

Stiftelsen Svensk Hästforskning
Att. Peter Kallings, Forskningschef
105 33 Stockholm

Redogörelse för forskningsprojekt

Kvalitetsbedömning av hingstesperma för semin Utveckling av metodik för hantering och diagnostik

Härmed översändes redogörelsen för rubricerat forskningsprojekt för vilket stöd erhållits för budgetåret 2006-2008 (Projnr SSH H0547119).

Sammanfattning av slutrapporten

Projektet "Kvalitetsbedömning av hingstesperma för semin" genomfördes åren 2006-2008 i syfte att utvärdera olika analysmetoder för färsk-, kyld- samt fryst-tinad hingstesperma, inklusive en ny vid SLU framtagen teknik för spermieselektering ("Single-Layer Centrifugation, SLC"). Målet var att kunna förbättra rekommendationerna vid praktisk hantering och kvalitetskontroll av hingstesperma i Sverige. Projektet, som genomfördes i nära samarbete med Flyinge AB samt ett par andra välkontrollerade stuterier i mellansverige, tillämpade både rutin- och avancerade spermaanalysmetoder och protokoll, vilka senare utvärderades för rutinanvändning vid stuterierna. Ett nytt, förenklat datoriserat motilitetsanalys-system samt undersökning av spermiernas kärn-(DNA)-integritet, jämte morfologin, var de mest användbara analysmetoder, för deras indirekta samband med fertilitet. SLC-selektionsmetoden separerade befruktningsdugliga spermier från det annars heterogena ejakulatet. Denna spermieanrikning fungerade bäst hos ejakulat med sub-optimal spermabild. SLC-metoden kunde då särskilja de bästa spermier från ett helt ejakulat, exvis för framtagning av transport (kylda) semindoser från hingstar vars sperma är känsliga för kyla, eller för att minska antalet spermier per dos för de flesta avelshingstar, med bibehållen fruktsamhet.

Bakgrund

Artificiell insemination (AI, semin) används i hög utsträckning vid avel inom halvblods- (93%, 2007) och varmblodiga travare (95%, 2007) i Sverige. Inom halvblodsaveln var det år 2007 framför allt kyld (transport) sperma som användes (63 %), medan 25% av stona inseminerades med färsk sperma och endast en liten andel av stona med fryst sperma (5%). Inom aveln med varmblodiga travare var fördelningen annorlunda; 46% av stona inseminerades med färsk-, 32% med kyld- och hela 18% av stona med fryst hingstesperma.

Kylning och frysning utsätter spermier för olika typer av hantering (spädning, kylning, frysning, upptining) som kan negativt påverka deras vitalitet och överlevnad (Rodriguez-Martinez, State of the art in farm animal sperm evaluation, *Reprod Fertil Dev* 2007 19: 91-101). Eftersom hingstavel dessutom bygger på prestationsresultat har inte alla avelshingstar god (eller till och med acceptabel) spermakvalité, vilket är väl känt. Med andra ord, hingstar med hög avelsvärde kan ha sub-optimalt spermakvalité, exempelvis med färre än 50% levande (rörliga) spermier och/eller med onormal form (morfologiskt onormala). Ofta tål inte heller deras spermier den ovan nämnda hanteringen, i synnerhet kylning, vilket är en förutsättning för användning av semin med transportsperma, och som därmed begränsar dessa hingstars användbarhet. Den metod som används idag för att bedöma hingstarnas fruktsamhet och spermakvalitet är en subjektiv okulär

bedömning av spermernas progressiva rörlighet (spermiemotilitet), ett mått som inte i tillräcklig grad överensstämmer med hingstens befruktningssuglighet, då ibland synes hingstar med låg spermierörlighet men med acceptabel fruktsamhet och sådana med bra rörlighet men med låg fruktsamhet. Denna individuella variation speglas också i spermabilden som, i varierande grad mellan ejakulat och mellan hingstar, betecknas av en stor heterogeneitet vad gäller spermernas morfologi, rörlighet och vitalitet. Denna heterogeneitet bland spermerna inom ejakulat syns hos alla husdjur, dock i högre grad hos de djurslag som ej varit specifik selekterade för spermakvalité.

Med denna bakgrund genomfördes, under åren 2006-2008 vid SLU, och i nära samarbete med Flyinge AB samt ett par andra stuterier i Uppland respektive Närke, ett forskningsprojekt ("Kvalitetsbedömning av hingstesperma för semin: Utveckling av metodik för hantering och diagnostik") med medel från SSH (SSH-0547119), vars mål var att etablera dels:

- metoder som kunde optimera hantering och möjliggöra kvalitetskontroll av kyld och fryst sperma från svenska hingstar avsedda för semin,

- en vid SLU framtagen teknik för selektion av spermie ifrån nyligen ejakulerade (färska) eller processade (kylda, frysta) spermier, oavsett ejakulatets ursprungliga kvalité.

Projektet genomfördes i stort sett enligt planerna. De hittills erhållna resultaten har redovisats, för-granskade, vid internationella kongresser, alternativt blivit publicerade/accepterade för publicering i internationella tidskrifter med "pre-review" system (se *Publikationslistan: Förteckning över de av sökanden hittills producerade arbetena inom projektet*), sammanlagt 20 vetenskapliga publikationer. Därtill föreligger en del resultat i manuskript form (som kan redovisas vid behov). Dessutom har totalt 9 veterinärstudenter genomfört sina examensarbeten med uppgifterna inom projektet (se *Förteckning över examensarbeten som genomfördes inom ramen för det nu redovisat projekt*).

Samarbetspartners

Arbetet har varit möjligt att genomföra tack vare ett omfattande samarbete mellan avdelningen för reproduktion, Inst för kliniska vetenskaper och enheten för cellanalys, Inst för anatomi, fysiologi och biokemi, vid SLU, rörande de flödescytometriska studierna. Essentiellt för projektet har varit det exceptionella goda samarbete som etablerats med Flyinge AB, samt det välvilliga deltagandet av de olika stuterier som bidrog med material till, framför allt, examensarbeterna. Därtill har ett internationellt samarbete kommit igång, primärt med Leóns Universitet i Spanien, varifrån en forskarstuderande (vet F Tejerina) deltagit 2006 inom vissa delstudier av projektet som rörde utvärdering av ett nytt datoriserat system för analys av spermiemotilitet (Qualisperm™) avsedd för rutinverksamhet [19]. Samarbete med Ghent Universitet i Belgien möjliggjorde oberoende utvärderingar av "Single-Layer Centrifugation, SLC"-selektions metodik [20].

Det internationella samarbetet utökades 2007-2008 till Extremaduras Universitet, Cáceres, Spanien (Prof Fernando Peña och medarbetare), rörande oberoende utvärdering av selektionsmetoden på färsk- respektive fryst sperma [1-3]. En av deras forskarstuderande (vet C Ortega Ferrusola, medförfattare i publikationer [1-3 samt 15-17]) vistades under 3 månader under HT-2008 vid SLU, och tränades med validering av metodik inom flödescytometrin. Samarbetet med Biophos AG, Schweiz, som utvecklade den nya data-baserade instrumentet för spermiemotilitets-undersökningar "QualiSperm™", har lett till nya djurlags-specifika versioner av den analytiska mjukvara, den ena specifikt för hingstesperma. Därutöver har ett integrerat fluorescens mikroskop för bedömning av spermiekoncentration- och viabilitet

(NucleoCounter SP-100, Chemometec, Danmark) som använder propidium jodid som fluorescerande markör, utvärderats i år.

Material och metoder

Sammanlagt studerades 174 ejakulat som samlades enligt praxis (artificiell vagina) från 31 avelshingstar. Hingstarna var stationerade på SLU, på Flyinge och vid två väl kontrollerade stuterier. Sperman undersöktes både före och efter en egendesignad centrifugering genom en artspezifisk kolloid lösning, antingen i form av en täthetsgradient eller en enkellager av kolloid (den sk "Single-Layer Centrifugation", SLC). Sperman undersöktes med avseende på graden av renandeeffekt av centrifugering samt för flera spermieparametrar med dokumenterad betydelse för befruktning (antal, motilitet, morfologin, membranintegritet, membranstabilitet och kromatin [kärnans DNA-integritet]). Sperman studerades också före och efter spädning för såväl kyld kortidsförvaring (0-48 t) som djupfrysning. Inverkan på spermakvalité av spädningsmedierna som inte innehöll komponenter av animaliskt ursprung studerades också, i såväl kylda- som frysta prov. Sperman späddes med olika spädningsmedier, exempelvis INRA-96, Kennneys, Equipro och Andromed-E™ (det sistnämnda innehållande vegetabiliskt lecitin, det vill säga utan animaliekomponenter). Spermadoserna preparerades alltid som "split-samples" för att kunna jämföra samma sperma under olika förhållanden.

Spermieantalet registrerades med hjälp av fotometer (SpermaCue), Nucleocounter samt Bürker kammare (manuell räkning). Spermimorfologin studerades med gängse metodik vid SLUs spermlaboratoriet (landets andrologiskt referenslaboratoriet). Spermimotilitet analyserades subjektivt (okulär bedömning med hjälp av mikroskop) samt med två olika datorbaserade motilitets analysatorer, den ena en konventionell CASA (SM-CMA) som -genom digitalisering av upprepade bilder- detaljregistrerar spermiernas rörelsemönster och hastigheter, och den andra ett ny utvecklade instrument (Qualisperm™) som registrerar enstaka variabler (totalantalet motila spermier, dess medelhastighet- och andelen spermier med linjär rörelse). Spermie plasmamembran integritet undersöktes dels med hjälp av en automatiserad fluorescensmätare (fluorometri, BioTek FL600, Boule Nordic AB, Stockholm), dels med flödescytometri (LSR flödescytometer, Becton Dickinson, San José, CA, USA). SYBR-14 och propidium jodid (PI) har använts som fluorescerande markörer för flödescytometrin medan Hoechst 33258 har använts för fluorometrin. Kartläggning av membran instabilitet (kapacitans-liknande förändringar) mättes med Annexin-V-PI medan kromatinintegriteten testades med SCSAs metoden (akridin-orange), också med flödescytometri. Tester med andra markörer genomfördes också, men tillämpades fullt ut i och med att de delvis överlappade med andra metoder. Samtliga de ovan nämnda tekniker är dock nu fullständig etablerade vid SLU.

Resultat och diskussion

Nedan redovisas svar på de frågeställningar som projektet ämnade att besvara (med referens till publicerade resultat som siffror inom parentes, enligt bifogad publikationslistan).

Finns det nya metoder för bedömning av spermakvalité hos hingst som kan tillämpas rutinmässigt?

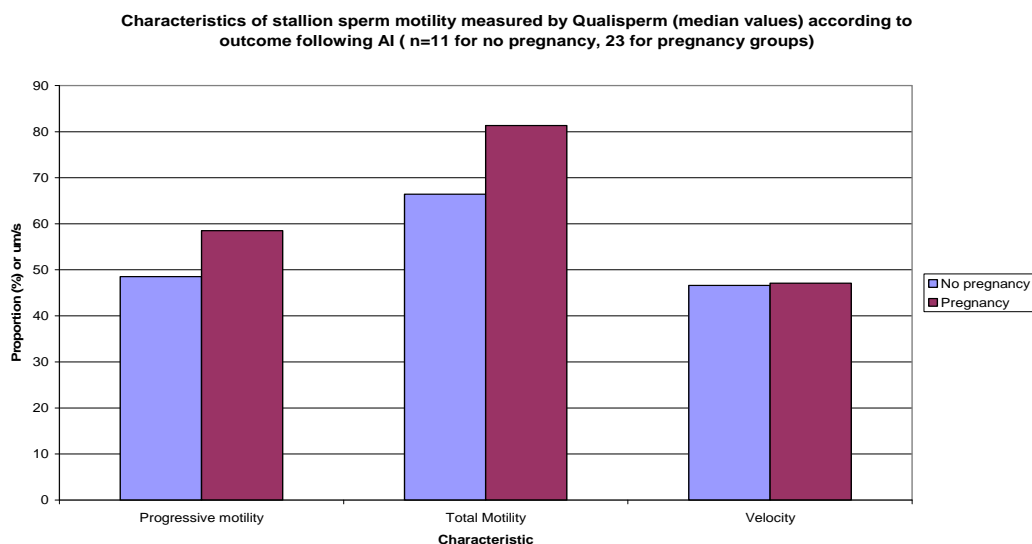
Projektet har studerat flera spermieundersökningsmetoder för att säkrare, än med den vanliga i rutin använda subjektiva motilitetsbedömningen (spermierörelse), kunna utvärdera spermiernas viabilitet och potentiella befruktningssuglighet [6,7,9,4]. Exempel på analysmetoder som använts är membranintegritet och membranstabilitet, vilka är avgörande vid kylning, eftersom man därmed kan bedöma om spermier skadats innan deras rörlighet påverkas. Bedömning av membranintegriteten är högst relevant, eftersom det beskriver cell viabiliteten och

kan undersökas med hög säkerhet. Dessa metoder kommer, å andra sidan, inte att kunna användas rutinmässigt så länge utrustningen (som exempelvis NucleoCounter, fluorometrar eller portabla flödescytometrar) är dyra och komplicerade, speciellt inte på hingststationer med fåtal hingstar. För större hingststationer kan dock en "personal flow cytometer" vara ett alternativ, då i första hand för att på ett objektivt sätt snabbt kunna avläsa membranintegriteten.

Subjektiv spermimotoilitetsbedömning förblir, i synnerhet hos hingststationer, det enklaste och billigaste sättet att indirekt utvärdera viabilitet, en generell princip som gäller andra husdjur (Rodriguez-Martinez, 2007). Metoden, trots att den är beroende av undersökarens erfarenhet, är enkel, snabb och billig och kan därmed användas i stor sett överallt. Man undersöker en droppe av en spermiesuspension med lagom antal spermier i ett ljusmikroskop med en uppvärmd platta och faskontrastoptik. Undersökaren bedömer andelen (i 10% enhets intervall) av spermier med framåtriktade, rektilinjär, snabb rörelse. Eftersom den mänskliga öga kan som bäst bedöma ca 20-30 spermier per fält, undersöks flera olika fält för att ta fram ett medelvärde. Tyvärr varierar resultat mellan personer som gör bedömningen och antal spermier som bedöms är lågt (ca 20 – 30 per synfält). Därmed är sambandet med fertilitet varierande. På grund av dessa begränsningar började man att ta fram för cirka 15 – 20 år sedan, nya instrument som kan analysera ett större andel spermier genom att filma deras rörelse, digitalisera bilderna och beräkna, genom speciella data program, dess förflyttning inom en viss tid, deras hastighet, distans som täcktes, samt typ av rörelse (rörelse mönster). Dessa instrument kallas generiskt CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) och ger ett enormt antal värden, bl.a. andel spermier som rör sig, de immotila, typ av rörelsemönster (gungande, cirkulära, kryssande eller linjär framåt), och deras olika hastigheter... En del av dessa värden, som är primära, ej-omräknade data (exempelvis andel linjära spermier, och dess hastighet) är viktiga för att få en uppfattning om spermans kvalité, medan andra resultat beräknas i efterhand av datorn ur dessa ursprungliga värdena, och brukar användas i framförallt forskningssyfte. Ett stort problem med CASA, som anses vara mer "objektiv" som metod än en visuell analys undersökningar och som ger mera data än ögat kan uppfatta är att andelen spermier som analyseras är fortfarande låg, ofta inte mer än 200 per prov. Därmed sjunker metodens attraktiva "säkerhet". Om man använder för många spermier per prov kan det (såsom det händer vid visuella undersökningar) leda till att andelen motila spermier överskattas eftersom det bildas flera lager av spermier (vissa i fokus och andra inte) som kan kollidera med varandra och därmed rubba instrumentets prestanda. CASA-instrumenterna är fortfarande dyra, kräver en viss grad av kalibrering och validering samt en bra programmering för varje djurslag som undersöks.

Alternativa system har testats som arbetar med nya principer, exempelvis genom att bestämma antal partiklar (spermier) som korsar olika fält och ger en regression fluktuation algoritmen av spermieantalet och dess förflyttning. Metoden möjliggör mätningar av flera tusen spermier per prov, vilket ökar säkerheten i mätningarna. Å andra sidan, mätts endast de grundläggande värden, det vill säga spermiernas hastighet som definierar olika spermieklasser samt rörelsetyp. Med andra ord, spermier som rör sig mycket fort är de som har ett linjärt mönster. Under detta projekt, har vi testat en ny utrustning (QualiSperm™; Biophos, Pfäffikon, Switzerland; <http://www.biophos.com>) som baseras på dem ovan nämnda princip och som ansågs intressant för rutin eftersom den var enkel att använda [19] och det har validerats för andra djurslag (Tejerina, Buranaamnuay, Saravia, Wallgren & Rodriguez-Martinez, Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. Theriogenology 2008, 69: 1129-1138). *Fördelen med QualiSperm™ gentemot visuell undersökningen är både det större antal spermier som undersöks samt tillgång till en parameter som inte kan undersökas visuellt, d.v.s. spermiehastigheten (i µm/sekund). Detta, tillsammans med den lägre kostnad som instrumentet har i kontrast med konventionella CASA gör att det kan bli attraktivt för rutin användning i större stuterierna om dess kostnad hålls låg och dess effektivitet uppgraderas kontinuerligt.*

Därutöver har vi funnit intressanta samband mellan motilitet (mätt med Qualisperm™, [18]) och fertilitet (efter semin av ett fåtal ston) (se Figur nedan). Ytterligare studier, med ett mycket högre antal undersökta ston måste genomföras för att bekräfta denna tendens mellan motilitet och fertilitet.



Vilka andra metoder visade största betydelse, och tillämpbarhet?

De resultat erhållna med användning av fluorometri, av spermimorfologi och av QualiSperm™ var -till viss grad- samstämmiga med dem som gavs av andra metoder (flödescytometri, CASA, även enkel mikroskopering). Datoriserad fluorometriska mätningar av spermier som laddas med fluorescerande markörer för membranintegritet är billigare än flödescytometriska undersökningar, vilket innebär att metoden kunde vara ett bra alternativ, men kostnader för inköp är fortfarande höga. Därutöver är metodiken ännu ej lämpad för rutinverksamhet vid stuterierna, likaså flödescytometrin. Spermimorfologiska undersökningar, som endast kan utföras på specialiserade laboratorier som vid avd för reproduktion, SLU, Uppsala visade sig ha stort värde inom projektet. Det är viktigt att komma ihåg att vissa morfologiska avvikelser, ex.vis onormala svansformer kan resultera i felaktiga spermierörelser och en nedsatt motilitet. Andra avvikelser, exempelvis ett annorlunda format spermiehuvud som visar sig som smal vid basen, och som relateras till en felaktig kondensering av kromatinet under spermio-genesen i testikeln, kan väl omöjliggöra en normal befruktning eller vara tecken för ett felaktigt DNAt och därmed leda till tidig embryodöd. Inom projektet kunde vi koppla nedsatt kromatinintegritet (DNA kvalitet), till sådana morfologiska avvikelser hos spermiehuvudena (smala vid basen, spermier med kärnsäckar) och därefter till fertiliteten [5,6,7,10,11]. *Detta innebär att morfologiska undersökningar av hingstarnas spermier bör rekommenderas före betäckningssäsong och om möjlig- även kombineras (kräver dock direkt frysning) med analys av kromatinintegritet [10, 11].*

Dock är spermimorfologin tids- och kompetenskrävande och därmed kanske inte en bra ersättare för SCSA metoden, som är billigare att genomföra men som kräver inte bara tillgång till en flödescytometer utan även teknisk kunsknad på grund av den speciella infärgnings- och analysmetodik som är relativt tids-, kompetens- och arbetsintensiv. Därför rekommenderas insändning av frysta prover till specialiserade laboratorier. Å andra sidan börjar det finnas en del datoriserade analysinstrument för spermimorfologi (Automatic Sperm Morphology Analysis, ASMA) som kan -så småningom- kanske ersätta den manuella morfologiska undersökningen.

Kan man lätt selektera de bästa spermier ifrån ett spermprov?

Användning av spermieselektionen genom centrifugering av sperma (antingen råsperma, utspädd eller tom fryst-tinad sperma) förbättrade spermakvaliteten (spermiemotilitet, membranintegritet och stabilitet, samt kromatinintegritet) och därmed överlevnadstiden hos spermerna [8, 9, 12]. De spermier som selekterades/separerades ifrån det ursprungliga provet visade sig tåla förvaring i kyld tillstånd mer än dubbel så lång tid jämfört med oselektad sperma, viabla och högmotila [9]. Sådana spermier kunde även utvinnas från frysta spermadoser [9, 1, 3]. Selektionen minskade därmed skillnader mellan hingstar [13]. Metoden visade sig naturligtvis vara bättre (i procent av högkvalitativa spermier som selekterades) hos hingstar med nedsatt spermakvalité (förutsatt att det fanns motila spermier -även med nedsatt rörelse- inom spermiesuspensionen), än hos hingstar med bra sperma. Vissa spädningsvätskor verkade befrämja denna selektion, exempelvis Andromed-ETTM, i och med att spermerna behåller sitt viabilitet längre [14] i detta medium som är fritt från animaliska komponenter.

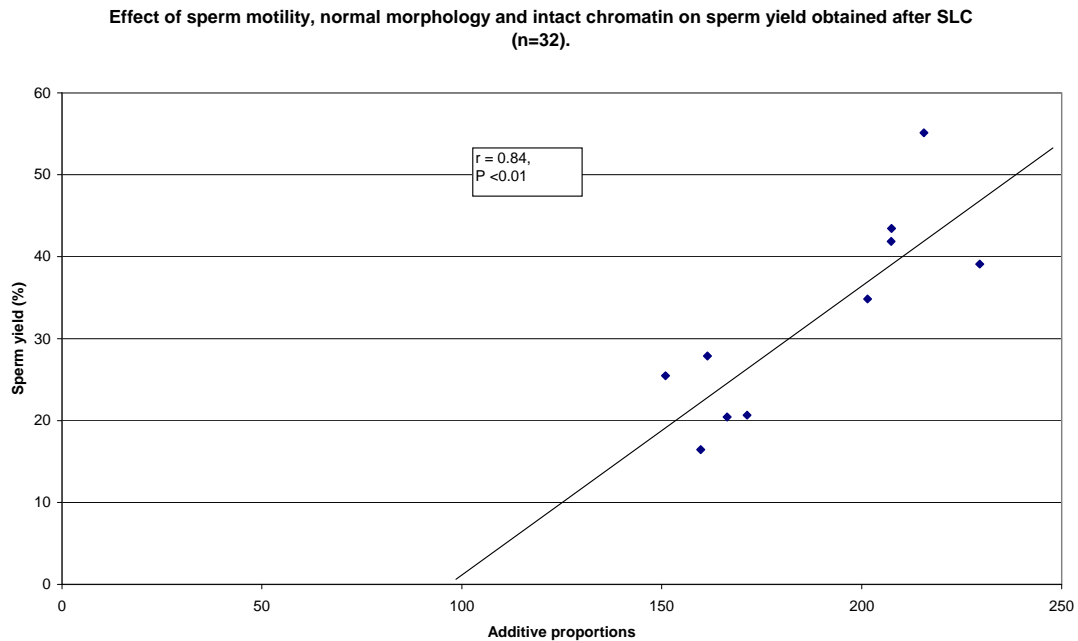
Den nyss utvecklade, förenklade metoden, ”enkel-kolumn” centrifugering (SLC) skilde sig knappast i sina resultat beträffande procent av separerade spermier (motilitet, morfologin, membran integritet, och kromatinintegritet) från ”två kolloid kolumn” metoden (Tätthetsgradient, [8-10, 12]). Denna SLC metod kunde dock inte hantera stora volymer sperma som behövs för hingstsperma. En serie ”scale-up” försök gjordes under tiden, och vi kan nu konstatera att en sådan hantering är fullt möjligt. Därmed är det också möjligt att använda metoden för rutinmässig hantering vid seminestationer med många hingstar. I ett mycket begränsad pilotförsök inseminerades två ston med kyld, SCL-selektad sperma från en ”problem” hingst. Intressant nog, blev båda ston dräktiga.

Kan man rutinmässigt bedöma proportioner av viabla, hög motila och till utseende normala spermier i ejakulat hos hingstar med olika spermiekvalité/fertilitet efter semin med hjälp av SLC-centrifugering?

Ett ejakulat består av spermier med olika egenskaper, suspenderade i sädesplasma. Spermernas utseende och rörlighet (bland andra parametrar) varierar därför att de härstammar från olika generationer av spermier som produceras i testikeln över en viss tid, en process som är mycket känslig och där avvikelser kan förekomma. Med hjälp av just morfometriska parametrar och av rörlighet kan man separera olika sub-grupper av spermier inom ejakulatet, de sk ”sub-populationer” [15-17]. I och med att en betydande andel av spermerna i ett bra ejakulat hör till den sub-population av mycket rörliga och snabba spermier med normal morfologi finns det intresse att fastställa om denna population alltid är av samma storlek i olika ejakulat och om det har ett samband med fertiliteten, något som tror sig vara fallet hos andra djurslag. SLC-metodiken separerar de bästa spermier ifrån färsk, kyld och fryst-tinade spermier [5, 1-3] lika bra, fast enklare, än andra metoder (exvis tätthetsgradienter)(Morrell & Rodriguez-Martinez, Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review, 2008). *Centrifugering via en enkel lager av kolloid (SLC) är därför ett bra alternativ till andra metoder för att selektera viabla, morfologiskt normala och hög-motila spermiersom sannolikt är befruktningssdugliga. Tekniken är enkel, billigare än andra selektions metoder och kan användas i rutin verksamhet för att fastställa proportionen av de bästa spermerna per prov.*

Kan man kombinera dessa resultat och få en diagnostisk värde för SLC-separering?

En retrospektiv analys av data genererade inom projektet visade signifikanta korrelationer ($r = 0.849$, $P < 0.01$) mellan spermieantalet efter SLC (dvs antal spermier som selekteras) och spermiemotilitet, andel spermier med normal morfologi samt med intakt kromatin i den ursprungliga spermaprovet (se figur nedan). Med andra ord, under standard hantering, andelen SLC-selektade spermier indikerar spermakvalité av den ursprungliga ejakulatet. Normal morfologin och kromatinintegritet relateras till fruktsamheten. Ergo, torde SLC kunna diagnostisera fertiliteten.



En sådan indikation bör dock testas i fält, genom insemination (kylda och förhoppningsvis även frysta/tinade doser) på ett tillräckligt stort antal ston, så att säkra slutsatser kan dras och för att metoden skall bli accepterad på hingststationer och av stoägare.

Vilka rekommendationer/anvisningar skall ges för bästa hantering och kvalitetskontroll av hingstesperma för seminverksamhet i Sverige?

Hantering av sperma skall göras med beaktande av att det är ett biologiskt material som består av terminala celler, vars membraner är programmerade för destabilisering och där deras metabolism och därmed överlevnad beror på vilken omgivning, temperatur och behandling vi utsätter dem för. Rörande diagnostik, verkar spermimotilitet å ena sidan vara den metod som fortfarande håller sin plats, enkel, snabb och... uppenbar ("om de rör sig, då lever de..."). Användning av okulärbedömning kommer att kvarstå om inte de nya datoriserade motilitetsanalytatorer utvecklas vidare, blir enklare, effektivare och billigare. Därefter är det morfologin som förblir nummer två, eftersom det går att analysera den med enkla metoder, för sitt samband med (rörande spermiehuvuden) kromatinintegritet, och... till fertilitet. Dock behöver vi komma ihåg att såväl membran- som kromatinintegritet är parametrar med relevans för fruktsamhet. Metoderna för att mäta dessa är relativt enkla, väl definierade och säkra. De är billiga per prov och analyserar tusentals spermier inom en kort stund. Å andra sidan krävs det fortfarande tillgång till teknisk avancerad instrumentation. Instrumenterna utvecklas kontinuerligt vilket gör att för större hingststationer kan personliga flödescytometrar och inskickning av prover för analys av kromatinintegritet bli värdefulla.

Selektionen av spermier med SLC-tekniken förstärker dessa tydliga samband mellan kvalitet och potentiell fruktsamhet och kan därutöver göra det möjligt att separera de befruktningssugliga spermier från den annars heterogena ejakulatet. Denna spermieanrikning fungerar bäst hos ejakulat med sub-optimal spermabild. SLC-metoden kan då plocka ur de bästa spermier från ett helt ejakulat, exvis för framtagning av transport (kylda) semindoser från hingstar vars sperma är känslig för kyla, eller för att minska antalet spermier per dos för de flesta avelshingstar, med bibehållen fruktsamhet.

Förmedling av resultat till näringen

Resultaten har redovisats både i internationell fackpress, i internationella kongresser, i svenska hemsidor och informationstidskrifter (SSH) samt i kurser anordnade av SLU. Sådana åtgärder kommer förhoppningsvis att fortsätta genom fortbildning av personer som sysslar med hästseminverksamhet (veterinärer och stuteripersonal) i Sverige. Forskningsresultaten bör även ligga till grund för diskussioner med svenska avelsorganisationer (STC, ASVH), stuteriveterinärföreningen samt SJV om anvisningar/rekommendationer som gäller hantering och kvalitetsbedömning av hingstsperma (kyld och fryst). De forsknings- och utvecklingsresultat som härstammar från projektet anses direkt gagna hästnäringens nationella intressen, inte minst via den lyckosamma medverkan i projektet av Flyinge AB.

Publikationer

Förteckning över de av sökanden hittills producerade arbetena inom projektet

- 1- García Macías B, Fernández-González L, Morrell J, Ortega-Ferrusola C, Tapia JA, Rodriguez Martínez H & FJ Peña (2008a) Single layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Reprod Domest Anim* (in press, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01276.x).
- 2- Garcia Macias B, JM Morrell, C Ortega-Ferrusola, L Fernandez-Gonzalez, JA Tapia, H Rodriguez-Martinez & FJ Peña (2008) Centrifugation on a single layer of colloid selects high viability and DNA integrity frozen-thawed stallion spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 43, S4: 5-54 (OC3).
- 3- García Macías B, Morrell J, Ortega-Ferrusola C, Fernández-González L, Tapia JA, Rodriguez-Martínez H & FJ Peña (2008b) Centrifugation on a single layer of colloid selects the "best" quality frozen-thawed stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* (accepted for publication).
- 4- Johannisson A, JM Morrell, J Thorén, M Jönsson, AM Dalin & H Rodriguez-Martinez (2008) Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci* (Re-submitted after reviewers comments).
- 5- Morrell JM, AM Dalin & H Rodriguez-Martinez (2008a) Sperm morphology variation of stallion ejaculates in different breeding seasons. *Reprod Domest Anim* 43, S3: 108 (P241).
- 6- Morrell JM, AM Dalin, L Hammer, A Johannisson, T Sandeberth & H Rodriguez-Martinez (2007a) Chromatin integrity in breeding stallions and its relationship to sperm morphology. *Reprod Domest Anim* 42, S2: 85.
- 7- Morrell JM, AM Dalin, T Sandeberth & H Rodriguez-Martinez (2007b) Morphology of spermatozoa from warmblood stallions: relation to pregnancy rate. *Reprod Domest Anim* 42, S2: 85-86.
- 8- Morrell JM, Dalin AM & H Rodriguez-Martinez (2008b) Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Animal Reprod* 5: 121-126.
- 9- Morrell JM, Dalin AM & H Rodriguez-Martinez (2008c) Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Vet J* 40: (in press) (doi: 10.2746/042516408X3221391).
- 10- Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM & H Rodriguez-Martinez (2008d) Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single

- layer centrifugation through silica colloids. *Reprod Domest Anim* (in press, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01265.x).
- 11- Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T & H Rodriguez-Martinez (2008e) Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand* 50: 2 (doi: 10.1186/1751-0147-50-2).
 - 12- Morrell JM, Johannisson A, Strutz H, Dalin AM & H Rodriguez-Martinez (2009) Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage. *Equine J Vet Sci* (In press).
 - 13- Morrell JM, Peña FJ, Johannisson A, Dalin AM, Samper JC & H Rodriguez-Martinez (2008f) Techniques for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 107 (3-4) In press (doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.110). Proc of the 5th Int Symp Stallion Sperm, Gramado, Brazil, Sept 2008.
 - 14- Morrell JM, S Meurling, E Levin & H Rodriguez-Martinez (2008) Andromed-E™ maintains the motility of stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation: a preliminary study. *Reprod Domest Anim* 43, S5: 61 (P30).
 - 15- Ortega Ferrusola C, JM Gallardo Bolaños, L Gonzalez Fernandez, H Rodriguez-Martinez, JA Tapia & FJ Peña (2008) Apoptotic markers can be used to forecast the freezability of stallion spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 43, S3: 109 (P245).
 - 16- Ortega-Ferrusola C, Macías García B, Suárez Rama V, Gallardo-Bolaños JM, González-Fernández L, Tapia JA, Rodríguez-Martinez H & FJ Peña (2008) Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reprod Domest Anim* (in press, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01097.x).
 - 17- Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galán Y, Varela-Fernández E, Gallardo-Bolaños JM, González-Fernández L, Rodríguez-Martinez H, Tapia JA & FJ Peña (2008) Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* (Accepted for publication).
 - 18- Strutz H, JM Morrell, A-M Dalin, & H Rodriguez-Martinez (2008) The Qualisperm™ analyzer is effective for measuring sperm motility and velocity in cooled stallion semen. *Reprod Domest Anim* 43, S5: 65 (P42).
 - 19- Tejerina F, Morrell J, Petterson J, Dalin A-M & H Rodriguez-Martinez (2008a) Assessment of motility of ejaculated stallion spermatozoa using a novel computer-assisted motility analyzer (Qualisperm™) *Animal Reprod* (in press).
 - 20- Thys M, Vanadele L, Morrell JM, Mestach J, Van Soom A, Hoogewijs M & H Rodriguez-Martinez (2008) In vitro fertilising capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer silane (glycerolpropylsilane, GS)-coated silica colloidal centrifugation. *Reprod Domest Anim* (In press, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01081.x).

Förteckning över examensarbeten som genomfördes inom ramen för det nu redovisat projekt

- 1- Hammar L (2007) Kromatinstabilitet som grund för kvalitetsbedömning av hingstesperma. Dept. of Clinical Sciences, SLU. Examensarbete (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2007:40, pp 1-15.
- 2- Petterson J (2007) Utvärdering av förbättrad metod för objektiv kvalitetsbedömning av spermimotoilitet hos hingst. Div of Reproduction, Dept. of Clinical Sciences, SLU. Examensarbete (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2007:17, pp 1-11.
- 3- Strutz H (2007) Bedömning av spermimotoilitet i färsk, kyld samt selekterad hingstesperma

- med Qualisperm™. (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2007:79, pp 1-21.
- 4- Thorén J (2007) Utvärdering av en ny selektionsmetod för hingstsperma – med avseende på membranintegriteten och membranstabiliteten. (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2007:75, pp 1-22.
 - 5- Björk H (2008) Utvärdering av viabilitet hos selekterad hingstsperma med hjälp av fluorometri. (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2008: 22, pp 1-15.
 - 6- Jönsson M (2008) Kvalitetsbedömning (motilitet och kromatinstabilitet) av oselekterad och selekterad hingstsperma. (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet) vol. 2008:32, pp 1-32.
 - 7- Ryytty K (2008/9) Effekter av spädningvätska och selektion på motilitet och fertilitet hos hingstsperma. (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet, i manuskript).
 - 8- Junttila L (2008/9) Effekt av spädningvätska på spermiemembranintegritet analyserad med NucleoCounter SP-100 (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet, i manuskript).
 - 9- Beckgren L (2008/9) Kvalitetsbedömning av selekterad och oselekterad hingstsperma med hjälp av flödescytometri och fluorometri, före och efter seminsäsongen (Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet, klart för tryckning).

SLU, 2008-12-11

Heriberto Rodriguez Martinez
Huvudsökande