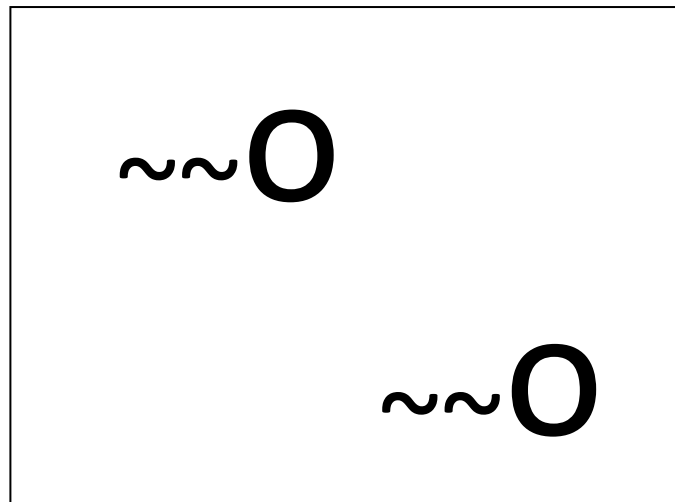


Livslängden hos kylgrade spermier vid artificiell insemination hos häst - kan den förlängas?

Elin Stahre



Examensarbete, 15 hp

Agronomprogrammet - Husdjur, examensarbete för kandidatexamen

Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Uppsala 2012



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

Livslängden hos kylagrade spermier vid artificiell insemination hos häst - kan den förlängas?

Longevity of cold stored spermatozoa in association with artificial insemination in the mare - can it be extended?

Elin Stahre

Handledare:

Anders Johannisson, SLU, Institutionen för anatomi och fysiologi

Examinator:

Andrzej Madej, SLU, Institutionen för anatomi och fysiologi

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Husdjursagronom

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2012

Omslagsbild: Elin Stahre

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

Nyckelord: överlevnad, semin, hingstar, häst, sperma, fryst, kylad, tinad

Key words: survival, longevity, semen, stallion, equine, spermatozoa, frozen, cold, thawed

Abstract

Over 90 % of the matings in 2011 in the Swedish Warmblood Association (SWB) occurred with artificial insemination (AI). AI has several advantages in breeding and one of them is that the stallion does not need to be present when a mare shows standing heat. The possibility to choose among both national and international stallions gives a major option of selection for the mare owner. In Sweden, semen is normally collected from the stallions three times a week. The stallion mounts a phantom horse and ejaculates into an artificial vagina. Despite much research, about 20 % of stallions still provide sperm that are not suitable for freezing.

Before cooling the seminal plasma is removed by centrifugation or is diluted for reducing the effect on spermatozoa. Seminal plasma has a positive effect on sperm at natural mating but may have a negative effect on spermatozoa during storage. A milk-based medium is then added to maintain a consistent quality during the cooling. Cooled semen is stored at a temperature of 4–6 °C to get as long durability as possible concerning motility and fertility. The semen for freezing is packed in straws and finally stored in containers with liquid nitrogen, they are also an important gene pool for the future. Two methods for improving the quality of semen are single layer centrifugation and column separation. Both methods aims to filter out damaged and motionless spermatozoa to get an enrichment of the sperm that may have the best probability to achieve a successful pregnancy result. At the thawing of frozen spermatozoa, chromatin damage and membrane integrity could be evaluated to get a good picture of sperm quality.

Sammanfattning

Över 90 % av betäckningarna inom Avelsföreningen för svenska varmblodiga hästen (ASVH) skedde med artificiell insemination (AI) år 2011. AI har många fördelar i avelsarbetet då hingsten inte behöver vara på plats när stoet brunstar, möjligheten att välja bland både nationella och internationella hingstar ger en stor valmöjlighet för stoägaren. I Sverige samlas sperma från hingstarna normalt sett tre gånger i veckan genom upphopp på en fantomhäst där ejakulatet samlas i en artificiell vagina. Trots mycket forskning är det fortfarande ca 20 % av hingstarna som lämnar spermier som inte lämpar sig för frysning.

Innan nedkylning centrifugeras seminalplasman bort eller späds ut för att reducera inverkan på spermerna. Seminalplasman har positiv inverkan på spermerna vid naturlig betäckning men kan ha negativ inverkan på spermerna under lagring. Ett mjölkbaserat medium tillsätts därefter för att upprätthålla en jämn kvalitet vid nerkyllning. Kyld semin förvaras i en temperatur på 4–6 °C för att få så lång hållbarhet som möjligt gällande motilitet och fertilitet. Sperman som ska frysas packas slutligen i strån och lagras i kärl med flytande kväve, dessa utgör även en viktig genbank inför framtiden. Två metoder för att höja kvaliteten på sperman är ”single layer” centrifugering och kolonnseparation. Båda metoder går ut på att sortera bort skadade och orörliga spermier för att få en anrikning av de spermier som tros ha bäst förutsättning till ett lyckat dräktighetsresultat. Vid upptinandet av frysta spermier kan kromatinskador och membranintegriteten undersökas för att få en bra bild av spermernas kvalitet.

Introduktion

År 1776 upptäckte den italienska vetenskapsmannen Lazzaro Spallanzani att hingstsperma kunde bevaras genom kylning (Saragusty et al., 2007). Det skulle dock dröja ända till år 1956 innan det första levande fölet föddes genom artificiell insemination (AI) med fryst sperma (Barker et al., 1957). I Sverige introducerades AI i slutet av 70-talet, användandet av kyld sperma började sedan användas i mitten av 80-talet (Lundgren, 2011). Inför avelssäsongen 2011 fanns det 219 hingstar verksamma inom Avelsföreningen för svenska varmlodiga hästen (ASVH) i Sverige. Totalt betäckte dessa hingstar 3684 ston, endast 135 stycken (3,7 %) av dessa betäckningar skedde på naturlig väg. Det innebär att hela 96,3 % av betäckningarna inom ASVH skedde med artificiell inseminering. 6,3 % av det totala antalet betäckningar skedde med fryst artificiell inseminering (ASVH, 2012a).

Kylförvarad sperma har använts rutinmässigt inom hästaveln de senaste 20 åren, dessvärre har fölningsprocenten sjunkit i takt med att användningen av den kylförvarade sperman ökat (Aurich & Aurich, 2006). Trots bra resurser och kunskap om fryst hingstsperma är det endast 20 % av hingstarna som har spermier som är helt opåverkade vid frysning (Tischner, 1979). I många europeiska länder, däribland Sverige, samlas sperman från hingsten tre gånger i veckan. Detta sker normalt sett på måndag, onsdag och fredag. Efter uppsamlandet kyls den utspädda sädesvätskan (seminet) ner till en temperatur av 4–6 °C för att kunna fraktas vidare till mottagarstoet. För att dräktigheten ska lyckas måste stoet insemineras vid rätt tidpunkt, detta kan bli ett problem med färsk semin (Morrell et al., 2011), då det krävs att hingsten finns tillgänglig då stoet brunstar. Fryst semin har flera fördelar i avelsarbetet, doserna kan användas när stoet har ovulation, hingstarna kan fortsätta tävla samtidigt som de medverkar i aveln då de kan tappas på spermier under hela året. Den frysta sperman är en viktig genbank som ger stoägaren större möjlighet att välja hingst även internationellt. En hingst kan användas många år efter sin död och eftersom ett ejakulat vid fryst semin resulterar i mellan 10-12 doser kan hingsten få fler avkommor än vid färsk semin. Den frysta sperman transporteras i flytande kväve och kräver en konstant temperatur (Loomis, 2001).

Fryst sperma har visat sig ge lägre fertilitet hos många hingstar och detta ger merkostnader för stoägarna (Papa et al., 2008). Dräktighetsprocenten per brunst för kyld sperma var 53,9 % jämfört med färsk sperma som gav 65,6 % enligt Dahlsten (2006). I flera studier där stora variationer i stoantalet har använts har det visat sig att mellan 32 och 73 % av stona blir dräktiga vid första insemineringen och 56-89 % blir dräktiga under en säsong (Loomis, 2001). Trots fertilitetsproblemen har få studier gjorts för att kunna hitta ett samband mellan fertilitet med fryst semin och laborietester. En anledning till det är att det är både dyrt och svårt att inseminera tillräckligt många ston för att kunna dra korrekta slutsatser och få ett statistiskt signifikant resultat (Katila, 2001).

Syftet med denna litteraturstudie är att jämföra fryst och kyld sperma och förklara vad begreppen innebär, samt att diskutera metoder för att förbättra spermieöverlevnaden.

Artificiell insemination (AI)

Hästbranschen i Sverige är under ständig tillväxt, sedan år 2004 har hästpopulationen ökat från uppskattningsvis 283 100 individer till 2011 års uppskattade nivå på 362 700 stycken. Detta innebär en ökning på totalt nära 80 000 hästar (Jordbruksverket, 2012). ASVH använder sig av en så kallad öppen stambok som innebär att individer från andra raser kan användas för

inkorsning. Urvalet av dessa individer baseras på deras härstamning och egna meriter. Vanligast förekommande är inkorsning av varmblodiga ridhästar från Tyskland, Holland och Danmark (ASVH, 2012b). Artificiell insemination inom hästaveln har blivit populärt och medför flera fördelar jämfört med naturlig betäckning. Valmöjligheten bland ett stort antal hingstar, även internationella samt dessas tillgänglighet i och med AI har lett till en ökad popularitet för metoden. I och med att stoet aldrig kommer i fysisk kontakt med hingsten minskar risken för överförbara infektionssjukdomar och risken för fysiska skador som kan uppkomma under betäckningen hos både sto och hingst (Janett et al., 2003).

Metoder för uppsamling

Ett ejakulat från hingsten består av spermier och seminalplasma. Seminalplasman är sekret från testiklarna, bitestiklarna och de accessoriska könskörtlarna (Kareskoski et al., 2010) som består av ampullan, sädesblåsan, prostatan och bulbouretralkörtlarna (Kareskoski et al., 2011). Ungefär 80 % av spermierna återfinns i de första tre strålarna (Tischner et al., 1974) av de normalt 6-9 strålarna när hingsten ejakulerar (Kareskoski & Katila, 2008). Vid naturlig betäckning har seminalplasman positiv inverkan på spermiernas funktion, transport och överlevnad i stoet. Däremot verkar seminalplasman ha negativ inverkan på spermierna under lagring och resulterar i minskad motilitet (Akçay et al., 2010).

Det finns ett flertal olika tekniker att för att samla upp hingstens ejakulat. Ejakulatet kan sedan användas som rå, färsk, fryst eller kyld. För att uppnå en hög spermiekoncentration och ett lågt innehåll av seminalplasma och föroreningar bör uppsamlingen ske genom att ge djuret så lite sexuell stimulans som möjligt (Aurich, 2008). Elektroejakulation är en metod som är vanligt förekommande hos nöt och gris men används inte hos häst på grund av skaderisken. Metoden går ut på att man med hjälp av en elektrisk sond stimulerar nerverna via rectum och på så vis orsakar ejakulation hos djuret. Uppsamlade spermier från vaginan på stoet efter naturlig betäckning eller insamling av spermier direkt från epididymis är också två tillvägagångssätt (Papa et al., 2008). I Sverige använder man sig dock vanligtvis av en annan metod där hingsten får hoppa på en fantomhäst och ejakulera i en artificiell vagina (Morrell et al., 2011).

Hantering av sperman

Rå och färsk semin

Efter att sperman samlats upp hanteras den på olika sätt beroende på när stoet ska insemineras. Rå semin samlas upp direkt från hingsten och insemineras inom 10 minuter i stoet som står på mottagarstationen (Shepherd, 2004). Hanteringen är viktig då spermierna är känsliga för plötsliga temperaturförändringar och ljus (Bedford-Guaus, 2007). Färsk semin kyls ner till 22 °C och kan sparas upp till 4 timmar efter att hingsten lämnat den (Shepherd, 2004).

Kyld och fryst semin

Sperma som kyls ner håller mellan 24-48 timmar (Jasko et al., 1992) om den förvaras kyld i mellan 5 och 10 °C (Shepherd, 2004), efter det sjunker dräktighetsresultatet drastiskt (Aurich, 2008). Mest optimalt gradantal anses vara mellan 4-6 grader för att kunna bevara motilitet och fertilitet under transporten (Moran et al., 1992). Innan nedkylning tas alltid seminalplasman bort genom centrifugering eller späds ut för att reducera dess inflytande på spermierna (Akçay

et al., 2006). Aktiva spermier har en hög metabolism i rumstemperatur och detta leder till en pH-sänkning i seminalplasman. Genom att tillsätta spädningssvätska så motverkas pH-sänkningen som påverkar spermerna negativt (Bäckgren, 2007). Därefter tillsätts vanligen ett medium baserat på mjölkprotein eller äggula för att upprätthålla en jämnare kvalitet (Aurich, 2008). Mediet innehåller en blandning av buffertar, salter, antibiotika, äggula och olika kolhydrater (Barbas & Mascarenhas, 2009) och fungerar som en näringskälla för spermerna. En bakteriell kontamination av sperman kan få negativa effekter på motiliteten (Aurich & Spergser, 2007), därför används antibiotika. Om den bearbetade sperman förvaras under anaeroba förhållanden i 5 °C är bakterietillväxten minimal och tillförseln av antibiotika är inte nödvändig (Price et al., 2008).

Den frysta sperman förvaras i kärl med flytande kväve i -196 °C. Innan sperman kan frysas förpackas den i smala plaströr, så kallade strån, med en volym på vanligtvis 0,5 eller 5 ml. De mindre stråna ger en jämnare nedfrysning än de större stråna, de större utsätts inte för samma temperaturförändring i hela röret samtidigt under processen. Däremot har de större stråna en fördel i att hanteringen vid upptining och inseminationen blir lättare av att hantera färre strån (Bedford-Guaus, 2007). Den vanligaste frysmetoden är långsam jämviktsfrysning. Rätt hastighet vid infrysningen är viktigt, går processen för långsamt kan spermerna skadas av dehydrering. Vid för snabbt händelseförlopp hinner inte vattnet gå ur spermerna snabbt nog för att en jämvikt ska kunna inträffa. Resultatet av det är att spermerna fryser intracellulärt och dör (Karlsson, 2011). Tack vare frysningsprocessen kan sperman förvaras under mycket lång tid då ämnesomsättningen hos spermerna avtar (Varner et al., 1989).

Användning, upptining och kvalitetskontroll

Vid frysnings- och upptiningsprocesser har det visat sig att skador på membran, döda celler, för tidig kapacitering och akrosomreaktion av spermerna kan orsakas. Detta kan vara svårt att se på de enkla motilitetstester som görs innan inseminering (Katila, 2001).

Hypo-osmotic swelling test (HOST)

Ett test som inte är rutinmässigt men som kan ge en god bild av spermernas kvalitet är hypo-osmotic swelling test (HOST). Det finns inget samband mellan spermiers motilitet och dess membran integritet. Tillvägagångssättet i HOST är att spermerna blandas i en hypo-osmotisk lösning där vattnet tränger in i spermien. Spermien försöker därmed uppnå osmotisk jämvikt och vid ett intakt flagellmembran kan detta ses i mikroskop som en krökning i svansregionen (Drevius & Eriksson 1966). Ett intakt membran innebär att spermerna har förmåga att transportera kemiska föreningar genom membranet vilket behövs för att kunna befrukta ägget (Jeyendran et al., 1984).

Kromatinstabilitet

Kromatin innehåller DNA och finns i spermens kärna. Om skador uppkommer på kromatinet kan det leda till en misslyckad befruktning av ägget eller en felaktig embryoutveckling (Hammar, 2007). Sperm chromatin structure assay (SCSA) är en metod för att bedöma andelen spermier med intakt kromatin i ett ejakulat. För att kontrollera detta behandlas spermerna med en lösning som exponerar DNA i kärnan och färgas därefter med det fluorescerande ämnet Acridin-orange. Om DNA är dubbelsträngat färgas det grönt och om det är enkelsträngat färgas det rött. Under mätning med flödescytometri indikerar rött skadat DNA och grönt visar att DNA är intakt (Januskauskas et al., 2001). Metoden är relativt snabb

men kräver dyr utrustning, därför används den inte rutinmässigt (Hammar, 2007). Hög andel kromatinskadorna hos spermerna har visat sig ge lägre dräktighetsresultat (Love & Kenney, 1998).

När stoet är redo att insemineras ska strået med sperma förberedas för insemination. Efter upptining kontrolleras spermernas rörlighet, antal och morfologi (Jeyendran et al., 1984), när spermerna fortfarande är kalla simmar de långsammare. Ett ejakulat har normalt en motilitet på 50-80 % (Parlevliet et al. 1999). Enligt Vidament et. al (1997) ligger en godtagbar gräns vid 35 % motilitet för fryst-tinad sperma, rörligheten ökar därefter vid temperaturhöjning.

Upptiningen sker i vattenbad, temperaturen på vattnet kan variera mellan 37 °C och 75 °C (Loomis & Squires, 2005). Ett upptinat prov ska hålla temperaturen 37°C (Brinsko et al., 1991). En spermados som exponerats för hög temperatur under längre tid kan ha negativ inverkan på dräktighetsresultatet. Spermerna dör snabbt om de förvaras i 39-40 °C. Efter upptagandet från vattenbadet torkas strået torrt innan innehållet suggs upp i en spruta som används vid insemineringen. En insemineringsdos av fryst semin består normalt av 4-8 strån på en volym av vardera 0,5 ml (Loomis & Squires, 2005). En dos bör innehålla minst 500 miljoner motila spermier (Bedford-Guaus, 2007), praxis i Sverige anger en mängd på en miljard rörliga spermier (Morrell et al., 2011).

Överlevnad i stoet

Om stoet blir dräktigt beror på många faktorer, bland annat av spermernas kvalitet (Troedsson et al., 1998). I Sverige används normalt inte gonadotropinfrisättande hormon för att framkalla ovulation, därför krävs det att stoet insemineras vid rätt tidpunkt (Morrell et al., 2011). För att veta om det är rätt tidpunkt kan stoet ultraljudas för att se om hon närmar sig ovulation (Loomis, 2001). Inseminationsdosen har även den betydelse för dräktighetsresultatet. Antal spermier per dos samt hur lång tid det gått efter upptinandet till insemineringen är avgörande (Gahne et al. 1997). Den biokemiska sammansättningen i spermamembranet är viktigt för spermernas befruktningförmåga, de måste även ha förmågan att överleva tillräckligt länge i äggledaren för att kunna befrukta ägget. Något som är nödvändigt för att kunna penetrera ägget är att spermerna har tillräcklig motilitet, det vill säga rörlighet. De behöver även ha förmågan att utsöndra enzym via en akrosomreaktion (Troedsson et al., 1998). Akrosomen är toppen på spermies huvud som bland annat innehåller enzymer som hjälper spermien att tränga in i ägget (Vigil et al., 2011). Transporten av spermerna inuti stoet kan även påverkas av rörligheten hos livmodern under brunsten (Troedsson et al., 1998).

Vid naturlig betäckning återfinns den största mängden spermier i äggledaren inom 4 timmar. Fertila spermier antas därefter lagras i äggledaren fram till att ägglossningen sker. Hur frisläppandet av spermerna går till och hur länge de kan lagras vet forskarna inte ännu men man har sett att den intracellulära kalciumkoncentrationen bevarades hos spermerna som var fästa till epitelcellerna i äggledaren (Troedsson et al., 1998). Detta hindrar spermerna från att genomgå kapacitering som är ett steg i mognadsprocessen (Dobrinski et al., 1996). Kapaciteringen sker efter hingstens utlösning och är ett nödvändigt mognadssteg för att kunna befrukta äggcellen. En rad strukturella och biokemiska reaktioner händer med spermien när den befinner sig i livmodern. Under kapaciteringen ökar bland annat den intracellulära koncentrationen av kalcium och en minskning av kolesterolhalten i plasmamembranet sker.

Kapaciteringen är avgörande för att akrosomreaktionen ska kunna ske, endast spermier som genomgått kapacitering har förmågan att befrukta ägget (Vigil et al., 2011).

Skillnaden mellan kyld och fryst sperma

Studier har visat att insemination med fryst semin bör utföras inom 12-24 timmar innan ovulation för att uppnå det bästa dräktighetsresultatet. Detta till skillnad mot färsk semin som kan insemineras redan 2 till 3 dagar före ovulation och ändå uppnå ett bra resultat. Skillnaden mellan fryst och färsk semin ger ingen markant skillnad på dräktighetsresultatet vid inseminering inom 6 timmar efter ovulation. Detta visar att fryst semin har kortare livslängd inuti stoet än vad färsk semin har (Troedsson et al., 1998).

Förmågan att nå äggladaren är lägre hos fryst semin, däremot har man inte sett någon skillnad på kapaciteringen hos de båda alternativen. Att fryst semin har nedsatt transportförmåga och kortare hållbarhet tros bero på bortsorterandet av seminalplasman före frysningen. Trots att inga direkta bevis finns för att spermieplasman har någon större betydelse för transporten inuti stoet så kan den vara av betydelse för överlevnaden då plasman innehåller olika metaboliter, hormoner och enzymer (Troedsson et al., 1998).

Metoder för förbättrad kvalitet

Single layer centrifugering

En metod för att förbättra kvaliteten på semenen är att sortera ut de spermier i ett ejakulat som har bäst förutsättning till att kunna befrukta ägget. En relativt nyutvecklad metod för att sortera ut de bästa spermierna med bra rörlighet och morfologi är single layer centrifugering (SLC) som går ut på att selektera bort döda och skadade spermier. Spermierna centrifugeras genom en kolloid ner i en pellet. Endast rörliga spermier med ett normalt DNA och bra morfologi kan passera, de skadade spermierna kan efter centrifugeringen avlägsnas tillsammans med kolloiden och kvar i pelleten finns en anrikning av motila spermier (Morrell et al., 2009).

Tillsatser

Som tidigare nämnt verkar seminalplasman ha en negativ inverkan på kylförvarade spermier (Akçay et al., 2010). Däremot har återinförandet av små mängder seminalplasma visat sig ha en gynnsam effekt på spermiernas rörlighet och livslängd. I en studie resulterade tillförseln av 5 % seminalplasma i ett single layer centrifugerat (SLC) prov en signifikant ökning av den progressiva motiliteten. En mindre mängd seminalplasma på 1,25 % och 2,5 % gav ingen effekt, däremot gav en högre andel på 20 % och 50 % en negativ effekt på den progressiva motiliteten (Morrell et al. 2012). Morrell et al. (2012) visar även att både 5 % och 10 % kan återföras till SLC prov för att öka kvaliteten i spermadosen. Detta bör ske direkt före en insemination för att öka spermiernas progressiva motilitet samt för att undvika kromatinskador. Enligt Klinc et al., (2005) kan andelen lyckade frysta ejakulat ökas med hjälp av tillsatser av medium innehållande heat shock proteins, aminosyror och tillsatser av glycerol. Heat shock proteins används vid frysförvaring av celler och inducerar tolerans mot kyla hos cellen (Barrett, 2001).

Kolonnseparation

Metoden kolonnseparation används för att förbättra kvaliteten på ejakulatet innan insemination. Det går ut på att spermierna filtreras genom en kolonn fylld med ett 2 cm tjockt

lager glaspärlor med en diameter på mindre än 150 µm och med glasull på botten. När spermier filtreras genom kolonnen avlägsnas orörliga spermier (Casey et al., 1993). En minskad procent av spermier med akrosomskada kan även ses efter kolonnseparationen (Klinc et al., 2005).

Säsongsvariation

Janett et al., (2003) visar i sin studie att kvalitetsparametrarna i ett ejakulat varierar under säsongen. Under sommaren var volymen, spermieantalet och motiliteten signifikant högre än på vintern. Däremot var koncentrationen av spermier samt andelen spermier med onormal morfologi lägre på sommaren än på hösten. Andelen motila spermier var som högst i fryst-tinad semin under hösten. Resultatet av studien visar att tappning av spermier för frysförvaring bör utföras på hösten för högre kvalitet. Bäckgren (2007) visar dock att några signifikanta säsongsvariationer på spermernas livsduglighet inte fanns, dock ingick endast ett fåtal hingstar i denna studie.

Dålig frysbarhet

I en studie från år 1979 användes 36 hingstar för att undersöka frysbarheten på spermier. Resultatet visade att endast 14-20 % av dessa hingstar hade mycket bra spermakvalitet efter frysning och upptinande. Cirka 60 % av hingstarna hade spermier som på något sätt var påverkade men fortfarande användbara efter frysning och resterande 20 % lämnar oanvändbara spermier som inte klarade av frys- och upptiningsmomentet (Tischner, 1979). Det är ett kritiskt steg i processen att kyla ner spermier från 18 till 8 °C, för hingstar med dålig spermakvalitet används bearbetad sperma inom några timmar istället för att kyla ner den. Vid nedkylningen kan spermier drabbas av chock på grund av kylan. Membranskador, motilitetsförlust och nedsatt metabolism kan uppkomma som följd av detta (Francl et al., 1987).

Att dålig frysbarhet inte behöver leda till sämre fertilitet visade (Vidament et al., 1997) i sin studie från 1997. I studien såg de inget samband mellan hingstens fertilitet vid användandet av färsk eller fryst sperma men däremot fanns det ett starkt samband mellan kvalitet på sperma och frysbarheten. Hingstar med sämre kvalitet på färsk sperma hade med andra ord en lägre frysbarhet.

Fältstudier har visat att artificiell inseminering med fryst sperma har gett ett varierande fölresultat. Mellan 30-60 % av insemineringarna har lett till ett föl. Detta kan dock inte endast förklaras med att frysegenskaperna hos sperma varit dålig, resultatet kan även bero på antalet insemineringar per cykel, antal spermier per dos och tidpunkten för insemineringen under brunsten. Det visade sig att om man inseminerade stoet 2 gånger under samma brunstcykel ökade dräktighetsresultatet med 7 %. Däremot sågs ingen signifikant skillnad om stoet inseminerades 3 gånger istället (Vidament et al., 1997).

Diskussion

I en hästnäring där den personliga ekonomin spelar en stor roll inför den kommande avelssäsongen kan det vara avgörande för en stoägare att hingsten har hög fertilitet. Det många kanske inte tänker på är att även stoet har en betydande roll i hingstens statistik över fruktsamhet. Populära och högt avelsvärderade hingstar är vanligtvis dyra att använda sig av

och av förklarliga skäl använder man sällan dessa till förstagångsfölare och ston som är kända för att ha problem med att bli dräktiga. Istället får dessa hingstar de ston som lätt blir dräktiga, detta ökar såklart fertilitetsstatistiken hos hingsten. De hingstar som anses som billiga får därför en större andel problemston och detta bidrar till flera insemineringar och troligen ett sämre dräktighetsresultat för hingsten även om hingsten själv har god kvalitet gällande fertiliteten. Aspekten på hur många ston varje hingst får under en säsong bör också noteras då det kan skilja sig från 1-269 ston under en säsong (ASVH, 2012c), därmed kan en dräktighetsprocent på 100 % vara väldigt missvisande. Det kan även förekomma att stoägaren byter hingst efter ett misslyckat försök och den nya hingsten får tillgodoräkna sig ännu en betäckning på ett sto som kanske normalt inte blir dräktigt på första försöket. Antal levande födda föl är därför ett grovt mått på hingstens fruktsamhet och bör kanske användas med försiktighet. Om statistiken istället hade visat dräktighetsresultat per brunst finns det en möjlighet till en mer objektiv bedömning. Hingsten hade möjligen visat ett sämre dräktighetsresultat men statistiken hade kunnat bli mer rättvisande gällande hans fertilitet.

Hanteringen och förvaringen av doserna är ett viktigt steg i processen till ett lyckat dräktighetsresultat. Fertiliteten påverkas av ett flertal olika faktorer däribland sädkvalitet som kan mätas i bland annat antalet rörliga spermier. Ett skäl till att stor variation kan förekomma i sädkvalitet mellan olika hingstar kan bero på att sporthästar till största delen selekteras på prestationer och utseende. Jämfört med livsmedelsproducerande djur tas ingen hänsyn till hingstens spermakvalitet eller reproduktionsförmåga vid ett avelsgodkännande. Hingstar med låg fertilitet tas heller inte ur avel (Love, 2005) och på så vis kan heller ingen höjning i reproduktionsförmåga ske i avelsframstegen. I slutändan kan det resultera i djur med ärftliga fertilitetsproblem. I stället för att förbättra fertilitetsförmågan i en spermados kanske man även bör införa fertilitetstester vid avelsvärderingarna innan hingsten får ett godkännande.

Eftersom gonadotropinfrisättande hormon inte används i Sverige för att framkalla ovulation hos stoet är det extra viktigt att hon insemineras i rätt tid (Morrell et al., 2011). För att veta om stoet närmar sig ägglossning kan man göra ett ultraljud (Loomis, 2001). Att fryst semin visat sig ge lägre fertilitet (Loomis, 2001) kan även vara en bieffekt av felaktig tidpunkt för insemineringen. Med fryst semin bör stoet insemineras 12-24 timmar innan ovulation för bäst resultat, det är ganska ont om tid jämfört med kyld semin som kan insemineras 2-3 dagar innan ovulation och ändå uppnå bra resultat (Troedsson et al., 1998). Den frysta semenen har därmed en kortare livslängd än kyld även om inga markanta skillnader har setts i dräktighetsresultatet om stoet inseminerats strax efter ovulation. I och med att metoderna kyld och fryst transport finns tillgängliga kan stoet insemineras när hon börjar nå ovulation. Om stoet däremot funnits tillgängligt för insemination av rå- eller färsk semin hade det varit en mindre chans till att hon blivit dräktig om hon inte var nära en ovulation. Rå och färsk semin har en kort hållbarhet på endast 10 minuter respektive 4 timmar så tidpunkten måste vara den rätta (Morrell et al., 2011). I detta fall måste även hingsten finnas tillgänglig när stoet närmar sig ovulation. Många av dagens hingstar inom ASVH har en tävlingskarriär och kan inte alltid finnas tillgängliga, även här finns en stor fördel med kyld- och fryst semin. Eftersom spermadoserna kan transporteras en längre sträcka och bevaras under lång tid fungerar den som en viktig del i avelsarbetet. Hingstar i andra länder är helt plötsligt lättillgängliga och kan tillföra nya gener till den svenska aveln. Skulle däremot hingsten förolyckas eller kastreras så kan han fortfarande användas inom aveln så länge de frysta doserna räcker och tillföra viktigt genetiskt material.

Eftersom fölningsprocenten minskat i takt med ökandet av användningen av transporterad sperma är det av extra stor vikt att finna användbara metoder till att kvalitetssäkra spermadoserna. Kvalitetskontroll med hjälp av kromatinanalys skulle kunna vara en användbar metod. Trots att spermerna har normal morfologi och motilitet kan de ha kromatinskador (Love, 2005) vilket innebär en sämre fertilitet och även uppkomsten av embryoskador. Tyvärr så är tekniken väldigt dyr och används inte rutinmässigt då de metoder som redan används fungerar tillfredsställande. Däremot skulle detta kanske kunna utgöra ett komplement till övriga metoder, speciellt hos hingstar med väldigt låg fertilitet. Säsongsvariation av spermiers kvalitet har visat olika resultat (Janett et al., 2003; Bäckgren, 2007). I Bäckgrens (2007) studie användes väldigt få hingstar i försöket, detta kan innebära en felkälla och resultatet gällande säsongsvariation hade kanske varit annorlunda med ett större antal hingstar. En annan teori skulle kunna vara att det kan variera beroende på i vilket land man bor. Klimatet kan vara väldigt varierande och hingstens näringsintag bör även det kunna spela en viktig roll i säsongsvariationen. Återinförandet av seminalplasma visar på en ökad motilitet (Morrell et al. 2012), men frågan är hur det skulle fungera i praktiken ute på landets seminestationer. Detta skulle resultera i mer arbete, svåra doseringar av små volymer och kontroll över vilken seminalplasma som kommer från vilken hingst. Sammanfattningsvis är förbättringsteknikerna ett viktigt bidrag till en högre fertilitetsnivå och bör utvecklas vidare.

Referenser

- Akcay, E., Reilas, M., Andersson, M., Katila, T. 2006. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53, 481-485.
- Aurich, C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 107, 268-275.
- Aurich, J., Aurich, C. 2006. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 275-279.
- Aurich, C., Spergser, J., 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67, 912-918.
- Avelsföreningen för svenska varmblodiga hästen (ASVH). April 2012 a.
<http://www.asvh.se/avel/siffror-och-statistik>
- Avelsföreningen för svenska varmblodiga hästen (ASVH). April 2012 b.
<http://www.asvh.se/avel/stambok>
- Avelsföreningen för svenska varmblodiga hästen (ASVH). April 2012 c.
http://www.asvh.se/MediaBinaryLoader.axd?MediaArchive_FileID=3b2ee437-d81d-4189-887b-04bf2aa6b745&MediaArchive_ForceDownload=true
- Barbas, J. & Mascarenhas, R. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* 10, 49-62.
- Barker, C.A.V. & Gandier, J.C.C. 1957. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 21, 47-51.
- Barrett, J. 2001. Thermal hysteresis proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, 105-117.
- Bedford-Guaus, S.J. 2007. Transported stallion semen and breeding mares with cooled or frozen-thawed semen. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 239-248.
- Brinsko, S.P., Varner, D.D., Blanchard, T.L. 1991. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 35, 1111-1119.
- Bäckgren, L. 2008. Kvalitetsbedömning av selekterad och oselekterad hingstesperma med hjälp av flödescytometri och fluorometri, före och efter seminsäsongen. Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet. Examensarbete.
- Casey, P.J., Robertson, K.R., Liu, I.K.M., Espinosa, S.B., Drobnis, E.Z. 1993. Column separation of motile sperm from stallion semen. *Journal of Andrology* 14, 142-148.
- Dahlsten, A. 2006. Fertilitet hos svenska halvblodshingstar betäckningssäsongen 2004 - en pilotstudie. Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet. Examensarbete.
- Dobrinski, I., Suarez, S.S., Ball, B.A. 1996. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of reproduction* 54, 783-788.
- Drevius, L.O., Eriksson, H., 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42, 136-156.
- Francl, A.T., Amann, R.P., Squires, E.L., Pickett, B.W. 1987. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20 °C. *Theriogenology* 27, 517-525.
- Gahne, S., Gånheim, A., Malmgren, L. 1997. Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 49, 1071-1074.

- Hammar, L. 2007. Kromatinstabilitet som grund för kvalitetsbedömning av hingstesperma. Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet. Examensarbete.
- Janett, F., Thun, R., Niederer, K., Burger, D., Hässig, M. 2003. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60, 453–461.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2001. Assessment of sperm characteristics quality through flourometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55, 948-961.
- Jasko, D.J., Hathaway, J.A., Schaltenbrand, V.L., Simper, W.D., Squires, E.L. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241–1252.
- 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 its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and fertility* 70, 219-228.
- Jordbruksverket. April 2012. http://www.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/Amnesomraden/Statistik,%20fakta/Husdjur/JO24/JO24SM1101/JO24SM1101_kommentarer.htm
- 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.
- 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.
- Karlsson, A. 2011. Seminalplasma – komponenter och dess betydelse för spermiers överlevnad, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Agronomprogrammet. Examensarbete.
- Katila, T. 2001. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Veterinaria Scandinavica* 42, 199-217.
- Klinc, P., Kosec, M., Majdic, G. 2005. Freezability of equine semen after glass beads column separation. *Equine Veterinary Journal* 37, 43-47.
- Loomis, P.R. 2001. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science* 68, 191-200.
- Loomis, P.R., Squires, E.L. 2005. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology* 64, 480–491.
- Love, C.C. 2005. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reproduction Science* 89, 39–45.
- Love, C.C., Kenney, R.M. 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 50, 955-972.
- Lundgren, A. 2011. Förekomst av reaktiva syreföreningar i transportsperma från hingst. Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet. Examensarbete.
- Moran, D.M., Jasko D.J., Squires E.L., Amann R.P. 1992. Determination of temperature and cool rate induced cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38, 999–1012.
- Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A-M., Rodriguez-Martinez, H., 2009. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 512–517.

- Morrell, J.M., Macias Garcia, B., Peña, F.J., Johannisson, A. 2011. Processing stored stallion semen doses by Single Layer Centrifugation. *Theriogenology* 7, 1424-1432.
- Morrell, J.M., Pihl, J., Dalin, A.-M., Johannisson, A. 2012. Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. *Theriogenology*
doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.009
- Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'Aqua Jr, J.A., Zahn, F.S., Alvarenga, M.A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 107, 293-301.
- Parlevliet, J.M., Colenbrander, B. 1999. Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. *Equine Veterinary Journal* 31, 248-251.
- Price, S., Aurich, J., Davies-Morel, M., Aurich, C. 2008. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5°C and 15°C. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 261-266.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Pettit, M.T., Arav, A. 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 610-615.
- Shepherd, C. 2004. Artificial insemination in mares. *In Practice* 26, 140-145.
- Tischner, M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 27, 53-59.
- Tischner, M., Kosiniak, K., Bielansky, W. 1974. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 41, 329-335.
- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M., Crabo, B.G. 1998. Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology* 50, 807-818.
- Varner, D.D., Blanchard, T.L., Meyers, P.J., Meyers, S.A., 1989. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 h at 5 or 20°C. *Theriogenology* 32, 515-525.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., Palmer, E. 1997. Equine frozen semen, freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907-917.
- Vigil, P., Orellana, R.F., Cortés, M.E. 2011. Modulation of spermatozoon acrosome reaction. *Biological Research* 44, 151-159.