



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Utvärdering av sojalecithin som ett alternativ till äggula vid frysning av hundsperma

Elaine Sandell

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:42*

Utvärdering av sojalecithin som ett alternativ till äggula vid frysning av hundsperma

Evaluation of soybean lecithin as an alternative to egg yolk in the cryopreservation of canine semen

Elaine Sandell

Handledare: Eva Axné, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Jane Morrell, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:42

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: spermafrysning, hundsperma, sojalecithin, äggula

Keywords: cryopreservation, canine semen, soybean lecithin, egg yolk

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Frost eller kyld sperma används ofta vid artificiell insemination på hund. Skador kan uppstå på spermerna under frysningsprocessen. För att spermerna ska bibehålla sin viabilitet och undvika skador tillsätts spädningvätskor som bland annat innehåller sockerarter, antibiotika, glycerol och äggula. Äggula skyddar spermerna mot frysskador och bidrar till en ökad spermieöverlevnad, dock är mekanismen bakom detta ej helt klarlagd. Att äggula ingår i spädningvätskan kan medföra en risk för mikrobiell kontamination och innebära ett problem vid internationell handel med sperma. Sojalecithin har nyligen lyfts fram som ett icke-animaliskt alternativ till äggula i spädningvätskor och har framgångsrikt använts vid frysning av sperma från andra djurslag.

Målet med detta arbete var att utvärdera hur hundsperma påverkas av att frysas med en spädningvätska som innehåller sojalecithin jämfört med en spädningvätska som innehåller äggula. Sperma från totalt fem hundar delades in i tre delar och frystes in med äggula, 1 % sojalecithin eller 2 % sojalecithin. Efter upptining utvärderades spermernas livsduglighet efter frysning genom att jämföra motilitet, andel intakta akrosomer samt andel intakta plasmamembraner. Resultaten visar att motiliteten var högre med en äggulebaserad spädningvätska jämfört med en spädningvätska baserad på sojalecithin ($p < 0,0001$). Lägre andel intakta plasmamembraner samt lägre andel intakta akrosomer sågs vid frysning med sojalecithinsbaserad spädningvätska än med äggulebaserad spädningvätska ($p < 0,0001$ resp. $p = 0,015$). Sammanfattningsvis visade studien på en bättre spermieöverlevnad när spermier frystes med äggulebaserad spädningvätska jämfört med när spermier frystes med en spädningvätska baserad på sojalecithin.

SUMMARY

Frozen or chilled semen is often used in artificial insemination in dogs. To maintain viability and prevent damages of the spermatozoa, extenders containing sugars, glycerol, antibiotics and egg yolk are added to the semen. Egg yolk prevents cell damages during freezing and cooling, but the mechanism behind this is not fully understood. The presence of egg yolk represents a potential risk of microbial contamination, which can pose a problem in the international exchange of cryopreserved semen. Recently, soybean lecithin has been suggested as an alternative to egg yolk in extenders. Soybean lecithin has successfully been used in the cryopreservation of semen in other species.

The aim of this study was to evaluate the suitability of an extender based on soybean lecithin for freezing of canine semen compared with an extender based on egg yolk. Semen from five dogs was divided into three aliquots and frozen using three different extenders containing egg yolk, 1 % soybean lecithin or 2 % soybean lecithin. The viability of the spermatozoa was evaluated after thawing by examining motility, acrosome integrity and plasma membrane integrity. A higher motility was achieved with an egg yolk based extender compared to an extender based on soy bean lecithin ($p < 0,0001$). Both acrosome integrity and plasma membrane integrity were better with an extender containing egg yolk compared to an extender containing soybean lecithin ($p < 0,001$ and $p = 0,015$). In conclusion, the sperm evaluated in this study had enhanced preservation with an egg yolk based extender compared to an extender based on soybean lecithin.

INNEHÅLL

INTRODUKTION	1
LITTERATURÖVERSIKT	1
Artificiell insemination	1
Spermasamling samt utvärdering	2
Spermahantering vid kylning och frysning	2
Innehåll i spädningslösningar	3
MATERIAL OCH METODER	6
Hundar	6
Spädningslösningar	6
Försöksdesign	7
Spermasamling och hantering	7
Utvärdering efter upptining	8
Statistiska analyser	10
RESULTAT	10
Spermiekvalitet	10
Motilitet	10
Utvärdering av plasmamembran	12
Utvärdering i akrosomintegritet (andel intakta akrosomer)	13
Parametrar för motilitet	14
DISKUSSION	15
KONKLUSION	17
REFERENSER	18

INTRODUKTION

Vid artificiell insemination används ofta kyld eller fryst sperma. För att inseminationen ska lyckas krävs att spermerna är livsdugliga även efter kylning eller frysning. Under de senaste årtiondena har utvecklingen av frystekniker för sperma gått starkt framåt.

Användning av en spädningvätska är nödvändig för att spermerna ska överleva och behålla sin viabilitet under och efter frysning (Salisbury *et al.*, 1978). I spädningvätskan ingår ofta äggula som skyddar spermerna mot frysskador och bidrar till en ökad spermieöverlevnad. Mekanismen bakom äggulans skyddande verkan är ej helt klarlagd.

Att äggula ingår i spädningvätskan kan dock medföra en risk för mikrobiell kontamination vilket framförallt kan innebära ett problem vid internationell handel. Sojalecithin har lyfts fram som ett alternativ till äggula i spädningvätska. Tidigare försök har visat att äggula kan ersättas av sojalecithin vid kylning och frysning av sperma hos andra djurslag än hund (Forouzanhar *et al.*, 2010; Salmani *et al.*, 2014; Vick *et al.*, 2012) Blandade resultat har setts i studier där spädningvätska innehållandes sojalecithin har använts vid kylning av hundsperma (Kmenta *et al.*, 2011; Beccaglia *et al.*, 2009a; Kasimanickam *et al.*, 2012). Få studier har utvärderat spädningvätska innehållande sojalecithin vid frysning av hundsperma.

Syftet med detta arbete var att utvärdera hur hundsperma påverkas av att frysas med en spädningvätska som innehåller sojalecithin jämfört med en spädningvätska som innehåller äggula. I arbetet jämfördes även två olika koncentrationer av sojalecithin, 1 % respektive 2 %, vid frysning av hundsperma.

LITTERATURÖVERSIKT

Artificiell insemination

Artificiell insemination (AI) innebär att sperma på konstgjord väg deponeras i de honliga könsorganen. Sperma kan deponeras antingen vaginalt eller intrauterint (Linde-Forsberg, 1991). Intrauterin deponering ger högre dräktighetsresultat jämfört med vaginal deponering (Linde-Forsberg *et al.*, 1998, Thomassen *et al.*, 2001). Den intrauterina deponeringen kan bland annat ske med hjälp av ett endoskop eller en transcervikal (s.k. skandinavisk) kateter. Andra metoder som används vid insemination är att sperma deponeras i livmodern med ett kirurgiskt snitt (Hutchison, 1993) eller genom laparaskopi (Silva, 1995). Vid fertilitetskliniken på SLU används för närvarande intrauterin deponering med endoskop (Axné, E., SLU, pers. medd., 2014).

Den första lyckade inseminationen hos däggdjur använde sig av hund och rapporterades redan 1787 av den italienske prästen och forskaren Lazzaro Spallanzani. Då användes färsk sperma. Tidiga studier av AI har framförallt fokuserat på produktionsdjur såsom nötkreatur och svin då det hos dessa djurslag finns en stor ekonomisk vinning på AI. Under de senaste decennierna har dock utvecklingen och forskningen gått framåt även inom området smådjursreproduktion. 1954 rapporterades den första lyckade inseminationen på hund där kyld sperma användes (Harrop) och 1969 med fryst sperma (Seager). Studier har visat att dräktighetsresultaten från artificiell insemination är bra då 65 % av inseminationer med kyld

sperma lyckades medan 55,5 % av inseminationer med fryst sperma lyckades (Linde-Forsberg, 2002). Dräktighetsprocenten låg på 76,5 % för inseminationer utförda med fryst sperma på fertilitetskliniken på SLU under 2013 (Axné, E., SLU, pers. medd., 2014). Lyckade resultat är avhängiga av att spermerna är väl bevarade, att tiken befinner sig på rätt dag i löpcykeln samt att inseminationen sker på ett korrekt sätt. AI utförs numera rutinmässigt på veterinärkliniker världen över. I Sverige får AI endast utföras av veterinärer med AI-kompetens (SJVFS 2009:91).

Anledningar till att artificiell insemination används hos hund är många. Det gör det möjligt att överbrygga stora geografiska skillnader mellan tik och hanhund genom internationell eller nationell export/import av sperma (Linde-Forsberg, 1995). Livslängden för spermier kan markant förlängas genom lagring via frysning i flytande kväve, teoretiskt mer än 2000 år (Mazur, 1984). Detta innebär att sperma från döda djur kan användas till att producera avkomma långt senare och sprida det genetiska materialet vidare, vilket även är mycket intressant för forskningen kring utrotningshotade djur. Dessa fördelar med AI medverkar till att lösa problem med inavel inom hundraser. AI kan även användas när naturlig parning ej är ett alternativ, t.ex. vid hög ålder eller ryggont samt för att undvika smittspridning. Avel på djur som ej kan fortplanta sig på naturlig väg är dock förbjudet enligt djurskyddslagen (12 § djurskyddslagen [1988:534]) samt SKK:s regler (Grundregler 2:6) vilket bör tas i beaktande vid val av avelsdjur.

Spermasamling samt utvärdering

Sperma från hund kan samlas genom digital manipulation. Ofta underlättas processen om en löptik är närvarande men detta är oftast inte nödvändigt. Den första fraktionen från prostata samt den andra spermierika fraktionen samlas upp. Efter samlingen kontrolleras spermans koncentration, totalantal och färg samt spermernas motilitet och morfologi undersöks.

För att utvärdera spermernas funktion används olika slags *in vitro*-tester. Fertilitetsförsök med insemination är oftast ej praktiskt genomförbart på hund. De vanligaste spermieparametrarna som testas är motilitet, morfologi, akrosom- och membranstatus.

Spermahantering vid kylning och frysning

Vid en lägre temperatur avstannar cellmetabolism och kemiska processer och det är möjligt att genom kylning eller frysning förlänga spermernas livslängd. Vid +4°C har motilitet och cellmetabolism avstannat tillräckligt för att spermerna kan förvaras i denna temperatur under i flera dagar utan att förlora i viabilitet (Bouchard, 1990). Spermier är särskilt känsliga för temperaturskillnader. Vid en alltför snabb nedkylningshastighet kan spermier skadas, vilket även kallas för ”cold shock”. När temperaturen faller under nollpunkten bildas iskristaller som kristalliseras ut ur cellerna och då plasmamembranet förhindrar expansion av iskristaller inuti cellen, leder detta till att koncentrationen av lösliga ämnen i cellerna ökar samt att en osmotisk gradient bildas. Cellerna skadas också om frysningen sker för snabbt då intracellulära iskristaller bildas under denna process (Mazur, 1984). Det är även visat att skadorna beror på förlust av flagellaktivitet, skador på intracellulära organeller och framförallt skador på cellmembranet vilket orsakar läckage av enzymer och joner (Drobnis *et al.*, 1993).

Vid frysning i flytande kväve som håller -196°C kan spermier förvaras i nästintill oändlig tid (Mazur, 1984) vilket är praktiskt om spermier ska användas långt senare eller vid långa transporter. Det finns olika frysningstekniker. En teknik som visar på bra resultat och är enkel att använda, bygger på en stegvis nersänkning i kvävetanken (Rota *et al.*, 1997) där det är viktigt med rätt frysningsskurva.

Spermier innehåller höga nivåer av fleromättade fettsyror. Spermiers förmåga att motstå ”cold shock” under kylning och frysning är relaterat till lipidsammansättningen i spermiers membran (Farstad, 2009). Olika hunddjur inom släktet *Canidae* hanterar frysningssprocessen olika bra vilket kan förklaras med att spermiermembranens fettsyresammansättning skiljer sig åt mellan olika djurslag.

Reaktiva syreradikaler skadar däggdjurspermier genom att inducera peroxidation av fleromättade fettsyror i spermiers cellmembran, vilket spermier är oförmögna att återskapa (Aitken *et al.*, 1989). Under fysiologiska förhållanden skyddas spermier mot oxidativ stress genom ett enzymatiskt antioxidantsystem. Peroxidationen av fettsyror orsakar sämre motilitet, viabilitet och minskad förmåga att sammansmälta med oocyten (Aitken *et al.*, 1989). Låga mängder reaktiva syreradikaler är dock nödvändigt för en normal spermiefunktion (Aitken *et al.*, 2012). Försök har gjorts att tillsätta antioxidanter och vitaminer i olika kombinationer i spädningsslösningen för att motverka oxidativ stress. I en studie där spädningsslösningen innehöll katalas kunde ingen generell förbättring ses i spermiekvalitet förutom en något ökad bindning mellan spermie och zona pellucida (Beccaglia *et al.*, 2009a).

Innehåll i spädningsslösningar

Spermier är metaboliskt aktiva celler som inte behåller sin viabilitet eller befruktningssförmåga under särskilt lång tid utan att spädas ut med spädningsslösning. Spädningsslösningen bidrar med energisubstrat, bibehåller ett konstant pH, förebygger bakterietillväxt, balanserar osmotiskt tryck och skyddar spermier mot ”cold shock” (Salisbury *et al.*, 1978). Spädningen gör även att spermier kan användas vid flera inseminationstillfällen. En mängd spädningsslösningar har studerats och utvärderats, bland annat innehållande pastöriserad komjölk (Harrop, 1954) eller pastöriserad grädde (Linde-Forsberg, 1995). Ett flertal kommersiella spädningsslösningar finns tillgängliga för hund. Vad som ingår i dessa är ej känt då innehållet är konfidentiellt. Företagen anger att deras spädningsslösningar ger höga dräktighetsresultat men det finns inga kontrollerade studier publicerade som stödjer detta.

Socketarter

Socketarter har flera funktioner i spädningsslösningen. De förser spermier med energisubstrat, upprätthåller det osmotiska trycket i lösningen samt har en skyddande verkan under frysning (Salisbury *et al.*, 1978). Det osmotiska trycket i seminalplasma hos hund är omkring 315 mOsm (Rota *et al.*, 1995). Att upprätthålla det osmotiska trycket är viktigt för att undvika osmotisk stress, vilket kan vara skadligt för spermier (Songsasen *et al.*, 2002). Monosackarider, såsom glukos och fruktos verkar framförallt som energisubstrat då dessa går in i glykolysen i spermier hos däggdjur. Sammansatta socketarter har däremot en mer skyddande verkan hos spermier vid frysning (Seager, 1969). Socker som tillsätts i

spädningslösningen har visats ha en stark positiv effekt på framförallt spermernas motilitet (Ponglowhapan *et al.*, 2004).

Antibiotika

Bakteriellt kontaminerad sperma kan medföra en direkt negativ effekt på spermier samt medföra en risk för vidare spridning till tiken vid insemination (Salisbury, 1978). Om äggula ingår i spädningslösningen kan denna potentiellt vara mikrobiellt kontaminerad och riskera att kontaminera sperma (Bousseau *et al.*, 1998). Energisubstrat i spädningslösningen samt förvaring vid rumstemperatur skapar dessutom en miljö där bakterietillväxt kan ske. För att förhindra att detta tillsätts antibiotika rutinmässigt till spädningslösningen. Vanligtvis används en kombination av streptomycin och benzyl-penicillin. Hos hund har framförallt isolat av *Escherichia coli* samt *Pasteurella multocida* och β -hemolyserande streptokocker odlats fram från sperma och förhud (Bjurström & Linde-Forsberg, 1992).

Buffert

Hos hund ligger medelvärdet på pH i sperma på ungefär 6,4 (Bartlett, 1962). Undersökningar har visat att ett pH på 6,6 i spädningslösningen var bättre för sperma än pH på 5,9 eller 7,3 (Foote & Leonard, 1964). Dessutom sänks pH i sperma under förvaring då cellerna förbrukar glukos och därmed producerar surgörande mjölksyra. För att pH i sperma skall hållas stabilt under förvaringen tillsätts Tris (tris(hydroxymetyl)-aminomethane) till spädningslösningen. Tris fungerar som en biokemisk buffert (består av dipolära joner).

Glycerol

Glycerol tillsätts i spädningslösningen för att skydda spermerna mot frysskador (Farstad, 2009). För höga koncentrationer av glycerol kan dock ge negativa effekter (Hammerstedt & Graham, 1992).

Äggula

Äggula från hönsägg tillsätts rutinmässigt till spädningslösningar då det har visats att äggula bidrar till en ökad spermieöverlevnad och befruktningsevne hos flera djurslag, och även hos hund (Foote, 1964). Tidigt visades att den optimala koncentrationen av äggula i spädningslösningar är 20 % (Foote, 1964), vilket är den koncentration som fortfarande används. Äggula brukar kombineras med Equex® STM paste då detta har visats ge ökad viabilitet och livslängd (Rota *et al.*, 1997). Det har även visats att spädningslösningen innehållandes både äggula och Equex® STM paste ökar spermens förmåga att binda till zona pellucida hos oocyter in vitro (Ström Holst *et al.*, 2000).

Den viktigaste funktionen hos äggula är att det skyddar spermerna mot ”cold shock” under kylning och frysning (Quinn *et al.*, 1980). Mekanismen bakom detta är ej helt klarlagd. En teori som framförts är att fosfolipider och ”low density lipoprotein fractions” som äggulan innehåller, skapar en skyddande film vid spermie-membranets yta (Quinn *et al.*, 1980). Studier har sedan dess visat att specifika proteiner i seminalvätska binds till lipoproteiner från äggulan (Manjunath *et al.*, 2002) vilket kan vara en förklaring till äggulans skyddande egenskaper då seminalplasma kan vara skadligt för spermier (Rota *et al.*, 1995).

Seminalplasmans skadeverkan kan bero på att proteiner i seminalplasma stimulerar en efflux av kolesterol och fosfolipider från spermieceller vilket kan göra spermerna mer sårbara vid kylning eller frysning (Thérien *et al.*, 1999). På senare tid har framsteg gjorts i att extrahera specifika lipoproteiner (LDL) från äggula. En spädninglösning med endast LDL har visats ge lika bra frysningresultat som när en äggulebaserad spädninglösning användes och även visats ge lyckade inseminationsresultat (Bencharif *et al.*, 2010). Ännu bättre resultat har erhållits då spädninglösningen förutom LDL även innehållit aminosyran glutamin (Bencharif *et al.*, 2012).

Äggula är emellertid en animalisk produkt vilket innebär en rad nackdelar. Det är exempelvis svårt att exakt bestämma äggulans komposition då den ej är konstant. Det finns även en risk att äggulan är mikrobiellt kontaminerad. Tillväxt av mikrober är en möjlig källa till produktion av endotoxiner, vilket kan skada spermernas befruktningförmåga (Bousseau *et al.*, 1998). I studien utförd av Bousseau (1998) hittades bakterier eller mycoplasma i alla testade produkter som innehöll äggula och de högsta halterna av bakterier sågs i industriellt framställda ägguleprodukter. Risken för kontamination skapar problem vid internationell handel på grund av olika länders införselregler. Detta är negativt för de som använder sig av kyld/fryst sperma då en betydande andel av den kyld/fryst sperma som nyttjas är föremål för internationell handel. För att undvika de möjliga nackdelar som äggula innebär har det nu börjat forskas på alternativ av icke-animaliskt ursprung, exempelvis lecithin från sojaböner.

Sojalecithin

Lecithin är en fosfolipid som liksom de proteiner som finns i äggula kan skydda spermernas cellmembran mot kylskada. Lecithin kan extraheras på kemisk eller mekanisk väg och kan framställas från olika källor, däribland sojaböner.

Spädninglösningar baserade på sojalecithin har på senare tid lyfts fram som ett alternativ till den äggulebaserade spädninglösningen. Flera av de nackdelar som är förenade med användning av äggula i spädninglösningen kan undvikas genom att ersätta äggula med sojalecithin, ex. kan mikrobiell kontamination undvikas.

Spädninglösningar baserade på sojalecithin har framgångsrikt använts vid frysning av sperma hos flera djurslag. Positiva resultat vid frysning har bland annat visats hos karp (Yildiz *et al.*, 2013), bagge (Forouzanfar *et al.*, 2010), get (Salmani *et al.*, 2014) och katt (Vick *et al.*, 2012). Den optimala koncentrationen av sojalecithin verkar dock skilja mellan olika djurslag, vilket kan vara på grund av olika sammansättningar av seminalplasma (Bencharif *et al.*, 2008).

Kommersiella spädninglösningar baserade på sojalecithin finns tillgängliga på marknaden. Försök har gjorts där en kommersiell spädninglösning för frysning av tjursperma som innehåller sojalecithin (Andromed) jämfördes med en äggulebaserad lösning (BilEq) vid frysning av hundsperma. Progressiv motilitet efter frysning var bättre när BilEq användes jämfört med Andromed (Nöthling *et al.*, 2007).

Beccaglia *et al.* (2009a) visade att sojalecithinsbaserade spädningslösningar kan vara ett fullgott alternativ till äggulebaserade lösningar vid kylning av hundesperma. I studien användes 0,04 % sojalecithin. Resultat från studien visar jämförbara resultat i motilitet, antal okapaciterade spermier samt antal spermier som binder till zona pellucida. Kmenta *et al.* (2011) visade i sin studie att en spädningslösning baserad på sojabönslecithin och kompletterad med katalas bevarade progressiv motilitet och viabilitet bättre än en äggulebaserad spädningslösning vid kylning av hundesperma under åtta dagar. I denna studie användes en koncentration av 0,8 % lecithin. En annan studie rapporterade att hundesperma kyls bättre med en spädningslösning bestående av 0,4 % lecithin jämfört med spädningslösningar bestående av äggula eller 0,04 % lecithin (Kasimanickam *et al.*, 2012). I studien av Kasimanickam *et al.* utvärderades spermiernas motilitet, mitokondriemembran samt plasmamembran.

En annan studie utförd av Beccaglia *et al.* (2009b) studerade spädningslösning baserad på sojalecithin vid frysning av hundesperma. Äggulebaserad spädningslösning jämfördes med spädningslösning baserad på sojalecithin (0,04 %). Studien visade att progressiv motilitet, antal okapaciterade spermier samt antal spermier bundna till zona pellucida var jämförbart mellan de båda spädningslösningarna. I studien testade även en spädningslösning med sojalecithin kompletterad med Equex. Denna lösning visades vara skadlig för spermiernas motilitet och gav sämre resultat i antal spermier som bundna till zona pellucida.

MATERIAL OCH METODER

Initialt utfördes en testfrysning för att utvärdera metoderna som var tänkta att användas i studien. Då upptäcktes att spermier hade svårt att röra sig framåt i spädningslösningen vid upptining. Detta avhjälpes genom att tillsätta 2 % (vikt/volym) bovint serum albumin (BSA) vid upptining.

Hundar

Sperma från totalt fem hundar användes i studien. Sperma samlades från en privatägd hund av rasen vorsteh samt fyra försökshundar av rasen beagle. Hundarna var mellan 1,5 och 5 år gamla. Vid två tillfällen poolades proverna från två hundar samman. Totalt analyserades fem prov i studien. Kriterier för att sperman skulle få ingå i studien var en motilitet på minst 70 % samt att antalet defekta spermier ej var över 30 %.

Spädningslösningar

De spädningslösningar som användes i studien framställdes vid KVLab på SLU. Komponenterna blandades och centrifugerades i 2900 G i 15 minuter, därefter justerades pH och lösningen filterades. Vid filtreringen användes ett pappersfilter av porstorlek 11 µm (Whatman cat no 1001-070) samt flertalet sprutfilter av porstorlek 0,45 µm (art nr 514-0071 VWR) I studien jämfördes spädningslösningar med 1 % respektive 2 % lecithin ("Extender L1" resp. "Extender L2") med en kontroll (Uppsala Equex II) som innehöll äggula. Sojalecithinet som användes var av typen P5638 från Sigma-Aldrich. I spädningslösning "Kontroll b" var även Equex tillsatt. I övrigt var innehållet nästintill identiskt i alla spädningslösningar. Små skillnader fanns i pH och osmolaritet. Spädningslösning "Kontroll

a/b” används rutinmässigt vid spermafrysning vid Hund och kattlab på SLU. Fullständig innehållsförteckning kan ses i tabell 1.

Tabell 1. *Innehåll samt pH och osmolaritet i spädninglösningar*

	Kontroll a	Kontroll b	Extender L1a	Extender L1b	Extender L2a	Extender L2b
Tris	3,025 g	3,025 g	3,0284 g	3,0284 g	3,0284 g	3,0284 g
Citronsyra	1,7 g	1,7 g	1,7 g	1,7 g	1,7 g	1,7 g
Fruktos	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g
Na- Benzylpenicillin	0,06 g	0,06 g	0,06 g	0,06 g	0,06 g	0,06 g
Streptomycin	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Glycerol	3 ml	7 ml	3 ml	7 ml	3 ml	7 ml
Äggula	20 ml	20 ml	-	-	-	-
Lecithin wt/vol	-	-	1 g	1 g	2 g	2 g
Equex	-	1 ml	-	-	-	-
Destillerat vatten	to 77 ml	to 72 ml	to 100 ml	to 100 ml	to 100 ml	to 100 ml
pH	6,72	6,74	6,75	6,75	6,75	6,75
Osmolaritet (mOsm)	865	1495	837	1418	810	1413

Försöksdesign

Sperma delades upp i tre delar och späddes sedan antingen med ”Kontroll a/b”, ”L1a/b” eller ”L2a/b”. Proverna frystes och tinades upp på samma sätt. Proverna utvärderades direkt efter upptining, två timmar efter upptining samt fyra timmar efter upptining. Spermaproverna förvarades efter upptining i en inkubator som höll 37° C.

Spermasamling och hantering

Ejakulaten samlades genom digital manipulation i en förvärmad uppsamlingsbehållare. Ejakulatvolymen mättes direkt efter ejakulation i den graderade uppsamlingsbehållaren. Spermakoncentrationen mättes med en kalibrerad fotokolorimeter (SpermaCue, Minitube, Tiefenbach, Tyskland). En subjektiv bedömning av motilitet gjordes i ljusmikroskop. En liten mängd sperma fixerades med fixol-saline och morfologin undersöktes subjektivt i ett ljusmikroskop.

Sperma delades upp i tre delar och centrifugerades i 700 G i sex minuter. Supernatanten togs bort för att ge ett mer standardiserat prov samt ge en lagom volym (för AI). Den kvarvarande spermiepelleten späddes med spädninglösning (kontroll a resp. 1a samt 2a) till koncentrationen 400×10^6 spermier/ml. Proverna kylades sedan i kylbänk där spermiepelletsens temperatur sjönk från rumstemperatur till 5°C under en tidsperiod på 75

minuter. Detta steg gjordes för att undvika "cold shock". Efter kylning tillsattes spädningslösning (kontroll b, resp. 1b samt 2b) av samma mängd som tidigare tillsatts. Proverna fördes över till märkta strånar. Stråna frystes genom att föra ner stråna i en tank med flytande kväve i tre steg enligt den metod som tidigare beskrivits av Rota *et al.* (1997).

Stråna tinades genom att placeras i ett vattenbad (70° C) i 8 sekunder. Proverna späddes sedan med 500 µl 37-gradig Tris innehållandes 2 % bovint serumalbumin.

Utvärdering efter upptining

Utvärdering av motilitet

En subjektiv bedömning av motilitet utfördes i ljusmikroskop som tillägg till den bedömning som utfördes med CASA.

Motilitet utvärderades med CASA (Computer assisted spermatozoa analysis; SpermVision®, Minitube, Tiefenbach, Germany). Sperma placeras på uppvärmda objektsglas (38°C). Åtta slumpmässigt utvalda fält utvärderades per prov. Följande parametrar undersöktes: procent total motilitet (total motility, TM%), procent progressiv motilitet (progressive motility PM%), DAP (distance average path, µm), DCL (distance curved line, µm), DSL (distance straight line, µm), average path velocity (VAP, µm/s), straight line velocity (VSL, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), STR (straightness, VSL/VAP, %), LIN (linearity, VSL/VCL, %), WOB (wobble, VAP/VCL, %), ALH (amplitude of lateral head displacement, µm), och BCF (beat cross frequency, Hz). Progressiv motilitet beräknades utifrån total motilitet och hastigheter beräknades utifrån de spermier som visade en progressiv motilitet. Inställningarna som användes för motilitetsanalys var "Stallion", då inställningarna för hund inte fungerade optimalt.

Utvärdering av plasmamembran

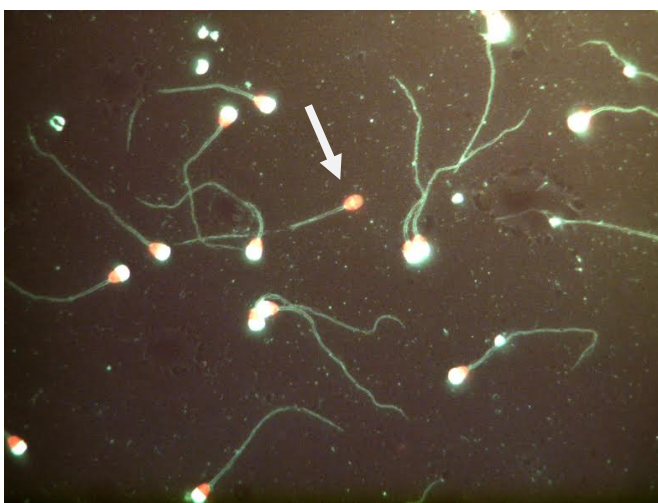
Spermiernas plasmamembran utvärderades med en fluorescensfärgningsteknik som beskrivs av Garner *et al.* (1986) samt Harrison och Vickers (1990) och som senare har modifierats av Rota *et al.* (1995). I färgningen används 6-carboxyfluorescein diacetat (C-FDA) samt propidiumjodid (PI). Färgningsmediet sammanställdes i direkt anslutning till färgningen. Proverna utvärderades i ett fluorescensmikroskop i 40 gånger förstoring. För varje prov som färgades med C-FDA/PI räknades minst 100 celler och dessa grupperades sedan in i tre grupper: grupp 1 (gröna) där cellerna hade ett intakt plasmamembran (cellerna färgades in med C-FDA men ej med PI); grupp 2 (röda) där cellerna hade ett skadat plasmamembran och ett skadat akrosommembran (cellerna färgades in med PI men ej med C-FDA) samt grupp 3 (grön-röda) där cellerna hade ett skadat plasmamembran men en intakt akrosom (cellerna färgades in med C-FDA och den post-akrosomala regionen färgades in med PI). Värderna från denna utvärdering presenteras som procentsatser. I figur 1 ses ett exempel på spermier infärgade med C-FDA samt PI. I figuren kan både gröna och röda spermier ses.



Figur 1. Exempel på spermier infärgade med C-FDA samt PI.

Utvärdering av akrosomintegritet (antal intakta akrosomer)

En fluorescensfärgningsteknik med fluorescein isothiocyant - konjugerat jordnötsagglutin (FITC-PNA) samt propidiumjodid (PI) användes för att bedöma akrosomer. Färgningen följde ett protokoll som utvecklats av Cheng *et al.* (1996) för hingstsperma och senare modifierats för kattsperma av Axner *et al.* (2002). Propidiumjodid tillsätts då det färgar alla spermier röda och därmed gör det lättare att upptäcka spermier med helt avsaknad akrosom i mikroskop. Minst 200 celler bedömdes i fluorescensmikroskop för varje prov. Cellerna grupperades in i tre grupper beroende på infärgningsutseende på akrosomen. Grupp A innefattar celler med en intakt akrosom (fullständig grön infärgning av akrosom med FITC-PNA); grupp B innefattar celler med skadad akrosom (ofullständig fläckvis infärgning av akrosom med FITC-PNA), grupp C inkluderar celler med avsaknad eller reagerad akrosom (ingen infärgning med FITC-PNA). Värden från denna utvärdering presenteras som procentsatser. I figur 2 ses ett exempel på spermier infärgade med FITC-PNA samt PI.



Figur 2. Exempel på spermier infärgade med FITC-PNA och PI. En spermie i mitten av bilden saknar akrosom (markerad med vit pil), övriga spermier på bilden har intakta akrosomer.

Statistiska analyser

För statistisk bearbetning av resultat i total motilitet, plasmamembran och akrosomintegritet användes en repeated measures ANOVA efter kontroll av normalfördelning av residualerna med Ryan-Joiner's test. ANOVA valdes då den jämför medelvärden i fler än två grupper. Faktorerna som ingick i modellen var ID, tid, behandling samt interaktioner mellan dessa. Vid signifikant skillnad beräknades parvisa skillnader med ett post hoc test (Tukey's test). Vid statistisk bearbetning av motilitetsparametrar användes Friedman's test. SAS 9.2 och Minitab 16.2.4.0 användes för statistisk bearbetning. För uträkning av medelvärden och standardavvikelser användes Excel. Ett p- värde <0,05 anses vara statistiskt signifikant.

RESULTAT

Spermiekvalitet

Den totala spermiekoncentrationen i proverna varierade mellan 136×10^6 och 370×10^6 spermier/ml med ett medelvärde på $230 \times 10^6 \pm 115 \times 10^6$ spermier/ml. Volymen på sperma varierade mellan 1,1 ml och 7 ml med ett medelvärde på $3,52 \pm 2,32$ ml. Antal defekta spermier före frysning varierade mellan 6 % och 14 % med ett medelvärde på $8 \pm 3,4$ %. Subjektiv motilitet före frysning varierade mellan 90 % och 95 % med ett medelvärde på $93 \pm 2,73$ %.

Motilitet

Total motilitet

Frysning med en spädningsvätska som innehöll sojalecithin gav en lägre total motilitet efter upptining jämfört med kontroll ($p < 0,0001$). Total motilitet var lägre efter 2 timmar resp. 4 timmar jämfört med direkt efter upptining ($p = 0,045$). Skillnad sågs mellan hur olika prov svarar på behandling ($p < 0,0001$). Ingen interaktion kunde ses mellan tidpunkt och olika spädningsvätskor för total motilitet ($p = 0,97$).

Tabell 2. Medelvärde och standardavvikelse för total motilitet för olika spädningslösningar, uttryckt i procent ($n = 15$ för varje grupp). Alla tidpunkter är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (abc) indikerar statistisk signifikans ($p < 0,05$).

Spädningslösning	% total motilitet
Kontroll	$41,1 \pm 15,9^a$
Extender L1	$21,8 \pm 13,0^b$
Extender L2	$14,9 \pm 11,3^c$

Tabell 3. Medelvärde och standardavvikelse för total motilitet vid olika tidpunkter, uttryckt i procent ($n=15$ för varje grupp). Alla spädningslösningar är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (ab) indikerar statistisk signifikans ($p<0,05$).

Tidpunkt	% total motilitet
Direkt efter upptining	29,0±19,0 ^a
2 h efter upptining	24,6±12,3 ^a
4 h efter upptining	24,2±17,2 ^a

Tabell 4. Medelvärde och standardavvikelse för total motilitet vid tre tidpunkter och tre spädningslösningar ($n=5$ för varje grupp). Olikhet i upphöjda bokstäver inom en kolumn (ab) indikerar statistisk signifikans ($p<0,05$).

Spädningslösning	% total motilitet		
	0 h efter upptining	2 h efter upptining	4 h efter upptining
Kontroll	44,9±14,8 ^a	38,9±13,4 ^a	40,2±16,3 ^a
Extender L1	24,7±16,1 ^b	21,4±12,3 ^b	19,4±10,1 ^b
Extender L2	18,2±15,8 ^b	13,5±8,5 ^b	13,5±6,9 ^b

Progressiv motilitet

Frysning med en spädningsvätska som innehöll sojalecithin gav en lägre progressiv motilitet efter upptining jämfört med kontroll ($p<0,0001$). Progressiv motilitet var lägre efter 2 timmar resp. 4 timmar jämfört med direkt efter upptining ($p=0,037$). Skillnad sågs mellan hur olika prov svarar på behandling ($p<0,0001$). Ingen interaktion sågs mellan tidpunkt och behandling för progressiv motilitet ($p=0,96$).

Tabell 5. Medelvärde och standardavvikelse för progressiv motilitet för olika spädningslösningar, uttryckt i procent ($n=15$ för varje grupp). Alla tidpunkter är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (abc) indikerar statistisk signifikans ($p<0,05$).

Spädningslösning	% progressiv motilitet
Kontroll	25,5±13,5 ^a
Extender L1	13,0±11,0 ^b
Extender L2	7,4±7,8 ^c

Tabell 6. Medelvärde och standardavvikelse för progressiv motilitet vid olika tidpunkter, uttryckt i procent ($n=15$ för varje grupp). Alla spädningslösningar är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (ab) indikerar statistisk signifikans ($p<0,05$).

Tidpunkt	% progressiv motilitet
Direkt efter upptining	17,7±9,0 ^a
2 h efter upptining	14,7±11,8 ^a
4 h efter upptining	13,6±13,2 ^a

Tabell 7. Medelvärde och standardavvikelse för progressiv motilitet vid tre tidpunkter och i tre olika spädningsslösningar (n=5 för varje grupp). Olikhet i upphöjda bokstäver inom en kolumn (ab) indikerar statistisk signifikans (p<0,05).

Spädningsslösning	% progressiv motilitet		
	0 h efter upptining	2 h efter upptining	4 h efter upptining
Kontroll	27,8±14,8 ^a	24,2±11,0 ^a	24,5±12,9 ^a
Extender L1	14,9±14,5 ^b	13,0±10,1 ^b	11,2±8,5 ^b
Extender L2	10,3±10,7 ^b	6,8±5,6 ^b	5,2±4,3 ^b

Utvärdering av plasmamembran

De spermier som endast färgas in grönt är levande spermier. De spermier som färgas in med både grönt och rött eller endast rött är döende eller döda.

Frysning med en äggulebaserad spädningssväska (kontroll) gav en högre andel gröna plasmamembraner efter upptining (p<0,0001). En högre andel gröna plasmamembraner sågs direkt efter upptining jämfört med efter två timmar resp. fyra timmar (p=0,04). Skillnad sågs mellan olika provs svar på behandling (p<0,0001). Ingen interaktion sågs mellan tidpunkt och olika spädningssväska (p=0,75).

Tabell 8. Medelvärde och standardavvikelse för total andel gröna plasmamembraner i olika spädningsslösningar, uttryckt i procent (n=15 för varje grupp). Alla tidpunkter är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (ab) indikerar statistisk signifikans (p<0,05).

Spädningsslösning	% grönt membran
Kontroll	38,0±15,1 ^a
Extender L1	20,9±12,6 ^b
Extender L2	16,6±10,0 ^b

Tabell 9. Medelvärde och standardavvikelse för total andel gröna plasmamembraner vid olika tidpunkter, uttryckt i procent (n=15 för varje grupp). Alla spädningsslösningar är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (ab) indikerar statistisk signifikans (p<0,05).

Tidpunkt	% grönt membran
Direkt efter upptining	30,2±17,2 ^a
2 h efter upptining	22,8±12,3 ^b
4 h efter upptining	22,5±16,5 ^b

Tabell 10. Medelvärde och standardavvikelse för andel gröna plasmamembraner vid tre tidpunkter och tre olika spädningslösningar ($n=5$ för varje grupp). Olikhet i upphöjda bokstäver inom en kolumn (ab) indikerar statistisk signifikans ($p<0,05$).

Spädningslösning	% grönt membran		
	0 h efter upptining	2 h efter upptining	4 h efter upptining
Kontroll	44,9±14,8 ^a	33,2±12,0 ^a	35,8±18,4 ^a
Extender L1	24,9±15,7 ^b	19,4±10,0 ^b	18,5±13,2 ^b
Extender L2	20,7±12,5 ^b	15,9±8,8 ^b	13,2±9,1 ^b

Utvärdering i akrosomintegritet (andel intakta akrosomer)

En högre andel intakta akrosomer sågs efter upptining vid frysning med äggulebaserad spädningsvätska jämfört med lecithinbaserad spädningsvätska ($p=0,015$). Andelen intakta akrosomer var högre direkt efter upptining jämfört med efter två timmar resp. fyra timmar ($p=0,031$).

Ingen skillnad kan ses i hur olika prov svarar på behandling ($p=0,098$). Ingen interaktion sågs mellan tidpunkt och olika spädningsvätskor ($p=0,51$).

Tabell 11. Medelvärde och standardavvikelse för total andel intakta akrosomer i olika spädningslösningar, uttryckt i procent ($n=15$ för varje grupp). Alla tidpunkter är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (ab) indikerar statistisk signifikans ($p<0,05$).

	% intakta
Kontroll	25,4±17,1 ^a
Extender L1	17,7±15,0 ^{ab}
Extender L2	8,1±6,9 ^b

Tabell 12. Medelvärde och standardavvikelse för total andel intakta akrosomer vid olika tidpunkter, uttryckt i procent ($n=15$ för varje grupp). Alla spädningslösningar är inräknade i medelvärdena. Olikhet i upphöjda bokstäver (ab) indikerar statistisk signifikans ($p<0,05$).

Tidpunkt	% intakta
Direkt efter upptining	25,5±19,4 ^a
2 h efter upptining	16,1±11,8 ^{ab}
4 h efter upptining	9,5±8,7 ^b

Tabell 13. Medelvärde och standardavvikelse för andel intakta akrosomer vid tre tidpunkter och i tre olika spädninglösningar (n=5 för varje grupp). Olikhet i upphöjda bokstäver inom en kolumn (ab) indikerar statistisk signifikans ($p < 0,05$).

Spädninglösning	% intakt membran		
	0 h efter upptining	2 h efter upptining	4 h efter upptining
Kontroll	33,7±23,8 ^a	25,0±13,8 ^{ab}	17,5±10,1 ^a
Extender L1	31,1±18,3 ^a	15,7±6,8 ^b	6,1±3,4 ^b
Extender L2	11,6±7,4 ^a	7,6±7,7 ^b	3,5±1,0 ^b

Parametrar för motilitet

Inga skillnader i motilitetsparametrar kunde ses mellan olika spädninglösningar eller mellan olika tidpunkter. I tabell 14 visas resultat för utvalda parametrar.

Tabell 14. Median med variationsvidd för parametrar för motilitet (n=5 för varje grupp)

Tidspunkt	Spädnings- lösning	Parameter						
		VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL (%)	BCF (Hz)	ALH (μm)	LIN (%)	STR (%)
0h	Kontroll	119,49 (101,65)	84,18 (59,24)	68,30 (56,52)	29,29 (14,25)	3,34 (6,1)	0,60 (0,43)	0,83 (0,23)
0 h	Extender L1	122,86 (210,25)	84,70 (140,43)	66,41 (128,95)	28,17 (44,47)	3,44 (6,4)	0,52 (0,85)	0,77 (0,91)
0 h	Extender L2	121,74 (246,81)	86,28 (118,09)	70,42 (101,59)	27,40 (45,15)	3,54 (6,4)	0,51 (0,88)	0,81 (0,93)
2 h	Kontroll	113,70 (90,63)	83,10 (55,4)	68,60 (41,22)	32,36 (22,33)	3,22 (11,28)	0,56 (0,39)	0,79 (0,39)
2 h	Extender L1	126,33 (219,04)	86,99 (141,66)	66,05 (131,55)	31,21 (44,72)	3,73 (11,45)	0,49 (0,89)	0,73 (0,94)
2 h	Extender L2	120,46 (253,81)	85,46 (146,36)	60,58 (95,75)	30,74 (45,0)	3,89 (8,36)	0,45 (0,78)	0,70 (0,9)
4 h	Kontroll	137,36 (188,05)	89,30 (102,95)	69,12 (92,6)	32,80 (80,0)	3,80 (6,94)	0,51 (0,76)	0,77 (0,93)
4 h	Extender L1	120,01 (230,67)	79,47 (125,98)	63,23 (109,52)	30,89 (46,15)	3,82 (4,92)	0,48 (0,88)	0,76 (0,96)
4 h	Extender L2	111,65 (275,02)	78,37 (117,14)	62,83 (101,59)	29,22 (49,19)	2,42 (9,34)	0,48 (0,87)	0,75 (0,94)

DISKUSSION

Frysning av hundesperma med spädningsvätska innehållandes sojalecithin gav en sämre motilitet, både total och progressiv, jämfört med frysning i en äggulebaserad spädningsvätska. Detta resultat skiljer sig från studien utförd av Beccaglia *et al.* (2009b) där ingen skillnad i total eller progressiv motilitet kunde ses när lecithin och äggula jämfördes. Andra studier har

visat att motiliteten varit högre vid kylning med sojalecithinsbaserad spädningsvätska jämfört med äggulebaserad spädningsvätska (Kmenta *et al.* 2011). Dock är kylning och frysning två olika processer vilket gör att resultaten inte kan jämföras rakt av.

Lägre andel intakta plasmamembraner sågs vid frysning med sojalecithinsbaserad spädningsvätska än med äggulebaserad spädningsvätska. Resultaten visar en tendens mot att 1 % lecithin gav fler intakta plasmamembran än 2 % lecithin. Då denna skillnad ej var statistiskt signifikant kan slutsatsen att 1 % lecithin är bättre än 2 % lecithin inte dras.

Frysning med en äggulebaserad spädningsvätska gav en högre andel intakta akrosomer jämfört med spädningsvätska innehållandes 2 % sojalecithin. Ingen statistisk signifikant skillnad kunde ses av andelen intakta akrosomer vid frysning med äggulebaserad spädningsvätska jämfört med spädningsvätska innehållandes 1 % sojalecithin. Liknande resultat rapporteras i studien utförd av Beccaglia *et al.* (2009b) där ingen skillnad kunde ses i andel intakta akrosomer när spädningsvätskor innehållandes sojalecithin och äggula jämfördes.

Koncentrationen av sojalecithin kan ha påverkat resultaten. I denna studie användes en spädningsvätska med 1 % resp. 2 % sojalecithin. Dessa koncentrationer valdes då studier på andra djurslag har visat positiva resultat med liknande koncentration, 1,5 % hos get i Salmani *et al.* (2014) och 1 % hos bagge i Forouzanfar *et al.* (2010). Högre koncentration än 1 % lecithin ökar spädningsvätskans viskositet och minskar motilitet och viabilitet av upptinade spermier hos bagge (Farouzanfar *et al.*, 2010). Det är möjligt att samma samband finns hos hund. En koncentration på 0,8 % motsvarar ungefärligt innehåll av lecithinkoncentrationen i äggula om 20 % äggula ska ersättas (Palacios & Wang, 2005, se Kmenta *et al.*, 2011). I studien utförd av Beccaglia *et al.* (2009b) var koncentrationen sojalecithin mycket låg (0,04 %). Det är möjligt att en lägre koncentration lecithin hade kunnat ge bättre resultat i denna studie. Skillnad har även setts i koncentration av LDL, 6 % har konstaterats ge högre motilitet jämfört med 4 %, 5 %, 7 %, 8 % och 10 % (Bencharif *et al.*, 2008).

I startfasen av studien fanns vissa svårigheter att framställa spädningslösning med sojalecithin. En svårighet vid jämförelse med andra studier är att väldigt få studier beskriver hur framställningen av spädningsvätska går till eller vilka produkter som används. Det är möjligt att typen av sojalecithin är av betydelse. I denna studie har sojalecithin av typen 5658 använts. Ett flertal typer av sojalecithin finns kommersiellt tillgängliga från olika företag och det finns begränsad information om vilken typ av sojalecithin som använts i andra studier.

Det var ett begränsat antal individer som ingick i studien. Sperman från dessa individer hade en varierande tålighet mot frysningsprocessen. Ett större antal individer i studien hade kunnat ge säkrare värden.

De utvärderingsmetoder av sperma som skedde innan frysning var en subjektiv bedömning av motilitet och morfologi vilket var mycket enklare metoder än de utvärderingsmetoder som användes efter upptining. Det hade varit önskvärt att använda samma utvärderingsmetoder före och efter frysning samt jämföra resultaten från dessa. I denna studie var det dock inte möjligt på grund av tidsbrist och praktiska skäl.

En felkälla kan ha varit utvärderingen av andel intakta akrosomer samt andel gröna plasmamembraner då denna har skett subjektivt av en person som är ovan att läsa av prover. Det bör ej ha påverkat resultaten då samma person utvärderade alla proverna. Provens identitet har varit känd vid avläsning vilket omedvetet kan ha påverkat bedömningen. Denna felkälla kunde ha avhjälpas med blindade prover.

KONKLUSION

Studien visade på en bättre spermieöverlevnad när spermier frystes med äggulebaserad spädningvätska jämfört med när spermier frystes med en spädningvätska baserad på sojalecithin.

Sammanfattningsvis kan en trend mot att en lecithinkoncentration på 1 % är bättre än en lecithinkoncentration på 2 % ses. Det hade varit intressant att testa en spädningvätska innehållandes mindre än 1 % lecithin för att utvärdera om en lägre lecithinkoncentration kan ge en bättre spermieöverlevnad.

REFERENSER

- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. and Fishel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*. 41, 183-197.
- Aitken, R. J., Jones, K. T. and Robertson S. A. 2012. Reactive Oxygen Species and Sperm Function— In *Sickness and In Health*. *Journal of Andrology*. 33, 1096-1106.
- Axnér, E., Hermansson, U. and Linde-Forsberg, C. 2002. Capacitation time of feline epididymal spermatozoa. Proc. EVSSAR 3rd European Congress, Liège, pp 115.
- Bartlett, D. J. 1962. Studies of dog semen. II. Biochemical characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 3, 190-205.
- Beccaglia, M., Anastasi, P., Chigioni, S. and Luvoni, G. C. 2009a. Tris-Lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reproduction of Domestic Animals*. 44, 345-349.
- Beccaglia, M., Anastasi, P. and Luvoni, G. C. 2009b. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Veterinary Research Communications*. 33, 77-80.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M-L., Barrière, P., Larrat, M. and Tainturier, D. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70, 1478-1488.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barrière, D., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2010. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). *Animal Reproduction Science*. 119, 305-313.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barrière, D., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Research in Veterinary Science*. 93, 440-447.
- Bjurström, L. and Linde-Forsberg, C. 1992. Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in stud dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 53, 670-673.
- Bouchard, G. F., Morris, J. K., Sikes, J.D., and Youngquist, R. S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*. 34, 147-157.
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Guienne, M., Guerin, B., Camus, A. and Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*. 50, 699-706.
- Cheng, F.P., Fazell, A., Voorhout, W.F., Marks, A., Bever, M.M. and Colenbrender, B. 1996. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*. 17, 674-682.
- Djurskyddslagen (1988:534), 12 §, första stycket
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchoroguy, T. J., Overstreet, J. W. and Crowe, J. H. 1993. Cold Shock Damage Is Due to Lipid Phase Transitions in Cell Membranes: A Demonstration Using Sperm as a Model. *The Journal of Experimental Zoology*. 265, 432-437.
- Farstad, W. 2009. Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges. *Reproduction of Domestic Animals*. 44, 336-341.
- Foote, R. H. 1964. The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm stored in buffered-yolk mediums. *American Journal of Veterinary Research*. 25, 32-36.

- Foote, R. H. and Leonard, E. P. 1964. The influence of pH, osmotic pressure, glycine and glycerol on the survival of dog sperm in buffered yolk extenders. *Cornell Veterinary Journal*. 54, 78-89.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Haijan, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R. and Nasr-Esfahani, M. H. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73, 480-487.
- Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A. and Pace, M.M. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*. 34, 127-138.
- Hammerstedt, R. H. and Graham, J. K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Journal of Andrology*. 29, 26-38.
- Harrison, R.A.P. and Vickers, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity of mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88, 343-352.
- Harrop, A.E. 1954. Artificial insemination in a bitch with preserved semen. *The British Veterinary Journal*. 110. 424-425.
- Hutchison RV.1993. Vaginal & surgical intra-uterine deposition of semen. Proc Canine Theriogenology Short Course 33-37
- Kasimanickam, V. R., Kasimanickam, R. K., Memon, M. A. and Rogers, H. A. 2012. Effect of extenders on sperm mitochondrial membrane, plasma membrane and sperm kinetics during liquid storage of canine semen at 5°C. *Animal Reproduction Science*. 136, 139-145.
- Kmenta, I., Strohmayr, C., Müller-Schlösser, F. and Schäfer-Somi, S. 2011. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology*. 75, 1095-1103.
- Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice – Vol 21 No 3, May 1991*. 467-485.
- Linde-Forsberg, C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, 10, 48-58.
- Linde-Forsberg, C, Ström Holst, B & Govette G. 1998. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology*. 52. 11-23.
- Linde-Forsberg, C. 2002. Hints on dog semen freezing, cryoextenders, and frozen semen artificial insemination. In; Proceeding, Society for theriogenology, American college of theriogenologists. Colorado, USA, pp. 303-320.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A. and Menard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*. 67, 1250-1258.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247, C125-C142.
- Morton, D. B. & Bruce S. G. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39, 311-316.

- Nöthling, J. O., Gerber, D., Colenbrander, B., Dijkstra, M., Bakker, T. and de Cramer, K. 2007. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. *Theriogenology*. 67, 264-275.
- Palacios, L. E., Wang T. Egg yolk lecithin fractionation and characterization. *Journal of American Oil and Chemical Society*. Submission 1/11/05.
- Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B. and Linde-Forsberg, C. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender on long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*. 62, 1498-517.
- Quinn, P. J., Chow, P. Y. and White, I. G. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60, 403-407.
- Rota, A., Ström, B. and Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 44, 885-900.
- Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of Equex STM on viability of frozen thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*. 47, 1093-1101.
- Salisbury, G.W., VanDemark, N.L. and Lodge, J.R. 1978. Extenders and extension of unfrozen semen. In: *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle* (Second edition). Eds. Salisbury, G.W.W.H. Freeman and Company, San Francisco, pp 442-493.
- Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M. and Sharafi, M. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 68, 276-280.
- Seager, S.W. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A. I. Digest*, 17, 6-16.
- Silva, LDM, Onclin K, Snaps F, Verstegen JP. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 43, 615-623.
- Songsasen, N., Yu, I., Aurton, S., Paccamonti, D. L., Eilts, B. E., Godke, R. A. and Leibo, S. P. 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*. 44, 79-90.
- Statens jordbruksverks föreskrifter om seminverksamhet med hund och katt, 2009:91, 2 §.
- Ström-Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez H. Evaluation of chilled and frozen-thawed spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119, 201-6.
- Svenska Kennelklubben. Grundregler. Avelsetik. 2:6.
- Thérien, I., Moreau, R. and Manjunath, P. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*. 61, 590-8.
- Thomassen, R., Farstad, W., Krogenaes, A., Fougner, J.A. and Berg, K. A. 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 57, 341-346.
- Vick, M. M., Bateman, H. L., Lambo, C. A. and Swanson, W. F. 2012. Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. *Theriogenology*. 78, 2120-2128.
- Yildiz, C., Bozkurt, Y. and Yavas, I. 2013. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*. 67, 91-94.