



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Kan kolloidcentrifugering förbättra spermiekvaliteten hos hund?

Johanna Karlsson

Uppsala

2012

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:5*

Kan kolloidcentrifugering förbättra spermiekvaliteten hos hund?

Johanna Karlsson

Handledare: Eva Axné, Institutionen för Kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Jane Morrell, Institutionen för Kliniska vetenskaper
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, 22,5 hp

Nyckelord: SLC, hund, reproduktion, spermafrysning, kolloidcentrifugering
Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:5

INNEHÅLL

Sammanfattning	1
Abstract	1
Syfte	3
Bakgrund.....	3
Utvärdering av sperma.....	4
Motilitet	5
Membran.....	5
Morfologi.....	6
Centrifugering	6
Densitetsgradientcentrifugering.....	7
Material och metoder	8
Djur och insamling av prov	8
Medium.....	8
Ejakulatvolym.....	8
Spermiekoncentration	8
Motilitetsbedömning	9
Centrifugering och första spädning.....	9
Membranintegritet	9
Spermiemorfologi	9
Akrosomintegritet	10
Kylning och frysning	10
Upptining	10
Statistiska analyser.....	11
Resultat	12
Spermiekvalitet	12
Utvärdering av färsk sperma.....	12
Utvärdering av motilitet.....	12

Membranintegritet	14
Akrosomintegritet	14
Morfologi	15
Diskussion.....	16
Slutsats	17
Tack	18
Litteraturförteckning	19

SAMMANFATTNING

Denna studie undersökte om så kallad "Single layer centrifugation" (SLC) genom en silanöverdragen silikat kan selektera spermier med bättre kvalitet. SLC är en metod för att separera spermier med bra kvalitet från andra celler och seminalplasma genom att utnyttja deras olika densitet.

Egenskaperna hos spermier varierar mellan arter och därför även möjligheterna att spara och förvara spermier. Utvärdering av spermiekvalitet är viktigt för att förutsäga den fertila förmågan och även utvärdera påverkan de olika processerna som spermier utsätts för. I denna studie har spermiernas morfologi, motilitet, membranintegritet och akrosomintegritet undersöktes.

Ejakulat från sex hundar av olika ras och ålder användes. Ejakulaten delades i ett prov för SLC och en kontroll. Morfologiska undersökningar utfördes på spermalaboratoriet vid Sveriges Lantbruksuniversitet. Motiliteten bedömdes både subjektivt och med hjälp av datoranalys. Membran- och akrosomintegritet bedömdes i fluorescensmikroskop. De tre sistnämnda kontrollerna utfördes både före frysning samt 0 och 4 timmar efter upptining. Som frysbuffert användes UE-1 och UE-2.

Resultaten var lovande då man kunde se tendenser till att SLC var bättre än vanlig centrifugering på alla bedömda parametrar och den hade statistiskt signifikant bättre akrosomintegritet fyra timmar efter upptining.

Det skulle vara intressant med vidare studier på ett större antal hundar för att få mer tillförlitliga resultat och sedan gå vidare med studier för att undersöka om det går att rena hundesperma från bakterier. Detta för att kunna minska tillsatsen av antibiotika i spädningssvåtskor.

ABSTRACT

This study examined if so-called "single layer centrifugation" (SLC) through a silane-coated silica can select sperm with better quality. SLC is a method to separate spermatozoa with good quality from other cells and seminal plasma by exploiting their different densities.

The characteristics of sperm varies between species and therefore also the potential to save and store sperm. Evaluation of sperm quality is important for predicting the fertile ability and also to evaluate the impact of the various processes which sperm are exposed to. This study has examined sperm morphology, motility, membrane integrity and acrosome integrity.

Ejaculate from six dogs of different breed and age were used. The ejaculate was divided in one SLC-sample and one control sample. Morphological evaluation was carried out on semen laboratory at the Swedish University of Agricultural Sciences. Motility was assessed both subjectively and by computer analysis. Membrane and acrosome integrity was assessed in a fluorescence microscope. The last three checks were carried out both before freezing and 0 and 4 hours after thawing. UE-1 and UE-2 was used as freezing buffer.

The results were promising as you could see trends that the SLC was better than normal centrifugation on all the examined parameters and acrosome integrity 4 hours after thawing was significantly better.

It would be interesting with further studies on a larger number of dogs to get more reliable results and then proceed with studies to investigate the feasibility of clean dog semen from bacteria. This is to reduce the addition of the antibiotics in the buffer solutions.

SYFTE

Syftet med denna pilotstudie var att undersöka om det är möjligt att förbättra kvaliteten och frysbarheten på hundsperma, genom rening av ejakulat, från spermier av sämre kvalitet, andra celler och debri, med hjälp av centrifugering genom en kolloid, med avseende på motilitet, membranintegritet, akrosomintegritet och spermiemorfologi,. Vi ville även undersöka om denna centrifugeringsmetod fungerar bra ihop med frysningsprocessen samt kontrollera om man i processen inte bara förlorar spermier av sämre kvalitet utan även förlorar många spermier av hög kvalitet, vilket är oönskat.

Detta var en pilotstudie med ett litet antal hundar. I förlängningen skulle det vara intressant att öka antalet hundar/ejakulat och att se om metoden är användbar hos hundar med prostataproblem för att rena ejakulatet från blod och prostatavätska av sämre kvalitet, som har en negativ effekt på spermerna. Det vore även intressant att se om denna metod gör att man blir av med bakterier i sperman och på så vis kan minska tillsatsen av antibiotika i spädningvätskor för sperma. Idag används antibiotika i princip alla spädningvätskor för att förhindra tillväxt av bakterier som alltid förorenar ejakulatet. Då den ökande antibiotikaresistensen är ett ökat globalt problem bör man försöka minska användandet av antibiotika inom alla områden.

BAKGRUND

Spermielagring genomfördes första gången 1776 av Spallanzani och sedan dess har man arbetat med att utveckla och förfinas tekniken (Watson, 1979). Den första lyckade inseminationen på hund utfördes av samme man i Italien 1784 och ledde till att tiken fick 3 valpar (Foote, 2002).

Fördelarna med konserverad sperma är att viktiga avelshanor kan utnyttjas maximalt, då man kan transportera sperma långa sträckor. Man minskar även smittspridning, både av veneriska sjukdomar och av andra infektionssjukdomar. Förmågan att frysa och tina sperma varierar mellan arter och olika arter kan kräva olika spädningvätska. Kylförvaring är en möjlighet om sperman endast ska lagras några dagar, vid längre förvaring krävs det att man fryser sperman (Watson, 1979).

Frysförvaring av sperma har länge använts för att underlätta avel av produktionsdjur, det används också för att bevara hotade arter och inom fertilitetsbehandling hos människor.. Men hos de flesta arter får man en sänkt fertilitet efter frysförvaring jämfört med färsk sperma, detta genom en kombination flera eventuellt skadliga påfrestningar för spermerna, som till exempel temperaturförändringar, osmotiska förändringar och toxisk påverkan samt extracellulär isbildning. Temperaturförändringar innebär påfrestningar för membran och ändrar membranfunktionen. Kylning ökar membranpermeabiliteten och påverkar kalciumregleringen, vilket påverkar cellfunktionen (Watson, 2000).

Frysning av sperma påverkar både morfologi och biokemiska förhållanden som kan påverka fertiliteten. Spädningvätskans pH, bufferkapacitet, osmolaritet och energitillförsel är faktorer som måste tas hänsyn till vid val av spädningvätska.

Den ska också ge spermier skydd mot negativa effekter av kylning, frysning och tining, samt motverka tillväxt av bakterier (Watson, 1979).

Olika föreningar har visats ha en frysskyddande effekt. De delas upp i de som penetrerar cellen och de som stannar kvar extracellulärt. Glycerol, som kan tränga igenom plasmamembranet, har varit den mest använda frysskyddaren för spermier (Watson, 1979).

Påfrestningen vid isbildning beror framför allt på de osmotiska förändringar som uppstår i den ofrusna delen. Den osmotiska kraften ökar då de lösta ämnena fördelas upp i den kvarvarande vätskan. Andelen vätska som fryser beror på temperaturen, ju lägre temperatur desto större del som bildar is och desto högre osmotisk kraft. Snabb kylhastighet minimerar tiden för denna påfrestning, men samtidigt måste kylhastigheten vara tillräckligt långsam för att vatten ska kunna lämna cellen och hindra isbildning intracellulärt, som är dödlig för cellen (Watson, 2000).

Närvaro av äggula under kylningen ger en bättre överlevnad efter frysning och minskat antal akrosomskador. Ytterligare ökad överlevnad ses om äggula även finns närvarande under frysning. Spermernas överlevnad ökar i närvaro av glycerol, men det gör även akrosomskadorna som blir fler ju mer glycerol som används. I närvaro av äggula kan man minska glycerolmängden (Watson, 1975).

De Leeuw et al (1993) visade att äggula är viktig som frysskydd för spermier. Uteslutande av äggula gör att andelen spermier med intakt plasmamembran sjunker kraftigt både efter kylning och efter frysning/ting.

Behovet av antibiotika i spädningvätskor beror delvis på att sperman, vid AI, deponeras på en annan plats än vid naturlig parning. Det gör att honans normala skydd mot bakteriell kontamination inte fungerar. Förhållandena som sperman har förvarats under kan också ha gynnat bakteriell tillväxt. På grund av dessa anledningar används antibiotika profylaktiskt i spädningvätskor för sperma (Morrell & Wallgren, 2011).

Utvärdering av sperma

”Målet med utvärdering av sperma är att förutsäga spermernas fertila förmåga. En hane med optimal fertilitet producerar sperma med en hög andel motila, livskraftiga och morfologiskt normala spermier”(Peña Martínez, 2004).

Parametrar man tittar på är bland annat koncentration och totalantal spermier, motilitet, morfologi, akrosomintegritet och membraintegritet.

Utvärdering av spermakvalitet görs ofta genom motilitetsbedömning. Men tester visar att även andra parametrar är viktiga för kvalitetsbedömning. En kombination av motilitet och andra parametrar leder till en bättre värdering av fertiliteten (Watson, 1979), då det vid utvärdering av sperma finns det inte någon enstaka egenskap hos spermier som starkt motsvarar den faktiska fertiliteten (Amann & Hammerstedt, 1993).

Motilitet

Motilitet är den mest använda parametern för spermiefunktion. Spermies egen förmåga till motilitet är viktig för transporten i delar av hondjurets reproduktionsvägar (Watson, 1979). Motilitet uttrycks i andelen motila spermier, totalt eller progressivt motila. Motilitet bedöms ofta subjektivt i ljusmikroskop vid 37°C (Peña Martínez, 2004).

Computerized Assisted Sperm Analysis (CASA) gör det möjligt att objektivt bedöma andelen motila spermier och deras rörelsemönster. Datoranalys har visats vara exakt för prover med en hög andel motila spermier, men felaktig vid låg andel motila spermier (Amann & Hammerstedt, 1980). Då man vid datoranalys måste välja parametrar och inställningar som påverkar utvärderingen och den data man får ut så är datoranalyser inte helt objektiva (Ellington et al., 1993).

Med normal motilitet menas en snabb, progressiv framåtrörelse (Freshman, 2002).

Membran

Plasmamembranintegritet

Spermier kan färgas med olika färgkombinationer för att bedöma dess livskraft (Garner et al., 1994. Garner & Johnson, 1995). Membranintegriteten bedöms efter att man färgat cellerna med membran-impermeabla och membran-permeabla färger och genom dubbelfärgning kan man färga både levande och döda celler i samma preparat. SYBR-14 är membranpermeabel och deacyleras när den är i cellen, vilket gör att den inte kan ta sig tillbaka över plasmamembranet och ut ur spermiecellen igen, utan fångas inne i cellen. Genom att SYBR-14 binder till DNA i cellen fluorescensfärgas spermien. En levande cell lyser då klart grön. Om plasmamembranet är skadat lämnar SYBR-14 cellen och ingen infärgning sker (Silva & Gadella, 2006).

För döda celler kan man istället använda en färg, till exempel ethidium homodimer-1 (EthD-1) eller propidium jod (PI) som inte kan passera ett intakt membran. Det innebär att om cellen färgas in av någon av dess färger så har den någon typ av membranskada och lyser då rött, vilket blir en tydlig kontrast till de gröna cellerna (Silva & Gadella, 2006). Döende celler kan färgas både röda och gröna (Garner et al., 1994. Garner & Johnson, 1995).

Dessa färger har affinitet för DNA. Det gör att delar som inte är spermier, som t ex äggula från spändningsvätska, inte behöver avlägsnas då de inte innehåller DNA kommer de inte att färgas in och störa analysen (Silva & Gadella, 2006).

Akrosommembranintegritet

Akrosomen är fylld med hydrolytiska enzymer. Bindning mellan spermien och äggcellens zona pellucida startar akrosomreaktionen som ger frisättning och aktivering av dessa enzymer. Dessa hjälper spermien att penetrera zona pellucida (Primakoff & Myles, 2002).

Akrosomreaktionen krävs för spermies penetration genom zona pellucida. Akrosomreaktionen är nödvändig för att fertilisering ska kunna ske, då bara

spermier som genomgått akrosomreaktionen kan binda till och sammansmälta med ägget (Evans, 1999).

För att detta ska fungera måste akrosomen vara hel tills bindning mellan spermie och zona pellucida har skett. En för tidig akrosomreaktion leder till infertila spermier (Silva & Gadella, 2006). Bedömning av akrosomen är därför viktig för att utvärdera spermiers fertila förmåga (Zhang et al., 1990).

För att undersöka akrosomen kan man använda fluorescein isothiocyanatekonjugerad jordnötsagglutinin (FITC-PNA). Cheng et al (1996) visade att FITC-PNA bindningen bara skedde till akrosomen och att den var begränsad till det yttre akrosommembranet.

Olika akrosommönster kan utvärderas med fluorescensmikroskop efter permeabilisering och färgning med FITC-PNA. Permeabilisering förstör plasmamembranet och gör att färgen når det yttre akrosommembranet. Fluorescensmönstret kan delas in i fyra grupper: klar fluorescens som tyder på oskadat yttre akrosommembran, fläckig fluorescens av akrosomen som tyder på nedbrytning av akrosommembranet, ett fluorescerande band vid ekvatorialplanet som tyder på rester av det yttre akrosommembranet, ingen fluorescens som tyder på total förlust av det yttre akrosommembranet (Cheng et al., 1996).

Permeabilisering gör att alla spermier färgas röda av propidium jodid (Silva & Gadella, 2006), vilket gör det lättare att hitta spermier som helt saknar akrosom och därför inte färgas in alls av FITC-PNA (Axnér et al. 2004).

Morfologi

Det finns flera olika klassificeringssystem för spermimorfologi. Det går i ut på att skilja de normala spermierna och de med onormalt huvud/svans/mittstyck, samt att klassificera dessa med avvikande utseende utifrån den avvikelse de har. En spermie kan klassificeras med flera olika avvikelser (Seed et al., 1996).

Morfologi kan bedömas antingen genom en manuell subjektiv bedömning eller med hjälp av datoranalys (Verstegen et al., 2002).

Centrifugering

Assisterad reproduktion hos hund, som hos häst och människa, bygger inte alltid på att välja handjur baserat på individer med bäst spermiekvaliteten. Därför kan det krävas tekniker som ur ejakulatet kan skilja ut de spermier som har en högre kvalitet (Morrell, 2006).

Ett ejakulat innehåller spermier, seminalplasma, epitel- och immunceller, bakterier och cellavfall, även virus kan finnas närvarande (Morrell, 2006). Detta innehåll påverkar spermiernas överlevnad, t ex kan långvarig kontakt med seminalplasma leda till att spermier förlorar sin fertiliseringsförmåga. (Mortimer, 2000). Separation av motila spermier från resten av ejakulatet kan i laboratoriet göras genom densitetsgradientcentrifugering eller swim-up, det sistnämnda innebär att motila spermier kommer simma från ejakulatet in i ett medium placerat ovanpå ejakulatet (Morrell, 2006).

Densitetsgradientcentrifugering

Centrifugering i en densitetsgradient, som kolloiden innebär, kan användas för att separera olika celltyper. Detta genom att celler flyttar sig till den plats i kolloiden som motsvarar cellens egen densitet vid centrifugeringen. Spermier kommer att separeras från seminalplasman, bakterier, leukocyter, epitelceller och cellavfall på grund av att de har en annan densitet än det övriga innehållet i ejakulatet. Genom att förändra centrifugeringsvillkoren, tid eller centrifugalkraft, kan till slut alla celler hamna i pelleten. Noggrant val av centrifugeringstid och styrka kan separera motila och icke-motila spermier då motila spermier bättre kommer anpassa sig till centrifugalkraftens riktning och kan passera mellan kolloidpartiklarna och på så vis snabbare pellettera än de icke-motila. Omogna spermier och de med skadat DNA fastnar också i de övre gradientlagren på grund av att de har en annan densitet (Morrell, 2006). Spermier med intakt plasmamembran kan passera mellan kolloidpartiklarna medan spermier med skadat plasmamembran fastnar på kolloiden och kan inte hamna i pelleten. Spermier med normal svans simmar bättre än de med svansdefekter och kommer lättare att simma genom kolloiden. Huvuddefekter kan förändra densiteten och kan därför påverka hur snabbt spermien hamnar i pelleten. Det ger en pellet med motila och förhoppningsvis fertila spermier (Morrell, pers. medd.).

Single Layer Centrifugation (SLC) är en variant av densitetsgradientcentrifugering, men enklare då man bara använder ett lager av kolloid. Spermier rör sig neråt i röret under centrifugering, medan seminalplasman blir kvar ovanpå kolloiden (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2009). Studier på hingst har visat en bättre spermiekvalitet efter användning av SLC, till exempel en betydligt högre progressiv motilitet och ökad andel levande spermier än i ocentrifugerade prov (Macías García et al., 2009).

En tidigare studie på hund har visat att man får en högre medelmotilitet efter SLC och att andelen spermier med normal morfologi ökar. Man kunde även se en högre motilitet efter kylförvaring i de prover som genomgått SLC (Morrell et al., 2008).

Det har även visat att gradientcentrifugering ökar spermiers överlevnadstid i rumstemperatur, det tros bero på att bakterier och celler som kan bilda reaktiva syreföreningar avlägsnas under centrifugering. Det är viktigt att använda produkter som specialiserats för djurslaget för att få en bättre spermieöverlevnad (Morrell, 2006).

Hos människa har gradientcentrifugering visats öka livslängden för färsk sperma och öka andelen motila spermier både före och efter frysningförvaring (Allamaneni et al., 2005).

Bakterier i ejakulatet kan ha negativ effekt på fertiliteten, både indirekt genom att producera endotoxin, men även direkt genom att försämra motiliteten och orsaka agglutination av spermier (Kaur et al., 1988), påverka aksosomreaktionen (El-Mulla et al., 1996), samt ha en spermicid effekt (Kaur et al., 1986). En förberedelsesteknik som avlägsnar bakterier är att föredra framför tillägg av

antibiotika pga att antibiotika kan sakta ner embryots celledelning (Magli et al., 1996) och för att minska resistensutvecklingen.

Studier har visat att man kunnat avlägsna ekvint arteritvirus ur smittad sperma från hingst genom att kombinera gradientcentrifugering och swim-upmetoden (Morrell & Geraghty, 2006). I en nyligen publicerad studie visade Morrell & Wallgren (2011) att SLC kraftigt kan minska mängden bakterier eller avlägsna bakterier helt i sperma från galt. Även i studier på människa har gradientcentrifugering visats minska bakteriemängden kraftigt (Nicholson et al., 2000).

MATERIAL OCH METODER

Djur och insamling av prov

Sex privatägda, kliniskt friska hanhundar av olika ras, med en ålder mellan 1,5 år och 10,5 år, användes i denna studie. Innan insamling av sperma torkades förhuden av för att minska bakteriemängden i provet. Ett ejakulat från varje hund samlades in genom digital manipulation. Ejakulaten från de två sista hundarna blandades till ett prov för att nå upp i tillräcklig volym och refereras till som hund 5. Dispens från kravet att försöksdjur ska vara destinationsuppfödda var beviljat av Jordbruksverket (Dnr 31-109118/09) och djurägarna fick lämna en skriftlig tillåtelse att använda deras hund i försöket.

Medium

En frysbuffert, utvecklad vid SLU, med spädning i två steg användes. Första spädningen gjordes med UE-1 som innehåller 3,025 g TRIS, 1,7 g citronsyra, 1,25 g fruktos, 0,1 g streptomycin, 6 g bensylpenicillin löst i 0,3 ml destillerat vatten, 3 ml glycerol, 20 ml äggula löst i destillerat vatten till 77 ml, pH 6,72 (Schäfer-Somi et al., 2006).

Andra spädningen gjordes med UE-2 som innehåller 3,025 g TRIS, 1,7 g citronsyra, 1,25 g fruktos, 0,1 g streptomycin, 6 g bensylpenicillin löst i 0,3 ml destillerat vatten, 7 ml glycerol, 20 ml äggula, 1 ml Equexpasta löst i destillerat vatten till 72 ml, pH 6,74 (Peña & Linde-Forsberg, 2000ab, Schäfer-Somi et al., 2006).

Kolloiden består av glycidoxypropyltrimetoxysilan-överdragen silikat i en buffrad saltlösning, utvecklad av JM Morrell (Morrell & Wallgren, 2011).

Ejakulatvolym

Ejakulatvolymen mättes direkt efter ejakulation i den graderade uppsamlingsbägaren.

Spermiekoncentration

Spermiekoncentrationen mättes direkt efter ejakulation med hjälp av Canine SpermaCue fotometer och med NucleoCount SP-100 (ChemoMetec A/S, Danmark), som har en integrerad fluorescensdetektor. Mätningarna i NucleoCount utfördes med inställningar för hingst, enligt tillverkarens bruksanvisningar. 50 μ l spermaprov blandades med 5 ml S100, reagent som permeabiliserar spermerna så

att cellkärnan kan färgas in. Ca 50 µl av blandning dras upp i en kasset innehållande propidiumjodid (PI) och placeras i fluorescensdetektorn. Propidiumjodid passerar skadade cellmembran och färgar DNA i cellerna (<http://www.chemometec.com>).

Motilitetsbedömning

Andelen motila spermier bedömdes både subjektivt i ljusmikroskop vid x20 förstoring och genom datoriserad motilitetsanalys (Computer Assisted Sperm Analysis/CASA) Analys i CASA gjordes i programmet SpermVision med inställningar för hingst då inställningar för hund inte fanns tillgängligt. I åtta synfält, för varje prov, mättes både total och progressiv motilitet och ett genomsnitt från dessa mätningar användes. Motiliteten bedömdes vid båda metoderna på förvärmade objeksglas och värmeplatta som håller 38 °C. Motilitetsbedömning gjordes både direkt efter insamling av ejakulat (färsk sperma) och efter centrifugering med eller utan kolloid, samt 0 timmar och 4 timmar efter upptining av frysta prover.

Centrifugering och första spädning

Provet centrifugerades enligt en metod som kallas Single layer centrifugation (SLC). 4 ml av kolloiden placeras i ett centrifugeringsrör, spermaprovet pipetterades ovanpå kolloiden och centrifugerades i 300 G i 20 minuter och därefter togs supernatanten, som består av seminalplasma och celler som inte pelleterat, och det mesta av kolloiden bort. Pelleten löses upp i frys buffert UE-I.

Kontrollen centrifugerades i 700 G i 6 minuter. Supernatanten togs bort och pelleten löstes upp i frysbuffert UE-1.

Pellet från både SLC och kontroll fördes över i nya provrör och späddes efter det i frysbuffert 1 till en koncentration på 400 miljoner spermier/ml.

Membranintegritet

Efter centrifugering och delning av prov i SLC och kontroll bedömdes membranintegriteten. För bedömning av membranintegritet användes en dubbelfärgning. 15 µl spermieprov blandades med 3 µl EthD-1 (14µM) och 3 µl SYBR-14 (0,38µM). EthD-1 färgar alla döda spermier röda och SYBR-14 färgar levande spermier gröna. Lösningen inkuberades efter blandning i 37 °C i 30 minuter. Efter inkubationstiden placerades 2 µl av lösningen på ett objektsglas, även det förvämt i 37 °C. Direkt efter utstryket gjorts genomfördes en manuell räkning av 200 spermier per utstryk i fluorescensmikroskop. Spermerna bedömdes som gröna (levande), röd/gröna (döende) eller röda (döda) (Axnér et al 2004).

Spermiemorfologi

Fem µl av prov och kontroll användes för att göra helutstryk för Williamfärgning för bedömning av spermiehuvudsmorfologi. Utstryken lufttorkades innan färgning. Både prov och kontroll fixerades även i formol-saline för morfologibedömning av spermernas svans och mittstycke.

De morfologiska undersökningarna utfördes av personalen på spermalaboratoriet vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala. Bedömningen gjordes manuellt i ljusmikroskop. Från formol-saline räknades 200 spermier från varje prov och från Williamfärgning 500 spermier per utstryk (Peña & Linde-Forsberg, 2000ab).

Akrosomintegritet

Utstryk gjordes av 5 µl av både prov och kontroll på förvärmda (37°C) objektsglas för bedömning av akrosomintegritet. Efter lufttorkning permeabiliserades utstryken med hjälp av 96 % ethanol i 30 sekunder och fick sedan lufttorka i 4°C. En µl propidium jodid (340 µM) blandades med 20 µl FITC-PNA. Utstryken färgades med 20 µl av PI/FITC-PNA-blandningen och inkuberades mörkt i en fuktkammare i 4°C i 30 minuter. Efter inkubering sköljdes utstryken med kallt destillerat vatten. De förvarades sedan mörkt i 4°C till avläsning, förvaringstiden var maximalt tre dagar. Före avläsning monterades utstryken genom av 10 µl antifade droppades på objektglaset och täcktes med täckglas. Kanterna förseglades med nagellack för att glaset inte skulle glida (Axné et al. 2004).

Avläsning gjordes i fluorescensmikroskop. Tvåhundra spermier per utstryk bedömdes och delades utifrån fluorescensmönster in i tre olika grupper. Klar och jämn fluorescens bedömdes som intakt yttre akrosommembran, fläckig eller ojämn fluorescens bedömdes som skadat yttre akrosommembran och ett fluorescerande band i ekvatorialplanet eller avsaknad av fluorescens bedömdes som förlust av det yttre akrosommembranet (Cheng et al., 1996).

Kylning och frysning

Efter bedömning av motilitet, morfologi, membranintegritet, akrosomintegritet och koncentration placerades både prov och kontroll i en kyl under 75 minuter för att från rumstemperatur successivt kylas ner till 4 °C. Därefter späddes både prov och kontroll i 1:1 i frysbuffert 2, som också förvarats kylt i 4 °C, till en slutkoncentration på 200 miljoner spermier/ml. Lösningarna drogs upp i förmärkta strån på vardera 0,5 ml (100 miljoner spermier/strå) och sänktes under fem minuter successivt ner i tank med flytande kväve till -196°C (Peña & Linde-Forsberg, 2000ab)

Stråna frysförvarades sedan i en kvävetank under minst 2 dygn.

Upptining

Ett fruset strå per prov tinades upp genom att det placerades i ett vattenbad, med en temperatur på 70 °C, i 8 sekunder (Peña & Linde-Forsberg, 2000a). Sedan tömdes strået i 0,5 ml (samma volym som strået) Tris utan äggula. Efter det utfördes ytterligare en bedömning av motilitet, både subjektivt och med hjälp av CASA, samt utstryk för kontroll av akrosomintegritet och membranintegritet. Detta gjordes både direkt efter upptining och fyra timmar senare. Dessa processer och bedömningar utfördes på samma sätt som tidigare beskrivits.

Statistiska analyser

Den statistiska bearbetningen genomfördes med hjälp av ”repeated measures ANOVA” i SAS. Denna analys valdes då den tar hänsyn till att samma individ förekommer flera gånger och att man upprepar samma prov vid flera tidpunkter. Vid signifikant skillnad i ANOVA beräknades parvisa skillnader med LSM (Least Squares Means).

RESULTAT

Spermiekvalitet

Utvärdering av färsk sperma

Medelvärden för volym, koncentration, totalantal spermier och motilitet direkt efter insamling av sperma är summerade nedan (tabell 1).

Tabell 1. Spermaegenskaper direkt efter insamling

	Medelvärde ± SD
Volym (ml)	6,3 ± 2,56
Koncentration (x 10 ⁶ /ml)	89,2 ± 27, 02
Totalantal spermier	590 ± 318,73
Subjektiv motilitet (%)	84 ± 10,84
CASA Total motilitet (%)	80,92 ± 4,38
CASA Progressiv motilitet (%)	56,56 ± 9,21

Utvärdering av motilitet

Tabell 2 visar medelvärdet och standardavvikelsen för spermiernas motilitet vid tre tillfällen: efter centrifugering, direkt efter upptining och fyra timmar senare. Den subjektiva motilitet avser progressiv motilitet, motila icke progressiva spermier har inte tagits med i beräkningen.

Tabell 2. Medelvärde och standardavvikelse för subjektiv motilitet och motilitet bedömd med hjälp av datoranalys av färsk sperma och efter frysning/upptining (n = 5 för varje grupp)

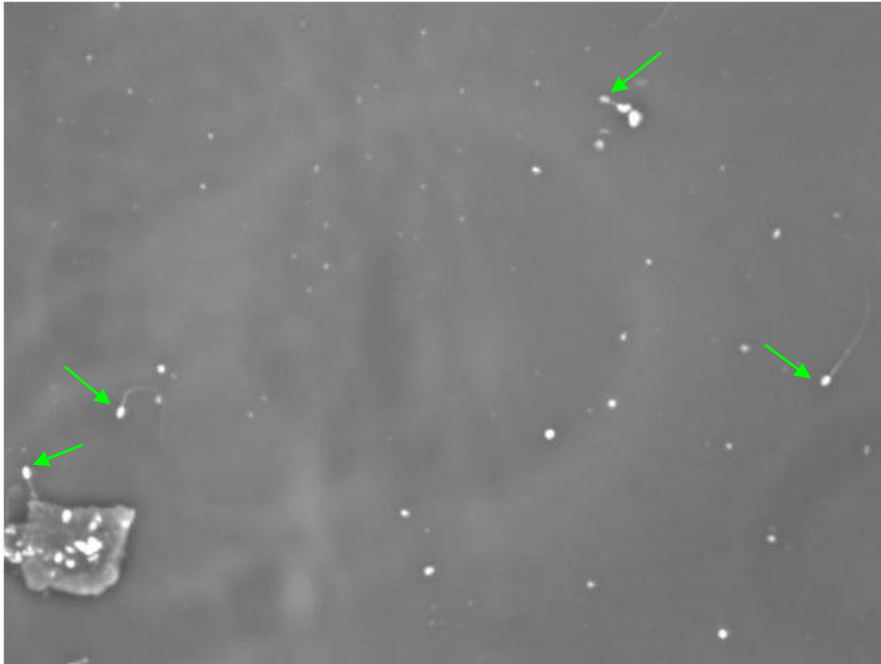
	Efter centrifugering		0 h efter upptining		4 h efter upptining	
	SLC	Kontroll	SLC	Kontroll	SLC	Kontroll
Subjektiv motilitet (%)	86,0 ± 4,2	74,0 ± 8,2	47,0 ± 25,6	52,5 ± 30, 7	22,0 ± 30,3	19,0 ± 17,8
CASA progressiv motilitet (%)	58,9 ± 11,9	59,6 ± 6,6	12,1 ± 3,3	12,8 ± 5,1	7,4 ± 10,0	7,8 ± 6,1
CASA total motilitet (%)	80,5 ± 7,2	84,6 ± 12,8	21,2 ± 8,4	22,6 ± 10,8	18,5 ± 17,2	19,2 ± 3,8

Generellt så ser SLC-proverna ut att ha en något högre andel motila spermier vid en subjektiv bedömning, men inga signifikanta skillnader finns mellan de olika metoderna (efter centrifugering P>0,43; 0 h efter upptining P>0,92; 4 h efter upptining P>0,78).

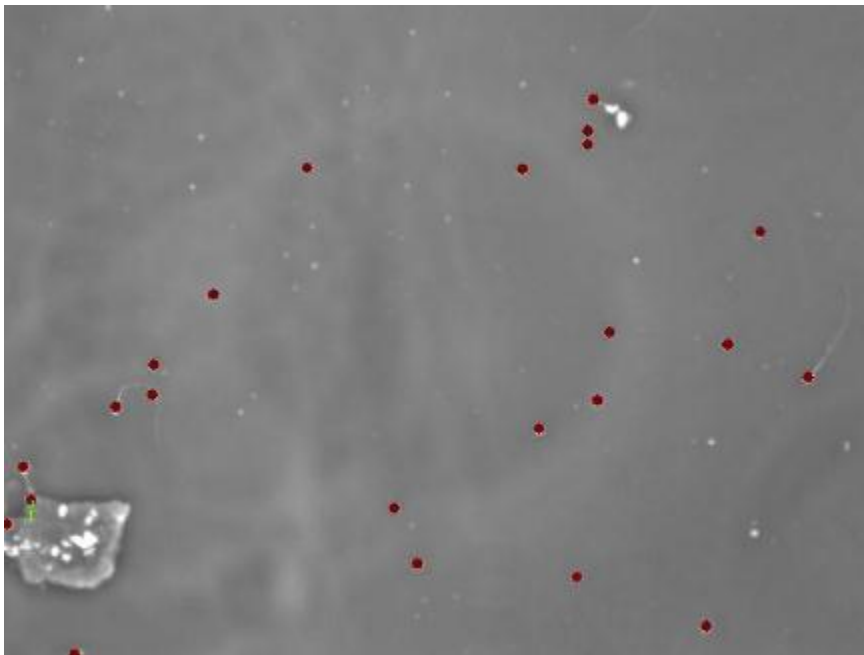
Datoranalysen har genomgående en lägre progressiv motilitet än den subjektiva bedömningen. En förklaring till det kan vara att programmet felaktigt räknar andra partiklar, än spermier, i spädningsvätskan som icke motila spermier och det ger ett falskt lågt resultat. Det kan bero på att äggulepartiklarna var likstora med storleken på spermiehuvudet hos hund och därför misstolkas som spermier av

programmet. På bilder (figur 4, figur 5) från datoranalysen kan man se att äggulepartiklar från spändningsvätskorna räknades som icke-motila spermier i, vilket då ger en lägre motilitet än det egentliga värdet. Då det såg ut att finnas mer äggula kvar i SLC-proverna så påverkar det framför allt dessa motilitetsvärden.

På bilderna (figur 4, figur 5), som är tagna ur spermieanalysprogrammet SpermVision, nedan ses samma fyra spermier.



Figur 4. Bild ur SpermVision som visar fyra spermier (markerade med gröna pilar).



Figur 5. Samma bild som i figur 4. De röda markeringarna är alla de partiklar som SpermVision räknar som icke-motila spermier.

Vid jämförelse av bilderna kan man se att datorprogrammet räknar betydligt fler partiklar som spermier än de som faktiskt finns.

I några prover var det relativt mycket agglutination mellan spermier och även det kan ha gett en lägre motilitet om många motila spermier agglutinerat och då inte kunnat räknas, eftersom det endast är solitära celler av en viss storlek som räknas.

Membranintegritet

Membranintegritet bedömdes i fluorescensmikroskop efter färgning med SYBR-14 och EthD-1. SYBR-14 färgar alla levande spermier gröna och EthD-1 färgar alla döda spermier röda. Döende spermier färgas in av båda färgerna och fluorescerar därför i både grönt och rött.

Tabell 3. Medelvärde och standardavvikelse för membranintegritet, uttryckt i procent, grön motsvarar levande spermier, röd/grön döende spermier och röd döda spermier

Prov	Tidpunkt	Membranintegritet		
		Grön	Röd/grön	Röd
SLC	Efter centrifugering	75,2 ± 6,1	7,3 ± 4,1	17,3 ± 7,7
Kontroll	Efter centrifugering	73,4 ± 5,9	7,1 ± 5,1	19,4 ± 10,5
SLC	0 h efter upptining	58,2 ± 17,9	15,9 ± 7,9	25,8 ± 19,2
Kontroll	0 h efter upptining	52,5 ± 16,4	19,4 ± 12,5	28,1 ± 14,8
SLC	4 h efter upptining	49,7 ± 10,7	24,7 ± 15	25,7 ± 10,7
Kontroll	4 h efter upptining	38,6 ± 8,2	28,2 ± 19,6	33,5 ± 16,2

Även för membranintegritet är tendensen att SLC generellt har något bättre resultat, men det är inte statistiskt signifikant (efter centrifugering $P > 0,78$; 0 h efter upptining $P > 0,39$; 4 h efter upptining $P > 0,10$).

Akrosomintegritet

Bedömning av akrosomintegritet gjordes vid tre tillfällen. Akrosommönstret delades in i tre grupper. Grupp 1: klart mönster som bedömdes som intakt yttre akrosommembran, grupp 2: fläckigt mönster som bedömdes som skadat akrosommembran, grupp 3: fluorescerande band eller ingen fluorescens som tyder på avsaknad av det yttre akrosommembranet. Fördelningen mellan dessa grupper visas i tabell 4.

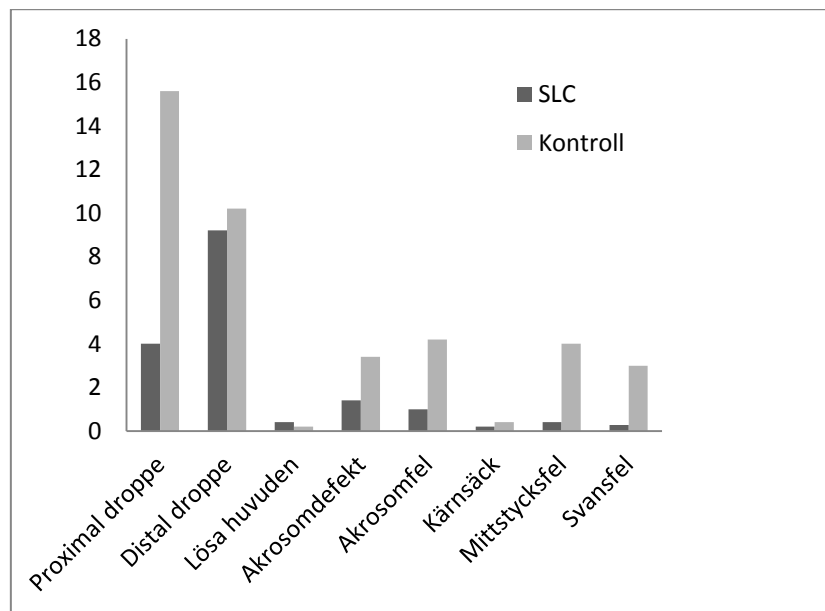
*Tabell 4. Medelvärden och standardavvikelser för akrosomintegritet. *statistiskt signifikant skillnad mellan SLC och kontroll ($P < 0,0006$)*

Akrosomintegritet	Efter centrifugering		0 h efter upptining		4 h efter upptining *	
	SLC	Kontroll	SLC	Kontroll	SLC	Kontroll
Intakt (%)	97,9 ± 2,0	96,8 ± 1,4	94,7 ± 3,0	90,3 ± 3,8	83,8 ± 9,6	68,6 ± 11,3
Skadat (%)	0,9 ± 1,1	1,3 ± 1,0	3,6 ± 1,6	6,6 ± 2,8	13,9 ± 8,2	21,8 ± 9,5
Avsaknad (%)	1,2 ± 0,9	1,8 ± 0,8	1,7 ± 1,4	3,1 ± 1,2	2,4 ± 1,6	9,3 ± 4,0

Efter centrifugering och direkt efter upptining kan ingen skillnad mellan SLC och kontrollen uppmätas, men efter fyra timmar är SLC signifikant bättre än kontrollerna.

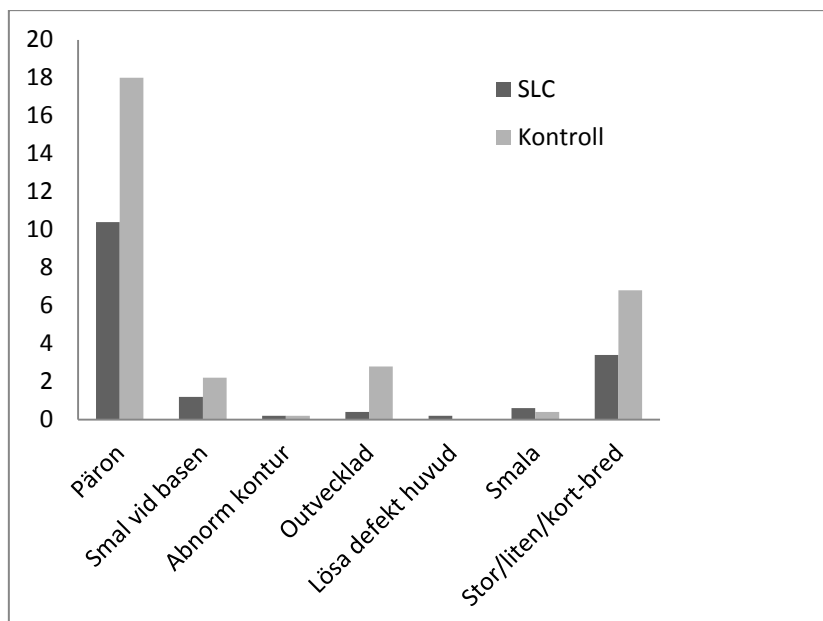
Morfologi

Medelvärdet för patologiska huvuden var i SLC-gruppen 3,28 % (standardavvikelse $\pm 1,93$), jämfört med kontrollgruppens 6,08 % (standardavvikelse $\pm 2,72$). Som man kan se i figur 1 och figur 2 har kontrollgruppen fler avvikelser morfologiskt på alla bedömda punkter förutom för lösa huvuden (SLC: medelvärde 0,4, SD $\pm 0,55$; kontroll: medelvärde 0,2, SD $\pm 0,45$).



Figur 1. Medelvärden för morfologiska avvikelser på svans och mittstycke.

Den största skillnaden kan ses på proximala droppar, men där är det framför allt hund 2 som höjer medelvärdet kraftigt. Den hunden hade ett högre värde på proximala droppar än resterande hundar även i SLC-gruppen. Bortser man från denna individ när det gäller proximala droppar är skillnaden liten mellan metoderna.



Figur 2. Medelvärden för morfologiska huvudavvikelser.

Vid bedömning av huvudets morfologi är andelen morfologiskt normala spermier högre i SLC-provet än i kontrollen för alla hundarna (tabell 5).

Tabell 5. Visar andelen morfologiskt normala spermier. Genom att dra av värdet för andelen patologiska huvuden från det värde som är lägsta av andelen övriga i Williamfärgning och andelen övriga + distala droppar i formol-saline får man andelen normala spermier. ^aEndast räknad på williamutstryk

SLC	Andel normala spermier (%)	Kontroll	Andel normala spermier (%)
Hund 1	99 ^a	Hund 1	94-97 ^a
Hund 2	88-94	Hund 2	49-59
Hund 3	93-96	Hund 3	75-82
Hund 4	92-95	Hund 4	89-94
Hund 5	94-97	Hund 5	77-82

DISKUSSION

Denna studie visade lovande resultat då SLC-centrifugeringen verkar fungera bra på hundsperma. Det stämmer överens med resultaten från Morrell et al (2008), som visade en ökad motilitet och ökad andel morfologiskt normala spermier. Tidigare studier med gradientcentrifugering har hos andra djurslag och människa visat på en förbättrad motilitet hos spermerna efter frysning och upptining (Allamaneni et al., 2005; Macías García et al. 2009). I denna studie kunde inte en sådan signifikans påvisas. En orsak till det kan vara att studien endast innehöll ett väldigt litet antal individer. Vidare studier på ett större antal individer behövs för att säkert kunna uttala sig om resultatet. Resultatet i denna studie liknar resultaten från studier på hingst där man fått en högre andel motila och ökad andel levande

spermier vid användning av SLC (Macías García et al., 2009) och det skulle därför vara intressant att gå vidare med en större studie.

Vid eventuellt vidare studier av effekten av denna kolloid på selektion av hundens spermier bör vid motilitetsanalys inställningar för korrekt djurslag användas i SpermVision. Problemen med datoranalysen visar att det är viktigt med en subjektiv bedömning i kombination med objektiva metoder.

Endast akrosomintegritet 4 timmar efter upptining visade en statistiskt signifikant skillnad mellan SLC och kontrollen, med bättre resultat för SLC. Men flera av de andra medelvärdena se ut att tala till fördel för SLC. Det låga antalet individer i studien kan ha bidragit till att övriga parametrar inte skiljde sig signifikant mellan kontroller och SLC.

Om man tittar på morfologiska avvikelser har SLC genomgående bättre resultat än kontrollgruppen. Det talar för att centrifugeringen ger en selektion för spermier av högre morfologisk kvalitet, även om det inte är statistiskt säkerställt.

Hundarna i denna studie har inte valts ut baserat på spermiekvalitet och kvaliteten har därför varit varierande i ursprungsprovet mellan olika individer.

En fråga som kommer upp är varför man lyckats få så bra resultat på hingst med samma metod, när denna studie inte kan visa mer än en signifikant skillnad. En anledning kan vara att det behöver utvecklas en till hund mer anpassad kolloid, då denna behöver vara specialiserad för djurslaget (Morrell, 2006).

Det hade varit intressant att göra de olika analyserna som utförts även på de spermier som selekterades bort vid kolloidcentrifugeringen, för att säkerställa att det framför allt är spermier av sämre kvalitet som selekteras bort, det vill säga att man inte förlorar många spermier med bra kvalitet i centrifugeringen. Men på grund av tidsbrist gjordes inte detta.

Ett antal felkällor bör tas hänsyn till. Då alla analyser och bedömningar, utom morfologi, har utförts av mig själv, så kan ovanan att utföra göra detta ha påverkat bedömning och klassificering. Men då det bör ha påverkat både SLC-gruppen samt kontrollgruppen i samma utsträckning bör det därför inte gett någon stor effekt på resultatet. En annan felkälla är att providentiteten (SLC eller kontroll) på det prov som bedömts oftast varit känd för mig och det kan därför omedvetet ha påverkat min bedömning, det gäller både vid subjektiv motilitetsbedömning och vid bedömning av membran- och akrosomintegritet. Närvaro av agglutination i en del prover kan även det ha påverkat analyser och bedömning. Det är också bara ett relativt litet antal spermier som bedöms i varje analys, till exempel 200 spermier vid membranintegritet, från ett prov innehållande flera miljoner spermier.

SLUTSATS

Resultaten i denna studie är lovande. Det finns en tydlig tendens till bättre kvalitet hos de spermier som centrifugerats genom kolloiden, i alla de tester som har utförts. Men det går inte att med statistisk signifikans säga att metoden är bättre än

vanlig centrifugering, förutom när det gäller akrosomintegritet fyra timmar efter upptining, då SLC visade sig statistiskt bättre än vanlig centrifugering.

För att få säkrare värden skulle det vara intressant att utföra en studie med ett större antal individer. Om de resultaten är positiva då gå vidare med studier för att se om det går att rena även hundsperma från bakterier och virus.

TACK

Jag vill tacka min två handledare, Eva Axné och Jane Morrell, för er hjälp med detta arbete.

Jag vill även tacka Karin Selin-Wretling för tålamodet att svara på alla mina frågor och hjälp med morfologibedömning.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Allamaneni et al. (2005) Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved semen. *Asian J Androl* 7, 1, 86–92.
- Amann, R. P. & Hammersted, R. H. (1980) Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction* vol. 23 no. 3 647-656.
- Amann, R. P. & Hammersted, R. H. (1993) In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of andrology*, vol 14, no 6.
- Axnér, E. et al. (2004) The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 84, 179-191.
- Cheng et al. (1996) Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucid-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of andrology*, vol 17, no 6.
- De Leeuw, F. E et al. (1993) Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30, 32–44.
- Ellington et al. (1993) Computer-assisted analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Theriogenology*, vol. 40, 725–733
- El-Mulla, K. F. et al. (1996) In Vitro Effect of Escherichia Coli on Human Sperm Acrosome Reaction. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, vol. 37, no. 2, 73-78.
- Evans, J. P. (1999) Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interaction. *Frontiers in bioscience*, 4, 114-131.
- Foote, R. H. (2002) The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of animal science*, 80, 1-10.
- Freshman, J. L. (2002) Clinical management of the subfertile stud dog. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* vol. 17, Issue 3, 104-107.
- Garner, D. L. et al. (1994) Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of andrology*, vol 15, no 6.
- Garner, D. L. & Johnson, L. A. (1995) Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of reproduction*, vol 53, no 2, 276-284.
- Kaur, M. et al. (1986) Bacteriology of the cervix in cases of infertility: effect on human sperm. *Am J Reprod Immunol Microbiol.*, Sep;12(1), 21-4.
- Kaur, M. et al. (1988) Bacteriology of the cervix in case of infertility: effect on human and animal spermatozoa and role of elastase. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 17(1), 14-7.
- Macías García, B. et al. (2009) Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science* vol. 114, Issues 1-3, 193-202.
- Magli, M. C. et al. (1996) Improved cleavage rate of human embryos cultured in antibiotic-free medium. *Human Reproduction* vol. 11 no. 7, 1520-1524.
- Morrell, J. M. 2011-12-06. Personligt meddelande

- Morrell, J. M. & Wallgren, M. (2011) Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science* 123, 64–69
- Morrell, J. M. & Rodriguez-Martinez, H. (2009) Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal*, 1, 1-9
- Morrell, J. M. et al. (2008) Single layer centrifugation on a colloid selects motile and morphologically normal spermatozoa from dog semen: preliminary results. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 61. Abst. P29.
- Morrell, J. M. (2006) Update on Semen Technologies for Animal Breeding. *Reprod Dom Anim* 41, 63–67.
- Morrell, J. M. & Geraghty, R. M. (2006) Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Veterinary Journal*, 38 (3) 224-229
- Mortimer, D. (2000) Sperm preparation methods. *Journal of andrology*, vol. 21, no.3
- Nicholson, C. M. (2000) Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Human Reproduction*, vol 15, no 3, 662-666
- Peña A. and Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one-or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. (2000a) *Theriogenology*, 54, 859-875.
- Peña A. and Linde-Forsberg C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. (2000b) *Theriogenology* 54, 703-718.
- Peña Martínez, A. I. (2004) Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science* 82–83, 209–224.
- Primakoff, P. & Myles, D. G. (2002) Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction. *Science*, vol. 296, no. 5576, 2183-2185
- Silva, P. F. N & Gadella, B. M. (2006) Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, vol. 65, issue 5, 958-978.
- Schäfer-Somi, S. et al. (2006) Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* vol. 66, issue 2, 173–182.
- Tsutsui, T. et al. (2003) Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. *J. Vet. Med. Sci.* ,65, 307-312
- Zhang, J. et al. (1990) Acrosome reaction of stallion spermatozoa evaluated with monoclonal antibody and zona-free hamster eggs. *Molecular reproduction and development*, 27, 152-158.
- Verstegen, J. et al. (2002) Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* vol. 57, issue 1, 149-179.
- Watson, P. F. & Martin, I. C. A. (1975) Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28, 153-9.
- Watson, P. F. (1979) The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Vol. 1. 283-350. Oxford: Clarendon Press. C.A. Finn (Ed.).
- Watson, P. F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60–61, 481–492.

Elektroniska dokument

<http://www.chemometec.com/>. NucleoCounter Sp-100. [accessdatum 2011-12-08]