



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Seminalplasma – komponenter och dess betydelse för spermens överlevnad

Anna Karlsson

Examensarbete, 15 hp

Agronomprogrammet - Husdjur, examensarbete för kandidatexamen

Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Uppsala 2011

Sveriges lantbruksuniversitet



Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Seminalplasma – komponenter och dess betydelse för spermens överlevnad

Seminal plasma – its components and its impact on sperm survival

Anna Karlsson

Handledare:

Anders Johannisson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator:

Andrzej Madej, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Husdjursagronom

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2011

Omslagsbild: -

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Seminalplasma, sperma, spermie, lagring, frysning, kylning, artificiell insemination, nöt, häst, gris, får

Key words: Seminal plasma, semen, sperm, store, storage, cryopreservation, cooling, artificial insemination

Abstract

Semen is a mixture of spermatozoa and seminal plasma, where the ratio and the sperm content differ between the ejaculate fractions as well as the animal and species. The seminal plasma is produced in the testes, epididymes and the accessory glands. It influences the spermatozoa and the environment in the male and female reproductive tract. For example the immune system, in the female's genital tract, is affected by seminal plasma, spermatozoa and extender. The seminal plasma benefits the spermatozoa during copulation but is, in some species, injurious when used in storage extender. The contents of the semen differs among its fractions, the protein concentration is at its lowest in the pre-sperm fraction but reaches its peak in the following, sperm-rich, fraction. As the use of artificial insemination (AI) gets more widespread the knowledge needs to be increased about the components of seminal plasma and the needs of the spermatozoa. The possibility to use AI differs due to the anatomic conditions of the species and also the composition of the seminal plasma. The quality of the thawed spermatozoa depends on the seminal plasma concentration during storage, which should be as low as possible, as well as which part of the ejaculate that is used. More studies about the effects of storage extender and seminal plasma on the spermatozoa during storage should be done.

Sammanfattning

Sperma består av spermier och seminalplasma, vars förhållande liksom spermans innehåll varierar mellan ejakulatets fraktioner, individer och djurslag. Seminalplasma bildas i hanens testiklar, bitestiklar och accessoriska könskörtlar och påverkar spermerna samt miljön i hanens och honans reproduktionsorgan. Bland annat påverkas immunförsvaret i honans könsorgan av seminalplasma, spermier och spädningsmedium. Vid naturlig betäckning gynnas spermerna av seminalplasmans närvaro men under lagring har denna, för vissa arter, även en negativ inverkan. Spermans koncentrationer av olika ämnen skiljer sig mellan ejakulatets fraktioner, där den totala proteinkoncentrationen är lägst i första delen, innan spermier finns, och högst i den efterföljande fraktionen, som även är den mest spermierika. Ett ökat användande av artificiell insemination (AI) kräver en djupare förståelse för spermernas behov och seminalplasmans roll i detta. Förutsättningar för AI skiljer sig mellan djurslag beroende på djurens olika anatomi och arternas olika sammansättning av seminalplasma. Vid lagring påverkar seminalplasmans halt spermerna, generellt bör halten vara så låg som möjligt, dessutom påverkar vilken av ejakulatets fraktioner som används på olika sätt. Vidare forskning på lagringsmedier, seminalplasmans komponenter och hur dessa påverkar spermier vid lagring bör bedrivas.

Introduktion

I samband med ejakulation blandas spermerna med sekret (seminalplasma) (Rodríguez-Martínez, et al., 2009) från testiklarna, bitestiklarna samt de accessoriska könskörtlarna (Kareskoski et al., 2010). Till de accessoriska könskörtlarna hör ampullan, sädesblåsan, prostatan samt bulbourethralkörtlarna (Kareskoski, 2011). Seminalplasman består av proteiner, enzymer, hormoner, joner, lipider och kolhydrater. Organens sekretion sker i en bestämd ordning vilket gör att kompositionen varierar mellan utlösningens olika fraktioner. Seminalplasman påverkar spermernas överlevnad och funktion positivt vid betäckning, men

tycks verka negativt på spermerna vid lagring (Kareskoski et al., 2010). De accessoriska könskörtlarnas sekret är basiskt och påverkar miljön i hanens urinrör samt honans könsorgan. På detta vis ökas spermernas överlevnadsförmåga (Sjaastad et al., 2003), rörelseförmåga och fertilitet, vilket påverkar morfologi samt akrosomfunktion (Yue et al., 2009). Ejakulatets första del innehåller granulocyter, främst neutrofiler vilka är en del av det ospecifika immunförsvaret, och därmed renas uterus på patogener inför spermernas inträde (Rodríguez-Martínez, et al., 2009). Seminalplasmans fysiologiska roll är dock inte helt kartlagd (Kareskoski & Katila, 2008). Spermernas vitalitet under och efter frysförvaring kan bland annat mätas med hjälp av dess rörlighet (Rodríguez-Martínez, et al., 2008). Spermien erhåller sin rörelseenergi från fruktos, som är dess främsta energikälla, via adenosintrifosfat (ATP) (Sjaastad et al., 2003).

Artificiell insemination (AI) är en ofta använd reproduktionsmetod inom animalieproduktionen. Metoden är beroende av att sperma förvaras på ett sätt som minimerar eventuella skador på spermerna. AI öppnar möjligheter för en effektivare djurhållning, bland annat då lantbrukarna inte behöver hålla handjur för avel på den egna gården och då avelsframstegen kan bli större. Att inte hålla handjur minskar lantbrukarens arbetsbelastning, säkerhetsrisker och kostnader. För att bibehålla möjligheterna att använda och vidareutveckla tekniken bör kunskapen fördjupas om seminalplasmans påverkan på spermier och fertilitet.

Denna litteraturstudie sammanfattar och diskuterar seminalplasmans beståndsdelar och hur den påverkar spermens överlevnad vid lagring.

Lagring av spermier

Vid lagring av spermier används vanligen frysförvaring eller kylförvaring (Rodríguez-Martínez, et al., 2009). Vilket medium som bör användas beror på om och hur mycket seminalplasma provet innehåller (Kareskoski, 2011). Uppsamling av sperma bör ske på ett sätt som ger djuret minsta möjliga sexuella stimulans för att få ett ejakulat med högre andel spermier, låg koncentration av seminalplasma och färre bakterier. Kyllagring är ett vanligt sätt att förvara hästsperma som har optimal lagringstemperatur på 5 °C. Vanligen används då mjölkbaserade medium vilket ger en jämnare och mer pålitlig kvalitet på spermerna, jämfört med andra medium (Aurich, 2008). Frysingsmedium innehåller äggula, buffert, salter, antibiotika och kolhydrater såsom glukos, laktos, raffinös, sackaros and trehalos (Barbas & Mascarenhas, 2009). Vid själva frysningen används flytande kväve som har en temperatur på -196°C. Spermernas frysbarhet varierar mellan arter, raser och individer (Haugan et al., 2007) och påverkar spermernas kvalitet vid befruktning. Den individuella skillnaden är mest påtaglig bland getter (Barbas & Mascarenhas, 2009). Fryslagring erbjuder, till skillnad från kyllagring, internationell spridning av genetiskt material utan att djur behöver transporteras, förlängd lagringstid vilket gynnar bevarandet av genetiskt material samt ökar möjligheterna att testa sperman för patogener innan insemination (Rodríguez-Martínez, et al., 2009) och därigenom öka biosäkerheten bland besättningarna (Garcia et al., 2010).

Den vanligaste fryslagringen är långsam jämviktsfrysning (slow equilibrium freezing), där det är viktigt att frysningen varken är för snabb eller långsam. Om processen går för fort kommer inte vattnet att gå ur spermerna tillräckligt snabbt för att en jämvikt ska uppnås, och spermerna riskerar då att frysa intracellulärt, vilket är letalt. Om processen istället går för långsamt kan spermerna skadas av en dehydrering. Två andra vanliga tekniker vid fryslagring är frystorkning av spermier och vitrifikation (Dinnyes et al., 2007). Frystorkning innebär att sperman fryses varpå trycket sänks, därmed sublimerar sperman vilket innebär att vattnet

övergår i gasform och kondenserar. Proceduren upprepas tills sperman är fri från vatten (Tang & Pikal, 2004). Spermier är konventionellt sett döda efter en frystorkning då dessa själva varken kan röra sig eller befrukta ett ägg. Däremot, om en av dessa spermier injiceras direkt i oocyten kan denna ge upphov till avkomma. Fördelarna med denna teknik är att förvaringen är billig då spermier kan förvaras i rumstemperatur eller kylskåp, vilket även underlättar transport av spermier. Risken är dock, precis som vid jämviktsfrysning, att spermier skadas i samband med nedfrysningen. I och med frysning övergår spermiers membran från att vara i en biologiskt aktiv flytande fas till att bli i gelfas. Vittrifikation av sperma är en sorts frysförvaring utan att iskristaller bildas, materialet omvandlas istället till ett glaslikt tillstånd. Detta möjliggörs genom att blanda sperman med höga koncentrationer CPA (cryoprotective agent) och att blandningen sedan snabbt kyls ner. CPA är ett sockerbaserat medium, till exempel glycerol, etylenglykol eller propylenglykol, som skyddar spermier från frysskador men kan skada spermier vid för höga koncentrationer. Det används både vid vittrifikation och vid den långsamma jämviktsfrysningen. Innan inseminering, med frysförvarade spermier, tas detta medium bort och spermier rehydreras. Spermiers membran går då igenom ännu en fasomvandling. Vittrifikation kräver ingen dyr utrustning och går snabbare, jämfört med övriga frysmetoder. Resultatet av metoden påverkas dock av cellernas storlek, då stora spermie huvuden försämrar frysningen, samt cellernas halter av makromolekyler (Dinnyes et al., 2007).

Ejakulatets fraktioner

Spermans koncentrationer av olika ämnen skiljer sig mellan ejakulatets fraktioner, (Rodríguez-Martínez et al., 2009; Kareskoski et al., 2011) där den totala proteinkoncentrationen är lägst i första delen, innan spermier finns, och högst i den efterföljande fraktionen, som även är den mest spermierika (Koskinen et al., 2002). Ejakulatet från gris har stor volym (Rodríguez-Martínez et al., 2010) och kan delas upp i tre huvudfraktioner, som är enkla att urskilja; försats, spermierik fraktion och den efter-spermierika fraktionen. Grisens försats består av sekret från körtlar i anslutning till urinröret, bulbourethral körtlarna och prostata (Rodríguez-Martínez et al., 2009). Försatsen är vattning och innehåller, tillskillnad från resten av ejakulatet, inga spermier. Den spermierika delen kan delas upp i ytterligare två delar, den första som är rik på vätska, vari spermier simmar, från bitestikeln och den andra från sädesblåsan vars sekret har en högre proteinkoncentration. Den delen av ejakulatet som kommer efter den spermierika fraktionen har låg spermiekoncentration, men innehåller mer vätska från sädesblåsan, prostata och även bulbourethral körtlarna än övriga ejakulatet (Siqueira et al., 2011).

Hingstens ejakulat består av sex till nio fraktioner, där 70 % av spermier finns i de tre första. I samband med en ejakulation börjar bulbourethral körtlarna att producera sekret, det är denna vätska som formar försatsen (Kareskoski & Katila, 2008). Hingst spermans första fraktion innehåller främst ämnen från bitestikeln och ampullan, möjligen även från prostata. Innan ejakulationen startar kommer ampullan och prostatan att producera sekret, detta sker i samband med att spermier och seminalplasma utsöndras i urinröret (Kareskoski et al., 2011). Sädesblåsans tömning inleds i samband med att prostatan avbrutit sin produktion, detta utgör den sista fraktionen och slutet av ejakulationen. Sekretion från bulbourethral körtlarna under ejakulationen har inte kunnat påvisas (Kareskoski & Katila, 2008).

Seminalplasmans komponenter

Proteiner

Vid ejakulation binder proteiner från de accessoriska könskörtlarna till spermerna (Gwathmey et al., 2006), många proteiner är även bundna till olika typer av sackarider (Liberda et al., 2002). Seminalplasma innehåller naturligt höga koncentrationer av protein (Dinnyes et al., 2007) vilka samspelar med spermens yta och med olika ämnen, bland annat sura polysackarider av heparintyp (Liberda et al., 2001). För de flesta domesticerade djur liknar proteinerna i seminalplasma de i blodplasman, detta gäller för till exempel albumin, transferrin, α -, β - och γ -globuliner samt immunoglobuliner (Kareskoski, 2011). Grisens ejakulat består till stor del av proteiner varav 80-90 % bildats i sädesblåsan. Dessa består huvudsakligen av spermadhesiner. Spermadhesiner är glykoproteiner med många olika uppgifter, bland annat binder dessa till heparin men de är även viktiga vid stabilisering av spermimembranen, kapacitering och i interaktionen mellan spermie och ägg (Rodriguez-Martinez et al., 2010). Heparinbindande proteiner med låg molekylvikt utgör den största delen av proteininnehållet i såväl sperma från tjur som galt och hingst. Dessa proteiner tycks dock vara obesläktade, strukturellt sett, mellan arter vilket tyder på att de heparinbindande proteinerna som verkar vid kapacitering är artspecifika. Det finns även proteiner i lägre koncentrationer, kopplade till spermens bindning till äggcellen, vilka är strukturellt konserverade mellan däggdjursarter (Calvete et al., 1994).

Proteinerna i hingstesperma delas ofta upp i tre grupper; proteiner med två eller fyra fibronectin typ II moduler (Fn-2 proteiner), cysteinrika sekretoriska proteiner (CRISP) samt spermadhesiner. Hos många arter, inklusive häst, är Fn-2-proteiner de mest förekommande. Vanligen bildas de små proteinerna, med enbart två Fn-moduler, i ampullen medan de större bildas i bitestikeln (Kareskoski & Katila, 2008). I samband med ejakulation binder Fn-2-proteinerna till spermimembranets fosfolipider vilket ändrar membranets struktur. Hingstans seminalplasma-proteiner (HSP) kan vidare delas in i åtta typgrupper. De flesta proteintyperna är av låg molekylvikt, 14-30 kDa, och bildar tillsammans större proteinaggregat. Fn-2-proteinerna HSP-1 och HSP-2 utgör tillsammans 70-80% av alla proteiner, binder till heparin och tros spela en roll i kapaciteringen (Kareskoski, 2011). Brandon et al. (1999) delade upp hästens seminalproteiner (SP) i 14 grupper och fann att SP-1, SP-2, SP-3 samt SP-4 är kopplade till avelsmeriter hos häst. Baserat på molekylvikt föreslog Brandon et al (1999) att SP-3 och SP-4 kan vara samma proteiner som HSP-1 och HSP-2. HSP-3 ingår i gruppen CRISP vilket främst bildas i ampulla och sädesblåsa. CRISP tycks skydda levande spermier mot bindning till granulocyter och hjälper även spermerna att överleva och röra sig i äggledaren. HSP-7 är det enda identifierade spermadhesinet i hingstesperma och har en viktig roll i spermens bindning med äggcellens zona pellucida. I galtens sperma finns två icke-heparinbindande spermadhesin, seminalplasmaproteinerna I och II, vilka har positiv effekt på utspädda spermiers livsduglighet beroende på dos och tid. Dessa proteiner har inte visats ha någon påverkan på spermernas överlevnad efter upptining (Kareskoski, 2011) men hos gris sänker dessa spermiers förmåga att penetrera äggceller *in vitro* (Caballero et al., 2004).

De tre vanligaste bovina seminalplasmaproteiner (BSP) är PDC-109, BSP-A3 och BSP-30-kDa. De är små sura proteiner med en molekylvikt på 15-16 kDa för PDC-109 och BSP-A3 samt 28-30 kDa för BSP-30-kDa (Gwathmey et al., 2006). Proteinet PDC-109 i tjursperma möjliggör spermens bindning till äggledarens epitel och ansvarar därigenom för bildningen av spermiereservoaren (Gwathmey et al., 2006; Liberda et al., 2002) samt spermens mognad

genom att avlägsna lipider från cellmembranet, främst kolesterol och fosfatidylkolin (Tannert et al., 2007). Gwathmey et al. (2006) har visat att även BSP-A3 och BSP-30-kDa bidrar till spermernas bindning till äggladarens cellmembran.

Vissa proteiner har en tydligare koppling till fertilitet än andra. Det har till exempel visats att tjurar med hög fertilitet har höga halter av osteopontin, producerad i ampulla och sädesblåsan, samt högre halt prostaglandin-D₂-syntas från testiklar och bitestikeln (Kareskoski & Katila, 2008).

Enzymer

Aktivitet av surt fosfatas (ACP), basiskt fosfatas (AP), aspartataminotransferas (AST) och γ -glutamyl transferas (GGT) i seminalplasma är negativt korrelerade med spermavolym och positivt korrelerade med spermakonzentration. Detta tyder på att dessa enzymer producerats i testiklarna och bitestikeln, där AP även har högst aktivitet. Högst koncentration av AP och ACP finns i den spermierika delen av ejakulatet. AP kan bland annat användas till att upptäcka om det blivit någon form av avbrott i ejakulatets bildning (Kareskoski & Katila, 2008). Hos galt finns aktivt AP i sekretet från sädesblåsan, enzymet finns även hos nöt där aktiviteten är säsongsbunden. AP-aktivitet har dessutom hittats i flertalet däggdjurs prostatavätska där även höga halter ACP har hittats hos hund, apa och människa men låga halter hos nöt. Genom att mäta ACP-konzentrationen i en hunds ejakulat kan prostatans funktion värderas (Kareskoski, 2011). Aktivitet och koncentration av AST påverkar spermernas frysbarhet (Kareskoski & Katila, 2008).

Laktatdehydrogenas (LDH) är starkt korrelerad med spermavolym, spermiekonzentration, andelen levande spermier samt patomorfologi. Enzymet har antagits ha en stor påverkan på spermies funktioner och metabolism. LDH och GGT påverkar även spermernas totala samt framåtriktade rörelse (Kareskoski & Katila, 2008).

Prostaglandiner och cytokiner

Prostaglandin E (PGE) tros produceras i sädesblåsan (Shore et al., 2003) och sänker immunförsvaret i honans vagina och ökar därmed spermernas chanser att överleva (Denison et al., 1999). Shore et al. (2003) har konstaterat att tjurar med låg spermieaktivitet och kryptorkism har sperma med lägre PGE-konzentration. Försöket visade även att sperma från tjurar med ensidig kryptorkism och sperma som kasserats på grund av kryptorkism innehåller lägre halter testosteron och högre halter östrogen jämfört med normala tjurar. Djur vars spermier hade god rörlighet hade även signifikant högre PGE-konzentration i sperman än hos de med lägre rörlighet. Dock fann forskargruppen ingen korrelation mellan PGE och spermiekonzentration, volym eller livsduglighet (Shore et al., 2003).

Delar av immunförsvaret i honans könsorgan, till exempel rekryteringen av neutrofiler, hämmas av seminalplasma men aktiveras av spermier och spädningmedium. Tillväxtfaktorerna, transforming growth factor, (TGF)- β 1 och TGF- β 2 är två cytokiner som finns i galtens seminalplasma och tycks reglera honans immunsvaret i livmodern mot de hanliga patogenerna (Jiwakanon et al., 2011). Vera et al. (2003) fann att cytokiner påverkar spermiekvaliteten hos tjur och att halten av cytokinet interleukin (IL)-10 hos en individ är korrelerat med spermernas rörlighet. I ett annat försök observerade Denison et al. (1999) att seminalplasma och dess prostaglandiner stimulerar frisättningen av den proinflammatoriska

cytokinen IL-8. Däremot inhiberades IL-8-sekretionen av sperma i *in vitro*-odling av perifert blod, medan mängden av det anti-inflammatoriska cytokinet IL-10 ökar. Detta skulle kunna förklaras av att IL-10-utsöndringen, i blodkulturen, stimuleras av seminalplasma och eftersom inhiberingen av IL-8- och IL-10-frisättningen motsvarar varandra kan detta vara orsaken till den mindre mängden IL-8 (Denison et al., 1999). Ett liknande förhållande har hittats på tjur, där mängderna IL-6 och IL-10 är negativt korrelerade (Vera et al., 2003). Madej et al. (2011) inkuberade i ett försök endometriala stromaceller i olika volymer av seminalplasma från gris under tre timmar. Försöket visade en ökning i produktionen av IL-6, oavsett mängd seminalplasma i provet. Vidare fann forskargruppen att epitelceller från bovint endometrium som inkuberats i seminalplasma under tre timmar ökade IL-6-frisättningen, dock var denna ökning lägre efter 24 timmars inkubering (Madej et al., 2011).

D-fruktos

Seminalplasma från flertalet arter, bland andra nöt, innehåller D-fruktos inte bara som energikälla utan det påverkar även befruktningsprocessen. Det har visats på människa att D-fruktos inhiberar proteaset akrosin och blockerar fullständigt spermernas penetration genom äggets cellmembran. Monosackarider, såsom D-fruktos, har dessutom en möjlig funktion vid interaktionen mellan plasmaproteiner och polysackarider i tjursperma (Liberda et al., 2001).

Elektrolyter och spårämnen

Mängden oorganiska ämnen i seminalplasma skiljer sig mellan de olika fraktionerna. Magnesium, kalcium och oorganiskt fosfat har högst koncentration i hingstspermans spermierika delar från bitestiklar och ampulla. Ejakulatets volym är positivt korrelerat med förekomst av kalcium, både det totala och det joniserade, vilket tyder på att det främst är de accessoriska könskörtlarna som tillför kalcium till seminalplasman (Kareskoski & Katila, 2008). På får är antalet levande spermier i ejakulatet positivt korrelerat med kalium- och kalciumhalten och negativt korrelerat med fosforhalten (Abdel-Rahman et al., 2000). I hingstperma är 60-75 % kalcium joniserat, vilket skiljer sig från förhållandet hos människan där endast 2-4 % av allt seminalt kalcium är i joniserad form. Kalcium är en av de mest undersökta beståndsdelarna i seminalplasma, då grundämnet ingår i många fysiologiska reaktioner i reproduktionssteg. Bland annat reglerar extracellulärt kalcium spermernas kapacitering genom att minska mängden tillgängligt ATP intracellulärt. Kalcium är även viktigt för hyperaktiveringen av spermerna och de akrosomala reaktionerna (Kareskoski, 2011).

Koncentrationerna av järn, zink och koppar är, till skillnad från kalcium, negativt korrelerade med ejakulatvolym och spermiekoncentration (Kareskoski & Katila, 2008). Det har visats att hingstspermans innehåll av koppar och järn skiljer sig mellan normala spermaprover och de med sänkt spermiekvalitet (Pesch, 2005). Försatsen innehåller högre andelar natrium och klor än övriga fraktioner, något som tros kunna påverka spermernas lagringsförmåga. Det finns även en individuell variation i koncentrationerna av kalcium, magnesium och koppar, dock har inga skillnader i zinkförekomst hittats. Variationerna har inte kunnat förklara spermernas rörlighet efter frysning följt av upptining (Kareskoski & Katila, 2008). Zink påverkar bland annat spermernas kromatin och rörlighet (Kareskoski, 2011).

Hos häst och nöt är järn- och zinknivåerna positivt korrelerade. Halter av olika grundämnen i seminalplasma varierar dock mellan arter. Till exempel har gris högre zinkhalt än både nöt

och häst, men koppar- och järnhalterna i fårs seminalplasma är högre än hos häst och gris. Kalcium och magnesium är negativt korrelerade med spermiekoncentration hos häst, men positiv hos får (Kareskoski, 2011).

Seminalplasmans effekt på spermien efter ejakulation

De olika fraktionerna i seminalplasman påverkar spermiernas överlevnad på olika sätt (Rodríguez-Martínez et al., 2008). Innehållet i seminalplasman beror delvis på var i honan sperman deponeras vid betäckning, vilket sker i livmodern på häst och gris men i kons vagina. Detta gör att olika krav ställs på hingst- och galt- respektive tjursperma, för att spermierna ska kunna ta sig till befruktningplatsen. Hos de arter där sperman lämnas i vagina innehåller seminalplasman komponenter som hjälper spermierna att ta sig förbi cervix. Hos de arter som lämnar sin sperma direkt i livmodern reducerar seminalplasman kemotaxis, fagocytos och komplementaktivering. Det finns även ämnen i seminalplasman som påverkar spermiernas funktion i äggledarna och som tar spermierna genom uthertubal junction, vilket krävs oavsett vart spermierna deponerats och därför binder dessa till spermierna på liknande sätt oavsett art (Alghamdi et al., 2009). Även foder påverkar seminalplasmans komponenter och spermiernas livslängd, högt intag av antioxidanter och fleromättade fettsyror ökar spermiekvaliteten för ett flertal arter (Aurich, 2008). Spermiernas förmåga att behålla sitt DNA intakt under miljömässig, intern såväl som extern, stress varierar stort mellan olika arter (Mukhopadhyay et al., 2011).

Gris

Mer än 99 % av all AI på gris i världen görs med flytande sperma (Rodríguez-Martínez et al., 2009) i en temperatur på 15 °C (Aurich, 2008). Fryst sperma är ovanligt eftersom endast cirka 40 % av galt spermerna överlever och de överlevande har en förkortad livslängd (Rodríguez-Martínez et al., 2009). Detta i sin tur leder till mindre kullstorlekar och att en mindre andel av de betäckta suggorna grisar än vid användning av flytande sperma (Garcia et al., 2010). Fryslagringens fördelar har gjort avelsföretagen mer intresserade av att utveckla denna teknik även för gris (Rodríguez-Martínez et al., 2009).

Vid naturlig parning blandas spermier med seminalplasma i begränsad utsträckning då det mesta av seminalplasman ejakuleras efter spermierna. Spermier från den spermierika delen av ejakulatet kan förvaras i rumstemperatur i upp till 20 timmar utan att sänka spermiernas frysbarhet eller förmåga att penetrera äggets cellmembran. En sådan lagring ökar dock mängden reaktiva syreföreningar (ROS) intracellulärt vilket orsakar spermierna oxidativ stress och ökar dödligheten (Rodríguez-Martínez et al., 2008). Garcia et al. (2010) visade tydligt att seminalplasma kan ha en positiv effekt på spermiekvaliteten *in vitro*, beroende på dos, men *in vivo* var svaren mindre uppenbara. Tidigare försök har visat att spermiers åldrande och kapaciterings-liknande processer, som sker i samband med frysning och upptining, kan förhindras om tinade spermier inkuberas i 10 % seminalplasma. Denna effekt var som tydligast vid 15 minuters inkubationstid. Även kylning i 10 % eller 20 % seminalplasma verkar förebyggande mot kapacitering innan insemination. I försöket drogs slutsatsen att nedfrysning av spermier i 50 % seminalplasma signifikant höjer spermiernas livskraft och rörlighet, med en möjlig positiv effekt på suggornas fertilitet (Garcia et al., 2010).

Nöt

Liksom på gris (Rodríguez-Martínez et al., 2008) leder en lång tid i frysförvaring till högre halter ROS i sperma även hos nöt. ROS gör att spermies DNA fragmenteras och därigenom sänks befruktningsevne. Tjursperma är, relativt andra däggdjurs sperma, mer motståndskraftig mot frysningsskador, vilket har visats i försök där endast en liten del av allt DNA (4-5%) har fragmenterats. Sperman innehåller ett mer utvecklat försvarssystem med antioxidanter än hos många andra arter, och spermies cellmembran är inte lika känsligt för peroxidering (Mukhopadhyay et al., 2011).

Seminalplasmans innehåll av BSP är avgörande för bildandet av spermiereservoaren i äggladaren. Proteinerna förlänger *in vitro* spermies livslängd som rörliga (Gwathmey et al., 2006). Dessutom ökar tillsatser av magnesiumklorid i frysmedium nötspermies rörlighet efter att de tinats upp (Kareskoski, 2011).

Får

Spermies frysbarhet varierar mellan olika raser. Även spermans tjocklek varierar mellan raserna, där lantrasernas sperma generellt har tjockare konsistens. Högre halter av kalium, kalcium och magnesium ger tjockare sperma. Abdel-Rahman et al. (2000) har i ett försök visat en positiv korrelation mellan förekomsten av natrium-, klor-, fosfor- och magnesiumjoner i plasma samt i spermien och andelen rörliga spermier (Abdel-Rahman et al., 2000), korrelationen för kalium är negativ (Kareskoski, 2011).

Häst

Flera undersökningar har visat att hingst spermier skadas vid lagring i seminalplasma, både vid kyl- och frysförvaring (Kareskoski & Katila, 2008). Braun et al. (1994) har visat att prover där spermier lagrats i 5 % seminalplasma hade högre rörlighet 24, 48 respektive 72 timmar efter att kylningsprocessen inletts, jämfört med spermier som lagrats i 25 % seminalplasma. Det har visats att korrelationen är negativ mellan seminalplasmans koncentration och spermies rörlighet efter lagring. Däremot tycks det finnas vissa komponenter som verkar positivt på fertilitet och spermies lagringsevne (Kareskoski & Katila, 2008). En hög koncentration av seminalplasma i lagringsmediet, över 40 %, är letalt för spermies. Det har dock visats att seminalplasma från den spermierika delen har större negativ effekt på spermies rörlighet och plasmamembranens intaktet än vad seminalplasman från de spermiefattiga delarna har (Kareskoski, 2011). Även individuella skillnader påverkar effekten av seminalplasma och medium, vissa hingstars ejakulat är mer kyl- och lagringsevne än andras (Kareskoski, 2011).

Diskussion

Seminalplasmans vara eller inte vara i lagringsmedium varierar mellan djurslag, lagringsmedium, -metod och -tid. I samband med naturlig betäckning ejakuleras nötsperman i vaginan varpå spermies tar sig genom cervix och seminalplasman lämnas kvar i vagina. Vid AI deponeras dock seminprovet, med seminalplasma, direkt i livmodern. Det är idag oklart om och i så fall hur seminalplasma, som naturligt lämnats i vagina vid betäckning, hämmar bindningen mellan spermier och neutrofila granulocyter. Seminalplasma tycks dock skydda

spermierna mot neutrofiler vilka annars skulle försämra spermiefunktionen, detta är särskilt aktuellt för häst och gris där upprepade inseminationer sker vid varje brunst. Det har visats att spermier, som förvarats i seminalplasma, binder till neutrofiler i större utsträckning än om de förvaras utan seminalplasma (Alghamdi et al., 2009). Detta pekar möjligen mot att detta även händer i vaginan.

Garcia et al. (2010) menar att grisspermier har bäst överlevnad om de fryses ned i, och därmed även lagras i, medium med 50 % seminalplasma och enligt Rodríguez-Martínez et al. (2008) bör de tinas utan någon seminalplasma närvarande. Provets innehåll av seminalplasma beror alltså på vilken del av lagringsprocessen det gäller, då olika delar utsätter spermierna för olika sorters påfrestningar. Vad gäller själva lagringen skriver Kareskoski (2011) att seminalplasma är skadligt för kylda häst spermier om koncentrationen överstiger 40 %. Seminalplasmans skadlighet på spermierna beror inte bara på dess halt i lagringsmediet utan även från vilken ejakulatfraktion den härstammar. Spermierna skadas mer av att lagras i seminalplasma från den spermierika delen än den från de mer spermiefattiga fraktionerna (Kareskoski, 2011). Detta bör alltså hållas i åtanke vid samling och lagring av spermier. Eftersom grisspermier är fryskänsliga bör dessa följa resultaten från Garcia et al. (2010), att frysa och lagra dessa i 50 % seminalplasma. Om metoder för frysning av galtsperma skulle utvecklas med goda resultat skulle detta innebära stora möjligheter för grisindustrin att effektiviseras.

ROS i seminalplasma sänker spermiernas rörlighet och leder till en fragmentering av DNA, dessutom skadas spermiernas membran i och med en peroxidation av lipiderna. Trots att ROS ökar mortaliteten och är extremt giftigt i höga halter, är spermierna i behov av en mindre mängd för att fungera normalt. Detta eftersom ämnena underlättar spermiernas kapacitering och tyrosinfosforylering, vilket påverkar akrosomreaktion och signalsystemet för kapaciteringen (Kareskoski, 2011). Vissa typer av lagring av gris- (Rodríguez-Martínez et al., 2008) och nötsperma leder till en ökad mängd ROS i proverna (Mukhopadhyay et al., 2011), dess negativa effekter kan inte avhjälpas med tillsatser av antioxidanter i frysmediet (Kareskoski, 2011). Medan effekterna av ROS beror på dess koncentration, påverkar D-fruktos spermierna både positivt och negativt vid normala halter. Spermierna använder D-fruktos till att utvinna energi, men det dämpar till exempel även akrosomens funktion (Liberda et al., 2001). Liberda et al. (2001) visade också att D-fruktos i tjursperma hindrar heparin att binda till seminalplasmans proteiner och spermier i bitestikeln, de föreslår att förklaringen är att D-fruktos binder till proteinerna som då får nya egenskaper. Effekten kunde inte hittas i de fall då seminalplasman innehöll ämnen med låg molekylvikt, till exempel ejakulerad sperma eller komplett seminalplasma. Vidare fann Liberda et al. (2001) PDC-109 och RNAs i D-fruktos-fraktionen i tjurars seminalplasma samt i fraktionen där D-fruktos binder heparin. PDC-109, som gör det möjligt för spermien att binda till äggledarepitelet, släpper spermierna i och med kapaciteringen och spermierna lämnar därmed äggledarens cellmembran (Gwathmey et al., 2006). Ingen koppling mellan D-fruktos och bindningen mellan coating-proteiner och spermiernas yta, i samband med kapacitering, har hittats (Liberda et al., 2001). Även joniserat kalcium påverkar akrosomens funktion. Om halterna avviker från de normala kan det leda till att omogna akrosomer exocyterar, på häst kan detta ske då halterna av joniserat kalcium är alltför höga, och detta i sin tur leder till en minskad befruktningssuglighet (Kareskoski, 2011).

I äggula-extrakt finns låg-densitets lipoproteiner som hämmar bindningen mellan BSP och spermierna, samma effekt uppkommer vid användning av mjölkextrakt. Äggula inhiberar dessutom bindningen mellan tjurspermier och neutrofiler genom att binda till BSP:s

bindningsställe på spermien samt genom att minska affiniteten mellan BSP och spermie (Alghamdi et al., 2009). Alghamdi et al. (2009) jämförde även andelen bindningar mellan neutrofiler och hästspermier, som förvarats i ägg- respektive mjölkextrakt, utan att hitta några signifikanta skillnader. Resultatet tolkades som att det finns stora skillnader mellan hur tjur- och hingstpermier reagerar på seminalplasma och lagringsmedium (Alghamdi et al., 2009). Skillnaderna kan även bero på seminalplasmans olika sammansättningar mellan arterna. Bindningen mellan spermie och neutrofiler är dock en naturlig process till skillnad från spermiers bindning till ett lagringsmedium. Frågan är alltså hur mediet påverkar befruktningssprocessen vidare, med tanke på spermiereservoaren, kapacitering, akrosomreaktion etc (Alghamdi et al., 2009). Skillnaderna beror troligen på fysiologiska olikheter, bland annat depositionsplats i honans könsorgan, ejakulatvolym, spermiekoncentration och bitesticklarnas utformning.

AI har öppnat upp för fantastiska möjligheter och om tekniken utvecklas vidare finns eventuellt mer att hämta. Det har drivit avelsarbetet framåt sedan dess introduktion, och har lett till en mer effektiv animalieproduktion men kan även öka inavelsgraden. Hur AI-teknikerna bör utvecklas skiljer sig mellan djurslag. På gris bör fortsatt forskning bedrivas på fryslagring, för att bredda möjligheterna med AI. Tekniken bör även utvecklas för de djurslag där tekniken redan är framgångsrik, såsom nöt, för att vidare effektivisera användningen.

Kunskaper om tjurspermier och varför tjursperma är mer fryståligt än många andra arter bör fördjupas, och därigenom öka förståelsen för hur detta komplexa samspel fungerar. Denna kunskap skulle kunna föras över på andra arter, med hänsyn till spermiernas, seminalplasmans och djurens anatomiska morfologi. Aurich (2008) visade att handjur som utfodras med höga halter antioxidanter och fleromättade fettsyror producerar sperma med högre spermiekvalitet, och skriver även att foder påverkar seminalplasmans komponenter och spermiernas livslängd. Fodret som ges till handjuren, vilka används i avel, bör alltså anpassas efter detta, då det ökar seminalplasmans positiva effekt på spermierna såväl vid betäckning som vid lagring.

Seminalplasman påverkar spermierna både negativt och positivt. Den är främst anpassad till att spermier ska leva häri under en kortare tid och kan därmed ha överhängande negativa effekter vid långtidslagring. Vid lagring kan det därför vara fördelaktigt att ta bort mer eller mindre seminalplasma från lagringsmediet. De ämnen i seminalplasmans med övervägande positiva effekter på spermiernas fryslagringförmåga bör identifieras. Om dessa ämnen, eller ämnen med liknande funktioner, skulle ingå i ett fryslämpligt lagringsmedium skulle detta kunna öka möjligheterna för en lyckad fryslagring. Detta kräver eventuellt att all seminalplasma tas bort innan lagring, vilket i sig riskerar att sänka spermiernas vitalitet. I och med spermans komplexitet skulle en sådan studie kräva omfattande resurser. Dessutom skulle de individuella skillnaderna kunna vara så pass stora att några absoluta riktlinjer inte kan sättas upp vad gäller innehåll av seminalplasman och andra komponenter i lagringsmedium samt lagringsmetoder. Dock bör detta kunna generaliseras inom arter utan att några större problem skulle uppstå.

Referenser

- Abdel-Rahman, H.A., El-Belely, M.S., Al-Qarawi, A.A. & El-Mougy, S.A. 2000. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Small Ruminant Research* 38, 45-49.
- Alghamdi, A.S., Lovaas, B.J., Bird, S.L., Lamb, G.C., Rendahl, A.K., Taube, P.C. & Foster, D.N. 2009. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Animal Reproduction Science* 114, 331-344.
- Aurich, C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 107, 268-275.
- Barbas, J. & Mascarenhas, R. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* 10, 49-62.
- Brandon, C.I., Heusner, G.L., Caudle, A.B. & Fayrer-Hosken, R.A. 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52, 863-873.
- Caballero, I., Vazquez, J., Gil, M., Calvete, J., Roca, J., Sanz, L., I, P., Garcia, E., Rodriguez-Martinez, H. & Martinez, E. 2004. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J. Androl* 25, 1004-1012.
- Calvete, J.J., Nessau, S., Mann, K., Sanz, L., Sieme, H., Klug, E. & Töpfer-Petersen, E. 1994. Isolation and Biochemical Characterization of Stallion Seminal-plasma Proteins *Reproduction in Domestic Animals* 29, 411-426.
- Denison, F.C., Grant, V.E., Calder, A.A. & Kelly, R.W. 1999. Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. *Molecular Human Reproduction* 5, 220-226.
- Dinnyes, A., Liu, J. & Nedambale, T.L. 2007. Novel gamete storage. *Reproduction, Fertility and Development* 19, 719-731.
- Garcia, J.C., Dominguez, J.C., Pena, F.J., Alegre, B., Gonzalez, R., Castro, M.J., Habing, G.G. & Kirkwood, R.N. 2010. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science* 119, 160-165.
- Gwathmey, T.M., Ignatz, G.G., Mueller, J.L., Manjunath, P. & Suarez, S.S. 2006. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. *Biology of Reproduction* 75, 501-507.
- Haugan, T., Gröhn, Y.T., Kommisrud, E., Ropstad, E. & Reksen, O. 2007. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science* 97, 1-11.
- Jiwakanon, J., Persson, E., Berg, M. & Dalin, A.M. 2011. Influence of seminal plasma, spermatozoa and semen extender on cytokine expression in the porcine endometrium after insemination. *Animal Reproduction Science* 123, 210-220.
- Kareskoski, A.M., Reilas, T., Sankari, S., Andersson, M., Güvenc, K. & Katila, T. 2010. Alkaline and Acid Phosphatase, β -Glucuronidase and Electrolyte Levels in Fractionated Stallion Ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals* 45, e369-e374.
- Kareskoski, A.M., Rivera Del Alamo, M.M., Güvenc, K., Reilas, T., Calvete, J.J., Rodriguez-Martinez, H., Andersson, M. & Katila, T. 2011. Protein Composition of Seminal Plasma in Fractionated Stallion Ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals* 46, e79-e84.

- Kareskoski, M. (2011). Components of fractionated stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. Doctorial thesis. Dept. of Production Animal Medicine, University of Helsinki.
- Kareskoski, M. & Katila, T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science* 107, 249-256.
- Koskinen, E., Karlsson, M., Reilas, T., Sankari, S., Esala, A.-L. & Katila, T. 2002. Catalase activity and total protein in fractionated stallion seminal plasma. *Theriogenology* 58, 337-340.
- Liberda, J., Kraus, M., Ryšlavá, H., Vlasáková, M., Jonáková, V. & Tichá, M. 2001. D-fructose-Binding Proteins in Bull Seminal Plasma: Isolation and Characterization. *Folia Biologica* 47, 113-119.
- Liberda, J., Ryslavá, H., Jelínková, P., Jonáková, V. & Tichá, M. 2002. Affinity chromatography of bull seminal proteins on mannan-Sepharose. *Journal of Chromatography B* 780, 231-239.
- Madej, M., Norrby, M., Madsen, MT., Johannisson, A., Hansen, C., Madej, A. 2011. The Effect of Boar Seminal Plasma on the Release of Prostaglandins and Interleukin-6 by Porcine Endometrial and Cervical Cells and Bovine Endometrial Cells. *Reproduction in Domestic Animals* doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01809.x
- Mukhopadhyay, C.S., Gupta, A.K., Yadav, B.R., Chauhan, I.S., Gupta, A., Mohanty, T.K. & Raina, V.S. 2011. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. *Livestock Science* 136, 114-121.
- Pesch, S.K. (2005). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Hengstejakulat sowie biochemische Analysen des Seminalplasmas. Doctorial thesis. Dept of Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Rodriguez-Martinez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Martinez, E.A., Sanz, L., Roca, J., Vazquez, J.M. & Calvete, J.J. (2010). Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *Journal of Reproductive Immunology* 84, 57-65.
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Roca, J. & Peña, F.J. 2008. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 70, 1242-1250.
- Rodríguez-Martínez, H., U, Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Sanz, L., Peña, F., Martínez, E., Roca, J., Vázquez, J. & Calvete, J. 2009. The Physiological roles of the boar ejaculate. *SocReprodFertil Suppl* 66, 1-21.
- Shore, L., Yehuda, R., Marcus, S., Bartoov, B. & Shemesh, M. 2003. Effect of hCG injection on prostaglandin E concentrations in ram seminal plasma. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 70, 291-301.
- Siqueira, A.P., Wallgren, M., Hossain, M.S., Johannisson, A., Sanz, L., Calvete, J.J. & Rodríguez-Martínez, H. 2011. Quality of boar spermatozoa from the sperm-peak portion of the ejaculate after simplified freezing in MiniFlatpacks compared to the remaining spermatozoa of the sperm-rich fraction. *Theriogenology* 75, 1175-1184.
- Sjaastad, Ø., Hove, K. & Sand, O. 2003. Reproduction. In: *Physiology of Domestic Animals* (ed. C. Steel), 627-633. Scandinavian Veterinary Press, Oslo, Norway.
- Tang, X. & Pikal, M. 2004. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research* 21, 191-200.

- Tannert, A., Kurz, A., Erlemann, K.-R., Müller, K., Herrmann, A., Schiller, J., Töpfer-Petersen, E., Manjunath, P. & Müller, P. 2007. The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine-containing lipids from the outer membrane leaflet. *European Biophysics Journal* 36, 461-475.
- Vera, O., Vásquez, L.A. & Gladys Muñoz, M. 2003. Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates. *Theriogenology* 60, 553-558.
- Yue, W., Shi, L., Bai, Z., Ren, Y. & Zhao, Y. 2009. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of ram seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. *Animal Reproduction Science* 116, 386-391.