget att seminalplasma skadar spermerna under förvaring, för att minska denna process späds sperman ut med spädningsvätska. För att minska metabolismen hos den utspädda sperman kyls den långsamt ned till ca +5°C. Transportsperman packas i emballage som bevarar temperaturen och skickas till seminestationen, där insemination bör ske inom 12 h (Söderquist, 2004).

Fördelarna med kyld sperma är många till exempel förhindrande av smittspridning, effektivare användning av sperman (ett ejakulat delas upp i flera doser) och möjlighet till bättre kontroll av spermakvaliteten på stuterier (Söderquist, 2004). Samtidigt som användningen av transportsperma ökat har fölningsprocenten minskat (Demick *et al.*, 1976, Dahlsten, 2006). I en pilotstudie från 2006 undersöktes bland annat skillnaden i dräktighetsprocent mellan färsk och kyld sperma. Resultaten från studien visade att dräktighetsprocenten per brunst för kyld sperma var 53,9%, medan den var 65,6% för färsk sperma (Dahlsten, 2006). En anledning till skillnaden är att alla hingstar inte har förmågan att producera sperma lämpat för kylning. Ett annat problem är att tiden för inseminering relativt till ägglossning inte alltid blir optimal med kyld transportsperma (Loomis, 2001). Kraven på spermakvaliteten ökar med ökad användning av transportsperma för att uppnå det bästa dräktighetsresultatet. Eftersom dagens hästar inte är avlade efter reproduktionsförmåga utan efter prestationsförmåga är det extra viktigt att kunna utvärdera spermernas kvalitet.

Förvaring av hingstsperma i kylt tillstånd (transportsperma) är mycket känslig och fertiliseringsperioden är kort. För transportsperma i Sverige är intervallet från samling till insemination minst 15 timmar men oftast ett dygn (Söderquist, 2004). Den främsta orsaken till känsligheten är bildning av reaktiva syreföreningar som påverkar spermernas membranintegritet negativt (Alvarez *et al.*, 1987, Griveau *et al.*, 1995). Det har länge varit känt att oxidativ stress påverkar spermernas normala funktioner (Aitken, 1995). Kommande avsnitt tar upp reaktiva syreföreningar samt deras positiva och negativa påverkan på spermier.

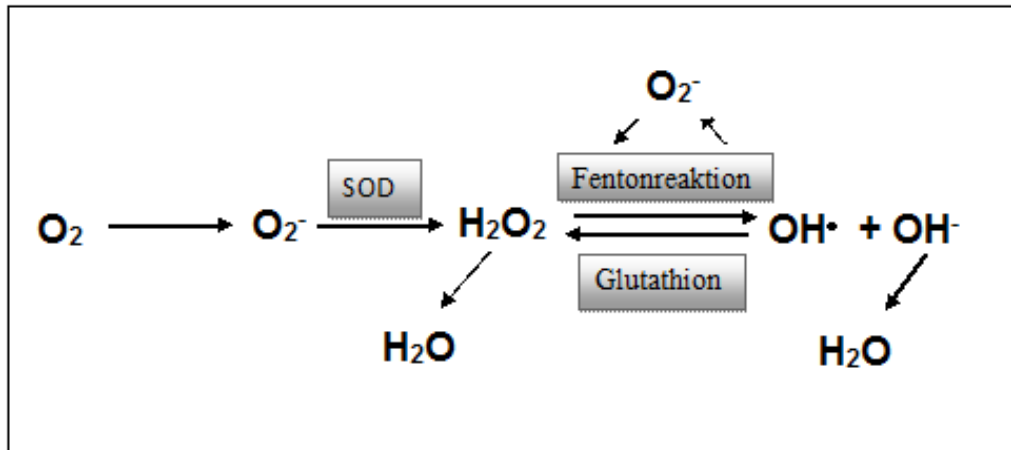
För att bedöma spermakvaliteten hos hingst finns flera olika metoder, både kvantitativa och kvalitativa. Vanliga parametrar som används är koncentration, spermimorfologi samt total och progressiv motilitet. På senare tid har det publicerats studier gjorda på kromatinstabilitet som också kan vara till hjälp för spermabedömningen, det måste dock finnas tillgång till flödescytometer vid dessa analyser (Hammar, 2007). Felaktigheter i spermiernas kromatin kan leda till misslyckad befruktning eller felaktig embryoutveckling. Vid oxidativ stress bildas stora mängder reaktiva syreföreningar som i sin tur kan skada DNAt (Halliwell & Gutteridge, 1989). Därför är det viktigt att bedöma kromatinstabilitet samtidigt som man utvärderar produktion av reaktiva syreföreningar.

LITTERATURÖVERSIKT

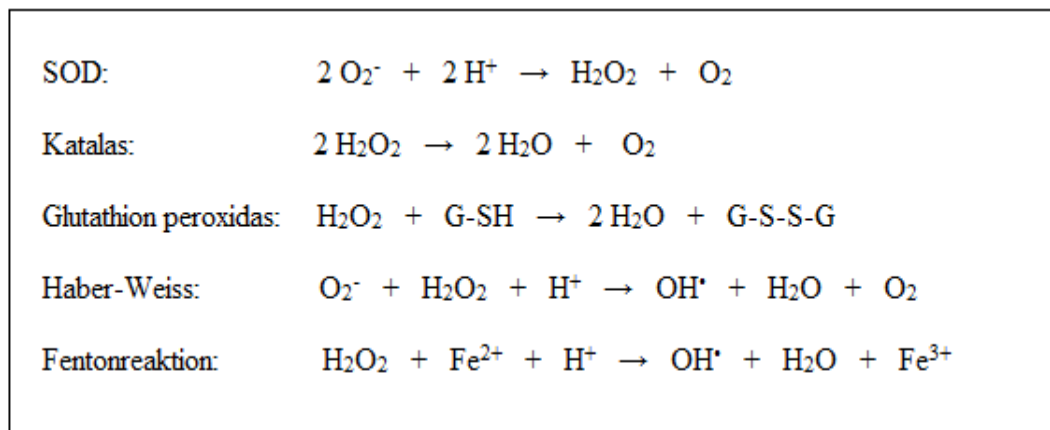
Fria radikaler och reaktiva syreföreningar

Alla levande celler i aeroba miljöer är beroende av syre samtidigt som metabolismen av syre är skadligt på grund av bildning av fria syreradikaler. Balansen mellan fria radikalens produktion och nedbrytning i en vävnad kallas oxidativ stress (Baumber *et al.*, 2000). Definitionen av en fri radikal enligt Halliwell och Gutteridge (1989) är ett oberoende komplex innehållande en eller flera oparade elektroner, vilket gör de fria radikalerna extremt reaktiva. De flesta fria radikaler är reaktiva syreföreningar. Enligt definitionen ovan är inte heller alla reaktiva syreföreningar fria radikaler. I litteraturen hänförs de reaktiva syreföreningarna till reactive oxygen species (ROS). Exempel på ROS är väteperoxid (H_2O_2), superoxid (O_2^-) och hydroxylradikal (OH^\cdot). I låg koncentration är ROS involverade i cellernas fysiologiska signalsystem, medan större mängder orsakar skador på RNA, DNA och initierar apoptos. (Halliwell & Gutteridge, 1989)

I de flesta aeroba celler kommer superoxid framför allt från mitokondriernas elektrontransportkedja och endoplasmatiska retiklet. För att kunna generera energi till att driva ATP-syntesen oxiderar mitokondrierna bland annat NADH i elektrontransportkedjan. Superoxid bildas när elektronläckage sker från olika komponenter i kedjan och då främst vid oxidering av NADH (Halliwell & Gutteridge, 1989). Superoxid har låg reaktivitet i levande celler (Bileski *et al.*, 1983), kort halveringstid och passerar i de flesta fall inte cellmembran (Halliwell & Gutteridge, 1989). När superoxid har bildats kan enzymatisk dismutation (superoxid dismutas, SOD) eller spontan omvandling till väteperoxid ske (Floreani *et al.*, 2002, de Lamirande & Gagnon, 1992). Figur 1 (modifierad från Myers & McGavin, 2007) visar en förenklad översikt på ROS bildning och figur 2 visar de exakta reaktionerna som är involverade i generation och omhändertagande av ROS.



Figur 1. Bildning av reaktiva syreföreningar sker i cellernas mitokondrier, plasmamembran, peroxisomer, cytosol och endoplasmatiska retiklet. Vid elektronläckage från elektrotransportkedjan bildas superoxid (O_2^-), därefter kan omvandling till väteperoxid (H_2O_2) ske via superoxid dismutas (SOD). Superoxid katalyserar fentonreaktionen som bildar hydroxylradikal (OH^\bullet) från väteperoxid. Glutathion peroxidase oskadliggör hydroxylradikalen genom omvandling till väteperoxid, som i sin tur kan övergå till vatten via katalas (Myers & McGavin, 2007).



Figur 2. Superoxid dismutas (SOD), glutathion peroxidase och katalas är de främsta antioxiderande systemen. SOD tar hand om superoxid (O_2^-), men om mängd O_2^- överstiger SODs kapacitet initieras Haber-Weiss reaktion och hydroxylradikaler (OH^\bullet) bildas. OH^\bullet kan även bildas genom fentonreaktion, som katalyseras av O_2^- . Oskadliggörande av OH^\bullet sker via glutathion reaktion där reducerat glutathion (GSH) reagerar med OH^\bullet och H_2O_2 via glutathion peroxidase och bildar vatten samt oxiderat glutathion (GSSG). Glutathion reductas återskapar GSH från GSSH (Myers & McGavin, 2007, Halliwell & Gutteridge, 1989).

Väteperoxid agerar som ett oxiderande ämne och har förmåga att inaktivera vissa enzymer samt har antibakteriella egenskaper. Bildning av väteperoxid stimuleras i närvaro av leukocyter för att understödja det mikrobiella skyddet (Halliwell & Gutteridge, 1989). Syreföreningen är högtoxiskt även i mindre doser (de Lamirande & Gagnon, 1995). Om höga nivåer väteperoxid bildas sker inhibition av glykolysen och därefter eventuell ATP-förbrukning. Neutralisation av väteperoxid sker med hjälp av katalas samt peroxider som glutathionperoxidase (se figur 2). Peroxider förekommer i flera subcellulära komponenter som mitokondrier och kärnan, medan katalas finns i cytoplasma och peroxisomer

(Weydert & Cullen, 2010). Eftersom väteperoxid är oladdat underlättar det passage genom cellmembran. Inne i celler kan väteperoxid reagera med tvåvärt järn (Fentonreaktionen) och generera den extremt reaktiva hydroxylradikalen. Den syre-syre bindning som finns i väteperoxid är svag vilket underlättar bildning av hydroxylradikal vid närvaro av energi (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Hydroxylradikalen är den mest reaktiva radikalen och attackerar de flesta ämnena så fort radikalen bildats. Hydroxylradikaler kan reagera direkt med DNA, men den måste ha bildats i direkt närhet till nukleinsyran om den ska kunna skadas direkt (Marnett, 2000). Sekundära radikaler med olika reaktivitet skapas vid attackerna. Det är mycket svårt att undersöka och mäta halter av radikalen på grund av dess höga reaktivitet. Vid joniserande strålning bildas hydroxylradikaler från vatten och som är ansvariga för mycket av skadan på DNA som uppstår vid strålning (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Spermier och ROS

Spermien består av tre huvuddelar; huvud, mittstycke och svans. I huvudet finns cellkärnan, små mängder cytoplasma och akrosomen, som innehåller de viktiga enzymer som krävs för att spermien ska kunna penetrera äggets zona pellucida. Mittstyckets mitokondrier förser spermier med energi. Liksom alla cellmembran innehåller spermiers plasmamembran fettsyror (fosfolipider, kolesterol, glykolipider). Kompositionen av fettsyror varierar mellan olika däggdjur (Gadella *et al.*, 2001). Spermiers plasmamembran har en hög halt fleromättade fettsyror och begränsade reparationsmekanismer (Aitken & Clarkson, 1987), som medför att spermier löper högre risk att skadas av oxidativ stress (Bileski *et al.*, 1983, Halliwell & Gutteridge, 1989).

Spermien och dess rörelse (Gadella *et al.*, 2001) bildar låga intracellulära nivåer av superoxid och väteperoxid (Gadella *et al.*, 2001), vilka bidrar till spermiers signalöverföring vid bland annat normal kapacitering (Baumber *et al.*, 2000, de Lamirande *et al.*, 1997, Baumber, 2003). Bildningen av ROS sker främst i plasmamembranen (Aitken & Clarkson, 1987, Aitken *et al.*, 1989), men låga nivåer produceras även i mitokondrierna (Koppers *et al.*, 2008, Sabeur & Ball, 2006). Det finns membranbundet NADPH oxidas, som bildar superoxid från NADPH (Sabeur & Ball, 2006, Aitken & Clarkson, 1987, Aitken *et al.*, 1989).

De tre enzymen superoxid dismutas (SOD) (Alvarez *et al.*, 1987), glutathion peroxidas (Li, 1975) och katalas (Jeulin *et al.*, 1989) finns i seminalplasma och skyddar spermier från ROS aktivitet (för reaktionsformler se figur 2). Speciellt har man hittat höga halter SOD i seminalplasma hos hingstar (Aurich *et al.*, 1997). Dessutom finns det ett flertal andra ämnen med antioxiderande effekt t.ex. askorbinsyra (Baumber *et al.*, 2000).

En av mekanismerna bakom minskad befruktningsevne hos spermier efter förvaring är aktivitet från lipidperoxider (Alvarez *et al.*, 1987, Griveau *et al.*, 1995, Ortega Ferrusola *et al.*, 2009). Oxidativ degradering av fleromättade

fettsyror i cellmembran kallas för lipidperoxidation. Det uppstår när fria radikaler fångar elektroner från fetterna i cellmembranet och därmed påverkas membranfunktionen. Hydroxylradikaler reagerar med vätemolekyler från fettsyrornas metylengrupper (-CH₂-). Resultatet blir bildning av vatten och instabila fettsyre-radikaler, som leder till en kedjereaktion i membranen (Halliwell & Gutteridge, 1989). De instabila spermimembranen leder till förlorad membranintegritet och därmed minskad spermiefunktion och spermimotilitet (Alvarez *et al.*, 1987, Griveau *et al.*, 1995). Enligt studier på humansperma är SOD det enzym som spelar störst roll i skyddet mot lipidperoxidation och är kopplat till när spermier förlorar sin motilitet (Alvarez *et al.*, 1987). När mängden superoxid överstiger SODs kapacitet att omvandla superoxid till väteperoxid bildas hydroxylradikaler genom Haber-Weiss reaktionen (se figur 2) (Aitken *et al.* 1989). Även bestämda koncentrationer askorbinsyra kan ha hämmande effekt på peroxidation under förvaring (Aurich *et al.*, 1997).

I livmodern kommer spermier i kontakt med ROS och utsätts för oxidativ stress under sin förflyttning mot oocyten (Gadella *et al.*, 2001). Mild lipidperoxidation gynnar kapacitering genom stimulering av cAMP-beroende protein kinas och tyrosinkinaser (Leclerc *et al.*, 1997). Kapaciterade spermier har ett mycket instabilt plasmamembran, vilket gör dem mycket känsliga för miljöförändringar. Om temperaturen sänks från 38 grader till 30 grader kan den kapaciterade spermien genomgå spontan akrosomreaktion (Gadella *et al.*, 2001). I samband med lipidperoxidation induceras även hyperaktivering hos spermier (de Lamirande & Gagnon, 1995).

Väteperoxid förorsakar mer direkta cytotoxiska skador på spermier jämfört med superoxid (Griveau *et al.*, 1995, Baumber *et al.*, 2000, Awda *et al.*, 2009). I studien av Baumber *et al.* (2000) tillsattes ROS-inducerare till färsk hingstsperma, vilket resulterade i motilitetsminskning samt ökade nivåerna av superoxid och väteperoxid. Dock kunde ingen detekterbar viabilitetsminskning, minskning av akrosomintegritet eller ökning av lipidperoxidation påvisas (Baumber *et al.*, 2000). Vid tillsatts av katalas motverkades motilitetsminskningen, ingen motsvarande reaktion sågs vid tillsatts av SOD (Baumber *et al.*, 2000, Guthrie & Welch, 2006, Griveau *et al.*, 1995) Resultaten tyder på att väteperoxid är den främsta motilitetshämmaren och att motiliteten är ett mer sensitivt mått på oxidativ stress än lipidperoxidation (Baumber *et al.*, 2000). Lipidperoxidation sker under oxidativ stress och efter det att väteperoxid har påverkat spermier (Griveau *et al.*, 1995). Neild *et al.* (2005) såg liknande resultat som Baumber *et al.* (2000), men upptäckte även att hingstsperma var anmärkningsvärt resistent mot oxidativ stress. Den minskade motiliteten beror troligen på en ROS-inducerad skada i utnyttjandet av ATP eller i spermiesvansens kontraktilla apparat (Guthrie *et al.*, 2008).

Färger som kan användas för att studera ROS

I försök för att studera ROS kan färger med fluorescerande egenskaper användas och som sedan kan avläsas i flödescytometer. Färgerna som användes för att undersöka viabilitet var SYBR-14 och propidiumjodid (Garner & Johnson, 1995). För att kontrollera förekomst av reaktiva specifika syreföreningar och viabilitet användes hydroethidine, divätedichlorofluoresceindiacetat (Guthrie & Welch, 2006) och Hoechst 33258 (Garner & Johnson, 1995, Garner *et al.*, 1994). Hoechst 33258 användes för att utvärdera viabilitet i ROS proverna eftersom både hydroethidine och propidiumjodid fluorescerar med röd färg och därför skulle störa varandra i analyserna.

SYBR-14/Propidiumjodid

SYBR-14 Green är ett färgämne som tränger in genom intakt cellmembran och binder till cellens DNA. När färgämnet binder till DNA kan detta upptäckas genom att komplexet avger ett fluorescerande grönt ljus (Garner & Johnson, 1995, Garner *et al.*, 1994). För att kunna detektera döende och döda celler användes propidiumjodid (PI). PI binder till DNA, men endast hos celler som har förlorat membranintegritet. När dessa celler utsätts för synligt ljus avges fluorescerande rött ljus. (Garner *et al.*, 1994). Vilka celler och hur de färgas in visas i tabell 1 nedanför, uppgifterna är hämtade från Garner & Johnson (1995).

Tabell 1. Vilka celler som färgas in med SYBR-14 och PI

	Färgning	
	SYBR-14	PI
Levande spermier	+	-
Döende spermier	+	+
Döda spermier	-	+

Hoechst 33258

Hoechst 33258 är en bisbenzimid (Garner *et al.*, 1994) som specifikt binder till DNA och speciellt till de segment som innehåller flera AT-baspar (Bazhulina *et al.*, 2009). Färgningen används för att utvärdera viabilitet och DNA innehåll i spermerna. Hoechst 33258 tränger in i celler med skadat cellmembran, men kan även komma in i celler med intakt cellmembran i låg grad (de Leeuw *et al.*, 1991). Då Hoechst 33258 stimuleras med ultraviolett ljus kommer en fluorescens med blått ljus att avges (Garner *et al.*, 1994, Bazhulina *et al.*, 2009, de Leeuw *et al.*, 1991). Försök har tidigare gjorts för att jämföra antal celler färgade av Hoechst 33258 och propidiumjodid i sperma. Pintado *et al* 2000 kom fram till att PI färgade in fler celler än Hoechst i galt och tjursperma. Dock har det inte varit signifikant skillnad mellan de båda färgerna i undersökning av kyld hingstsperma (Papaioannou *et al.*, 1997).

Hydroethidine

Hydroethidine (HE) används för att detektera superoxid i celler. HE är ett ämne som har fri permeabilitet in i celler. När HE kommer i kontakt med superoxid oxideras HE till ethidium, som ger en DNA-bindande fluorofor (Benov *et al.*, 1998). Ethidium kommer att fluorescera med rött ljus (Zhao *et al.*, 2003). HE har visat sig vara ett bra mått på superoxidproduktion i spermier enligt Burnaugh *et al.* (2007). Benhov *et al.* (1998) rekommenderar att HE endast ska användas som ett kvalitativt mått på halten superoxid eftersom HE kan katalysera dismutation av superoxid.

Divätedichlorofluorescindiacetat

Divätedichlorofluorescindiacetat (H₂DCHF₂DA) används för att detektera de intracellulära halterna av reaktiva syreföreningar och då främst väteperoxid. DCHF₂DA är lipofil och korsar cellmembran genom passiv diffusion. Med hjälp av intracellulära esteraser klyvs acetatgruppen och DCHF fångas inne i cellerna. Om det förekommer väteperoxid i cellerna kommer DCHF att oxideras till DCF, som är starkt fluorescerande med grön färg. Styrkan på fluorescensen bestäms av hur mycket väteperoxid som finns i cellerna (Loetchuntinat *et al.*, 2005, Bass *et al.*, 1983).

Ämnen som inducerar produktion av fria syreradikaler

I de flesta studier som gjorts på ROS används ämnen som inducerar processen, för att undersöka hur cellerna påverkas av ökad halt radikaler. Denna typ av ämnen används även för att undersöka om spermier verkligen kan producera ROS. Det finns flera olika ämnen som har använts för att framkalla bildning av ROS. I denna studie användes menadione (2-metyl-1,4-naphthoquinone). Kinon ingår i menadione och är det huvudsakliga ämnet som genererar fria radikaler. Det finns flera olika reduktionsenzymer bl.a. i mitokondrierna som metaboliserar kinoner. När kinon genomgår en elektronreduktion bildas en ostabil molekyl som går in i en redoxcykel i närvaro av molekylärt syre (Criddle *et al.*, 2006). Resultatet blir en bildning av fria radikaler och då främst superoxid. Superoxid kan spontant eller enzymatiskt omvandlas till väteperoxid i mitokondriemetabolismen (Floreani *et al.*, 2002).

SYFTE MED STUDIEN

Kvalitetsskillnaden mellan färsk sperma och transportsperma kan till en del vara att spermerna utsätts för oxidativ stress under kylning och förvaring. Morrell *et al.* (2007) visade att både morfologi och kromatinstruktur är viktiga parametrar för att kunna förutspå hingstars fertilitet. Som tidigare nämnts har hög förekomst av reaktiva syreföreningar inverkan på kromatinstruktur och morfologi (akromsomedefekter och akromsommel). Även motilitet berörs av höga ROS halter genom att påverka membranstabiliteten via lipidperoxidation (Alvarez *et al.*, 1987, Griveau *et al.*, 1995). Syftet med studien var att undersöka förekomst av reaktiva syreföreningar i transportsperma 24 h efter samling och sätta det i relation till

kromatinstabilitet, viabilitet, morfologi, motilitet samt dräktighetsresultat. Hur halten reaktiva syreföreningar varierar mellan olika hingstar ingick också i studien. Det finns inga studier gjorda på kyld transportsperma om ROS-produktion varierar mellan hingstar, men har däremot utförts på fryst hingstsperma (Ortega Ferrusola *et al*, 2009).

MATERIAL OCH METODER

Transportsperma skickades från Flyinge till Uppsala och analyserades inom 24 timmar efter spermasamling. Flödescytometrianalyserna utfördes på Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi SLU Uppsala, medan övriga analyser utfördes på Institutionen för kliniska vetenskaper avd för reproduktion SLU Uppsala.

Hingstmaterial

I studien ingick 15 avelsgodkända hingstar stationerade på Flyinge. Av dessa var 14 av halvblodstyp och en av ponnytyp. Åldern på hingstarna varierade mellan 3 och 26 år. Varje hingst samlades 3 gånger, vilket sammanlagt gav 45 prover. Provtagningen pågick tre veckor i slutet av april och början av maj 2010. Ejakulaten samlades med artificiell vagina (Missouri eller Colorado beroende på vilken som fungerade bäst för hingsten) och som efter koncentrations- och motilitetsbedömning späddes med INRA96 till transportdoser innehållande totalt en miljard progressivt motila spermier per dos.

Laboratorieanalys av viabilitet och ROS

Utförandet gjordes i två steg. Först preparerades prov som skulle komma att utgöra grunden till analyserna. 500 µl transportsperma från vardera hingst mättes upp i provrör och 2500 µl Cellwash tillsattes. Proven centrifugerades i 400 x g 10 minuter i 20 °C . Supernatanten togs bort och 500 µl cellwash tillsattes på nytt i samtliga provrör. Spermieblandningen anges nedan som grundprovet.

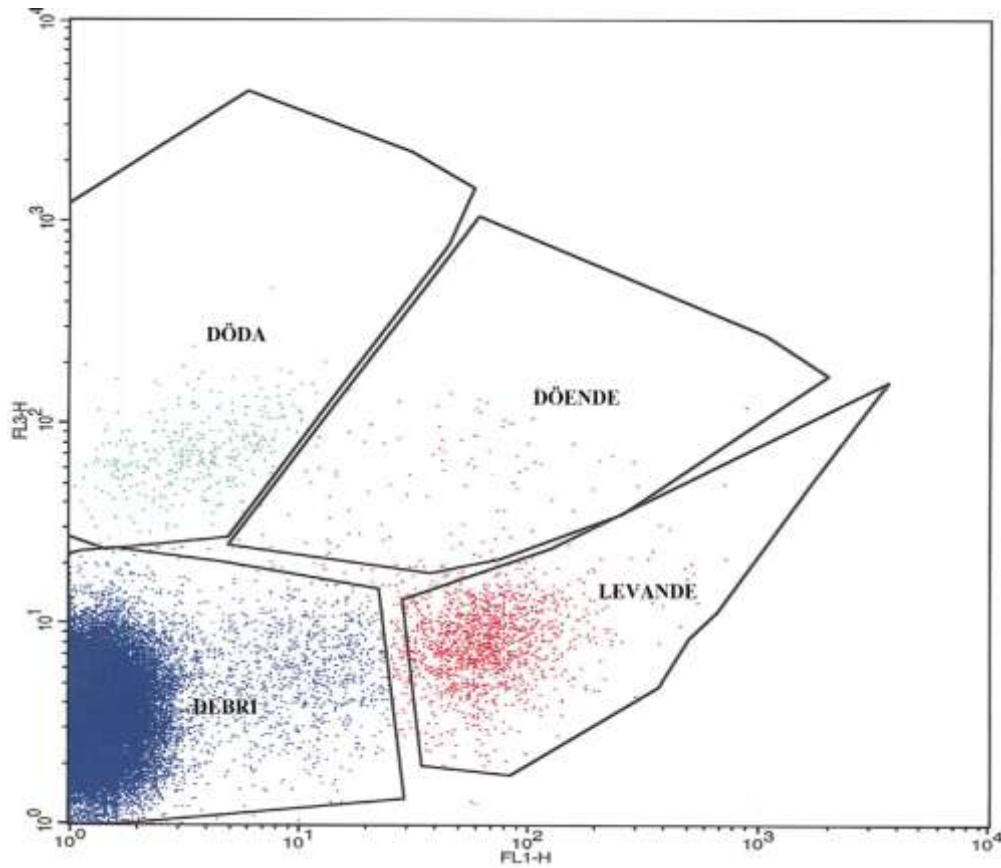
30 µl från grundprovet tillsattes till 270 µl cellwash. För varje hingst tillreddes 3 provrör med olika kombinationer av färger enligt tabell 2. I prov 1 utvärderades endast viabilitet med tillsats av SYBR-14 och Propidiumjodid (Live/Dead® Sperm Viability Kit L-7011; Invitrogen™, Inc., Eugene, OR, USA). SYBR-14 späddes 1:50 i cellwash till en slutkoncentration på 0,4 µM. För detektion av ROS tillsattes Hydroethidine (Invitrogen™, Inc., Eugene, OR, USA) och Divätedichlorofluoresceindiacetat (Invitrogen) i prov 2 och 3. Hoechst 33258 (Invitrogen) användes i ROS proverna för att utvärdera viabiliteten. Induceraren Menadione (Sigma-Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) tillsattes till prov 3.

Tabell 2. Schema över alla tillsatsers koncentrationer(konc) och mängder. Slutkoncentrationen anges för PI, HE, DCFDA, Hoechst 33258, menadione och SYBR-14.

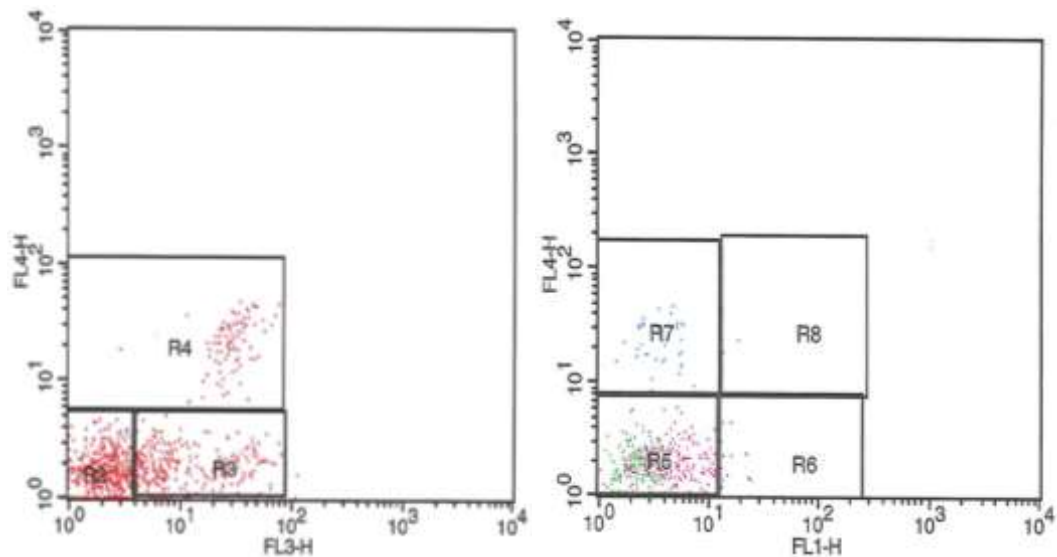
	Tillsats	Konc	Mängd
Prov 1 (Viabilitet)	SYBR-14	0,4 µM	0,6 µl
	PI	24 µM	3 µl
Prov 2 (ROS)	Hoechst 33258	1,2 µM	9 µl
	HE	1,2 µM	9 µl
	DCFDA	60 µM	9 µl
Prov 3 (Inducerad ROS)	Hoechst 33258	1,2 µM	9 µl
	HE	1,2 µM	9 µl
	DCFDA	60 µM	9 µl
	Menadione	200 µM	3 µl

Prov 1 inkuberas 10 min i 37° C. Prov 2 och 3 inkuberas 30 min i 37° C. Grundproven sattes 2 timmar i 37° C, därefter preparerades 2h-proverna på samma sätt som 0h-proverna. Proverna anges i resultaten som 0 och 2 timmars prov.

Efter inkubering analyserades proverna i LSR flödescytometer med standardoptik från BDBiosciences (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Flödescytometern detekterade de fluorescerande spermier och bearbetning av data gjordes med programmet CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Med hjälp av ljusspridningsegenskaper (forward scatter och side scatter) kunde cellernas debris urskiljas. I viabilitetsproverna räknades 50 000 events (spermier) och i ROS-proverna räknades spermier under 90 sekunder. Resultaten presenteras i diagram med punkter, där en enskild spermie representeras av en punkt. I prov 1 delades resultatet in i levande (SYBR+/PI-), döende (SYBR+/PI+) och döda (SYBR-/PI+) spermier. Figur 3 visar ett exempel på ett diagram med SYBR/PI färgade celler. Resultatet från prov 2 och 3 delades in ROS- (HE-/DCFDA-), ROS+ (HE+/-/D+/-), ROS döda (Hoechst+/HE+/-/D+/-), levande ej H₂O₂ (Hoechst-/DCFDA-), levande H₂O₂ (Hoechst-/DCFDA+), döda ej H₂O₂ (Hoechst+/DCFDA-) och döda H₂O₂ (Hoechst+/DCFDA+). Resultaten från prov 3 gavs tilläggsbokstaven M (menadione). Exempel på hur diagram för ROS och väteperoxidproverna såg ut visas i figur 4.



Figur 3. Resultatet från SYBR-14/PI presenterades i CellQuest som ovanstående figur. Resultatet visade procentsats av antalet räknande spermier och delades in SYBR Levande, SYBR Döda och SYBR Döende.



Figur 4. Resultatet från ROS proverna presenterades som ovanstående figurer. R2 (ROS-), R3 (ROS+), R4 (ROS Döda), R5 (Hoechst-/DCFDA-), R6 (Hoechst-/DCFDA+), R7 (Hoechst+/DCFDA-) och R8 (Hoechst+/DCFDA+).

Koncentration, motilitet, morfologi och kromatinstabilitet

Alla transportspermadoser undersöktes med avseende på koncentration, kromatinstabilitet och motilitet utom morfologin där endast ett prov från varje hingst utvärderades. Bestämning av koncentration och motilitet utfördes av Jane Morrell, SLU Uppsala, avd för reproduktion. Kromatinanalyser genomfördes av Anders Johannisson och Jane Morrell på Inst. för anatomi, fysiologi och biokemi, SLU Uppsala. Morfologiundersökning gjordes av personalen på Spermalaboratoriet, SLU Uppsala. Nucleocounter SP-100 (Chemometec, Denmark) användes för bestämning av koncentration. 50 µl från varje spermados tillsattes till 5 ml S100 (reagent), blandningen kördes i en kassett med propidiumjodid. Totalantalet celler detekterades med hjälp av en fluorescensdetektor (Morrell *et al*, 2010). För att bestämma total motilitet (%) och progressiv motilitet (%) användes QualispermTM (Biophos AG, Switzerland) (Morrell *et al*, 2009b). Kromatinstabilitet mättes med Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), som med hjälp av flödescytometri analyserar andel spermier med intakt kromatin. Celler med intakt DNA fluorescerar med grön färg samtidigt som celler med skadat DNA fluorescerar rött. Hur många procent av spermierna som har skadat DNA anges som DFI (DNA Fragmentation Index). Resultatet presenterades i % DFI, Mean_DFI, CV (Coefficient of variation) och SD_DFI (standardavvikelsen av DFI). Morfologin bestämdes med hjälp av ett fixerat utstryk i formalin-saltlösning samt ett ofixerat prov med Williams färgning (Morrell *et al*, 2009a). Morfologireultatet presenterades i andel normala spermier samt vilka defekter som förekom i procent.

Dräktighetsresultat

Den sammanlagda dräktighetsprocenten från hela betäckningssäsongen 2010 erhöles från Flyinge AB hösten 2010. Det var inte möjligt att få dräktighetsresultat med hänsyn till vilken betäckningsmetod som användes. Tillgång fanns endast till hur stor andel av semineringar som utfördes med TAI, fryst AI samt AI.

Statistisk analys

Resultatet från CellQuest överfördes till Microsoft Excelfiler (Microsoft Corporations, USA). Alla siffror som användes i resultaten var procentsatser av det totala antalet räknade spermier i flödescytometern. I Excel räknades även hur stor andel av ROS och H₂O₂ som var positiva ($(\text{ROS} +) / (\text{ROS} - + \text{ROS} +) = \% \text{ROS} +$), liknande beräkningar gjordes med de prover som behandlats med inducerare. Tre prover uteslöts från excelfilerna på grund av kraftigt avvikande resultat eller felaktig hantering. Därför finns endast 2 prover för hingst 4, 11 och 13.

Insamlad data hanterades med hjälp av SAS-programmet (SAS Inst. Inc., Cary, NC). De statistiska analyserna genomfördes med hjälp av variansanalys (PROC MIXED). Den statistiska modellen inkluderade de fixa effekterna av hingst, tid (tid 0h och tid 2h) samt samspelet mellan hingst och tid. Den slumpmässiga

effekten av ejakulat inom hingst inkluderades också i modellen. För variablerna ROS och H₂O₂, analyserades också differensen mellan inducerad produktion och icke inducerad produktion. Korregerade medeltal (LSmeans) beräknades och signifikans för skillnader mellan dessa medeltal skattades med hjälp av t-test. Från det korregerade medeltalet utfördes korrelationsberäkningar (PROC CORR) för att få fram Pearsons korrelationskoefficienter. Samtliga variabler (totalt 58) ingick i korrelationsberäkningarna. Resultat med ett p-värde < 0,05 ansågs vara statistiskt signifikanta.

RESULTAT

Hingstarna har namngivits med siffrorna 1-15. Resultaten presenteras genom att dela in dem i kategorierna; grundreproduktionsparametrar (dräktighetsprocent, motilitet, koncentration, morfologi), kromatinstabilitet, ROS och väteperoxid. Flera av resultaten visas i tabeller där korrelation (r) och signifikans (p) anges. Signifikanser upp till p 0,09 har inkluderats i resultaten om dessa anses relevanta. Om ingen signifikant korrelation finns anges det som NS (non significant) i tabellerna.

Grundreproduktionsparametrar

Det totala dräktighetsresultatet (DR%) från 14 av de provtagna hingstarna återfinns i tabell 3. Då en av hingstarna som provtogs togs ur avel senare på säsongen finns endast dräktighetsresultat för 14 hingstar tillgängligt. Den hingst som togs ur aveln har namngivits med siffran 15. Från alla hingstar, med undantag från hingst nummer 12, hade kyld transportsperma (TAI) använts till över 60 % av de betäckta stona. I tabell 3 återfinns även dräktighetsresultatet med transportsperma (DR% TAI) för alla hingstar med undantag för hingst nummer 15 och 12.

Tabell 3. Dräktighetsresultat från betäckningssäsongen 2010

Hingstnummer	Antal ston	Total DR %	Andel TAI i %	DR% TAI
1	34	76,5	85,3	77,8
2	162	86,4	72,8	87,8
3	63	81	66,7	80
4	38	47,4	71,1	37,5
5	24	83,3	87,5	85
6	90	81,1	76,7	85,7
7	33	81,8	87,9	81,4
8	46	84,8	76,1	85,7
9	14	92,9	71,4	90
10	15	80	86,7	70
11	28	78,6	71,4	77,8
12	10	90	40	-
13	39	76,9	69,2	70,3
14	14	85,7	85,7	90,9

Sambanden mellan total dräktighetsprocent (Tot DR%), dräktighetsprocent transportsperma (DR% TAI), morfologi (Morf), koncentration (konc), total motilitet (Tot mot) och progressiv motilitet (Prog mot) visas i tabell 4. Total dräktighetsprocent hade högst korrelation med progressiv motilitet, $r = 0,58$ ($p < 0,03$). Förhållandet mellan dräktighetsprocenten för transportsperma och motilitet visar statistisk signifikans. Även morfologi var signifikant korrelerad till total dräktighetsprocent.

Tabell 4. Samband mellan grundreproduktionsparametrar

	Tot mot	Prog mot	Konc	Morf	Tot DR %	DR% TAI
Tot mot	1	$r = 0,84$ ($p < 0,0001$)	NS	NS	$r = 0,46$ ($p 0,0996$)	$r = 0,80$ ($p 0,0009$)
Prog mot		1	NS	NS	$r = 0,58$ ($p 0,03$)	$r = 0,77$ ($p 0,002$)
Konc			1	NS	$r = - 0,48$ ($p 0,093$)	NS
Morf				1	$r = 0,53$ ($p 0,05$)	$r = 0,51$ ($p 0,077$)
Tot DR %					1	$r = 0,96$ ($p < 0,0001$)
DR% TAI						1

Stark korrelation sågs mellan motilitetsparametrarna och SYBR Levande (positiv korrelation) samt SYBR Döda (negativ korrelation). I tabell 5 presenteras r och p värden för sambanden.

Tabell 5. Korrelationer mellan viabilitet och motilitet

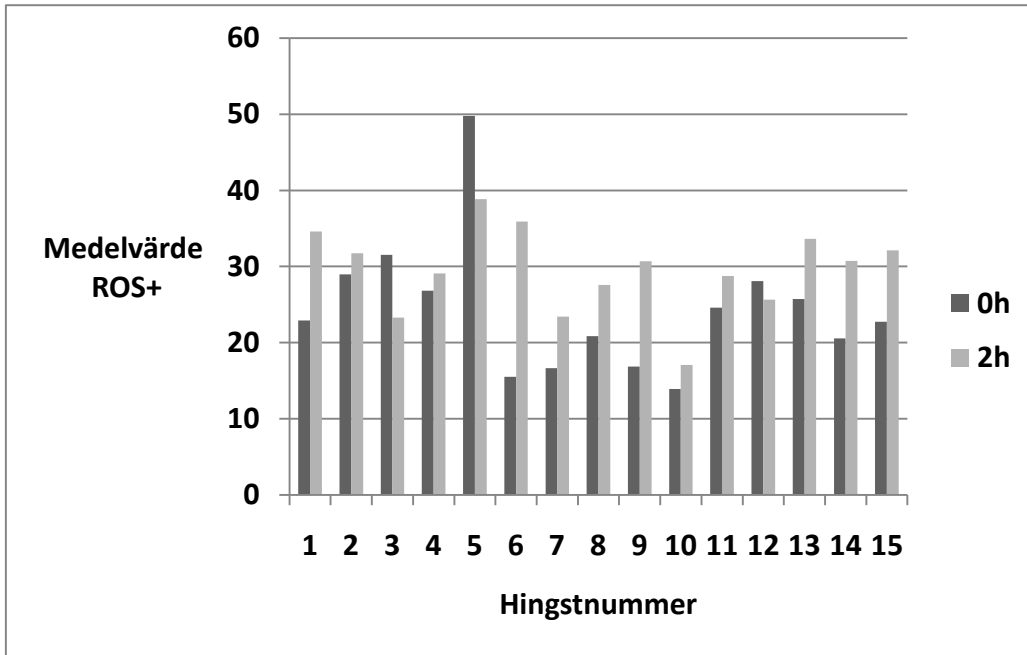
	SYBR Levande	SYBR Döda	SYBR Döende
Tot mot	r = 0,77 (p 0,0008)	r = - 0,81 (p 0,0003)	NS
Prog mot	r = 0,75 (p 0,0015)	r = - 0,71 (p 0,003)	NS

Kromatinstabilitet

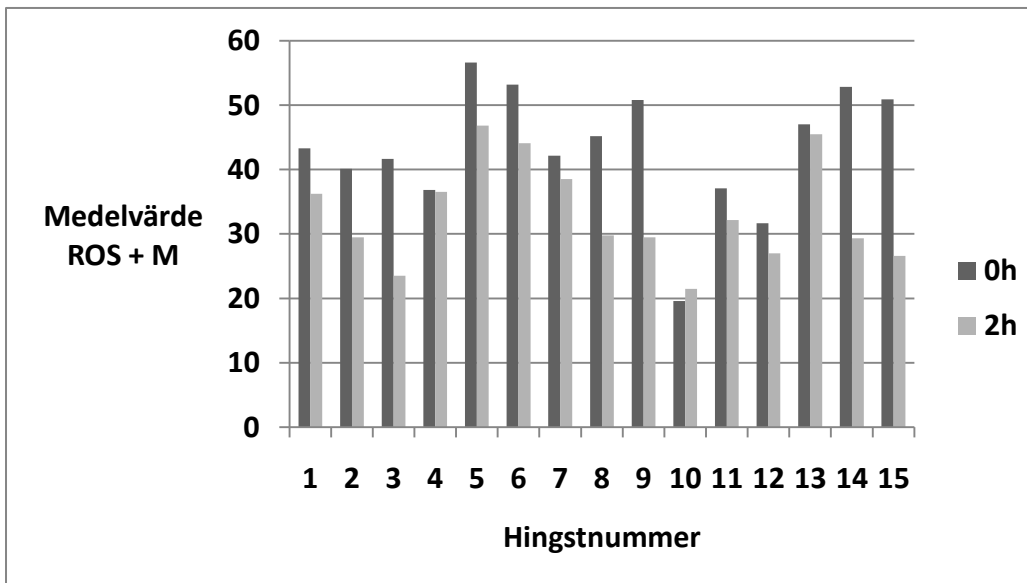
Till korrelationerna användes % DFI, Mean_DFI, SD och CV eftersom parametrarna hade en stark koppling till varandra visas endast korrelationer med % DFI i resultaten. % DFI var starkt kopplat till viabilitetsparametrarna SYBR Levande (negativt korrelation) och SYBR Döda (positiv korrelation). Förhållandet mellan DR% TAI och % DFI var $r = -0,56$ (p 0,045), liknande resultat fanns inte för Tot DR%. Korrelation sågs även mellan % DFI och motilitet, det starkaste sambandet var med total motilitet $r = - 0,669$ (p 0,0064). Jämförelse mellan % DFI och progressiv motilitet var $r = -0,5$ (p 0,058).

ROS

Variationen ROS+ mellan hingstar visas i figur 5. Medelvärdet för alla ROS+ 0h prov var 24,4 motsvarande siffra för 2h var 29,5. Medelvärdet för inducerad ROS + var 43,3 för 0h proven och 33,1 för 2h proven, variationen mellan hingstar ses i figur 6. Alla variabler för grundreproduktion, viabilitet och kromatinstabilitet jämfördes med samtliga ROS parametrar. De variabler som visade korrelationer med signifikans visas i tabell 6. Samband såg främst i 0h proverna, men de korrelationer som sågs i tvåtimmarsproven presenteras i tabell 7. Notera de starka sambanden mellan koncentration och ROS- M samt % ROS + M i 2h-proverna (se tabell 7 för p och r värden).



Figur 5. ROS variation mellan hingstar. Figuren visar skillnaden mellan 0 och 2 timmars proven. Notera hingst nummer 3, 5 och 12 där ROS-produktion är högre vid 0h än vid 2h.



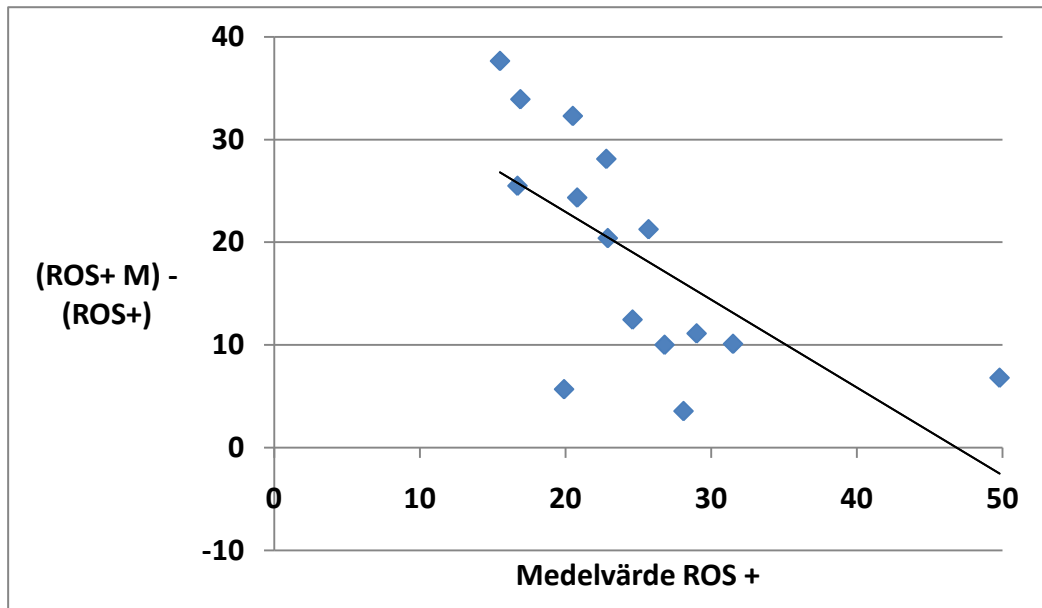
Figur 6. Inducerad ROS variation mellan hingstar. Figuren visar skillnaden mellan 0 och 2 timmars proven.

Tabell 6. Korrelationer gäller för ROS undersökning vid tid 0 h. ROS- och % ROS + är exkluderade i tabellen då inget signifikant samband fanns.

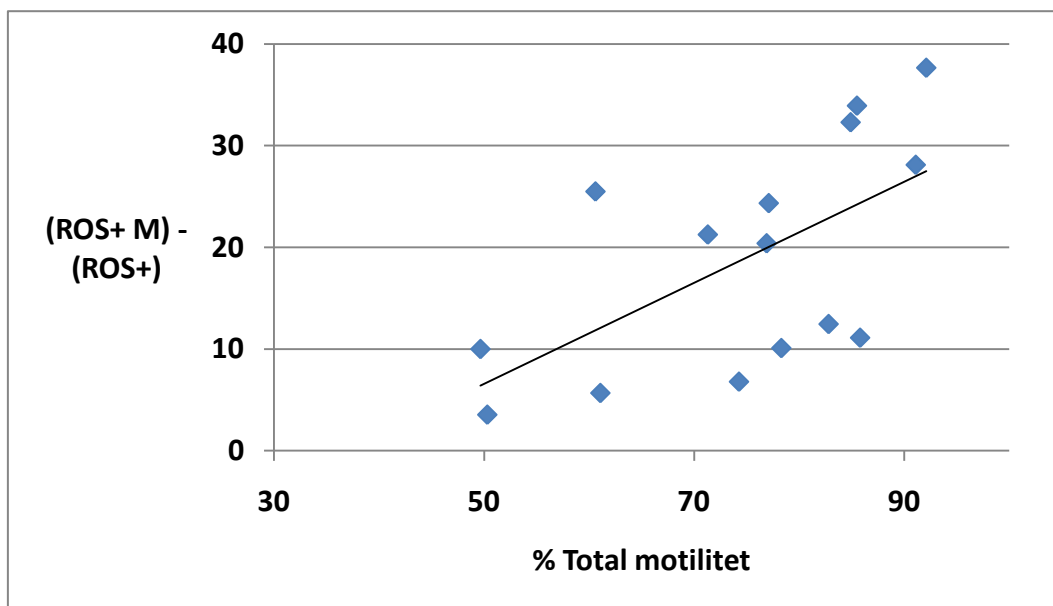
	ROS +	ROS Döda	ROS – M	ROS + M	% ROS + M	ROS Döda M
Tot DR %	NS	r = 0,65 (p 0,009)	NS	r = -0,67 (p 0,006)	r = -0,59 (p 0,02)	r = 0,51 (p 0,05)
DR % TAI	NS	r = -0,53 (p 0,064)	NS	r = 0,485 (p 0,092)	NS	r = -0,51 (p 0,073)
Tot motilitet	NS	r = -0,7 (p 0,004)	NS	r = 0,63 (p 0,012)	r = 0,47 (p 0,07)	r = -0,62 (p 0,01)
Prog motilitet	NS	r = -0,71 (p 0,003)	NS	r = 0,45 (p 0,094)	NS	r = - 0,61 (p 0,015)
Konc	NS	NS	r = 0,57 (p 0,032)	NS	NS	NS

Tabell 7. Korrelation för ROS undersökning vid tid 2 h. ROS- och % ROS + är exkluderade i tabellen då inget signifikant samband fanns.

	ROS +	ROS Döda	ROS – M	ROS + M	% ROS + M	ROS Döda M
Tot DR %	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DR % TAI	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tot motilitet	r = 0,52 (p 0,047)	NS	NS	NS	NS	NS
Prog motilitet	r = 0,49 (p 0,063)	NS	NS	NS	NS	NS
Konc	r = 0,46 (p 0,096)	NS	r = - 0,79 (p 0,0008)	r = 0,0525 (p 0,0537)	r = 0,81 (p 0,0004)	NS



Figur 7. Samband mellan grundproduktionen av ROS och skillnaden i ökning med inducerare (M) vid tid 0h. Punkterna motsvarar varje hingsts korrigerade medelvärde för ROS+ och (ROS+M)-(ROS+). $r = -0,56$ ($p 0,03$).

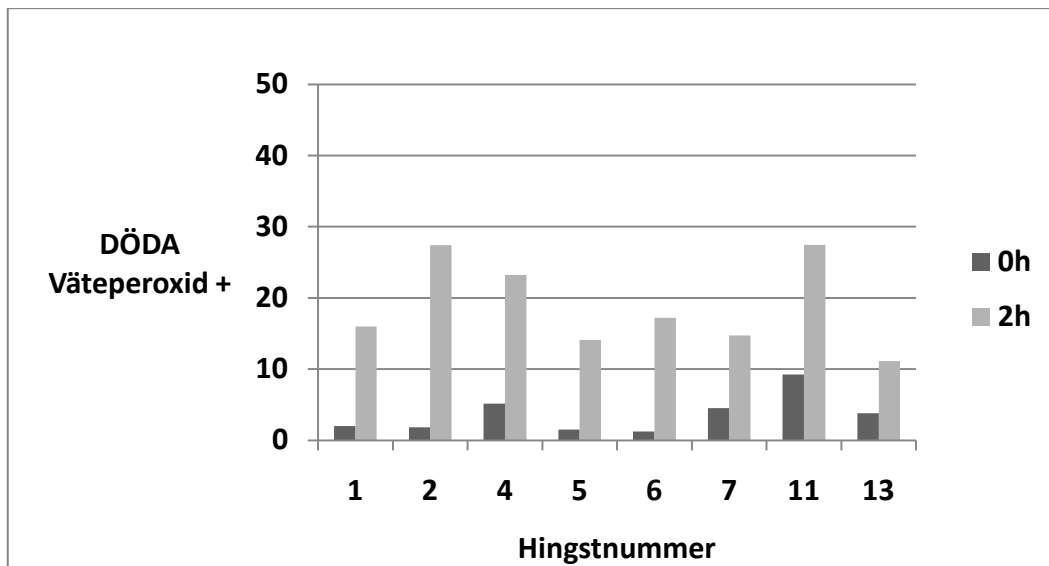


Figur 8. Samband mellan total initial motilitet och skillnaden i ökning av ROS med inducerare (M) vid tid 0h. Punkterna motsvarar varje hingsts korrigerade medelvärde för ROS+ och (ROS+M)-(ROS+). $r = 0,61$ ($p 0,02$). Liknande figur ses om total motilitet byts ut mot progressiv motilitet, dock med mindre positiv korrelation.

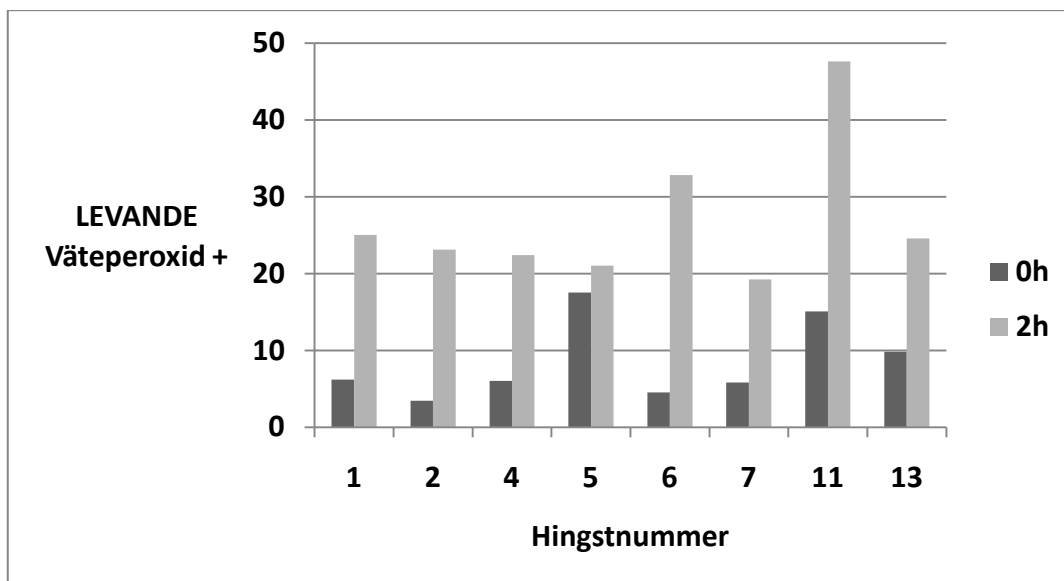
Väteperoxid

Resultatet för väteperoxiden presenterades som levande ej H₂O₂ producerande (Levande H₂O₂ -), levande H₂O₂ producerande (Levande H₂O₂ +), procent levande H₂O₂ producerande (% Levande H₂O₂ +), döda ej H₂O₂ producerande (Döda H₂O₂ -), döda H₂O₂ producerande (Döda H₂O₂ +), procent döda H₂O₂ producerande (% Döda H₂O₂ +) samt parametrar för induktion med menadione (M). I tabell 8 ses

korrelationer mellan väteperoxid och grundreproduktionsparametrar vid tid 0 och i tabell 9 resultaten för 2h proverna. Observera att tydliga samband sågs mellan koncentration och väteperoxid vid 2h och då främst vid tillsatts av menadione.



Figur 9. Skillnaden mellan döda spermier som är väteperoxidproducerande vid tidpunkt 0h och 2h. De åtta hingstar som är representerade i figuren hade värden för Döda H₂O₂ som inte hade en betydlig variation mellan de olika transportspermadoserna, vilket gör dessa medelvärden mest tillförlitliga.



Figur 10. Skillnaden mellan levande spermier som är väteperoxidproducerande vid tidpunkt 0h och 2h. De åtta hingstar som är representerade i figuren hade värden för Levande H₂O₂ som inte hade en betydlig variation mellan de olika transportspermadoserna, vilket gör dessa medelvärden mest tillförlitliga.

Tabell 8. Väteperoxidparametrar jämfört med grundreproduktionsparametrar vid tid 0 h. Har ej tagit med Levande H₂O₂+, % Levande H₂O₂+, Döda H₂O₂+, % Döda H₂O₂ + Döda H₂O₂ - M, % Döda H₂O₂ + M då ingen korrelation fanns.

	Levande H ₂ O ₂ -	Döda H ₂ O ₂ -	Levande H ₂ O ₂ - M	Levande H ₂ O ₂ + M	% Levande H ₂ O ₂ + M	Döda H ₂ O ₂ + M
Tot DR %	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DR % TAI	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tot motilitet	r = 0,59 (p 0,03)	r = -0,52 (p 0,05)	NS	r = 0,66 (p 0,02)	r = 0,71 (p 0,009)	r = - 0,57 (p 0,06)
Prog motilitet	r = 0,59 (p 0,03)	r = - 0,64 (p 0,01)	NS	NS	NS	NS
Konc	NS	NS	r = 0,51 (p 0,08)	r = 0,58 (p 0,06)	r = 0,53 (p 0,09)	NS
Morf	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabell 9. Väteperoxidparametrar jämfört med grundreproduktionsparametrar vid tid 2 h. Har ej tagit med Döda H₂O₂+, % Döda H₂O₂ + och % Döda H₂O₂ + M då inget samband sågs.

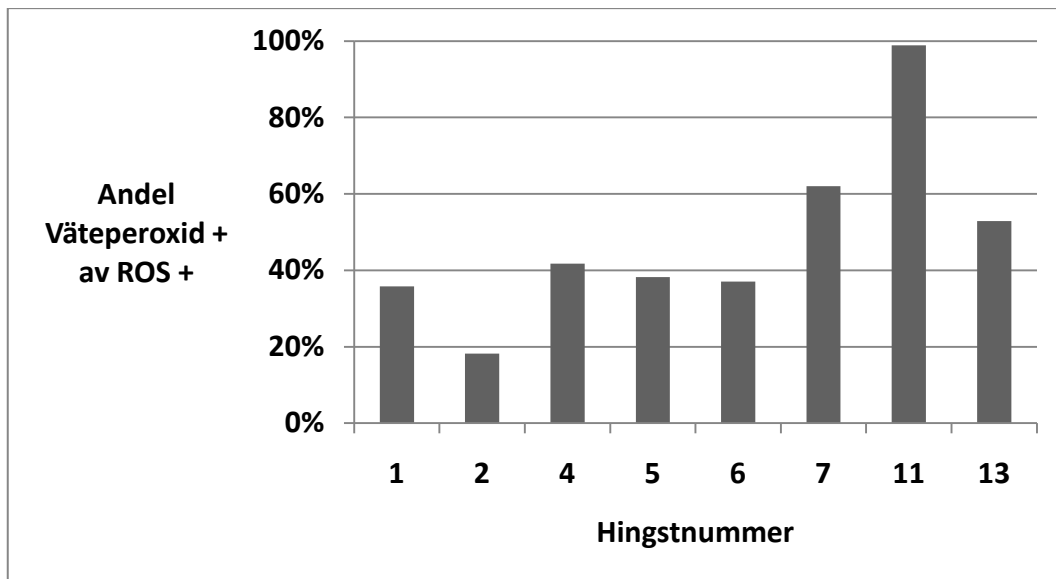
	Levande H ₂ O ₂ -	Levande H ₂ O ₂ +	% Levande H ₂ O ₂ +	Levande H ₂ O ₂ - M	% Levande H ₂ O ₂ + M	Döda H ₂ O ₂ - M	Döda H ₂ O ₂ + M
Tot DR %	NS	NS	NS	NS	r = -0,52 (p 0,056)	r = 0,57 (p 0,087)	r = -0,52 (p 0,086)
DR % TAI	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r = -0,52 (p 0,099)
Tot mot	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Prog mot	NS	NS	NS	NS	NS	r = 0,59 (p 0,072)	NS
Konc	r = - 0,49 (p 0,088)	r = 0,51 (p 0,077)	r = 0,56 (p 0,038)	r = - 0,59 (p 0,025)	r = 0,62 (p 0,017)	NS	NS
Morf	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r = -0,49 (p 0,089)

Tabell 10. Väteperoxidparametrar jämfört med kromatinstabilitetsparametrar vid tid 0. Korrelation för % DFI sågs och anges i tabellen. Har ej tagit med Levande H₂O₂+, % Levande H₂O₂+, Döda H₂O₂+, Döda H₂O₂ - M, % Döda H₂O₂ + M då inget samband sågs.

	Levande H ₂ O ₂ -	Döda H ₂ O ₂ -	Levande H ₂ O ₂ - M	Levande H ₂ O ₂ + M	% Levande H ₂ O ₂ + M	Döda H ₂ O ₂ + M
% DFI	r = - 0, 54 (p 0,04)	NS	NS	r = - 0,60 (p 0,04)	r = - 0,71 (p 0,02)	r = - 0,57 (p 0,06)

Tabell 11. Väteperoxidparametrar jämfört med ROS vid tid 0h.

	Levande H ₂ O ₂ -	Levande H ₂ O ₂ +	Döda H ₂ O ₂ -	Döda H ₂ O ₂ +	Levande H ₂ O ₂ - M	Levande H ₂ O ₂ + M	Döda H ₂ O ₂ + M
ROS -	r = 0,56 (p 0,039)	r = -0,56 (p 0,048)	NS	NS	NS	NS	NS
ROS +	r = 0,64 (p 0,020)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ROS Döda	r = -0,83 (p 0,0003)	NS	r = 0,82 (p 0,0002)	r = 0,60 (p 0,041)	NS	r = -0,64 (p 0,025)	r = 0,74 (p 0,0096)
ROS - M	NS	NS	NS	NS	r = 0,60 (p 0,024)	r = -0,58 (p 0,049)	r = 0,62 (p 0,042)
ROS + M	NS	NS	NS	r = -0,66 (p 0,02)	NS	r = 0,72 (p 0,009)	r = -0,89 (p 0,0002)
ROS Döda M	r = -0,83 (p 0,0003)	NS	r = 0,63 (p 0,012)	r = 0,69 (p 0,013)	NS	r = -0,65 (p 0,021)	r = -0,92 (p <,0001)

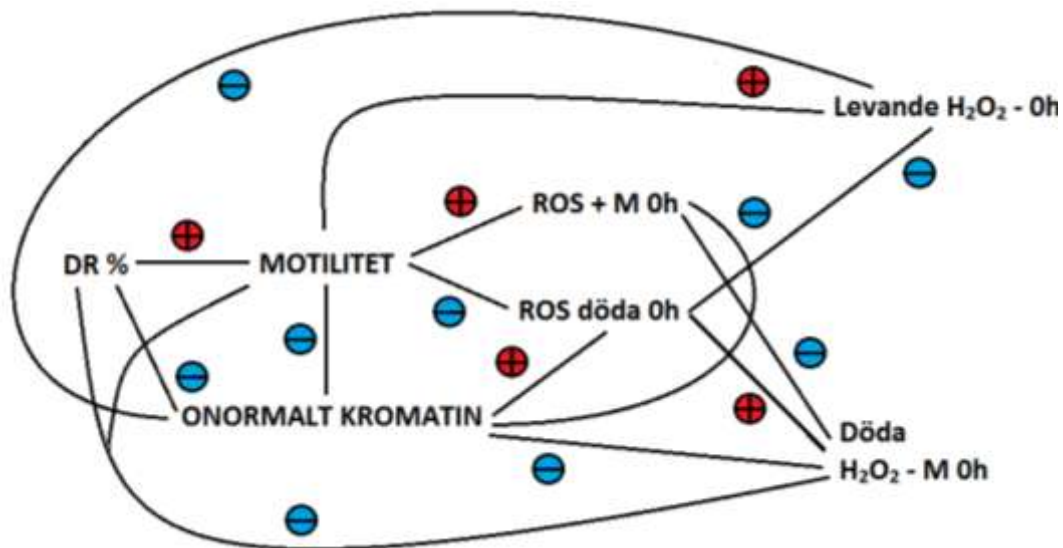


Figur 11. Hur stor andel av ROS som är väteperoxid vid tid 0h visas i figuren. Värdet för väteperoxid togs fram genom att addera parametrarna Döda H_2O_2 + och Levande H_2O_2 +. De åtta hingstar som är representerade i figuren hade värden för Levande H_2O_2 som inte hade en betydlig variation mellan de olika transportspermadoserna, vilket gör dessa medelvärden mest tillförlitliga.

DISKUSSION

De flesta studier som har gjorts på ROS i sperma har utfört på fryst och tinad sperma, trots att de flesta inseminationer görs med transportsperma. Det gör det svårt att hitta liknande studieresultat att jämföra resultatet från denna studie med. I arbetet har korrelationer som inte visat statistisk signifikans tagits med i resultaten för att visa att det finns indikation på samband. Bedömning av spermiekvalitet är mycket komplext och då är det viktigt att även ta hänsyn till analysresultat som inte är statistiskt signifikanta.

Kvaliteten på de olika ejakulaten varierar hos den enskilda hingsten, somliga spermadoser har sämre kvalitet medan andra har bättre. Variationen är del av verkligheten vilket gör det möjligt att inkludera den totala dräktighetsprocenten i studien. Viktigt att ha i åtanke är att stoets dräktighetsförmåga inte bara beror på spermiekvaliteten, utan det är många olika faktorer som spelar in.



Figur 12. Översikt över hur de olika parametrarna är kopplade till varandra, observera att koncentrationen har uteslutit ur figuren.

Figur 12 ger en översikt över de resultat som kom fram under arbetets gång. Att onormalt kromatin och motilitet påverkade dräktighetsresultatet är sedan tidigare känt och det var förväntade resultat. Motiliteten, främst den progressiva motiliteten, är den vanligaste metoden som används för att kvalitetsbedöma sperma. De övriga resultaten samt resultaten för koncentration diskuteras vidare i nedanstående text.

Tanken med att använda induceraren menadione var från början att undersöka spermernas förmåga att bilda ROS och därmed få mer tillförlitliga resultat för grundproduktionen av ROS. Med andra ord om en låg ROS produktion var verkligt låg eller om den var låg för att spermerna inte hade förmåga att producera ROS. Vid tillsats av menadione sågs hos samtliga hingstar, utom hingst nummer 10, att halterna ROS var högre i 0h än i 2h proven (se figur 6). Spermerna är initialt mer mottagliga att induceras till ROS produktion, vid inkubation i 2h är grundproduktionen ROS högre och spermerna har inte förmågan att generera ännu mer ROS vid stimulering. Det är viktigt att tänka på att ROS produktion med induktionshjälp är tidsberoende om man i framtida studier vill studera hur höga ROS halter (med induktionshjälp) påverkar exempelvis motilitet.

Efter hand som korrelationer gjorts har det visats att det finns flera signifikanta samband med parametrar i de inducerade proven medan samma samband inte sågs med de icke inducerade proven. Ett viktigt sådant exempel är det positiva sambandet mellan total motilitet och ROS+ M vid 0h. Det kan finnas flera förklaringar till detta, en är att spermier med hög motilitet har högre metabolism vilken gör dem mer mottagliga till att stimulera ROS produktion. Ytterligare en förklaring som skulle kunna klargöra sambandet är ju högre grundproduktion ROS en spermie har desto mindre ökning av ROS sker med induktion. Omvänt blir det en högre ökning av ROS med inducerare om spermien har låg

grundproduktion av ROS (se figur 5). Desto högre skillnad mellan grundproduktion ROS och inducerad ROS produktion än högre motilitet, vilket visas i figur 6. Låg grundproduktion av ROS vid 0h har positiv inverkan på motiliteten. I tvåtimmarsproven ses inga liknande samband, däremot finns en positiv korrelation mellan motilitet och ROS+. Detta kanske kan bero på att spermier med hög motilitet har hög flagellaktivitet som bildar intracellulära nivåer av ROS (Gadella *et al*, 2001). Spermier utsätts för oxidativ stress under inkubation vilket tillsammans med den fysiologiska intracellulära ROS produktionen vid flagellaktivitet kan ge så höga ROS värden att det ses som ett positivt samband mellan motilitet och ROS+.

Samma tankesätt kan användas till att förklara sambandet det starka sambandet mellan total motilitet och % levande H₂O₂ + med menadione vid 0h (se tabell 8). Det blir däremot lite mer komplicerat när väteperoxidparametrarna ska analyseras eftersom det inte var möjligt att få enbart en väteperoxidhalt så som var möjligt med ROS parametrarna. Det är därför svårt att säga om korrelation med väteperoxidparametrar beror på om det är döda/levande spermier eller väteperoxidhalt. Ett exempel på det är den positiva korrelationen mellan ROS Döda 0h och Döda H₂O₂ – 0h (se tabell 11), där sambandet uppstått eftersom båda innefattar döda spermier. I tabell 10 jämförs kromatinstabilitet med väteperoxid, tabellen är ett bra exempel på svårtolkade resultat. I tabellen ses negativt samband mellan alla möjliga kombinationer inom gruppen väteperoxidparametrar.

De studier som har gjorts på motilitet och inducerad ROS produktion har undersökt motiliteten i de prover som har inducerats. En sådan studie från 2000 undersökte hur färsk hingstsperma påverkades av tillsats av ROS inducerare. Efter inkubation i 30 minuter sågs en signifikant minskning av % total motilitet och progressiv motilitet i närvaro av inducerare jämfört med kontroller (Baumber *et al*, 2000). Guthrie *et al* (2008) visade att tillsats av menadione samt väteperoxid i galtsperma minskade motiliteten med 90 % efter 60 minuters inkubation. Med hög sannolikhet hade sambanden sett annorlunda ut i vår studie om korrelation mellan ROS och motilitet efter inkubation samt induktion utförts. Dock kan resultaten från studien koppla ihop ett ejakulats grundegenskaper (t.ex. motiliteten) med dess förmåga att bilda ROS och stimuleras till ROS produktion.

Ett intressant samband mellan motiliteten och dräktighetsresultaten var att DR% TAI hade starkare koppling till total motilitet än progressiv motilitet. Den progressiva motiliteten är ju främst den parameter som undersöks och utvärderas vid kvalitetskontroll av sperma. Resultatet visar att en större vikt bör läggas på den totala motiliteten främst vid transportsperma. Det kan tyda på att det kan vara indikerat att öka totala antalet motila spermier i transportspermadoserna. Ett annat alternativ kan vara att tillsätta mer antioxidanter till exempel katalas för att motverka motilitetsminskning (Baumber *et al.*, 2000, Guthrie & Welch, 2006, Griveau *et al.*, 1995).

Även negativ korrelation mellan kromatinstabilitet och inducerad ROS produktion vid 0h sågs. Sambandet kan möjligtvis förklaras på liknande sätt som med motiliteten. Ett lågt % DFI värde betyder att spermerna har bra kromatinstabilitet (hög kvalitet), vilket kan tolkas som att de har lättare till att stimuleras till ROS produktion. En liknande förklaring kan vara att spermier med lågt % DFI har en låg grundproduktion av ROS och därmed kan stimuleras till högre ROS produktion.

Koncentrationen kan ha högre koppling till kvaliteten på sperman än vad man tidigare trott. Som tidigare nämnts justeras antalet progressivt motila spermier i transportproverna vilket leder till varierande koncentration av spermier beroende på hur motila de är. Om en hingst endast har 40 % progressivt motila spermier måste transportsperman ha en högre koncentration spermier än den hingst som har 70 % motila spermier för att nå en miljard motila spermier i insemineringsdosen. När ett ejakulat kräver högre spermiekoncentration har det sämre progressiv motilitet och därmed lägre dräktighetsprocent. Korrelationerna mellan dessa tre parametrar ses i tabell 4. Det fanns negativa samband mellan Levande H_2O_2 - (främst i de inducerade proven) och koncentration vid 2h samt positiva samband mellan Levande H_2O_2 + (främst i de inducerade proven) och koncentration vid 2h. Resultaten visar att ju högre koncentration desto högre inducerad ROS och väteperoxid produktion (2h). Detta beror troligen på att ett prov med högre spermiekoncentration har fler döende eller defekta spermier som har större kapacitet att stimuleras till att bilda ROS och väteperoxid. Vid tid 0h fanns dock ett positivt samband mellan koncentrationen och halten spermier som inte bildat ROS med inducerare. Sambanden tyder på att effekten av induceraren är tidsberoende. Det finns inga studier gjorda som bekräftar sambandet mellan koncentration och induktion av ROS.

Som finns beskrivet i litteraturoversikten är det väteperoxid som ger flest negativa effekter på spermerna. Resultaten för väteperoxidparametrarna visade stor variation mellan olika prover från samma hingst. Värdena korrigerades för att få ett så sant medelvärde som möjligt, vilket resulterade i att flera hingstar inte fick något medelvärde för flera av väteperoxidparametrarna. Figur 11 visar hur stor andel av ROS + som är väteperoxid vid 0h. I figuren ses en stor variation mellan hingstar och kanske kan ytterligare studier med utökat material undersöka om hingstar med högre halt väteperoxidproduktion relativt till superoxid har sämre spermomotilitet.

En viktig komponent i förhindrande av produktion av ROS är komponenterna i seminalplasman. Som tidigare nämnts skadar seminalplasman spermerna och spädningssväska tillsätts för att förhindra skadan (Söderqvist 2004). Risk och nytta med att tillsätta spädningssväska kan diskuteras om det ses ifrån ett ROS perspektiv. Om spädningssväska tillsätts minskar proportionen seminalplasma och antalet spermier per ml minskar. När spermier dör hamnar ROS extracellulärt och då finns det inte lika hög koncentration av antioxidanter eller skyddande enzymssystem som kan oskadliggöra ROS. Det finns studier som visar att

spermiernas motilitet minskar vid total avsaknad av seminalplasma (Jasko *et al*, 1992). Detta talar för att det måste vara bra balansgång mellan halt seminalplasma och mängd spädningssväska.

Vid tolkningen av resultaten är det viktigt att inte glömma bort att spermerna vistats i en påfrestande miljö under inkubation, utan tillgång till spädningssväska och seminalplasma där skyddande faktorer (enzymssystem och antioxidanter) finns. Man ska även ha i åtanke att proverna som analyserades för motilitet, kromatinstabilitet och morfologi inte inkuberades.

SLUTSATS

Att bedöma kvaliteten på sperma är svårt och flera olika faktorer spelar in. I arbetet visas att det är fler faktorer än vad man tidigare trott som samspelar och påverkar spermakvaliteten. Statistiken visar att det finns flera samband med statistisk signifikans mellan de olika variablerna och detta kan vara till stor hjälp i framtida avelsarbete. Mer forskning behövs på området, men resultaten tyder på att man med hjälp av flera av de undersökta parametrarna kan förutspå en hingst dräktighetsprocent.

TACK!

Tack till personalen på Flyinge som skickade transportspermadoserna till Uppsala, vilket gjorde hela experimentet möjligt att utföra.

Tack till Nils Lundheim för hjälpen med statistiken.

A huge Thank You to Patrice Humblot for all your engagement and help with the complicated statistics.

Stort tack till biträdande handledare Anders Johannisson som hjälpt mig med alla labbmomenten, datahanteringen och kommit med bra kommentarer på examensarbetet.

Tack till biträdande handledare Anne-Marie Dahlin som har hjälpt till och kommit med kommentarer under skrivprocessen.

Stort tack till huvudhandledare Jane Morrell som med sitt engagemang har hjälpt mig att både under skrivprocessen och med att tolka resultaten.

REFERENSER

- Aitken R.J., Clarkson J.S., Fishel S. 1989. Generation of Reactive Oxygen species, Lipid Peroxidation and Human Sperm Function. *Biology of Reproduction* 40, 183-197.
- Aitken R.J., Clarkson J.S. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 459-469.
- Aitken J.R. 1995. Free Radicals, Lipid Peroxidation and Sperm Function. *Reproduction, Fertility and Development* 7, 659-668.
- Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L, Storey B.T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology* 8, 338-348.
- Aurich J.E., Schonherr U, Hoppe H, Aurich C. 1997. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 48, 185-192.
- Awda B.J., Mackenzie Bell M, Buhr M.M. 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function. *Biology of Reproduction* 81, 553-561.
- Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R., Szejda P, Seeds M.C., Thomas M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology* 130, 1910-1917
- Baumber J, Ball B.A., Gravance C.G., Medina V, Davies-Morel M.C.G. 2000. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. *Journal of Andrology* 21, 895-902.
- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball B.A. 2003. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 60, 1239-1247.
- Bazhulina N.P., Nikitin A.M., Rodin S.A., Surovaya A.N., Kravatsky Y.V., Pismensky V.F., Archipova V.S., Martin R, Gursky G.V. 2009. Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA. *Journal of Biomolecular Structure & dynamics* 26, 701-718.
- Benov L, Szejnberg L, Fridovich I. 1998. Critical evaluation of the use of Hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radical Biological Medicine* 25, 826-831.
- Bileski B.H.J., Arudi R.L., Sutherland M.W. 1983. A study of reactivity of HO₂/O₂ with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 254, 4759-4761.
- Burnaugh L, Sabeur K, Ball B.A. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 67, 580-589.
- Criddle D.N., Gillies S, Baumgartner-Wilson H.K., Mohammed J, Chinje E.C., Passmore S, Chvanov M, Barrow S, Gerasimenko O.V., Tepikin A.V., Sutton R, Petersen O.H. 2006. Menadione-induced reactive Oxygen Species via redox Cycling promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 40485-40492.

- Dahlsten, A. (2006) Fertilitet hos svenska halvblodshingstar betäckningssäsongen 2004 – en pilotstudie. Examensarbete vid fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, SLU, veterinärprogrammet, sidor 1-25.
- Demick D.S., Voss J.L., Pickett B.W. 1976. Effect of Cooling, Storage, Glycerolization and Spermatozoal Numbers on Equine Fertility. *Journal of Animal Science* 43, 633-637.
- Floreani M, Napoli E, Palatini P. 2002. Role of antioxidant defences in the species-specific response of isolated atria to Menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 132, 143-151.
- 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, 249-265.
- Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland R.P. 1994. Dual Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Journal of Andrology* 15, 620-629.
- Garner D.L., Johnson L.A. 1995. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction* 53, 276-284.
- Griveau J.F., Dumont E, Renard P, Callegari J.P., LeLannou D. 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 103, 17-26.
- Guthrie H.D., Welch G.R. 2006. Determination of intracellular reactive species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science* 84, 2089-2100.
- Guthrie H.D., Welch G.R., Long J.A. 2008. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology* 70, 1209-1215.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hammar L. (2007) Kromatinstabilitet som grund för kvalitetsbedömning av hingstesperma. Examensarbete vid fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, SLU, veterinärprogrammet, sidor 1-17.
- Jasko D.J., Hathaway J.A., Schaltenbrand V.L., Simper W.D., Squires E.L. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241-1252.
- Jeulin C, Soufir J.C., Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete research* 24, 185-196.
- Koppers A.J., de Iuliis G.N., Finnie J.M., McLaughlin E.A., Aitken R.J. 2008. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, 3199-3207
- de Lamirande E, Gagnon C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology* 13, 368-378.

- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction* 2, 48-54.
- de Lamirande E, Gagnon C. 1995. Capacitation-associated production of superoxide anion in human spermatozoa. *Free Radical Biology & medicine* 18, 487-495.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1997. Interaction between Ca^{2+} , cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human spermatozoa. *Journal of Andrology* 19, 434-443.
- de Leeuw A.M., Den Daas J.H.G., Woelders H. 1991. The Fix Vital Stain Method; Simultaneous Determination of Viability and Acrosomal Status of Bovine Spermatozoa. *Journal of Andrology* 12, 112-118.
- Li T.K. 1975. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biology of Reproduction* 12, 641-646.
- Loetchuntinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J-P, Mankhetkorn S. 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug sensitive and drug resistant cancer cells using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation physics and chemistry* 72, 323-331.
- Loomis P.R. 2001. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction science* 68, 191-200.
- Neild D.M., Brouwers J.F.H.M., Colenbrander B, Agüero A, Gadella B.M.. 2005. Lipid Peroxide Formation in Relation to Membrane stability of Fresh and Frozen thawed Stallion Spermatozoa. *Molecular reproduction and development* 72, 230-238.
- Marnett L.J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370.
- Myers R.K., McGavin M.D. 2007. Cellular and Tissue Response to Injury. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. 3-62. Mosby Elsevier.
- Morrell J.M., Johannisson A, Dalin A-M, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. 2008. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rate. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50:2.
- Morrell J.M., Johannisson A, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H. 2009. Morphology and Chromatin Integrity of Stallion Spermatozoa Prepared by Density Gradient and Single Layer Centrifugation through Silica Collodis. *Reproduction of Domestic Animals* 44, 512-517.
- Morrell J.M., Johannisson A, Strutz H, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H. 2009. Colloidal Centrifugation of Stallion Semen: Changes in Sperm Motility, Velocity and Chromatin Integrity during Storage. *Journal of Equine Veterinary Science* 29, 24-32.
- Morrell J.M., Johannisson A, Juntilla L, Rytty K, Bäckgren L, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H. 2010. Stallion Sperm Viability, as Measured by the Nucleocounter SP-100, Is Affected by Extender and Enhanced by Single Layer Centrifugation. *Veterinary Medicine International* 2010.

- Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Morrell J.M., Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia J.A., Peña F.J. 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 138, 55-63.
- Papaioannou K.Z., Murphy R.P, Monks R.S., Hynes N, Ryan M.P., Boland M.P., Roche J.F. 1997. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology* 48, 299-312.
- Pintado B, de la Funete J, Roldan E.R.S. 2000. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and fertility* 118, 145-152.
- Sabeur K, Ball B.A. 2006. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 67, 701-706.
- Söderquist L. 2004. Artificial Insemination. I: *Compendium on Equine Reproduction*. 4th ed. 167-179. Uppsala
- Weydert C.J., Cullen J.J. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols* 5, 51-66.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. 2003. Superoxide reacts with Hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology & Medicine* 34, 1359-1368.