

KOMPOSITION FÖR SEPARATION AV SPERMIER FRÅN ETT SPERMAPROV

Uppfinningens område

Föreliggande uppfinning avser området av veterinärmedicin, i synnerhet

- 5 kompositioner och metoder som är användbara för att bearbeta djursperma för användning vid assisterad reproduktion.

Uppfinningens bakgrund

- Artificiell insemination (AI) har använts för mjölkkor och grisar i flera årtionden. Det
- 10 krävs emellertid nya metoder för att förbättra spermiekvaliteten i spermadoser som används för AI, av olika orsaker: (i) för att separera spermier från inhiberande faktorer i sädesplasma, exempelvis dekapaciteringsfaktorer; (ii) för att välja mogna, normala och livsdugliga spermier från hela spermiepopulationen i ejakulatet; (iii) för att separera spermier från källor av reaktivt syre (*reactive oxygen species*) som är
- 15 skadliga för spermiers överlevnad. Dessa processer utförs normalt av de honliga reproduktionsorganen under naturlig parning men kan delvis saknas, när spermier insemineras artificiellt (AI). Dessutom, när spermier ska användas för *in vitro*-fertilisering är dessa selektionsmekanismer fullständigt frånvarande och spermier måste därför separeras från sädesplasman före användning.

- 20 Under de senaste 15 år, har tekniken av densitetsgradientcentrifugering använts för att bereda humana spermier för användning vid assisterad reproduktion (WHO, 1999). Ursprungligen användes silikapartiklar belagda med polyvinylpyrrolidon, men nyare formuleringar har använt silanbelagda silikapartiklar i
- 25 densitetsgradienten.

De beredda spermiesuspensionerna används **omgående** för *in vitro*-befruktnings, intracytoplasmatisk spermieinjektion eller intrauterin deponering.

- 30 Kommersiellt tillgängliga kolloidkompositioner för att bearbeta humana spermier exempelvis Puresperm (Nidacon International AB) för assisterad reproduktion har en osmolaritet av 300-310 mOsm enligt företagets hemsida och dess säljfrämjande litteratur. Den fram till nu enda kommersiellt tillgängliga densitetsgradientprodukten för djurspermier som citerats i litteraturen har också

en osmolaritet inom intervallet 300-310 mOsm, t ex Equipure och Bovipure (båda framställda av Nidac International). Även om Bovipure rapporterades ge bra resultat för att bearbeta nötkreaturspermier för IVF (4), gav användningen av Equipure såsom en densitetsgradient för hingstpermier inte samma gynnsamma effekter på spermie kvaliteten (5) som har rapporterats för humanspermier (6).

Beredningen av humana spermaprover utförs vanligtvis i 1,5 ml alikvoter av sperma. Även om beredningen av djursperma i sådana små volymer är adekvat för att bereda spermier för IVF eller ICSI, är avsevärt större spermieantal nödvändiga för artificiell insemination i djur. Följaktligen finns det ett behov av enkla och lämpliga metoder för att bereda spermier från djursperma på platsen för insamlingen därav och i adekvata antal för användning i artificiell insemination. Det finns också ett behov av djurspecifika kompositioner som lämpar sig för sådana metoder.

Sammanfattning av uppfinningen

I en första aspekt avser föreliggande uppfinning en komposition för separation av spermier från ett spermaprov, innefattande åtminstone ett salt av en alkalimetall, och/eller en alkalisk jordartsmetall, EDTA, en zwitterjonsbuffert, silanbelagda silikapartiklar och vatten, varvid kompositionen har ett pH av 7,0-7,35 och en osmolaritet av 300-345 mOsm.

I en utföringsform av denna aspekt innefattar kompositionen:

- natriumklorid i en koncentration av 97,5-140,0 mM
- kaliumklorid i en koncentration av 4,0-5,5 mM
- glukos i en koncentration av 1,0-1,4 mM
- EDTA i en koncentration av 0,10-0,14 mM
- HEPES i en koncentration av 15,0-19,0 mM
- tri-natriumcitrat i en koncentration av 4,8-8,3 mM
- laktat i en koncentration av 0,0-4,0 mM; och
- silanbelagda silikapartiklar i en concentration av 300-1000 g/l.

I en ytterligare utföringsform av denna aspekt har kompositionen ett pH inom intervallet 7,10-7,25, företrädesvis ca 7,15 innan den autoklaveras. Kompositionen

har vidare företrädesvis en osmolaritet av 320-345 mOsm, såsom 320-330 mOsm. Den genomsnittliga diametern av de silanbelagda silikapartiklarna kan vara 10-1000 nm, företrädesvis 10-100 nm.

- 5 I ytterligare en aspekt avser uppfinningen en metod för att bereda spermier från ett spermaprov från ett icke-humant djur, vilken innefattar separation av spermierna från andra spermabeståndsdelar genom centrifugering av spermaprovet genom ett enkelskikt av en kolloidformulering.

- 10 I en utföringsform av denna aspekt använder metoden kompositionen enligt den första aspekten.

- I en utföringsform av denna aspekt ligger densiteten hos kolloidformuleringen inom intervallet 1,05-1,14 g/ml, såsom 1,051-1,11 g/ml. Formuleringen kan ha ett pH av
15 6,8-7,4, företrädesvis 7,0-7,3 och en osmolaritet av 300-345 mOsm, såsom 320-330 mOsm.

- I en utföringsform av denna aspekt utförs metoden i en behållare som inte är av plast, såsom en glasbehållare.

20

I en utföringsform av denna aspekt utförs metoden i behållare med en volym av 10 ml eller mer än 10 ml, såsom 50-200 ml. Höjden av den kolloida formuleringen i behållaren kan vara 30-45 mm.

- 25 I en utföringsform av denna aspekt bearbetas hela ejakulatet.

I en utföringsform av denna aspekt är djuret en fågel eller ett däggdjur, såsom en häst, tjur, gris eller hund.

- 30 I en utföringsform av denna aspekt är den genomsnittliga diametern av de belagda silikapartiklarna 10-1000 nm, företrädesvis 10-100 nm.

I en utföringsform av denna aspekt är spermaprovet inte oligospermiskt.

I en utföringsform av denna aspekt separeras spermier från sädesplasman och de cellulära och icke-cellulära komponenterna av sädesplasman, såsom bakterier, virus, leukocytes, partiklar etc. Varje separerad komponent kan användas separat.

- 5 I en utföringsform av denna aspekt används metoden för att förlänga varaktigheten av spermimotoiliteten. Detta beskrivs vidare i exemplen nedan.

I en utföringsform används metoden för att reducera variationen i spermiekvalitet mellan ejakulat. Detta beskrivs vidare i exemplen nedan.

10

De olika utföringsformerna av metoden enligt uppfinningen kan kombineras med varandra.

I ytterligare en aspekt avser uppfinningen en metod för att separera en

- 15 spermiesubpopulation av intresse från ett spermaprov från ett icke-humant djur, innefattande stegen av

tillhandahållande av en densitetsgradient innefattande åtminstone två skikt av kompositionen enligt den första aspekten, varvid varje skikt har olika densiteter,

20

separation av spermiesubpopulationer i spermaprovet genom centrifugering genom densitetsgradienten och
selektion av spermiesubpopulationen av intresse.

- 25 Denna spermiesubpopulation kan t ex vara haploida spermier eller spermier som har normal rörlighet, med ursprung från häst, nötkreatur eller gris.

Slutligen avser uppfinningen spermier som är bearbetade med metoden enligt uppfinningen och användningen av sådana spermier i AI, IVF och ICSI.

30 **Kort beskrivning av figurerna**

Figur 1: Effekt på hingstspermieöverlevnad under användning av färsk eller lagrad sperma för kolloid centrifugering (n=12). Anm.: insamlingsdag= dag 1; följaktligen är dag 2= 24 timmar; dag 3= 48 timmar etc.

Figur 2: Effekt av tvättning (n=38) respektive ej tvättning av spermiepelleten efter enkelskiktscentrifugering på genomsnittliga subjektiva motilitetbedömningar (%).

- 5 **Figur 3:** Effekt av osmolariten hos kolloider på hingstpermier med normal morfologi efter kolloid centrifugering (n=15).

Figur 4: Effekt av kolloid osmolaritet på spermiekromatindefekter (n=12).

- 10 **Figur 5:** Effekt av separation av spermier från sädesplasman utan åtföljande selektion av spermerna för bra kvalitet under användning av kolloid densitet (n=3).

Figur 6: Jämförelse av olika densiteter av kolloiden (80% och 60%) som används för enkelskiktscentrifugering (n=8).

15

Figur 7: Effekt av uppskalning av enkelskiktscentrifugering på utbytet av hingstpermier: kontroll (4 ml kolloid plus 1,5 ml utspädd ejakulat), indexerat till 1 för varje behandling.

- 20 **Figur 8:** Subjektiv motilitet i spermaprover före och efter enkelskiktscentrifugering, under jämförande av små (4,0 ml kolloid plus 1,5 ml utspädd ejakulat) och stora (20 ml kolloid och 7,5 ml utspädd ejakulat) behandlingar (n=8).

- 25 **Figur 9:** Subjektiv motilitet i spermaprover före och efter enkelskiktscentrifugering, under jämförande av små (4,0 ml kolloid plus 1,5 ml utspädd ejakulat) och extra stora (60 ml kolloid och 22,5 ml utspädd ejakulat) behandlingar (n=4).

Figur 10: Effekt av uppskalning av den kolloida centrifugeringen på hingstpermernas viabilitet (n=8).

30

Figur 11: Effekt av uppskalningen av den kolloida centrifugeringen på hingstpermernas motilitet (n=7).

Figur 12: Effekt av uppskalningen av den kolloida centrifugeringen på hingstspermiernas hastighet (n=7).

5 **Figur 13:** Effekt av ökning av både kolloidens volym och ejakulatets volym på hingstspermiernas motilitet (n=9).

10 **Figur 14:** Effekt av kolloidens osmolaritet på galtspermiers motilitet efter densitetsgradientcentrifugering i små och stora centrifugrör: osmolaritet 305 mOsm (n=4). Anm.: dag 1 är dagen för beredning; dag 2 är plus 24 timmar etc.

Figur 15: Effekt av kolloidens osmolaritet på galtspermiers motilitet efter densitetsgradientcentrifugering i små och stora centrifugrör: osmolaritet 330 mOsm (n=8). Anm.: dag 1 är dagen för beredningen; dag 2 är plus 24 timmar etc.

15 **Figur 16:** Jämförelse av densitetsgradientcentrifugering och enkelskiktscentrifugering av galtspermier (n=12 ejakulat). Anm.: dag 1 är dagen för beredningen; dag 2 är plus 24 timmar etc.

20 **Figur 17:** Effekt av inkubation i 37°C på motiliteten av galtspermier från enkelskiktsberedningar (n=18 ejakulat).

Figur 18: Jämförelse av kolloid centrifugering under användning av färska respektive lagrade galtspermier (n=12 ejakulat).

Detaljerad beskrivning av uppfinningen

25 Föreliggande uppfinning syftar till att förbättra kompositioner och metoder inom tidigare teknik för att bereda spermier från olika djurejakulat med avseende på kvalitet och även enkelhet hos denna beredning. Förbättringen av spermiekvalitet inkluderar förlängning av spermieöverlevnad, förbättrad spermomotilitet, viabilitet, morfologi, kromatinintegritet och fertiliseringsförmåga. Förbättringarna av
30 metoderna inkluderar ökat utbyte, enkelhet att genomföra metoden, kapacitet att bearbeta stora volymer av ejakulat, selektion av spermiesubpopulationer och optimering för de enskilda arterna. Detta specificeras vidare i exemplen.

Kompositionen enligt uppfinningen kan produceras som en stamkomposition. Denna stamkomposition har en densitet av ungefär 1,14 g/ml. Stamkompositionen kan användas utspädd för bestämda applikationer men kan också spädas med en lämplig buffert. Lämpliga spädningar är exempelvis 80%, 70%, 67,5%, 65%, 60% och 40% av stamkompositionen. De utspädda kompositionerna kan naturligtvis också bearbetas direkt, utan att en stamlösning först produceras.

De silanbelagda silikapartiklarna som används i metoden kan vara en kommersiellt tillgänglig produkt, såsom RediGrad som kan erhållas från GE Healthcare, eller någon annan partikelkomposition med jämförbara egenskaper.

Några exempel på kompositioner enligt uppfinningen ges som stamlösning A (lämplig för användning med grisarter) och stamlösning E (lämplig för andra arter, såsom häst, nötkreatur eller hund) i tabell I nedan. Buffert E och buffert A kan användas för att framställa motsvarande utspädda kompositioner, men andra buffertar kan också användas. Buffert A kan exempelvis ersättas med Beltsville Thawing Solution (BTS) i spädning av stamlösning A. I dessa exempel på stamlösningar är pH ca 7,15, men pH ökar under autoklivering till ca 7,33.

Tabell I

Kemikalie	Stamlösning E mM	Stamlösning A mM	Buffert E mM	Buffert A mM	80%E mM	80% A mM
NaCl	104	113	135	121	115	113
KCl	4,3	4,7	5,5	5,0	4,7	4,7
Glukos	1,1	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2
EDTA	0,11	0,13	0,13	0,12	0,13	0,13
HEPES	16	18	18	19	18	18
CaCl ₂	2,5	2,7	0	0	0	2,7
Na-citrat			7,6	8,1	5,8	1,6
Ca-laktat			3,0		2,5	0
Na-laktat				19		3,8
H ₂ O *			1 1	1 1	0,2 1	0,2 1
RediGrad	1 1	1 1			0,8 1	0,8 1
Densitet	1,13 ± 0,005					
Osm	320	330	320	330	320	330
pH	7,15-7,35	7,15-7,35			7,15	7,15

* vatten-för-injektion-kvalitet

- En ny metod är nödvändig för att förlänga den användbara livslängden av
- 5 hingstpermier som är avsedda för AI. Föreliggande uppfinnare jämförde densitetsgradientcentrifugering eller centrifugering genom ett enkelskikt av kolloid såsom potentiella metoder för att bereda hingstpermier. Båda metoderna verkade förlänga varaktigheten av spermimotoilitet jämfört med ocentrifugerade permier ($P < 0,001$), vilket därmed potentiellt förlänger den användbara livslängden av
- 10 behandlade hingstpermier för AI. Dessutom gjordes en jämförelse av effektiviteten av selektionen under användning av (i) färskt insamlad, utspädd hingstperma och (ii) spermaprover lagrade över natten vid 4°C, före bearbetningarna.

- För färsk, utspädd sperma, sågs ett liknande utvinningsutbyte av rörliga permier
- 15 för de två beredningsmetoderna ($27,0 \pm 6,56$ miljoner permier mot $32,6 \pm 7,79$ för enkelskikt respektive densitetsgradienter]. Emellertid förminskades utbytet med 18-20%, då sperma lagrad under kyla användes för centrifugering jämfört med färsk sperma, och en större variation sågs mellan ejakulaten än mellan färska ejakulat.

Återigen förbättrades spermiemotilitet och spermieöverlevnad i de centrifugerade spermieberedningarna jämfört med lagrade, obearbetade ejakulat. Slutsatsen kan därmed dras att de två kolloida centrifugeringsteknikerna ger ekvivalenta spermieberedningar och att enkelskiktsmetoden skulle vara lämplig för användning på fältet. Detta beskrivs vidare i exempel 1.

Spermiemorfologi och kromatinintegritet har knutits till hingstspermiernas fertiliteten. Tidigare studier med humana ejakulat har visat att andelen spermier med normal morfologi och med intakt kromatin kan ökas under användning av densitetsgradientcentrifugering (6). Föreliggande uppfinnare undersökte huruvida en sådan metodik kunde vara effektiv för hingstesperma, genom att använda antingen densitetsgradientcentrifugering eller den ovannämnda nya metoden, enkelskiktscentrifugering. Det fanns en signifikant höjning i andelen morfologiskt normala spermier i spermieberedningarna efter kolloidal centrifugering oavsett vilken centrifugeringsmetod som användes (före centrifugering $67,5 \pm 13,06\%$; efter enkelskiktscentrifugering $77,1 \pm 9,3\%$; efter densitetsgradientcentrifugering $76,7 \pm 8,7\%$; $P < 0,001$). Vidare minskade variationen mellan hingstar betydligt genom centrifugeringen. Några av de morfologiska abnormaliteterna minskade betydligt efter kolloidal centrifugering, t ex minskade förekomsten av proximala cytoplasmadroppar med 20%, och förekomsten av distala cytoplasmadroppar med 50%, under det att kolloidal centrifugering hade liten effekt på proportionerna av förekomsten av smala eller päronformade huvuden. Sammantaget tyder dessa resultat på att kolloidal centrifugering är en lämplig metod för att skörda morfologiskt normala spermier från ejakulat som ska användas i AI och som dessutom delvis kan minska variationen som ses mellan hingstar. Detta beskrivs vidare i exempel 1.

Dessutom gav de båda metoderna av kolloidal centrifugering spermiepreparationer där kromatinintegriteten förbättrades signifikant (DNA-fragmenteringsindexet i icke-selektade preparationer: $11,0 \pm 4,6$; enkelskiktscentrifugering: $4,8 \pm 2,6$; densitetsgradientcentrifugering: $4,8 \pm 2,8$; $P < 0,001$). Det fanns inte någon skillnad mellan de två centrifugeringsmetoderna. Dessutom var det negativa förhållanden mellan den normala morfologin och DNA-fragmenteringsindexet (DFI) ($P < 0,001$), mellan normal morfologi och standardavvikelsen av DFI (SD_DFI), ($P < 0,001$), och

mellan DFI och dräktighetsfrekvensen ($P < 0,03$). För specifika spermiehuvuddefekter fanns det ett direkt förhållande mellan förekomsten av påronformade huvuden och DFI ($P < 0,05$), kärnsäckar och DFI ($P < 0,001$), och mittstycksdefekter och DFI ($P < 0,01$); mellan lösa huvuden och SD-DFI ($P < 0,001$) samt mellan lösa huvuden och genomsnittligt_DFI ($P < 0,05$). Slutsatsen är att enkelskiktscentrifugering var lika effektiv som densitetsgradientcentrifugering för att anrika hingstpermiepreparationer med normal kromatinstruktur och kan därmed hjälpa till med att förbättra dräktighetsfrekvensen för artificiell insemination. Förekomsten av vissa morfologiska defekter kan väl indikera en kromatinskada och skulle därmed kunna användas som en markör för att förutse fertiliteten av inseminationsdoser. Detta beskrivs vidare i exempel 1. Användningen av kolloid centrifugering för att bereda djurspermier för AI kommer att kräva bearbetning av stora volymer av ejakulat eller stort antal spermier. Metoder för att öka den volym som kan bli hanterad och reducera förluster under centrifugering utforskades genom att förändra parametrar såsom osmolariteten och densiteten hos den kolloida formuleringen och användningen av centrifugrör av olika material (glas vs. plast) och storlekar (10 vs. 50 ml). Genom att minska densiteten hos kolloiden som används för enkelskiktet ökade utbytet av rörliga spermier väsentligt jämfört med normaldensitetskolloiden (genomsnitt $\pm$ SD: $72,6 \pm 28,9$ miljoner vs. $28,9 \pm 24,7$ miljoner), samtidigt som spermieöverlevnaden förlängdes med 24 timmar jämfört med icke-centrifugerat ejakulat. Användning av glas- i stället för plaströr ökade signifikant det genomsnittliga utbytet: ($42,2 \pm 22,14$ miljoner resp. $39,3 \pm 19,87$ miljoner spermier för glas- resp. plaströr; $P < 0,01$). Användning av stora centrifugrör (50 ml) tillsammans med ökande volymer av kolloid och sperma ("uppskalning") gav varierande resultat, förmodligen på grund av skillnader mellan ejakulaten. Volymer om 8-10 ml kolloid (antingen i ett eller två skikt) tillsammans med 4,5 ml utspädd sperma i 50 ml rör gav emellertid de högsta utbytena jämfört med de vanliga volymerna i 10 ml rör, vilket antyder att det bör vara möjligt att utvinna tillräckliga mängder spermier för AI. Detta beskrivs vidare i exempel 3.

I en jämförelse av två osmolariteter av kolloidformuleringen var det genomsnittliga utbytet för "normal" (320 mOsm) och "hög" (345 mOsm) för enkelskikt: $30,19 (\pm 16,9)$ respektive $25,8 (\pm 18,5)$ miljoner spermier för de två osmolariteterna, medan utbytet för densitetsgradients var $31,84 (\pm 19,7)$ respektive $26,46 (\pm 20,0)$ miljoner

spermier, med avsevärd variation mellan ejakulaten. Dessa skillnader är inte statistiskt signifikanta. Användning av kolloiden med "hög" osmolaritet för enkelskiktet resulterade emellertid i en förhöjning av antalet morfologiskt normala spermier i preparationen ($P < 0,001$). Dessutom observerades denna trend också för densitetgradienter, även om skillnaderna här inte var statistiskt signifikanta ($P < 0,051$). För enskilda morfologiska abnormiteter var skillnaden mellan den normala och höga kolloidformuleringens förmåga att avlägsna onormala spermier inte signifikant. En ökning av osmolariteten hos kolloidformuleringe kan därmed vara gynnsam för bearbetningen av ejuakulat som innehåller en stor andel onormala spermier. Detta beskrivs vidare i exempel 3.

I ett ytterligare exempel modifierades enkelskiktsmetoden av kolloidal centrifugering för att snabba upp bearbetningen och skalades upp för att göra det möjligt att bearbeta hela ejakulatet, som är voluminöst hos hingstar, i ett litet antal stora rör. Utelämnandet av det andra centrifugerings"tvätt"steget från det ursprungliga protokollet resulterade i betydligt tidsbesparande och påverkade inte menligt spermimotoiliteten. För "uppskalningen" gav användning av 8 till 12,5 ml kolloid (80%) med 5 ml ejakulat inte så god spermimotoilitet i spermiepreparationerna som 4 ml kolloid i 10 ml centrifugrör. När antingen 15 eller 20 ml kolloid av olika densiteter (60-80%) användes för att centrifugera 7,5 ml utspätt ejakulat i 50 ml centrifugrör, erhöles emellertid spermiepreparationer som ansågs vara ekvivalenta, vad gäller kvalitet, med dem från normalstora preparationer. Det upptäcktes att 15 ml 60% kolloid gav de bästa spermiepreparationerna i termer av spermieutbyte och spermieöverlevnad. Spermimotoilitet skilde sig inte mellan behandlingarna. Dessutom gav användningen av 60 ml kolloid (80%) med 22,5 ml utspätt ejakulat i 200 ml centrifugrör spermiepreparationer som ansågs vara likadana som spermiepreparationerna från 4 ml kolloid i 10 ml centrifugrör med avseende på motilitet och överlevnadslängd. Slutligen hade de bearbetade spermerna fertiliseringsförmåga, eftersom dräktigheter uppnåddes efter insemination av de kylda, transporterade, centrifugerade spermerna Uppskalningen beskrivs vidare i exempel 4.

Fertiliseringsförmåga hos utvalda frysta och upptinade tjurspermier testades genom in vitro-fertilisering (IVF), varvid spermerna bereddes antingen på en

densitetsgradient eller på ett enkelskikt av kolloid. Den genomsnittliga fertiliseringsgraden, blastocystutvecklingsgraden och det totala antalet celler var $56,3 \pm 23,3\%$, $23,5 \pm 17,4\%$ resp. $83,2 \pm 29,9$ för densitetsgradientberedda spermier och $58,1 \pm 23,3\%$, $24,5 \pm 14,3\%$ resp. $94,6 \pm 23,4$ för spermier som bereddes på ett enkelskikt av kolloid. Medelvärdena för olika parametrar av datorbaserad analys av spermimotoilitet skilde sig inte mellan de två spermiepreparationsmetoderna. Dessa resultat bekräftar rapporterna för hingst och galt, nämligen att spermierna som är beredda på ett enkelskikt av kolloid inte har annat uppförande eller andra egenskaper än gradientberedda spermier, och tyder vidare på att det inte finns någon skillnad i fertiliseringsförmåga hos spermier i de båda typerna av preparationer. Detta beskrivs vidare i exempel 6.

Kolloidal centrifugering har tidigare använts för att välja spermier med normal morfologi. Inom ramen för föreliggande uppfinning, gjordes ett försök att välja ut spermier med normal storlek från en polymorf population i ett tjurejakulat. Enkelskikt av kolloid med olika densiteter användes för att identifiera lämpliga densiteter för densitetsgradienten. Genom att använda kolloiddensiteter av 55% och 70%, var det möjligt att erhålla två spermie-subpopulationer, en innehållande nästan bara spermier med normal storlek och en annan som var anrikad på makrocefaliska spermier. De mikrocefaliska spermierna selekterades ut genom kolloiden med lägsta densitet och framträdde därför inte i någon av de selekterade subpopulationerna. Detta beskrivs vidare i exempel 5.

Hindren för att använda densitetsgradientcentrifugering i andra djurarter, såsom galt, liknar dem som listats för hingst. Föreliggande uppfinnare undersökte följande: (i) effekten av ökande osmolaritet hos en kolloid formulering på effektiviteten av galtspermieselektion under densitetsgradientcentrifugering, i syfte att utveckla kolloidformuleringar specifika för djurspermier, (ii) en jämförelse av densitetsgradientcentrifugering med centrifugering genom ett enkelskikt av kolloid för beredning av galtspermier, (iii) effekten på galtspermier av autoklavering av kolloiden, samt (iv) tvättning av spermier efter kolloidal centrifugering.

Resultaten visade att ökande osmolaritet hos kolloiden som användes för densitetsgradientcentrifugering av galtspermier ökade andelen rörliga spermier i

den resulterande spermiepreparationen. Dessutom behölls spermie motilitet åtminstone 24 timmar längre hos de centrifugerade spermiepreparationerna än hos kontroller (ocentrifugerade alikvoter), d v s 7-8 dagar för spermier centrifugerade på en densitetsgradient jämfört med mindre än 6 dagar för ocentrifugerade spermier.

- 5 När kolloidenkelskikt och densitetsgradients jämfördes, var spermie motilitet signifikant bättre ($P < 0,001$) i de centrifugerade spermiepreparationerna (medel $\pm$ sd: $79,6 \pm 8,1\%$ och $74,2 \pm 12,0\%$ för enkelskikt respektive densitetsgradient) än i ocentrifugerade kontroller ($62,9 \pm 12,7\%$). Det genomsnittliga utbytet av rörliga spermier för enkelskiktet var $67,5 \pm 25,6\%$, och för densitetsgradienten $59,6\% \pm$
- 10 $22,3\%$ (icke signifikant). Överlevnaden ökade signifikant genom kolloidal centrifugering (ocentrifugerade preparationer $3,1 \pm 0,3$ dagar, enkelskikt (SL) $5,5 \pm 0,79$ dagar, densitetsgradient (DG) $5,75 \pm 0,62$ dagar; $P < 0,001$ för ocentrifugerade vs. centrifugerade preparationer; SL vs. DG icke signifikant). Närvaron av bakterier i ocentrifugerade spermaprover kan ha bidragit till fränfallet av spermier. Kolloidal
- 15 centrifugering verkade avlägsna bakterierna.

- Autoklivering av kolloidformuleringen hade ingen effekt på spermieantalet, spermierörligheten eller spermieöverlevnaden, jämfört med icke-autoklivering av kolloiden. Dessutom hade tvättning av den spermiepellet som erhöles efter kolloidal
- 20 centrifugering därav ingen effekt på spermieantalet, spermie motiliteten eller spermieöverlevnaden, jämfört med ingen tvättning. Galt spermier kunde lagras i 24 timmar innan centrifugering utan att detta hade en skadlig effekt på spermie motilitet och varaktighet av motilitet i de centrifugerade preparationerna. Avslutningsvis förbättrar en ökad osmolaritet hos kolloidformuleringen selektionen
- 25 av spermier under densitetsgradientcentrifugeringen. Avslutningsvis ger centrifugering på ett kolloidenkelskikt spermiepreparationer som i motilitet och utbyte liknar dem från densitetsgradients och dessa preparationer visar förbättrad spermie motilitet och överlevnadslängd jämfört med kontroll spermieprover (ocentrifugerade). Enkelskiktsmetoden kan underlätta utvecklingen av en
- 30 uppskalad metod för beredning av stora volymer ejakulat. Detta beskrivs vidare i exempel 6.

Föreliggande uppfinnare undersökte användningen av enkelskiktscentrifugering (SLC) för att bereda hund spermier för AI, under det att spermie motilitet och

morfologi jämfördes i icke-selekterade och selekterade spermieprover. Genomsnittlig spermie-
 motilitet ökade från $77,2 \pm 19,6\%$ före SLC till $87,6 \pm 2,7\%$ efter SLC, under
 det att den genomsnittliga progressiva motiliteten ökade från $48,6 \pm 18\%$ till $67,9 \pm$
 11%. Genomsnittlig normalmorfologi var $62,2 \pm 42,8$ i icke-selekterade prover och
 5 $82,5 \pm 19,1\%$ hos SLC-selekterade prover. Efter lagring i 7 dagar vid 4°C var
 spermie-
 motilitet $<5\%$ i icke-selekterade spermieprover och $57 \pm 11,3\%$ i de SLC-
 selekterade spermiepreparationerna. Spermieutbytet varierade mellan 12 och 47%
 beroende på spermiekvalitet i det ursprungliga ejakulatet. Slutsats: Dessa
 preliminära resultat indikerar att SLC kan vara en användbar metod för att
 10 förbättra hundspermiekvaliteten i spermiedoser avsedda för AI. Detta beskrivs
 vidare i exempel 7.

Exempel

Följande exempel beskriver vidare några specifika utföringsformer av uppfinningen.
 15 Dessa exempel ska inte anses som begränsande och omfånget av uppfinningen är
 det enligt de bifogade patentkraven.

EXEMPEL 1: Hingst

20 **Mål:** (i) att jämföra enkelskiktscentrifugering (SLC) och
 densitetsgradientcentrifugering (DGC) på hingstspermiekvalitet i termer av
 spermie-
 motilitet, utbyte, spermie-
 morfologi, kromatinintegritet och
 spermieöverlevnad (kvarhållande av motilitet) under användning av nyinsamlad
 hingstsperma; (ii) att jämföra spermiekvalitet efter kolloid centrifugering av färsk
 25 och lagrad hingstsperma.

Metoder: sperma samlades in från 10 hingstar hos kommersiella AI-stuterier med
 sedvanliga metoder. Ejakulaten späddes med egentillverkade eller kommersiellt
 tillgängliga spermaspänningsvätskor (Kenneys´ extender [7], INRA 96 [IMV,
 30 Frankrike]) uppvärmda till 37°C och spermiekoncentrationen justerades till ca
 $100 \times 10^6/\text{ml}$. Alikvoter från 38 ejakulat användes för DGC och SLC såsom följer: en
 densitetsgradient preparerades genom att pipettera 2 ml av 80% kolloid E in i ett
 centrifugrör och därefter försiktigt placera ett 2 ml skikt med lägre densiteten
 överst; en alikvot (1,5 ml) av den utspädda sperman pipetterades ovanpå det övre

lagret av kolloid. Gradienten centrifugerades i 300 x g för 20 minuter, varefter supernatanten och det mesta av gradientmaterialet kastades bort. Spermiepelleten överfördes till ett rent centrifugrör som innehöll 5 ml av Kenney's spädningsmedel och tvättades genom att centrifugeras i 10 minuter vid 500 x g. Efter tvättningen resuspenderades spermiepelleten i färsk Kenney's spädningsmedel (1 ml). För SLC var metoden liknande den som för DGC med undantaget att 4 ml av 80% kolloid E placerades i centrifugröret i stället för två skikt av olika densiteter (2 ml av varje densitet).

10 Spermiekvalitet i de icke-selektade och centrifugerade spermaproverna bedömdes såsom följer: subjektiv motilitetsbedömning, spermimorfologi (8, 9) och kromatinintegritet under användning av metoden av Evenson et al. (10) modifierad genom Januskauskas et al. (11, 12).

15 För subjektiv motilitetsbedömning undersöktes aliquoter (0,5 µl) av det utspädda ejakulatet och spermiepreparationer med faskontrastljusmikroskopi (x200) omedelbart efter beredning på en upphettad mikroskop-platta (38°C), och därefter en gång dagligen tills motiliteten hade sjunkit till ungefär 20%. Spermiepreparationerna lagrades antingen i kylskåp (6°C) eller vid rumstemperatur (22-30°C). När spermimotilitet undersöktes hos sperma som hade lagrats vid 6°C, fick proverna stå i rumstemperatur under 15 minuter innan aliquoter togs för motilitetsbedömning.

I den andra experimentet, lagrades utspädda ejakulat (n = 21) över natt i en isolerad transportbox med kylklampar, dvs genom att använda standardmetoden för transport av hingstsperma. Endera densitetsgradient- eller enkelskiktscentrifugering genomfördes med den lagrade sperman dagen efter, med motilitetsbedömningar som gjordes på de spermiepreparationer från såväl färsk som lagrade ejakulat.

30

Resultat: När färsk, utspädd sperma användes för kolloid centrifugering, var andelen rörliga spermier, morfologiskt normala spermier och spermier med intakt kromatin liknande för de två centrifugeringsmetoder. Dessa parametrar av spermiekvalitet följande på endera metod av kolloidcentrifugering var bättre än i de

ocentrifugerade proverna (Tabell 1), och spermieöverlevnadslängden förbättrades signifikant från 4 dagar till 10 dagar vid 6°C och från 2 till 6 dagar vid rumstemperatur.

5 **Tabell 1: Effekt av enkelskiktscentrifugering och densitetsgradient-centrifugering på spermiekvalitet hos hingst, medel $\pm$ SD (n= 38).**

Parameter	Ocentrifugerad kontroll	Efter kolloidcentrifugering	
		Enkelskikt	Densitetsgradient
Motilitet (%)	68,0 $\pm$ 9,2	84,7 $\pm$ 5,4 ^{ab}	84,3 $\pm$ 5,9 ^{ab}
Utbyte		27,0 $\pm$ 6,6 ^b	32,6 $\pm$ 7,8 ^b
Överlevnad vid 4°C (dagar)	2,4 $\pm$ 1,3 intervall 1-5	5,6 $\pm$ 1,8 ^{ab} intervall 3-9	5,7 $\pm$ 1,9 ^{ab} intervall 3-10
Överlevnad vid rumstemperatur (dagar)	2,1 $\pm$ 0,7 intervall 1-3	3,0 $\pm$ 0,9 ^{ab} intervall 2-6	3,1 $\pm$ 0,9 ^{ab} intervall 2-5
Normal morfologi (%)	67,5 $\pm$ 13,0	77,1 $\pm$ 9,3 ^{ab}	76,7 $\pm$ 8,7 ^{ab}
Kromatinskada (%)	11,0 $\pm$ 4,6	4,8 $\pm$ 2,6 ^{ab}	4,8 $\pm$ 2,8 ^{ab}

^a signifikant skillnad efter centrifugering; ^b ingen skillnad mellan metoder.

- 10 Då kyldlagrad sperma användes för centrifugering, reducerades utbytet med 18-20% jämfört med färsk sperma, och mer variation observerades mellan ejakulat än för färsk ejakulat. Återigen förbättrades spermie motilitet och spermieöverlevnad i de centrifugerade spermapreparationerna jämfört med lagrade obearbetade ejakulat (Figur 1).

15

Konklusioner: de två kolloidcentrifugeringsteknikerna ger ekvivalenta spermiepreparationer med förbättrad spermiekvalitet jämfört de ocentrifugerade kontrollproverna. SLC eller DGC kunde genomföras med lagrad sperma såväl som med färsk sperma, även om spermiekvaliteten i de resulterande spermiepreparationerna var bättre när färsk sperma användes. Eftersom SLC är enklare och snabbare att genomföra än DGC, skulle den vara lämplig för användning på fältet.

20

EXEMPEL 2: Hingst

Mål: (i) att undersöka förändringarna i spermiemotilitet, viabilitet och

- 5 kromatinintegritet med lagring efter kolloidcentrifugering; (ii) att undersöka nödvändigheten av att tvätta spermiepelleten genom en retrospektiv dataanalys.

Metoder: sperma samlades in från 4 hingstar på kommersiella AI-stuterier med sedvanliga metoder. Ejakulaten späddes med egentillverkade eller kommersiellt

- 10 tillgängliga spermaspänningsvätskor (Kenneys´ extender, INRA 96) uppvärmda till 37°C och spermiekoncentrationen justerades till ca 100×10^6 /ml. Alikvoter från dessa ejakulat användes för SLC, såsom beskrivits tidigare, genom att placera 1,5 ml av det utspädda ejakulatet ovanpå 4 ml kolloid (80%). Spermiepelleten tvättades inte. Spermiekvalitet (spermiemotilitet, spermieviabilitet, membran- samt
- 15 kromatinintegritet) bedömdes i SLC-bearbetade och i ocentrifugerade kontrollprover omedelbart och efter 24 och 48 timmar. Metoderna är såsom beskrivet i exempel 1 med tillägget av metoden för datorstödd analys av spermiemotilitet (CASA, 13), spermieviabilitet och membranintegritet (14). Spermapreparationerna lagrades i kylskåp (6°C). Vid bedömning av motilitet hos spermier som hade lagrats vid 6°C,
- 20 fick proverna jämviktas vid rumstemperatur under 15 minuter innan de bedömdes.

För den retrospektiva analysen gjordes en jämförelse av subjektiva motilitetsdata från 38 ejakulat bearbetade genom enkelskiktscentrifugering med efterföljande tvättning av spermiepelleten och 39 ejakulat där ingen tvättning av spermiepelleten

25 gjordes efter enkelskiktscentrifugeringen.

Resultat: det skedde en snabb försämring i spermiemotilitet hos de ocentrifugerade proverna under 48 timmar, vilket åtföljdes av en minskning i spermieviabilitet, membran- och kromatinintegritet. I motsats till detta var alla parametrarna för

30 spermiekvalitet bättre för de SLC-bearbetade proverna än för de ocentrifugerade proverna och detta behölls under 48 timmar (Tabeller 2-5).

Tabell 2: Motilitetsparametrar (subjektiva och CASA) för spermieprover före kolloidal centrifugering, omedelbart efter kolloid centrifugering och 24 timmar och 48 timmar efter kolloidal centrifugering under lagring vid 5°C (10 ejakulat).

Prov	Tid	Subjektiv motilitet	total CASA-motilitet	c-mot	icke-l-mot	l-mot
Ocentrifugerat	0	64 ± 3,9	72,11 ± 13,1	2,26 ± 0,93	46,7 ± 14,4	34,8 ± 22,9
	+24	31,5 ± 15,1	33,3 ± 19,4	4,77 ± 5,4	59,95 ± 9,4	9,69 ± 8,6
	+48	10 ± 6,6	12,1 ± 12,2	1,97 ± 2,4	45,9 ± 21,3	10,3 ± 12,4
Centrifugerat	0	77 ± 7,5	85,7 ± 9,0	5,6 ± 3,6	27,1 ± 14,3	59 ± 18,1
	+ 24	72,5 ± 18,7	71,3 ± 2,34	12,25 ± 6,2	31,0 ± 22,0	49,8 ± 23,1
	+ 48	48,5 ± 14,9	61,7 ± 2,7	10,97 ± 4,9	38,31 ± 25,0	44,68 ± 23,2

5 Anm.: CASA-motilitet= hela den motila populationen enligt CASA; C-mot: cirkulär motilitet; icke-l-mot= icke-linjär motilitet; l-mot= linjär progressiv motilitet.

1) Subjektiv motilitet: centrifugerade prover hade signifikant högre motilitet än ocentrifugerade prover vid alla tidpunkter ($P < 0,001$).

2) CASA: centrifugerade prover hade högre motilitet än ocentrifugerade prover vid alla tidpunkter (0 timmar, $P < 0,05$, 24 och 48 timmar $P < 0,001$); värden för c-mot och l-mot var signifikant högre för centrifugerade prover än för ocentrifugerade prover vid alla tidpunkter, medan värden för icke-l-mot var signifikant lägre ($P < 0,05$).

Tabell 3: Effekt av lagring vid 5°C på spermieviabilitet (SYBR-14/PI-infärgning) hos icke-selekterade och SLC-selekterade spermieprover över tid (n=10).

	Icke-selekterade			SLC-selekterade		
	levande	döda	döende	levande	döda	döende
0	64,7 ± 9,3 ^{bd}	27,4 ± 9,1 ^{ad}	7,9 ± 2,6 ^b	79,5 ± 9,2 ^b	16,4 ± 8,1 ^a	4,1 ± 2,0 ^b
+24	50,3 ± 18,3 ^{cd}	40,0 ± 20,7 ^b	10,0 ± 4,7 ^b	79,1 ± 8,8 ^c	15,9 ± 6,7 ^b	5,0 ± 2,6 ^b
+48	32,8 ± 10,9 ^{cd}	56,8 ± 24,8 ^{cd}	10,5 ± 6,8 ^{ns}	75,6 ± 6,8 ^c	18,5 ± 5,6 ^c	5,9 ± 2,0 ^{ns}

a, b, c = signifikant skillnad mellan ocentrifugerade och centrifugerade prover ($P < 0,05$, $P < 0,01$ respektive $P < 0,001$). d = signifikant skillnad mellan ocentrifugerade prover vid olika tidpunkter ($P < 0,05$).

Tabell 4: Ändringar i plasmamembranstabilitet hos hingsspermier lagrade i 5°C; Annexin V/propidiumjodid-infärgning (n=10).

	AN-/PI-		AN-/PI+		AN+/PI+		AN+/PI-	
Tid	Icke-selekterade	SLC	Icke-selekterade	SLC	Icke-selekterade	SLC	Icke-selekterade	SLC
0	69,3 ± 8,2 _{ns} ^b	74,6 ± 7,6 _{ns}	23,9 ± 6,0 ^{ab}	13,4 ± 3,3 ^a	4,8 ± 3,3 ^a	9,1 ± 4,4 ^a	2,0 ± 0,4 ^{ab}	2,9 ± 0,5 ^a
+ 24	67,1 ± 12,2 _{ns}	74,1 ± 10,4 _{ns}	28,7 ± 11,9 ^a	13,1 ± 2,8 ^a	2,5 ± 1,3 ^a	7,9 ± 5,6 ^a	1,7 ± 0,9 ^a	5,0 ± 3,7 ^a
+ 48	56,6 ± 14,7 ^{ab}	74,9 ± 5,5 ^a	39,1 ± 14,7 ^{ab}	15,7 ± 4,1 ^a	3,1 ± 1,1 ^a	7,0 ± 2,9 ^a	1,3 ± 0,8 _{ns} ^b	2,4 ± 1,5 _{ns}

Anm.: AN-/PI- = levande spermier med stabila membran; AN+/PI- = spermier med instabila men intakta membran; AN-/PI+ och AN+/PI+ = spermier med skadade membran. SLC = enkelskiktscentrifugering

^a = signifikant skillnad mellan ocentrifugerade och centrifugerade prover, $p \leq 0,05$. ^b = signifikant skillnad mellan ocentrifugerade prover vid 0 och 48 timmar, $p \leq 0,05$. ns = icke signifikant.

Tabell 5: Effekt av lagring på kromatinintegritet hos icke-selekterade och selekterade spermieprover över tid under användning av spermiekromatin-strukturanalys (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA) (n=10).

	Icke-selekterade			Selekterade		
	DFI	Medel_DFI	SD-DFI	DFI	Medel_DFI	SD-DFI
0	22,1 ± 9,7 ^a	414,9 ± 34,0 ^b	23,8 ± 3,99	11,3 ± 4,9 ^a	414,9 ± 31,7 ^b	24,2 ± 3,9
+ 24	29,6 ± 10,0 ^a	413,8 ± 42 ^b	21,8 ± 3,1 ^b	14,8 ± 6,8 ^a	412,2 ± 35,2 ^b	30,5 ± 2,3 ^b
+ 48	41,1 ± 20,3 ^b	393,8 ± 45,6	21,3 ± 3,3 ^a	11,6 ± 5,3 ^b	418,6 ± 37,0	28,3 ± 3,7 ^a

^a = signifikant skillnad mellan ocentrifugerade och centrifugerade prover, $p < 0,01$. ^b = signifikant skillnad mellan ocentrifugerade och centrifugerade prover, $p < 0,001$.

I den retrospektiva jämförelsen av tvättning mot icke tvättning av spermiepelleten efter enkelskiktscentrifugering fanns ingen skillnad i genomsnittlig subjektiv motilitet hos de SLC-bearbetade spermiepreparationerna (Figur 2).

- 5 **Konklusioner:** spermiekvalitet (motilitet, viabilitet och kromatinintegritet) i de centrifugerade proverna behölls under lagring i 48 timmar, antingen vid 6°C eller rumstemperatur, medan spermiekvalitet hos de ocentrifugerade proverna försämrades. Tvättning av spermiepelleten efter enkelskiktscentrifugering är inte ett absolut krav i termer av spermiekvalitet och därför kan detta steg utelämnas för att
10 spara tid.

EXEMPEL 3: Hingst

- Mål:** att utröna effekten av osmolaritet och densitet hos kolloidformuleringar på
15 utbyte och kvalitet av hingstpermieprover och dess kvalitet, och även användningen av centrifugrör av olika material (glas vs. plast) och olika storlekar (10 vs. 50 ml) på spermieutvinningsgraden från kolloidcentrifugering (SLC).

- Metoder:** kolloidcentrifugering utfördes som beskrivits tidigare, med följande
20 modifieringar enligt de olika undersökningarna: (i) kolloider av två osmolariteter, 320 och 345 mOsm, användes för enkelskiktscentrifugering (SLC) och densitetsgradientcentrifugering av 15 hingst ejakulatalikvoter; (ii) kolloider (4 ml) av olika densiteter användes för SLC såsom följer: 40% (låg densitet), 60% (mellanstor densitet) och 80% (standarddensitet); (iii) alikvoter av 7 ejakulat bearbetades genom
25 SLC i glas och plastcentrifugrör; (iv) en jämförelse gjordes genom att använda SLC eller DGC i små rör (gradient 2+2+2,5 ml, enkelskikt 4+1,5 ml) och stora rör (gradient 4+4+3, 5+5+4,5, 9+9+6 och 9+9+7,5; enkelskikt 8+3, 8+4,5 och 12+3), vardera vid ett tillfälle. Siffrorna refererar till volym i det nedersta lagret, volym i det övre lagret (för densitetsgradients) eller för volym i enkelskikt respektive volym av
30 det utspädda ejakulatet. De parametrarna som användes för att utvärdera spermiekvalitet i alla dessa studier var subjektiv spermimotilitet, utvinningsgrad (utbyte), samt spermimorfologi och kromatinintegritet för jämförelse av olika osmolariteter, såsom beskrivits tidigare.

Resultat (i): utvinningsgraden av spermier var något lägre för de högre osmolariteterna av kolloiden jämfört med normal osmolaritet, även om dessa skillnader inte var statistiskt signifikanta (Tabell 1). Spermieöverlevnaden påverkades inte av kolloidens osmolaritet.

5

Tabell 6. Effekt av kolloidens osmolaritet på antalet rörliga spermier i pelleten efter centrifugering på en kolloid (medel $\pm$ SD). n = 20

305-320 mOsm		330-345 mOsm	
Enkelskikt	Densitetsgradient	Enkelskikt	Densitetsgradient
30,19x10 ⁶ $\pm$ 16,9	31,84 x10 ⁶ $\pm$ 19,7	25,8 x10 ⁶ $\pm$ 18,5	26,46 x10 ⁶ $\pm$ 20,0

- 10 Användning av en högre osmolaritet i kolloiden resulterade i en ökning av antalet morfologiskt normala spermier i preparationen ($P < 0,001$) (Figur 3). Dessutom observerades denna trend också för densitetsgradienter, även om skillnaden här inte var helt statistiskt signifikant ($P < 0,051$).
- 15 För enskilda morfologiska abnormaliteter var skillnaderna i förmåga att avlägsna onormala spermier emellertid inte signifikanta för kolloidformuleringar med normal och hög osmolaritet. Tvärtom ledde användningen av kolloid med hög osmolaritet inte till ökad effektiviteten vad gäller avlägsnandet av spermier med skadat kromatin (Figur 4).

20

Resultat (ii): Efter centrifugering genom ett enkelskikt med låg densitet, var spermiepreparationerna mycket lika kontrollen (ocentrifugerad sperma) i termer av antalet rörliga spermier, förekomst av cellspillror etc. Spermieöverlevnaden förlängdes emellertid med ungefär 24 timmar i de centrifugerade preparationerna (Figur 5). När spermierna bearbetades på ett enkelskikt med mellanstor densitet, innehöll preparationerna en högre andel rörliga spermier och spermier överlevde längre än kontrollerna (ocentrifugerad alikvot), även om ingendera parameter var lika bra som proverna bearbetade på det normala enkelskiktet (Figur 6).

25

Spermieantalet ökade väsentligt ($P < 0,01$) för prover beredda på 60% kolloid

jämfört med den vanliga 80% kolloiden (medel $\pm$ SD: 72,6 $\pm$ 28,9 miljoner jämfört med 28,9 $\pm$ 24,7 miljoner).

Resultat (iii): Användning av glas- i stället för plastcentrifugrör för sju ejakulat resulterade i en signifikant ökning ($P < 0,01$) av antalet spermier som framträdde i pelleten. Medelvärdena var 42,2 miljoner och 39,3 miljoner för glas- respektive plaströr.

Resultat (iv): det fanns betydande skillnader i utbyte mellan ejakulaten för en hingst, uttryckt som proportionerna i den initiala laddningen. Uppskalningen av gradienterna gav konsekvent mindre utbyten än den vanliga gradienten, men två av de större volymerna av kolloiden som användes som ett enkelskikt och en av gradienterna gav större utbyten än den vanliga storleken av enkelskikt (Figure 7). Höjning av volymerna över dessa nivåer ökade inte utbytet. Andelen rörliga spermier reducerades något i det stora röret jämfört med det lilla röret (medel 75% cf. 80%), oberoende av vilken volymkombination som användes. Spermieöverlevnadslängden påverkades inte av uppskalningen.

Konklusioner: utbytet av hingstspermier erhållet efter SLC kan höjas genom minskning av densiteten hos kolloiden som används för ett enkelskikt, även om spermiekvaliteten inte är så bra som när normaldensiteten används. Utbytet kan också höjas genom uppskalning till större centrifugrör. Genom att använda glascentrifugrör i stället för plastcentrifugrör ökar utbytet något men är kanske inte värt extrakostnaderna som inbegrips i inhandling, rengöring och sterilisering av rören. En ökning av kolloidformuleringens osmolaritet från 320 mOsm till 345 mOsm resulterar i förbättrad normal spermiemorgologi, men inte kromatinintegritet, även om spermieutbytet kan minska.

EXEMPEL 4: Hingst

Mål: att skala upp kolloidcentrifugeringstekniken för att underlätta bearbetningen av hela ejakulat på fältet.

Experiment: (i) användning av 80% kolloid i 50 ml rör och i 200 ml rör (experiment 1); (ii) undersökning av effekten av att ändra densiteten av kolloiden (60% till 80%) i 50 ml rör (experiment 2); (iii) användning av 80% kolloid i 10 ml rör men ökning av volymen av det använda utspädda ejakulatet (experiment 3) och (iv) jämförelse av 80% kolloid i 10 ml rör med 1,5 ml och 4,5 ml ejakulatet överst och 67,5% kolloid i 50 ml rör med 15-18 ml ejakulatet överst.

Experiment 1: Alikvoter från 8 ejakulat (4 hingstar, Västerbo Stuteri)

transporterades till laboratoriet och användes för SLC såsom beskrivet ovan, benämnda såsom små (1,5 ml utspätt ejakulat på 4 ml kolloid i ett 10 ml rör) och stora (7,5 ml utspätt ejakulat på 20 ml kolloid i ett 50 ml Falcon-rör). Dessa volymer av kolloiden utgör kolonner av samma höjd i de två typerna av centrifugrör. Efter centrifugering vid 300 x g i 20 minuter, resuspenderades de resulterade spermiepelletarna i färsk Kenney´s spädningsmedel i ett rent rör, under användning av 1 ml Kenney´s för den "lilla" pelleten och 5 ml Kenney´s för den "stora" pelleten. Spermiekvaliteten bedömdes i de SLC-selektade spermiepreparationerna och de icke-selektade spermiepreparationerna vad gäller subjektiv motilitet, CASA, spermieviabilitet (SYBR-14/PI-infärgning), membranintegritet (Annexin-V/PI) och spermiekromatinintegritet under användning av SCSA, som beskrivits tidigare. Antalet spermier i varje spermiepellet räknades för att beräkna utbytet. Analyserna upprepades efter 24 lagring vid 5°C i 24 och 48 timmar. Subjektiva motilitetbedömningar upprepades tills spermimotiliteten var <20%. Alikvoter från ytterligare 4 ejakulat användes för SLC som beskrivet ovan benämnda såsom små (1,5 ml utspätt ejakulat på 4 ml kolloid i ett 10 ml rör), medan 22,5 ml av samma ejakulat placerades ovanpå 60 ml kolloid i 200 ml Falcon-rör, benämnda såsom extrastora (SLC-XL). SLC-XL-spermiepelletarna resuspenderades i 10 ml Kenney´s. Både små och stora spermiepreparationer bedömdes för spermimotilitet och överlevnadslängd. Metoderna var såsom beskrivits tidigare.

Resultat:

Spermimotilitet: Total motilitet förbättrades i de SLC-selektade spermiepreparationerna jämfört med de icke-selektade, både enligt subjektiva motilitetsbedömningar och genom CASA. Enligt subjektiva motilitetbedömningar var dessa skillnader signifikanta vid alla tidpunkter ($P < 0,001$) och det fanns inga skillnader

mellan SLC-små och SLC-stora (Figur 8). Ett liknande resultat erhöles för SLC-XL och SLC-små prover (Figur 9).

CASA-resultaten visade också att skillnaderna mellan icke-selekterade och SLC-selekterade spermieprover var signifikanta vid alla tidpunkter ($P < 0,05$), även om det också fanns vissa skillnader mellan SLC-små och SLC-stora ($P < 0,05$), där de små preparationerna hade bättre motilitet än de stora (Tabell 7). För cirkulär motilitet, icke-linjär motilitet och linjär motilitet fanns det signifikanta skillnader mellan SLC-selekterade och icke-selekterade spermiepreparationer ($P < 0,05$), men inte mellan SLC-små och SLC-stora preparationer. Det var en bra korrelation mellan subjektiva och CASA-bedömningar för total motilitet ($r = 0,8$, $P < 0,001$).

Tabell 7: Motilitetsbedömningar (subjektiva och genom datorstödd motilitetsanalys, CASA) av små och stora spermiepreparationer från enkelskiktscentrifugering (Medel $\pm$ SD) för total motilitet och olika motilitetsparametrar.

Prov	Tid (tim)	Subjektiv motilitet (%)	CASA motilitet (%)	Cirkulär motilitet (%)	Icke-linjär motilitet (%)	Linjär motilitet (%)
Icke-selekterade	0	64 $\pm$ 3,9	72,11 $\pm$ 13,1 ^a	2,26 $\pm$ 0,93 ^{ab}	46,7 $\pm$ 14,4	34,8 $\pm$ 22,9
	+24	31,5 $\pm$ 15,1 ^a	33,3 $\pm$ 19,4 ^{ac}	4,77 $\pm$ 5,4 ^{ac}	59,95 $\pm$ 9,4	9,69 $\pm$ 8,6
	+48	10 $\pm$ 6,6	12,1 $\pm$ 12,2 ^c	1,97 $\pm$ 2,4	45,9 $\pm$ 21,3	10,3 $\pm$ 12,4
Selekterade "små"	0	77 $\pm$ 7,5	85,7 $\pm$ 9,0 ^a	5,6 $\pm$ 3,6 ^b	27,1 $\pm$ 14,3	59 $\pm$ 18,1
	+24	72,5 $\pm$ 18,7 ^{af}	71,3 $\pm$ 2,34 ^c	12,25 $\pm$ 6,2 ^c	31,0 $\pm$ 22,0	49,8 $\pm$ 23,1
	+48	48,5 $\pm$ 14,9	61,7 $\pm$ 2,7 ^c	10,97 $\pm$ 4,9	38,31 $\pm$ 25,0	44,68 $\pm$ 23,2
Selekterade "stora"	0	77 $\pm$ 8,6	80,22 $\pm$ 10,0 ^a	6,9 $\pm$ 3,9 ^a	29,0 $\pm$ 16,8	57,8 $\pm$ 18,7
	+24	69 $\pm$ 15,4 ^f	56,8 $\pm$ 20,7 ^a	13,1 $\pm$ 7,5	33,6 $\pm$ 19,8	46,8 $\pm$ 24,2
	+48	54,5 $\pm$ 9,8	42,3 $\pm$ 18,3 ^c	10,5 $\pm$ 5,6	39,6 $\pm$ 31,0	44,2 $\pm$ 27,6

^a = skillnad mellan icke-selekterade och SLC-selekterade, $P < 0,05$.

^f = skillnad mellan små och stora SLC-selekterade, $P < 0,05$.

Spermieviabilitet: Figur 10 visar resultaten av SYBR-14/PI-infärgning i små och stora SLC-selekterade och icke-selekterade spermiepreparationer. Andelen levande spermier var signifikant högre i de SLC-selekterade spermiepreparationerna än i de

icke-selekterade spermiepreparationerna, under det att andelen döda respektive döende spermier var signifikant mindre i de selekterade än i de icke-selekterade spermiepreparationerna. Det fanns inga skillnader i dessa andelar mellan SLC-stora och SLC-små spermiepreparationer. Med tiden minskade andelen levande spermier signifikant i de icke-selekterade spermiepreparationerna medan andelen döda spermier steg signifikant ($P < 0,05$). Däremot ändrades inte dessa andelar i de SLC-selekterade spermiepreparationerna. För SLC-XL-preparationer var det inte någon skillnad mellan medelvärdena för SLC-små och SLC-XL-spermiepreparationer för någon parameter (Tabell 8).

Tabell 8: Spermieviabilitet (%) i icke-selekterade, små och extrastora spermiepreparationer från enkelskiktscentrifugering under användning av SYBR-14/PI-infärgning (Medel $\pm$ SD) (n=4).

	Små			Extrastora		
	Levande	Döda	Döende	Levande	Döda	Döende
0 timmar	82,8 $\pm$ 4,9	14,7 $\pm$ 5,3	2,5 $\pm$ 0,3	85,4 $\pm$ 2,5	12,2 $\pm$ 1,8	2,3 $\pm$ 0,8
24 timmar	83 $\pm$ 6,2	14,2 $\pm$ 6,3	2,7 $\pm$ 0,3	86,1 $\pm$ 1,9	11,1 $\pm$ 1,7	2,9 $\pm$ 0,9
48 timmar	78,8 $\pm$ 7,9	17,7 $\pm$ 8,7	3,5 $\pm$ 1,1	80,3 $\pm$ 4,3	15,0 $\pm$ 4,1	4,6 $\pm$ 2,2

Anm.: Ingen signifikant skillnad mellan SLC-små och SLC-XL enkelskiktspreparationer. Värdena för varje parameter ändrades inte signifikant över tiden för endera SLC-små eller SLC-XL.

Spermieintegritet: resultaten av Annexin-V/PI-infärgning visas i Tabell 9 (SLC-små vs. SLC-stora) och Tabell 10 (SLC-små vs. SLC-XL). Det var ingen skillnad mellan SLC-små och SLC-stora spermiepreparationer vid någon tidpunkt: de enda skillnaderna mellan icke-selekterade och selekterade spermiepreparationer infärgade med Annexin-/PI- (intakta membran) var för SLC-små spermiepreparationer vid tiden 0 timmar ($P < 0,05$). Det var också signifikanta skillnader mellan icke-selekterade och SLC-selekterade spermiepreparationer i flera av de andra parametrarna: mellan icke-selekterade och SLC-selekterade preparationer vid tiden 0 timmar, 24 timmar och 48 timmar för Annexin-/PI+ ($P < 0,001$); mellan icke-selekterade och SLC-selekterade preparationer vid 24 och 48 timmar för Annexin+/PI+ ($P < 0,001$); mellan icke-selekterade och SLC-små

preparationer vid 0 timmar och 48 timmar, och mellan icke-selekterade och SLC-stora preparationer vid 24 timmar för spermier infärgade med Annexin+/PI- ($P < 0,001$). Det fanns inte några signifikanta skillnader mellan SLC-små och SLC-XL för någon av de uppmätta parametrarna, inte heller förändrades värdena signifikant med tiden.

Tabell 9: Spermieintegritet i icke-selekterade och små och stora spermiepreparation från enkelskiktscentrifugering under användning av Annexin-V/propidiumjodid (medel $\pm$ SD) (n=8).

Tid	Behandling	Annexin-V-/PI-	Annexin-V-/PI+	Annexin-V+/PI+	Annexin-V+/PI-
0 timmar	stora	74,2 $\pm$ 8,7	13,8 $\pm$ 6,1 ^c	8,4 $\pm$ 3,2	3,6 $\pm$ 2,0
	små	75,2 $\pm$ 6,0 ^a	12,8 $\pm$ 2,8 ^c	8,8 $\pm$ 3,4 ^c	3,2 $\pm$ 0,6
	icke-selekterade	67,4 $\pm$ 8,1 ^a	24,7 $\pm$ 6,0 ^{cd}	5,7 $\pm$ 3,5 ^c	2,3 $\pm$ 0,6
24 timmar	stora	69,1 $\pm$ 14,8	13,8 $\pm$ 3,4 ^c	11,6 $\pm$ 8,9 ^a	5,5 $\pm$ 4,1 ^b
	små	75,0 $\pm$ 9,3	12,7 $\pm$ 3,3 ^c	7,1 $\pm$ 3,6	5,3 $\pm$ 4,1 ^{ce}
	icke-selekterade	65,1 $\pm$ 13,1	30,3 $\pm$ 12,5 ^c	2,5 $\pm$ 1,3 ^a	2,1 $\pm$ 1,1 ^{b c}
48 timmar	stora	73,3 $\pm$ 6,4	15,1 $\pm$ 3,9 ^c	8,3 $\pm$ 2,7 ^a	3,4 $\pm$ 1,9 ^c
	små	76,9 $\pm$ 4,2	15,2 $\pm$ 4,4 ^c	6,1 $\pm$ 1,6	2,1 $\pm$ 1,6 ^{ce}
	icke-selekterade	51,3 $\pm$ 16,3	43,6 $\pm$ 16,1 ^{cd}	3,7 $\pm$ 1,5 ^a	1,3 $\pm$ 0,9 ^c

Anm.: inga skillnader mellan stora och små SLC-selekterade spermiepreparationer vid någon tidpunkt. ^a, ^b, ^c = skillnad mellan icke-selekterade och selekterade, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$; ^d = skillnad mellan 0 och 24 timmar, $P < 0,05$; ^e = skillnad mellan 24 och 48 timmar, $P < 0,05$

Tabell 10: Spermiemembranintegritet i icke-selekterade och små och extrastora spermiepreparationer från enkelskiktscentrifugering under användning av Annexin-V/Propidium jodid färgning (medel $\pm$ SD) (n=4).

	SLC-små				SLC-extrastora			
	Annexin-V-/PI-	Annexin-V-/PI+	Annexin-V+/PI+	Annexin-V+/PI-	Annexin-V-/PI-	Annexin-V-/PI+	Annexin-V+/PI+	Annexin-V+/PI-
0 tim	76,8 $\pm$ 4,8	11,4 $\pm$ 1,6	8,9 $\pm$ 3,9	2,8 $\pm$ 0,3	76,9 $\pm$ 7,8	13,8 $\pm$ 3,8	5,7 $\pm$ 1,9	3,7 $\pm$ 2,2
24 tim	81,9 $\pm$ 3,8	9,5 $\pm$ 2,4	5,4 $\pm$ 3,1	3,2 $\pm$ 1,7	78,7 $\pm$ 3,9	13,1 $\pm$ 4,1	4,4 $\pm$ 1,8	3,8 $\pm$ 2,5
48 tim	80,0 $\pm$ 2,3	12,9 $\pm$ 4,3	5,5 $\pm$ 1,3	1,71 $\pm$ 1,5	80,8 $\pm$ 4,8	14,0 $\pm$ 6,8	3,4 $\pm$ 1,7	1,7 $\pm$ 0,7

- 5 Anm.: Ingen signifikant skillnad mellan SLC-små och SLC-extrastora enkelskiktspreparationer. Värdena för varje parameter förändrades inte med tiden för endera små eller XL.

- 10 **Spermiekromatinintegritet (SCSA):** de SLC-selekterade spermiepreparationerna hade bättre spermiekromatinintegritet, som visas av ett lägre värde för DFI, än de icke-selekterade spermiepreparationerna (Tabell 11), för alla tidpunkter som studerades (0 timmar, $P < 0,01$; 24 timmar och 48 timmar, $P < 0,001$). Det var inte några skillnader i endera medel_DFI, eller SD_DFI mellan de icke-selekterade och selekterade spermieproverna. För XL-provet var den ingen skillnad mellan små och
- 15 stora för endera DFI eller SD_DFI (DFI små 11,2 $\pm$ 3,8, XL 9,3 $\pm$ 4,6; SD_DFI små 29,6 $\pm$ 3,2, XL 27,4 $\pm$ 6,0). Det var emellertid en signifikant skillnad mellan medel_DFI för små och extrastora (416,3 $\pm$ 42,8 respektive 258,3 $\pm$ 6,5; $P < 0,05$).

Tabell 11: Parametrar av spermiekromatinintegritetsanalys (Sperm Chromatin Structure Assay) för icke-selekterade, små SLC-selekterade och stora SLC-selekterade spermiepreparationer lagrade i 48 timmar vid 5°C (n=8).

	Icke-selekterade			Små SLC-selekterade			Stora SLC-selekterade		
	DFI	Medel_DFI	SD-DFI	DFI	Medel_DFI	SD-DFI	DFI	Medel_DFI	SD-DFI
0 tim	26,2 ± 6,5 ^a	405,4 ± 73,4	24,2 ± 4,1	14,3 ± 5,4 ^a	397,2 ± 71,1	24,3 ± 5,1	13,1 ± 6,4 ^a	400,2 ± 71,5	27 ± 4
24 tim	33 ± 6,6 ^b	415,1 ± 61,8	22,4 ± 3,8	16,0 ± 7,5 ^b	398,8 ± 67,4	28,9 ± 5,9	16 ± 7,1 ^b	393,4 ± 71,6	29 ± 4,1
48 tim	48,6 ± 20,1 ^b	404,3 ± 44,8	21,4 ± 3,3	13,8 ± 5,9 ^b	404,8 ± 69	26 ± 6,4	14,3 ± 6,6 ^b	394,1 ± 71,1	27,4 ± 4,0

5 Anm.: a, b = DFI för icke-selekterade > SLC-selekterade, P<0,01 respektive P<0,001.

Spermieutbyte: det fanns en betydande skillnad mellan det genomsnittliga utbytet för SLC-små och SLC-stora spermiepreparationer (32 ± 22,3% resp. 8,9 ± 8,9%, P<0,001). I ett annat experiment var däremot utbytena för de extrastora proverna
10 ungefär 25% högre än för de små proverna (25,5 ± 14,1% jämfört med 20,2 ± 5,9%).

Experiment 2: Alikvoter från 23 ejakulat (från 4 hingstar vid Västerbo stuteri och 10 hingstar från Flyinge AB), användes för SLC såsom beskrivet ovan, benämnda såsom små (1,5 ml utspädd ejakulat på 4 ml kolloid i ett 10 ml rör) och stora (7,5 ml
15 utspädd ejakulat på antingen 15 ml eller 20 ml kolloid av olika densiteter - 60%, 65%, 70%, 75% eller 80% - i ett 50 ml Falcon-rör). Notera att det inte var möjligt att använda alikvoter från varje ejakulat i var och en av de 10 behandlingarna i experiment 2 på grund av brist på prov. Efter centrifugering vid 300 x g i 20 minuter, togs de resulterande spermiepelletarna fram och resuspenderades i färsk
20 Kenney's spädningsmedel i ett rent rör, under användning av 1 ml Kenney's spädningsmedel för den "lilla" pelleten och 5 ml Kenney's för den "stora" pelleten. Spermiekvaliteten i de resulterande spermiepreparationerna bedömdes med avseende på subjektiv motilitet och kromatinintegritet såsom beskrivet i experiment 1, och även spermieöverlevnaden och utbytet. Dessutom utfördes objektiv
25 motilitetbedömning under användning av antingen Qualisperm™ (15) -systemet (Flyinge-ejakulat; 9) eller MTM Motion Analyzer (13) (Västerbo-ejakulat).

Resultat: Mätningar för genomsnittlig subjektiv motilitetsbedömning och Qualisperm™-motilitet för de olika kombinationerna av volym/densitet visas in Tabell 12, tillsammans med överlevnad dvs. varaktighet av motilitet. Även om det inte fanns några skillnader mellan de olika kombinationerna av volym/densitet vid subjektiv motilitetsbedömning, fanns det signifikanta skillnader mellan de små och stora spermiepreparationerna vid lägre kolloiddensiteter under användning av objektiv motilitetsbedömning med Qualisperm™. De stora spermiepreparationerna behöll inte motiliteten lika länge som de små preparationerna ($P < 0,001$).

Tabell 12: Effekten av förändrad volym och/eller densitet hos kolloiden som användes för uppskalade preparationer av hingsspermier på genomsnittlig spermimotilitet och överlevnad (n=23).

Volym/densitet	Behandling	Subjektiv motilitet (%)	Objektiv motilitet (%)*	Överlevnad (timmar)
15/60	Små	85 ± 0	76,5 ± 20,6	112 ± 27,7
	Stora	83 ± 7,6	72,1 ± 16,4	160 ± 13,9
15/65	Små	86,7 ± 2,9	87,1 ± 3,6*	136 ± 36,7
	Stora	81,7 ± 14,4	59,9 ± 5,9*	144 ± 41,6
15/70	Små	91,7 ± 2,9*	86,9 ± 2,6	120 ± 24,0
	Stora	80 ± 5,0*	82 ± 7,9	144 ± 24,0
15/75	Små	81,5 ± 5,8	86,4 ± 14,4	112 ± 27,7
	Stora	80 ± 10	91,6 ± 3,8	112 ± 13,9
15/80	Små	85 ± 5	69,7 ± 16,1	112 ± 36,7
	Stora	81,7 ± 14,4	73,3 ± 14,5	112 ± 27,7
20/60	Små	90 ± 0*	ND	96 ± 24
	Stora	80 ± 5*	ND	80 ± 36,7
20/65	Små	90 ± 0	ND	112 ± 13,9
	Stora	85 ± 5	ND	72 ± 41,6
20/70	Små	86,7 ± 5,8	ND	192 ± 98,0
	Stora	80 ± 0	ND	104 ± 50,0
20/80	Små	76,7 ± 8,2	ND	84 ± 29,4
	Stora	77,5 ± 6,89	ND	92 ± 18,1

Anm.: * Qualisperm™. 1) Motilitet: Inga skillnader mellan stora preparationer. Signifikanta skillnader mellan behandlingar för små preparationer: 15/70 vs. 15/60 $P < 0,05$; 15/70 vs. 15/80 $P < 0,05$; 15/70 vs. 20/80 $P < 0,05$; 20/60 vs. 20/80 $P < 0,05$; 20/65 vs. 20/80 $P < 0,05$.

0,05. 2) Överlevnad: Inga signifikanta skillnader mellan små preparationer; den stora preparationen 20/65 hade signifikant kortare överlevnad än den stora preparationen 15/60; inga signifikanta skillnader mellan andra stora preparationer. Notera: små, 0 timmar vs. 2 timmar, icke signifikant. Stora, 0 timmar vs. 24 timmar, icke signifikant. Små vs. stora, 0 timmar P < 0,05; 24 timmar, icke-signifikant.

DFI-resultaten (Tabell 13) indikerade återigen att det fanns skillnader mellan kontrollpreparationerna (SLC-små) och de SLC-stora preparationerna då lägre densiteter av kolloiden användes, t ex 60% och 65% (P < 0,05 vid 0 timmar) men inte då 70% eller mer användes. Dessa skillnader försvann emellertid vid 24 timmar. Det var inte någon signifikant skillnad mellan DFI för SLC-små preparationer vid 0 timmar och 24 timmar eller för SLC-stora preparationer vid 0 timmar och 24 timmar.

Tabell 13: Effekt av förändrad volym och/eller densitet hos kolloiden som användes för uppskalningspreparationer av hingstesperma på medelvärdena av DFI (%) (n=23).

Volym/densitet	Behandling	DFI (%) 0 timmar	DFI (%) 24 timmar
15/60	Små	8,6 ± 4,4	11,3 ± 6,7
	Stora	13,7 ± 7,5	10,2 ± 4,3
15/65	Små	14,92 ± 1	5,2 ± 1
	Stora	11,63 ± 1	22,4 ±
15/70	Små	12,2 ± 5,9	8,8 ± 2,6
	Stora	15,2 ± 11,5	11,5 ± 6,4
15/80	Små	12,0 ± 6	18,6 ± 9,1
	Stora	5,5 ± 1,9	5,0 ± 2,1
20/60	Små	7,5	7,0
	Stora	12,6	14,3
20/65	Små	13,7 ± 2,9	18,2 ± 3,0
	Stora	7,1 ± 2,1	8,7 ± 3,6
20/70	Små	5,5	5,0
	Stora	8	6,9
20/80	Små	14,3 ± 5,4	16,0 ± 7,5
	Stora	13,1 ± 6,4	16,0 ± 7,1

Experiment 3: "Små" spermiepreparationer bearbetades som beskrivet tidigare för experiment 1 och 2 under användning av 1,5 ml från vart och ett av 7 utspädda ejakulat. Ytterligare SLC gjordes med en ökad volym av ejakulat (4,5 ml) placerad ovanpå 4 ml kolloid i 10 ml centrifugrör, benämnda såsom "SLC-Inc" (vilket betyder ökad volym). Efter centrifugering resuspenderades varje "SLC-Inc"-spermiepellet i 3 ml färsk Kenney's spädningsmedel och alla spermiesuspensioner lagrades vid 5°C. Spermiekoncentrationen bestämdes för alla SLC-preparationer och spermieutbytet beräknades. Motiliteten hos spermiepreparationerna och det utspädda ejakulatet bedömdes dagligen under användning av CASA (13), under det att membranintegritet mättes vid 24 timmar efter SLC-beredningen (14).

Resultat: CASA-motilitetsresultaten visas in Figur 11. Det var inte någon skillnad i motilitet mellan SLC-små och för SLC-Inc-spermiepreparationer, även om det fanns signifikanta skillnader mellan icke-selekterade och båda typer av selekterade spermiepreparationer vid 24 och 48 timmar. Den icke-selekterade spermiesuspensionen hade ingen mätbar motilitet efter 48 timmar. Hastighetsdata skilde sig inte heller mellan de två typerna av SLC-selekterade spermiepreparationer (Figur 12). Även om det genomsnittliga utbytet för SLC-Inc-preparationerna var större än för SLC-små ($41,2 \pm 28,3\%$ respektive $33,3 \pm 21,3\%$), var denna skillnad inte statistiskt signifikant. Spermieviabiliteten skilde sig inte mellan de två SLC-metoderna (Små, levande: $72 \pm 0,3\%$; Inc, levande $72 \pm 0,3\%$).

Experiment 4: Som för experiment 3 men med tillägget av en andra uppskalningsmetod under användning av 15 ml kolloid (densitet 67,5%) plus 15 ml utspätt ejakulat, i ett 50 ml Falcon-rör (som benämns "stort"). Subjektiva och CASA- (13) motilitetmätningar gjordes dagligen, viabilitetsbedömningar gjordes vid 0 timmar respektive 24 timmar under det att alikvoter frystes för efterföljande SCSA vid 0, 24, 48 och 72 timmar.

Resultat: de subjektiva och CASA-motilitetsresultaten var liknande dem som erhöles i experiment 3, utan skillnad mellan några av SCL-metoderna (Figur 13). Det var en god korrelation mellan CASA- och subjektiva motilitetsresultat ($r = 0,7$ till $0,9$ för centrifugerade respektive ocentrifugerade prover; $P < 0,001$). Utbytena skilde sig inte signifikant mellan de tre SLC-behandlingarna (medel $\pm$ SD: små $33,3 \pm 20\%$;

Inc $36,3 \pm 15,8\%$; stora $40 \pm 21,7\%$). Dessutom var det inte någon skillnad i spermieviabilitet mellan några av SLC-uppskalningsmetoderna (Tabell 14).

Tabell 14: Andel viabla spermier i olika SLC-spermiepreparationer vid 0 timmar och 24 timmar, medel $\pm$ SD (n=9).

	Centrifugering Liten volym	Centrifugering Ökad volym	Centrifugering Stor volym
0 timmar	$78 \pm 11,3$	$84,9 \pm 8,9$	$81,4 \pm 11,5$
+ 24	$76,5 \pm 11,3$	$81,4 \pm 8,9$	$76,6 \pm 9,0$

Ingen signifikant skillnad mellan de tre centrifugeringsmetoderna.

Signifikanta skillnader fanns i medel-DFI mellan ocentrifugerade och centrifugerade prover, även om det fanns en interaktion med tiden, eftersom de ocentrifugerade proverna visade försämrade spermiekvalitet vid lagring medan kromatinintegriteten hos de centrifugerade proverna inte försämrades med tiden (Tabell 15).

Tabell 15: Effekten av olika uppskalningsmetoder på kromatinintegritet hos hingst spermier, medel $\pm$ SD (n=9).

	Centrifugering Liten volym	Centrifugering Ökad volym	Centrifugering Stor volym
0 tim	$20,7 \pm 10,2$	$14,2 \pm 7,7$	$13,9 \pm 6,8$
24	$19,2 \pm 11,3$	$12,9 \pm 8,0$	$19,2 \pm 10,4$
48 tim	$15,0 \pm 8,0$	$13,0 \pm 8,0$	$21,0 \pm 14,0$
72 tim	$17,0 \pm 10,0$	$18,0 \pm 11,0$	$22,0 \pm 8,0$

Konklusion: Det är möjligt att skala upp SLC genom att öka volymen av det utspädda ejakulatet som används på 4 ml kolloid. För ytterligare ökning i volym är det emellertid nödvändigt att använda ett större centrifugrör och att justera kolloiddensiteten, såsom visas i Tabell 16. Dessa justeringar ger spermiepreparationer som är ekvivalenta till de ursprungliga vad gäller spermiekvalitet och utbyte, baserat på spermimotoilitet, -viabilitet och -kromatinintegritet.

Tabell 16: Jämförelse av parametrar som ger jämförbar kvalitet i uppskalade spermiepreparationer och i originalmetoden.

	Kolloidvolym (ml)	Kolloiddensitet (%)	Volym av utspätt ejakulat (ml)
Original	4	80	1,5
Ökad volym	4	80	4,5
Stor uppskalning	15	67,5	15-18

5 EXEMPEL 5: Tjur

Mål: (i) att undersöka fertiliseringsförmågan hos tjurspermier som bereddes antingen på en densitetsgradient eller på ett enkelskikt av kolloid i IVF; (ii) att undersöka användningen av kolloid centrifugering för selektion av spermier med normal storlek från en polymorf population hos ett tjurejakulat.

Metoder: För det första experimentet gjordes strån av kryokonserverad tjursperma tillgängliga på Universitetet i Gent, Belgien, där IVF-försöket genomfördes. Före centrifugeringen tinades stråna av utspädd sperma i vatten vid 37°C under 12 sekunder och koncentrationen justerades till 100×10^6 miljoner per ml. Kolloid centrifugering utfördes som beskrivet för hingstsperma under användning av 80% kolloid E för enkelskiktscentrifugering och 2 ml 40% plus 2 ml 80% kolloid E för densitetsgradienten. Datoriserad spermimotilitetsanalys (CASA) på ocentrifugerade kontroller och på båda typerna av spermiepreparationer genomfördes av en erfaren operatör under användning av en Hamilton Thorne motilitetsanalysapparat. Data samlades in för följande parametrar: hastighet av den jämn bana, raklinjig hastighet, kroklinjig hastighet, amplitud av lateral huvudavvikelse, slagkorsfrekvens (*beat cross frequency*), rakhet (*straightness*), linjäritet, koncentration,% motilitet,% progressiv motilitet,% snabb motilitet,% mellansnabb motilitet,% långsam motilitet och% orörlig. Standardmetoder (16) användes för IVM och IVF för att bestämma fertiliseringsgrad (10). Odling av de fertiliserade oocyterna fortsatte i 8 dagar, varefter% utveckling till blastocyst och det totala antalet celler bedömdes. För det andra experimentet samlades ejakulat in från en tjur som var känd för att producera både diploida och haploida spermier. Spermerna var mycket

- polymorfa, där macrocefaliska och mikrocefaliska spermier förelåg, tillsammans med hel rad spermier som hade ungefär normal storlek. Sperman kryokonserverades på Universitetet i Helsingfors, Finland på vanligt sätt. Stråna sändes till SLU för ytterligare undersökningar. Före centrifugering tinades stråna av
- 5 utspädd sperma i vatten vid 37°C under 12 sekunder innan den späddes med buffert B. Enkelskikt med kolloid av olika densiteter inom intervallet från 40-90% av stamlösningskolloiden användes för att identifiera lämpliga densiteter för efterföljande användning i en densitetsgradient. Kolloid centrifugering genomfördes såsom beskrivet tidigare, varvid den resulterande spermiepelleten resuspenderades
- 10 i buffert B. Förinfärgade objektglas (Testsimplys; Online diagnostik, Tyskland) användes för att färga in spermerna för mikroskopisk undersökning. Andelen makrocefaliska spermier bland 200 spermier från ocentrifugerad och centrifugerad sperma registrerades.
- 15 **Resultat (första experimentet):** Medelfertiliseringsgrad, blastocystutvecklingsgrad och totalt antal celler var $56,27\% \pm 29,1$, $23,5\% \pm 17,4$ resp. $83,2 \pm 29,9$ för densitetsgradientberedda spermier och $58,1\% \pm 23,3$, $24,5\% \pm 14,3$ respektive $94,6 \pm 23,4$ för spermier beredda på ett enkelskikt av kolloid. Medelvärdena för olika parametrar av den datoriserade analysen av spermieaktivitet skilde sig inte mellan
- 20 de två spermieprepareringsmetoderna (Tabell 17).

Tabell 17: CASA-parametrar av nötkreatursspermier preparerade genom densitetsgradients och enkelskiktscentrifugering.

Parameter	Enkelskikt	Densitets-gradient	Parameter	Enkelskikt	Densitets-gradient
VAP	$112,36 \pm 9,93$	$111,1 \pm 8,87$	Konc	$37,68 \pm 17,69$	$36,96 \pm 20,3$
VSL	$95,4 \pm 8,87$	$94,92 \pm 10,58$	% mot	$75,4 \pm 10,5$	$71,4 \pm 17,09$
VCL	$171,48 \pm 10,98$	$167,44 \pm 16,18$	% prog mot	$61,4 \pm 13,3$	$54,8 \pm 16,8$
ALH	$7,08 \pm 0,57$	$6,98 \pm 0,71$	% snabb	$69,4 \pm 11,04$	$64,6 \pm 17,87$
BCF	$23,12 \pm 5,63$	$23,3 \pm 5,54$	% medelsnabb	$6,6 \pm 1,95$	$6,6 \pm 1,95$
STR	$82,2 \pm 2,28$	$83 \pm 4,04$	% långsam	$14 \pm 6,12$	$15,2 \pm 9,49$
LIN	$55,6 \pm 4,05$	$56,2 \pm 3,70$	% orörlig	$10,4 \pm 6,69$	$13,4 \pm 8,53$

- 25 Anm.: det finns inga signifikanta skillnader

ii) Resultaten av enkelskiktscentrifugeringen med de polymorfa spermier visas i Tabell 18. Nästan alla spermier hade förmåga att passera genom enkelskikt med 40% och 50% kolloid. De högsta andelarna makrocefaliska spermier fanns i pelleten efter ett 60% enkelskikt (49% makrocefaliska), vilket åter minskade till 27% makrocefaliska då kolloiddensiteten höjdes till 70%. Under användning av en densitetsgradient med skikten 70/55% identifierades två subpopulationer, en som var anrikad på spermier med normal storlek på gränsytan mellan de två skikten (8% makrocefaliska spermier och 92% normala), medan spermiepelleten var anrikad på makrocefaliska spermier (34%). Under användning av kolloiddensiteterna 55% och 70% var det möjligt att erhålla två spermiesubpopulationer, en som innehöll nästan alla spermier med normal storlek och en annan anrikad på de makrocefaliska spermier (Tabell 19). De mikrocefaliska spermier selekterades ut genom kolloiden med lägst densitet och uppträdde därför inte i någon av de selekterade subpopulationerna.

Tabell 18: Andel spermier med olika storlek före och efter enkelskiktscentrifugering av tjurspermier.

		Stor	Liten	Rest
Före		24	6	70
Efter enkelskikt 40%	Pellet	35,5	1	63,5
	Kolloid (endast litet antal)	23	4	73
Före		26	6	68
Efter enkelskikt 60%	Pellet	49	2	49
	Kolloid	14	3	82
Efter enkelskikt 70%	Pellet	27	3,5	69,5
	Kolloid	15	3,5	80

Tabell 19: Andel spermier med olika storlek före och efter densitetsgradientcentrifugering av tjurspermier.

		Stor	Rest	Liten
Före		32	65	3
Efter 70/55	Pellet	34	64,5	1,5
	70 Kolloid	17	81,5	1,5
	Gränsyta	8	92	0
	Övre del (<55%) (litet antal)	10	83,5	6,5

Konklusioner:

- 1) Spermier beredda på ett enkelskikt av kolloid har inte annat uppförande eller andra egenskaper än spermier beredda på en densitetsgradient.
- 2) Under användning av en kombination av enkelskiktscentrifugering och densitetsgradientcentrifugering var det möjligt att separera spermier i olika subpopulationer, exempelvis en som innehöll nästan alla spermier med normal storlek och en annan som var anrikad på makrocefalika spermier.

EXEMPEL 6: Galt

Mål: (i) att undersöka effekten av ökande osmolariteten hos en kolloid formulering och centrifugörstorlek på effektiviteten av galtspermieselektion under densitetsgradientcentrifugering, i syfte att utveckla kolloidformuleringar som är specifika för djurspermier; (ii) att jämföra densitetsgradientcentrifugering med centrifugering på ett enkelskikt av kolloid för beredning av galtspermier, (iii) effekten av att sterilisera genom autoklavering av kolloiden; och (iv) effekten av att tvätta spermiepelleten efter kolloidal centrifugering.

Metoder: den gelfria, spermierika fraktionen av ejakulatet samlades manuellt in från 8 galtar (*the gloved hand method*) och späddes omgående 1:1 (v/v) i Beltsville Thawing Solution. Spermiekoncentration justerades till 100×10^6 /ml. Densitetsgradient- och enkelskiktscentrifugering genomfördes enligt metoden som beskrivits tidigare, under användning av 80% kolloid A för enkelskiktscentrifugering och 2 ml 40% plus 2 ml 80% kolloid A för densitetsgradientcentrifugeringen. I ett experiment antingen tvättades (genom resuspendering av pelleten i 5 ml spermaspädningsmedel och centrifugering vid 500 g i 10 minuter) replikat av spermiepelletar eller ej. Spermie motiliteten i de icke-selekterade och selekterade spermieproverna bedömdes subjektivt som följer: alikvoter (0,5 µl) undersöktes genom faskontrastljusmikroskopi (x 200), på en uppvärmd mikroskop-platta (38°C) omedelbart efter beredning och därefter dagligen tills motiliteten hade minskat till ca 20%. För bedömningarna under de efterföljande dagarna lagrades spermiepreparationerna över natt vid rumstemperatur (19-24°C, beroende på väder) och inkuberades vid 38°C under 15-30 minuter inför motilitetsutvärderingen. Utvinningsgrad (utbyte) beräknades såsom andelen av spermier som initialt hade

laddats på kolloiden efter kolloid centrifugering och som uppträdde i spermiepelleten efter centrifugering.

Resultat: genom att öka osmolariteten av kolloiden som användes för densitetsgradientcentrifugering av galtspermier från 305 till 330 mOsm, ökade andelen rörliga spermier i den resulterande spermiepreparationen (Figurer 14 och 15).

Spermieomotiliteten bibehölls i åtminstone 24 timmar längre i de centrifugerade spermiepreparationerna än i kontroller (ocentrifugerade alikvoter), d v s 7 eller 8 dagar för spermier centrifugerade på en densitetsgradient jämfört med mindre än 6 dagar för ocentrifugerade spermier. Vid jämförelse av ett enkelskikt av kolloid och en densitetsgradient var spermieomotiliteten signifikant bättre ($P < 0,001$) i de centrifugerade spermiepreparationerna (medel $\pm$ SD: $79,6 \pm 8,1\%$ och $74,2 \pm 12,0\%$ för enkelskikt respektive densitetsgradient) än i de ocentrifugerade kontrollerna ($62,9 \pm 12,7\%$). Antalet spermier som erhöles efter centrifugering (Tabell 20) och

medelutbytet skilde sig inte mellan de två metoderna (medelutbyte av rörliga spermier, enkelskikt: $67,5 \pm 25,6\%$; densitetsgradient: $59,6\% \pm 22,3\%$).

Spermieöverlevnaden (Figur 16), ökade signifikant genom kolloidal centrifugering (ocentrifugerade preparationer: $3,1 \pm 0,3$ dagar, enkelskikt $5,5 \pm 0,79$ dagar, densitetsgradient $5,75 \pm 0,62$ dagar; $P < 0,001$ för ocentrifugerade vs.

centrifugerade; enkelskikt vs. densitetsgradient, icke signifikant). Inkubering före motilitetutvärdering var nödvändig för lagrade spermaprover (Figur 17).

Förekomsten av bakterier i de ocentrifugerade spermaproverna kan ha bidragit till frånfället av spermier. Kolloidal centrifugering verkade avlägsna bakterierna (subjektiv visuell bedömning). Autoklivering av den kolloida formuleringen hade

ingen effekt på spermieantalet, spermieomotiliteten eller spermieöverlevnaden (Tabell 21). Vidare hade tvättning eller ej av spermiepelleten erhållen efter kolloidal

centrifugering inte någon effekt på spermieantalet, spermieomotiliteten eller spermieöverlevnaden (Tabell 22). Galtspermierna kunde lagras i 24 timmar före centrifugering utan att detta hade någon skadlig effekt på spermieomotiliteten och

motilitetsvaraktigheten i de centrifugerade proverna (Figur 18).

Tabell 20: Antalet galt spermier erhållna efter densitetsgradient- och enkelskiktscentrifugering, medel $\pm$ SD (miljoner) (n=20)

Galt	Enkelskikt	Densitetsgradient	P-värde
87	107,17 $\pm$ 20,3	84,5 $\pm$ 20,0	icke signifikant (ns)
1500	49,5 $\pm$ 28,7	45,2 $\pm$ 15,8	icke signifikant
62	88,7 $\pm$ 31,8	90,7 $\pm$ 25,4	icke signifikant
367	93,2 $\pm$ 25,5	90,8 $\pm$ 32,7	icke signifikant

Anm.: Signifikanta skillnader mellan galtar (P < 0,01) men inte mellan ejakulat.

5

Tabell 21: Effekten av autoklivering av kolloiden på spermimotoilitet, spermieöverlevnad och spermieantal i pelleten.

Parameter	Autoklaverad	Icke-autoklaverad
Spermimotoilitet Dag 1 (%)	78,6 $\pm$ 8,7	81,4 $\pm$ 6,4
Spermieöverlevnad (dagar)	4,7 $\pm$ 1,2	4,5 $\pm$ 1,3
Spermieantal ($\times 10^6$)	88,5 $\pm$ 30,1	77,5 $\pm$ 30,2

Anm.: skillnaderna mellan autoklaverade och icke-autoklaverade kolloider var inte signifikanta.

10

Tabell 22: Effekten av tvättning av spermiepelleten på spermimotoilitet, spermieöverlevnad och spermieantal efter kolloid centrifugering.

Parameter	Tvättad	Ej tvättad
Spermimotoilitet Dag 1 (%)	80,7 $\pm$ 10,3	75,4 $\pm$ 9,9
Spermieöverlevnad (dagar)	6,1 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 1,1
Spermieantal ($\times 10^6$)	82,5 $\pm$ 32,5	73,8 $\pm$ 24,1

Anm.: skillnaderna mellan tvättade och ej tvättade kolloider var inte signifikanta.

15

Konklusion: genom att öka osmolariteten av den kolloida formuleringen ökar selektionen av spermier under densitetsgradientcentrifugering. Centrifugering på ett enkelskikt av kolloiden ger spermiepreparationer som har liknande motilitet och utbyte som dem från densitetsgradienterna och dessa preparationer uppvisar

20

förbättrad spermimotoilitet och överlevnadsvaraktighet jämfört med kontrollspermaproverna (ocentrifugerade).

EXEMPEL 7: Hund

5

Mål: att undersöka om enkelskiktscentrifugering (SLC) är gynnsam för att selektera hundspermier av god kvalitet för insemination.

- Metoder:** ejakulat med varierande spermiekvalitet från fyra hundar samlades in genom digital manipulation. Alikvoter (4.5 ml) placerades på 4 ml 80% kolloid E i ett 12 ml centrifugrör. Efter centrifugering vid 300 g i 20 minuter resuspenderades den resulterande spermiepelleten i äggula-Tris-spädningsmedel (1 ml) (17). En alikvot av det icke-selekterade ejakulatet späddes i äggula-Tris-spädningsmedel till samma spermiekoncentration som den selekterade spermiepreparationen.
- 15 Motilitetsbedömning under användning av datorstödd spermieanalys (CASA) och morfologisk utvärdering utfördes på alla icke-selekterade och selekterade spermieprover.

- Resultat:** genomsnittet av spermimotoiliteten ökade från $77,2 \pm 19,6\%$ före SLC till $87,6 \pm 2,7\%$ efter SLC, medan genomsnittet av den progressiva motiliteten ökade från $48,6 \pm 18\%$ till $67,9 \pm 11\%$ (Tabell 23). Genomsnittet av normal morfologi var $62,2 \pm 42,8\%$ i icke-selekterade prover och $82,5 \pm 19,1\%$ i SLC-selekterade prover. Efter lagring i 7 dagar vid 4°C var spermimotoiliteten $< 5\%$ i icke-selekterade spermaprover och $57 \pm 11,3\%$ i de SLC-selekterade spermiepreparatione.
- 25 Spermieutbytet varierade från 12 till 47% beroende på spermiekvaliteten i det ursprungliga ejakulatet.

Tabell 23: Motilitetsresultat genom datorstödd spermieanalys (CASA) för icke-selekterade och SLC-selekterade hundspemaprover.

Hund	Total motilitet (%)		Progressiv motilitet (%)		Utbyte (%)
	icke-selekterade	selekterade	icke-selekterade	selekterade	
1	48,3	84,1	34,3	81,8	12
2	82,3	90	69	68,5	47
3	87,9	89,5	32,5	54,5	47,5
4	90,4	86,9	58,7	67,5	30
Medel (SD)	77,2 (19,6)	87,6 (2,7)	48,6 (18)	67,9 (11)	34,1 (16,9)

- 5 **Konklusion:** Dessa preliminära resultat indikerar att SLC kan vara en användbar metod för att förbättra hundspemiekvaliteten i spermadoser avsedda för AI.

Referenser

- 1) Colenbrander, B., Gadella, B.M. and Stout, T.A.E (2003) The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod Dom Anim* 38: 305-311.
- 2) Malmgren, L. (1998) Effectiveness of two systems for transporting equine semen. *Theriogenology* 50: 833-839.
- 3) World Health Organisation. (1999) WHO laboratory manual for the analysis of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth ed. United Kingdom, Cambridge University Press.
- 4) Samardzija M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina J., Grizelj, J., Karadjole, T. (2006) A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci* 3-4: 237-247.
- 5) Macpherson, M., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, S.P., Thompson, J.A. & Varner, D.D. (2002) Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology* 58: 317-320.
- 6) Morrell, J.M. (2006) Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Dom Anim* 40: 1-5.
- 7) Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW (1975) Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proc Am Assoc Equine Practice* 21: 327-336.
- 8) Williams W & Utica N (1920) Technique of collecting semen for laboratory examination with review of several diseased bulls. *Cornell Vet* 10: 87-94.
- 9) Skiktlöf, N. (1934) Morphological studies on the change in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 19: 254-267.
- 10) Evenson DP, Darzynkiewicz Z & Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210: 1131-1133
- 11) Januskauskas A, Johannisson A & Rodriguez-Martinez H (2001) Assessment of sperm quality through fluorimetry and sperm chromatin structure assay in relation to fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI-bulls. *Theriogenology* 55: 947-961.

- 12) Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H (2003) Subtle
membrane changes in cryopreserved bull semen in relation to sperm
viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology* 60:743-758.
- 13) Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M & S
5 Einarsson (2003) Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and
Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 76: 205-
216.)
- 14) Saravia F, Hernández M, Wallgren MK, Johannisson A & H Rodríguez-Martínez
(2007) Cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation
10 of boar spermier. *Int J Androl* 30: 485-499.
- 15) Tejerina F, Buranamanuay K, Saravia F, Wallgren M & H Rodriguez-Martinez
(2008) Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermier using
computerized instruments. *Theriogenology* 69:1129-1138.
- 16) Tanghe, S., Van Soom, A., Sterckx, V, Maes, D & de Kruif, A. (2002) Assessment
15 of different sperm quality parameters to predict in vitro-fertility of bulls.
Reprod Domest Anim 37: 127-132.
- 17) Ponglowhapen S, Essen-Gustavsson B & Linde Forsberg C (2004) Influence of
glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled
canine semen. *Theriogenology* 62: 1498-1517.