SpermVital - en ny tilnærming innen sædprosessering

ELISABETH KOMMISRUD [1]OG GEIR KLINKENBERG [2]
BioKapital AS, Hamar[1], SINTEF Materialer og kjemi, Trondheim[2]

I moderne husdyrproduksjon er god fruktbarhet avgjørende for det økonomiske resultatet. For å oppnå gode fruktbarhetsresultater, må inseminasjon eller kunstig sædoverføring (k.s.) utføres innenfor et begrenset tidsvindu i forkant av eggløsningen. I praksis er brunstobservasjon både vanskelig og tidkrevende. Mange bønder inseminerer ofte dyra for tidlig i brunsten, og dobbeltinseminasjon (inseminasjon to ganger i løpet av brunsten) blir derfor gjerne benyttet. For å gjøre k.s. til en enda mer verdifull reproduksjonsmetode er det utviklet ny teknologi der spermiene immobiliseres i et gel-nettverk laget av kalsium alginat gel som gradvis løses opp etter inseminasjon. Metoden antas å forlenge levetiden til spermiene, både før inseminasjon og etter inseminasjon i børen. Inseminasjonsresultater fra innledende forsøk indikerer at metoden er konkurransedyktig med tradisjonelt prosessert sæd, og resultatene antyder også at tidspunktet for inseminering er mindre kritisk. Teknologien forbedres stadig og flere mindre inseminasjonsforsøk har blitt utført for å verifisere resultatene. Et større inseminasjonsforsøk gjennomføres høsten 2010 og vinteren 2011.

Immobilisering

Alginatgeler dannes som følge av interaksjon mellom divalente ioner som Ca^{2+} og blokkstrukturer av guluronsyre i alginat polymerkjeden. Alginatgeler kan dannes under svært milde forhold, og kan derfor benyttes for immobilisering av celler. Immobilisering i alginat benyttes imidlertid oftest som et utgangspunkt for senere dannelse av ulike typer kapsler med flytende kjerne. Flere studier av immobilisering av spermier i kapsler har blitt publisert. I disse studiene har det vært benyttet immobiliseringsmetoder som resulterer i en partikkel der spermiene ligger i en flytende kjerne omgitt av en membran.
Nebel *et al.* (1985) utviklet en prosedyre for immobilisering av oksespermier i kapsler av polylysin (polykation) og alginat. Denne metoden er basert på en tidligere publisert metode fra Lim og Sun (1980), som jobbet med insulinproduksjon fra immobiliserte Langerhanske celler. Prosedyren ble benyttet i en senere studie av Nebel *et al.* (1996), som omfattet både lagringsforsøk (120 timer ved 37°C) og inseminasjonsforsøk (335 inseminasjoner), der immobiliserte spermier ble sammenlignet med ”frie” spermier som kontroll. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i lagringsstabilitet eller i befruktningsprosent i forsøk med inseminasjon med innkapslede spermier og ikke-innkapslede spermier. Det er vist at innkapslede spermier har evnen til å befrukte eggceller *in vivo* hos flere

dyrearter (Munkittrick *et al.* (1992) (storfe), Vishwanath *et al.* (1997) (storfe) og Maxwell *et al.* (1996) (sau). Munkittrick *et al.* (1992) rapporterte imidlertid at mikroinnkapslede spermier var til stede i lavere antall på befruktningsstedet enn "frie" spermier da begge typene ble inseminert på det optimale tidspunktet for ikke-innkapslede spermier. Dette ble forklart med at innkapslede spermier trenger tid til å frigjøre seg fra kapselmaterialet, slik at optimalt tidspunkt for inseminering med innkapslede spermier er noe tidligere enn for frie spermier.

Senere er det patentert en mer skånsom metode for innkapsling av svinespermier (Conte *et al.*, 1998; Torre *et al.*, 2000, 2002) som gir tilnærmet samme cellekonsentrasjon inne i partiklene som i nativ sæd og en større andel spermier med intakt akrosom (Faustini *et al.*, 2004). Metoden er nylig utprøvd i et større inseminasjonsforsøk på svin i Italia, og resultatene viser tilnærmet samme antall befruktinger med en enkel dose med innkapslede spermier som med tradisjonell inseminasjonsrutine med dobbel inseminering (Faustini *et al.* 2008). Spermiene ble derimot ikke lagret før bruk og metodene som ble benyttet kan være vanskelig å overføre til kommersiell kunstig sædoverføring på for eksempel storfe.

SpermVitals teknologi innebærer en annen tilnærming til immobilisering av spermier, der spermiene immobiliseres i et fast gel-nettverk laget av kalsium alginat gel. Immobilisering i et fast gel-nettverk kan ha flere fordeler sammenlignet med innkapsling i kapsler. Ved hjelp av denne metoden hemmes spermienes bevegelse som følge av gel-nettverket, noe som kan ligne forholdene i bitestikkelen (cauda epididymidis). En fysisk begrensning av bevegelse på grunn av høye konsentrasjoner av celler og høy viskositet kan være en av de faktorene som påvirker overlevelse og opprettholdelse av spermienes funksjonalitet under lagring i cauda epididymidis (Watson 1993). Det er innlevert en europeisk patentsøknad (PCT/NO07/00256) på denne teknologien.

K.s. hos storfe utføres i alt vesentlig grad med kryokonservert (frossen) sæd. Frossen sæd kan lagres i flytende nitrogen i flere tiår før det brukes. Når sæden tines må imidlertid inseminasjonen utføres i løpet av få timer, og etter inseminasjon har spermiene befruktningsevne i 12-24 timer. Dette innebærer at optimalt tidspunkt for inseminasjon med ordinært prosessert sæd er i området 24 til 6 timer før eggløsning, noe som krever kunnskap om brunst og tid til brunstobservasjon. Det er derfor behov for å utvikle nye konserveringsmetoder for sæd, der spermiene beholder befruktningsevnen i en lengre periode enn med dagens metode, og derved gjøre inseminasjonstidspunktet mindre kritisk. En konserveringsmetode som gir en kontrollert og langvarig frigjøring av spermier vil dessuten redusere behovet for synkronisering av brunst og hormonelt framprovosert eggløsning. Dette ville være økonomisk fordelaktig for bøndene og i tillegg gunstig med hensyn til dyrevelferd.

Resultater oppnådd

Fortynningsvæsker til sæd benyttes for å øke volumet, standardisere spermietallet i inseminasjonsdosene, gi bufferkapasitet, fysiologisk miljø i forhold til osmolaritet, næring til sædcellene, og for å kontrollere mikrobiologisk forurensning, samt å beskytte sædcellene mot fryse- og tineskader. Alle disse funksjonene er ivaretatt i teknologien til SpermVital. Teknologien er utviklet over tid, der hvert framskritt har vært vurdert både ved hjelp av *in vitro*-metoder som mikroskopi og flowcytometri og *in vivo* ved inseminasjonsforsøk. Resultater er målt som drektighetsresultater fra små pilotforsøk.

Lagring av immobiliserte spermier *in vitro* ved romtemperatur, med påfølgende frigjøring av sædcellene før inseminasjon viste at spermiene beholder befruktningsevnen under immobilisering. Lagring av immobiliserte spermier ved 37 ^{o} C i flere timer før de ble frigitt viste at det er mulig å forlenge sædcellenes levetid og befruktningsdyktige periode. Drektigheter ble oppnådd etter inseminasjon av immobiliserte sædceller en og to dager "for tidlig", noe som viste at teorien stemte. Alle disse, og flere andre forsøk, ble imidlertid utført med fersk sæd, noe det ikke er ønskelig å benytte innen k.s. hos storfe. Gjennombruddet på storfe kom da det lyktes å kombinere immobiliseringsteknologien med kryokonservering. De første kalvene som følge av k.s. en dag for tidlig med immobiliserte og kryokonserverte spermier ble født i 2008.

Det siste forsøket der det foreligger resultater ble utført i løpet av vinteren 2010. Ejakulater fra seks okser ble split-samplet, halvparten prosessert med ordinær kryokonserverings-prosedyre, og den andre halvparten prosessert med immobilisering. Kyr og kviger ble inseminert, der tre forsøksgrupper ble inkludert. En forsøksgruppe tjente som kontroll, og ble inseminert til ordinær tid i brunsten med vanlig prosessert sæd. Forsøksgruppe to ble inseminert til ordinær tid i brunsten med immobiliserte sædceller, og den tredje forsøksgruppen ble inseminert anslagsvis en dag for tidlig med immobiliserte spermier. Tre dyr ble sett under ett som en dyre-gruppe, bestående av enten kviger eller kyr, med ett dyr i hver forsøksgruppe, og hvor alle tre dyrene ble inseminert med sæd fra samme okse. Kun én inseminering pr dyr var tillatt. Drektighetsdiagnose ble stilt ved rektal undersøkelse 35-45 dager etter k.s.. Resultatene var like i de tre forsøksgruppene. Det relativt lave antall dyr tillot ikke noen statistisk behandling av data. Et større, blindt forsøk pågår. Sæden er behandlet som beskrevet ovenfor, og inkluderer sæd fra 16 ungokser med ukjent fruktbarhet. Kun to grupper lar seg inkludere, med likt inseminasjonstidspunkt, der bonden inseminerer til antatt optimal tid i brunsten. Det er tatt sikte på å ha minst 8000 førstegangs inseminasjoner i hver gruppe.

Parallelt med feltforsøk har det foregått og foregår fortsatt videre FoU med sikte på å forbedre teknologien og forlenge spermienes levetid i børen ytterligere.

Referanser

Conte U, Torre ML, Maggi L, Giunchedi P, Vigo D, Maffeo G, Russo V. Microcapsules containing seminal material for artificial insemination in pigs. European patent application 98122633.5-2114, 1998.

Faustini M, Torre ML, Stacchezzini S, Norberti R, Consiglio AL, Porcelli F, Conte U, Munari E, Russo V, Vigo D. Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensiometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18ºC. Theriogenology 2004 61:173-184

Faustini M, Riccardi A, Villani S, Russo V. A single insemination intervention in the sow with barium. Vet. Res. Commun. 2008 32(1): 147–149

Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. Science 1980 210(4472):908-10.

Maxwell WMC, Nebel RL, Lewis GS. Survival and fertility of micro-encapsulated ram spermatozoa stored at 5 ℃. Reprod. Dom. Anim. 1996 31:665-73.

Munkittrick TW, Nebel RL, Saacke RG. Accessory sperm numbers for cattle inseminated with protamine sulfate microcapsules. J. Dairy Sci. 1992 75(3):725-31.

Nebel RL, Bame JH, Saacke RG, Lim F. Microencapsulation of bovine spermatozoa. J. Anim. Sci. 1985 60(6):1631-39.

Nebel RL, Vishwanath R, McMillan WH, Pitt C. Microencapsulation of bovine spermatozoa: effect of capsule membrane thickness on spermatozoal viability and fertility. Anim. Repro. Sci. 1996 44:79-89

Torre ML, Maggi L, Vigo D, Galli A, Bornaghi V, Maffeo G, Conte U. Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads. Biomaterials 2000 21:1493-98.

Torre ML, Faustini M, Norberti R, Stacchezzini S., Maggi L, Maffeo G, Conte U, Vigo D. Boar semen controlled delivery system: storage and in vitro spermatozoa release. J. Contol. Release 2002 85:83-89.

Vishwanath R, Nebel RL, McMillan WH, Pitt C. Selected times of insemination with microencapsulated bovine spermatozoa affect pregnancy rates of synchronized heifers. Theriogenology 1997 48: 369-76.

Watson PF. The potential impact of sperm encapsulation technology on the importance of timing of artificial insemination: a perspective in the light of published work. Reprod. Fertil. Dev. 1993 5(6):691-99.