



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for Produksjonsdyrmedisin
Produksjonsdyrklubben

Fordypningsoppgave 2015

Fordypning produksjonsdyrmedisin og mattrygghet

Betydningen av spermienes DNA-fragmentering på embryoutvikling hos storfe.

The significance of sperm DNA fragmentation for bovine embryo development.

Ida Haalien, Alexandra Elisabeth Ubøe
Kull 2015

Veiledere: Anette Krogenæs og Amin Sayyari

Innholdsfortegnelse

FORORD	- 4 -
SAMMENDRAG	- 4 -
FORKORTELSER OG DEFINISJONER	- 5 -
INNLEDNING	- 7 -
<i>FORMÅL</i>	- 9 -
<i>MATERIALE OG METODER</i>	- 9 -
KAPITTEL 1: Faktorer som påvirker feltbruktbarheten	- 11 -
<i>FRUKTBARHET HOS KUA</i>	- 12 -
<i>RUTINER RUNDT SÆDUTTAK</i>	- 14 -
<i>RUTINER RUNDT INSEMINASJON</i>	- 15 -
<i>REDX™ og SPERMVITAL</i>	- 16 -
<i>SÆDKVALITET</i>	- 17 -
KAPITTEL 2: Spermatogenesisen, implantasjon og tidlig embryoutvikling	- 18 -
<i>KORT OM ANDROLOGI HOS OKSEN</i>	- 18 -
<i>SPERMATOGENESE OG HORMONELL REGULERING</i>	- 18 -
<i>SERTOLI- OG LEYDIGCELLER</i>	- 20 -
<i>MODNING OG DEN NORMALE SÆDCELLEN</i>	- 21 -
<i>DEFEKTER I SÆDENS MORFOLOGI</i>	- 25 -
<i>SÆDPLASMA</i>	- 27 -
<i>SPERMIEKVALITET, IMPLANTASJON OG TIDLIG EMBRYOUTVIKLING</i>	- 28 -
KAPITTEL 3: DNA-fragmentering	- 30 -
<i>DFI SOM BIOMARKØR</i>	- 31 -
<i>SAMMENHENG MELLOM DFI OG FUNKSJONELLE SÆDPARAMETERE</i>	- 34 -
<i>DNA-FRAGMENTERING OG EMBRYOUTVIKLING</i>	- 35 -
<i>ROS-SKADER OG EMBRYOUTVIKLING</i>	- 37 -
KAPITTEL 4: Analysemetoder brukt på seminastasjonen	- 39 -
<i>ENKLE OG SUBJEKTIVE ANALYSEMETODER</i>	- 39 -
<i>ENKEL SPERMATOLOGISK UNDERSØKELSE: DIREKTEMIKROSKOPI OG FOTOMETER</i>	- 41 -
<i>FEILKILDER VED ENKEL SPERMATOLOGISK UNDERSØKELSE SOM KAN HA BETYDNING FOR FELTBruktbarhet</i>	- 43 -
KAPITTEL 5: Avanserte analysemetoder	- 45 -
<i>CASA</i>	- 45 -
<i>FLOW CYTOMETRI</i>	- 46 -
<i>FLOW CYTOMETRI: SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA)</i>	- 47 -

<i>DNA-FRAGMENTERINGSTESTER: TUNEL, COMET, SCD</i>	- 48 -
KAPITTEL 6: Diskusjon	- 50 -
<i>PRAKTISK BRUK AV DFII AVLSARBEIDET</i>	- 50 -
<i>RELEVANS AV HUMANFORSKNING FOR FORHOLD HOS STORFE</i>	- 52 -
<i>KOST/ NYTTE</i>	- 52 -
KONKLUSJON	- 54 -
TAKK TIL BIDRAGSYTERE	- 55 -
BIBLIOGRAFI	- 56 -

FORORD

Vår opprinnelige plan var å skrive om spermatologiske sesongvariasjoner hos vær. Vi gjorde flere uttak og analyserte sæden, men på grunn av Covid-19 situasjonen måtte vi begynne på ny oppgave. Valget falt på sædkvalitet hos okse da dette lot seg gjennomføre som litteraturoppgave. Som sisteårsstudenter på veterinærstudiet med erfaring som inseminører, er praktisk avlsarbeid av stor interesse for begge forfattere. Vi syns det ville være interessant å lære mer om analysemetodene brukt på avlsstasjon. Utover i litteratursøkene og etter forslag fra veiledere, ble fokuset på DNA-fragmentering og embryoutvikling hos storfe. DNA-fragmenteringsindeksen (DFI) er en målbar parameter som per i dag ikke brukes når Geno skal kvalitetssikre sæden. Derfor syns vi det var spennende å lese mer om avanserte analysemetoder og se hvilke muligheter det er for å gjøre en enda grundigere analyse av spermene som brukes til kunstig inseminasjon.

SAMMENDRAG

Tittel: Betydningen av spermienes DNA- fragmentering på embryoutvikling hos storfe.

Forfattere: Ida Haalien, Alexandra Elisabeth Ubøe

Veiledere: Anette Krogenæs og Amin Sayyari, Institutt for produksjonsdyrmedisin NMBU
Veterinærhøgskolen

Formålet med oppgaven har vært å undersøke ulike sædparametere og deres betydning for feltfruktbarheten hos storfe. Gjennom litteraturstudier har vi lagt vekt på publiserte data om DNA-fragmentering og embryoutvikling. Ved å se på publiserte forsøk og ulike analysemetoder som brukes for å kvantifisere DNA-fragmenteringsindeksen (DFI) har vi prøvd å vurdere om DFI kunne vært en nyttig tilleggsmarkør på seminastasjonen.

FORKORTELSER OG DEFINISJONER

AI: Artificial insemination. Kunstig inseminasjon.

ART: Assisted Reproductive Technologies: Assistert befruktning.

BBSE: Bull breeding soundness exam

CASA: Computer-assisted sperm analysis: Et databasert system som brukes for å analysere spermier, konsentrasjon, morfologi og progressiv motilitet.

COMET: single cell gel electrophoresis assay. Kvantifiserer fragmenterte DNA-tråder ved hjelp av en gel elektroforese. Her viser resultatene at ødelagte DNA-tråder beveger seg raskere på grunn av den mindre størrelsen enn ikke-fragmentert DNA

DFI: DNA-fragmenterings indeks. Ved å bruke analysemetoden SCSA får vi oppgitt en kvantitativ verdi av mengden fragmenterte DNA-tråder.

DNA-fragmentering: Dette er brudd på DNA tråder. Avhengig av hvilke gener som er affisert kan evnen til utvikling av et embryo være nedsatt.

Flow cytometri: også kalt væskestrømscytometer.. Analysen går ut på at celler beveger seg i en væskestrøm, der hver enkelt celle blir belyst med en laser. Resultatene viser i hvor stor grad cellene bøyes av lyset i en bestemt bølgelengde. Man kan tilsette fluorescens farge og måle forskjellige markører samtidig. Metode brukt for sædkvalitetsanalyse.

HDS: highly DNA stain-able cells (DNA fargeopptak).

ICSI: Intra-cytoplasmic sperm injection

IO%: Ikke-omløpsprosent. Den prosentandelen av inseminerte kyr som ikke er registrert med ny inseminasjon (omløp) etter en definert periode. Ved utregninger av avlsverdier for fruktbarhet brukes I.O.% etter 56 dager og det er det vi har valgt i vår oppgave.

IVF: *In vitro* fertilisation

ROS: Reactive Oxygen Stress: frie radikaler kan redusere fertiliteten.

SCD: Sperm chromatin dispersion test. Måler DNA fragmenterings indeksen indirekte ved å se på kjernenes spredning etter denaturering

SCSA: Sperm chromatin structure assay. Flow cytometri test som måler hvor lett DNA-et fragmenteres, etterfulgt av farging med acridin orange som fester seg til områder der DNA-et er ødelagt.

SDF: sperm DNA fragmentering.

TUNEL test: terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling. Måler nivået av DNA fragmentering indirekte ved å se på antall apoptotiske celler etter denaturering.

INNLEDNING

Forskning har vist at det er en sammenheng mellom målbare egenskaper hos spermene og fertiliseringsrate, embryoutvikling og drektighetsresultater. I denne litteraturstudien har vi sett på avvik i spermiekvaliteten, hovedsakelig i form av DNA-fragmentering, og koblingen til nedgang i implantasjonsrate og embryokvalitet (1,2,3).

Det er mange faktorer som kan påvirke feltfruktbarhet. Det har tradisjonelt vært et fokus på reproduksjonsproblemer hos kyrne dersom omløpsprosenten er for høy. I Norge måles dette ved hjelp av ikke-omløpsprosenten (IO%), det vil si at kua er blitt inseminert på nytt etter 56 dager. Andre faktorer som sædkvalitet, riktig inseminasjonstidspunkt, forhold i endometriet og genetik er også viktig for å få en vellykket implantasjon. I tillegg kan menneskelige feil påvirke feltfruktbarheten dersom man for eksempel ikke klarer å opprettholde celleviabilitet gjennom alle steg av sædproduksjonen og selve insemineringen. Vi har med denne oppgaven sett på i hvilken grad paternal genomisk integritet, målt ved hjelp av DNA-fragmenteringsindeksen (DFI), er rapportert å affisere drektighetsresultatet.

Spermatogenesisen hos hanndyret innebærer et stort antall replikasjoner i forhold til utviklingen av oocytten og er derfor mer utsatt for DNA skader. For at intakte spermier skal kunne fertilisere egget kreves riktig genekspresjon og beskyttelse av cellene fra agens som kan gi DNA fragmentering og dermed affisere feltfruktbarheten (4). DFI er en målbar parameter som per i dag ikke brukes når Geno skal kvalitetssikre sæden. Allikevel har flere forsøk vist at det er en sammenheng mellom en høy DFI og dårlig embryokvalitet (2, 3), noe som blir utdypet i de senere kapitlene.

Geno bruker i dag kun enkle spermatologiske undersøkelser; direkte mikroskopi og fotometer for å kvalitetssikre standard sæddoser. Sædparametere som undersøkes er volum,

konsentrasjon, morfologi, motilitet og progressiv motilitet (5). I følge produksjonsleder på Genos avlsstasjon Store Ree, Simon Reisvaag, planlegger de å snart gå over til å bruke computer-assisted sperm analysis (CASA) som også baserer seg på enkel spermatologisk analyse, men gir en mer objektiv vurdering av standard sædparametere (6, 7). En tilleggsmodule sperm class analyser (SCA) i dette programmet kan gi noe mer informasjon om faktorer som vitalitet og akrosomreaksjon, men med en noe varierende grad av sikkerhet (8).

Flow cytometriske analysemetoder gir mer informasjon om paternalt DNA og andre funksjoner som må være intakte for at eggcellen skal klare å produsere et embryo av god kvalitet (9). Det å se på fordelene og ulempene ved å investere i mer avanserte analysemetodene som brukes i forskning, samt å sammenligne funn av DNA-fragmentering med makro- og mikroskopiske avvik i sædkvalitet kan være nyttig med tanke på å stadig forbedre sæden som brukes til kunstig inseminering.

Nedsatt genomisk integritet i form av enkelt- eller dobbeltrådig brudd kan skje under spermatogenesen eller i modnings- og lagringsprosessen, men også i senere tid forårsaket for eksempel av oksidativ skade (ROS) (10). Spermier er spesielt utsatt for ROS-skade fordi plasmamembranen inneholder umettede fettsyrer som gjør de mottagelige for oksidativ skade (11).

Effekten av spermienes DNA-fragmentering på fertiliseringsrate og embryoutvikling har blitt undersøkt i mange humane forsøk (12), men også i direkte undersøkelse av Norsk rødt fe (NRF) (13). Et økt antall studier indikerer at DFI kunne vært en god tilleggsmarkør for sædkvalitet (12, 14).

FORMÅL

Denne fordypningsoppgaven har gjennom litteratursøk fokusert på sammenhengen mellom DNA- fragmentering og embryoutvikling hos storfe. Per i dag brukes kun enkle spermatologiske analyser ved avlsstasjoner. Oppgaven har derfor sett nærmere på analysemetoder som kvantifiserer funksjonsparametere, med fokus på DFI og om dette kunne vært en aktuell biomarkør for å gi en mer nøyaktig vurdering av kvaliteten til sæden som brukes til kunstig inseminering.

MATERIALE OG METODER

Oppgaven bruker eksisterende litteratur som grunnlag for sine problemstillinger og konklusjoner. I tillegg til forskningsartikler om norsk og utenlandsk avlsforskning, er det også brukt lærebøker, forskning fra ulike bedrifter, forskning om generell reproduksjon, samt kommunikasjon med ansatte i Geno.

Vi har sett på nyere forskning som inkluderer avanserte analysemetoder, men også lest eldre publikasjoner og bøker som omhandler grunnleggende andrologi.

Der det har vært mulig, har vi også prøvd å inkludere søkekriteriene «Geno», «Norsk Rødt Fe», og «ikke-omløpsprosent,» men det har ikke vært et eksklusjonskriterium når aktuelle forsøk ikke har dreid seg spesifikt om norske forhold.

Vi har hatt spesiell interesse av artikler som har inkludert søkeordene «sædkvalitet», «DNA-fragmentering», «ROS-skader», og «embryoutvikling», samt de relatert til «bovin reproduksjon» og «fruktbarhet storfe.»

Databasene som er brukt er PubMed, Google Scholar, Brage NMBU og Oria. I tillegg har vi brukt nettsidene til Geno og SpermVital. Produksjonsleder på Genos avlstasjon Store Ree, Simon Reisvaag, har bistått med informasjon rundt Genos rutiner og kriterier som omtales i Kapittel 4.

KAPITTEL 1: Faktorer som påvirker feltbruktbarheten

Hovedfokuset til oppgaven er å se på målbare sædparametere og deres kobling til embryoutvikling. Før man kommer dit er det en rekke kjente faktorer som spiller inn og påvirker feltfruktbarheten. En vellykket inseminasjon, fertilisasjon, embryoutvikling og implantasjon er fintfølede prosesser som påvirkes av både menneskelige feil og hormonell regulering hos kua.

I Norge bruker ofte produsenter og veterinærer ikke-omløpsprosent (IO%) som et mål på fruktbarheten hos kua, dvs. prosentandelen av kyr i en besetning der det ikke er registrert ny inseminering etter 56 dager. Dette er et praktisk og sammenlignbart mål til bruk i kukontrollen. Svakheten ved tallet er at det ikke sier noe direkte om årsak til at kua ikke er blitt inseminert igjen. Det tar heller ikke i betraktning aborter, dødfødsler eller andre avvik i drektighetens forløp.

Fruktbarhetsundersøkelser fra andre land kan i noen tilfeller bruke enten født eller avvent kalv som mål på fertiliteten (15). Svakheten her er at andre faktorer som akutt sykdom hos kua, miljø, fôr, uhell og lignende i stor grad påvirker tallet. Denne oppgaven bruker forskning som benytter seg av begge målemetodene, men fokuserer her på IO% som i norsk kontekst er hyppigere brukt og mer relevant.

FRUKTBARHET HOS KUA

Forhold hos kua som stille brunst, brunstmangel eller cyster på eggstokkene er relativt vanlige reproduksjonssykdommer som gjør det vanskelig å enten detektere brunst hos kua eller å oppnå vellykket fertilisering.

En optimal ikke-omløpsprosent forutsetter visse faktorer hos kua, deriblant en regelmessig og synlig brunst. Kua er polyøstral med regelmessige sykluser på 18-24 dager gjennom hele året. Brunstadferd forekommer etter en topp i plasmaøstrogener og selve ovulasjonen forekommer spontant omtrent 12 timer etter brunstens slutt (16).

Alle mekanismene er avhengig av en fungerende hypothalamus-hypofyse-gonade-akse (HPG-akse) med tilstrekkelig produksjon og signalisering av gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH), follikkelstimulerende hormon/luteiniserende hormon (FSH/LH) og regulering av østrogener, prostaglandin og progesteron (16).

Det kan brukes ulike målemetoder for å detektere brunst, for eksempel aktivitetsmålere, endring i atferd, eller progesteronnivå i melk (17). Uansett metode er det viktig at signalene er tydelige slik at bonden eller systemet klarer å fange opp brunstrelaterte endringer. I miljøer med for eksempel forstyrrende stressfaktorer eller dårlig fôring kan det være vanskelig for bonden å se brunstadferd. Det er viktig at forholdene rundt kua legges til rette for å optimalisere brunstdeteksjon og insemineringstidspunkt.

Under brunsten er cervix åpen slik at intrauterin inseminasjon er mulig, og økende tonus og kontraktilitet i uterusmuskulaturen bidrar til transport og lagring av sæd. Det forekommer

også en reduksjon i endometriødem som opprettholdes inn i tidlig drektighet. Dette kreves for å tilrettelegge for begynnende embryoutvikling (18).

Dersom egget blir fertilisert tar det omtrent fire dager før det kommer ned gjennom egglederen og ut i uterus. Her begynner delingen til morula og deretter blastocyst. Frem til omtrent dag ti er embryoet fortsatt omgitt av det beskyttende laget zona pellucida og er dermed ikke avhengig av forhold i uterus. Implantasjon skjer ved at trofoblastceller i zona pellucida skiller ut enzymer slik at blastocysten og celler fra uterusveggen tilsammen danner placenta.

Trofoblast- og endometrieceller sekreterer større mengder Interferon Tau (IFNT) innen dag 16 for å hemme Prostaglandin F₂alpha (PGF_{2a}) og dermed tilbakedannelse av corpus luteum slik at drektigheten opprettholdes. Corpus luteum produserer progesteron som er nødvendig for å opprettholde drektigheten. Økte mengder progesteron er sterkt assosiert med tidlig embryoutvikling, økt utskillelse av IFNT og høyere drektighetsresultater, mens det er påvist reduksjon i alle disse faktorene ved lavere progesteronnivåer. Det vil si at forhold i uterus er avgjørende for en vellykket implantasjon (19, 20).

Selv om avvik ved embryoutviklingen tradisjonelt har blitt sett på som reproduksjonsproblemer hos kua, viser flere forskningsartikler at visse sædparametere, som DNA-fragmentering, også har en direkte sammenheng med vellykket tidlig embryoutvikling. Dette blir vektlagt utover i oppgaven (21).

RUTINER RUNDT SÆDUTTAK

For at spermier skal kunne fertilisere oocytten må de være levende. Dermed er rutinene og teknikkene som brukes fra uttak av sæden og frem til inseminering viktige for å opprettholde sædcelleviabilitet. Siden det er så mange trinn involvert i dette tidsspennet, er det heller ikke uvanlig at det her skjer avvik og menneskelige feil kan dermed påvirke feltbruktbarheten.

Hos Geno tas sæduttakene ved bruk av fantom. Prøven settes til varming, motilitet evalueres og sædvolumet kontrolleres ved hjelp av et fotometer før fortynning. Deretter kjøles det ned, fortynnes en gang til og må stå noen timer før det kan fryses ned til -150°C . Sæden må oppbevares på flytende nitrogen ved -196°C frem til den skal brukes. Det er viktig at sæden holder en temperatur mellom $35-37^{\circ}\text{C}$ før den fortynnes og fryses. Dersom det skjer noen forsinkelse mellom ejakuleringen og overføringen til varmeblokk, vil cellene begynne å dø i løpet av kort tid. Et opphold på et visst antall timer mellom andre fortynning og kjøling ned til -150°C er også nødvendig for å gi økt beskyttelse ved frysing.

Ifølge Simon Reisvaag, driftsleder ved Genos Store Ree avlsstasjon, tillates allerede en nedgang i spermimotilitet fra 70% til minimum 50% etter frysing. Dersom sæden blir utsatt for skade utover dette vil det begynne å påvirke sædkvaliteten betydelig. Her er det også viktig at fortynningsvæsken inneholder riktig balanse med næringsstoffer, buffer, osmotisk trykk, bakteriostatisk virkning og faktorer for beskyttelse mot kuldesjokk og kryokonservering. Her er det allerede risiko for produksjons- og titreringsfeil som kan føre til at sæddosene mister sin befruktningsevne (22). I tillegg er det viktig at alt utstyr som brukes har riktig temperatur, er rent og at det ikke sitter igjen rester av vann eller vaskemidler da disse vil ha spermicid effekt.

RUTINER RUNDT INSEMINASJON

For å opprettholde sæddosens befruktningsevne er det viktig med gode rutiner hos inseminør og veterinær. Selve sæddunken må fylles jevnlig med flytende nitrogen for å opprettholde den optimale temperaturen på -196°C . Man vet at temperaturen i dunken øker betydelig for hver gang den åpnes og sylindere løftes opp. Det anbefales derfor at man ved uttak av det aktuelle sædstrået, ikke løfter sylindere mer enn nødvendig, og i så få sekunder som mulig (max 10 sekunder). Dette er et viktig punkt som vil kunne redusere sædkvaliteten dersom anbefalingen ikke følges. Overføringen av sædstrået til kroppstemperert vann (37°C) bør skje så fort som mulig. Rester av nitrogen må ristes av strået, da det kan risikere å sprekke i det varme vannet dersom det sitter igjen dråper.

Etter opptining i termosene løftes strået opp med en pinsett, vannet tørkes av og strået plasseres i inseminatoren. Både riktig temperatur og god hygiene må opprettholdes frem til inseminatoren er på plass og sæden kan deponeres intrauterint.

I Norge er ikke temperaturen i fjøset optimal for å opprettholde viabiliteten til spermiecellene. Tiden fra strået tas opp av vannet til det er plassert i kua kan derfor være en kilde for celledød. Siden det er mange celler per strå og det finnes ulike enkle metoder for å holde temperaturen høyere enn romtemperatur frem til inseminering, er det kanskje ikke utslagsgivende for drektigheten. Likevel bør det vektlegges som et kontrollpunkt dersom fruktbarhetsproblemer kan knyttes til en bestemt inseminør.

For å unngå spermicide stoffer som forurensning fra fjøs, fett fra fingre, vann og vaskemidler, er det viktig at strået håndteres lite og så skånsomt som mulig. Generelt skal vask av utstyr foregå på en hensiktsmessig og grundig måte.

Ved kunstig inseminering (AI) vil den fysiske fremdriften som kommer av naturlig bedekning og den beskyttende effekten av sædplasma være redusert. Det er derfor viktig at sæden deponeres intrauterint. Dersom den allerede fortynnede sæddosen legges i vagina eller i livmorhalsen, er det mindre sannsynlig at en befruktningsdyktig sædcelle når eggcellen.

REDX™ og SPERMVITAL

I tillegg til vanlige sæddoser finnes spesialiserte typer strå som inneholder for eksempel kjønnsseparert sæd (som REDX™ fra Geno) eller sæd med lengre levetid (SpermVital).

Ved bruk av kjønnsseparert sæd er levetiden til cellene mye kortere og stråene inneholder færre sædceller. Derfor er tidspunkt for inseminering enda viktigere for å få en vellykket drektighet. Et forsøk utført på melkekyr i Irland viste også en større usikkerhet i drektighetsresultater ved bruk av ulike typer kjønnsseparert sæd i motsetning til vanlig sæd, og i alle tilfeller en lavere fruktbarhet (23). Forsøk utført på NRF av Geno med sitt eget produkt REDX™ viste tilsvarende resultater, der bruk av REDX™ ga en fertiliseringsrate på 90%. Rapportering i en periode mellom 2018 og 2019 på kviger viste ikke-omløpsprosent på 73,5% ved bruk av konvensjonell sæd, men 53,8% ved bruk av REDX™ (24).

SpermVital derimot er en type sæd der spermene har økt levetid nettopp for å redusere betydningen av tidspunkt for inseminering. For å gi lengre levetid immobiliseres sæden i en kalsium- og alginatkapsel umiddelbart før nedkjøling, noe som resulterer i større mengde preservert energi hos cellene samt et mer gradvis utslipp av spermier (17). Dette kan være et nyttig produkt tilfeller med stille eller svak brunst, brunstsynkronisering eller av økonomiske hensyn slik at bonden kan redusere antall besøk fra veterinær/inseminør. Internasjonale forsøk utført av produsenten selv (25, 26), også på NRF-kyr i Norge (17), viser at

drektighetsresultatene er minst like gode eller bedre ved bruk av dette produktet, selv ved et redusert antall celler i strået. Dette er forsøk utført av produsenten selv og vi har ikke funnet tilsvarende resultater i uavhengige forsøk. Uavhengig av hvilken type sæddose som brukes er det like viktig med gode inseminasjonsrutiner for å oppnå gode drektighetsresultatene.

SÆDKVALITET

De forutgående kapitlene har vist at fertilisering er en lang og dynamisk prosess og at mange faktorer kan påvirke drektighetsresultatet. Selv om dette demonstrerer at man ikke kan legge all vekt eller ressurser på ett enkelt trinn, så er det hensiktsmessig å ha god oversikt over de faktorer som faktisk kan kontrolleres. Dermed bør også sædkvalitet og gode analysemetoder for sæd være sentrale i arbeidet mot høyere fruktbarhet blant NRF kyr.

Det er også verdt å vurdere om ikke større økonomiske ressurser bør delegeres til dette en det gjøres i dag. I kapittel 6 diskuteres fordeler og ulemper ved bruk av mer avanserte analysemetoder. Sædkvaliteten påvirkes også av mange faktorer og i kapitlene under vil vi blant annet gå gjennom modningen av en sædcelle og feil som kan oppstå tidlig under spermatogenesisen. Spermatologiske avvik i form av brudd på DNA- tråden kan også skje senere forårsaket av oksidative skader, noe som gjennomgås i kapittel 3.

KAPITTEL 2: Spermatogenesisen, implantasjon og tidlig embryoutvikling

KORT OM ANDROLOGI HOS OKSEN

Oksens testikler kommer ned i skrotum ved 3,5-4 måneder og spermatogenesisen etableres rundt 9 måneders alder. Hanndyret regnes likevel ikke som kjønnsmodent før 2-3 års alder. Noen kilder har definert puberteten som alderen der ejakulatet inneholder minst 50 millioner spermier med minst 10% motilitet (27). Testiklene når ikke sin fulle størrelse og kapasitet før 1-2 år etter puberteten. Derfor vil sædproduksjon og sædkvalitet vil være dårligere hos unge okser (28).

Forskning har vist at antallet Sertoliceller er fastsatt innen puberteten starter og at sædvolumet som produseres er direkte relatert til antallet Sertoliceller. Dermed kunne man teoretisk sett få indikasjon på produksjonsevnen tidlig i oksens kjønnsmodning, men per dags dato finnes det ikke tester for å måle dette (29). Antallet Sertoliceller reduseres gjennom livet til oxen (27).

SPERMATOGENESE OG HORMONELL REGULERING

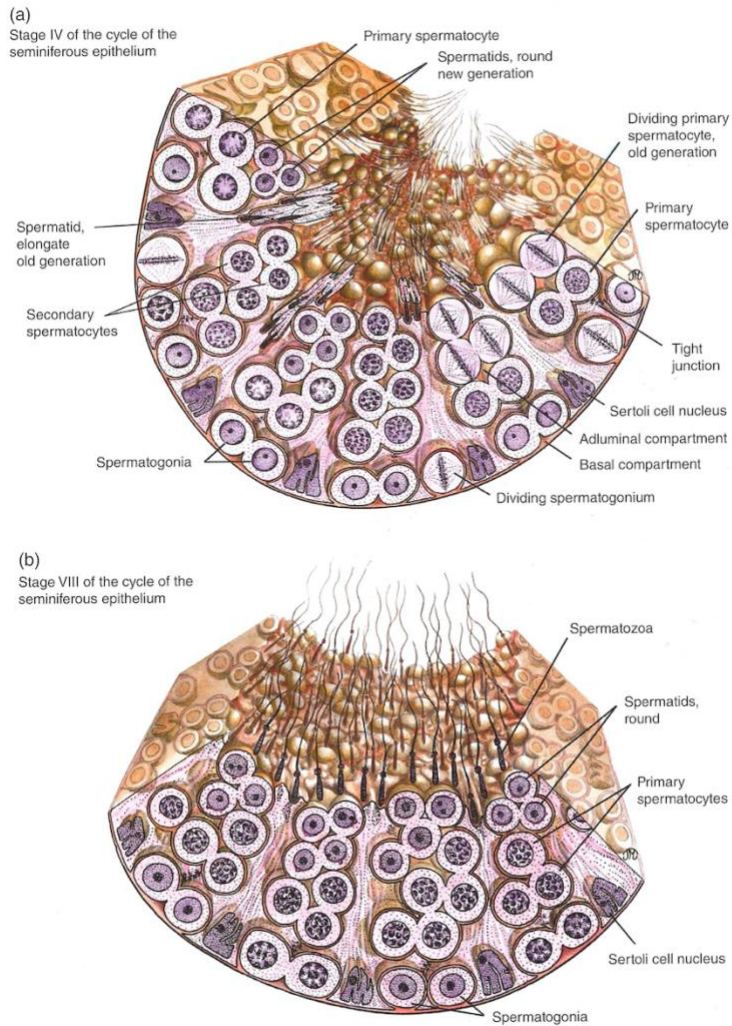
Spermatogenesisen og libido styres av HPG-aksen. Hypothalamus skiller ut GnRH som stimulerer hypofysen til å produsere og skille ut LH og FSH. FSH virker direkte på Sertolicellene i det spermatogenetiske epitel, mens LH stimulerer Leydigcellene til å produsere androgener (vesentlig testosteron). Androgenene vil sammen med FSH kontrollere spermatogenesisen via Sertolicellene. Sertolicellene produserer inhibin og får også tilført androgener som ved aromatisering omdannes til østrogen. Testosteron, østrogen og inhibin har en negativ tilbakekobling på hypothalamus og hypofyse som da nedregulerer frisetting av GnRH, LH og FSH. (30).

En balansert og følsom hormonell styring er viktig for en sædproduksjon med høy fertiliseringsrate (29). I tillegg er dannelse av blod-testes-barrieren androgenavhengig, slik at utviklingen av sæden i tidlige faser også er avhengig av en optimal stimulerings-og tilbakekoblingsmekanisme (16).

Spermatogenesisen deles tradisjonelt inn i tre faser (illustrert i Figur 1 under) og tar hos oxen ca. 61 dager (27):

- i. *Spermatocytogenesis*. Dette er den proliferative fasen. Her undergår germinale celler (stamcellespermatogonier) mitoser som produserer spermatogonier og primære spermatocytter (27). Det er i denne fasen at DNA-et dannes, samt hoveddelen av RNA (16).
- ii. *Meiosen*. I denne fasen gjennomgår spermatocytter to delinger. Første delingen er reduksjonsdelingen som gir sekundære haploide spermatocytter med en reduksjon i kromosomantall. Det er også i dette momentet at en samtidig nedbrytning og nydannelse av tight junctions mellom sertolicellene fører spermatocytene over blod-testesbarrieren slik at videre stadier er adskilt fra tidlige stadier (16). Den andre meiotiske delingen, som er en mitose, gir separasjon av datterkromatidene og resulterer i totalt fire runde haploide spermatider som utveksler genetisk materiale (27). Spesielt i meiotisk profase er prosessen uttalt følsom for skade fra miljøfaktorer som temperatur og hormoner (16). Man kan også se degenerasjon av germinale celler som mekanisme for å utrydde celler med kromosomale abnormaliteter (27).
- iii. *Spermiogenesis*. Her foregår differensiering av runde spermatider til modne spermatozoa som slippes ut ved apikale pol av Sertolicellene i lumen av tubuli semineferi (27, 31). Denne prosessen inkluderer nukleær kromatinkondensering og dannelse av akrosom og flageller (27, 29, 31). Fasen avsluttes med at hoveddelene av

spermatidens cytoplasma blir fagocyttert av Sertoliceller og kun en liten cytoplasmadråpe ved basis av hodet gjenstår ved utslipp.



Figur 1: Spermatogenesis. Skjematisk illustrasjon av faser i spermatogenesisen i oksens testikulære epitelvev. a) Utviklingene av primære spermatocytter til sekundære spermatocytter under Meiose I og utviklingen frem til Meiose II med dannelse av spermatider. b) Differensiering av runde spermatider til elongerte spermatider og ferdige smerier. Gjengitt med tillatelse fra Wiley Books (32).

SERTOLI- OG LEYDIGCELLER

Funksjonen til disse cellene er som nevnt mangfoldige. Ved avvik her vil det ha effekt på sædkvaliteten enten i form av redusert produksjon, feildannelse eller manglende beskyttelse mot senere skader.

Leydigcellenes har en viktig rolle i styring av puberteten og fysisk utvikling hos hanndyret. I tillegg er Leydigcellenes produksjon av testosteron avgjørende for stimulering av delingsfrekvens av spermatogonier, modning av spermier, dannelse av sædplasma og uttrykk av libido. Leydigcellene har også hovedandelen av reseptorene for LH og er dermed sentrale i styring av HPG-aksen (16).

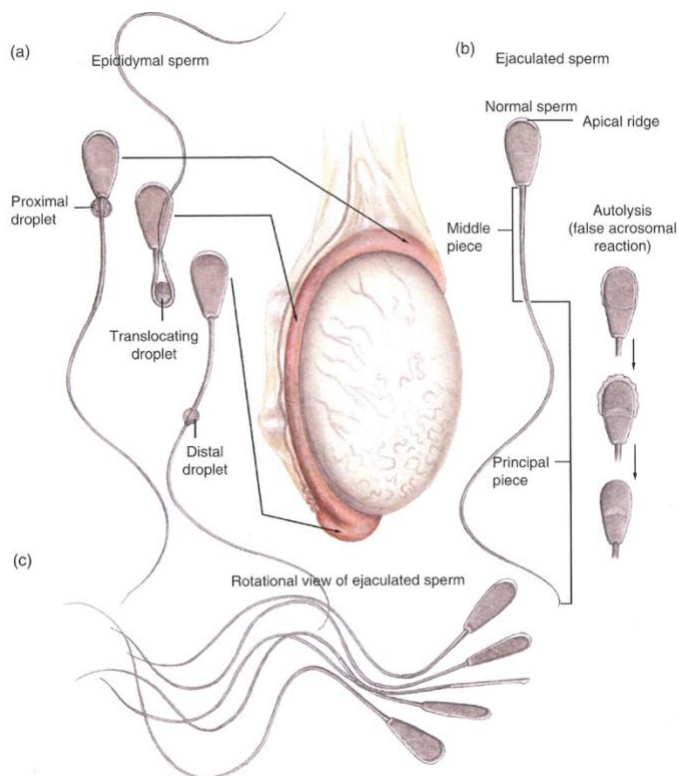
Sertolicellene danner blod-testes barrieren, regulerer ionebalanse i miljøet, og bidrar med næring som laktat, glukose og pyruvat til celler i utvikling. I tillegg produserer de proteiner som inhibin, transferrin, androgenbindende protein (ABP), alfa-5 reduktase, aromatase, vekstfaktoren seminiferous growth factor (SGF) og insulinlignende vekstfaktor typ I (IGF-1) som er avgjørende for mitokondriell morfologi, DNA-syntese, aromatisering av testosteron til østrogen, og opprettholdelse av androgennivået i testiklene. Til slutt bidrar de med fagocytose av apoptotiske celler og cytoplasma under spermiogenesen (27, 29).

Avvik i en eller flere av disse funksjonene medfører endringer i normal cellefunksjon. Dette vil gjøre cellene mer utsatt for skade og dermed ha negativ innvirkning på fertilisering av eggceller og feltfruktbarhet.

MODNING OG DEN NORMALE SÆDCELLEN

Umodne sædceller transporteres fra lumen i tubuli semineferi og over i epididymis der endelig modning og lagring forekommer. Hos oxen tar det cellene 10-14 dager å bevege seg gjennom caput, corpus og cauda av epididymis. Det er i bitestikkelen de gjennomgår endelig modning. Den resterende cytoplasmadråpen beveger seg gradvis fra hodet og forbi halen og spermene får evnen til bevegelse, som vist i Figur 2 under. I denne prosessen får også sædcellene evne

til fertilisering, immunogenisitet reduseres, og stabiliserende glykoproteiner tilsettes akrosomet (16).



Figur 2: Faser i modningen av sæden gjennom bitestikkelen. a) Proksimal protoplasmadråper beveger seg gradvis distalt på flagellen. b) En normal ejakulert sædcelle, samt illustrasjoner av hoder i autolyse. til høyre c) Normale, modne bovine sædceller. Gjengitt med tillatelse fra Wiley Books (32).

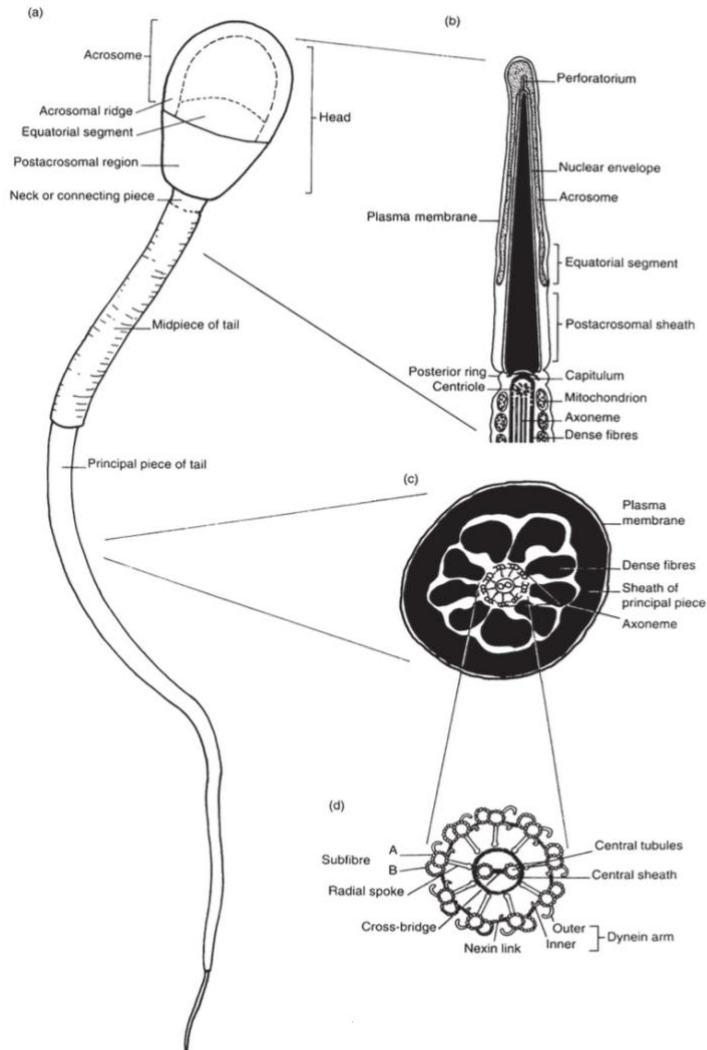
Epididymis evne til modning og lagring er som de andre deler av prosessen

androgenavhengig, slik at avvik i hormonell regulering eller suppresjon av testosteron og dihydrotestosterone (DHT) vil gi morfologiske og funksjonelle avvik (16). Bitestikkelen har flere funksjonelle områder, og epitelet i de ulike delene bidrar sammen med Sertoliceller med ulike faktorer til den luminale væsken. Den består blant annet av elektrolytter, enzymer og andre proteiner.

Det er viktig med en organisert og gradvis modning av sædcellene. Dette involverer omstrukturering av nukleoproteiner, organeller og membraner i sædcellen, men det er endringene plasmamembranen gjennomgår som er mest avgjørende (33). Plasmamembranens

funksjon er helt avgjørende for vellykket fertilisering. For det første må membranen kunne gjenkjenne zona pellucida, og den må klare å gjennomgå akrosomreaksjonen (33).

Glykoproteiner og glykaner som finnes på overflaten av plasmamembranen er essensielle for fertilisering da de muliggjør binding av spermien til overflaten av eggcellen. Mangel på disse enzymene er assosiert med infertilitet nettopp på grunn av feilmodifisering av plasmamembranen som gir lekkasje av enzymer, proteiner og lipider, og dermed funksjonelle og morfologiske avvik (16, 33).



Figur 3: Diagram av sædens normalmorfologi. a) Oversikt over strukturelle områder som sett ved lysmikroskopi. b) Morfologiske detaljer av hode- og midtstykket. c) Morfologiske detaljer av proksimale del av hale. d) Morfologiske detaljer av distale del av hale. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier (16).

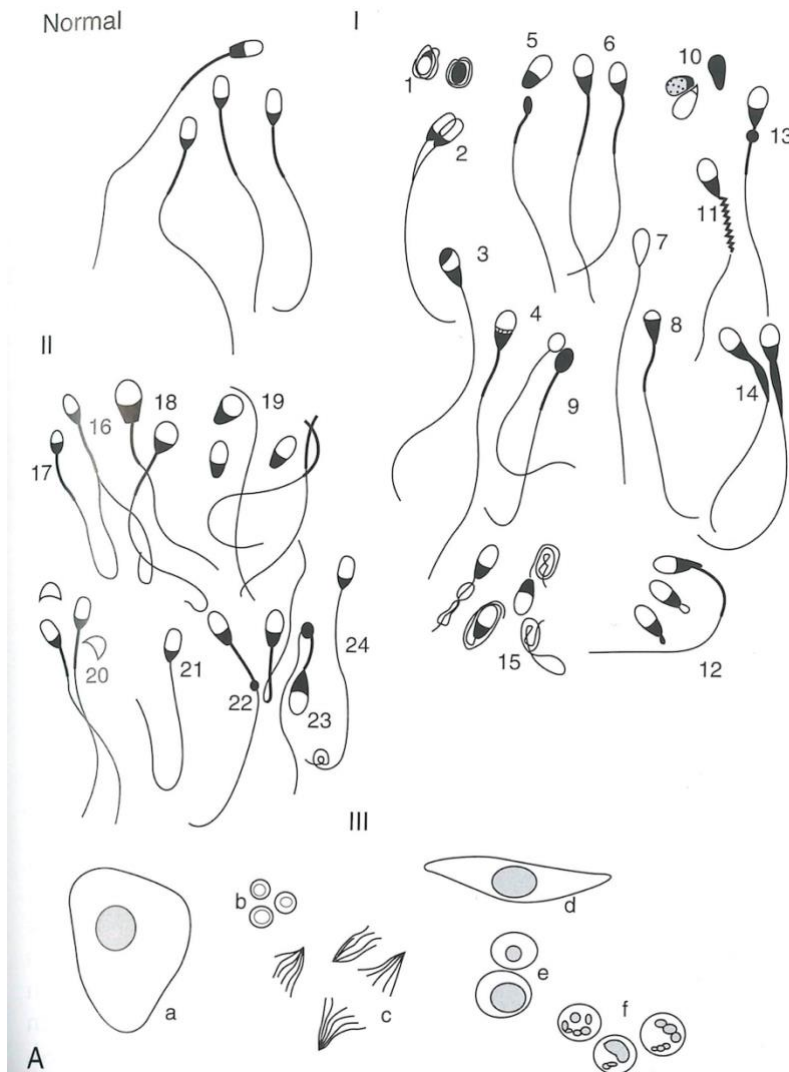
Den modne sædcellen, som illustrert i figur 3, består av tre deler. Hodet inneholder kjernen av den haploide cellen. I tillegg sees det apikalt på hodet et akrosom som ved akrosomreaksjonen skiller ut enzymer, blant annet hyaluronidase, som gjør at spermien klarer å bryte gjennom eggcellens zona pellucida. Midtdelen av sædcellen inneholder mitokondrier som i hovedsak danner ATP som energikilde til den voldsomme bevegelsen av flagellen. Selv om kontraksjoner i myometriet står for mye av den fremadgående bevegelsen gjennom livmorhals

og livmor, er velfungerende og godt ernærte flageller uunnværlige for bevegelse gjennom eggleder (16).

DEFEKTER I SÆDENS MORFOLOGI

Defekter i sæden kan oppstå ved ulike tidspunkter i spermiens utvikling og klassifiseres deretter, som illustrert i Figur 4 under. En primær abnormalitet oppstår i løpet av selve spermatogenesisen i testikkelen og påvirker som regel hodet og mellomstykket. En sekundær defekt oppstår i epididymis og viser seg ofte som protoplasmadråper. Defekter som oppstår etter ejakulasjon, betegnes som tertiære og inkluderer håndteringsfeil, feil i temperatur, pH og lignende. Disse gir ofte en defekt i form av opprullet hale.

De defektene som oppstår på grunn av unormal spermatogenese, som for eksempel akrosomdefekter og defekter som gjør sædcellene ubevegelige, har mest betydning for fertiliteten. Saacke et al., (2000) hevder at økt andel deformerte hoder er den beste måten å identifisere sterkt nedsatt fertilitet. Mindre defekter, som små avvik i hodestørrelse, abaksiale haler, distale protoplasmadråper og bøyd hale, har mindre betydning (16).



Figur 4: Større og mindre defekter i sædmorfologi. Gruppe I Større defekter: 1) Underutviklede celler. 2) Doble former. 3-4) Akrosomdefekter 5) Diademdefekter 6-7) Hodeløse spermier 8) Pyriforme hoder. 9) Små unormale hode. 10) Løse unormale hoder. 11) Midtstykke med korktrekkerdefekt. 12-13) Andre defekter i midtstykket. 14) Proksimal cytoplasmadråpe. 15) Andre fortykkede midtstykker. 23) Oppkrøllede haler. Gruppe II Mindre defekter: 16) Smale hoder. 17) Små normale hoder. 18) Store og brede hoder. 19) Løse normale hoder. 20-21) Løse akrosomale membraner. 22) Abaksiale haler. 23) Distale protoplasmadråpe. 24) Enkel bøyd hale. Gruppe III Andre celler: a) Epitelceller b) Erytrocytter c) »Medusa formations«, cilier d) Erytrocytter forbundet med unormalt haemoglobin e) mononukleære celler f) Nøytrofile. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier (16).

Studier har vist at man også kan skille disse morfologiske defektene i oksesæd i kompenserbare og ikke-kompenserbare defekter (34). Det vil si at i noen tilfeller kan oksens fertilitet kompenseres. For eksempel kan økt konsentrasjon kompensere for en noe høyere andel morfologiske avvik. Ved naturlig bedekning vil dermed ikke høy forekomst av morfologiske avvik nødvendigvis ha noe å si for drektighetsresultatet hos kua, og i mange tilfeller heller aldri avdekkes. Derimot vil ikke-kompenserbare defekter ikke kunne utjevnes

ved noen andre faktorer hos oxen. I norsk landbruk der man fortrinnsvis bruker AI, vil ikke fordelene ved kompenserbare vs. ikke-kompenserbare defekter ha noen praktisk betydning.

Man kunne ha økt konsentrasjonen av sædceller i strået i tilfeller med kompenserbare defekter, men fordi dette vil føre til redusert antall strå per ejakulat er ikke dette aktuelt (34).

Dersom oxen har en høy andel spermier med unormal morfologi vil man anbefale eliminering av oxen uansett.

SÆDPLASMA

Ejakulatet til oxen består av sædceller som beskrevet over, samt sædplasma som produseres av hanndyrets aksessoriske kjønnskjertler. Sædplasmaet har flere funksjoner. Det fungerer som et transportmedium, og inneholder faktorer til næring, komponenter til regulering av osmose, faktorer som gir koagulering av sæden etter deponering ved naturlig bedekning, samt komponenter til beskyttelse fra miljøet i det hunnlige kjønnsorganet (16).

Glandula vesicularis sitter ved utgangen av urinblære og lateralt til ampulla. Den åpner ut i uretra og slipper ut store mengder klar væske som inneholder blant annet citrat og fruktose. Hos oxen produserer de mer enn 50% av det totale ejakulatvolumet (35). Ampulla bidrar i liten grad til sædplasmaens volum og prostata skiller ut kun moderate mengder vandig sekret til uretra.

Glandula bulbouretralis er små strukturer mellom anus og uretra som skiller ut et vandig stoff som antas å rense uretra for urin før ejakulasjon. I forhold til en rekke andre arter har ejakulatet til oxen et relativt lavt volum med høy konsentrasjon av sædceller (omtrent 30%) (35).

Selv om sædplasmaets bidrag til sædkvalitet og spermens overlevelse tidvis har vært noe omdiskutert (16), viser flere analyser at proteomet i sædplasmaen er involvert i nedbrytning

og syntese av proteiner, cellulær sammensetning, organisasjon, celledisiplinering og celleinteraksjoner. Det deltar også i prosesser som glykolyse, glukoneogenese, reseptoraktivering, og responsen til visse typer oksidativt stress (36).

Sædplasmaens sammenheng med sædkvalitet og fertilitet hos oxen vil ikke være sentralt i videre diskusjon, men er et interessant tema gitt proteomets rolle i ernæring, reparasjon og beskyttelse av spermier.

SPERMIEKVALITET, IMPLANTASJON OG TIDLIG EMBRYOUTVIKLING

Som tidligere nevnt, har avvik i embryoutviklingen og implantasjon ofte blitt ansett som et problem hos kua, men senere forskning innenfor human assisted reproductive technologies (ART) viser at avvik i spermiekvaliteten, da i hovedsak DNA fragmentering, har en direkte sammenheng med embryokvalitet og implantasjonsrate (37).

Tidligere har man trodd at tidlig embryoutvikling fram til aktivering av embryoets genom, styres av m-RNA nedarvet fra mor, slik at eventuelle avvik i sæden ikke vil ha noen effekt før senere i delingsstadier (21). Forsøk med human sæd viste derimot at negative effekter på embryoutvikling forårsaket av avvik i spermiekvaliteten oppsto tidligere enn antatt. I perioden rett etter fertilisering av egget utøver sædcellen en veldig svak transkriptiv aktivitet som er nødvendig for egen nukleolær utvikling, og det er mest sannsynlig denne aktiviteten som også påvirker embryo (38).

Et lignende eksperiment med *in vitro* fertilisering (IVF) av human sæd viste tilsvarende resultater. Selv i faser der det paternale genomet regnes som inaktivt, ble det funnet nedgang i andel embryoer av god kvalitet og økning i andel embryoer av dårlig kvalitet ettersom

andelen DNA-fragmentering i spermene økte. Samme forsøk viste negativ sammenheng mellom økende DNA-fragmentering og implantasjonsrate (39).

Selv om den mest negative effekten av sædens DNA-fragmentering på fertilitet naturlig nok kommer i senere stadier av embryoutviklingen, etter aktivisering av det paternale genomet, er slike funn slående og støtter en teori om at sædens DNA integritet er av større betydning.

Med noen unntak er forskningen som er gjort på dette området i all hovedsak innenfor humanmedisin og ART. Relevansen av humane forsøk for øksen drøftes i kapittel 6.

KAPITTEL 3: DNA-fragmentering

Betydning av intakt spermie-DNA for vellykket embryoutvikling er blitt rapportert i mange humane forsøk, men også i forsøk med NRF (13). DNA-skader sees som basemodifikasjoner, enkelt- og dobbeltrådbrudd, og krysslinkede proteiner. Skadene antas som oftest å være forårsaket av reaktive oksygensubstanser (ROS), spermie-kromatin pakking og apoptose (4, 21).

Infertilitet hos hannkjønn har hovedsakelig blitt vurdert ved å undersøke sædvolum, spermiekonsentrasjon, sædens morfologi og progressive motilitet (39). Selv om det er en sterk sammenheng mellom disse parametrene og fertiliseringssevne, er det også eksempler på spermier som er innenfor det normale når det kommer til disse egenskapene, men som likevel ikke er befruktningsdyktige (40). Da må man se på funksjonsparameterne til spermene. Den viktigste årsaken til nedsatt befruktningsevne hos tilsynelatende normal sæd er nettopp skade på genomet i form av DNA fragmentering (1). Brudd på DNA-tråden kan gjøre spermene infertile, avhengig av hvor skaden er og hvor stor prosent av genomet som er ødelagt (13). Dermed er disse bruddene også assosiert med redusert fertiliseringsrate, dårligere embryokvalitet og en økt sjans for embryodød (3).

Spermatogenesen hos hanndyret innebærer et stort antall replikasjoner i forhold til den tilsvarende utviklingen av oocytten. Spermene er dermed mer utsatt for skader på DNA. For at mitose, meiose og apoptose skal kunne reguleres og for at intakt, velfungerende spermier skal kunne fertilisere egget, kreves riktig genekspressjon og beskyttelse av cellene fra de agens som kan gi DNA fragmentering og dermed affisere fruktbarheten (4). Den genomiske integriteten til spermene må altså være intakt for å få en vellykket fertilisering, og DFI er en viktig parameter for å vite nøyaktig hvor god sædkvaliteten er. Per i dag undersøkes ikke DFI

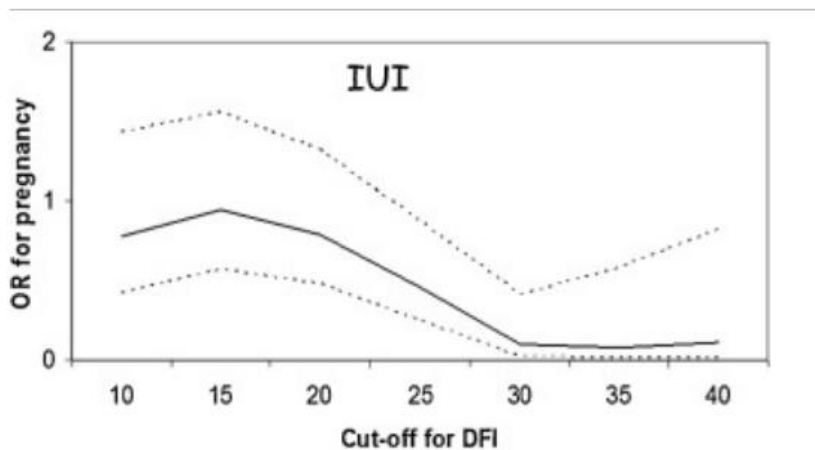
ved Genos seminastasjon. Årsaken til dette, samt fordeler og ulemper ved bruk av ulike spermatologiske analysemetodene, vil diskuteres senere i oppgaven.

DFI SOM BIOMARKØR

Det har blitt gjort flere forsøk i humanmedisin for å undersøke hvilken effekt paternal genomisk integritet har på utviklingen av et embryo. Et økt antall studier indikerer at DFI kunne vært en god tilleggsmarkør for sædkvalitet (14, 41, 42, 43, 44). Spesielt siden det på humane infertilitetsklinikker har det vist seg at menn som i utgangspunktet har normal sædkvalitet men likevel er infertile, i flere tilfeller har vist seg å ha en økt DFI (1). I likhet med andre funksjonsparametere må genomet være intakt for at embryoet skal kunne utvikle seg som normalt. Dette er spesielt viktig i tidlige stadier av embryogenesen (28). En svakhet ved bruk av DFI som biomarkør er at det ikke finnes noen nøyaktig grenseverdi for når DFI vil gi dårlig embryokvalitet. Siden mange biologiske faktorer er involvert og dette varierer individuelt. Som illustrert i figur 5, har likevel flere analysemetoder vist at en DFI som er høyere enn 25-30% vil kunne ha en negativ effekt for embryoutviklingen (47).

Flere artikler vektlegger også at det er kvaliteten til eggcellen som har størst betydning for å få en vellykket embryoutvikling, og at spermienes målbare egenskaper spiller en mindre rolle (28, 45, 46). Eggcellen har også til en viss grad evnen til å reparere skadet spermie- DNA slik at embryo likevel vil kunne utvikle seg normalt (2, 12). Dersom skaden er for stor vil fertilisering likevel være mulig, men blastocyst utviklingen stanses (dag 7- 9) og apoptose induseres etter andre eller tredje celledeling (37). Generelt vil en høy DFI kunne gi unormale blastocyster, fragmenterte kjerner og lavere delingsrate (38). Det finnes likevel ikke en nøyaktig grenseverdi for når DFI gir dårlig embryokvalitet. Dette diskuteres videre i kapittel 6.

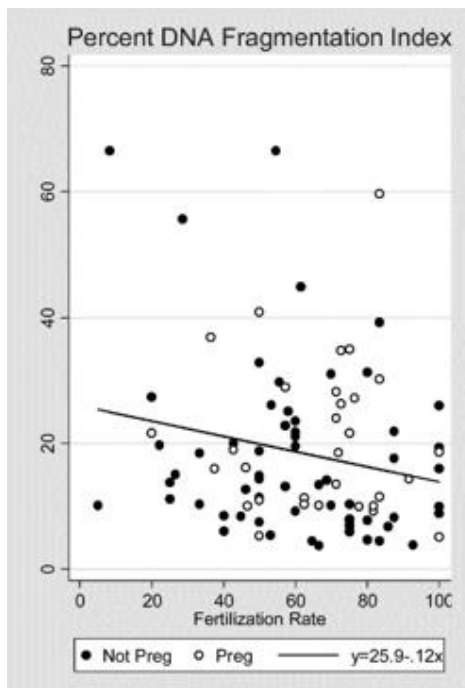
For å undersøke hvordan spermienes DNA påvirket embryo kvaliteten ble det gjort et forsøk som viste at DNA med lav DFI resulterte i bedre kvalitet på embryo (12). Det ble tatt ut oocytter fra kvinnene som var med i forsøket for å dobbeltsjekke at disse var innenfor det normale. Sædceller ble tatt ut og DFI ble målt ved bruk av sperm chromatin dispersion testen (SCD). Denne metoden beskrives i kapittel 5. Dag 3 etter kunstig befruktning ble embryokvaliteten evaluert basert på morfologisk stadium og kategorisert som A, B, C, og D, der det beste resultatet for embryoer var A og bestod av 7 eller flere celler. Det var en høy overvekt av embryoer i gruppe A som hadde blitt befruktet av spermier med DFI på under 30,7%. Konklusjonen i dette var at sædceller med høy DFI bidro til en dårligere embryoutvikling (12).



Figur 5: Prosent DFI- grenseverdi for intra-uterin inseminering (IUI) hos mennesker. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier Opprinnelig fra forsøk med Bungum et.al (2007). (47).

Selv om de fleste forsøkene vi fant viste en kobling mellom en høy DFI og dårlig embryokvalitet (2, 3, 12, 37, 39, 49) er det også noen som ikke har klart å finne en sammenheng (12, 48, 50, 51, 52). Et eksempel på dette er en undersøkelse gjort av effekten til DNA-fragmentering på fertiliseringsraten (48). Dette forsøket viste at av en gruppe pasienter med DFI på over eller er lik 27% ble 9 av 19 par gravide, altså omtrent halvparten. Til sammenligning så man på en gruppe på 22 pasienter med DFI på under eller er lik 9%, altså

færre skadete DNA tråder. Her ble bare 2 av 22 par gravide. De fant altså ingen sammenheng mellom høy DFI og lav fertilitetsrate. I dette tilfellet viste resultatene, avbildet i figur 6, at genomisk integritet ikke hadde en avgjørende betydning for resultatet. Det er likevel viktig å merke seg at dette var par som allerede slet med å få barn og at flere biologiske faktorer alltid er involvert. Forfatterne av studien var derfor åpne om at temaet må undersøkes nærmere før man kan konkludere med noe sikkert (48). Det er også andre studier som konkluderer med at det fortsatt er en del usikkerhet knyttet til bruk av DFI som biomarkør på paternale fertiliseringsmuligheter (1, 14, 53). Andre studier mener det kunne vært en god tilleggsmarkør (42, 44).



Figur 6: Bildet hører til forsøket som beskrives i teksten over. Her fant de ingen klar sammenheng mellom spermier med DFI på > 27% og redusert fertiliseringsmulighet. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier (48).

SAMMENHENG MELLOM DFI OG FUNKSJONELLE SÆDPARAMETERE

I en norsk undersøkelse fra 2006 ble funksjonsparametere som DNA integritet, mitokondrie funksjonen, plasma membran- og akrosomintegriteten målt hos spermier fra NRF okser (13). Dette ble satt opp mot feltfruktbarheten etter inseminering. Det ble brukt 30 okser og 142 ejakulater. Disse ble rangert i tre grupper ut ifra kvalitetsnivået av disse målbare egenskapene. Fruktbarheten hos kyrne ble målt som ikke-omløpsprosenten innen 60 dager etter første inseminering. Resultatet av undersøkelsen viste at DFI hadde en negativ kobling til fertilitetsraten. Derimot fant de ingen direkte sammenheng mellom fertilitetsraten og mitokondrie funksjon, plasma membran- eller akrosom integriteten (13).

Ikke-omløpsprosenten viste at det var en målbar sammenheng mellom høy fertiliseringsrate og ejakulater i gruppen med best kvalitet (gruppe 1). Denne gruppen lå over gjennomsnittet, i motsetning til gruppe 2 og 3 som hadde en mer gjennomsnittlig drektighetsrate. Forsøket viste at DNA skader kan påvirke feltfruktbarheten hos NRF okser og dermed drektighetsresultater (13).

Ulike humane forsøk har gitt varierende resultater når det gjelder sammenheng mellom DNA fragmentering og faktorer som kan vurderes i enkle spermatologiske undersøkelser.

Tomlinson et.al. (2001) fant høyere insidens av DNA fragmentering i prøver med lavere sædkonsentrasjon (54), mens et forsøk gjennomført i Vietnam fant sammenheng mellom DFI og hodemorfologi og motilitet, men ingen sammenheng med andre synlige parametere ved sæden (55.). Sivanarayana et.al. (2014) derimot fant en tydelig sammenheng mellom økende DNA-fragmentering og økende avvik i konsentrasjon, motilitet og morfologi. (41).

Lignende forsøk fra Khalili et.al. (2006) eller Rafighdoost et.al. (2006) viste derimot ikke like klare negative sammenhenger og kunne ikke fastslå at bare menn med en relativt høy andel

DNA fragmentering hadde avvik i andre spermiemålinger (56, 57). Det er omdiskutert om funn som dette har direkte klinisk relevans for drektighetsresultatene eller ikke. Uansett vil en viss andel DNA-skade være normalt og ikke påvirke drektighetsresultatet (57, 58), enten det måles som IO% eller født/avvent kalv.

Undersøkelsene referert ovenfor indikerer at dårlige drektighetsresultater i felt likevel kan kobles til sædkvalitet selv om konvensjonelle sædparametere viser normale verdier. Det er da underliggende å tenke at skade på DNA-et kan være av betydning for feltfruktbarheten (2).

DNA-FRAGMENTERING OG EMBRYOUTVIKLING

De senere årene har det blitt gjort mer forskning på sædcellens effekt på embryogenesen og som årsak til embryodød og spontanaborter (1, 2, 3, 12, 21, 37, 39, 41, 59).

Ett forsøk så nærmere på DNA-fragmenterte spermier og deres evne til fertilisering av eggcellen, samt om utviklingen av embryo ble affisert (2). Skader på DNA trådene ble registrert og resultatene av undersøkelsen viste ingen signifikant forskjell mellom fertiliseringsraten i gruppen med DNA-fragmenterte spermier og kontrollgruppen. Sædceller med brudd på DNA-et hadde omtrent like god fertiliseringsevne.

Samtidig ble det oppdaget store forskjeller avhengig av hvor stor DNA-skaden var. Mens kontrollgruppen hadde 49,8 % blastocystutvikling viste resultatene en sterk nedgang ved økende DNA-skade. Konklusjonen var at selv om DNA-fragmenterte spermier klarer å fertilisere eggcellen, kan evnen til embryoutvikling være sterkt nedsatt avhengig av hvor skadet DNA-trådene var (2).

Det er interessant med tanke på feltfruktbarheten og IO%. For å få et vellykket drektighetsresultat er det ikke nok at spermier klarer å fertilisere eggcellen. Alle trinn i utviklingen av embryo må kunne fullføres. De fleste feilene i embryogenesen skjer tidlig i utviklingen og før drektighetsresultatet er bekreftet (59).

En studie undersøkte seks dager gamle embryoer fra storfe for å evaluere resultater som følge av inseminering med god og dårlig sædkvalitet. Forskerne så på kvaliteten til embryoet og sammenlignet den med kvalitativ og kvantitative data fra ejakulatet som ble brukt. På denne måten fikk man et skille mellom fertiliseringssuksessen og den faktiske embryoutviklingen. Selv om en spermie er kapabel til å fertilisere egget, er det ikke sikkert at embryoet vil utvikle seg som normalt. Forfatterne konkluderte med at spermier av god kvalitet var positivt assosiert med både fertiliseringsrate og kvaliteten på embryo (60).

Et annet forsøk ble utført av Fatehi et.al (2006) for å undersøke effekten av paternalt DNA på fertiliseringsevne og tidlig embryoutvikling (37). Hypotesen var at DNA-fragmenterte spermier ville påvirke steg i embryogenesen, der de spesifikke genene var nødvendige for videre utvikling. For å teste hypotesen brukte de først gamma stråler for å indusere DNA-skader. Det viste seg at andre funksjoner som motilitet, mitokondrie funksjon, plasma membran og akrosom integritet ikke ble affisert av strålingen. Derimot var det en sammenheng mellom mengde stråling og skader på selve DNA-tråden.

Disse spermier var fullt ut kapable til å fertilisere egget. Men forskerne fant forandringer på dag 7 og 9 i embryoutviklingen. Blastocystraten gikk fra 28% for normale spermier, som ikke var utsatt for stråling, og ned til under 3% hos spermier med indusert DNA-fragmentering. I embryoene skjedde det en fullstendig blokkering av utviklingen videre og man fant tegn til apoptose og fragmenterte kjerner.

Resultatet sammenfalt med tidligere undersøkelser der DNA-skadete spermier klarer å fertilisere egget, men uten videre utvikling av blastocysten. Isteden induseres apoptose og man får en embryodød (37).

ROS-SKADER OG EMBRYOUTVIKLING

De beskrevne forsøkene viser alle at brudd på DNA-tråder kan affisere gener som trengs i tidlig embryoutvikling (1, 2, 3, 37, 59). Avvik i genomisk integritet i form av enkelt- eller dobbeltrådige brudd kan som nevnt skje under spermatogenesisen eller i modnings- og lagringsprosessen, men også i senere tid forårsaket for eksempel av oksidativ skade (ROS) (10, 61). Figur 10 viser ulike faktorer som bidrar til oksidativ skade på spermier og hvilke konsekvenser det vil kunne ha for embryoutviklingen.

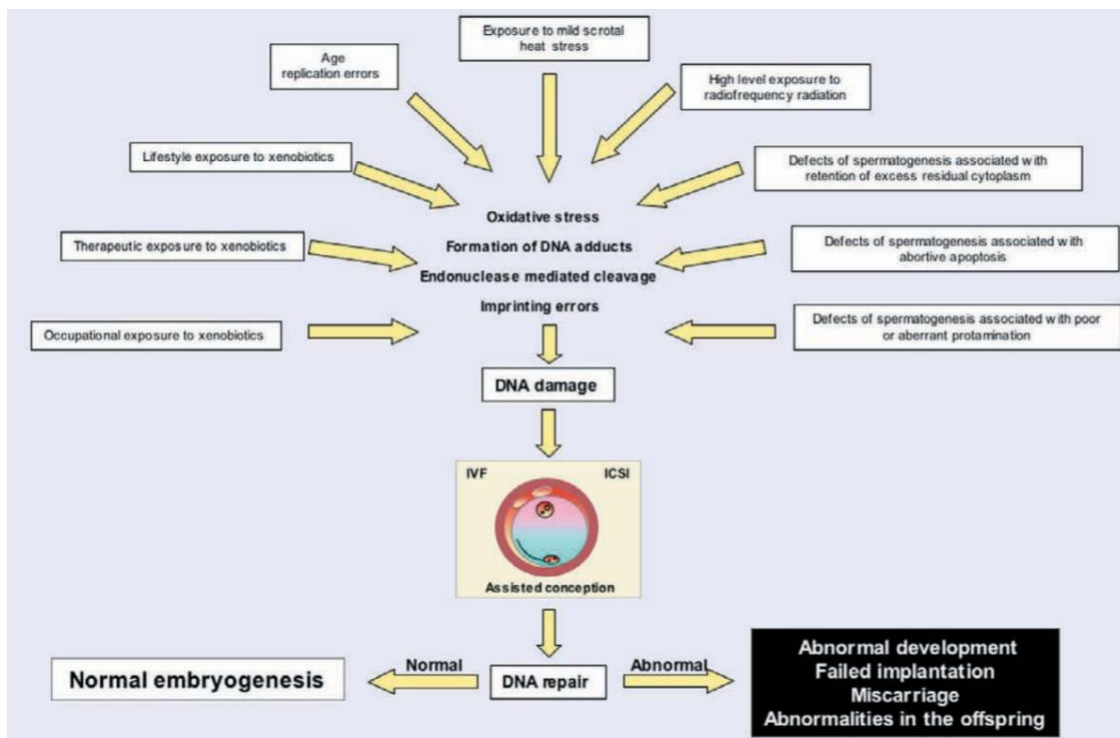
Frie radikaler har en fysiologisk rolle i normal celleregulering, men forsøk på oksesæd har vist at for store mengder ROS allikevel vil kunne inducere DNA-fragmentering. Dette vil forårsake skade på DNA og dermed redusert embryokvalitet (62). Spermier er spesielt utsatt for ROS-skade fordi plasmamembranen inneholder umettede fettsyrer som skal gjøre det mulig for sædcellen å fusjonere med eggcellen, men som også øker mottakeligheten for oksidativ skade (11). Det er forsket mye på årsaken til forskjeller mellom kvantitative nivå av frie oksygenradikaler i sædplasma. Blant annet kan mangel på antioksidanter i sædplasma føre til at DNA-trådene lettere blir ødelagt (63, 64 65).

I human medisin er det mye fokus på ernæring og livsstil. Mangel på antioksidanter i sædplasma kan føre til at DNA-trådene lettere blir ødelagt. Det kan også være feil med den programmerte celledøden (apoptosen), noe som gjør at cellene dør raskere. Videre vil sykdom og nedsatt immunforsvar øke nivået av disse reaktive stoffene. Infeksjoner og høy temperatur i testiklene på grunn av feber gjør DNA-et svakere og mer utsatt for fragmentering (63). I tillegg kan miljøgifter påvirke sædkvaliteten ved å blant annet forstyrre normale endokrine

funksjoner (66, 67). Ulike miljøgifter kan også selv indukere ROS og videre skade på sædceller (68).

Det er usikkert hvor stor betydning ROS-indusert DNA-skade har for feltfruktbarheten hos storfe. I motsetning til mennesker som kan ha både livsstil- og kostholdsproblemer, er slike forhold mye mer kontrollert hos de selekterte avlsoksene på seminstasjonen. Avlsoksene blir heller ikke så gamle og dermed er det langt færre faktorer som kan indukere ROS-skader.

Likevel er det mange biologiske likheter mellom ulike pattedyrs spermier som skulle kunne tilsa at oksidativ skade som forårsaker DNA-fragmentering også kan ødelegge for fertiliseringsprosessen og utviklingen av et embryo hos storfe (47).



Figur 7: Bildet viser ulike faktorer som bidrar til oksidativ skade på spermier og hvilke konsekvenser det vil kunne ha for embryoutviklingen. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier (69)

KAPITTEL 4: Analysemetoder brukt på seminestasjonen

ENKLE OG SUBJEKTIVE ANALYSEMETODER

I en eldre studie blant kjøttfe ble det påvist en 5% økning i drektighet hos kyr der det ble brukt okser som hadde blitt evaluert med tanke på fertilitet i forkant av bedekning. Dette sammenlignet med de som ikke blir evaluert i det hele tatt (70). Flere faktorer ble undersøkt i denne studien, men spesiell vekt ble lagt på effekten av høy andel spermier med normalmorfologi.

Det er i tillegg vist at den økonomiske gevinsten av å gjennomføre BBSE (Bull breeding soundness evaluations) for å kunne eliminere bruk av infertile okser er stor. Disse evalueringene inkluderer faktorer som bedekningsevne og omkrets av skrotum, men det blir lagt størst vekt på analyse av ejakulatet (15).

På bakgrunn av slike studier anses aktiv bruk av spermatologisk undersøkelse i avlsarbeidet som nødvendig for å oppnå en høy fruktbarhetsrate. Geno bruker ved sine oksestasjoner dyr som er valgt ut ved genomisk seleksjon, hovedsaklig basert på egenskaper hos hunndyrene som er ønskelig i kjøtt- og melkeproduksjon.. Deretter blir sæden kontrollert ved hjelp av enkel makroskopisk og mikroskopisk sædundersøkelse både ved selektering av avlsokser og ved hvert uttak (22). I følge driftsleder på avlsstasjon Store Ree, Simon Reisvaag, brukes en noe mer standardisert analysemetode, CASA, til analyse av kjønnseparert sæd (REDX)TM. Denne metoden skal også snart innføres for å undersøke vanlig sæd hos Geno.

De faktorer som vurderes i enkle sædundersøkelser og som antas å ha betydning for befruktning hos kua blir definert og utdypet her. Normalverdiene som er anslått er tatt fra utenlandske studier og ikke direkte fra forsøk på NRF-ku.

Volum: Volumet på ejakulatet gir ikke nødvendigvis en indikasjon på sædkonsentrasjonen, men avvik fra normalvolumet kan tyde på avvik hos oxen relatert til helse, hydreringsgrad, kroppstemperatur, og lignende. I tillegg inneholder sædplasma en rekke stoffer fra aksessoriske kjønnskjertler som bidrar til transport og ernæring av sædcellene slik at reduksjon i totalvolumet kan indikere suboptimale forhold og dermed nedsatt befruktningsevne hos oxen. Normalt volum er ca. 4 ml, men kan variere fra 2-10mL.

Farge: Fargen vurderes som en indikasjon på konsentrasjon, generell helse hos dyret samt at det kan gi indikasjon på eventuell forurensning. Fargen bør være en lys gul-hvit farge. Fargen kan variere noe siden det er mange fargestoffer i fôret til dyret, uten at dette påvirker fruktbarheten. Blod- og urintilblanding vil være synlig makroskopisk og er indikasjon for å mistenke patologiske tilstander i kjønnsorganer.

Konsistens: En vurdering av prøvens konsistens bør noteres. En veldig vandig konsistens kan indikere lav konsentrasjon av sædceller, mens puss i sæden kan føre til at prøven skiller seg (16). Disse karakteristikene må etterprøves ved generell helsekontroll hos dyret eller ved videre spermatologisk undersøkelse, men er uansett nyttige observasjoner.

Masseaktivitet: Graderes på en skala fra 1-3. Her er det vanskelig å skille på progressiv motilitet og passiv bevegelse hos døde/defekte sædceller eller tilfeldig vandring av cellene i sitt medium (brownske bevegelser), men bidrar til det generelle inntrykket.

Konsentrasjon: En høy konsentrasjon av fertile sædceller gir økt sjanse for befruktning hos kua og er spesielt viktig når det tas sæduttak for AI som skal fortynnes kraftig. Normalt kan konsentrasjonen av spermier variere mellom $600-2800 \times 10^6/\text{ml}$, men i følge Reisvaag godkjennes tetthet på over $390 \times 10^6/\text{ml}$. Viktigheten av konsentrasjon for sædkvalitet er dog noe nedgradert i forhold til parametere som motilitet og morfologi (15).

Motilitet: En kraftig fremadgående bevegelse er høyst nødvendig for at sæd ved naturlig bedekning skal kunne ta seg frem gjennom den foldede livmorhalsen hos kua og nå frem til fertilisasjonssted i egglederen. Dermed anses progressiv motilitet som et av de viktigste parameterne ved sædanalyse for prediksjon av fruktbarhet. Det tillates noe lavere motilitetsprosent hos okse enn for eksempel hos vær, men den bør være over 70% (16). Etter frysing tillates en nedgang til 50% hos Geno. Her graderes også motilitet på en skala fra 1-5, og må ligge på 3 eller høyere for å godkjennes, også etter frysing.

Morfologi: Tilstrekkelig nivå av normale spermier er en viktig parameter for fruktbarheten. De ulike morfologiske avvikene som er utdypet tidligere i oppgaven gir ulik effekt på fertiliteten og utelukker ikke nødvendigvis befruktning, men man ønsker generelt at alle sæddoser skal ha mer enn 75% normale spermier (15). Ved Store Ree er kravende enda strengere og man krever at ejakulatet består av færre enn 10% defekte celler per kategori (primære og sekundære defekter), og under 17% defekte celler totalt. Dette gjelder også etter frysing, og skal bekreftes ved en etterkontroll.

ENKEL SPERMATOLOGISK UNDERSØKELSE: DIREKTEMIKROSKOPI OG FOTOMETER

En enkel spermatologisk undersøkelse ved hjelp av direktemikroskopi og spektrofotometri er en tids- og kostnadseffektiv metode for å vurdere sædkvalitet. Det er påkrevet med et mikroskop med varmeplate for å holde objektglassvarme (37°C), samt fasekontrast og forstørrelse på minst 400. I tillegg kreves et fotometer og fysiologisk saltvann til fortykning av sæden.

Innledningsvis gjøres en makroskopisk vurdering av sædprøvens volum, farge, konsistens og masseaktivitet. Avvik i prøvens konsistens og homogenitet kan kobles til nedsatt kvalitet eller sykdom hos dyret.

For å vurdere konsentrasjon fortynnes en liten andel av uttaket med fysiologisk saltvann og analyseres i fotospektrometer. Så lenge prøven er homogen, bør dette gi en kvantifiserbar sammenheng med sædkonsentrasjonen hos dyret og ut ifra dette vil man også kunne regne ut totalt antall spermier i prøven. Masseaktivitet bør også graderes mikroskopisk.

For å vurdere et av de viktigste kriteriene hos sæden nemlig progressiv motilitet, brukes en fortynnet prøve til å estimere en prosentandel av prøven med progressiv bevegelse. På grunn av høy konsentrasjon av spermier i oksesæd anbefaler noen kilder så høyt som 100:1 ratio fortynning med oppvarmet fysiologisk saltvann (37°C) for dette trinnet (16). Det er her viktig at den *progressive* motiliteten vurderes, og ikke kun bevegelse. Defekte spermier kan bevege seg bakover, i ring eller svinge fra side til side uten at dette gir den effektive fremadgående bevegelsen som bidrar til befruktning.

Det er også mulig å vurdere ratio av levende:død spermier ved hjelp av en eosin-fargemetode, men fargemetoden i seg selv kan gi økt celledødelighet og estimering av ratio med det blotte øye har vist seg å være lite repeterbart i laboratorieforsøk og dermed mindre hensiktsmessig (16).

Morfologien til sædcellene kan vurderes enten med farget eller ufarget prøve. Ulike fargemetoder og mikroskop innstillinger kan fremheve ulike typer defekter, men ved hjelp av et enkelt fasekontrastmikroskop kan man også gjøre en relativt god vurdering av et ufarget utstryk. Man bør vurdere et stort antall celler fra utstryket, og både antall og type defekt bør noteres og klassifiseres.

FEILKILDER VED ENKEL SPERMATOLOGISK UNDERSØKELSE SOM KAN HA BETYDNING FOR FELTBRUKTBARHET

På grunn av spermienes følsomhet for temperatur er håndtering av sædprøver rett etter uttak antagelig en av de største feilkildene ved spermatologisk undersøkelse som har direkte betydning for feltfruktbarheten. Temperaturen på uttaket må holdes mellom 30° og 37°C for å kunne vurdere motilitet på en god måte (16). Sædprøvene bør i tillegg analyseres så fort som mulig både av hensyn til motilitet og morfologi. Degenerasjon og skade av spermiecellene kan forekomme, og gi et misvisende inntrykk av sædens morfologi og dermed kvalitet. I laboratorieforsøk er denne feilkilden noe redusert, men i felt er det en viss sannsynlighet for at forholdene fører til kraftig nedkjøling av sæden før den analyseres. I slike tilfeller anbefales det derfor å holde prøven tett inntil kroppen frem til analyse.

En annen viktig feilkilde ved bruk av standard mikroskopisk undersøkelse er den subjektive vurderingen. Gradering av cellenes bevegelse og progresjon er basert på enkeltindividets erfaring og det tilfeldige utvalget som viser seg i mikroskopet. Estimering av prosentandeler med det blotte øyet av for eksempel levende: død ratio er ofte lite repeterbart (16). Også i human kontekst er det problematisert at vanlige spermatologiske undersøkelsesmetoder er lite standardiserte og dermed vanskelig å repetere og sammenligne (71).

Det er også viktig at prøvene blandes godt, men samtidig forsiktig siden prøven har en tendens til å skille seg og dermed ikke vil være representativ.

I tillegg tar ikke spermatologisk undersøkelse høyde for dyrets evne til å bedekke. Ved naturlig bedekning er dyrets fysiske helse, libido, vekt samt miljøet viktige faktorer for drektighetsresultat. Også i tilfeller der oksen kun brukes til AI er man avhengig av

temperament, god libido og evne til jevnlig ejakulasjon. Det er viktig at man ikke glemmer fysisk undersøkelse og vurdering av dyret selv om spermatologisk undersøkelse er viktigst.

KAPITTEL 5: Avanserte analysemetoder

I forskning brukes ulike avanserte spermatologiske undersøkelser. Flere målbare feil som DNA-fragmentering hos spermene, kan ikke avdekkes i en enkel spermatologisk undersøkelse. For å kunne jobbe med mest mulig standardiserte metoder har man i stor grad gått bort i fra bruk av enkel spermatologisk undersøkelse i forskningssammenheng (72). De følgende analysemetodene kan brukes til å se på sammenhengen mellom funksjonelle egenskaper ved sæden, som DFI og sannsynligheten for fertilisering, embryoutvikling og et positivt drektighetsresultat. Da det i dag kun brukes enkle spermatologiske undersøkelser på avlsstasjonendrøftes det i kapitlene nedenfor den vitenskapelige egnetheten og den eventuelle praktiske bruken av disse mer avanserte metodene i det norske avlsarbeidet (73).

CASA

Computer-assisted sperm analysis (CASA) er et program som baserer seg på enkel spermatologisk analyse, men som gir en mer objektiv vurdering av standard sædparametere som morfologi, motilitet og progressivitet (6, 7). CASA kan også brukes til å måle kinematiske bevegelser av spermene (74). Det er en klar sammenheng mellom disse egenskapene og sædcellenes befruktningsevne (73). Derfor er en standard spermatologisk undersøkelse grunnlaget for å kunne kvalitetssikre sædkvaliteten og dermed si noe om spermens evne til vellykket fertilisering, embryoutvikling og dermed et vellykket drektighetsresultat (6). Bortsett fra en noe mer standardisert avlesning enn enkel sædundersøkelse gir ikke en standard CASA undersøkelse noen tilleggsinformasjon om andre funksjonsparametere. Som tidligere nevnt i oppgaven brukes CASA kun til analyse av kjønnseparert sæd hos Geno, men planen er å innføre bruk av CASA på alle typer sæd.

FLOW CYTOMETRI

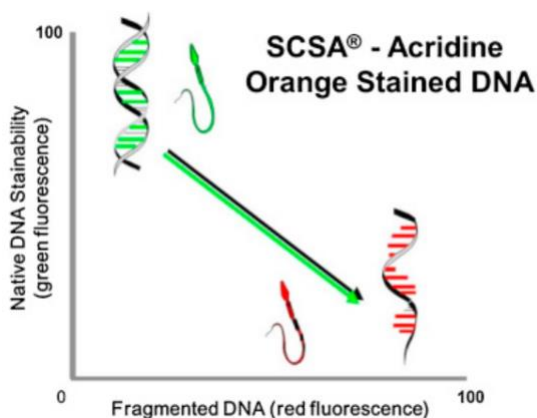
En noe mer komplisert metode som brukes for å studere sædens funksjonsparametere er flow cytometri. Analysen baserer seg på laserbelysning av hver enkelt celle i en væskestrøm. Resultatene viser i hvor stor grad cellene bøyes av lyset i en bestemt bølgelengde og gir informasjon om andre funksjonelle egenskaper hos sædcellen som det ikke ville vært mulig å oppdage ved hjelp av en enkel spermatologisk analyse (14, 75). Ved å tilsette fluorescens farge kan det måles flere markører samtidig, inkludert funksjonsparametere som DNA fragmentering, plasma membran integriteten og mitokondriefunksjonen. Alle disse sædkvalitetene må være funksjonelt intakte for å få en vellykket befruktning av eggcellen og en normal embryoutvikling (5). Dermed kan flow cytometri gi mer informasjon enn en standard spermatologisk undersøkelse. Kvantifisering av funksjonelle sædkvaliteter som DFI er ikke en del av en standard sædundersøkelse, verken på fertilitetsklinikker eller på avlsstasjoner, men har blitt brukt hos menn som tilsynelatende har normale sædkvaliteter i form av morfologi og progressiv motilitet, men som likevel er infertile (11).

Flow cytometriske analysemetoder gir mer informasjon om paternalt DNA og andre funksjoner som må være intakte for å få en vellykket fertilisering. Det gir standardiserte resultater ved gjentatte forsøk og har en høy validitet (47). Dermed er det en god indikator på sædcellens befruktningsevne og det diskuteres om DFI kunne blitt brukt som en tilleggsmarkør for å sikre en enda bedre vurdering av sædkvalitet (14).

FLOW CYTOMETRI: SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA)

Sperm chromatin structure assay (SCSA) er en rask flow cytometri test som undersøker spermie DNA-integriteten (47). Analysen tar omtrent 10 minutter og 5000 individuelle spermier blir undersøkt. Først ser man på tilbøyeligheten spermie DNA-et har til syreindusert denaturering. Deretter tilsettes fargen acridin orange som fester seg til områder der DNA-et er ødelagt, som illustrert i Figur 8. Resultatet er to uavhengige indikatorer: DNA fragmenteringsindeks (DFI) og DNA fargeopptak (HDS) (76). Ifølge SCSA-testen har sædceller med en DFI på over 25% dårligere fertilitetsresultater (47).

SCSA-testen er sensitive, men den har en lav spesifisitet. Årsaken er at det er så mange andre biologiske variabler som også påvirker fertiliseringsrate og evne til å opprettholde drectigheten. Det er dermed usikkerhet rundt hvorvidt testene og biomarkøren DFI er prediktive nok til å brukes som en markør for fertilitetsresultater (12).

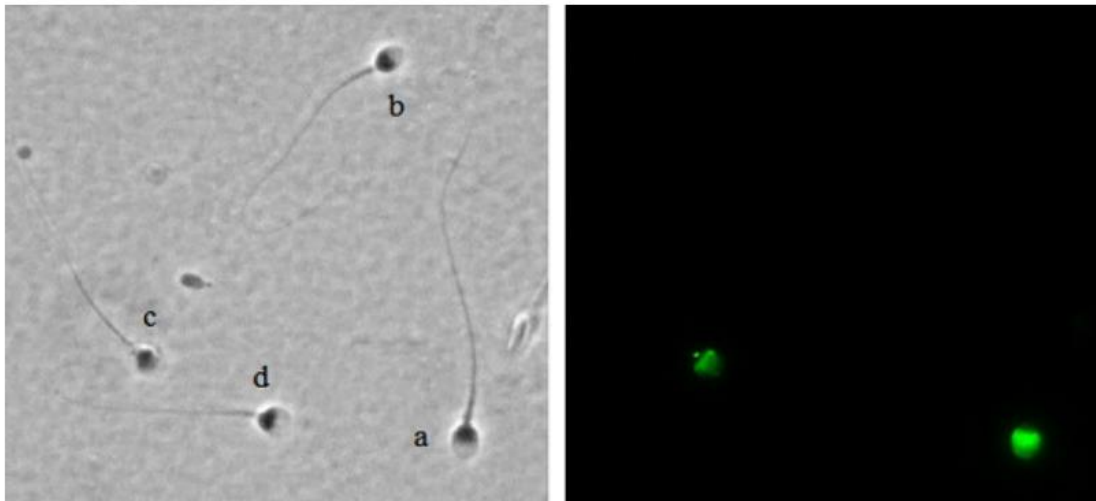


Figur 8: SCSA: Fragmentert DNA farges med acridinin orange. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier (47).

DNA-FRAGMENTERINGSTESTER: TUNEL, COMET, SCD

Det finnes flere andre metoder som også kvantifiserer DNA-fragmenterings indeksen.

TUNEL- testen måler DFI indirekte ved å se på kjernenes spredning etter denaturering, altså antall apoptotiske celler med ødelagt DNA (1). Siden testen gjøres via lysmikroskopi er det en mindre pålitelig test enn SCSA. Figur 9 viser et eksempel på at en sædcelle kan ha normal morfologi, men likevel ha brudd på DNA- tråden, noe som kan oppdages ved hjelp av blant annet TUNEL- testen (3). Siden denne analysemetoden gjøres via lysmikroskopi er det en mindre pålitelig test enn SCSA.



Figur 9: Bildet viser at en human sædcelle kan ha normal morfologi og likevel ha fragmentert DNA. a) Normal spermie med DNA fragmentering; b) normal spermie uten DNA- fragmentering; c) morfologisk unormal spermie med DNA fragmentering og d) morfologisk unormal spermie uten DNA- fragmentering Venstre bilde: fase kontrast. Høyre bilde: TUNEL fluorescens. Gjengitt med tillatelse fra Elsevier (3).

COMET- testen kvantifiserer fragmenterte DNA-tråder ved hjelp av en gel elektroforese. Her viser resultatene at ødelagte DNA-tråder beveger seg raskere fordi størrelsen er mindre enn hos ikke- fragmentert DNA (77).

SCD- testen måler kjernenes spredning etter denaturering og på denne måten måles DFI indirekte (1).

COMET og SCD er noe nyere tester enn TUNEL men måler bare 50-200 spermier i hver prøve (1). De fleste forsøk konkluderer med at SCSA har den mest standardiserte protokollen, med tanke på å kunne sette en bestemt grenseverdi for DFI (78). Det er likevel diskutert hvor stor prediktiv verdi en slik grense har, siden det er så mange andre biologiske faktorer involvert i fertiliseringsprosessen og i tidlig embryoutvikling (40).

KAPITTEL 6: Diskusjon

PRAKTISK BRUK AV DFI I AVLSARBEIDET

Det brukes i dag kun standard analysemetoder i avlsarbeidet for å kvalitetssikre sæden som skal brukes til inseminasjon (73). Man vet at det er en sammenheng mellom generelle sædparametere som spermiekonsentrasjonen, normal morfologi og progressiv motilitet, og spermienes befruktningsevne og derfor er dette en relativt trygg metode (6, 47 54, 55 73).

En forskningsartikkel skrevet av Ericsson et.al. (1993) omhandler nettopp sammenhengen mellom spermiekvaliteter undersøkt ved hjelp av flow cytometri, og ikke-omløps prosenten (IO%). Dette ble undersøkt ved hjelp av prøver fra 8 okser (79). Forskerne undersøkte mitokondriefunksjon, cellemembranintegriteten og akrosomintegriteten ved hjelp av ulike fargestoffer og enkle mikroskopiske metoder. I tillegg ble klassiske sædparametere som motilitet, morfologi og tilstedeværelse av cytoplasmadråper inkludert. Det ble funnet positiv sammenheng mellom resultatene fra en standard spermatologisk undersøkelse og flow cytometri tester, når det kommer til den faktiske kvaliteten på sæden (79). Slike forsøk fører til at avlstasjoner kanskje vurderer DFI som en unødvendig tilleggsmarkør, og at en standard spermatologisk analyse er godt nok.

De fleste forsøk viser at standard spermatologisk undersøkelse er det mest praktiske verktøyet vi har for å kunne forutsi sædcellenes kvalitet og dermed fertiliseringsevne, men ikke alle feil blir avdekket ved bruk av denne metoden (73). Egenskaper som angår plasmamembran og akrosomintegriteten, ROS skader og DNA-fragmentering blir per i dag ikke kvantifisert (5). Dette er funksjonsparametere som må være intakte for at sædcellen skal klare å fertilisere egget og at embryo skal kunne utvikle seg normalt (3).

Mer avanserte tester som SCSA, COMET, SCD eller TUNEL kan brukes for å kvantifisere slike målbare egenskaper hos sædcellene og dermed gi et enda bedre bilde av den faktiske sædkvaliteten. Metodene kan likevel ikke alene si noe om fertiliseringssevne og drektighetsresultater (1). Disse tilleggsparemetere er per i dag ikke en del av Geno sin kvalitetsjekk av sæden som skal brukes til kunstig inseminering, og enkel spermatologisk undersøkelse er fortsatt det viktigste grunnlaget for å kunne predikere sædcellens fertiliseringssevne og muligheter for et positivt drektighetsresultat (6, 47, 73).

Det finnes ikke noen eksakt grenseverdi for når DFI gir en dårligere embryokvalitet og resulterer i embryodød, manglende født kalv, eller lav IO%. Dermed kan man ikke bruke biomarkøren alene for å predikere fertilitet eller infertilitet (58). I tillegg gir de forskjellige DNA-fragmenteringstestene noe ulikt resultat med tanke på å sette en DFI-grenseverdi (40). Ulike forsøk har også gitt forskjellige resultater når det gjelder å finne en kvantifiserbar grenseverdi, selv om mange analysemetodene har vist at dersom DFI er høyere enn 25-30%, vil det kunne ha negativ effekt på drektighetsresultatet (47). Da det finnes mange andre biologiske faktorer involvert, både når det kommer til fertiliseringsrate og drektighetsresultater, kan ikke DFI alene gi en god nok prediktiv verdi for feltfruktbarheten, men kunne fungert godt som en tilleggsmarkør (1).

Det vil det kreves et mye større forskningsgrunnlag, og jevnlig bruk av disse avanserte metodene, for å kunne vurdere i hvilken grad DFI egentlig kan anslå at et ejakulat er infertilt eller fertilt.

Dersom det ble lagt ressurser i slik forskning mener vi at bruk av disse hjelpemidlene kunne gi mer nøyaktig vurdering av sædkvaliteten ved avlsstasjoner, effektivisering av arbeidet med okseseleksjon, og til slutt en høyere IO%.

RELEVANS AV HUMANFORSKNING FOR FORHOLD HOS STORFE

Hovedtyngden av forskningsartikler baserer seg på resultater fra humane infertilitetsklinikker. Ikke bare er dette en helt annen art, men de tar stort sett for seg par som allerede sliter med å få barn av ulike grunner (48). Dette i motsetning til okser på avlsstasjoner som er genomisk selektert for å produsere avkom med gode egenskaper.

En av hovedårsakene til at DNA-et blir ødelagt er ROS-skader. Årsaker til oksidativ skade er blant annet mangel på antioksidanter i sædplasma på bakgrunn av et dårlig kosthold, høy alder og sykdom (67). Hvorvidt dette i praksis affiserer okser er noe omdiskutert nettopp fordi disse dyrene er avlet frem på bakgrunn av gode kvaliteter som fruktbarhet, samt lever korte liv med mer kontrollert kosthold og miljø.

Det er blitt forsket mindre på hvilken kvantifiserbar betydning DNA-fragmentering har for dyr. Men på bakgrunn av de mange biologiske likheter mellom pattedyr spermier vil mest sannsynlig flere av studiene være sammenlignbare. For praktisk bruk i avlsarbeidet er konklusjonen at en høy DFI hos en okse vil føre til dårligere embryokvalitet uansett skadeårsak (13). Men det er av stor interesse å forske videre på årsakene til DNA-skader og omfanget av effekten av ROS og andre skadelige agens spesifikt for spermieviabiliten til oksen (62).

KOST/ NYTTE

Valgene rundt sædundersøkelse i praktisk avlsarbeid styres som alt annet i stor grad ved vurdering av kost vs. nytte (7). Den vitenskapelige fordelene av å bruke biologiske tilleggsmarkører som DNA-fragmenteringstester må vurderes med hensyn til økonomi. Høye innkjøpskostnader, vedlikehold, daglig drift, og krav om spisskompetanse hos ansatte, vil være meget kostbart (72). Geno jobber hele tiden for å finne nye og bedre måter å

kvalitetssikre sitt produkt, men samtidig er det dyrt å drive forskning i Norge og det må naturlig nok foreligge en økonomisk gevinst i valg av metoder.

Selv om man har konkludert med at det finnes en viss kobling mellom DFI og embryokvalitet, er det fortsatt noe usikkerhet knyttet til *hvor stor* betydning genomisk integritet har for fertilitetsraten til okser og dermed i hvilken grad omløpsprosenten ute i felt kan kobles tilbake til nettopp sædkvaliteten. Det er tross alt andre faktorer som i stor grad påvirker fertilitetsraten og drektighetsresultatet, som det å ta ut riktig brunst, inseminasjonsteknikk, drift, samt god helse og dyrevelferd. I tillegg viser blant annet Geno allerede til gode resultater med dagens metoder for vurdering av sæd.

Blant annet er det ikke gjort nok undersøkelser som baserer seg på ROS-skade hos norske avlsokser og dermed hvor stor prosentandel DFI det faktisk er i avlsoksenes sæd (62). Selv om forskning tilsier at ROS gjør skade på sædens DNA, viser også flere forsøk manglende konklusjoner rundt omfang og betydning (80). Blant annet er det usikkert i hvilken grad ROS nivåer kan reduseres uten å affisere normal fysiologisk reproduktiv funksjon (80, 81). Dersom sædcellene på generell basis befinner seg under de diskuterte grenseverdiene for DFI, vil ikke embryogenesen være affisert. Derfor er det heller ikke per i dag økonomisk gunstig å bruke tilleggsundersøkelser som flow cytometri i avlsarbeidet.

Allikevel foreslår Harstine et.al. (2018) at ved økt bruk av den nye teknologien vil kunnskapen innenfor hanndyrets fertilitet øke drastisk i løpet av de neste årene, og verdien av dette i praktisk avlsarbeid kan være stor (72).

KONKLUSJON

Vi konkluderer at DNA-fragmentering i spermene gir redusert embryokvalitet og en dermed en lavere drektighetsrate. Det er likevel uklart hvilken kvantifiserbar betydning DNA-fragmentering har for feltfruktbarheten og dermed i hvilken grad omløpsprosenten ute i felt kan kobles tilbake til sædkvaliteten alene.

Forskjellige forsøk og ulike DNA-fragmenteringstestene har ikke klart å finne en nøyaktig DFI grenseverdi som kan fastslå når paternal fertilitet vil ha betydning for embryoutvikling. I tillegg er det meste av forskningen knyttet til DNA-fragmentering gjort på mennesker, og det er derfor usikkerhet knyttet til hvor relevant denne forskningen er for avlsokser.

Siden det er så mange andre biologiske faktorer involvert, som fruktbarheten hos kyrne og menneskelige feil, er det ikke nok grunnlag for å anbefale bruk av DNA-fragmenteringstester på avlsstasjonen. Sett opp mot kostnad er dermed en standard spermatologisk undersøkelse fortsatt det mest effektive grunnlaget for å kunne si noe om sædcellenes fertiliseringssevne.

Med et større forskningsgrunnlag kan analysemetoder som gir kvantifisering av DNA-fragmenter i sæd bli en viktig del av spermatologisk undersøkelse som kan gi effektivisert avlsarbeid og forbedret feltbruktbarhet i fremtiden.

TAKK TIL BIDRAGSYTERE

Vi ønsker å takke veilederne våre, Anette Krogenæs og Amin Sayyari, for faglig og teknisk bistand gjennom søke- og skriveprosessen. Vi vil også takke Simon Reisvaag, produksjonsleder på Genos avlsstasjon Store Ree, for informasjon rundt Genos rutiner og fremtidsplaner.

BIBLIOGRAFI

1. Cissen M, Wely MV, Scholten I, et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165125. Published 2016 Nov 10.
doi:10.1371/journal.pone.0165125
2. Ahmadi, A. , Ng, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 284, 696–704, 1999. doi: 10.1002/(sici)1097-010x(19991101)284:6<696::aid-jez11>3.0.co;2-e.
3. Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril*. 2010;94(2):549-557. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.02.050
4. Gunes, S., Al-Sadaan, M., Agarwal, A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive Healthcare Ltd*. Elsevier Ltd, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.010>
5. Berg, F., & Norges miljø-og biovitenskapelige universitet Institutt for produksjonsdyrmedisin. (2018). *Flow Cytometric Assessment of Sperm Functionality in Relation to Bull Semen Preservation Methods and Fertility = Flowcytometrisk Evaluering Av Spermiefunksjonalitet Relatert Til Ulike Metoder for Konservering Av Oksesæd Og Fertilitet, 2018:60*
6. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014;81(1):5-17.e173.
doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.004
7. Köse M, Sokmensuer LK, Demir A, Bozdog G, Gunalp S. Manual versus computer-automated semen analysis. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(6):662-664.

8. Dearing, C.G., Kilburn, S., Lindsay, K.S. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Hum Fertil (Camb)*. 2014. Mar;17(1):37-44. doi: 10.3109/14647273.2013.865843.
9. Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*, Vol.23, No.1, January/February 2002.
10. Cocuzza, M., Sikka, S.C., Athayde, K.S., & Agarwal, A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International braz j urol*, 33(5), 603-621, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1677-55382007000500002>
11. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*. 2004;25(1):5-18. doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x
12. Kim SM, Kim SK, Jee BC, Kim SH. Effect of Sperm DNA Fragmentation on Embryo Quality in Normal Responder Women in In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Yonsei Med J*. 2019;60(5):461-466. doi:10.3349/ymj.2019.60.5.461
13. Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, et al. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod Fertil Dev*. 2006;18(7):781-788. doi:10.1071/rd06029
14. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersbøll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1576-1582. doi:10.1093/humrep/del019
15. Chenoweth, P.J., McPherson, F.J. Bull breeding soundness, semen evaluation and productivity. *Animal Reproduction Science* 169, Elsevier B.V., 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.03.001>

16. Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W. *Veterinary Reproduction and Obstetrics* Tenth Edition. Saunders Elsevier, 2018.
17. Berg, H.F. *Reproductive potential and quality of SpermVital semen used for artificial insemination in cattle*. Doctoral thesis, NMBU, Ås/Adamstuen, 2020.
18. Bonafos, L.D., Kot, K., Ginther, O.J. Physical Characteristics of the Uterus During the Bovine Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Theriogenology* 43: 713-721, 1995.
19. Forde, N., Lonergan, P. Transcriptomic Analysis of the Bovine Endometrium: What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 58, No.2, 2012.
20. Sánchez, J.M., Simintiras, C.A., Lonergan, P. Aspects of embryo-maternal communication in establishment of pregnancy in cattle. *CBRA*, 2019. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2019-0075
21. Loutradi, K.E., Tarlatzis, B.C., Dimitrios, G.G., Zepiridis, L., Pagou, T., Chatziioannou, E., Grimbizis G.F., Papadimas, I., Bontis, I. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 23, No.2, February 2006. DOI: 10.1007/s10815-006-9022-8
22. *Produksjon av sæd*. Geno. Oppdatert 15.09.15
<https://www.geno.no/Start/Brunst/Semintjeneste/Produksjon-av-sad/> (15/9/2020)
23. *Results of sexed semen dairy trials published*. Teagasc: Agriculture and Food Development Authority, Carlow, Irland. 47.2019. <https://www.teagasc.ie/news--events/news/2019/results-sexed-semen-trial.php> (1/10/2020)
24. Reisvaag, Simon Tobias Kvasnes. *Resultater bruk av REDX™ – kjønnsseparert NRF-sæd*. Buskap Utgave 8 – 2019. https://www.buskap.no/journal/2019/8/m-590/Resultater_med_bruk_av_REDX_TM (1/10/2020)

25. *Suksess for SpermVital I italiensk feltforsøk*. SpermVital AS.

<http://www.spermvital.com/no/Dokumentasjon/DokumentasjonFelles/Dokumentasjon/>

(5/10/2020)

26. *Suksess for Spermvital i Nederland*. SpermVital AS. *Synchronization Trial*.

<http://www.spermvital.com/no/Dokumentasjon/DokumentasjonFelles/Dokumentasjon/>

(5/10/2020)

27. Staub, C., Johnson, L. Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal* 12:S1, 2018, p.27-35.

doi:10.1017/S1751731118000435

28. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *Journal of Assisted*

Reproduction and Genetics. 2018 Nov;35(11):1953-1968. DOI: 10.1007/s10815-018-1304-4.

29. De Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N.

Spermatogenesis. Institute of Reproduction and Development. Monash University, Australia. *Human Reproduction* Volume 13, Supplement 1, 1998. Accessed at:

https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1 (1.September, 2020.)

30. Corradi, P.F., Corradi R.B., Greene L.W. Physiology of the Hypothalamic Pituitary

Gonadal Axis in the Male. *Urologic Clinics of North America*, March 2016. DOI:

10.1016/j.ucl.2016.01.001

31. Chocu, S., Calvel P., Rolland, A.D., Pineau, C. Spermatogenesis in mammals: proteomic

insights. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2012, 58: 179-190. DOI:

10.3109/19396368.2012.691943

32. Hopper, R.M. *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons, 2014..

DOI:10.1002/9781118833971

33. Toshimori, K. Biology of Spermatozoa Maturation: An Overview with and Introduction to This Issue. *Microscopic Research and Technique* 61:1-6 (2003). Pages 1-6.
DOI: [10.1002/jemt.10311](https://doi.org/10.1002/jemt.10311)
34. Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:663-677. doi:10.1016/s0378-4320(00)00137-8
35. Kershaw-Young, C.M., Maxwell, WMC. Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 4), 369–375 (2012); doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x
36. Westfalwicz, B., Dietrich, M.A., Mostek, A., Partyka, A., Bielas, W., Nizanski, W., Ciereszko, A. Analysis of bull (*Bos Taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to the seminal plasma proteome. *Journal of Dairy Science*, Vol 100, 2017. S. 2282-2298.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11866>
37. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.* 2006;27(2):176-188.
doi:10.2164/jandrol.04152
38. Tesarik, J., Mendoza, C., Greco, E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*, Volume 17, Issue 1, January 2002. Pages 184-189. DOI: [10.1093/humrep/17.1.184](https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.184)
39. Simon, L., Murphy, K., Shamsi M.B., Liu, L., Emery, B., Aston, K.I., Hotaling, J., Carrell, D.T. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*, Vol 29, No. 11, pp2402-2412, 2014. doi:10.1093/humrep/deu228

40. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod.* 2002;17(7):1856-1862. doi:10.1093/humrep/17.7.1856
41. Sivanarayana T., Ravi Krishna C., Jaya Prakash G., et al. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Med Biol.* 2014;13(2):87-94.
42. Evenson D. P. (2017). Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Translational andrology and urology*, 6(Suppl 4), S495–S500. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.07.20>
43. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017 Jan-Feb;19(1):80-90. doi: 10.4103/1008-682X.182822. PMID: 27345006; PMCID: PMC5227680.
44. Fernandez JL, Velez de la Calle JF, Tamayo M, Cajigal D, Agarwal A, et al. Sperm DNA integrity and male infertility: current perspectives. *Arch Med Sci.* 2009;5:S55–62.
45. Sergio Oehninger, Intracytoplasmic sperm injection: results from Norfolk, USA, *Human Reproduction*, Volume 11, Issue Supplement_5, September 1996, Pages 73–75, https://doi.org/10.1093/humrep/11.suppl_5.73
46. Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, K pker D, Diedrich K, Schmidt W. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod.* 1996 Nov;11(11):2468-71. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019139. PMID: 8981135.

47. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA(®)) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci.* 2016;169:56-75. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.01.017
48. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 2005;84(2):356-364. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.02.032
49. Alvarez Sedó, C., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Lagar, E. V., & Nodar, F. (2017). Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA assisted reproduction*, 21(4), 343–350. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170061>
50. Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2011 May;28(5):391-7. doi: 10.1007/s10815-011-9544-6. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21327499; PMCID: PMC3151360.
51. Antonouli S, Papatheodorou A, Panagiotidis Y, Petousis S, Prapas N, Nottola SA, Palmerini MG, Macchiarelli G, Prapas Y. The impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome in cases of donated oocytes. *Arch Gynecol Obstet.* 2019 Jul;300(1):207-215. doi: 10.1007/s00404-019-05133-9. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30941554.
52. Gat I, Tang K, Quach K, Kuznyetsov V, Antes R, Filice M, Zohni K, Librach C. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with blastocyst aneuploidy or morphological grading. *PLoS One.* 2017 Jun 7;12(6):e0179002. doi: 10.1371/journal.pone.0179002. PMID: 28591199; PMCID: PMC5462460.

53. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril*. 2008 Apr;89(4):823-31. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.04.055. Epub 2007 Jul 20. PMID: 17644094
54. Tomlinson, M.J., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Bizzaro, D., Afnan, M., Sakkas, D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction* Vol.16, No.10, pp2160-2165, 2001.
<https://doi.org/10.1093/humrep/16.10.2160>
55. Le, M.T., Nguyen, T.A.T., Nguyen, H.T.T., Nguyen, T.T.T., Nguyen, V.T., Le, D.D., Nguyen, V.Q.H.N., Cao, N.G. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters. *Reproductive Medicine and Biology*, 2019; 18: 390-396. DOI: 10.1002/rmb2.12297
56. Rafighdoost, H., Farsi, M.M., Javadi, M., Khafri, S. Relationship between Sperm Parameters and DNA Fragmentation using a Halosperm Kit. *Anatomical Sciences Journal* 2013, Vol10, No 2, p. 79-85.
57. Khalili MA, Aghaie-Maybodi F, Anvari M, Talebi AR. Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urol J*. 2006;3(3):154-159.
58. Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M, Bujan L. Intégrité de l'ADN des spermatozoïdes comme élément diagnostique et pronostique de la fertilité masculine [Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2005 Mar;33(3):89-101. French. doi: 10.1016/j.gyobfe.2005.02.012. PMID: 15848079.
59. Jiang WJ, Jin F, Zhou LM. [Correlation of the DNA fragmentation index and malformation rate of optimized sperm with embryonic development and early

- spontaneous abortion in IVF-ET]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2016 Jun;22(6):520-524. Chinese. PMID: 28963841.
60. Saacke, R.G: Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* Volume 70 (2008), s. 473-478.
doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.012
61. Dada R., Bisht S. (2017) Oxidative Stress and Male Infertility. In: SINGH R., Singh K. (eds) *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment*. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-4017-7_10
62. Simões, R., Feitosa, W., Siqueira, A., Nichi, M., Paula-Lopes, F., Marques, M., Peres, M., Barnabe, V., Visintin, J., Assumpção, M. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *REPRODUCTION*, 146 (5), 433-441. 2013. Retrieved Nov 20, 2020 from
<http://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/146/433.xml>.
63. Sakkas, D., Mareithoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., Bianchi, U. Origina of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 4, p 31-37, 1999.
64. Opuwari CS, Henkel RR. An Update on Oxidative Damage to Spermatozoa and Oocytes. *Biomed Research International*. 2016 ;2016:9540142. DOI: 10.1155/2016/9540142.
65. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2014 Jun;28(6):684-703. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.02.004. Epub 2014 Mar 4. PMID: 24745838.
66. Olea, N., Fernandez, M.F. "Chemicals in the environment and human male fertility." *Occupational and environmental medicine* vol. 64,7 (2007): 430-1.
doi:10.1136/oem.2007.033621

67. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1027-36. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046. Epub 2010 Jan 18. PMID: 20080235
68. Roth, Z., Komsky-Elbaz, A., Kalo, D. Effect of environmental contamination on female and male gametes – A lesson from bovines. *Animal Reprod*, vol 17, n3, 2020. doi: 10.1590/1984-3143-AR2020-0041.
69. Aitken, R John et al. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online*, Volume 14, Issue 6, 727 – 733
70. Wiltbank, J.N., Parish, N.R. Pregnancy rate in cows and heifers bred to bulls selected by semen quality. *Theriogenology* Volume 25, 1986, s. 779-783. Doi: 10.1016/0093-691X(86)90093-2
71. Björndahl, L., Haugen, T.B. Hva forteller en sædanalyse? *Tidsskrift Norsk legeforening* nr.3 2008, 128: 320-3. <https://tidsskriftet.no/2008/01/tema-andrologi/hva-forteller-en-saedanalyse> (Accessed 15.9.2020)
72. Harstine, B.R., Utt, M.D., DeJarnett, J.M. Review: Integrating a semen quality control program and sire fertility at a large artificial insemination organization. *Animal* (2018), 12:S1. Pp s63-s74. doi:10.1017/S1751731118000319
73. Olsen HB, Heringstad B, Klemetsdal G. Genetic analysis of semen characteristic traits in young Norwegian Red bulls, *J. Dairy Sci.* 103:545–555 <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17291>, Published by FASS Inc. and Elsevier Inc. *Department of Animal and Aquacultural Sciences, Faculty of Biosciences, Norwegian University of Life Sciences, Geno Breeding and AI Association, Hamar, Norway.*
74. Robayo, I., Montenegro, V., Valdés, C., Cox, JF. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant

- cervical mucus. *Reprod Domest Anim.* 2008 Aug;43(4):393-9. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00920.x. Epub 2008 Feb 17. PMID: 18282216.
75. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1-5.1.11. Published 2018 Feb 21. doi:10.1002/cpim.40
76. Bungum M. Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:531042. doi:10.1155/2012/531042
77. Evenson, D. P., Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979–991.
78. Evenson DP, Kasperson K, Wixon RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:93-113. PMID: 17644957.
79. Ericsson, S. A., Garner, D. L., Thomas, C. A. , Downing, T. W. , and Marshall, C. E. (1993). Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen–thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 39, 1009–1024.
80. Bollwein, H., Bittner, L. Impacts of oxidative stress om bovine sperm function and subsequent *in vitro* embryo development. *Anim. Reprod.*, v.15 (Suppl.1), p.703-710, 2018. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0041
81. Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M-A. The Impact of Reactive Oxygen Species on Bovine Fertilizing Ability and Oocyte Maturation. *Journal of Andrology, Vol.18, No.4, July/August 1997, pp. 454-460.* PMID: 9283960.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no