



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap** Institutionen för
kliniska vetenskaper

Olika protokoll vid upptining av tjursperma

Effekt på spermans kvalitet och temperatur

Hanna Boëthius

*Uppsala
2014*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:2*

Olika protokoll vid upptining av tjursperma

Effekt på spermans kvalitet och temperatur

Different protocols for thawing bull semen

Effect on sperm quality and temperature

Hanna Boëthius

Handledare: Lennart Söderquist, Institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Hans Gustafsson, Institutionen för kliniska vetenskaper,
VÅXA Sverige

Examinator: Renee Båge, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2014

Delnummer i serie: Examensarbete 2014:2

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: spermakvalité, upptining, fryst sperma, tjur, temperatur, viabilitet

Key words: sperm quality, thawing, frozen semen, bull, bovine, semen, temperature, viability

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

SAMMANFATTNING

Artificiell insemination (AI) har revolutionerat reproduktionen och husdjursaveln sedan den första inseminationen gjordes 1784. När man 1949 upptäckte att spermier kunde överleva djupfrysning och upptining underlättades AI-arbetet ytterligare. Ett lyckat resultat vid användningen av AI bygger på att alla delar i den kedja av händelser fungerar från samling av sperma till insemination. En kritisk länk i kedjan är själva handhavandet av sperman vid upptining och laddning av payetten i pistoletten i samband med inseminationen. Hur upptiningsprotokollet ser ut varierar dock mellan olika länder och instruktionerna saknar ofta vetenskapliga referenser. Totalt semineras idag cirka 85% av mjölkorna i Sverige och merparten, cirka 60%, utförs av djurägaren själv eller dennes anställda. Ibland är förutsättningarna för insemination i djurstallarna långt ifrån optimala. Detta leder till att de givna instruktionerna inte alltid följs fullt ut. I vissa fall skulle detta kunna resultera i försämrade dräktighetsresultat och nedsatt produktion.

Syftet med denna studie var 1) att jämföra några olika upptiningsprotokoll, som idag rekommenderas i olika länder inom Europa, och studera hur spermernas livsduglighet påverkas och 2) att undersöka temperaturförändringen inuti payetterna vid upptining enligt de olika protokollen, samt 3) vid olika handhavanden i samband med laddning av pistoletten.

En payett från tre olika frysoperationer per tjur (totalt 20 tjurar) tinades för vardera av de fem olika protokoll, som vi tagit fram, baserat på de protokoll som används inom Europa. Därefter undersöktes spermernas motilitet med hjälp av en datoriserad motilitetsanalysator (sk CASA) och spermernas membranintegritet undersöktes med hjälp av flödescytometri. Resultatet visade att det föreföll fördelaktigt för motiliteten att spermerna tinades och förvarades i +35-37°C under en längre upptiningstid (>30s), men eventuellt negativt för membranintegriteten. Om preliminära resultat från en pågående studie rörande korrelationen mellan olika motilitetsvariabler och dräktighetsresultat appliceras på resultaten i vår studie skulle upptining enligt protokoll D (+37°C, 45s) vara det mest fördelaktiga.

Temperaturen inuti payetten steg betydligt snabbare och sluttemperaturen var betydligt högre vid upptining för de upptiningsprotokoll som studerades än vad som tidigare angivits i svenska dokument. Temperaturen fortsatte även att stiga ytterligare några grader efter det att payetten avlägsnats från vattenbadet, vilket är av betydelse vid användning av upptiningstemperaturer över +37°C. Temperaturen fluktuerade kraftigt efter upptiningen oavsett upptiningsprotokoll, men temperaturfluktuationerna kunde begränsas om pistolettens främre del förvärmades före och även skyddades efter laddningen oavsett omgivningstemperatur. Det är i dagsläget oklart vilken betydelsen temperaturfluktuationerna egentligen har för spermernas slutliga befruktningförmåga.

SUMMARY

Artificial insemination (AI) has revolutionized the reproduction and livestock breeding since the first insemination was done in 1784. When the discovery that sperm could survive freezing and thawing was made in 1949, it facilitated the development of applied AI work considerably. A successful result in the use of AI is depending on each single link in a long chain of events, from the collection of semen to the insemination. A critical link in the chain is the actual handling of the semen during thawing and the loading of the straw in to the insemination gun before insemination. The thawing protocols differ between countries and the instructions are not always based on scientific studies. Today about 85% of dairy cows in Sweden are inseminated and about 60% of the inseminations are performed by the owners or herd employees. The conditions and environment in the barn for this type of work is not always optimal. Inseminators may thus not follow the instructions of thawing, but make own changes which in some cases will lead to a decreased pregnancy rates and impaired fertility and production .

The objectives of this study were 1) to compare different thawing protocols, that are currently recommended in countries in Europe, and study how sperm viability is affected and 2) to investigate the temperature change inside the straw during thawing according to the different protocols, as well as 3) at various types of handling in connection with the loading of the insemination gun.

One payette from each of three freezeing operations per bull (a total of 20 bulls) were thawed for each of five different protocols based on protocols used within Europe. Various parameters of sperm motility was investigated using a computer-assisted sperm analyzer (CASA), and sperm membrane integrity was examined by flow cytometry. The results showed that it seemed advantageous for the motility of the sperm if it was thawed and stored at +35-37°C for a longer period of time (> 30s), but possibly negative for the membrane integrity. However, applying results from an ongoing study on the correlation between different motility variables and fertility results to our study indicated that the sperm thawed according to protocol D (+37°C, 45s) would have the best correlation.

The temperature inside the payette increased much faster and the final temperature was significantly higher during thawing according to the thawing protocols studied than claimed in previous Swedish documents. The temperature continued to rise a few degrees more after the straw was removed from the water bath, which could be of importance when using thawing temperatures above +37°C. The temperature fluctuated markedly after thawing regardless of the thawing protocol but we could also observe that temperature fluctuations could be limited if the front part of the insemination gun was preheated before and was protected after loading regardless of the ambient temperature. At present, it is unclear what effects temperature fluctuations really have on the sperm fertilization ability.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Syfte.....	1
Bakgrund	2
Historik	2
Spermasamling, hantering och djupfrysning.....	2
Faktorer som påverkar spermieens befruktningförmåga.....	3
Bedömningen av spermieekvaliteten <i>in vitro</i>	4
Datoriserad spermieanalys (CASA).....	4
Flödescytometri.....	5
Orsaker till spermieens skador under frysning och upptining	7
Frysning	7
Lagring	9
Upptining.....	9
Artificiell insemination i fält	10
Material och metoder	13
Datoriserad motilitetsanalys (CASA)	14
Flödescytometrianalys	15
Statistisk analys	16
Temperaturmätning	16
Resultat.....	19
CASA och flödescytometri.....	19
Temperaturmätningen	20
Diskussion.....	22
Spermieparametrar	22
Temperatur i payetten i samband med upptining	24
Temperatur i payetten vid olika handhavanden av pistoletten.....	25
Slutsats	26
Tack.....	26
Referenslista.....	27

INLEDNING

Användandet av artificiell insemination (AI) har revolutionerat husdjursaveln, framför allt inom mjölkproduktionen, och har fört med sig många fördelar. Några av dessa är att man på ett bekvämt och ur arbetsskyddsynpunkt säkert sätt kan åstadkomma dräktigheter då handjur inte själva behöver närvara vid betäckning. AI minskar behovet av transporter av djur, samt kontakterna mellan tjur och ko/kviga och därmed även risken för spridning av framförallt sexuellt överförbara sjukdomar. Artificiell insemination möjliggör även ett effektivt avelsarbete, d.v.s. avelstjurar med goda anlag kan utnyttjas effektivt till alla hondjur och man kan därmed åstadkomma stora avelsframsteg på kort tid (Larsson, 1977; Swensson, 1987).

En kritisk punkt vid användandet av AI är hanteringen av spermadoserna eller payetterna inför insemination. För att kon ska bli dräktig med fryst/upptinad sperma krävs att tillräckligt många spermier är viabla (livsdugliga) och kan ta sig från depositionsplatsen i livmodern till befruktningssplatsen i äggledaren och där befrukta äggcellen. Både frys- och upptiningsprocessen innebär en stress för spermerna och bortåt 50% av dem dör eller skadas under dessa steg. Det är därför viktigt att själva upptiningen och handhavandet av doserna före inseminationen sker på ett, för spermerna, så optimalt sätt som möjligt. På så sätt optimerar man chansen att varje inseminationsdos innehåller ett tillräckligt stort antal rörliga och befruktningssdugliga spermier så att ett acceptabelt dräktighetsresultat efter AI kan uppnås.

I dagsläget finns det fastställda protokoll för hur man fryser och tinar tjursperma. Dock är de publicerade studierna få som rör vad som är det mest optimala protokollet avseende temperatur och tid för upptining av tjursperma. Många av de rekommenderade upptiningsprotokoll, som idag används, får förmodas vara baserade på för oss okända undersökningar och på tradition. Även när det gäller den fortsatta hanteringen såsom laddning av pistoletten och dess hantering efter laddning i samband med inseminering finns det olika förfaranden. Kunskapen vad gäller betydelsen av olika upptiningsprotokoll och hantering i samband med AI för fruktsamhetsresultatet är för närvarande ofullständig (Personligt meddelande: Gustafsson, 2013)

SYFTE

Syftet med vår studie var att tina sperma enligt några olika protokoll som rutinmässigt används vid seminarbete inom Europa och sedan undersöka 1) tjurspermernas viabilitet *in vitro* efter upptining, 2) sluttemperaturen inuti payetten efter upptining, 3) inverkan på temperaturen i payetten, tinad enligt gällande svensk instruktion, vid olika handhavanden i samband med laddning av pistoletten.

BAKGRUND

Historik

Under 1780-talet utfördes det första lyckade försöket med artificiell insemination. Det gjordes på hund med färsk sperma av den italienske munken Lazzaro Spallanzani. År 1799 utfördes den första artificiella inseminationen på människa av den engelske läkaren John Hunter, men efter en rad tvivelaktiga försök utfärdade påven, år 1897, en bannbulla och förbjöd därmed artificiell insemination på människa. I början av 1900-talet utfördes AI-försök på ston vid ryska stuterier av veterinären Elia Ivanov. Han gjorde senare även lyckade inseminationsförsök på nötkreatur och får och fick i uppgift att utbilda andra veterinärer i tekniken. Redan före första världskriget fanns det 300-400 utbildade AI-veterinärer i olika delar av Ryssland. I Sverige började man använda AI på försök med färsk sperma först 1936 vid Institutet för husdjursförädling, Wiad. År 1949 publicerade Christopher Polge och medarbetare vid Institute of Animal Physiology i Cambridge den slumpmässiga upptäckten av glycerolens kyl- och frysskyddande egenskaper som framkommit då han experimenterat med att frysa tupsperma. Denna upptäckt utgjorde en milstolpe vad gäller användning av AI eftersom möjligheten att frysa sperma förenklar konservering, förvaring och distribution av sperma. Användningen av AI-tekniken har sedan dess kommit att revolutionera husdjursaveln, framförallt inom animalieproduktionen. I början frös man ner spermadoserna i ampuller eller i form av pellets. Senare utvecklade Robert Cassou i Frankrike tekniken med att förpacka spermadosen i en så kallad payette (Fr.= litet strå), vilket gjorde både identifikationen och hanteringen av sperman enklare och säkrare. Idag använder vi i Sverige nästan uteslutande dessa så kallade ministrån/minipayetter (0,25 ml) till tjursperma. I hela världen idag insemineras ca 100 miljoner nötkreatur per år, vilket uppskattas vara ca 20% av världens insemineringsbara kor och kvigor (Thibier, 2005). I Europa ligger siffran i genomsnitt på ca 60% och i Sverige insemineras ca 85% av hondjuren inom mjölkproduktionen. Nästan 60% av alla inseminationer utförs idag i Sverige av djurägarna själva i sina egna besättningar, resten utförs av husdjurstekniker vid husdjursföreningarna. Inseminationerna på nötkreatur görs i Sverige uteslutande med djupfryst tjursperma, som förvaras i flytande kväve vid en temperatur på -196°C (Swensson, 1987).

Spermasamling, hantering och djupfrysning

I Sverige samlas sperma på tjurstationen med hjälp av en så kallad artificiell vagina, varefter ejakulatets volym, spermiekoncentration samt eventuell kontamination i provet fastställs. Spermiernas motilitet (rörlighet) bedöms rutinemässigt i fasmikroskop. Därefter sker en spädning av sperman med lämplig spädningvätska innehållande ingredienser som har kyl- och frysskyddande effekt. Målet i Sverige är att uppnå ett totalantal spermier på ca 15 miljoner spermier per inseminationsdos (=minipayette; 0,25 ml). Initialt primärspäds sperman till hälften av den slutliga volymen i ett vattenbad med en temperatur på +35°C. Därefter kyls sperman ner till +5°C varpå slutspädningen sker för att uppnå önskad doskoncentration. Omfattningen av den andra spädningen styrs av spermiekoncentrationen i respektive ejakulat.

Vid slutspädningen tillsätts en spädningvätska innehållande glycerol, som har kyl/frysskyddande egenskaper, och som om tillsatt i för stor mängd under för kort tid kan vara

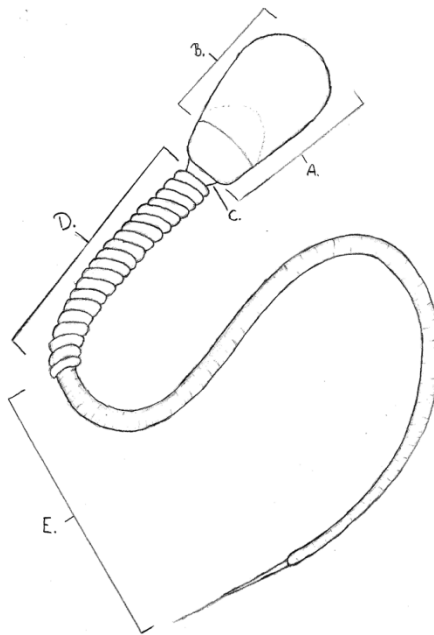
skadlig för spermerna. Slutspädningen sker därför ofta i flera steg med en successiv tillsättning av den glycerolinnehållande spädningssvätskan till sperman. När spädningen är klar ska sperman ekvibreras under minst 2-3 tim. Under tiden fylls den spädda sperman i för den aktuella tjuren speciellt märkta payetter. Payetterna läggs på ramper och placeras i en fryskammare. Här fryses de sedan ner genom en succesiv sänkning av temperaturen i kammaren genom att ånga från flytande kväve sprutas in i kammaren i enlighet med en på förhand programmerad fryskurva som styrs via en dator. Det finns flera olika fryskurvor som används, men principen är i korthet att de fyllda payetterna, som håller en temperatur av +5°C, först utsätts för nedkylning med en hastighet av 2-3°C/min ned till -8°C. Vid denna temperatur börjar en isbildning att ske i vätskan, varför hastigheten på temperatursänkningen ökas till 30°C/min ned till -130°C. Därefter sänks payetterna ner i flytande kväve, som håller en temperatur på -196°C, där de sedan lagras fram till upptining. Efter infrysningen kontrolleras resultatet av frysningen genom att några payetter tinas och spermernas motilitet bedöms i mikroskop. Om 50% eller fler av spermerna bedöms vara motila godkänns frysningen och resten av payetterna i den frysoperationen (Gustafsson *et al.*, 1987).

Faktorer som påverkar spermens befruktningsevne

Motilitet, dvs. spermernas aktiva framåtrörelse, är en viktig egenskap som tillräckligt många spermier måste besitta efter frysning/upptining. Orörliga spermier kan inte ta sig upp ur kryptorna i livmodern och inte heller penetrera zona pellucida (äggcellens skal) vid befruktningen. En fungerande spermiesvans som kan förflytta spermien framåt i dessa situationer är därför en förutsättning.

Exempel på andra egenskaper som är viktiga för spermens befruktningsevne är: ett helt membran hos både spermien i sin helhet och dess akrosom med intakta enzym och membranstrukturer (membranintegritet), intakt kromatin (spermien får inte ha ådragit sig skador på sitt DNA), samt fungerande mitokondrier (Figur1).

Även om kvalitén på spermerna har stor betydelse för dräktighetsresultatet, så finns det även en mängd andra parametrar som kan vara av avgörande betydelse för dräktighetsresultatet. Exempelvis är handhavandet av den frysta/upptinade sperman, tidpunkten för insemination i förhållande till ägglossning, inseminationstekniken, samt många faktorer hos hondjuret av betydelse.



Figur 1. Skiss över spermieens uppbyggnad. A: huvud, B: akrosom, C: hals, D: mittstycke med mitokondrier, E: svans. Modifierad efter Söderquist, 1987. Teckning:

Bedömningen av spermie kvaliteten *in vitro*

Det finns alltid en viss procent döda/skadade samt onormala spermier i dosen efter fryskonservering. Därför är det viktigt att ett tillräckligt stort antal normalt befruktningsdugliga spermier deponeras i hondjurets livmoder vid insemination för att en befruktning ska vara möjlig. Som tidigare nämnts används i Sverige en godkändgräns efter upptining på $\geq 50\%$ motila spermier, vilket kontrolleras för varje frysoperation.

Spermieens befruktningsduglighet beror på en mängd olika parametrar. Det är viktigt att snabbt och enkelt kunna identifiera vilka eventuella skador som spermierna fått vid nedfrysning, förvaring och upptining. Graham (2001) beskriver att det inte handlar om hur många av dessa parametrar som spermien besitter utan mer i vilken omfattning varje parameter existerar hos den individuella spermien. Det finns i dagsläget ingen enskild metod som undersöker samtliga parametrar samtidigt. Därför bör man undersöka så många parametrar som möjligt, och sedan försöka sammanställa resultaten till en helhetsbild. Problemet är att många av analysmetoderna är både tidskrävande och dyra.

Datoriserad spermieanalys (CASA)

Med hjälp av CASA (*Computer-assisted sperm analyzer*) analyseras motiliteten hos spermier i provet genom att en mängd bilder (varierar mellan 30-60 bilder/1-2s mellan olika modeller) tas inom ett konstant fönster. Datorn spårar sedan spermieens rörelse över det konstanta fönstret och räknar ut dess olika motilitetsvariabler.

Undersökning av motiliteten är enkel och görs på alla tjurstationer rutinmässigt genom en subjektiv bedömning fasmikroskop. Ett mer objektiva sätt är att analysera motiliteten med

hjälp av CASA. Med CASA kan man mäta flera motilitetsparametrar samtidigt, till exempel progressiv motilitet, hypermotilitet, hastighet, riktning etc. Vid själva undersökningen placeras en droppe av sperman på ett objektglas under ett mikroskop med en videokamera och en dator kopplad till detta. Datorn analyserar sedan totalt 17 olika parametrar hos spermerna (Tabell 3) och sammanställer data från åtta synfält till ett medeltal för varje parameter.

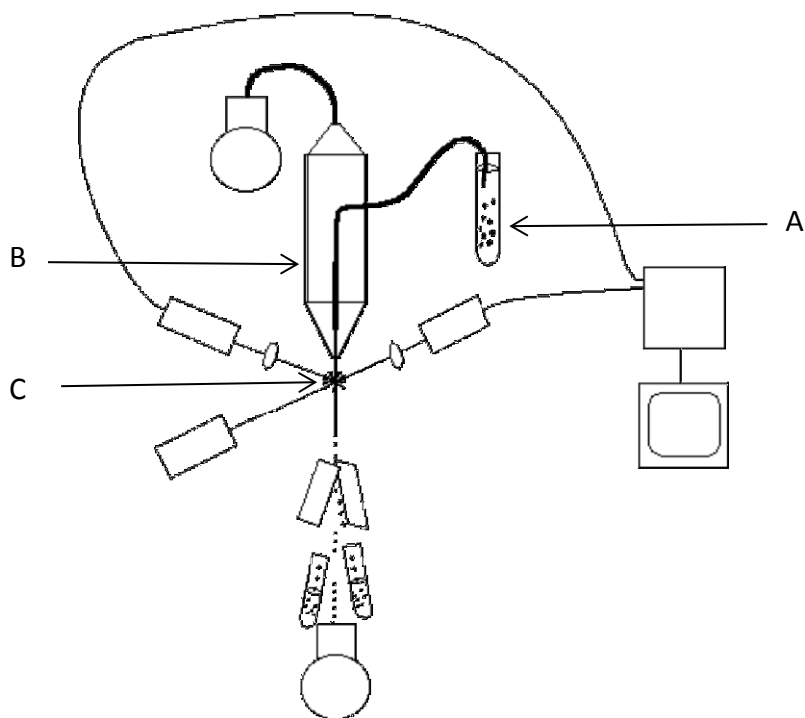
Flödescytometri

Spermernas membranintegritet kan undersökas med hjälp av t.ex. flödescytometri (FCM). Metoden har fördelen att flera parametrar kan mätas samtidigt, samt att tiotusentals spermier kan undersökas inom loppet av en minut. Tillvägagångssättet består i korthet i att ett prov med spermier inkuberas med en eller flera färgämnen. Därefter placeras provet i flödescytometern (Figur 2). När vätskan med spermerna passerar kanalens smalaste mynning delas den upp i individuella små droppar vilka endast har förmågan att bära med sig en cell vardera. Dropparna passerar sedan en laserstråle, som får eventuell infärgning av fluorescerande färg att avge ljus från varje enskild spermie. Om infärgningar med olika färger har använts registreras dessa. Det fluorescerande ljuset filtreras genom ett filter, som endast släpper igenom ljus av en viss våglängd. Ljuset registreras sedan och man kan därigenom avläsa om droppen innehållit en spermie och i så fall information om dess infärgning. Spermerna passerar laserstrålen under hög hastighet, vilket gör det möjligt att undersöka ca 50 000 spermier på en minut. Både mängden och avsaknad av infärgning kan avläsas.

Cellmembranets integritet kan utvärderas genom att man tillsätter färgämnen propidium jodid (PI) och SYBR-14 som färgar DNA. Färgämnet SYBR-14 tränger in genom cellmembranet och binder till DNA-strängens nukleinsyra och fluorescerar grönt. Färgämnet PI fäster också till DNA, men kan inte passera genom intakta cellmembran. Detta innebär att endast spermier med trasigt cellmembran kommer få sitt DNA färgat med PI, och fluorescerar rött.

Förutom cellmembranets integritet kan även andra parametrar undersökas med hjälp av flödescytometri t.ex. akrosomintegritet (d.v.s. spermens förmåga att genomgå akrosomreaktionen), den mitokondriella aktiviteten, samt spermiekromatinets denatureringsgrad i cellkärnan.

För att bedöma akrosomintegriteten färgar man provet med speciella växtlektiner med en fluorescerande prob ansluten till sig (d.v.s. lektinet är i sig inte fluorescerande utan det krävs en tillsatt prob). Lektinet fäster på akrosomens insida hos spermier som genomgått akrosomreaktion, dvs. när sammansmältning av akrosom- och cellmembran har skett. Hos celler med intakt akrosom kommer lektinet inte i kontakt med de strukturer inuti akrosomen som det kan binda till, varför endast spermier som genomgått akrosomreaktion färgas.



Figur 2. Skiss över uppbyggnaden av en flödescytometer. Spermierna suggs upp via slangen från provröret (A) och sprutas in i kammaren (B). Spermierna passerar sedan laserstrålen (C) en och en. Teckning: Anders Johannisson, SLU.

Mitokondriernas funktion mäts genom att tillsätta färgämnet rhodamine 123 till provet. Färgen transporteras direkt in i de aktiva mitokondrierna och ackumuleras där. Dessa kommer sedan att avge grönt ljus när laserstrålen träffar spermien. Dock kan man inte bedöma graden av mitokondriernas aktivitet (Graham, 2001). Thomas *et al.* (1998) använde sig av JC-1 infärgning istället. Denna färg transporteras även den in i aktiva mitokondrier och avger grönt ljus. Den skiljer sig dock från rhodamine 123 genom att när mängden JC-1 inuti mitokondrien överstiger en viss koncentration så klumpar den ihop sig och lyser orange istället för grönt. Därmed kan man se skillnad på mitokondrier med hög aktivitet jämfört med de som är mindre aktiva.

Även spermiers förmåga att genomgå kapacitering och akrosomreaktion kan mätas med hjälp av flödescytometri. Langlais & Roberts (1985) visade att spermier frigör en mängd kolesterol från sitt cellmembran under kapaciteringen. Detta medverkar till att öka cellmembranets fluiditet, vilket kan mätas med hjälp av flödescytometri (Langlais & Roberts, 1985: se Graham, 2001 s 245).

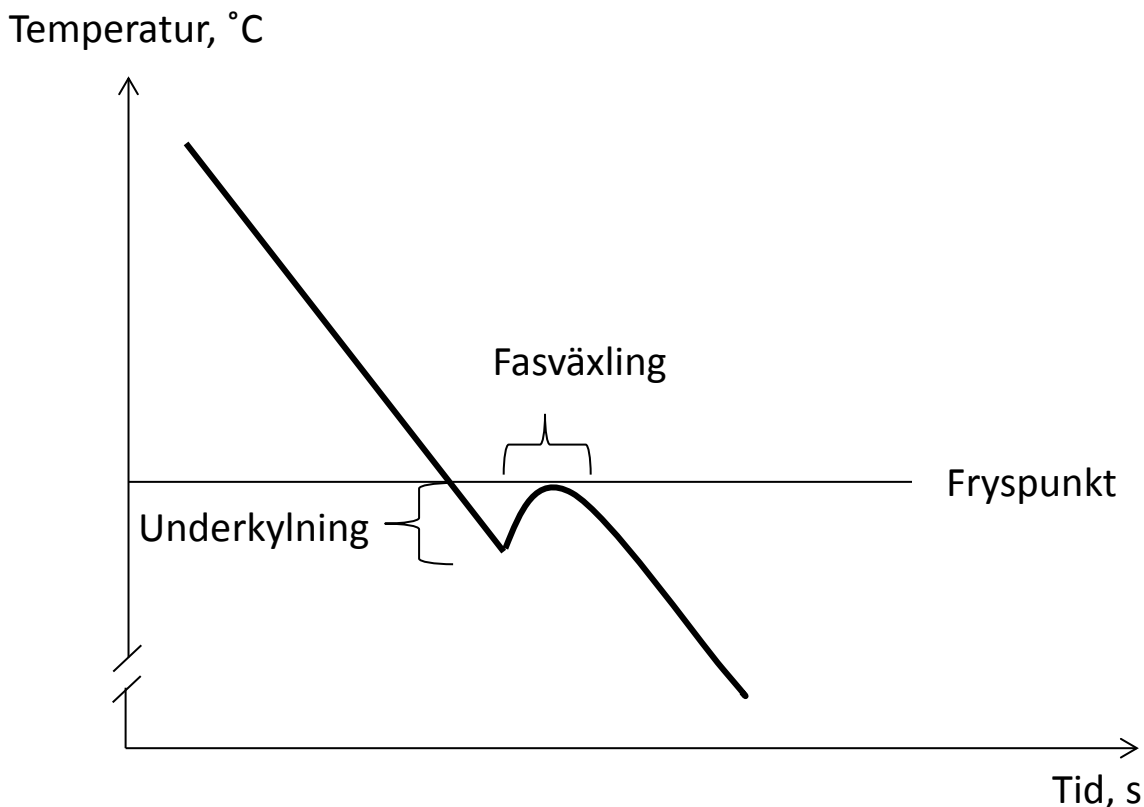
Man kan även mäta mängden av denaturerat kromatin i spermiers cellkärna genom att färga denna med acridinorange (AO). Färgen fäster till det denaturerade kromatinet, samt till oskadat DNA, och avger röd respektive grön färg, som registreras av flödescytometern (Graham, 2001).

Orsaker till spermens skador under frysning och upptining

Frysning

Sperman kyls långsamt från +35°C till +5°C under loppet av en timme, med syftet att sänka spermens metabolism, samt förmå cellen att omstrukturera lipiderna i sitt cellmembran (Mazur, 1984).

Oavsett metod för att försöka åstadkomma en jämn temperatursänkning av sperman i samband med frysning kommer provet vid en viss temperatur ge ifrån sig värme i samband med den sk fasväxlingen. Detta skapar då en plåtå i fryskurvan, som kan kvarstå under 2-3 min, innan den sjunker igen (Figur 3). En studie av Parkinson & Whitfield (1987) tyder på att denna plåtå i fryskurvan skulle kunna vara skadlig för spermerna och ha inverkan på spermernas befruktningförmåga.



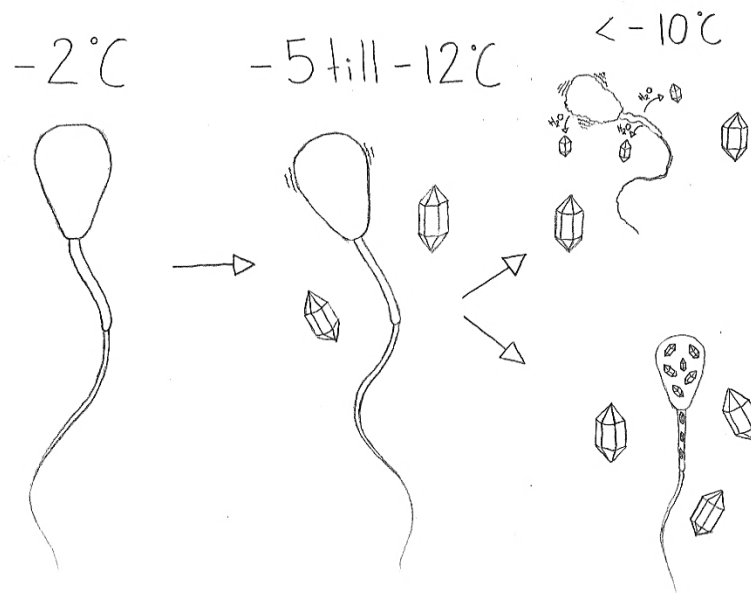
Figur 3. Schematisk bild över spermans temperaturkurva vid nedfrysning. Modifierad efter Larsson, 1987.

Viss forskning (Holt, 2000) tyder på att spermier som utsatts för köldchock (skador till följd av för snabb nedkylning i temperaturintervallet över 0°C) under frysningsprocessen får förändringar i sitt plasmamembran under omstruktureringsfasen av dess lipider. När spermien tinas upp igen kommer dess membran att omstruktureras för att anpassa sig till den nya temperaturen. Förändringar som uppstått vid frysningstillfället kan då påverka den processen och eventuellt leda till att membranet brister.

Det finns även undersökningar som tyder på att den defekta omstruktureringen av lipiderna i plasmamembranet, som nämns i stycket ovan, påverkar vissa enzymer vars funktion är beroende av lipidernas struktur. Ett exempel på detta är den försämrade kontrollen av intracellulärt kalcium som ses vid temperaturer under $+17^{\circ}\text{C}$. Orsaken tros vara bristande funktion av membranbundna ATP-aser, som annars hanterar transporten av kalcium in och ut ur cellen. Därför tillsätter man ofta EDTA till många spädningsvätskor för att binda kalcium och därmed förhindra transport av kalcium in i cellen (Mazur, 1984).

Vid temperatursänkning ner till -5°C förblir både det extra- och intracellulära vattnet i flytande form. Detta på grund av närvaro av skyddande ämnen som tillsattes med spädningsvätskan. Mellan -5°C och -15°C börjar iskristaller bildas i den extracellulära vätskan, vilket gör att den resterande flytande vätskan blir hyperosmotisk. Den intracellulära vätskan förblir i flytande form bland annat på grund av att cellmembranet hindrar bildningen av iskristaller. Den intracellulära vätskan diffunderar sen ut ur cellen till det extracellulära rummet. Vid långsam frysning hinner majoriteten av vätskan diffundera ut ur cellen varpå endast ca 10 % kvarstår tillsammans med höga koncentrationer av saltjoner (Figur 4). I detta tillstånd är det fysikaliskt omöjligt för cellen att frysa intracellulärt och därmed skadas av iskristaller. Samtidigt uppstår det en risk för att den extracellulära vätskan med sin höga osmotiska potential skadar cellen om den utsätts för denna under en längre tid. Därför är det viktigt att nedfrysningen är tillräckligt långsam för att vattnet skall hinna lämna cellen, men samtidigt snabb nog för att inte utsätta spermier för onödigt höga och långvariga elektrolytnivåer.

Benson *et al.* (2012) beskriver i en översiktsartikel om kryobiologin rörande spermier att vissa kyl/frysskyddande ämnen (exempelvis glycerol) ersätter vattenmolekylerna intracellulärt utan att påverka de intra- eller extracellulära koncentrationerna av saltjoner. När den extracellulära vätskan fryser och osmolariteten därmed ökar i den resterande vätskan, dras vatten ur cellen och osmolariteten ökas då även intracellulärt. Om vattenmolekylerna istället byts ut mot frys- och kylskyddande ämnen, som inte diffunderar ut ur celler till följd av ökad osmolaritet extracellulärt, bibehålls osmolariteten även intracellulärt och spermien förblir oskadd. Man tror också att glycerolen påverkar cellmembranets viskositet och därmed även diffusionen genom ändring av membranets lipidsammansättning, stabilitet och permeabiliteten för vatten.



Figur 4. Skiss över effekten på vattentransporten ut ur cellen vid olika kylningshastigheter. Modifierad från Saacke, 1982. Teckning: Hanna Boëthius.

Mazur (1984) visade i sin studie att det bildas en mikroskopisk miljö av kanaler med flytande medium mellan glaciala isblock vid djupfrysning. Nivån av salt i den flytande vätskan kan variera mellan kanalerna och då vissa spermier kan ligga i kontakt med flera kanaler samtidigt utsätts de för olika koncentrationer av salt samtidigt. Detta kan ha betydelse för spermernas överlevnad, motilitet och akrosomintegritet.

Lagring

Vid en temperatur på -196°C avstannar cellernas ämnesomsättning och de skulle därmed teoretiskt kunna förvaras utan att ta skada i oändliga tider, så länge kvävenivån i tanken är konstant. Kosmisk strålning, under mycket lång tid, är den enda faktorn som anses kunna orsaka skada på det genetiska materialet då det förvaras vid -196°C . Efter lagring under 2000-4000 år räknar man teoretiskt med att ca 60 % av spermerna dött p.g.a. strålningsskador. De flesta spermiedoser som används inom husdjursaveln lagras endast en kortare period, maximalt ett tiotal år, innan de används. Det innebär att de defekter som identifieras hos spermier efter upptining troligtvis har uppstått under nedfrysnings- eller upptiningsprocessen.

Upptining

Vid upptining kommer den nedfrysta cellen att rehydreras igen. För snabb och för kraftig diffusion av vätska från det extracellulära rummet till det intracellulära kan ge upphov till att cellmembranet spricker. Det finns även en risk för rekristallisering under upptiningsfasen, om denna sker under för lång tid, med kristallbildning intracellulärt som en konsekvens. Även detta kan ge upphov till att cellmembranet spricker (Mazur, 1984).

Bailey *et al.* (1994) visade i sin studie att ett långsamt inflöde av kalciumjoner in i cellen efter tining ökar spermens befruktningkapacitet. De visade också att spermens

befruktningsförmåga till stor del beror på dess egenskaper efter frysning/upptining, inte före. Med andra ord, trots att spermier från en tjur har god befruktningförmåga i färsk form betyder det inte att de även är väl lämpade för att klara av den stress som nedfrysning och upptining innebär med de goda befruktningsegenskaperna i behåll. Många av spermiers membranstrukturer förändras i och med djupfrysning, vilket leder till en ökad utpassage av intracellulära komponenter. Bailey *et al.* (1994) visade att höga nivåer av extracellulärt kalcium ökade befruktningförmågan hos spermier. Detta kanske på grund av att mycket av spermiers kalcium passerar ut ur cellen under nedfrysnings- eller upptiningsprocessen och därför behövs i det extracellulära utrymmet för att finnas tillgängligt för återupptag. De spermier som hade en lägre halt av kalcium intracellulärt, vilket efterliknar nivåerna hos färsk spermier, hade bättre befruktningförmåga än de med höga intracellulära nivåer. Eventuellt beror den generellt högre koncentrationen av kalcium hos de frysta spermier på att dess effluxkapacitet under frysning och upptining inte fungerar som det ska. De såg även en koppling mellan höga intracellulära nivåer av kalcium och ALH (*lateral head movement*) under dess hyperaktivitet som i sin tur styrs av de intracellulära nivåerna av kalcium.

Watson (1995) tar i sin översiktsartikel upp ett antal studier som tyder på att den behandling av spermier som djupfrysningen innebär kan liknas vid kapacitering, d.v.s. att akrosomen genomgår en förändring som liknar den normala reaktion som akrosomen genomgår i sin mognadsprocess före befruktning. Detta skulle kunna förklara varför upptinade spermier lever kortare tid än färsk, samt att dessa spermier kräver kortare tid för att kapaciteras.

Nagy *et al.* (2004) visade i sin studie att nästan alla spermier som identifierats som döda direkt efter upptining har intakt akrosom. En stor del av de som sedan dör under inkuberingen gör det till följd av akrosomskador.

En viktig aspekt att ta hänsyn till är att en hög kvot mellan yta och volym hos den förpackning i vilken spermier fryses in, i detta fall payetten, ökar temperaturpåverkan på innehållet dvs. spermier. Det är därför viktigt att inte utsätta strået för okontrollerade och oönskade temperaturförändringar då även små temperaturförändringar kan orsaka skador hos spermier. Shepard *et al.* (1976) visar i en studie att förändringar sker i en fryst vätska, sammansatt av bl.a. H₂O, NaCl och glycerol, även under den eutektiska temperaturen (den temperatur där vätskan övergår från flytande till fast form). Dessa händelser utgörs av hastiga stegringar och sänkningar i vätskans temperatur och sker vid -100°C, -60°C, -28°C och vid den eutektiska punkten.

Artificiell insemination i fält

Det är en lång väg från tjuren och fram till dess att kon blir dräktig via AI, med många steg och kritiska moment på vägen. Det räcker med att ett moment felar för att hela kedjan skall raseras.

De flesta inseminationer utförs av djurägaren själv eller av dennes anställda. För att djurägaren skall få tillstånd till detta måste denne gå en utbildning, som anordnas av husdjursföreningen eller privat utövare med tillstånd från Jordbruksverket. I utbildningen

ingår bl.a. hur man skall hantera payetterna i samband med upptining och insemination. Det förekommer dock att givna instruktioner inte alltid följs i den praktiska verksamheten. Både djurägare och tekniker kan på eget bevåg efter en tid modifiera hanteringen, ibland omedvetet. Alla avsteg från rekommenderat upptiningsprotokoll riskerar att ge ett försämrat dräktighetsresultat. Förutsättningarna för ett optimalt inseminationsförfarande varierar ofta ute i djurstallarna. Om till exempel flera djur ska insemineras vid samma tillfälle kan temperaturen på upptiningsvattnet i termoserna hinna sjunka innan sista payetten tinats. Det finns även indikationer på att payetten ibland laddas direkt i pistoletten och att dosen tinas inuti kon vid insemineringen.

Därför har VÄXA Sverige (fd Svensk Mjölk) tagit fram ett kvalitetsdokument där det beskrivs hur man skall gå tillväga för att kunna garantera ett optimalt dräktighetsresultat.

Detta dokument bygger bl.a. på regler och förordningar som styr hur seminverksamheten skall bedrivas i Sverige. Den viktigaste författningen är SJVFS (Statens Jordbruksverks Författningssamling) 2004:41 "Statens jordbruksverks föreskrifter om seminverksamhet på nötkreatur". Där anges grunden för hur seminverksamheten skall vara utformad (Gustafsson, 2010).

Hanteringen av payetterna, förvaring, upptining och inseminationsteknik är av yttersta vikt och regleras tydligt i instruktioner och kvalitetsdokument. Spermernas viabilitet får inte påverkas negativt under hanteringen då detta kan resultera i försämrat dräktighetsresultat. Många studier har visat att en snabb upptining är att föredra framför en långsam (Senger *et al.*, 1976 ; Mazur, 1984). Den instruktion beträffande tining av fryst tjursperma som vi fortfarande använder i Sverige kommer sannolikt från 60-talet då fryst sperma började användas i Sverige. Denna instruktion säger att tjursperma fryst i minipayetter ska tinas i vattenbad med en temperatur på +30-35°C under 12 sekunder och medumpayetter under 15 sekunder (Dyrendahl, 1972; Paulsson, 1972; Gustafsson *et al.*, 1987; Gustafsson, 2010).

Det finns exempel på tininginstruktioner som skiljer sig från de svenska. Som framgår av Tabell 1 varierar det mellan olika länder vilket tiningförfarande avseende temperatur och tid som tillämpas. Även i Norge är instruktionen att minipayetter ska tinas i +35°C vatten men att de sedan kan förvaras där tills de används för inseminering. Enligt två norska studier av tjursperma såg man mindre skador på spermernas membran om de tinades i +75°C i 12 sekunder jämfört med spermier som tinades i +35°C under 30 sekunder (Aamdal & Andersen, 1968a;1968b). Genetics, ett avelsföretag i Australien, rekommenderar i sin AI-manual att vattnet ska ha en temperatur på mellan 32-38°C och att upptining skall ske under minst 30 sekunder, men att payetterna kan förvaras i vattenbadet om de används inom 30 min. Enligt en AI- instruktion från USA får man bäst dräktighetsresultat om sperman tinas vid +35-37°C i minst 30 sekunder, men inte mer än 15 min (ABS Global, 1983).

Tabell 1. Sammanställning av olika upptiningsprotokoll för tjursperma som används i några länder inom Europa, baserat på en enkät och redovisat 23rd European AI vets conference. (Personligt meddelande: Margareta Håård, 2013)

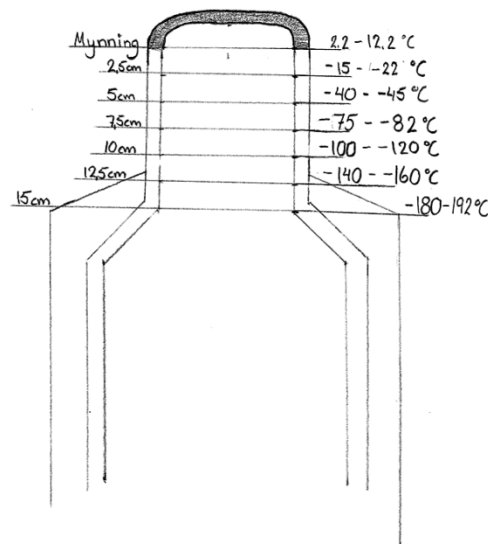
Land	Minipayette (0,25 ml)	
	Temperatur, °C	Tid, s
Tjeckien	37	7-10
Cypern	37	30
Danmark	35-37	7-8
Finland	33-37	>30
Frankrike	37	20
Tyskland	38	10
Ungern	36	60
Irland	37	30
Italien	37	20
Holland	37-38	45
Norge	35-37	20
Polen	37	20-30
Slovenien	37	11
Spanien*	35	30
Sverige	30-35	12
Schweiz	37-38	25
United Kingdom	35-37	30

* Payetten hålls i luften i 6-8s innan den placeras i vattenbadet

Men även andra hanteringsfaktorer i samband med tining är av betydelse. Mätningar av temperaturen i kvävebehållaren, där payetterna förvaras, visar att det sker en tydlig temperaturstegring redan i halsen på behållaren, oberoende av hur mycket kväve det finns i behållaren. Detta innebär att så fort kanistern lyfts upp för att man ska komma åt payetterna i den, utsätter man dessa för en temperaturförändring (Figur 5). Denna aspekt är viktig att tänka på när man ska överföra payetterna från långtidsförvaringen i kvävebehållaren till en mindre, mer portabel behållare vid förberedelserna inför insemination. Detta både för att tillse att de payetter som blir kvar i kvävebehållaren inte tar skada, men också för att överföringen av de payetter man skall använda sker så snabbt som möjligt för att minimera temperaturfluktuationer. Det är med andra ord viktigt att kanistern befinner sig i behållarens halsdel under endast en mycket kort tid och att man har en bra ordning i behållaren på sina inseminationsdoser. På så sätt slipper man leta efter de payetter som skall användas för insemination och minskar därmed temperaturfluktuationen som skulle kunna skada spermerna i payetterna (Shepard *et al.*, 1976).

När payetten skall laddas i pistoletten rekommenderas att denna förvärms genom att pistolettens främre del gnids med en torkduk under tiden payetten ligger i vattenbadet (ca 10 sekunder). Vattnet torkas sedan av från payetten innan den förs in i pistoletten varefter en skyddsstrumpa träs på (Dyrendahl, 1972; Paulsson, 1972; Gustafsson *et al.*, 1987; Gustafsson, 2010). Några vidare instruktioner om fortsatt hantering finns inte angivna i dessa dokument. Muntliga rekommendationer finns dock att vid kallare klimat, där djuren insemineras i kall

lösdrift eller om man skall transportera den laddade pistoletten från en plats i ladugården till en annan, att skydda pistoletten i möjligaste mån från temperaturväxlingar genom att hålla den mot den egna kroppen, t.ex. i armvecket på den arm där rektalhandsken är påträdd. Dokumentationen av detta förfarande och effekten på spermatemperaturen är bristfälligt undersökt och ifrågasätts då och då av seminarerande personal (Personligt meddelande: Gustafsson, 2013).



Figur 5. En schematisk skiss över temperaturen i halsen på en kvävebehållare. Modifierad från Saacke, (1974). Teckning: Hanna Boëthius.

MATERIAL OCH METODER

I undersökningen ingick fryst sperma (minipayette, 0,25ml; IMV, L'Aigle, Frankrike) från sammanlagt 20 mjölkkrastjurar, 10 SRB (Svensk röd och vit boskap) och 10 SH (Svensk Holstein) från VikingGenetics. Medelvärdet för NR56 för SRB respektive SH var 65,5% respektive 67,8% med en ett spann på 62,3-68,7% respektive 57-69,3%. Tjurarnas ålder vid den aktuella spermasamlingen varierade mellan 1 och 11 år (medelålder hos SRB- och SH-tjurarna var 5,1 respektive 3,2 år med en variation på 1-9 år respektive 1-7 år). Dock ingick i undersökningen spermadoser från en tjur (nr 5, SRB) som samlats vid två olika tillfällen, då tjuren var 1 respektive 5 år. Samtliga spermadoser i undersökningen var frysta i enlighet med det infrysningsprotokoll som beskrivits tidigare under avsnittet ”spermasamling, hantering och djupfrysning”.

De fem olika upptiningsprotokoll (A-E) som användes i studien framgår av Tabell 2. Valet av upptiningsprotokoll baseras på några av de rekommenderade temperaturer och tider som används vid upptining av tjursperma i fält i ett flertal länder inom Europa (Tabell 2.). Upptiningsprotokoll A utgör vår kontroll i undersökningen och motsvarar det rekommenderade upptiningsförvarande, som sedan länge används i Sverige i fält.

Tabell 2. Temperatur och upptiningstid för de protokoll (A-E) som användes

Protokoll	Temperatur °C	Tid
A	35	12s
B	38	7s
C	37	30s
D	37	45s
E	35	30min

De frysta doserna förvarades i flytande kväve fram till upptining. För vart och ett av de olika upptiningsprotokollen (A-E) tinades samtidigt 3 minipayetter (0,25ml) från varje tjur. Dessa payetter kom var och en från tre olika frysoperationer. Därefter tömdes den tinade sperman från de tre payetterna i ett provrör (3ml; Bergman labora, Sverige) för vidare analys. Detta för att utjämna eventuella skillnader mellan de olika ejakulaten/frysningoperationerna inom tjur.

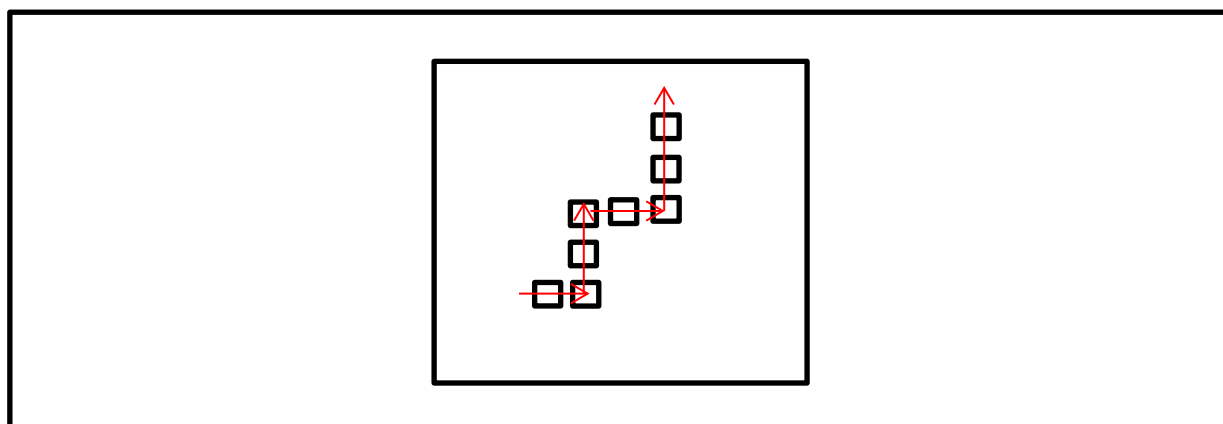
Vid upptiningen placerades de tre payetterna samtidigt i en termos med vatten av bestämd temperatur enligt protokollet. Vattentemperaturen mättes med hjälp av en digital termometer (Testo 735-2, Nordtec Instrument AB, Göteborg) med en noggrannhet av $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Efter upptining torkades payetterna av med papper. Den svetsade änden klipptes av, placerades i ett provrör, varefter den bomullspluggförsedda änden klipptes av och innehållet samlades upp i provröret. För att vara säker på att all sperma tömdes ur payetten blåstes en liten mängd luft genom de uppklippta stråna.

Datoriserad motilitetsanalys (CASA)

Innan provet applicerades på objektglas blandades sperman genom att ”knäppa med fingret” på sidan av röret 15 gånger. Exakt 5 μl sögs upp med hjälp av en pipett och applicerades på ett objektglas. Eventuella luftbubblor punkterades med ena hörnet på ett täckglas innan det applicerades på droppen. Uppstod luftbubblor under glaset applicerades ett lätt tryck på täckglaset med en nagel för att inte riskera att få fett på glaset. Därefter placerades objektglaset på ett varmt ($+38^{\circ}\text{C}$) objektbord under mikroskopet. Skärpan och ljusstyrkan anpassades enligt bilden på datorskärmen för att ge bästa möjliga skärpa till kameran. Analysen påbörjades först när eventuella strömningar i preparatet upphört, för att undvika felaktiga resultat. Därefter analyserades spermier i åtta olika synfält på olika platser i de inre delarna av preparatet. Ytterkanterna eller områden med luftbubblor och/eller debris analyserades inte. För att undvika att samma fält/område och spermier analyserades två gånger användes ett särskilt förflyttningsschema mellan de olika synfälten (Figur 6).

Analysen upprepades två gånger per prov efter upptining, dvs 16 fält per upptinat prov analyserades. Datorn analyserade de åtta fälten var för sig samt räknade ut ett medelvärde för alla åtta synfält, vilket innebar att vi fick två medelvärden per prov. Totalt analyserades ca 500 spermier per gång, varför det använda medelvärdet är baserat på en analys av ca 1000

spermier. Data lästes av och överfördes till en Excel-fil. De variabler som analyserades med hjälp av CASA framgår av Tabell 3.



Figur. 6. Skiss över förflyttningsschemat som användes vid CASA-undersökningen.

Tabell 3. Beskrivning och förklaring av de olika CASA-variabler som analyserades

Variabel	Förklaring
Tot.Mot %	Total motilitet
Prog.Mot %	Progressivt motila spermier
Lok.Mot %	Lokalt motila spermier
Immotile %	Immotila spermier
DCL μ	Distance Curved Line
DAP μ	Distance Average Path
DSL μ	Distance Straight Line
VCL μ /sek	<i>Curvilinear velocity</i> . Spermens väg är normalt något böjd varför hastigheten från A-B bör räknas längst en tänkt, böjd linje.
VSL μ /sek	<i>Velocity straight linear</i> . Istället för att följa den böjda linjen dras ett rakt streck mellan A-B och man räknar ut hastigheten efter den sträckan.
VAP μ /sek	<i>Velocity average path</i> . Hastigheten enligt ett medelvärde av sträckan enligt VCL och VSL
LIN	<i>Linearity</i> (VSL/VCL)
STR	<i>Straightness</i> (VSL/VAP)
WOB	<i>Wobble</i> (VAP/VCL)
BCF (Hz)	<i>Beat cross frequency</i> , hur många gånger svansen passerar en tänkt linje
ALH μ	<i>Amplitude lateral head displacement</i>
AOC ($^{\circ}$)	<i>Average Orientation Change of the head</i>
Hyper.Mot %	Hypermotila spermier

Flödescytometrianalys

För vart och ett av de olika upptyningsprotokollen (A-E) tinades tre payetter från varje tjur samtidigt. Var och en av dessa payetter kom från tre olika frysoperationer, och den tinade sperman tömdes från samtliga tre payetter i ett provrör (3ml; Bergman labora, Sverige). Detta

för att utjämna eventuella skillnader mellan de olika ejakulaten/frysningsoperationerna inom tjur. Ett prov om 8,5µl från sperman överfördes sedan till ett annat provrör och blandades med 291µl cellwash (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Därefter tillsattes 0,6 µl SYBR-14 och 3µl propidiumjodid (PI) (Live-dead ® Sperm Viability Kit L-7011; Invitrogen™ Inc., Eugene, OR, USA). Provet inkuberades därefter i ett mörkt värmeskåp vid +38°C under 10 minuter för ekvibrering. Efter inkuberingen placerades provröret i en LSR flödescytometer (Becton Dickinson, San José, CA, USA) med standardoptik. Den laser som användes var en argonjonlaser med våglängden 488 nm. Försöket genomfördes under två dagar med 50 prover/dag.

Statistisk analys

För varje tjur, protokoll och replikat (CASA) lagrades värden in i Excel (tio rader per tjur). Dessa data exporterades sedan till SAS programmet (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Mätvärdena analyserades med hjälp av variansanalys (PROC Mixed) enligt en modell som innehöll de fixa effekterna av ras, protokoll samt samspelet mellan ras och protokoll. Den statistiska modellen innehöll även den slumpmässiga effekten av tjur inom ras. Korrigerade medelvärden (LSmean) beräknades för protokoll och jämfördes med hjälp av T-test.

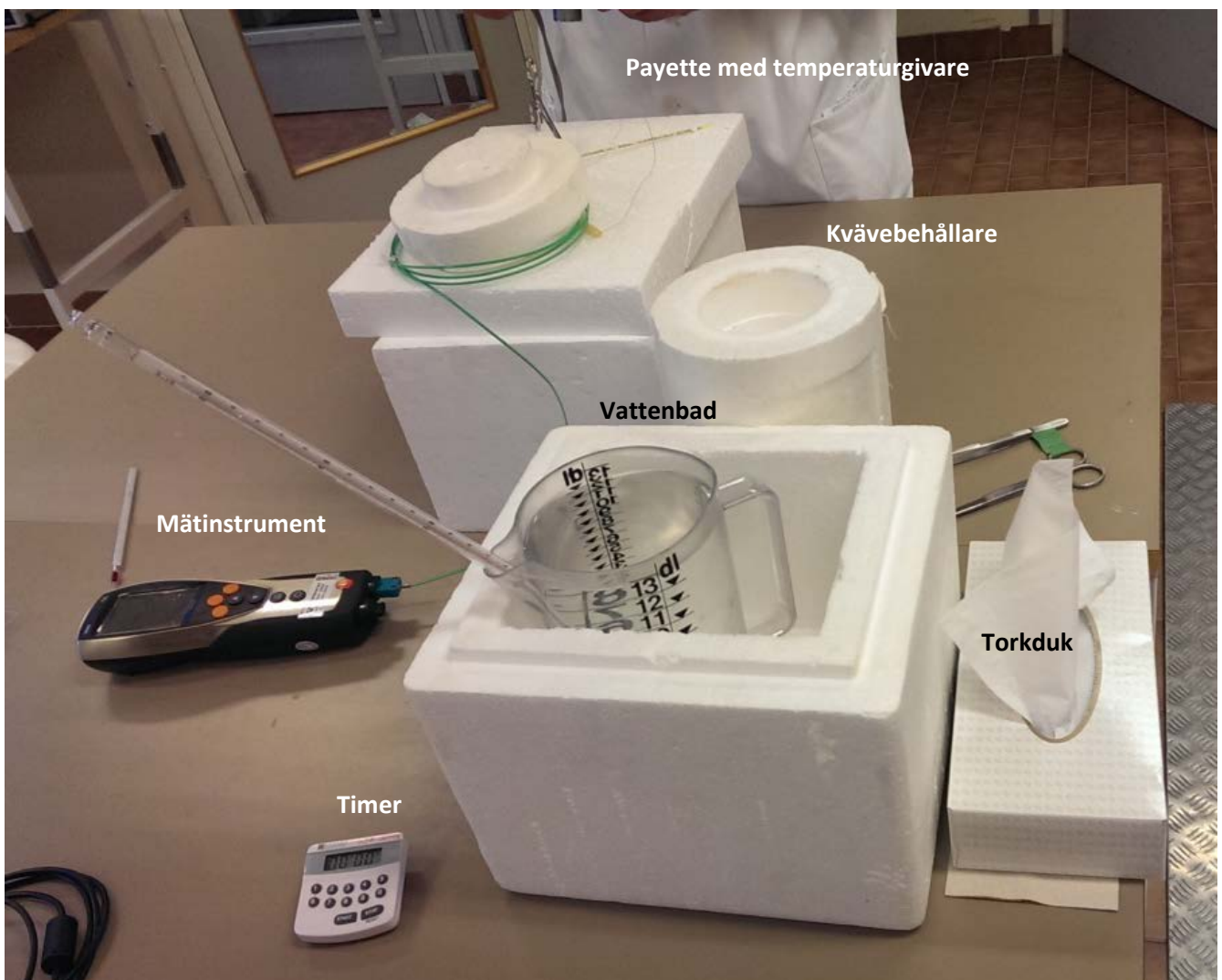
Temperaturmätning

För att mäta temperaturen inuti en minipayett vid de olika upptiningsprotokollen tinades en payett upp och den främre delen av en tunn, 2 m lång, temperaturgivare (diameter: 0,25 mm, mätområde: -40-200°C, mätnoggrannhet: 0,1°C; Nordtec Instrument AB, Göteborg, Sverige) fördes in i mitten av payetten (Figur 8). Temperaturgivaren anslöts till en TESTO 735-2 temperaturmätare (Nordtec Instrument AB, Göteborg, Sverige; Figur 7). För att temperaturgivarens främre sensor inte skulle ligga an mot payettens innervägg, utan vara så centrerad som möjligt inuti payetten, fäste vi små bitar av två silikonslangar med olika diameter på trådens ände innan den fördes in i payetten (Bild 9). Därefter sänktes payetten långsamt ner i flytande kväve. När temperaturen nått ca -193 - -195°C påbörjade vi upptiningen i enligt med de olika upptiningsprotokollen (A-E). Temperaturen registrerades två gånger per sekund och registreringen påbörjades i samma ögonblick som payetten sänktes ner i vattenbadet. Mätningen fortsatte sedan under ytterligare 10 sekunder med payetten i luften (med en omgivningstemperatur på +19°C) efter det att respektive upptiningsprotokoll avslutats och payetten lyfts ur vattenbadet. Upptiningsproceduren upprepades 5 gånger för varje protokoll. De registrerade värdena samlades sedan i ett Exceldokument för vidare analys.

För registrering av temperaturen inuti payetten, efter upptining enligt protokoll A, i samband med tre olika handhavanden i fält vid laddning av pistoletten, monterades temperaturgivaren på samma sätt som beskrivits ovan. Payetten tinades enligt protokoll A varefter vattnet torkades av med en pappersduk. Därefter placerades payetten i en pistollett som förvärmats genom att den gnidits med en torkduk under 10 sekunder. Därefter trädde en skyddsstrumpa av engångstyp på pistoletten varpå pistoletten hölls stilla i luften under resten av mätperioden.

Temperaturen mättes under 3-5 min med början då upptiningen av payetten påbörjades i vattenbadet.

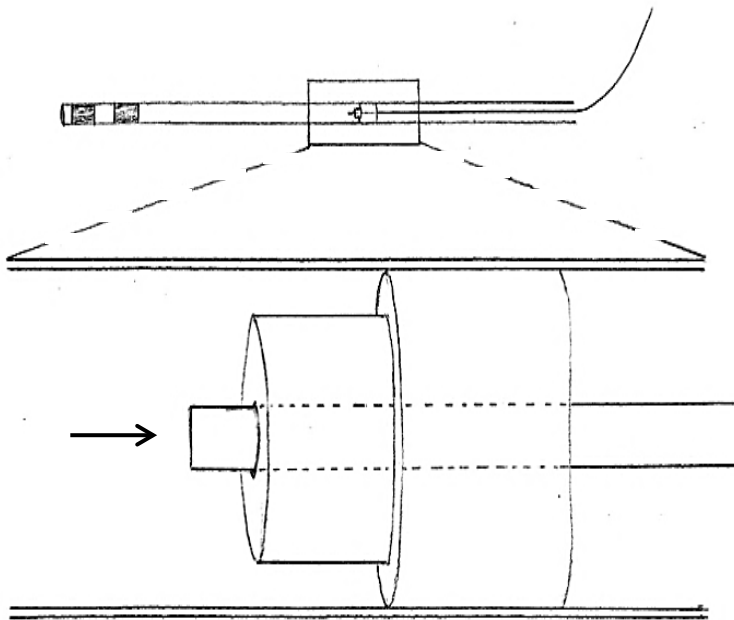
Försök utfördes vid två olika omgivningstemperaturer (+16-17°C respektive +4-6°C), i syfte att försöka efterlikna den tänkta temperaturen i ladugården och i en kall lösdrift under den kallare årstiden. Därefter upprepades försöken men med den skillnaden att pistoletens främre del efter laddning placerades i ett armveck hos en person med rektalhandske på armen. Försök gjordes även vid de olika omgivningstemperaturerna där pistoletten inte förvärmades innan payetten laddades. Tiden det tog till dess payetten laddats i pistoletten registrerades. Alla mätningar upprepades 5 gånger



Figur 7. Utrustningen som användes vid mätningen av temperaturen inuti payetten vid de olika tinningsprotokollen (A-E). Foto: Hanna Boëthius.



Figur 8. Payetten med temperaturgivaren i centrum och mitten av payetten. Detalj från Figur 7 ovan. Rektangeln tydliggör temperaturgivarens placeringen som beskrivs mer detaljerat i Figur 9. Teckning: Hanna Boëthius.



Figur 9. En detaljerad skiss över hur temperaturgivarens spets (pil) är placerat mitt i payetten med hjälp av några bitar silikonslang av två olika storlekar. Teckning: Hanna Boëthius.

RESULTAT

CASA och flödescytometri

Resultatet av analysen av spermieviabiliteten med hjälp av CASA och FCM för de olika upptiningsprotokollen (A-E) ses i Tabell 4. En statistiskt signifikant skillnad mellan upptiningsprotokollen sågs för variablerna total motilitet, progressiv motilitet, immotilitet, hypermotilitet, DAP, DSL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, BCF, ALH och AOC.

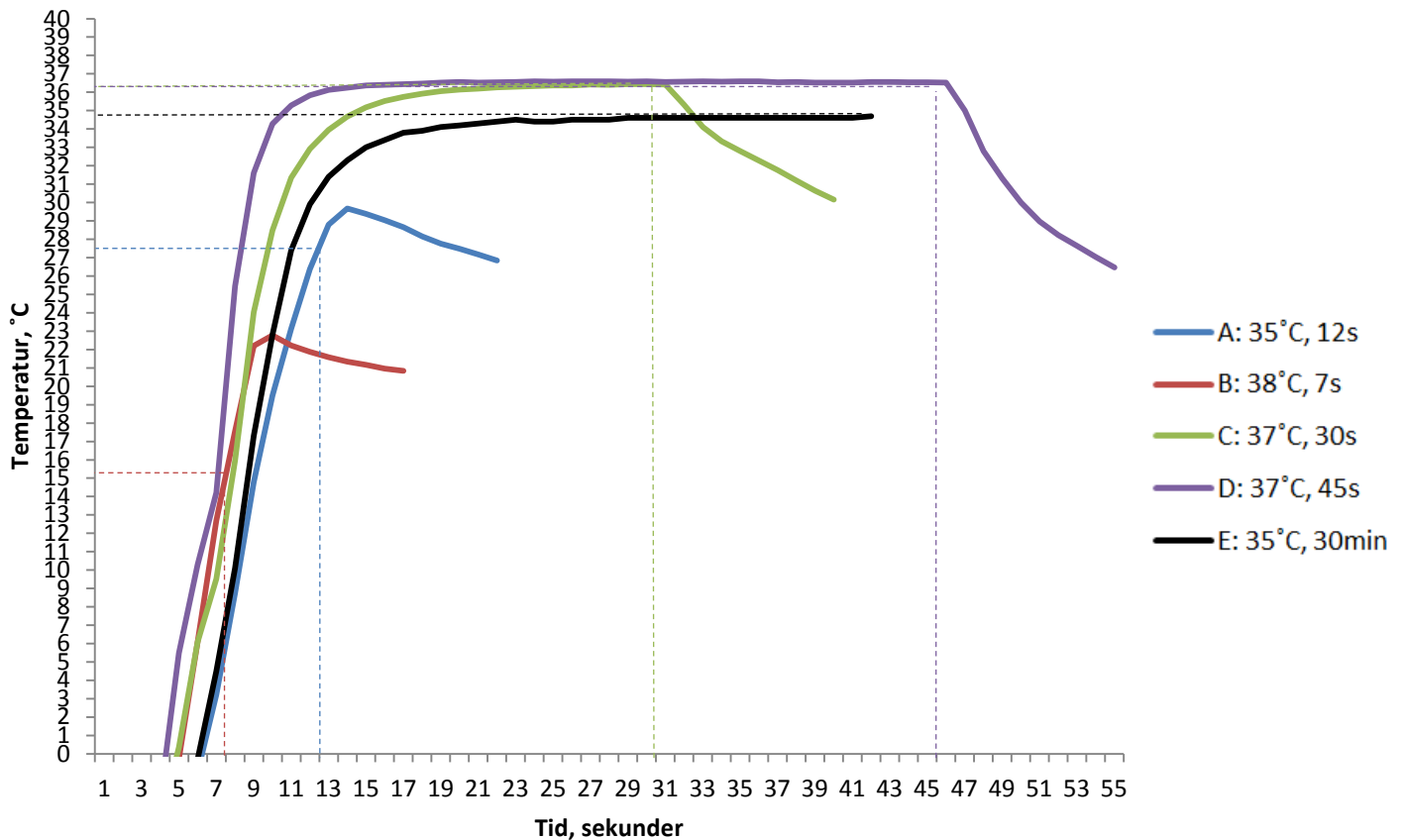
Tabell 4. *Least square means* för de olika motilitetsvariablerna som analyserats med hjälp av CASA samt membranintegriteten, utvärderat med hjälp av flödescytometri (FCM), för de olika upptiningsprotokollen (A-E)

Variabel	Upptiningsprotokoll					P-värde
	A (35°C, 12s)	B (38°C, 7 s)	C (37°C, 30s)	D (37°C, 45s)	E (35°C, 30 min)	
Total motilitet %	56,9	54,5	53,2	54,4	59,0	0,0355
Progressiv motilitet %	54,3	51,9	50,6	50,8	56,1	0,0185
Lokal motilitet %	2,6	2,6	2,6	2,7	2,9	n.s.
Immotilitet %	43,0	45,5	46,8	45,9	41,0	0,0264
Hypermotilitet %	13,6	13,6	10,3	9,8	11,9	0,0014
DCL μ	68,8	68,3	68,0	66,5	68,3	n.s.
DAP μ	34,3	33,8	34,6	33,9	36,2	0,0003
DSL μ	25,2	24,5	26,0	25,9	27,1	0,0021
VCL μ /sek	151,1	150,2	149,8	146,7	154,5	n.s.
VAP μ /sek	75,8	74,6	76,4	75,3	80,7	<.0001
VSL μ /sek	55,6	54,2	57,7	57,5	60,4	0,0002
LIN (VSL/VCL)	0,37	0,40	0,38	0,39	0,50	<.0001
STR (VSL/VAP)	0,73	0,70	0,75	0,76	0,70	0,0019
WOB (VAP/VCL)	0,49	0,49	0,51	0,50	0,50	<.0001
BCF (Hz)	24,9	24,8	25,5	25,7	25,4	0,0319
ALH μ	5,2	5,2	4,9	4,8	4,9	0,0013
AOC (°)	21,9	22,2	22,1	21,4	23,4	<.0001
FCM %	59,9	61,3	60,5	59	58,5	n.s.

n.s: icke signifikant

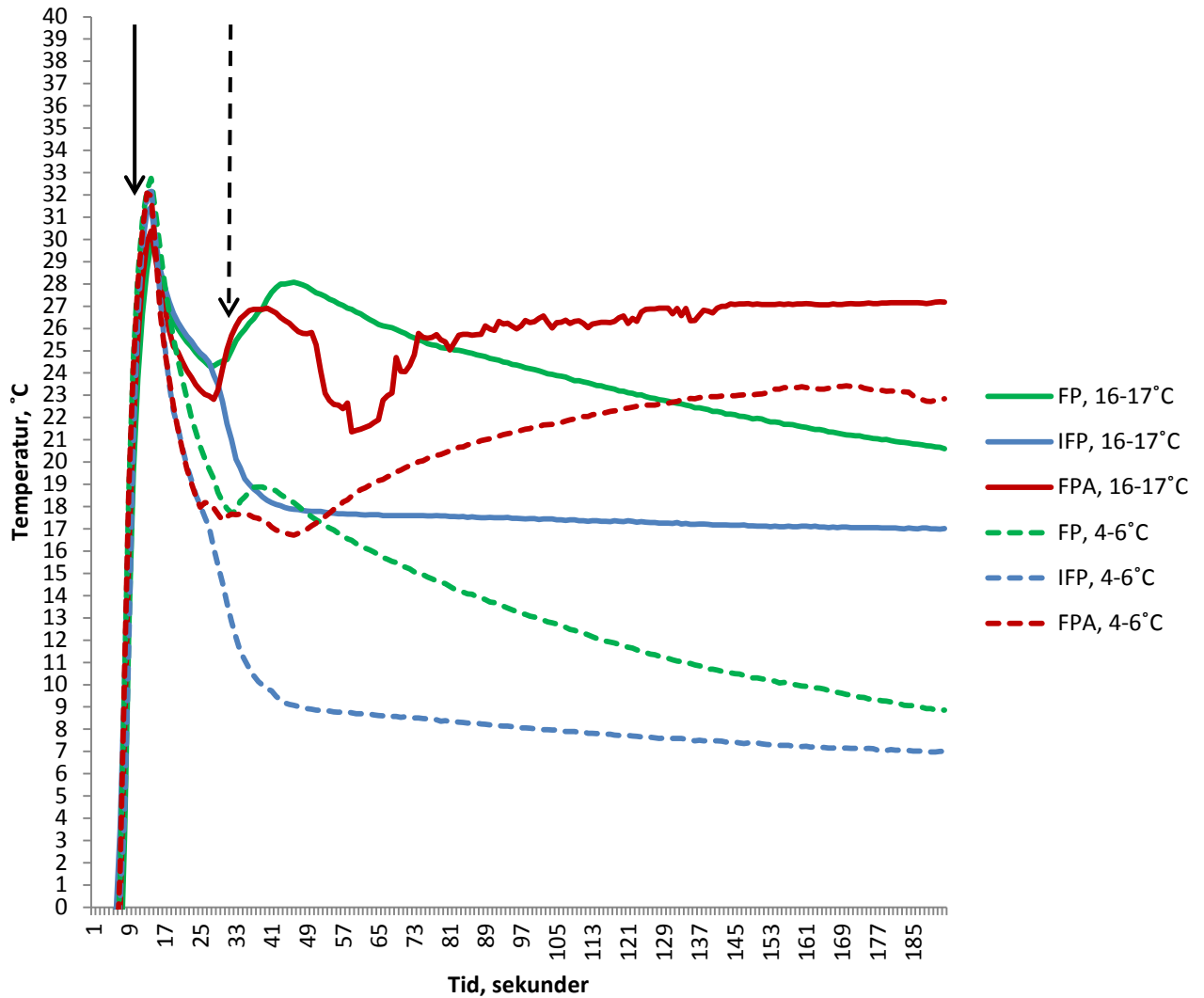
Temperaturmätningen

I Figur 10 ses resultatet av temperaturmätningen inuti payetterna vid de olika upptinningsprotokollen (A-E). Temperaturen steg ytterligare några grader efter det att payetten lyftes ur vattenbadet vid protokoll A och B. Efter att payetterna nått sin sluttemperatur började temperaturen att sjunka ner mot omgivningstemperaturen (19°C).



Figur 10. Medelvärde av fem replikat av registrering av temperaturen över 0°C inuti payetten vid de olika upptinningsprotokollen (A-E). De streckade linjerna markerar temperaturen i payetten vid upptinningstidens slut då payetten lyftes ur vattenbadet.

I Figur 11 visas temperaturen inuti payetten vid upptining i 35°C under 12s efter laddning i förvärmad respektive inte förvärmad pistolett varefter pistoletten hölls fritt i luften (omgivningstemperatur: +16-17°C respektive +4-6°C) och där pistolettens främre del skyddades i ett armveck (omgivningstemperatur: +16-17°C respektive +4-6°C).



Figur 11. Uppmätt medeltemperatur (5 replikat) per sekund inuti payetten i samband med olika handhavanden (FP: förvärmad pistolett, IFP: icke förvärmad pistolett, FPA: pistolettens främre del skyddas i armveck). Omgivningstemperatur + 16-17°C = heldragen linje, + 4-6°C=streckad linje. Pilen anger tidpunkten då payetten lyftes ur vattenbadet. Den streckade pilen anger den ungefärliga tiden då payetten laddats i pistolette, ca 18 sekunder efter upptining.

DISKUSSION

De olika tiningprotokollen som vi undersökte varierade sinsemellan avseende temperatur och tid. Temperaturen styr upptiningshastigheten medan tiden påverkar sluttemperaturen av sperman efter tining. Vi kan i detta försök inte särskilja eventuella effekter på spermerna av dessa två enskilda faktorer då de kombinerats i de använda protokollen. Många studier har visat att snabb upptining är att föredra framför långsam (Senger *et al.*, 1976; Mazur, 1984). Aamdal & Andersen (1968a; 1968b) kom fram till att tjursperma som tinats i +75°C under 12 sekunder gav mindre membranskador än upptining vid +35°C under 30 sekunder. I våra protokoll varierade temperaturen mellan +35°C och +38°C, dvs. förhållandevis marginellt, vilket också återspeglas i den sammanställning av upptiningstemperaturer som idag används i några europeiska länder (Tabell 1). Man kan eventuellt ifrågasätta om den lilla skillnad i upptiningstemperatur, som vi använt i studien, verkligen är av betydelse för effekten på spermerna. I vår litteraturgenomgång har vi inte kunnat hitta några sådana jämförande försök. Tiden (7 sekunder – 30 minuter) i tiningsvattnet varierade dock desto mer mellan våra olika protokoll. En konsekvens av upptiningstidens längd var att sluttemperaturen i sperman närmade sig upptiningsvattnets temperatur ju längre upptiningstiden var (Figur 10).

Spermieparametrar

I vår studie av spermernas livsduglighet fann vi att av motilitetsvariablerna (vid analys med hjälp av CASA), var flertalet av dessa numeriskt högst efter upptining enligt protokoll E (+35°C, 30 min) medan den var lägst för protokoll B (+38°C, 7s). En omvänd bild sågs vid analys med hjälp av flödescytometri där spermernas membranintegritet var lägst för protokoll E och högst för protokoll B ($P=0,029$). En orsak till detta skulle kunna vara att den långa förvaringen vid +35°C i protokoll E är fördelaktig för de variabler som registreras avseende spermens motilitet i CASA jämfört med vid de kortare upptiningstiderna i de andra protokollen (A-D). En del av spermerna som registrerades som immotila eller lokalt motila skulle eventuellt kunnat uppnå högre motilitetsvärden om upptiningstiden varit längre. Detta resonemang stöds av det faktum att de spermier som tinats enligt protokoll A hade lägre motilitetsvärden än spermier som tinats enligt protokoll E ($P=0,0014$), med den betydligt längre upptiningstiden. Å andra sidan skulle den långa upptiningstiden i protokoll E kunna medföra att en större andel spermier hinner skadas eller dö under de 30 minuter de förvaras vid +35°C. Detta skulle kunna förklara varför andelen spermier med intakt cytoplasmamembran var lägre (E), vid analys med hjälp av flödescytometri, jämfört med övriga protokoll och framförallt jämfört med protokoll B med den kortaste upptiningstiden (7s). Detta stöds även av ett numeriskt högre värde för andelen membranintakta spermier vid upptining enligt protokoll A (12s) jämfört med protokoll E (30 min).

I en pågående studie rörande viabiliteten hos fryst/upptinad tjursperma fann man en svag positiv korrelation mellan några motilitetsvariabler (STR, LIN, BCF; Tabell 3) analyserade i CASA och dräktighetsresultatet mätt som 56 dagars icke omlöpar procent (NR) (Personligt meddelande, Morrell, 2013). Om detta preliminära resultat appliceras på resultatet i vår studie skulle upptining enligt protokoll D vara det mest fördelaktiga ur fertilitetssynpunkt, före protokoll C och E. Upptining enligt protokoll C och D innebar upptining av spermerna under

en längre tid (30s respektive 45s) än vid upptining enligt protokoll A (12s) och en stabil temperatur på cirka +37°C uppnåddes i C och D redan innan upptiningstiden var slut. Motsvarande gällde även för upptining enligt protokoll E, men då med en sluttemperatur på +35°C. Eventuellt skulle de längre upptiningstiderna (C-E) kunna medföra att spermier hinner anpassa sig (t ex. genom att membranerna hinner stabilisera sig) till en högre upptiningstemperatur som de sedan dessutom befinner sig i under en längre tid. Möjligen skulle detta kunna innebära att de bättre skulle kunna klara av eventuella temperaturfluktuationer senare i samband med handhavandet före insemination.

Dessa delvis motstridiga resultat visar på svårigheterna med att tolka utfallet av de olika laboriemetoderna. En strikt tolkning kräver att man testat de olika metodernas dräktighetsresultat mot resultatet efter AI i fält. Dessutom har även påverkan av olika faktorer hos kon betydelse, så som t ex. transporten av spermier i de honliga genitalia, varför detta område är svårt att studera. Många tidigare undersökningar som gjorts visar dock att korrelationen mellan olika motilitetsvariabler enligt CASA och dräktighetsresultatet är svag (Söderquist *et al.*, 1991). Det är dock osannolikt att det inte skulle finnas något samband mellan t ex. spermernas motilitet och membranintegritet och fertiliteten. För att undersöka detta krävs ett tjurmaterial med en stor spridning i fertiliteten. I vår studie är dock tjurarna redan selekterade för bl a. spermernas frysbarhet och fertilitet, vilket gör spridningen i materialet liten.

I en AI-manual från ett avelsföretag i Australien (Genetics, 1996) slås fast att:

”stråna skall tinas i minst 30 sekunder, men att längre tid i vattenbadet inte ger någon negativ effekt på spermernas befruktningsskicklighet så länge payetten används inom 20 min”.

I vår studie visade spermier fortfarande en hög grad av motilitet efter 30 min (protokoll E) jämfört med övriga upptiningsprotokoll, men hur 30 minuters förvaring jämfört med 20 minuters förvaring påverkar befruktningsskickligheten är för närvarande oklart. Emellertid kunde Mørkholm & Filseth (1988) visa att tjursperma som tinades i vattenbad med +35-38°C och sedan förvarades i vattenbadet i upp till 1,5 tim inte påverkade dräktighetsresultatet (60 dagar NR) trots att andelen döda spermier ökade. Även i vår studie ökade andelen döda spermier vid den längre upptiningstiden (E), men enligt Mørkholm & Filseth (1988) behöver det alltså inte påverka dräktighetsresultatet.

I en studie av Almquist *et al.* (1979) där de jämförde befruktningsskickligheten hos tjurspermier som tinats i 35°C under 12 respektive 30 sekunder såg de en signifikant bättre dräktighetsresultat (högre NR) hos de spermier som tinats i 30 sekunder. I en liknande studie av Almquist *et al.* (1982) där de istället jämförde tjurspermier som tinats i +32-35°C under 9 respektive 40 sekunder såg de även här en signifikant ökning i dräktighetsprocenten (NR) hos de som tinats under en längre tid, det vill säga 40 sekunder. Detta överensstämmer med resultaten i vår studie som ger indikationer på att en längre upptiningstid skulle kunna vara positiv för spermernas befruktningsskicklighet. För att undersöka om resultatet från Almquist's studie stämde även under svenska förhållanden gjordes ett fältförsök med sperma

tinad i 12 respektive 30 sekunder i +32-34°C vatten (Håård & Håård, 1984). I den studien fann man dock ingen signifikant skillnad i dräktighetsresultat mellan de två tiningningsförfarandena. Författarna föreslår att den uteblivna positiva effekten med en längre tiningningstid, som tidigare försök antytt, uteblev på grund av att spermerna nådde en högre sluttemperatur och därmed blev mer utsatta för köldshock. Detta skulle kunna reducera den eventuella positiva effekt som tidigare visats med en längre tiningningstid (Almquist *et al.*, 1982).

Temperatur i payetten i samband med upptining

I en svensk instruktionsbok "Payetteknik i Fältarbete" från 1972, ges en förklaring till gällande tiningningsinstruktioner:

"Varför skall då upptiningen avbrytas efter 12 sekunder? Sperman har då temperaturen på +5-+10°C, d.v.s. den för färsk spermaförvaring och hantering idealiska temperaturen. Under förberedelser och insemination förskjuts den långsamt i riktning mot omgivningens och kroppens temperatur. Tinar man för kort tid, riskerar man att temperaturen stannar ungefär vid nollpunkten, som i själva verket bör passeras snabbt för att undgå för spermerna skadliga omlagringar i iskristallerna (därför måste upptiningen ske med ganska hög vattentemperatur). Tinar man för länge, stiger spermatemperaturen i payetten upp mot + 30°C och risken för köldchock vid den fortsatta hanteringen blir mycket stor. Ett snabbt temperaturfall på 5- 10°C från denna nivå, exempelvis genom låg omgivningstemperatur eller kall pistolet, verkar förödande på dräktighetsresultatet" (Dyrendahl, 1972)

I våra mätningar av temperaturen såg vi att dessa påståenden inte alls stämmer. Enligt protokoll A, som är det protokoll som avses ovan och är det rekommenderade protokollet i Sverige idag, så var temperaturen i payetten ca +9°C redan efter 9 s och efter 12 s var temperaturen ca +27°C. Temperaturen fortsatte sedan att stiga ytterligare till ca +29-30°C under de följande tre sekunderna efter det att payetten lyfts ur vattenbadet vid en omgivningstemperatur på +19°C. Liknande temperaturhöjning observerades även för protokoll B. Denna temperaturhöjning åstadkoms sannolikt av den värme som finns lagrad i payettens plastvägg. Dock sjunker sedan temperaturen i payetten efter avslutad upptining på grund av den lägre omgivningstemperaturen. När vi jämförde temperaturkurvan för samtliga upptiningprotokoll sjönk temperaturen snabbast i protokoll C och D efter det att payetten lyfts ur vattenbadet vid en rumstemperatur på 19°C. En förklaring till detta skulle kunna vara att temperaturen inuti stråna vid dessa protokoll var den högst uppmätta (37°C) och att skillnaden mellan payettens temperatur och omgivningstemperaturen därför var störst i dessa fall. Lägst temperaturfluktuation sågs vid upptining enligt protokoll B (+38°C, 7s) där sluttemperaturen efter upptining låg närmare omgivningstemperaturen, sannolikt på grund av den kortare upptiningstiden. Man kan därför spekulera i hur dräktighetsresultatet skulle påverkas om upptiningstvattnets temperatur skulle kunna anpassas till rådande omgivningstemperatur, för att minska fluktuationer i temperaturen hos den upptinade sperman. Ett sådant förfarande skulle dock ur praktisk synvinkel inte vara realistiskt att tillämpa i fält. Temperaturskillnaden mellan spermans sluttemperatur efter upptining och kons kroppstemperatur får inte heller bli för stor då en för snabb temperaturökning i samband med insemination också visat sig vara skadlig för spermernas befruktningsevne (Senger *et al.*, 1976).

Temperatur i payetten vid olika handhavanden av pistoletten

Vid upptining enligt protokoll A sjönk temperaturen från 30°C till 21°C efter ca 3 min då payetten laddats i en förvärmad pistolett vid en omgivningstemperatur på 19°C. Upptiningsprotokoll A har använts vid AI under många år i Sverige med ett generellt sett acceptabelt dräktighetsresultat som följd, vilket talar emot att den temperatur fluktuation vi uppmätte i payetten, verkligen skulle ha en sådan ”förödande” effekt på spermernas befruktningsskicklighet som tidigare påstås (Dyrendahl, 1972). Det finns även studier (Senger *et al.*, 1976; DeJarnette *et al.*, 2000), som visat på att spermerna är mer tåliga mot temperaturfluktuationer och därmed köldchock efter upptining än om temperaturfluktuationerna sker före upptining. Detta står i kontrast till tidigare påstående (Dyrendahl, 1972) och stödjer delvis resultaten i vår studie där vi såg högst motilitet i upptiningsprotokollen med längre upptiningstid och högre sluttemperatur.

Påståendet (Dyrendahl, 1972) att temperaturen i payetten efter upptining i vattenbad långsamt förskjuts i riktning mot omgivningens och kroppens temperatur under förberedelserna och inseminationen kunde inte heller bekräftas i vårt försök. Vi fann istället att laddning av payetten i pistoletten medförde en stadig sänkning av temperaturen inuti strået tills den närmade sig omgivningens temperatur. Hastigheten på temperatursänkningen och sluttemperaturen påverkades av hur hög omgivningstemperaturen var. Det medför i praktiken att tiden mellan upptining och insemination skulle kunna påverka temperaturen i payetten på ett, för dräktighetsresultatet, negativt sätt.

Vi fann även att temperaturen sjönk snabbare då payetten laddades i en pistolett som inte var förvärmad jämfört med i en pistolett som var förvärmad, men att temperatursänkingshastigheten även var beroende av omgivningstemperaturen. Vi såg också att både hastigheten och storleken på temperatursänkningen inuti payetten minskades, men i olika utsträckning beroende på omgivningstemperaturen om pistolettens främre del placerades i ett behandskat armveck. Om målet är att försöka undvika temperatursänkning och uttalade fluktuationer i payettens temperatur blir det viktigt att både förvärma och skydda pistolettens främre del i samband med laddning av pistoletten, framförallt då omgivningstemperaturen är låg, till exempel i en kall lödrift och under den kallare årstiden.

SLUTSATS

Resultaten visade att en längre upptiningstid vid +35°C var fördelaktigt för spermien motilitet, men baserat på preliminära resultatet från en pågående studie skulle upptining enligt protokoll D (+37°C, 45s) kunna ge ett bättre dräktighetsresultat. Det krävs dock ett omfattande och kontrollerat fältförsök för att utröna de olika upptiningsprotokollens påverkan på dräktighetsresultatet innan nuvarande instruktion för spermahantering i fält kan bli föremål för en ändring.

I motsats till tidigare teorier rörande vilken sluttemperatur som uppnås vid upptiningen uppmätte vi en betydligt högre temperatur inuti payetten vid upptining enligt protokoll A (35°C, 12s) och vi såg även att temperaturen fortsatte stiga efter payetten tagits upp ur vattenbadet. Temperaturen i payetten fluktuerade även kraftigt efter upptining oavsett upptiningsprotokoll. Temperaturfluktuationerna kunde dock begränsas om pistoletens främre del värmdes före och skyddades efter laddning av pistoleten oavsett omgivningstemperatur. Det är emellertid i nuläget oklart vilken betydelse temperaturfluktuationen i sig har för spermernas befruktningförmåga.

TACK

Ett stort tack till min huvudhandledare Lennart Söderquist som stöttat och hjälpt mig med kunskap och engagemang, oavsett veckodag, under hela projektperioden. Ett stort tack också till min biträdande handledare, Hans Gustafsson, för stöd, idéer och kunskap. Tack till er båda för roliga laborationer med intressanta resultat.

Tack till Nils Lundheim för den statistiska bearbetningen av analysresultaten och för experthjälp inom statistiken.

Tack till Jane Morrell för introduktion och hjälp inför laborationen med CASA samt för den information som delgivits oss rörande den pågående studien om korrelationen mellan CASA-parametrar och dräktighetsresultatet på nöt.

Tack till Anders Johannisson för hjälp med laborationer involverande flödescytometri och för hjälp med sammanställningen av den skriftliga delen rörande flödescytometrin.

Tack till Jonas Malmsten för villkorslös hjälp med Office och EndNote, vem vet hur det hade gått utan honom.

Tack till Karin Selin-Wretling för assistans vid laborationer och för trevliga pratstunder.

REFERENSLISTA

- Aamdal, J. & Andersen, K. (1968a). Fast thawing of bull semen frozen in straws. In: *VI e Congress on Reproduction and Artificial Insemination*. Paris.
Tillgänglig:
http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=3&SID=W1XjONah9IUJ2RqMoHv&page=1&doc=2 [2013-11-13]
- Aamdal, J. & Andersen, K. (1968b). Fast thawing of semen frozen in straws. *Zuchthygiene* vol. 3, ss. 22-24.
Tillgänglig:
http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=3&SID=W1XjONah9IUJ2RqMoHv&page=1&doc=1 [2013-11-13]
- ABS Global, I. (1983). *A.I. Management Manual*. Fourth. ed. Wisconsin, USA: ABS Global, Inc.
- Almquist, J.O., Grube, K.E. & Rosenberger, J.L. (1982). Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in french straws. *Journal of Dairy Science*, vol. 65(5), ss. 824-827.
- Almquist, J.O., Rosenberger, J.L. & Branas, R.J. (1979). Effect of thawing time in warm water on fertility of bovine spermatozoa in plastic straws. *Journal of Dairy Science* vol. 62(5), ss. 772-775.
- Bailey, J.L., Robertson, L. & Buhr, M.M. (1994). Relationships among in-vivo fertility, computer-analyzed motility and in-vitro Ca²⁺ flux in bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science*, vol. 74(1), ss. 53-58.
- Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M. & Critser, J.K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, vol. 78(8), ss. 1682-1699.
- DeJarnette, J.M., Barnes, D.A. & Marshall, C.E. (2000). Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, vol. 53(6), ss. 1225-1238.
- Dyrendahl, I. (1972). Payetteknik i fältarbete. Semin avel, ek. för., Skara. s. 14.
- Einarsson S., G.H., Larsson K., Swensson T., Söderquist L. (1987). *Artificiell insemination och reproduktion: Artificiell insemination och reproduktion* (red. T. Swensson, L. Söderquist), SHS Medelände 149, s. 51.
- Genetics, (1996), *DIY Artificial Insemination Manual: Genetics Australia*, Victoria, Australien.
- Graham, J.K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, vol. 68(3-4), ss. 239-247.
- Gustafsson, H., Larsson, K., Söderquist, L., (1987) *Artificiell insemination och reproduktion – Nötkreatur. Artificiell insemination och reproduktion* (red. T. Swensson, L. Söderquist), SHS Medelände 149, ss. 77-80.
- Gustafsson, H. (2010). *Kvalité i seminarbetet på nötkreatur*. Kvalitétssäkringsdokument, Svensk Mjölk. ss. 9-10.
- Håård, M.G. & Håård, M.C. (1984). Prolonged thawing time for bovine semen in 0.25 ml French straws. In: *10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, June 10-14 1984, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, USA. Volume II. Brief communications*. Urbana,: University of Illinois.
- Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, vol. 53(1), ss. 47-58.
- Larsson, K. (1987). Spermakonsivering. *Artificiell insemination och reproduktion* (red. T. Swensson, L. Söderquist), SHS Medelände 149, s. 51.
- Larsson, K. (1977). *Artificiell insemination*. Kompendiesamling från Institutionen för obstetrik och gynekologi, Sveriges Lantbruksuniversitet. ss. 113-149.

- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells - mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, vol. 247(3), ss. 125-142.
- Morkholm, E.J. & Filseth, O. (1988). Fertility results using deep-frozen bull semen after different lengths of incubation in the thawing water. Proc. *11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. University College Dublin, Ireland, June 26-30 1988. vol. 3 s. 276.
- Nagy, S., Hallap, T., Johannisson, A. & Rodriguez-Martinez, H. (2004). Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, vol. 80(3-4), ss. 225-35.
- Parkinson, T.J. & Whitfield, C.H. (1987). Optimization of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*, vol. 27(5), ss. 781-797.
- Paulsson, E. (1972). *Insemination och inseminationsteknik*: LT-förlag.
- Saacke, R. G., (1974): *Concept in semen packaging and use*. Proceedings of the 8th Conference of Artificial insemination in Beef Cattle of the National Association of Animal Breeders. s. 15.
- Saacke, R.G., (1982). What happens when a sperm is frozen and thawed. *9th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. National Association of Animal Breeders, Milwaukee, Wisconsin. s. 7.
- Senger, P.L., Becker, W.C. & Hillers, J.K. (1976). Effect of thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. *Journal of Animal Science*, vol 42(4), ss. 932-936.
- Shepard, M.L., Goldston, C.S. & Cocks, F.H. (1976). H₂O-NaCl-glycerol phase-diagram and its application in cryobiology. *Cryobiology*, vol. 13(1), ss. 9-23.
- Söderquist L., Rodriguez-Martinez, H., Janson L. (1991). Post thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation to fertility. *Journal of Veterinary Medicine Association*, vol 38, ss. 165-174.
- Söderquist, L., (1987). Reproduktionsfysiologi. *Artificiell insemination och reproduktion* (red. T. Swensson, L. Söderquist), SHS Medelände 149, s. 48.
- Swensson, T., (1987). AI-teknikens för- och nackdelar. *Artificiell insemination och reproduktion* (red. T. Swensson, L. Söderquist), SHS Medelände 149, ss. 23-24.
- Thibier, M. (2005). The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reproduction Nutrition Development*, vol. 45(3), ss. 235-242.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., DeJarnette, J.M. & Marshall, C.E. (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, vol. 58(3), ss. 786-793.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, vol. 7(4), ss. 871-891.