

Möjligt förbättra hingstars spermakvalitet: om reaktiva syreföreningar (ROS) i hingstsperma

Projektnamn: Reaktiva syreföreningar (ROS, "Reactive oxygen species") i hingstsperma; förekomst, spermiepåverkan och möjlighet till kontroll
Projektledare: Jane Morrell, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU
Medsökande: Heriberto Rodriguez-Martinez, Anders Johannisson
Projektnummer: H0747189
År: 2008, 2009
Kontaktperson: Jane Morrell, 018-67 11 52, jane.morrell@kv.slu.se

SLC-metoden (Single Layer Centrifugering) kan förbättra spermakvaliteten hos hingstar som har låga dräktighetsresultat. Det visar forskning som gjorts av Jane Morrell vid SLU.

Inom hästaveln är det ett problem att vissa hingstars kylda och utspädda sperma håller för dålig kvalitet. När sådan sperma transporterats för artificiell insemination (AI) av ston ger det låg dräktighetsprocent.

Att vissa hingstars kylda sperma håller låg kvalitet kan bland annat bero på reaktiva syreföreningar (ROS). Dessa finns i alla vävnader i kroppen och även i sperma, där de produceras av skadade och döda spermier, från cytoplasmiska rester i omogna spermier, och även av leukocyter och cellfragment.

Höga nivåer av ROS förknippas med infertilitet hos människor. Däremot har man tidigare inte trott att det även kan orsaka skador i hingstsperma på grund av att de antioxidativa system som finns i hingstens ejakulat skulle neutralisera ROS. Dessutom kan spädningssvåtskor för sperma ha antioxidativ aktivitet.

Dock kan yttre faktorer påverka ROS-produktionen hos enskilda hingstar, vilket överstiger den neutraliserande förmåga antioxidanter har och orsaka den kraftigt varierande överlevnad hos hingstsperma som noterats under lagring.

Variert resultat med transporterad sperma

Kyld utspädd hingstsperma som transporterats över natten i frigolitlådor, har gett mycket varierande resultat i AI. Det finns en stor variation mellan hingstar och mellan ejakulat i den tid som spermier behåller sin befruktningförmåga och viabilitet, varierande från en timme till 2-3 dagar.

Dessutom är det bara ~ 30% av hingstarna som producerar ejakulat som fryser bra, resten producerar varierande proportioner av levande spermier (eller inga alls) efter upptining. En ökning av ROS-produktionen antas ske under frysförvaring, vilket kan orsaka lipidperoxidering i spermie-membranen samt kromatinskador. En sådan ökning kan också förekomma under kylförvaring, trots tidigare rapporter om motsatsen.

Ville undersöka ROS i hingstsperma

Syftet med detta projekt var därför att undersöka ROS-produktion i hingstspermaprover, både kylförvarade och frysta och att fastställa möjliga sätt att neutralisera produktionens negativa effekter. Inledningsvis utreddes möjligheten att mäta ROS med en luminometer. Fördelen med en sådan metod skulle vara att den är transportabel och därmed kan användas på olika stuterier för att mäta ROS-produktion i sperma omedelbart efter samlingen.

Det var dock inte möjligt att etablera denna analys vid SLU och i stället utvecklades en flödescytometrisk analys med fluorescerande färgämnen. Denna analys har använts för att analysera ROS-produktion i 45 kylda lagrade spermadoser (15 hingstar, 3 ejakulat per hingst) och 37 upptinade frysta prover (10 hingstar).

Stor variation mellan hingstarna

I de upptinade proverna var spermiernas viabilitet korrelerad med andelen levande spermier som inte producerade ROS ($P < 0,05$), och viabiliteten var också korrelerad med progressiv motilitet ($P < 0,01$). I de kylagrade AI-doserna varierade ROS-produktionen kraftigt mellan hingstar (intervall 14-50%, median 25%). Det fanns dock inget uppenbart samband mellan ROS-produktion och förlust av viabilitet eller motilitet, vilket tyder på att den spädningssväska som använts (INRA96) kan neutralisera de skadliga effekterna av ROS på spermier.

Intressant nog visade det sig att ROS inte verkar orsaka lipidperoxidering i hingstspermiernas membran. Detta resultat står i kontrast till resultat för galtspermier, som skadas av ROS och kan bero på att hästens kost (och därmed hästens sädesvätska) har hög nivå naturliga antioxidanter, eller användning av spädningssväska som innehåller höga halter av antioxidanter.

Spermiernas rörlighet förbättrades

En möjlig positiv roll för låga andelar av sädesvätska upptäcktes i experiment där sädesvätskan sattes tillbaka till SLC-separerade spermier. Dessa utvalda spermier hade högre progressiv motilitet än icke-separerade spermier, och denna ökades ytterligare, om än tillfälligt, genom att sätta tillbaka sädesvätskan till en slutkoncentration av 5 procent till lösningen med framseparerade spermier. En koncentration av 20 procent eller mer av sädesvätskan hade däremot en skadlig effekt på spermiernas rörlighet. Detta resultat kräver ytterligare utredning eftersom det skulle kunna vara ett bra sätt att förbättra motiliteten i kylda eller upptinade spermiedoser för AI, om sädesvätskan tillsattes direkt innan AI.

Funktionaliteten hos hingstspermier som hade preparerats med Single Layer Centrifugering (SLC)-metoden mha Androcoll™-E, som tidigare utvecklats vid SLU, testades genom intracytoplasmisk spermieinjektion. Spermierna kunde initiera normal utveckling när de injicerades i äggceller från häst och normala blastocyster producerades.

När sperma från lågfertila hingstar användes, hade en högre andel av de oocyter som injicerats med SLC-utvalda spermier en utveckling till blastocyststadiet än de som injiceras med spermier som preparerats med densitetsgradient. SLC-metoden skalades upp så att större volymer ejakulat kan bearbetas. Hela ejakulatet kan nu behandlas i 4-8 50mL-rör, beroende på ejakulatets volym. Den uppskalade metoden användes för att preparera utvalda spermiedoser för artificiell insemination (AI), med resulterande dräktigheter.

Bättre dräktighet efter SLC-bearbetning

Ejakulat från fem problemhingstar bearbetades med SLC och användes för AI, vilket resulterade i dräktighet i 50 procent av inseminationerna, jämfört med 0-20 procent för tidigare oselekerade spermiedoser. En fullskalig fertilitetsstudie med AI pågår för att undersöka olika aspekter av fertilitet hos SLC-selekerade spermier.

I ett samarbetsprojekt med en grupp i Belgien, användes SLC-selekerade spermier för frysförvaring med Botucrio, en ny spädningssvätska innehållande amider, som tros orsaka mindre osmotisk stress för spermier än glycerol och därför mindre ROS-produktion.

Den progressiva motiliteten hos SLC-selekerade spermier efter upptining var i genomsnitt 13 procent bättre än hos oselekerade spermier preparerade för frysning på vanligt vis, vilket var ett utmärkt resultat (M. Hoogewijs, opublicerade observationer). Ytterligare arbete krävs för att optimera frysningsprotokollet för SLC-selekerade spermier och för att testa deras fertilitet efter AI, men SLC-tekniken verkar ge verkligt hopp för att förbättra frysningsprotokollen i hästavelsbranschen.

Sädesvätska tycks ge skydd under frysning

Ytterligare undersökningar som härrör från dessa resultat är att fortsätta att undersöka de eventuella positiva effekterna av små mängder av sädesvätska för att tillfälligt stimulera spermiernas rörlighet och för att skydda spermierna under nedfrysning. Användningen av SLC-selektion som ett sätt att förbättra spermieöverlevnaden efter nedfrysning är även relevant för branschen, tillsammans med nya tillsatser till frysmediet, såsom amider. Fördelarna med SLC-selektion för att förlänga spermiernas viabilitet under kylförvaring, och även i det inseminerade stoet, kräver ytterligare studier i AI-försök.

Vetenskapliga referenser

Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A-M, Rodriguez-Martinez, H. (2009) Single Layer Centrifugation with Androcoll™-E can be scaled-up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology* 72, 879-884.

Morrell JM, Rodriguez-Martinez H, Johannisson A. (2010) Single Layer Centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared to sperm washing. *Reproductive Biomedicine Online* 21, 429-436.

Ortega Ferrusola C, Johannisson A, Peña FJ, Tapia JA, Rodriguez-Martinez H, Dalin AM and JM Morrell (2011) Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after Single layer centrifugation (SLC), through Androcoll™-E. *JEVS* in press.

En längre lista av referenser: <http://ams.orbelon.com/slf/pdf/srpH0747189.pdf>

Det här projektet har fått anslag från Stiftelsen Hästforskning. Det här är en populärvetenskaplig sammanfattning av den slutrapport som forskarna skrivit efter forskningsprojektets slut. Mer information kan fås direkt från forskarna själva eller från Stiftelsen Hästforskning, www.hastforskning.se.