



*Sveriges lantbruksuniversitet*

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper

# Påverkan av frysning på spermiemorfologin hos kattdjur, med tamkatt som modelldjur

Johanna Larsson

*Uppsala*

2012

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

ISSN 1652-8697  
*Examensarbete 2012:21*

# Påverkan av frysning på spermimorfologin hos kattdjur, med tamkatt som modelldjur

Johanna Larsson

*Handledare: Eva Axnér, Institutionen för kliniska vetenskaper*  
*Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012*  
*Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap*  
*Institutionen för kliniska vetenskaper*  
*Kurskod: EX0239, Nivå AXX, 27 hp*

*Nyckelord: fertilitet, spermimorfologi, katt, feline, lodjur*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>*  
*ISSN 1652-8697*  
*Examensarbete 2012:21*

## *INNEHÅLLSFÖRTECKNING*

<b>SAMMANFATTNING</b> .....	4
<b>SUMMARY</b> .....	4
<b>INLEDNING</b> .....	5
<b>LITTERATURÖVERSIKT</b> .....	6
<b>Fertilitetsläget hos vilda kattdjur i Sverige och Europa</b> .....	6
<b>Orsaker till infertilitet hos vilda kattdjur</b> .....	7
<b>Spermiemorfologi som ett mått på fertilitet</b> .....	8
Normal spermatogenes och spermiogenes .....	8
Specifika avvikelser i spermiemorfologin.....	9
<b>SYFTE</b> .....	12
<b>MATERIAL OCH METODER</b> .....	12
Spermainsamling.....	12
Morfologisk analys.....	13
Statistik.....	13
<b>RESULTAT</b> .....	13
<b>DISKUSSION</b> .....	15
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	16
<b>REFERENSLISTA</b> .....	16

## **SAMMANFATTNING**

Världens mest utrotningshotade kattdjur just nu (2011) är det Spanska lodjuret. Arten har visats ha dålig spermiekvalitet och en liten genetisk pool vilket försvårar räddningsarbetet. Det enda vilda svenska kattdjuret, det europeiska lodjuret, är i nuläget ingen utrotningshotad kattart, men kunskap om artens reproduktion är viktigt vid beslut om förvaltning av populationen. Det Europeiska lodjuret har dessutom använts som modelldjur för det hotade Spanska lodjuret. Vid basala studier av till exempel undersökningsmetoder kan det vara lämpligt att använda ett tamdjur som modelldjur för vilda djur varför tamkatten ofta används som modelldjur för vilda kattdjur. Vid fertilitetsundersökningar hos olika djurslag undersöker man rutinmässigt spermiernas koncentration, morfologi och motilitet. Samma undersökningsgång kan även tillämpas vid fertilitetsövervakning av svenska viltstammar.

Ibland har man bara frysta organ från vilda djur att tillgå men inga studier har gjorts på hur vanlig frysning påverkar spermiernas morfologi. Syftet med den här studien var att se hur frysning påverkade spermimorfologin. Tamkatten användes som modelldjur. I studien ingick spermier från 16 testikelpar från friska, kastrerade tamkatter, där den ena testikeln först frystes och den andra var färsk vid fixering av spermier. Spermieproverna undersöktes med avseende på morfologi. Det förelåg en statistiskt signifikant skillnad mellan färska och frysta preparat på två av de parametrar som undersöktes, svansfel ( $p < 0,01$ ) och distala droppar ( $p < 0,00$ ) där prover som hade varit frysta hade falskt bättre spermimorfologi. Det är således viktigt att beakta hur frysning påverkar spermiernas morfologi då tidigare fryst material används vid fertilitetsövervakning.

## **SUMMARY**

The most endangered cat species in the world is the Iberian Lynx. In Sweden the only wild felid is the European Lynx which is not a species threatened by extinction, at the present (2011). However, there are other species of the Felida family, who are showing signs of decreased fertility. Poor sperm quality and a small genetic pool, complicates the efforts of rescuing the species. When evaluating fertility in animals, sperm morphology, motility and concentration are routinely measured. However, sometimes only frozen organs from wild animals are available, yet there has been no study on the impact of freezing on the morphology of the sperm cells. The aim of this study was to evaluate if the freezing process affects the sperm morphology. Testicles from healthy, castrated domestic cats ( $n=16$ ) were collected for the trial. Spermatozoa were fixed from one of the testicles in each pair, and the

other testicle was frozen before fixation of the spermatozoa. All samples containing sperm cells were evaluated for sperm morphology. There was a statistically significant difference between fresh and frozen samples, for simple tail defects ( $p < 0.01$ ) and distal droplets ( $p < 0.00$ ). The conclusion was that freezing affects sperm morphology and that this has to be considered when using frozen material for fertility studies.

## INLEDNING

Spermiemorfologi ingår som en viktig del i fertilitetsbedömning av handjur. Fertilitetsbedömning på djursidan i Sverige idag (2011) syftar främst till att kvalitetssäkra sperma som används inom semin, framför allt gäller detta djurslagen nöt och gris. Även individer av andra djurslag, såsom hundar och hästar, genomgår ibland spermatologiska undersökningar. Detta kan ske i samband med artificiell insemination, innan betäckningssäsongen börjar eller tillsammans med andra andrologiska undersökningar vid misstanke om patologiska tillstånd i könsorganen och/eller infertilitet.

En annan viktig aspekt är dock fertilitetsövervakning av den vilda djurfaunan. Av särskild betydelse är det för de arter som löper störst risk att drabbas av inavel, det vill säga de mindre populationerna, eller de som kan tänkas ackumulera miljögifter, det vill säga predatorerna. Fruktsamhetsstörningar kan vara en tidig indikator på olika typer av störningar i miljön och kan även orsakas av inavel.

I detta examensarbete används tamkatten som modelldjur. I Sverige har vi bara det Europeiska lodjuret som vilt levande kattdjur. Arten visar god förmåga att fortplanta sig enligt rapport från Länsstyrelsens hemsida (Länsstyrelsen, 2010), men mer forskning behövs för att säkert kunna uttala sig om det Europeiska lodjurets egentliga fertilitetsläge. För att kunna bedöma effekter av eventuella miljöförändringar behöver man också ha basdata att jämföra med.

Av de vilda kattdjuren är i nuläget det Spanska lodjuret den art som är mest hotad att gå under och olika försök att rädda arten pågår (Palomares 2011). Vilda kattdjur i hägn riskerar att drabbas av inavel då den genetiska poolen är liten och partnerpreferens samt situationen i fångenskap ibland kan medföra att djuren inte reproducerar sig (Wells et al. 2004). Sjukdomstrycket är även högre på katter som lever i hägn i till exempel djurparker.

Utvärdering av spermernas utseende, deras morfologi, är en viktig del i en fertilitetsutredning. Man tittar bland annat efter olika huvuddefekter som olika storlekar och former på spermiehuvuden, och även svans- och mittstycksfel, samt akrosomfel. Defekter i spermimorfologin innebär i många fall en nedsatt fertilitet (Bart & Oko 1989, Love 2011). Utöver spermimorfologi brukar spermernas motilitet och koncentration mätas vid en fertilitetsutredning.

Ibland finns det bara organ som varit frysta att tillgå från vilda djur. Detta kan bero på att organen har lagrats frysta i väntan på obduktion eller att det varit minusgrader utomhus.

Studiens syfte är att ta reda på om fryst material visar en tillförlitlig bild avseende spermimorfologi.

## **LITTERATURÖVERSIKT**

### **Fertilitetsläget hos vilda kattdjur i Sverige och Europa**

Det enda vilda kattdjuret som finns i Sverige är det Europeiska lodjuret (*Lynx Lynx*). Det svenska lodjursstammen uppskattades 2008 bestå av 1500-2000 individer, och 2010 kunde 211 säkra föryngringar och 2 misslyckade dokumenteras (Länsstyrelsen, 2010). Lodjuret är en skyddad art, men då den äter kött och ibland tar tama djur som byte har konkurrens uppstått mellan människa och lodjur. Licensjakt på lodjur infördes i Sverige 2004.

Studier av olika slag utförs på svenska lodjur som inkommit till Statens Veterinärmedicinska Anstalt i samband med licensjakten eller som dött av annan orsak (SVA, 2011). Organen är ibland svåra att utvärdera på grund av förruttnelse, intorkning eller annan typ av skada (Axner et al. 2008b). Vid en eventuell fertilitetsutredning innebär det problem att organen är i så dåligt skick. Ett annat problem med fertilitetsövervakning hos kattdjur är att de kan ha hög andel abnorma spermier men ändå vara fertila (Pukazhenti et al. 2006, Axner & Linde-Forsberg 2007). Exakt vart gränsen går då ett kattdjur är sterilt på grund av för många abnorma spermier vet vi inte. I in vitro försök har man sett att sperma med stor andel defekta spermier är sämre på att penetrera Zona pellucida och befrukta ägg, jämfört med prov innehållande normala spermier (Howard et al. 1991). Genom att övervaka hur spermimorfologi och spermimotilitet förändras i en population över tid, kan man upptäcka negativa effekter på spermiekvaliteten innan det har utvecklats till en total infertilitet, vilket kan leda till en minskning av populationen.

Världens mest hotade art är just nu (2011) är det Spanska lodjuret (*Lynx pardinus*), där endast ca 200 vilt levande individer finns kvar i södra Spanien (Palomares et al. 2011). Man har sett att handjuren har små testiklar, låg spermiekoncentration och en låg andel normala spermier (Ganan et al. 2010). Räddningsarbetet försvåras av att det är svårt att få vilda katter att föröka sig i fångenskap (Wells et al. 2004). Hos geparder i fångenskap har man sett ökade kortisonnivåer i feaces i samband med flytt av djur, vilket tyder på stress och som verkar negativt på reproduktionen hos både hon och handjur. Flytt av avelsdjur mellan olika djurparker är dock nödvändigt för att minimera inavel och öka den genetiska poolen. I tillägg till sämre fruktsamhet är dessa djur också hårdare drabbade av sjukdom.

Ett alternativ till att flytta levande djur är artificiell insemination, men inte heller detta är utan komplikationer på kattdjur. Ägglossningen hos honkatter är beroende av manuellt stimuli då de har så kallad inducerad ovulation. Hondjurens brunst är starkt säsongsbunden hos vissa arter, och även handjuren tycks ibland också ha en viss säsongsvariation, vilket gör tidpunkten för AI svårbedömd (Axnér. 2008a). AI försvåras också av att många kattarter har en hög andel defekta spermier som gör konstgjord befruktning mer komplicerad (Pukazhenti et al. 2006).

Den Europeiska vildkatten (*Felis silvestris silvestris*), har inga fertilitetsproblem men arten hotas lokalt av att till stor del blandas ut med domesticerade katter (Oliveira et al. 2008). Detta ökar den genetiska poolen, men kan hota arten som sådan.

### **Orsaker till infertilitet hos vilda kattdjur**

Infertilitet hos människa, med förändringar i testikeln samt spermimotoilitet och kvalitet ses hos människor som utsatts för miljögifter såsom kadmium, kvicksilver och bisphenol A (Wong & Cheng 2011). Gifterna orsakar en oxidativ stress som förstör cell- junctions i testiklarna och andra organ. I förlängningen leder detta till minskad spermiekvalitet och minskad spermiekoncentration vilket kan leda till infertilitet. Spermiekvalitet hos människor har också setts variera beroende på vart man bor, vilket indikerar att ens närmiljö och vad man utsätts för har betydelse för fertiliteten (Giwercman et al 2011).

I ett japanskt försök där råttor utsattes för pesticider av organisk fosfortyp, kunde man konstatera att spermimotoiliteten minskade, samt att en ökad andel defekta spermier och cytoplasmatiska droppar kunde ses (Okamura et al. 2009).

Många kattarter har fått en allt sämre spermiebild de senaste två decennierna (Pukhazenti et al. 2006). Det har spekulerats att de krympande populationerna leder till en alltmer minskad genetisk pool och en ökad inavelsprocent, vilket skulle kunna vara en bidragande faktor.

### **Spermiemorfologi som ett mått på fertilitet**

Spermiemorfologiska undersökningar, ger tillsammans med spermiekoncentration och spermimotoilitet ett mått på handjurets fruktsamhet. Olika avvikelser i spermiemorfologin ger en bild av var ett eventuellt fel kan ha uppstått, exempelvis i testikeln eller i bitestikeln. Spermiedefekter kan även uppstå på grund av en felaktig hantering som orsakar artefakter (Barth & Oko 1989).

### ***Normal spermatogenes och spermiogenes***

Spermatogenesen är en process där en spermatogon stamcell differentieras till att bli en spermie (Barth & Oko 1989). Processen innefattar ett flertal mitotiska och meiotiska delningar, och flera cytoplasmiska förändringar innan den färdiga, avlånga könscellen är mogen. Spermierna bildas i testikelns ductus seminiferi, där stamcellerna alltid återfinns mest basalt i tubulin. Spermatocyterna, som är nästa steg i utvecklingen, återfinns i lagret ovanpå stamcellerna och har bildats genom flera mitotiska delningar. Nästa lager består av spermatider, som bildats ifrån spermatocyterna genom en lång process av meiotiska delningar. Dessa celler är runda från början och måste genomgå en rad förändringar innan de bildar det sista lagret av avlånga könsceller, som sedan släpper och hamnar i lumen av ductus seminiferi. Denna sista cellulära förändring som spermierna genomgår kallas för spermiogenes. Sertolicellerna vars cytoplasma omsluter könscellerna under differentieringen fungerar som stödjeceller som försörjer könscellerna med näring och hormonella signaler.

Vid en spermiemorfologisk undersökning räknas ett visst antal spermier och andelen defekter samt normala spermier listas. Spermierna klassificeras med hjälp av ett så kallat spermigram. Nedan följer en närmare beskrivning av de parametrar vi har tittat på i försöket.



### **Specifika avvikelser i spermiemorfologin**

*Cytoplasmatiska droppar* härstammar från överflödigt cytoplasma som flyttas från spermatidens huvud under spermiogenesen. Cytoplasmadroppar kan ses i en proximal eller distal position på flagellen, spermiesvansen (Barth & Oko 1989). När spermier lämnar testiklarna har de som regel en cytoplasmadroppe i en proximal position. Under passagen genom bitestikeln migrerar de proximala dropparna längs spermiers flagell och hamnar i en distal position. De flesta dropparna försvinner under passagen genom bitestikeln sista del eller vid ejakulationen. Förekomst av *proximala droppar* är ett tecken på onormal spermiogenes. Även vid så låg förekomst som 5- 10 % proximala droppar försämras spermimotoiliteten och därmed fertiliteten, vilket har setts hos tjurar. Troligen är det inte dropparna i sig som är problemet, de hänger ofta ihop med andra spermiedefekter till följd av en onormal spermiogenes. Små mängder *distala droppar* anses vara normalt i ett ejakulat.

Om man tar spermier direkt från bitestikeln, som vi gjort i det här försöket, kan man förvänta sig en högre andel distala droppar då dessa försvinner sent i passagen genom bitestikeln eller i samband med ejakulation (Barth & Oko 1989). Dropparnas förekomst är av betydelse vid insamling av sperma från bitestikeln från döda eller kastrerade djur där man vill bevara genetiskt material till exempel som en del av arbetet att bevara hotade arter (Nichi et al. 2007). Många cytoplasmatiska droppar i ett prov innebär nämligen en ökad oxidativ stress på spermier, vilket försämrar hållbarheten och kvaliteten på provet.

*Lösa huvuden* kan återfinnas i små kvantiteter hos normala handjur (Barth & Oko 1989). Högre nivåer av lösa huvuden hos tjurar ses ofta i samband med testikelhypoplasi, testikeldegeneration eller inflammation i sädesblåsor, ampuller eller bitestikeln. Samma fenomen ses vid tillstånd där testiklarna blir för varma, exempelvis vid fång eller andra sjukdomar då djuret ligger mycket. Fertiliteten beror på hur många normala spermier som finns kvar.

*Akrosomala defekter och fel* kan uppstå på många olika sätt under spermiogenesen (Barth & Oko 1989). Hos galtar har man kunnat observera hur en tungliknande framåtskjutning av akrosomen har bildats under processen då spermatidens kärna plattas och avsmalnar. Under vidare utveckling återgår akrosomen normalt sett till sitt ursprungliga läge och bara en liten förtjockning av kärnans framkant återstår. Förutom att denna tungliknande förskjutning av akrosomen, ses hos galt även andra akrosomfel, såsom invagination av akrosomala granula i nukleus, och Sertolicell cytoplasma som hamnat inuti akrosomenens matrix. Akrosomfelen

kan uppstå på grund av genetiska faktorer eller miljöfaktorer. Stress av olika slag, exempelvis sjukdom (systemisk eller lokaliserad till testikeln, ex testikeldegeneration), gifter eller undernäring kan vara involverade när man hittar många spermier med akrosomfel. Ju högre andel defekta spermier som finns i ett ejakulat, desto sämre fertilitet har handjuret. Detta beror på att akrosomen behövs för att spermien skall kunna fästa till ägget, tränga igenom zona pellucida och för att en zonareaktion skall kunna uppstå (Thundathil et al. 2000).

Vakuoler i spermiehuvudet, även kallat *kärnsäckar* består av cellmembran som invaginerats i kärnanplasman och ses i faskontrastmikroskop som ljusa runda strukturer (Barth & Oko 1989). De är vanligt förekommande i spermieprover. Hos tjurar ses en varierande incidens på <1% till 100%. Invaginationens orsak är ej helt utredd (2011), men uppstår redan tidigt under spermiogenesen då kärnan plattas ut och avsmalnar. Enstaka kärnsäckar påverkar inte förmågan att befrukta ägget men kan leda till en tidig embryonal död. Multipla kärnsäckar i en stor andel spermier sänker fertiliteten markant.

*Svansfel* uppstår oftast i bitestikeln där spermierna genomgår sin mognad men kan även uppstå i testikeln (Barth & Oko 1989). Man bör misstänka att felet sitter i testikeln om det förutom svansfel även finns en hög andel abnormala spermier av annan typ, såsom akrosomfel och avvikande huvudformer. Stödjevävsnaden i testikelsvansen bildar starka disulfid- bindningar när zink oxideras under mognadsfasen. Svansböjningar kan bero på svagheter i svansens yttre stödjevävnad till följd av för få disulfid-bindningar på grund av ett zinkunderskott. Även andra spårämnen har betydelse för att en korrekt utveckling av svansen skall ske, såsom selen och krom. I försök gjorda på råttor där den ena av djurgrupperna fick zinkfattig kost sågs en rad signifikanta, negativa effekter på testiklarna och spermierna i den gruppen jämfört med de andra (Kumari et al. 2011). Olika celler i testikeln gick i apoptos och spermierna visade upp en rad ökade defekter som akrosomfel, lösa huvuden och defekta huvudformer. Svansfel kan även uppstå då hydrolytiska droppar brister prematurt (Barth & Oko 1989). En liknande effekt fås också om man blandar spermier med hypoosmotisk vätska (Jeyendran et al.1984, Barth & Oko 1989, Matson et al 2008). Vatten tränger då in i cellen så att cellmembranet expanderar varpå en svansböjning uppstår. Det går inte att vid histologisk undersökning se om ett cellmembran är intakt (Jeyendran et al. 1984), utan speciella tester krävs, exempelvis hypo osmotic swelling- test (HOS) (Matson et al. 2008). Vid köldchock avger de cytoplastiska dropparna sina hydrolytiska ämnen och svansböjningar uppstår då av denna anledning (Barth & Oko 1989). För att undvika falskt höga nivåer av svansfel är det därför viktigt att man hanterar prov och provtagning korrekt vid spermimorfologiska

undersökningar. Prov med artefakter i form av böjda spermiesvansar saknar ofta distala droppar helt. Förekomsten av svansfel varierar mycket mellan olika ejakulat och djuren är oftast fertila om de har normala spermier också. Flagellen är den mest komplexa delen på spermien vilket gör att orsaken till olika svansfel är många. I en studie gjord på hingstar såg man en nedsatt fertilitet om andelen svansfel var hög (Love, C.C. 2011). Samma trend sågs på de flesta parametrar som anses onormala i ett spermieprov, inklusive cytoplasmatiska droppar, mittstycksfel och lösa defekta huvuden. *Mittstycksfel* förekommer ofta i lågt antal i normala ejakulat (Barth & Oko 1989). Denna del av spermiesvansen innehåller störst antal mitokondrier och är därför mycket viktig för spermies motilitet (Shahani et al. 2010). I en studie på tjurar av olika ras kunde man se att de raser med kortast mittstycken var de som hade sämst dräktighetsresultat vid insemination av kor.

*Päronformade huvuden* är den vanligaste abnormala huvudformen hos tjurar (Barth & Oko 1989). Den akrosomala delen av huvudet är då rundad och den postakrosomala delen är smal. Det finns en stor spännvidd på grader av päronformade huvuden och hela skalan kan förekomma i ett enda ejakulat vilket kan göra det svårt att skilja på normala och onormala huvudformer. *Smala* huvuden skiljer sig från de päronformade då hela kärnan förefaller smal, både i den akrosomala regionen och nedanför. Även dessa kan i mildare fall vara svåra att skilja från normala spermier. I ejakulat där dessa typer av spermieformer förekommer är det även vanligt att man ser en variation av storlek på huvuden, samt kärnsäckar. En liten andel huvuden som är smala eller päronformade förekommer normalt i ejakulat hos tjurar och påverkar inte fertiliteten. Vid en hög andel försämras fertiliteten men orsaken är inte helt utredd. Cellerna har en normal akrosom och ofta bra motilitet så de kan nå ägget och befrukta det, men av ännu (2011) okänd anledning initieras ingen delning i ägget och ingen dräktighet uppstår. Den vanligaste orsaken till att det bildas päronformade och smala huvuden är fel i testikelns temperaturreglering eller en endokrin störning i testikelfunktionen.

*Variérande storlek* på huvudet förekommer i högre grad oftast i närvaro av andra defekter, såsom akrosomfel, päronformade eller smala huvuden och kärnsäckar (Barth & Oko 1989). Olikt stora huvuden kan vara ett resultat av en ojämn delning av kromatinet under meiosen, och cellerna är troligen inte befruktningsdugliga. Dock är det ovanligt hos nöt, att andelen olikstora celler i ett ejakulat är så högt att det skulle ha någon praktisk betydelse.

*Abaxiala* svansar och accessoriska svansar hänger ihop, då det har visat sig att spermier med en abaxial svans ofta har dubbla inplantationsfossor (Barth & Oko 1989). Försök har visat att spermier med abaxiala svansar är befruktningsdugliga (Barth 1989).

Ejakulat från kattdjur som innehåller högre andel än 60% morfologiskt defekta spermier har definierats som teratozoospermiska (Pukazhenti et al. 2006) men det har visat sig att en relativt stor andel av alla tamkatter har en lägre andel normala spermier än 60% (Axné och Linde Forsberg 2007).

Inga studier har gjorts avseende hur frysning av testiklar och bitestiklar påverkar spermimorfologin hos kattdjur.

## **SYFTE**

Syftet med studien var att utvärdera om organ som varit frysta kan ge en tillförlitlig bild avseende spermimorfologi med tamkatten som modelldjur.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Spermiansamling**

Testiklarna och bitestiklarna varifrån sperman fixerades, kom ifrån friska kastrerade hankatter. Alla katter var över 6 månader och köns mogna. Verifiering av spermieförekomst i mikroskop gjordes på samtliga prov innan de fick ingå i försöket. Testiklarna med vidhängande bitestiklar samlades in från UDS och mindre kliniker inom Uppsala. Efter att katterna hade kastrerats placerades organen i ziplock- påsar, utan medium. Därefter förvarades påsarna kylt fram tills fixering av sperman, dock aldrig längre än 24 timmar. Organ som var äldre än 24 timmar exkluderades från försöket.

Spermier fixerades ifrån den ena bitestikelsvansen i varje testikelpar. Den andra testikeln frystes ned och förvarades fryst i minst 48 timmar innan spermier fixerades ifrån dennes bitestikelsvans. Varje spermieprov hade således sin egen kontroll, ett färskt och en fryst prov från varje djur.

Bitestikelsvansen dissekerades fram och rengjordes från hinnor och synliga blodkärl innan den klipptes av. Spermierna fixerades genom att bitestikeln finfördelades med en liten sax i 1 ml formol-saline. Alla prov fick stå och dra i 10 minuter innan organbitarna avlägsnades. Proverna med de fixerade spermierna förvarades därefter kylt fram till den spermimorfologiska undersökningen.

## **Morfologisk analys**

Spermiemorfologin undersöktes av Karin Selin Wretling på spermalab, Institutionen för Kliniska Vetenskaper, SLU. I varje enskilt prov differentialräknades 200 spermier i formol-saline fixerade våtpreparat, med avseende på proximala droppar, distala droppar, lösa huvuden, akrosomdefekter/fel, kärnsäckar, mittstycksfel, svansfel samt ”övriga”, det vill säga normala spermier (Bane 1961). Vid räkning av våtpreparat användes faskontrastmikroskop och 1000 x förstoring. På Williams-färgade utstryk från respektive prov undersöktes 500 spermier med avseende på huvudform i 1000 x förstoring i ljusmikroskop. Andelen svansfel kontrollräknades också i Williams-färgade preparat (Williams 1920, Lagerlöf 1934).

## **Statistik**

Eftersom alla 16 proven var parade och räknades statistiken på differensen mellan färska och frysta prov. T-test förutsätter att differenserna är normalfördelade. För icke-normalfördelade värden användes icke-parametriska Wilcoxon-test. Då T-testet respektive Wilcoxon-testet upprepades för flera parametrar gjordes en Bonferroni korrektion för ”multiple testing” vilket innebär att alla P-värden multiplicerades med antalet tester. Om p-värdet fortfarande var < 0,05 efter korrigeringen räknades det som statistiskt signifikant.

## **RESULTAT**

Det fanns klara skillnader i spermiemorfologin mellan färska och frysta preparat. Statistisk signifikant skillnad påvisades för enkla svansböjningar ( $p < 0,01$ ) och distala droppar ( $p < 0,00$ ), i båda fallen föreföll frysta preparat vara falskt bättre.

Tabell 1: Visar medelvärden, standardavvikelser och p-värden för de parametrar som var normalfördelade. Statistiken är uträknad med parade t-test.

	Prov taget före frysning, medelvärde	Prov taget efter frysning, medelvärde	P-värde	Korrigerat P-värde
Lösa huvuden	2,63 ± 2,6	3,03 ± 2,3	0,59	1,0
Akrosomdefekt	8,34 ± 11,5	6,31 ± 13,6	0,06	0,3
Kärnsäckar	2,78 ± 2,1	2,38 ± 1,8	0,23	1,0
Hoprullade under huvudet	2,41 ± 2,1	1,41 ± 2,9	0,13	0,65
Patologiska huvuden	14,54 ± 5,3	14,83 ± 5,9	0,73	1,0

Tabell 2: Parametrar uträknade med Wilcoxon's test. P-värden < 0,05 efter korrigering för "multiple testing" är statistiskt signifikanta.

	Median, före frysning (Range: Min- Max)	Median, efter frysning (Range: Min- Max)	P-värde	P-värde korrigerat för "multiple testing"
Proximala droppar	3,25 (1,00-10,50)	1,25 (0,00-9,50)	0,01	0,10
Distala droppar	20,75 (0,50-74,50)	0,00 (0,00-9,00)	0,00	<b>0,00</b>
Akrosomfel	1,00 (0,00-9,00)	3,00 (0,50-24,50)	0,01	0,11
Mittstycksfel	2,00 (0,00-7,50)	2,00 (0,50-10,00)	0,93	1,0
Enkel svansböjning	7,25 (0,00-36,50)	0,50 (0,00-3,50)	0,00	<b>0,01</b>
Dubbel svansböjning	0,75 (0,00-3,50)	0,00 (0,00-4,50)	0,14	1,0

## DISKUSSION

Frysning av testiklar/bitestiklar innan spermierna frisattes och fixerades gav en signifikant påverkan på spermimorfologin i denna studie. Statistiskt signifikanta skillnader sågs för enkla svansböjningar och distala droppar varför dessa parametrar kan vara vilseledande om de analyseras på prover från tidigare frysta organ. Svansböjningar rätar ut sig efter frysning och distala droppar försvinner, vilket gör att det frysta provet ger sken av att vara falskt bättre än det färska. Det går därför inte att dra några slutsatser med avseende på fertiliteten genom att titta på spermimorfologin utifrån ett sådant prov, i synnerhet inte om man använder sig av ett standardiserat spermioqram. Alla parametrar ändrades dock inte av frysning. Vissa sjukdomar i testiklarna, exempelvis testikeldegeneration ger en spermiebild med allvarliga fel som mittstycksfel, patologiska huvudformer och lösa huvuden (Barth & Oko 1989). Dessa parametrar visade ingen signifikant skillnad mellan färska och frysta prov, och borde kunna analyseras med tillförlitligt resultat, även från frysta prov. Akrosomfel och akrosomdefekter visade en icke-signifikant tendens att skilja sig mellan proverna och bör sannolikt tolkas med försiktighet på spermieprover samlade från frysta organ. En annan parameter som är intressant vid fertilitetsundersökningar är spermimotiliteten, men denna kunde inte bedömas i studien eftersom vanlig frysning till skillnad från kontrollerad fryskonservering av spermier dödar cellerna.

Spermiekoncentrationen förändras inte av frysningsprocessen, och är således en fullt användbar parameter att analysera även från frysta prov.

Den lägre andelen cytoplastiska droppar svansfel efter frysning beror troligen på att cellmembranen sprängs sönder av frysningsprocessen och svansarna rätar ut sig (Ando et al 2009). När spermier blandas med hypo-osmotiska vätskor ökar andelen svansböjningar markant (Matson et al 2008). Reaktionen uppkommer då vatten strömmar in i cellen och gör att membranet expanderar. Resultatet blir att en svansböjning uppstår, och reaktionen är beroende av att cellmembranet är intakt. Exempelvis så använder man en metod som kallas "Hypo osmotic swelling (HOS) för att identifiera intakta celler i ett spermprov. Testet är så tillförlitligt på att identifiera intakta spermier att man kan tänkas använda det som ett komplement till vanliga spermieanalyser för att hitta befruktningdugliga spermier (Jeyendran et al.1984). Detta fenomen stärker ytterligare misstanken om att cellmembranen i de frysta

proverna gått sönder av frysningsprocessen, vilket har resulterat i att svansböjningarna har rätat ut sig igen.

Färska organ, eller möjligen spermier fixerade från bitestikelsvansen i direkt samband med kastration, är vad som lämpar sig bäst för en tillförlitlig bedömning, om man har tänkt titta på alla parametrarna i ett spermioqram. Detta är dock inte alltid möjligt då man undersöker organ som kommer in från vilda djur, då organen kan vara torra eller ruttna. Med bättre rutiner vid insamling av organ från vilda djur, skulle möjligheten att göra en mer korrekt undersökning av fertilitet kunna öka. I de fall då endast frysta organ finns att tillgå bör spermioqrammet tolkas med försiktighet framför allt avseende distala droppar och enkla svansböjningar.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Jag vill tacka alla de kliniker som ställt upp med material till studien; UDS, Årsta veterinärklinik, Ekebys Djurpraktik.

Tack mamma som ställde upp med oundgänglig barnpassning.

Ett stort tack även till Ylva Brandt och Raquel Rodrigues för ett gott samarbete och för att ni så frikostigt delade med er av testiklar från ert projekt.

Tack också till Karin Selin Wretling på spermalab och till Institutionen Kliniska Vetenskaper, SLU för att jag under flera veckor fick ockupera ett dragskåp och för all hjälp från personalen på spermalab, där jag gjorde den praktiska delen av arbetet.

Slutligen vill jag tacka min fantastiska handledare Eva Axner för all hjälp, med statistiken, arbetet och för alla goda råd.

## **REFERENSLISTA**

- Ando, H. Fukuoka, M. Miyawaki, O. Watanabe, M. Suzuki, T. (2009) PFG-NMR study for evaluating freezing damage to onion tissue. *Biosci Biotechnol Biochem* 73 sid.1257-1261.
- Axner, E. (2008a) Updates on reproductive physiology, genital diseases and artificial insemination in the domestic cat. *Reprod Domest Anim* 43 sid.144-149.
- Axner E, Linde-Forsbeg C. (2007) Sperm morphology in the domestic cat and its relation with fertility, a retrospective study. *Reprod Dom Anim* 42 sid. 282-291.



- Axner, E. Uhlhorn, H. Ågren, E. Mörner, T. (2008b) Reproductive maturation in the male Eurasian lynx (*Lynx lynx*): a study on 55 reproductive organs collected from carcasses during 2002-2005. *Reprod Dom Anim* 44 sid. 467-473.
- Bane A. (1961) Acrosomal abnormality associated with sterility in a boar. *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. AI. N.v. Drukkerij Trio, The Hague, The Netherlands, June*, sid. 810-817.
- Barth, A.D. (1989) Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. *Can Vet J* 30 sid.656-662.
- Barth, A.D & Oko, R.J (1989) Abnormal morphology of bovine spermatozoa, Iowa, Iowa state university press, USA.
- Ganan, N. Sestelo, A. Garde, J.J. Martinez, F. Vargas, A. Sanchez, I. Perez-Aspa, M.J. López-Bao, J.V. Palomares, F. Gomendio, M. Roldan, E.R. (2010) Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* 139 sid. 275-285.
- Giwerzman, A. Chairman, Giwerzman Y.L, (2011) Environmental factors and testicular function. *Best practice and research clinical endocrinology and metabolism* 25 sid 391-402.
- Howard, J. Bush, M. Wildt, D.E. (1991) Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J Androl* 12 sid 36-45.
- Jeyendran, R.S, Van der Ven, H.H. Perez-Pelaez, M. Crabo, B.G. Zaneveld, L.J.D. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and it's relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 70 sid. 219-228.
- Kumari, D. Nair, N. Bedwal, R.S.(2011) Testicular apoptosis after dietary zinc deficiency: ultrastructural and TUNEL studies. *Syst Biol Reprod Med* 57 sid:233-243.
- Lagerlöf N. (1934) Morphologische Untersuchungen über Veränderungen im Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit verminderter oder aufgehobener Fertilität. *Acta Pathol. Microb. Scand. Suppl. 19*.
- Love, C.C. (2011) Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76 sid.547-557.
- Länsstyrelsen. Hemsida. [online] (2010-12-03) tillgänglig: [http://www.lcie.org/Docs/Regions/Scandinavia/VC\\_lo\\_2010.pdf](http://www.lcie.org/Docs/Regions/Scandinavia/VC_lo_2010.pdf) [2011-9-22]
- Matson, P. Kapelle, W. Malecki, I. (2008) The use of a hypo-osmotic swelling (HOS) test on sperm of the pig (*Sus scrofa domestica*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), Asian elephant (*Elephas maximus*), hamadryas baboon (*Papio hamadryas hamadryas*), and central rock rat (*Zygomys pedunculatus*). *Reproductive biology* 9 sid.181-187.
- Nichi, M. Goovaerts, I.G. Cortada, C.N. Barnabe, V.H. De Clercq, J.B. Bols, P.E. (2007) Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* 15 sid. 334-40.

- Okamura, A. Kamijima, M. Ohtani, K. Yamanoshita, O. Nakamura, D. Ito, Y. Miyata, M. Ueyama, J. Suzuki, T. Imai, R. Takagi, K. Nakajima, T. (2009) Broken sperm, cytoplasmic droplets and reduced sperm motility are principal markers of decreased sperm quality due to organophosphorus pesticides in rats. *J Occup Health* 51 sid.478-487.
- Oliveira, R. Godinho, R. Randi, E. Alves, P.C. (2008) Hybridization versus conservation: are domestic cats threatening the genetic integrity of wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in Iberian Peninsula? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363 sid.2953-2961.
- Palomares, F. Rodríguez, A. Revilla, E. López-Bao, J.V. (2011) Assessment of the conservation efforts to prevent extinction of the Iberian lynx. *Calzada J* 25 sid. 4-8.
- Pukazhenti, B.S. Neubauer, K. Jewgenow, K. Howard, J. Wildt, D.E. (2006) The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 66 sid. 112-121.
- Shahani, S.K. Revell, S.G. Argo, C.G. Murray, R.D. (2010) Mid-piece length of spermatozoa in different cattle breeds and its relationship to fertility. *Pak J Biol Sci* 13 sid.802-808.
- Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Hemsida. [online] (2011-09-21) tillgänglig: <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Vilda-djur/Rovdjur2/?lid=26627> [2011-11-13]
- Thundathil, J. Meyer, R. Palasz, A.T. Barth, A.D. Mapletoft, R.J. (2000) Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology* 54 sid.921-934.
- Wells, A. Terio, K.A. Ziccardi, M.H. Munson, L. J. (2004) The stress response to environmental change in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Zoo Wildl Med* 35 sid.8-14.
- Williams, W.W. (1920) Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. *Cornell Veterinarian* 10 sid.87-94.
- Wong, E.W.P. Cheng, C.Y. (2011) Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends in Pharmacological sciences* 32, sid. 290-299.