

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Irena ŠIMENC

**VPLIV KRIOPROTEKTORJA IN NAČINA
SHRANJEVANJA PETELINJEGA SEMENA NA
OPLOJENOST IN VALILNOST KOKOŠJIH JAJC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Irena ŠIMENC

**VPLIV KRIOPROTEKTORJA IN NAČINA SHRANJEVANJA
PETELINJEGA SEMENA NA OPLOJENOST IN VALILNOST
KOKOŠJIH JAJC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF CRYOPROTECTOR AND STORAGE OF ROOSTER
SEMEN ON FERTILITY AND HATCHABILITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

S tem diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstva – zootehniko. Delo je bilo opravljeno na Katedri za znanosti o rejah živali Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Dušana Terčiča.

Recenzent: doc. dr. Silvester ŽGUR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Antonija HOLCMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Dušan TERČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani različici.

Irena ŠIMENC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 636.5(043.2)=163.6
KG perutnina/kokoši/reprodukcija/jajca/oplojenost/valilnost/petelinje seme/shranjevanje/krioprotektor
KK AGRIS L53/6100
AV ŠIMENC, Irena
SA TERČIČ, Dušan (mentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2012
IN VPLIV KRIOPROTEKTORJA IN NAČINA SHRANJEVANJA PETELINJEGA SEMENA NA OPLOJENOST IN VALILNOST KOKOŠJIH JAJC
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 52 str., 15 pregl., 8 sl., 46 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Razvijali smo enostavno metodo za shranjevanje petelinjega semena, ki bi jo kasneje lahko uporabili kot referenčno metodo za shranjevanje semena slovenskih lokalnih pasem kokoši. V poskus smo vključili kokoši pasme slovenska rjava kokoš. Kokoši so bile razdeljene v več skupin s tremi ponovitvami znotraj vsake skupine. V kontrolni skupini smo jih osemenjevali z svežim in razredčenim semenom. Seme smo jemali po metodi trebušne masaže. Po vizualni oceni smo seme združili v skupno stekleničko in ga nato razredčili z Lakeovim razredčevalcem. V času poskusa smo preverili uporabnost štirih krioprotektorjev (glicerol, N-metilacetamid (MA), dimetilacetamid (DMA), dimetil sulfoksid (DMSO)), dveh metod shranjevanja (plastične tubice, peleti) in več temperaturnih profilov ter njihov vpliv na uspeh globokega zamrzovanja semena. Z odtajanim semenom smo osemenjevali kokoši, zbirali jajca in jih tedensko vlagali v inkubator. Ob izvalitvah smo prešteli izvaljene piščance, na neizvaljenih pa ugotavljali vzroke neizvalitve (neoplojena jajca, zamrti zarodki). DMSO-dimetilsulfoksid je bil edini od štirih krioprotektorjev, ki je petelinjim spermijem zagotovil določeno zaščito pred poškodbami v času zamrzovanja. Na sveže spermije je deloval toksično. Oplojenost jajc je bila v skupini, kjer smo seme zmrznili le na -20°C (19,93 %) značilno boljša od oplojenosti jajc v skupini, kjer smo seme hranili v tekočem dušiku na -196°C (2,61 %).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 636.5(043.2)=163.6
CX poultry/reproduction/eggs/fertility/hatchability/rooster semen/storage/cryoprotector
CC AGRIS L53/6100
AU ŠIMENC, Irena
AA TERČIČ, Dušan (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2012
TI EFFECT OF CRYOPROTECTOR AND STORAGE OF ROOSTER SEMEN ON FERTILITY AND HATCHABILITY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 52 p., 15 tab., 8 fig., 46 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We developed a simple method for storing rooster semen that would later be used as a reference method for storing semen of Slovenian local breeds of chickens. In the experiment we had a breed of Slovenian Brown hen. Hens were divided into several groups with three replicates within each group. The control group was inseminated with fresh and diluted semen. Semen was taken by abdominal massage. After visual evaluation we collected semen together in a common glass tube and diluted it with Lake extender. During the experiment we examined the usefulness of four cryoprotectors to protect the semen from the effects of cryopreservation (glycerol, N-methylacetamide (MA), dimethylacetamide (DMA), dimethyl sulfoxid (DMSO)), tested two methods of storage (plastic tubes, pellets) and tested the temperature profile of semen storage. With defrosted semen we inseminated hens and collected eggs which were weekly invested in the incubator. At hatching the chicks were picked up, on non-hatched eggs the causes of non-hatching (unfertilized eggs, dead embryo) were examined. DMSO-dimethylsulfoxide was the only one of the four cryoprotectants which provided rooster sperm some protection against the harm in the time of freezing. On fresh semen DMSO acted toxic. Fertilization of eggs in the group where we just froze semen at -20°C (19,93 %) was significantly better than the fertilization of eggs in the group, where the semen was stored in liquid nitrogen at -196°C (2,61 %).

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA	3
2.2 POMEN GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA	4
2.3 SEME V REPRODUKCIJSKEM TRAKTU KOKOŠI	7
2.4 TEHNIKE OSEMENJEVANJA PERUTNINE	8
2.5 OSNOVNI PRINCIPI GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA	9
2.5.1 Razredčevalci semena	10
2.5.2 Krioprotektorji	11
2.6 FIZIKA KRIOPREZERVACIJE	14
2.6.1 Zamrzovanje in poškodbe celic	14
2.6.2 Krioprotektorji in zaščita celic	15
2.6.3 Vitifikacija kot alternativa zamrzovanju	16
2.7 TEHNIKE GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA PERUTNINE	18
2.7.1 Kakovost odtajanega semena	22
2.8 IZBOLJŠAVE V METODAH GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA	24

3	MATERIAL IN METODE DELA	26
3.1	PRVI DEL – TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILACETAMIDA (DMA) IN METILACETAMIDA (MA)	27
3.2	DRUGI DEL – TESTIRANJE ČASA EKVILIBRACIJE IN KONCENTRACIJE KRIOPROTEKTORJA	28
3.3	TRETJI DEL – TESTIRANJE DVEH NAČINOV SHRANJEVANJA SEMENA	29
3.4	ČETRTI DEL - TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILSULFOKSIDA (DMSO), GLICEROLA IN DIMETILACETAMIDA (DMA)	30
3.5	PETI DEL – TESTIRANJE TEMPERATURNEGA PROFILA ZAMRZOVANJA	31
3.6	ŠESTI DEL – TESTIRANJE POSTOPNEGA ZAMRZOVANJA V TEKOČEM DUŠIKU	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	35
4.1	TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILACETAMIDA (DMA) IN METILACETAMIDA (MA)	35
4.2	DRUGI DEL – TESTIRANJE ČASA EKVILIBRACIJE IN KONCENTRACIJE KRIOPROTEKTORJA	36
4.3	TRETJI DEL – TESTIRANJE DVEH NAČINOV SHRANJEVANJA SEMENA	37
4.4	ČETRTI DEL - TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILSULFOKSIDA (DMSO), GLICEROLA IN DIMETILACETAMIDA (DMA)	39
4.5	PETI DEL – TESTIRANJE TEMPERATURNEGA PROFILA ZAMRZOVANJA	40
4.6	ŠESTI DEL – TESTIRANJE POSTOPNEGA ZAMRZOVANJA V TEKOČEM DUŠIKU	41
5	SKLEPI	45
6	POVZETEK	46
7	VIRI	48
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemijska sestava »Lakeovega« razredčevalca (Pegg, 2007)	26
Preglednica 2: Razporeditev skupin in število živali na skupino v prvem delu poskusa	28
Preglednica 3: Razporeditev skupin in število živali na skupino v drugem delu poskusa	28
Preglednica 4: Razporeditev skupin in število živali na skupino v tretjem delu poskusa	29
Preglednica 5: Razporeditev skupin in število živali na skupino v četrtem delu poskusa	31
Preglednica 6: Razporeditev skupin in število živali na skupino v petem delu poskusa	32
Preglednica 7: Razporeditev skupin in število živali na skupino v šestem delu poskusa	33
Preglednica 8: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMA in MA	35
Preglednica 9: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMA in MA ob podaljšanem času ekvibracije	36
Preglednica 10: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMA in MA ter ob dveh načinih pakiranja semena	38
Preglednica 11: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMSO, glicerol in DMA	39
Preglednica 12: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorja DMSO	40
Preglednica 13: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorja DMSO in ob ohlajevanju semena v parah tekočega dušika	41
Preglednica 14: Odstotki oplojenosti in valilnosti v štirih poskusnih skupinah petega in šestega dela poskusa	42
Preglednica 15: Odstotki zamrtih zarodkov v štirih poskusnih skupinah petega in šestega dela poskusa	43

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prerez blastodiska (prirejeno po Telolecital ..., 2012)	5
Slika 2: Diagram korakov pri obnovitvi določene pasme/linije perutnine z uporabo himernih osebkov (prirejeno po Petite, 2006)	6
Slika 3: Oploditev ženske spolne celice v jajcevodu kokoši (prirejeno po What ..., 2012)	8
Slika 4: Celice pred zamrzovanjem (A) in celice po zamrzovanju (B). Celice so po zamrzovanju stisnjene med ledene kristale in izpostavljene letalnim koncentracijam soli. Zaradi naraščajoče koncentracije soli v nezamrznjeni tekočini, ki celice obdaja, le te dehidrirajo (Wowk, 2007).	15
Slika 5: Osnovni koncept kriozaščite celic (prirejeno po Wowk, 2007)	16
Slika 6: Shematska primerjava globokega zamrzovanja in vitrifikacije (prirejeno po Wowk, 2007)	17
Slika 7: Morfologija spermija (prirejeno po Male ..., 2012)	19
Slika 8: Spermiji petelina in žrebca (Parrish, 2012)	19

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MA	N-metilacetamid (N-methylacetamide)
DMA	dimetilacetamid (dimethylacetamide)
DMSO	dimetilsulfoksid (dimethyl sulfoxid)
DMF	dimetilformamid (dimethylformamide)
PVP	polivinilpirolidon (polyvinylpyrrolidone)
BPSE	Beltsville Poultry Semen Extender (razredčevalec)

1 UVOD

Zaščita domačih živali pred kužnimi boleznimi je eden od temeljev ohranjanja genetske pestrosti domačih živali. Zgodovina nas uči, da lahko kužne bolezni in ukrepi, ki jih ob izbruhu takih bolezni izvajamo, močno ogrozijo posamezne pasme, še zlasti, če je populacija majhna, reje pa koncentrirane. V Sloveniji redimo šest tradicionalnih in eno avtohtono pasmo kokoši. Tradicionalne pasme redimo le na eni lokaciji in vse pasme ohranjamo samo v obliki živih živali. Vsaj delno zaščito omenjenih pasem v primerih izbruha epidemij bi bilo mogoče doseči s krioprezervacijo (globokim zamrzovanjem) njihovega genetskega materiala. V perutninarstvu (še) ne poznamo metode, ki bi omogočala uspešno globoko zamrzovanje ženskih spolnih celic oziroma zarodkov. Edina opcija zato ostaja globoko zamrzovanje semena. Ta tematika je že več kot 60 let predmet številnih raziskav in v tem času so raziskovalci predstavili številne tehnike, pri čemer so za vsako od njih značilne določene specifikke v pogledu uporabljenega razredčevalca, redčitvenega razmerja, hitrosti in načina ohlajanja, uporabljenega krioprotektorja, pogojev zamrzovanja, načina pakiranja semena, postopkov tajanja pred osemenjevanjem in načinov osemenjevanja kokoši. Pomemben korak v postopku globokega zamrzovanja semena je izbira in uporaba krioprotektorja. V preteklosti je bilo uporabljenih več krioprotektorjev, kot na primer glicerol, dimetilsulfoksid, dimetilacetamid, metilacetamid itn. Če kokoši osemenimo z zadostnim številom spermijev, lahko z uporabo kateregakoli krioprotektorja dosežemo zadovoljivo oplojenost jajc (Tselutin in sod., 1999). Pomembna dodatna spremenljivka postopka globokega zamrzovanja semena je način pakiranja semena.

Skupni imenovalec vseh doslej znanih tehnik globokega zamrzovanja petelinjega semena je velika variabilnost in slaba ponovljivost rezultatov. Kar nekaj tehnik zahteva uporabo sofisticirane laboratorijske opreme (npr. naprav za postopno programirano zamrzovanje, naprav za polnjenje semena v slamice, naprav za dializo/centrifugiranje semena z namenom odstranitve glicerola pred osemenjevanjem), kar podaljša postopek njegove priprave, obenem se zaradi daljše priprave poveča pogostnost poškodb semena in posledično poslabša njegova oploditvena sposobnost.

Z raziskavo, ki je opisana v pričujočem diplomskem delu smo želeli testirati uporabnost nekaterih doslej opisanih tehnik globokega zamrzovanja semena v pogojih farmske reje, brez zatekanja v laboratorij in uporabe drage opreme. Testirali smo štiri krioprotektorje, dva načina pakiranja semena in dva različna temperaturna profila zamrzovanja. S testiranjem različnih metod smo želeli ugotoviti, katera bi bila kljub svoji enostavnosti in robustnosti najbolj uporabna za shranjevanje semena slovenske avtohtone in tradicionalnih pasem kokoši.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA

Globoko zamrzovanje spolnih celic perutnine je v središču zanimanja znanstvenikov že več kot sto let. Luyet in Gehenio (1940, cit. po Blesbois, 2006) v svoji monografiji navajata najpomembnejše znanstvene dosežke na področju kriobiologije kokošjih jajc v letih od 1736 do 1936. Po letu 1936 je sledilo petletno obdobje, ko je bilo na spolnih celicah perutnine opravljenih malo raziskav. Leta 1941 so Shaffner in sodelavci (cit. po Blesbois, 2006) dokazali, da je mogoče z osemenjevanjem kokoši z zamrznjenim semenom priti do oplojenih jajc, čeprav se v njihovem poskusu ni izvalil noben piščanec. Po spletu naključij so leta 1949 Polge in sodelavci odkrili zaščitno vlogo glicerola pred škodljivimi učinki nizkih temperatur. Petelinji spermiji razredčeni z 20% raztopino glicerola in zamrznjeni na -79°C po končanem postopku hitrega tajanja niso kazali slabše gibljivosti od spermijev v nezamrznjenih vzorcih (Blesbois, 2006). Poskus Polge-ja in sod. iz leta 1949 predstavlja temeljni mejnik v razvoju globokega zamrzovanja semena (Donoghue in Wishart, 2000). Od tega leta naprej je bilo opravljenih nešteto raziskav s ciljem izboljšanja in poenotenja metod za dolgotrajno shranjevanje semena številnih vrst domačih živali. Pri perutnini je bilo največ tovrstnih študij opravljenih na kokoših in purah, sledijo še race, gosi in pegatke (Blesbois, 2006). Od šestdesetih let 20. stoletja osemenjevanje rutinsko izvajajo le v komercialnih matičnih jatah pur. Velika razlika v telesni masi med spolno zrelim samcem (cca 33 kg) in spolno zrelo samico (cca 9 kg) ne omogoča, da bi naravno parjenje zagotavljalo dobro oplojenost jajc, zaradi česar je osemenjevanje pri purah nuja. Jajcevoda gosi ali race ni mogoče izvrniti na način, kot je to možno storiti pri kokoši ali puri. To dejstvo in manjše komercialne potrebe omejujejo razširjenost osemenjevanja gosi ali rac (Donoghue in Wishart, 2000). Kljub velikim vložkom raziskovalne skupnosti v raziskave na področju krioprezervacije semena, se v komercialnem perutninarstvu globoko zamrznjenega semena ne uporablja prav pogosto. Razloga za to sta dva. Prvič, osemenjevanje, ki sta ga prvič opisala Burrows in Quinn leta 1937 (Donoghue in Wishart, 2000; Floote, 2002) se pri udomačenih vrstah perutnine v glavnem ne koristi.

Osemenjevanje s svežim semenom je našlo širšo uporabo le pri reji pur in pegatk, manj se koristi pri kokoših, gosih, racah, prepelicah, nojih in emujih.

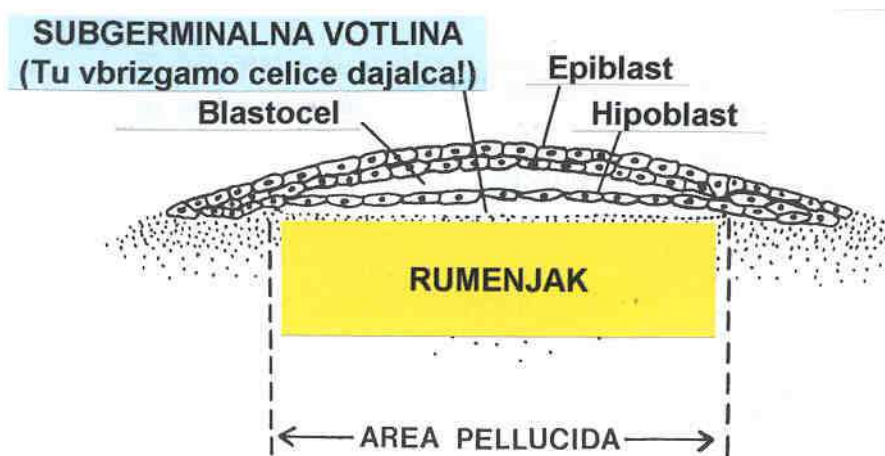
Drugič, uspeh postopkov globokega zamrzovanja semena je zelo spremenljiv in odvisen od vrste perutnine. Stroški priprave, skladiščenja in uporabe zamrznjenih ejakulatov ostajajo v primerjavi s tržnimi cenami dan starih piščancev relativno visoki (Blesbois, 2006).

2.2 POMEN GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA

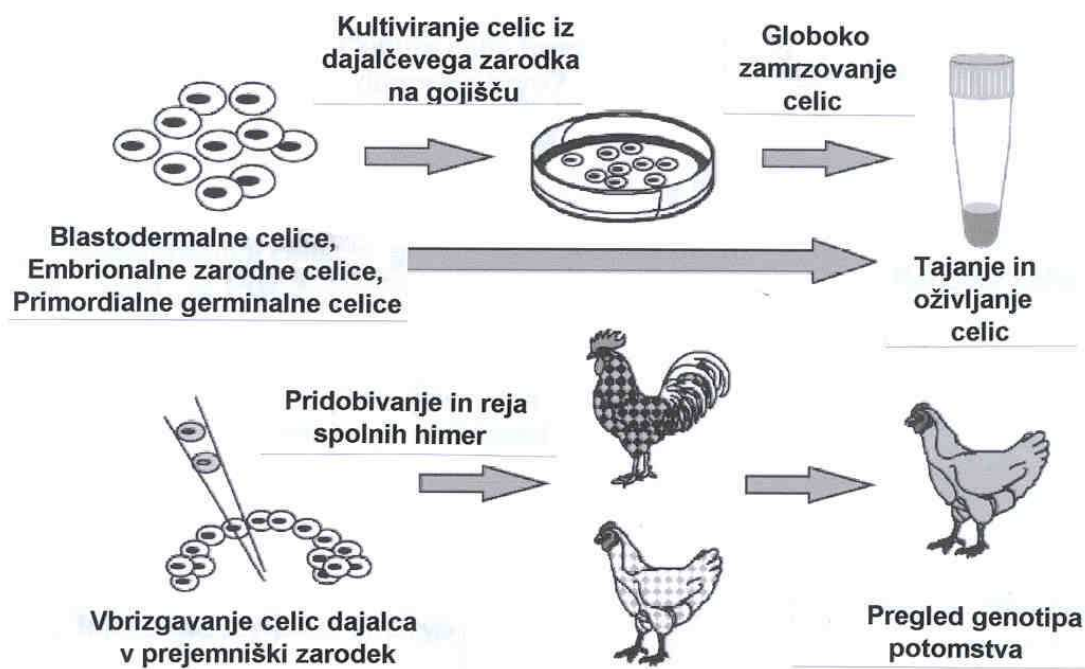
Pomen globokega zamrzovanja perutninskega semena je velik, saj zajema številna področja. V svojih razpravah avtorji izpostavljajo njegov pomen za ohranjanje biotske raznovrstnosti (Fulton, 2006; Blesbois in sod., 2007; Blesbois, 2007; Blesbois in Brillard, 2007; Larivière in Leroy, 2008), shranjevanje/ohranjanje genskih virov (mutanti, čiste, selekcionirane ter specializirane linije, pritlikave in okrasne pasme, avtohtone ter redke pasme) (Fulton, 2006; Blackburn, 2006; Blackburn in sod., 2009; Woelders in sod., 2006; Blesbois in sod., 2007; Blesbois in Brillard, 2007; Gliozzi in sod., 2011), shranjevanje biološkega materiala za primere pojava nevarnih bolezni in epidemij (ptičja gripa, kokošja kuga, limfoidna levkemija idr.) (Fulton, 2006; Blesbois, 2007; Blesbois in sod., 2007; Santiago-Moreno in sod., 2009), intenziviranje in širjenje genetskega napredka (Blesbois, 2007), zagotavljanje perspektive v perutninsko-živilski industriji (Fulton, 2006), ohranjanje ljubiteljske reje (Fulton, 2006) in varovanje genskega materiala posameznih vrst v primeru nesreč (požari, neurja idr.) (Fulton, 2006). Ohranjanje genetske variabilnosti pri domačih živalih je osnova za trajnostno pridobivanje hrane, za upravljanje z zemljišči ter širše za ohranjanje biotske raznovrstnosti. Po navedbah Dohnerja (2001, cit. po Blesbois in sod., 2007) je obstoj približno polovice pasem kokoši ogrožen. Vzroki za to so različni, od strukturnih sprememb na podeželju, komercialnih zahtev intenzivne prireje jajc/mesa in izpostavljenosti boleznim. Krioprezervacija semena predstavlja enega od načinov za ohranjanje genskih virov v perutninarstvu (Tselutin in sod., 1999). Ker so pri pticah samice heterogametne (spolna kromosoma Z in W), samci pa homogametni (samo spolni kromosom Z), z zamrzovanjem semena ohranimo samo genom samca. Do prvotnega genotipa pridemo po 1-6 generacijah povratnih križanj (Blesbois in sod., 2007). Z zamrzovanjem zarodkov in ženskih spolnih celic (oocit) bi ohranili spolni kromosom W,

vendar omenjenih postopkov pri pticah (še) ni mogoče uspešno izpeljati. Glavne težave pri globokem zamrzovanju jajčnih celic in zarodkov so povezane s specifično zgradbo jajčne celice in z njeno zgodnjo delitvijo v jajcu, že pred znesenjem slednjega.

Ohranitev celotnega genoma je možno doseči z zamrzovanjem celic blastoderma, embrionalnih zarodnih celic ali primordialnih germinalnih celic (Petitte, 2006). Postopek rekonstitucije (obnovitve) neke pasme/linije perutnine poteka v dveh korakih (sliki 1 in 2).



Slika 1: Prerez blastodiska (prirejeno po Telolecital ..., 2012)



Slika 2: Diagram korakov pri obnovitvi določene pasme/linije perutnine z uporabo himernih osebkov (prirejeno po Petite, 2006)

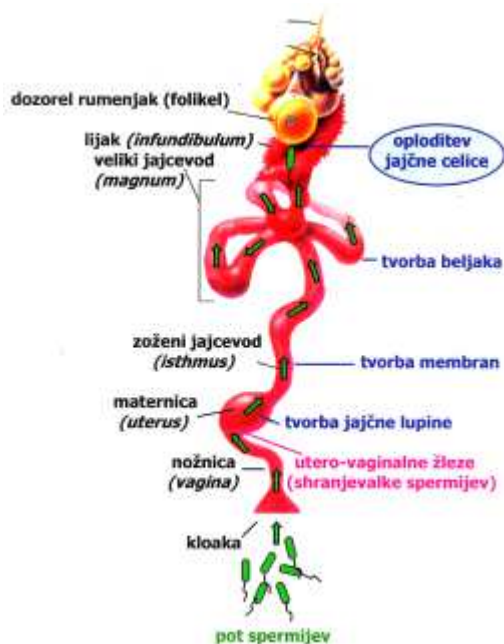
Celice blastoderma, embrionalne zarodne celice ali primordialne germinalne celice dajalca najprej odtajamo in vbrizgamo v prejemniški zarodek. Celice dajalca morajo biti vbrizgane v prejemniški zarodek na isti stopnji razvoja. Tako dobimo himerni osebek, to je osebek, ki je sestavljen iz genetsko različnih celic (celic dajalca + celic prejemnika). Himerizem se lahko odraža tako v somatskih celicah kot tudi v gonadah. Če himerizem zajame gonade, govorimo o spolnih himerah, ki lahko proizvajajo tudi dajalčeve spolne celice in tako prenašajo dajalčeve gene na potomstvo (Petitte, 2006). V drugem koraku nastale moške in ženske himerne osebke parimo med seboj in dobimo potomce, ki imajo genotip dajalca (prvotne pasme/linije). Čeprav je opisani postopek izvedljiv, metoda ni dovolj učinkovita, predvsem pa je njena izvedba predraga za rutinsko uporabo. Edini učinkovit način za krioprezervacijo biološkega materiala v perutninarstvu zato ostaja zamrzovanje semena (Blesbois in sod., 2007).

2.3 SEME V REPRODUKCIJSKEM TRAKTU KOKOŠI

Spermiji lahko v reprodukcijskem traktu (slika 3) samic perutnine preživijo več dni oziroma tednov in oplojujejo jajčne celice (Bakst, 1993, cit. po Donoghue in Wishart, 2000). V velikem jajcevodu ter na prehodu iz nožnice v maternico so prisotna tako imenovana »gnezda spermijev« oziroma žleze imenovane »shranjevalke spermijev«, kjer se po opravljeni kopulaciji oziroma osemenjevanju seme skladišči in dalj časa ohranja oploditveno sposobnost (Mosenene, 2009). Pri telesni temperaturi 41°C obdržijo petelinji spermiji gibljivost več dni ali celo več tednov po ejakulaciji. Kako spermiji vstopijo, preživijo in izstopajo iz shranjevalk spermijev ni znano. Znano je le, da se v shranjevalke spermijev naselijo samo vitalni spermiji (Mosenene, 2009). Zadnje raziskave kažejo, da poteka sproščanje shranjenih spermijev epizodno, čeprav je najprej obstajalo prepričanje, da poteka v povezavi z znesenjem jajca (ovipozicijo). Spermiji se po jajcevodu kokoši pomikajo zahvaljujoč blagim mišičnim kontrakcijam in/ali delovanju migetalk. Akumulirajo se v mukoznih gubah v spodnjem delu velikega jajcevoda (Hafez B in Hafez ESE, 2000, cit. po Mosenene, 2009). Spermiji sesalcev preživijo v reprodukcijskem traktu samic relativno kratek čas, za razliko od spermijev petelina, ki ostanejo v jajcevodu kokoši sposobni oploditve do 32 dni, spermiji purana pa v jajcevodu pure tudi do 70 dni (Hafez B in Hafez ESE, 2000, cit. po Mosenene, 2009).

Čeprav v zvezi s podaljšanim zadrževanjem spermijev v shranjevalkah spermijev še marsikaj ostaja nepojasnjeno, Tabatabaei in sod. (2009) navajajo, da pride v tem času do povratnega zavrtja dihanja in gibljivosti spermijev kot tudi do stabilizacije plazmatske membrane in ohranjanja akrosoma. Spermiji zapuščajo shranjevalke spermijev in oplojujejo ovulirane jajčne celice v enakomernih časovnih intervalih (Mauldin, 2000, cit. po Mosenene, 2009). Po sprostitvi iz shranjevalk poskrbijo za gibanje spermijev po jajcevodu navzgor kontrakcije jajcevoda in gibljivost spermijev v precejšnji meri izgubi na pomenu. V petih do desetih minutah po ovulaciji spermiji dosežejo področje zarodnega diska na površini jajčne celice (Mosenene, 2009). Prednji del glave spermija pokriva akrosom, ki ima posebno vlogo pri oploditvi jajčeca. Akrosom izloča tripsinu podoben encim akrosin, ki hidrolizira perivitelinsko plast jajčne celice in s tem omogoči oploditev

jajčne celice. Teoretično oplodi jajčno celico en sam spermij, čeprav je bilo v perivitelinski plasti kokošje jajčne celice opaženih več hidroliziranih odprtin, kar kaže na polispermijo (Hafez B in Hafez ESE, 2000, cit. po Mosenene, 2009).



Slika 3: Oploditev ženske spolne celice v jajcevodu kokoši (prirejeno po What ..., 2012)

2.4 TEHNIKE OSEMENJEVANJA PERUTNINE

Leta 1937 sta v ZDA dva znanstvenika (Burrows in Quinn, cit. po Mosenene, 2009) opisala enostavno in učinkovito metodo za pridobivanje petelinjega semena. Metoda temelji na masaži določenih delov telesa, kar spolno vzdraži plemenjaka in pripelje do ejakulacije. Za jemanje semena sta potrebna dva izurjena človeka: eden, ki drži žival in izvaja masažo ter drugi, ki mu pomaga in v trenutku ejakulacije prestreže spermo v posebej oblikovano epruveto. Seme se izliva v kloako, kjer se končuje tudi prebavni trakt in sečevod. Ker je kloaka skupno izvodilo za blato, seč in seme, je treba pri jemanju semena paziti, da se mu ne primešajo ostanki nečistoč (blata, uratov, krvi) (Łukaszewicz, 2002). Osemenjevanje kokoši izvajamo v popoldanskem času, ko jih večina že znese jajce. Jajce nam lahko namreč seme mehansko potisne iz jajceveda. Pri osemenjevanju kokoši morata

biti prisotna dva izurjena človeka. Eden drži kokoš naslonjeno na levem boku (pod levo pazduho) in s pritiskom roke na trebuh in kloako povzroči izvrnjenje zadnjega dela jajcevoda. Tedaj pomočnik potisne osemenjevalno pipeto (tuberkulinsko brizgo) približno 2-3 cm globoko v levi jajcevod, približno do mesta, kjer se nahajajo shranjevalke spermijev (Donoghue in Wishart, 2000). Preden vbrizga seme mora tisti, ki drži žival, popustiti s pritiskom na trebuh, da se vagina vrne v normalen položaj. V kolikor tega ne stori je možno, da se seme iz jajcevoda zlije v kloako. Jajca so oplojena drugi dan po osemenjevanju (Martin, 2004, cit. po Mosenene, 2009). Na začetku kokoši osemenimo dvakrat (dva dneva) zaporedoma, kasneje jih dosemenjujemo enkrat tedensko. Za zadovoljivo enotedensko oplojenost kokošnjih jajc potrebujemo 100 do 200 milijonov vitalnih spermijev (Gordon, 2005, cit. po Mosenene, 2009).

Poleg osemenjevanja z vbrizgavanjem semena v nožnico, poznamo tudi osemenjevanje neposredno skozi trebušno votlino (Long in Kulkarni, 2004). Pri tej tehniki z iglo prebodemo trebušno votlino, nato skozi nastalo odprtino potisnemo cevčico in po njej spustimo seme v področje lijaka jajcevoda. Omenjena tehnika osemenjevanja ne daje predvidljivih rezultatov in se jo koristi predvsem v poskusne namene (Mosenene, 2009).

2.5 OSNOVNI PRINCIPI GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA

Krioprezervacija je postopek, pri katerem posamezne celice ali celotna tkiva ohranimo na način, da jih ohladimo na zelo nizke temperature (običajno na -196°C kar je vrelišče tekočega dušika). Pri tako nizkih temperaturah ustavimo vsakršno biološko aktivnost, vključno z biokemijskimi reakcijami, ki vodijo v celično smrt (Özkavukcu in Erdemli, 2002). Blesbois (2007) opisuje krioprezervacijo kot nefiziološko metodo, ki od celic zahteva veliko prilagajanja, saj te v času procesa zamrzovanja doživijo osmotski in temperaturni šok. Poškodbe, do katerih pride med zamrzovanjem in tajanjem, v največji meri prizadenejo celične membrane kar vpliva na oploditveno sposobnost spermijev in njeno trajanje. Kritični mejniki z vplivom na celično strukturo in njen metabolizem so način shranjevanja semena, temperaturna krivulja zamrzovanja/tajanja in učinek krioprotektorja v blažitvi temperaturnega stresa (Blesbois, 2007, 2011). Ko govorimo o

globokem zamrzovanju običajno mislimo na zamrzovanje v tekočem dušiku pri -196°C , vendar Morris (2007) navaja, da je uspešno zamrzovanje možno že pri temperaturi nižji od -150°C . Prepričan je, da je shranjevanje biološkega materiala lažje z uporabo posebnih zamrzovalnikov kot v tekočem dušiku. Pri zamrzovanju v tekočem dušiku Morris (2007) omenja nevarnost onesnaženja vzorcev in kot vir onesnaženja navaja tako pripomočke za zamrzovanje kot tekoči dušik sam.

2.5.1 Razredčevalci semena

Razredčevalci so puferske raztopine soli, katerih sestava temelji na biokemijski sestavi petelinjega oziroma puranjega semena (Donoghue in Wishart, 2000). Obstaja več različnih razredčevalcev, nekega standardnega ni. Znanstveniki testirajo posamezne razredčevalce v različnih pogojih (čas in pogostnost osemenjevanja, globina osemenjevanja, uporabljena koncentracija semena), zato je težko izdvojiti prednosti posameznega razredčevalca. Kljub temu velja, da vsi razredčevalci vsebujejo tri skupne komponente (Mosenene, 2009):

- sestavine za vzdrževanje ustreznega pH semena
- sestavine za ohranjanje osmolarnosti
- sestavine, ki zagotavljajo vir energije za spermije

Kislost oziroma bazičnost (pH) razredčevalca vpliva na metabolizem in gibljivost spermijev. Nizek pH zmanjšuje gibljivost, nastajanje mlečne kisline in potrebe spermijev po kisiku medtem ko visok pH metabolizem pospešuje. Pufri vsebujejo mešanico kisline in njene konjugirane baze vzdržujejo pH v sprejemljivih okvirih. Običajno pufri sestojijo iz mešanic fosfatov, citratov in/ali organskih zwitterionskih molekul kot so npr. *N,N*-bis_2-hidroksietil-2-aminoetan sulfonska kislina - BES in *N*-Tris hidroksimetil-2-aminoetan sulfonska kislina - TES. S trajanjem skladiščenja semena nastaja mlečna kislina, ki znižuje pH. Petelinji in puranji spermiji tolerirajo pH v razponu od 6,0 do 8,0 (Donoghue in Wishart, 2000).

Perutninsko seme lahko ohranja oploditveno sposobnost v razredčevalcih z osmolarnostjo v mejah od 250 do 460 mosM/kg H_2O . Če damo spermije v raztopino z nizko osmolarnostjo, bo voda prehajala v spermije in ti bodo nabrekli. V hiperosmotski

raztopini spermiji izgubljajo vodo in se krčijo (Bakst, 1980, cit. po Donoghue in Wishart, 2000). V hipoosmotskih razmerah se pojavlja večje število spermijev z ukrivljenimi vratovi. Gre za okvaro, na katero je mogoče pogosto naleteti v razredčenem petelinjem ali puranjem semenu in nastopa v negativni korelaciji z oplojenostjo jajc (Bajpai in Brown, 1964, cit. po Donoghue in Wishart, 2000; Clark in sod., 1984, cit. po Donoghue in Wishart, 2000).

Razredčevalci morajo spermije zaščititi pred hladnim šokom v času zamrzovanja, zagotavljati potrebna hranila za metabolizem spermijev ter vsebovati penicilin in streptomycin, ki zavirata mikrobiološko rast v semenu. Pri razvoju razredčevalcev in sistemov shranjevanja perutninskega semena je treba upoštevati fiziološke razlike v metabolnih zahtevah spermijev različnih vrst perutnine (Mosenene, 2009). Petelinji spermiji so metabolno aktivni v aerobnih in anaerobnih pogojih in vitro. V nasprotju z njimi zahtevajo puranji spermiji za preživetje veliko kisika. Aerobni metabolizem zahteva zračenje purjega semena, kar se v praksi doseže na način, da seme v odprti steklenički stresamo na stresalniku. Poskusi z osemenjevanjem kokoši z globoko zamrznjenim semenom so zastavljeni različno, vendar je iz različnih poskusov mogoče sklepati, da se odstotek oplojenih jajc giblje okrog 40-50 % (Donoghue in Wishart, 2000).

2.5.2 Krioprotektorji

Krioprotektor je substanca, ki jo uporabimo za zaščito bioloških tkiv pred poškodbami zaradi zamrzovanja oziroma tvorbe ledenih kristalov (Özkavukcu in Erdemli, 2002). Znano je, da v telesih žuželk, rib, dvoživk in plazilcev, ki živijo v arktičnih področjih ter na Antarktiki nastajajo krioprotektorji, ki jih v mrzlih zimskih obdobjih obvarujejo pred poškodbami tkiv. Žuželke kot krioprotektorje najpogosteje koristijo sladkorje, arktične žabe glukozo, arktičnemu močeradu kot krioprotektor služi glicerol, ki nastaja v njegovih jetrih. Krioprotektorji delujejo na principu povečevanja koncentracije raztopljenih snovi v celici. Klasični krioprotektorji so glikoli (alkoholi z vsaj dvema hidroksilnima skupinama) kot so npr. etilenglikol, propilenglikol in glicerol (Özkavukcu in Erdemli, 2002). Etilenglikol uporabljajo v avtomobilskih hladilnikih kot antifris, propilenglikol uporabljajo za omejevanje nastajanja ledu v sladoledih. Vse kemikalije, ki se raztapljajo v vodi seveda

niso krioprotektorji. Dobri krioprotektorji morajo biti ne le topni v vodi, temveč tudi učinkoviti v zniževanju tališča vode, ne smejo precipitirati (se obarjati) oziroma tvoriti hidratov, zlahka morajo prodirati v celice in zanje ne smejo biti strupeni (Wowk, 2007). Vsi krioprotektorji tvorijo vodikove vezi z vodo. Od odkritja glicerola kot prvega krioprotektorja leta 1949, je bilo za krioprotektorje razglašanih že približno 100 spojin, čeprav se jih v kriobiologiji rutinsko uporablja le peščica. Najboljši in najbolj pogosto uporabljeni krioprotektorji sodijo v razred tako imenovanih predirajočih (penetracijskih) krioprotektorjev. Gre za majhne molekule, ki zlahka prodrejo skozi celične membrane. Z vstopom v celice jih zavarujejo pred rastjo kristalov in pred pretirano dehidracijo v času zamrzovanja (Wowk, 2007).

V kriobiologiji velja zamrzovanje posameznih celic v primerjavi z zamrzovanjem tkiv/organov za enostavnejše, kajti v primeru posameznih celic moramo upoštevati samo fizikalno-kemijske lastnosti enega tipa celic. Paradoksalno je dejstvo, da so spermiji oziroma oocite sicer posamezne celice, vendar dokaj občutljive na krioprezervacijski stres. Verjetno je to povezano z njihovo visoko specializirano strukturo in funkcijo rekonstitucije celotnega organizma z zlitjem dveh celic (Wowk, 2007).

Zamrzovanje v tekočem dušiku zagotavlja vitalnost biološkega materiala skoraj neomejeno dolgo. Dokaz za to je najstarejši vzorec bikovega semena, ki tudi po 60-ih letih skladiščenja v tekočem dušiku ne kaže manjše vitalnosti. S krioprezervacijo povezani stresi niso mutageni: milijoni goved izhajajo iz osemenjevanja z globoko zamrznjenim semenom pri čemer je pogostnost okvar identična kot pri tistih, ki izhajajo iz uporabe nezamrznjenega semena.

Največkrat uporabljeni krioprotektorji pri zamrzovanju petelinjega semena so glicerol, dimetilsulfoksid (DMSO), dimetilacetamid (DMA), dimetilformamid (DMF), etilenglikol in propilenglikol (Surai in Wishart, 1996). DMSO se veliko uporablja kot alternativo glicerolu. Ima pufersko kapaciteto, zelo hitro prodira v celice spermijev in je učinkovit pri počasnem zamrzovanju semena. Hkrati je zelo koristen kot dehidracijsko sredstvo. V mešanici DMSO in razredčevalca se giblivos spermijev ohranja, v kolikor se seme pred

globokim zamrzovanjem postopno ohladi na +5°C. Rezultati kažejo, da je razredčevalec z 10 % vsebnostjo DMSO učinkovitejši v kriozaščiti spermijev od preostalih krioprotektorjev (Han in sod., 2005). Največkrat uporabljeni krioprotektor v krioprezervaciji semena je glicerol. Je standardni krioprotektor pri globokem zamrzovanju semena v govedoreji. Njegovi poglavitni odliki sta sposobnost vezave vode ter zniževanje zmrziščne točke raztopine. Glicerol prodre v celico spermija, jo delno dehidrira ter na ta način zmanjša tveganje zaradi kristalizacije vode (Bearden in sod., 2004, cit. po Mosenene, 2009). Na gibljivost in preživetje spermijev močno vpliva njegova končna koncentracija, ki je odvisna od uporabljenega razredčevalca. Če razredčevalec vsebuje citrat iz jajčnega rumenjaka ali polnomastno mleko je optimalna 7 % koncentracija, v primeru uporabe posnetega mleka je boljša 10 % koncentracija glicerola. Jajčni rumenjaki vpliva na učinkovitost glicerola zaradi česar količina dodanega rumenjaka narekuje količino uporabljenega glicerola. Večja kot je koncentracija jajčnega rumenjaka v razredčevalcu, večjo količino glicerola mu je potrebno dodati (Maule, 1962, cit. po Mosenene, 2009).

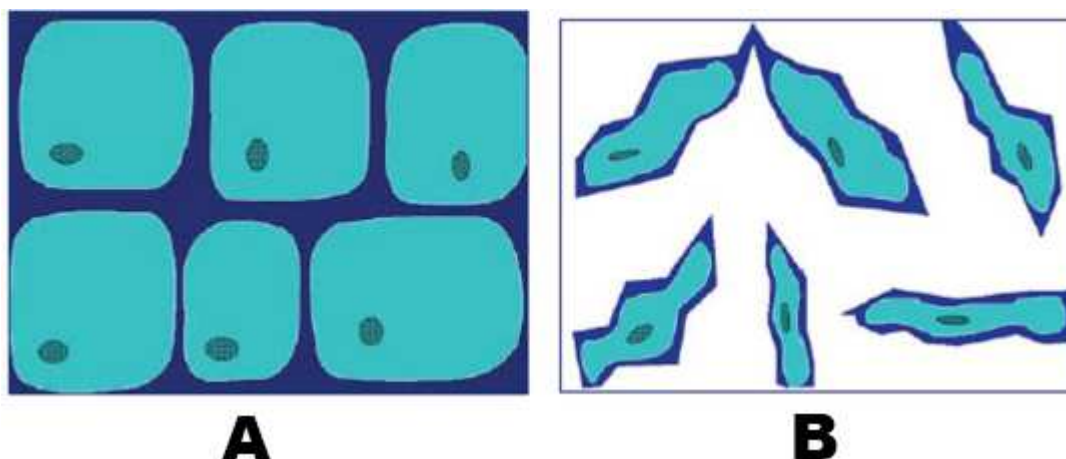
Pri perutnini ima glicerol kontracepcijski učinek in posledično ga je treba po tajanju odstraniti iz semena (Long in Kulkarni, 2004). Mehanizem kontracepcijskega delovanja glicerola še ni docela razjasnjen. Največ domnev gre v smeri osmotskega šoka in poškodb membran spermijev, do katerih pride v reprodukcijskem traktu kokoši v času hitrega izhajanja glicerola iz spermijev. Znano je dejstvo, da spermiji, katerim je bil kot krioprotektor dodan glicerol ne naseljujejo shranjevalk spermijev v reprodukcijskem traktu kokoši (Long in Kulkarni, 2004). Histološke preiskave so potrdile odsotnost spermijev v shranjevalkah po opravljenem intravaginalnem osemenjevanju s puranjim semenom. Obstaja prepričanje, da glicerol poškoduje celice spermijev in ne vpliva na sposobnost shranjevalk spermijev za skladiščenje spermijev (Westfall in Howarth, 1977, cit. po Long in Kulkarni, 2004). Raziskovalci so proučevali možnost »obvoza« shranjevalk spermijev z aplikacijo semena v zgornji del jajcevoda. Na ta način so se izognili spodnjemu delu jajcevoda (shranjevalkam spermijev) in pri tem dosegli 53 do 70 % oplojenost jajc (Bacon in sod., 1986, cit. po Long in Kulkarni, 2004). Gre za kirurški poseg, ki ga na posamezni kokoši ni mogoče uporabiti večkrat, zato se ta tehnika ne priporoča za preseganje kontracepcijskega učinka glicerola. Pogosteje se uporabljajo tehnike (centrifugiranje,

dializa), ki slonijo na odstranitvi glicerola iz semena pred začetkom zamrzovanja. Poleg glicerola in DMSO obstajajo še drugi krioprotektorji primerni za zaščito semena perutnine. V raziskavi Tselutina in sod. (1999) je bila ob uporabi DMA pri hitrem zamrzovanju semena v obliki peletov oplojenost jajc boljša (73,7-94,0 %) kot pri uporabi glicerola. Isti avtorji so testirali tudi počasno zamrzovanje semena v slamicah, kjer je dal glicerol boljše rezultate (57,4-67,4 % oplojenost jajc) od DMA. Sasaki in sod. (2010) so kot krioprotektor uspešno uporabili N-metilacetamid (MA).

2.6 FIZIKA KRIOPREZERVACIJE

2.6.1 Zamrzovanje in poškodbe celic

Ko voda zamrzuje se širi, vendar razširjanje vode med zamrzovanjem ni razlog, zaradi katerega bi prihajalo do poškodb celic. Tisto, kar dejansko povzroča poškodbe, je očiščevanje vode v času njenega zamrzovanja (Wowk, 2007). Voda zamrzuje kot čista substanca in pri tem izključuje vse ostalo. In prav omenjeni izključevalni proces je vzrok za poškodbe celic. Voda med zamrzovanjem ne ostaja topilo, ki bi molekulam življenja omogočalo, da se znotraj nje prosto mešajo temveč se med zamrzovanjem zgošča v kristale, pri čemer vse ostalo potiska ven (slika 4). Zamrzovanje povzroča dve vrsti poškodb: a) mehanične poškodbe, ko ledeni kristali deformirajo celice in b) poškodbe zaradi kemijskih in osmotskih učinkov koncentriranih raztopljenih snovi v preostanku nezamrznjene vode med ledenimi kristali (Wowk, 2007). V nasprotju s klasičnim mišljenjem, izziv s katerim se srečujejo celice v času globokega zamrzovanja ni v njihovi sposobnosti, da vzdržijo skladiščenje pri nizkih temperaturah temveč je zanje najbolj smrtonosna vmesna temperaturna cona (od -15 do -60°C), ki jo mora celica prečkati dvakrat – enkrat v času zamrzovanja in drugič v času tajanja (Özkavukcu in Erdemli, 2002).



Slika 4: Celice pred zamrzovanjem (A) in celice po zamrzovanju (B). Celice so po zamrzovanju stisnjene med ledene kristale in izpostavljene letalnim koncentracijam soli. Zaradi naraščajoče koncentracije soli v nezamrznjeni tekočini, ki celice obdaja, le te dehidrirajo (Wowk, 2007).

2.6.2 Krioprotektorji in zaščita celic

Krioprotektorje se uporablja v koncentracijah od 5 % do 15 %. Slika 5 prikazuje bistven koncept kriozaščite v času zamrzovanja celic. Z niževanjem temperature se rastoči led zgošča oziroma stiska celice v zmeraj manjše žepke nezamrznjene tekočine. Prisotnost krioprotektorja omogoča, da so ti žepki pri katerikoli temperaturi večji, kot bi bili ob njegovi odsotnosti. Celice se nahajajo v nezamrznjenih žepkih, kjer so zaščitene pred mehničnimi poškodbami ledu in poškodbami zaradi prevelikih koncentracij soli (Wowk, 2007).

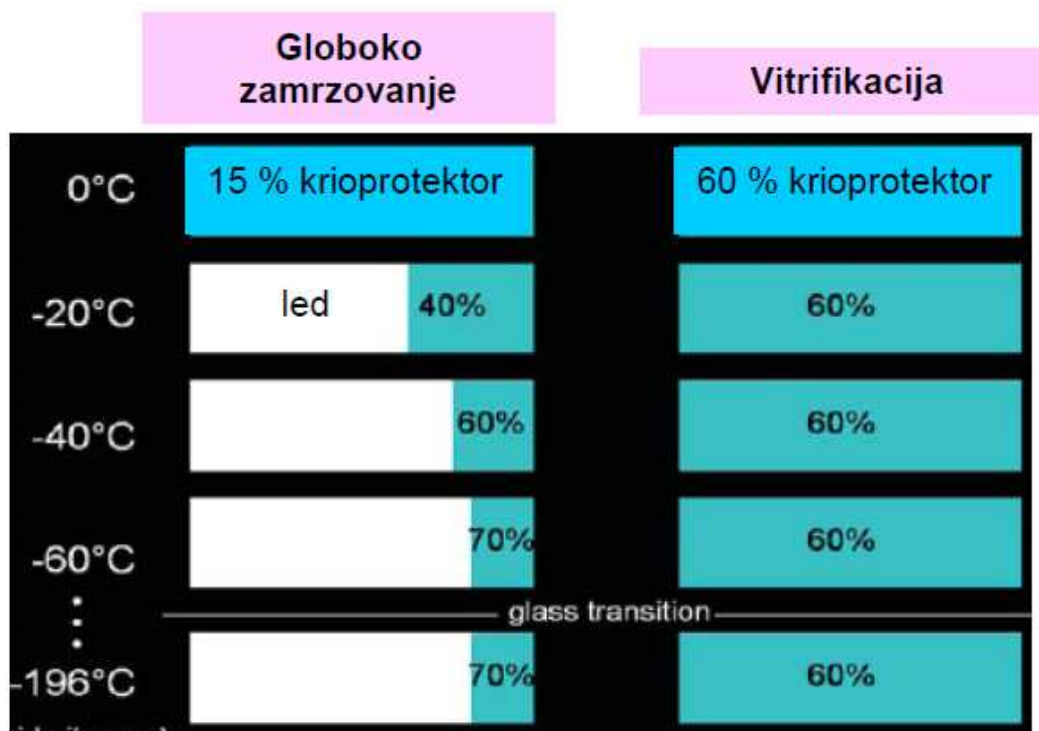


Slika 5: Osnovni koncept kriozaščite celic (prirejeno po Wowk, 2007)

2.6.3 Vitrifikacija kot alternativa zamrzovanju

Zamrzovanje bolj poškoduje neko tkivo, sestavljeno iz različnih celic, kot posamezne celice kot so npr. spermiji. Za razliko od raztopin nepovezanih celic, tkivo nima prostora za rast ledenih kristalov in se tudi ne more oddeliti (izolirati) v nezamrznjene žepke med ledene kristale. Za poškodbe zaradi zamrzovanja so zlasti dovzetni organi. Da bi nek organ po tajanju zopet pridobil prvotno funkcijo morajo vse njegove celice preživeti v velikem številu. Približno 25 % preživetje celic, kar je običajen rezultat pri zamrzovanju posameznih celic, pri zamrzovanju organov ni dovolj (Wowk, 2007). Zato je za krioprezervacijo organov potreben drugačen pristop kot za krioprezervacijo posameznih celic. Leta 1984 so Fahy in sod. predlagali vitrifikacijo kot pristop v krioprezervaciji. Beseda vitrifikacija pomeni proces spreminjanja neke snovi v steklo ali steklu podobno snov. Gre za postopek, pri katerem se vodo ohladi tako hitro, da ledeni kristali ne morejo nastati. V izogib nastanka ledu je treba pri vitrifikaciji tkivo oziroma organ založiti z veliko količino krioprotektorja.

Z vitrifikacijo se izognemo velikim poškodbam, katerim smo priča pri klasičnem zamrzovanju. Cena, ki jo za to plačamo so poškodbe zaradi toksičnosti krioprotektorja (Wowk, 2007).



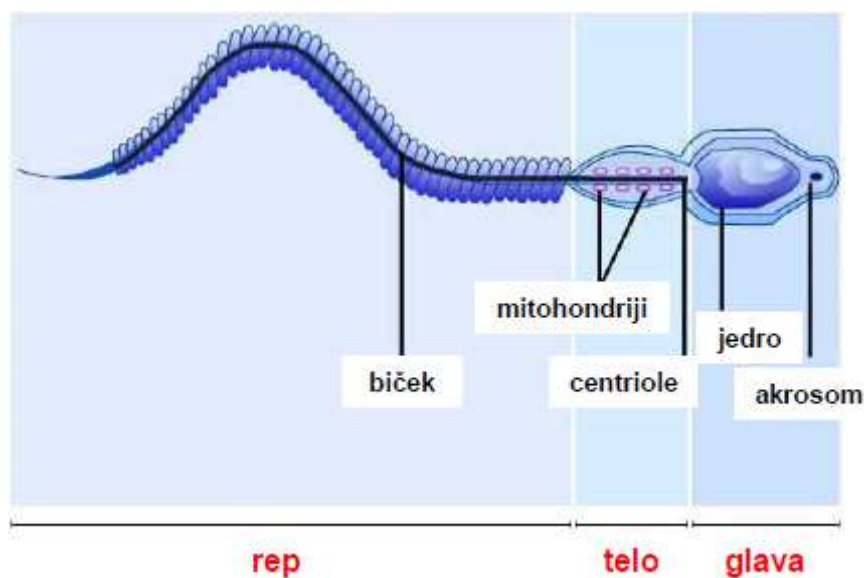
Slika 6: Shematska primerjava globokega zamrzovanja in vitrifikacije (prirejeno po Wowk, 2007)

Pri krioprezervaciji bodisi s klasičnim zamrzovanjem bodisi z vitrifikacijo, več kot polovico vode znotraj celic nadomestijo molekule krioprotektorjev. Na kriozaščito lahko gledamo kot na postopek zamenjave molekul vode z drugimi molekulami, ki ne morejo zamrzniti (Wowk, 2007). Mehanizmi toksičnosti krioprotektorjev so še vedno slabo raziskani. Pri klasičnem zamrzovanju dodajamo krioprotektor v sorazmerno majhnih koncentracijah (cca. 10 %) in v enem koraku. Dodatek krioprotektorja povzroči klasičen učinek krčenja-nabrekanja, pri katerem se celice zaradi osmoze najprej skrčijo (visoka koncentracija raztopljenih snovi zunaj celice) nato pa zaradi prodiranja krioprotektorja v celico nabreknejo. Nekaj minut zatem se koncentraciji krioprotektorja znotraj in zunaj celice izenačita (čas ekvilibracije) in celice dobijo volumen, ki ga določa razredčevalec. Celice so sedaj pripravljene na zamrzovanje. Pri izvajanju krioprezervacije z

zamrzovanjem, poteka ohlajanje postopno, običajno okrog 1°C/minuto. To zagotavlja čas, da voda z ohlajevanjem zapušča celice in koncentracija krioprotektorja znotraj celic narašča vzporedno s koncentracijo zunaj celic, kar zavaruje notranjost celic pred zamrzovanjem. Raztopine za vitrifikacijo vsebujejo krioprotektor v koncentraciji okrog ali preko 50 % (Wowk, 2007). Takih raztopin ne moremo dodati v enem koraku, saj bi bilo začetno krčenje zaradi osmoze preveliko. Zato jih pri temperaturi okrog 0°C dodajamo v več korakih. Pri krioprezervaciji z vitrifikacijo se ohlajanje in taljenje izvaja kar se da hitro. Za razliko od posameznih celic so organi preveliki, da bi lahko zadostno količino krioprotektorja absorbirali samo z namakanjem v raztopino krioprotektorja. Pri krioprezervaciji organov se krioprotektorje dodaja s prežemanjem (perfuzijo) (Wowk, 2007). Gre za postopek, pri katerem krioprotektor kroži skozi krvne žile na enak način kot se skozi organ pretaka kri. Na ta način ni nobena celica za več kot par celic stran od stika z raztopino krioprotektorja. Krioprotektorje se odstrani v obratnem vrstnem redu kot se jih dodaja. Uspešna vitrifikacija je bila doslej opravljena na srčnih zaklopkah, hrustancu, roženici in jajčnikih miši (Wowk, 2007).

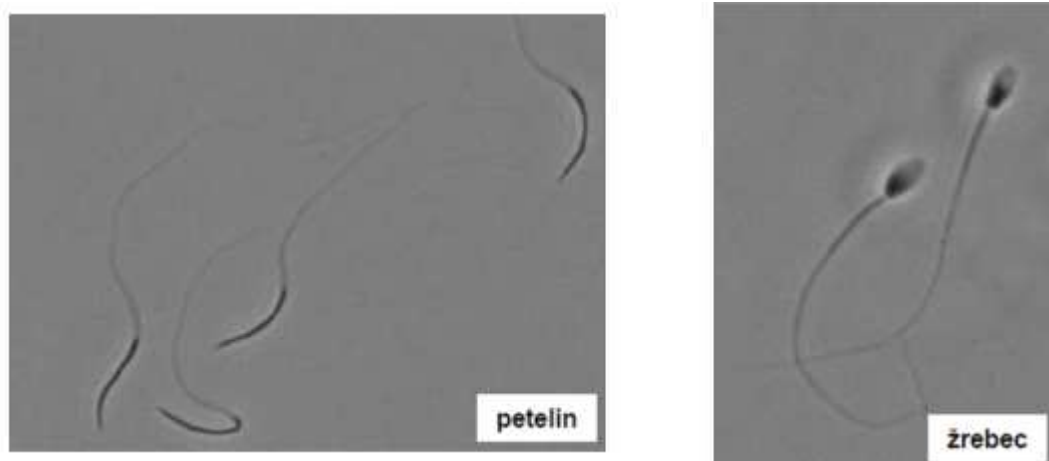
2.7 TEHNIKE GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA PERUTNINE

V primerjavi z drugimi vrstami živali ima seme ptic, še zlasti tistih iz reda kur (*Galliformes*), nekatere specifične fiziološke karakteristike, ki vplivajo na njegovo shranjevanje (Donoghue in Wishart, 2000). Spermij plemenjaka perutnine, podobno kot spermij drugih vrst živali, sestoji iz glave, telesa in repa (slika 7). Akrosom vsebuje enega ali več proteolitičnih encimov potrebnih pri razgradnji celičnega obroča (perivitelinske membrane) ovuliranega jajca - ženske spolne celice. V telesu spermija se nahaja približno 30 mitohondrijev z vlogo v njegovem energetskem metabolizmu. Telo skupaj z repom deluje kot gibalni mehanizem spermija.



Slika 7: Morfologija spermija (prirejeno po Male ..., 2012)

Za razliko od spermija bika, ovna, žrebca ali merjasca je glava ptičjega spermija valjaste oblike in nima bistveno večjega premera od premera repa (cca 0,5 μm) (slika 8).



Slika 8: Spermiji petelina in žrebca (Parrish, 2012)

Manjši volumen glave pomeni, da lahko vanjo prodre manj krioprotektorja, kar je lahko eden od razlogov za slabšo preživitveno sposobnost spermijev v času zamrzovanja.

Rep ptičjega spermija je zelo dolg, pri dolžini 90-100 μm je približno osemkrat daljši od glave (pri spermiju bika je rep dolg cca. 50 μm), kar je lahko tudi eden od razlogov za poškodbe spermijev v času zamrzovanja (Thurston and Hess, 1987, cit. po Donoghue in Wishart, 2000). Ptičji spermiji so celice s sorazmerno zelo veliko površino plazmatskih membran. Poškodbe v času zamrzovanja in tajanja semena prizadenejo zlasti celične membrane (plazmatske in mitohondrijske), v najslabšem primeru tudi jedro (Mosenene, 2009). Poškodbe vplivajo negativno na plodnost in njeno trajanje, kar je pri pticah, predvsem zaradi dolgega obdobja shranjevanja semena v shranjevalkah spermijev pomemben vidik reprodukcijske učinkovitosti.

V obilici raziskav na temo globokega zamrzovanje semena perutnine so raziskovalci proučevali vplive raznoraznih parametrov v postopku priprave semena na zamrzovanje ter postopke samega zamrzovanja in tajanja semena na preživitveno sposobnost spermijev. Največ pozornosti so namenjali naslednjim parametrom:

- uporabljenemu razredčevalcu in redčitvenem razmerju;
- uporabljenemu krioprotektorju in njegovi končni koncentraciji;
- načinu pakiranja semena;
- hitrosti zamrzovanja semena do končne vrednosti -196°C ;
- hitrosti in načinu tajanja semena;
- tehniki osemenjevanja kokoši.

Proces globokega zamrzovanja se začne že z zbiranjem semena. Večina znanstvenikov (Tselutin in sod., 1999; Long in Kulkarni, 2004; Herrera in sod., 2005; Dubos in sod., 2006; Partyka in sod., 2010, 2011a, 2011b; Makhafola in sod., 2009; Purdy in sod., 2009; Long in sod., 2010; Sasaki in sod., 2010) je za odvzem semena plemenjakom perutnine uporabila dokaj enostavno metodo trebušne masaže, ki sta jo leta 1937 opisala Burrows in Quinn. V poskuse globokega zamrzovanja je bilo doslej največkrat vključeno seme petelinov (Tselutin in sod., 1999; Long in Kulkarni, 2004; Blesbois in sod., 2005; Makhafola in sod., 2009; Purdy in sod., 2009; Long in sod., 2010; Partyka in sod., 2010; Sasaki in sod., 2010; Gliozzi in sod., 2011; Partyka in sod., 2011a), manj številne so raziskave na semenu gosakov (Partyka in sod., 2011a, 2011b), racakov (Han, 2005; Dubos

in sod., 2006), puranov (Long in Kulkarni, 2004; Blesbois in sod., 2005; Iaffaldano in sod., 2011) pegatk (Blesbois in sod., 2005) in fazanov (Herrera in sod., 2005). Pred globokim zamrzovanjem je treba seme razredčiti in mu dodati krioprotektor. Za redčenje petelinjega semena je bil v veliko raziskavah uporabljen tako imenovani »Lakeov« razredčevalec (Tselutin in sod., 1999; Long in Kulkarni, 2004; Purdy in sod., 2009; Long in sod., 2010; Gliozzi in sod., 2011), s katerim so seme redčili v razmerju 1:1 (Tselutin in sod., 1999; Long in Kulkarni, 2004; Purdy in sod., 2009; Long in sod., 2010). Kot krioprotektor je bil uporabljen glicerol s končno koncentracijo 11 % (Long in Kulkarni, 2004; Purdy in sod., 2009; Long in sod., 2011) ali DMA s končno koncentracijo 6 % (Purdy in sod., 2009, Gliozzi in sod., 2011). DMA s 6 % koncentracijo so uporabili tudi Partyka in sod. (2010 in 2011a), le da so namesto »Lakeovega« razredčevalca uporabili EK razredčevalec. Blesbois in sod. (2005) so seme redčili z razredčevalcem v razmerju 1:2 in kot krioprotektor uporabili 6 % raztopino DMA. Makhafola in sod. (2009) so seme redčili v razmerju 1:2, kot razredčevalec uporabili citrat jajčnega rumenjaka, kot krioprotektor jim je služila 4 % raztopina DMSO. Sasaki in sod. (2010) so petelinje seme redčili z razredčevalcem v razmerju 1:1 in tej mešanici dodali krioprotektor MA v končni koncentraciji 9 %. Tselutin in sod. (1999) so primerjali učinke treh krioprotektorjev (glicerol, DMA, DMSO) v štirih različnih končnih koncentracijah (4, 6, 8 in 11 %). Seme so shranjevali v slamicah ter v obliki peletov. Za konzerviranje v slamicah so se odločili tudi Purdy in sod. (2009), Makhafola in sod. (2009), Long in sod. (2010) ter Sasaki in sod. (2010). Peletno metodo, pri kateri se mešanico razredčenega semena in krioprotektorja v obliki kapljic spušča neposredno v tekoči dušik so uporabili Blesbois in sod. (2005), Herrera in sod. (2005), Partyka in sod. (2010) ter Gliozzi in sod. (2011). Nekateri avtorji so vzorce semena pred potopitvijo v tekoči dušik izpostavili param tekočega dušika na različni višini in različno dolgo. S tem so skušali doseči postopnost v ohlajanju, saj je temperatura par tekočega dušika višja (-80°C) od temperature samega tekočega dušika (-196°C). Purdy in sod. (2009) so seme v slamicah ohlajali 10 minut v parah tekočega dušika na višini dobrih 6 cm nad gladino tekočega dušika, medtem ko so Sasaki in sod. (2010) s semenom napolnjene slamice izpostavili param tekočega dušika za 30 minut v oddaljenosti 4-4,5 cm nad gladino tekočega dušika. Deset minutno izpostavitvev param tekočega dušika so opravili tudi Long in sod. (2010).

Makhafola in sod. (2009) so vzorce semena v slamicah zamrzovali postopno: najprej so seme ohladili na -20°C , kasneje so ga za 5 minut izpostavili param tekočega dušika pri -180°C in šele v zadnjem koraku shranili v tekočem dušiku pri -196°C .

V poskusih z globokim zamrzovanjem semena se je slednje v tekočem dušiku nahajalo različno dolgo. Gliozzi in sod. (2011) so vzorce hranili en dan, Makhafola in sod. (2009) en teden, Herrera in sod. (2005), Sasaki in sod. (2010) ter Long in sod. (2010) en ali več mesecev. Tajanje globoko zamrznjenega semena večinoma poteka v vodnih kopelih pri različnih temperaturah vode in različno dolgo. V eni od raziskav so Purdy in sod. (2009) ter Long in sod. (2010) vzorce zamrznjenega semena tajali v vodni kopeli pri temperaturi $3-5^{\circ}\text{C}$ za 2-5 minut, v drugi raziskavi so Purdy in sod. (2009) ter Gliozzi in sod. (2011) zamrznjeno seme za 10-20 sekund spustili v vodno kopel s temperaturo vode $50-60^{\circ}\text{C}$. Blesbois in sod. (2005) so namesto v vodni kopeli pelete semena talili na kuhalni plošči segreti na 60°C . Sasaki in sod. (2010) so seme, ki je bilo shranjeno v slamicah odtajali v slabih dveh minutah in sicer v vodi s temperaturo 5°C .

2.7.1 Kakovost odtajanega semena

Za določanje kakovosti odtajanega semena koristijo znanstveniki:

- a) Mikroskopske analize (giblivosť spermijev, koncentracija spermijev, odstotek mrtvih in patološko oblikovanih spermijev).
- b) Test oploditvene sposobnosti (ugotavljanje hidrolize notranje perivitelinske membrane, ugotavljanje oplojenosti jajc s presvetljevanjem, valilnost piščancev).

Oploditvena sposobnost odtajanega semena je slabša od oploditvene sposobnosti svežega semena (Han in sod., 2005; Dubos in sod., 2006; Iaffaldano in sod., 2011). Primerjalno slabša oploditvena sposobnost semena perutnine v primerjavi s semenom sesalcev je deloma posledica večje občutljivosti ptičjih spermijev na postopke zamrzovanja/tajanja, deloma pa posledica transporta in skladiščenja semena v reprodukcijskem traktu kokoši. Od skupnega števila spermijev, ki ga v času osemenjevanja vnesemo v spodnji del nožnice, jih le 1-2 % doseže shranjevalke spermijev na mestu spoja nožnice in maternice (Donoghue in Wishart, 2000).

Podatki o oplojenosti jajc po osemenjevanju z odtajanim semenom so od raziskave do raziskave zelo različni, kar je ob upoštevanju različnih okoliščin v katerih so poskusi potekali (različni genotipi živali, uporabljene doze semena, pogostnost osemenjevanj, globina vnosa semena) tudi razumljivo. Zaradi nenehno spreminjajočih sistemov ugotavljanja oploditvene sposobnosti odtajanega petelinjega semena se odstotek oplojenih jajc, ki so jih znesle osemnjene kokoši giblje okrog ali nad 50 % (Donoghue in Wishart, 2000). Tako npr. je bila po intravaginalnem vnosu 600 milijonov spermijev v prvem tednu poskusa zabeležena 53 % oplojenost jajc (Lake in Stewart, 1978, cit. po Donoghue in Wishart, 2000), z vnosom 400 milijonov spermijev vsake tri dni pa 80-94 % oplojenost (Kurbatov in sod., 1984, cit. po Donoghue in Wishart, 2000). Po dveh zaporednih osemenjevanjih rac z odtajanim semenom je bila oplojenost jajc 75-83 % (Tselutin in sod., 1995, cit. po Han in sod., 2005), po dveh zaporednih osemenjevanjih pur 61 % (Sexton, 1981, cit. po Han in sod., 2005), po dveh zaporednih osemenjevanjih gosi pa 68-95 % (Tai in sod., 2001). Han in sod. (2005) so pri osemenjevanju rac z odtajanim semenom dosegli le 39 % oplojenost jajc. Vsi navedeni raziskovalci so oplojenost jajc ugotavljali 2-9 dni po osemenjevanju. Čeprav je lahko oplojenost kokošjih jajc po osemenjevanju z odtajanim semenom precej manjša (npr. 20-40 %) kot se zahteva v komercialnih pogojih reje (> 90 %), mora globoko zamrznjeno seme ohraniti tako funkcionalnost, da se izognemo prevelikim osemenjevalnim dozam (> 500×10^6 spermijev) in pogostim osemenjevanjem (3-4 krat tedensko) (Long in Kulkarni, 2004). In vitro metode določanja oploditvene sposobnosti spermijev (npr. gibljivost spermijev, odstotek mrtvih in patološko oblikovanih semenčic, ugotavljanje hidrolize notranje perivitelinske membrane jajčne celice) pogosto precenijo slednjo za vsaj 1-2 %. In vitro metode merijo namreč le enega izmed več dejavnikov, ki vplivajo na oploditveno sposobnost spermijev, poleg tega ta parameter merijo takoj po tajanju semena, v realnosti pa mora odtajano seme preživeti še nekaj časa v reprodukcijskem traktu kokoši preden izvrši oploditev jajčne celice. Zaradi majhne korelacije z oploditveno sposobnostjo se in vitro tehnikam za spremljanje poškodb spermijev v času zamrzovanja/tajanja ne pripisuje velikega pomena (Donoghue in Wishart, 2000).

2.8 IZBOLJŠAVE V METODAH GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA SEMENA

Izboljšave v metodah shranjevanja semena omejuje pomanjkanje temeljnega znanja o biokemijskih mehanizmih, ki uravnavajo funkcije spermijev v pogojih in vivo ter in vitro. Lipidi imajo velik vpliv na strukturo in delovanje spermijev. Petelinji spermiji vsebujejo velik delež večkratnenaščenih maščobnih kislin, zaradi česar so zelo izpostavljeni lipidni peroksidaciji, kar lahko pripelje do njihove degradacije v shranjevalkah spermijev (Surai in sod., 1998, cit. po Tabatabaei, 2011). Posledice oksidativnega stresa se kažejo v poškodbah lipidov membran, zmanjšani gibljivosti spermijev in posledično v nezadostnem številu vitalnih spermijev oziroma slabi oplojenosti jajc. Reaktivne kisikove spojine ali reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species, ROS) so visoko reaktivni prosti radikali, ki vsebujejo kisikove ione ali perokside. Nastanejo kot stranski proizvod normalnega metabolizma kisika in imajo, vse dokler nastajajo v sprejemljivem obsegu, pomembne fiziološke vloge pri celičnem signaliziranju dogodkov povezanih s kapacitacijo spermijev, reakcijo akrosoma in zlitjem spermija z jajčno celico (Aitken in Baker, 2004, cit. po Tabatabaei, 2011). Ko količine teh spojin zelo narastejo, povzročijo obsežne poškodbe spermijev; tovrstno stanje imenujemo oksidativni stres. Za preprečevanje prekomernega nastajanja reaktivnih kisikovih spojin so organizmi razvili obrambne mehanizme, ki obsegajo encimski obrambni sistem (superoksid dismutaza, katalaza, glutation transferaza, glutation peroksidaza) in antioksidante (askorbat, vitamin E, beta karoten) (Cotgreave in sod., 1988, cit. po Tabatabaei, 2011; Tabatabaei in sod., 2011). Z določenim uspehom je bilo zavrtje peroksidacije lipidov preko dodajanja antioksidantov, ki blokirajo nastajanje reaktivnih kisikovih spojin ali nevtralizirajo toksičnost kisika doseženo pri spermi sesalcev. Askorbinska kislina, znana tudi kot vitamin C, je vodotopen vitamin, zelo pomemben za normalno delovanje telesa. Že vrsto let se ta vitamin povezuje s plodnostjo, čeprav njegova natančna fiziološka vloga v reprodukciji še ni znana. Tabatabaei (2011) je dodajal vitamin C razredčenemu petelinjemu semenu in ugotavljal njegov vpliv na gibljivost, vitalnost in morfološke okvare semena. V razredčenem semenu, kateremu je dodal 1 % askorbinske kisline ter ga za 24 ur hranil na 4°C je zabeležil boljšo gibljivost in vitalnost ter manj morfoloških okvar spermijev v primerjavi s semenom v kontroli oziroma semenom, kateremu je primešal 0,5 %, 2 % in 3 % askorbinske kisline. Ali se dovezetnost

membran spermijev za oksidacijski stres poveča med procesom globokega zamrzovanja so ugotavljali Partyka in sod. (2011a). Njihove ugotovitve so pritrdilne. Ugotovili so, da je sveže seme zaradi močnejšega antioksidativnega sistema manj izpostavljeno lipidni peroksidaciji kot seme, ki je dalj časa globoko zamrznjeno.

3 MATERIAL IN METODE DE LA

V poskus smo vključili kokoši in peteline pasme slovenska rjava kokoš. Istočasno smo v individualne kletke trinadstropne baterije uhlevili 32 petelinov (starih 25 tednov) in 125 kokoši (starih 77 tednov). Živali smo osvetljevali po klasičnem osvetljevalnem programu 14 ur luči + 10 ur teme. Na voljo so imele popolno krmno mešanico za kokoši nesnice (NSK) proizvajalca Jata Emona d. d. iz Ljubljane in pitno vodo. Kokoši smo razdelili v več poskusnih skupin, znotraj katerih so bile tri ponovitve (A, B, C). Ena skupina je služila za kontrolo. Kokoši v tej skupini smo osemenjevali s svežim, razredčenim in nezamrznjenim semenom. Po metodi trebušne masaže smo vsakemu petelinu odvzeli seme, ga vizualno ocenili (barva, konsistenca, primesi) in seme, ki je zadostilo vizualnim kriterijem kakovosti takoj po odvzemu združili v skupno stekleničko. Združeno seme smo v nadaljevanju redčili s tako imenovanim »Lakeovim« razredčevalcem (preglednica 1) v razmerju 1 : 1.

Preglednica 1: Kemijska sestava »Lakeovega« razredčevalca (Pegg, 2007)

Sestavina	Molarnost (M)	g/100 ml
Natrijev glutamat (monohidrat)	0,103	1,92
Magnezijev acetat (tetrahidrat)	0,004	0,08
Kalijev acetat (brez vode)	0,051	0,50
Polyvinyl pyrrolidin (MW 10,000)	0,0003	0,30
Glukoza	0,044	0,80

Na združenem semenu smo testirali: a) uporabnost različnih krioprotektorjev za zaščito semena pred učinki globokega zamrzovanja, b) dva načina shranjevanja semena (tubice, peleti), c) različne temperaturne režime zamrzovanja/tajanja semena. Z odtajanim semenom smo osemenjevali kokoši v posameznih skupinah, zbirali valilna jajca in jih tedensko vlagali v inkubatorje. Osemenjevanje kokoši smo izvajali v popoldanskih urah, ko jih je večina že znesla jajce. Ob izvalitvi piščancev smo pobrali vse izvaljene piščance, neizvaljena jajca pa razbili in ugotavljali, ali so bila oplojena ali ne. Poskus je potekal v obdobju od 05. 12. 2011 do 23. 02. 2012 na farmi Krumperk, valjenja v valilnici na Rodici.

Ker pred začetkom poskusa z globokim zamrzovanjem petelinjega semena nismo imeli nikakršnih praktičnih izkušenj, smo testirali v literaturi opisane posamezne parametre. Na

njihovi podlagi smo sami snovali postopke v posameznih delih poskusa. Izjema sta le treji del, kjer smo preizkusili metodo po Tselutinu in sod. (1999) in šesti del, kjer smo po Makhafolu in sod. (2009) postopno ohlajali seme. Glede na rezultate, do katerih smo prišli v času poskusa, smo sproti prilagajali posamezne parametre zamrzovanja. Poskus smo smiselno razdeliti v šest delov, ki so opisani v nadaljevanju.

3.1 PRVI DEL – TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILACETAMIDA (DMA) IN METILACETAMIDA (MA)

Po odvzemu smo seme vseh v poskus vključenih petelinov združili v skupni plastični steklenički in ga takoj po združitvi razdelili na tri enake dele (v tri stekleničke) (preglednica 2). Stekleničke z združenim semenom smo za 10 minut premestili v škatlo z ledom, kjer se je seme ohladilo na približno 5°C, nato pa semenu primešali enak volumen na 5°C ohlajenega »Lakeovega« razredčevalca (redčenje seme : razredčevalec = 1 : 1). Mešanico semena in razredčevalca smo pustili stati na ledu za 25 minut (čas ekvilibracije - čas, ki je potreben za vzpostavitev ravnotežja v koncentraciji med notranjo vsebino spermijev in raztopino, v kateri se nahajajo). Po preteku ekvilibracijskega časa smo iz škatle z ledom vzeli prvo stekleničko, mešanico semena in razredčevalca razdelili v plastične tubice (epice) po 1,8 ml ter v epice ob konstantnem blagem stresanju dodali kapljico po kapljico krioprotektorja DMA, vse dokler nismo dosegli končne koncentracije 6 %. Sledila je ekvilibracija v trajanju 1 minute. Nato smo z ledu vzeli drugo stekleničko z mešanico semena in razredčevalca, po 1,8 ml mešanice odpipetirali v epice ter enako kot v prvem primeru dodali postopno kapljico po kapljico MA, vse dokler nismo dosegli končne koncentracije 9 %.

Sledila je ekvilibracija v trajanju 1 minute. V tretji steklenički se je nahajala mešanica semena in razredčevalca, brez krioprotektorja in ta nam je služila za kontrolo. Epice s semenom, pripravljenim za globoko zamrzovanje smo spustili neposredno v tekoči dušik in se odpravili v kurnico. Po prihodu v kurnico smo seme vzeli iz tekočega dušika, ga odtajali v rokah (temperatura tajanja cca 37°C) in takoj po odtajanju vsako kokoš osemnili s 300 µl semena.

Preglednica 2: Razporeditev skupin in število živali na skupino v prvem delu poskusa

Poskusna skupina		
Kontrolna (seme+razredčevalec – brez zamrzovanja)	DMA ¹ (6 %) (seme+razredčevalec+6 % DMA – zamrzovanje v LN ₂)	MA ² (9 %) (seme+razredčevalec+9 % MA – zamrzovanje v LN ₂ ³)
K-A (n=14)	DMA-A (n=14)	MA-A (n=14)
K-B (n=14)	DMA-B (n=14)	MA-B (n=14)
K-C (n=14)	DMA-C (n=14)	MA-C (n=14)
Σ 42	Σ 42	Σ 42

¹DMA = dimetilacetamid; ²MA = metilacetamid; ³LN₂ = tekoči dušik

3.2 DRUGI DEL – TESTIRANJE ČASA EKVILIBRACIJE IN KONCENTRACIJE KRIOPROTEKTORJA

V drugem delu poskusa (preglednica 3) smo v odnosu na prvi del poskusa vpeljali naslednji dve spremembi:

- Oba ekvilibracijska časa (ob dodatku razredčevalca ter ob dodatku krioprotektorja) smo podaljšali na 30 minut.
- Končno koncentracijo DMA smo s 6 % povečali na 8 %.

V vseh ostalih zadevah je drugi del poskusa potekal po enakem protokolu kot prvi del poskusa.

Preglednica 3: Razporeditev skupin in število živali na skupino v drugem delu poskusa

Poskusna skupina		
Kontrolna	DMA ¹ (8 %)	MA ² (9 %)
K-A (n=14)	DMA-A (n=14)	MA-A (n=14)
K-B (n=14)	DMA-B (n=14)	MA-B (n=14)
K-C (n=14)	DMA-C (n=14)	MA-C (n=14)
Σ 42	Σ 42	Σ 42

¹DMA = dimetilacetamid; ²MA = metilacetamid

3.3 TRETJI DEL – TESTIRANJE DVEH NAČINOV SHRANJEVANJA SEMENA

V tretjem delu poskusa (preglednica 4) smo združenemu semenu primešali enak volumen na sobno temperaturo segretega »Lakeovega« razredčevalca (redčenje seme : razredčevalec = 1 : 1) in mešanico za 20 minut prestavili na led. Po preteku dvajsetih minut smo jo razdelili na tri volumsko enake dele v tri stekleničke. Mešanicama v prvih dveh stekleničkah smo dodali krioprotektorja DMA (prva steklenička) oziroma MA (druga steklenička) na enak način kot v prvem delu poskusa (8 % DMA oziroma 9 % MA ter 1 minuta ekvilibracije), mešanica semena in razredčevalca iz tretje stekleničke je služila za kontrolo. Z uporabo avtomatske pipete smo odpipetirali 50 µl/80 µl mešanice semena, razredčevalca in krioprotektorja in posamezne kapljice spuščali:

- a) V epice, ki smo jih takoj zatem potopili v tekoči dušik.
- b) Neposredno v tekoči dušik, da so se tvorile zamrznjene kroglice (peleti).

Po prihodu v kurnico smo seme zamrznjeno v obliki peletov raztopili na plastični plošči, ki se je nahajala nad ogreto vodno kopeljo ($\approx 45^{\circ}\text{C}$) in takoj po odtajanju pričeli z osemenjevanjem kokoši. V epicah zamrznjeno seme smo iz tekočega dušika prestavili na led (cca. 5°C) kasneje pa raztapljali pri temperaturi 37°C . Kokoši smo osemenjevali dva dni zaporedoma. Prvi dan osemenjevanja je doza semena/velikost peletov znašala 50 µl/kokoš, drugi dan 80 µl/kokoš.

Preglednica 4: Razporeditev skupin in število živali na skupino v tretjem delu poskusa

Poskusna skupina				
Kontrolna	DMA ¹ (8 %)		MA ² (9 %)	
K-A (n=14)	DMA-A-e ³ (n=7)	DMA-A-p ⁴ (n=7)	MA-A-e (n=7)	MA-A-p (n=7)
K-B (n=14)	DMA-B-e (n=7)	DMA-B-p (n=7)	MA-B-e (n=7)	MA-B-p (n=7)
K-C (n=14)	DMA-C-e (n=7)	DMA-C-p (n=7)	MA-C-e (n=7)	MA-C-p (n=7)
Σ 42	Σ 21	Σ 21	Σ 21	Σ 21

¹DMA = dimetilacetamid; ²MA = metilacetamid; ³e = seme zamrznjeno v plastičnih epicah (tubicah); ⁴p = seme zamrznjeno v obliki peletov (krogljic)

3.4 ČETRTE DEL - TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILSULFOKSIDA (DMSO), GLICEROLA IN DIMETILACETAMIDA (DMA)

V četrtem delu poskusa (preglednica 5) smo seme zopet odvzeli po ustaljenem postopku in mu dodali enak volumen »Lakeovega« razredčevalca. Mešanico smo razdelili na tri enake dele in jih za 20 minut prestavili v škatlo z ledom, da se je ohladila na približno 5°C. V nadaljevanju smo mešanici semena in razredčevalca dodali tri krioprotektorje (glicerol, DMSO in DMA) in sicer po naslednjem protokolu:

- a) Glicerol. Iz škatle z ledom smo vzeli stekleničko z mešanico semena in razredčevalca ter ji ob konstantnem blagem stresanju dodali polovico volumna ohlajenega »Lakeovega« razredčevalca, ki je vseboval 24 % glicerola. Na ta način smo dosegli, da je končna koncentracija glicerola v semenu znašala 8 %. Sledila je 30 minutna ekvilibracija na ledu. V vsako od predhodno ohlajenih epic smo odpipetirali 0,5 ml mešanice semena, razredčevalca in krioprotektorja in epice potopili v tekoči dušik.
- b) DMSO. Mešanici semena in razredčevalca smo dodali polovico volumna ohlajenega »Lakeovega« razredčevalca, ki je vseboval 24 % DMSO. Končna koncentracija DMSO v semenu je torej znašala 8 %. Sledila je 15 minutna ekvilibracija na ledu. Po tem koraku smo v ohlajene epice odmerili po 0,5 ml mešanice semena, razredčevalca in krioprotektorja in epice spustili v tekoči dušik.
- c) DMA. Mešanici semena in razredčevalca smo postopno, kapljico po kapljico dodajali DMA, vse dokler nismo dosegli 6 % končne koncentracije.

Sledila je ekvilibracija v času 1 minute. S pomočjo pipete smo seme po kapljicah ($\approx 50 \mu\text{l}$) spuščali v tekoči dušik, kjer so se tvorili peleti.

Priprava semena pred osemenjevanjem kokoši je potekala po naslednjih postopkih:

- a) Seme z glicerolom oziroma DMSO. Epice smo vzeli iz tekočega dušika in potopili v mlačno vodo segreto na okrog 45°C. Osemenjevanje kokoši je potekalo dva dni

zaporedoma. Prvi dan smo vsako kokoš osemenili s 410 µl, drugi dan pa s 490 µl odtajanega semena. Pred osemenjevanjem glicerola iz semena nismo odstranili.

- b) Seme z DMA: S pinceto smo iz tekočega dušika zajeli pet do šest peletov, jih premestili v epico in epico potopili v mlačno vodo segreto na okrog 45°C. Doza uporabljenega semena po kokoši je bila enaka kot v primeru uporabe glicerola in DMSO. Kontrolne skupine tokrat nismo vključili.

Preglednica 5: Razporeditev skupin in število živali na skupino v četrtem delu poskusa

Poskusna skupina		
DMA ¹ (6 %)	Glicerol (8 %)	DMSO ³ (8 %)
DMA-A-p ² (n=10)	G-A (n=9)	DMSO-A (n=9)
DMA-B-p (n=10)	G-B (n=9)	DMSO-B (n=9)
DMA-C-p (n=10)	G-C (n=9)	DMSO-C (n=9)
Σ 30	Σ 27	Σ 27

¹DMA = dimetilacetamid; ²p = seme zamrznjeno v obliki peletov (kroglic); ³DMSO = dimetilsulfoksid

3.5 PETI DEL – TESTIRANJE TEMPERATURNEGA PROFILA ZAMRZOVANJA

V petem delu poskusa (preglednica 6) smo kot krioprotektor uporabili le DMSO, kajti le ta je v predhodnih etapah poskusa dal določene pozitivne rezultate. Seme vseh petelinov smo združili v skupno stekleničko, takoj zatem razdelili na štiri volumsko enake dele, v štiri stekleničke, pustili za 10 minut na ledu in semenu primešali enak volumen na 5°C ohlajenega Lakeovega razredčevalca. Sledila je 25 minutna ekvilibracija na ledu.

V nadaljevanju smo seme pred osemenjevanjem kokoši pripravili po naslednjih štirih postopkih:

- a) Ohlajevanje semena na -20°C. Mešanici semena in razredčevalca smo primešali polovico volumna ohlajenega »Lakeovega« razredčevalca, ki je vseboval 24 % DMSO. Končna koncentracija DMSO v semenu je znašala 8 %. Sledila je ekvilibracija v trajanju 15 minut, razdelitev mešanice v posamezne epice in skladiščenje tako pripravljenega semena za eno uro v zamrzovalni skrinji na -20°C.

- b) Ohlajevanje semena na -20°C + tekoči dušik. Postopek je potekal enako kot postopek opisan pod alinejo a) s to razliko, da smo po enournem ohlajanju na -20°C epice s semenom premestili iz zamrzovalne skrinje v posodo s tekočim dušikom.
- c) Sveže seme brez zmrzovanja. Mešanici semena in razredčevalca smo primešali polovico volumna ohlajenega »Lakeovega« razredčevalca, ki je vseboval 24 % DMSO. Sledila je 15 minutna ekvilibracija na ledu in osemenjevanje kokoši.
- d) Kontrola = razredčeno seme: V jajcevod vsake kokoši smo vbrizgali seme razredčeno z »Lakeovim« razredčevalcem. Seme ni bilo zamrznjeno.

Zamrznjeno seme smo tajali v vodni kopeli ogreti na cca. 45°C . Osemenitvena doza po kokoši je bila prvi dan v vseh skupinah 380 μl , drugi dan 410 μl v skupinah kjer je bilo seme zamrznjeno, 360 μl kjer je bil semenu dodan le krioprotektor in 180 μl v kontrolni skupini. Tretji dan smo osemenitveno dozo po kokoši povečali. V skupinah z zamrznjenim semenom je znašala 500 μl , v skupini s svežim semenom brez zamrzovanja 470 μl , v kontrolni skupini pa 330 μl po kokoši.

Preglednica 6: Razporeditev skupin in število živali na skupino v petem delu poskusa

Poskusna skupina			
Kontrolna	DMSO (8 %)		
K-A (n=9)	DMSO-A sv ¹ (n=10)	DMSO-A -20°C ² (n=9)	DMSO-A LN ₂ ³ (n=9)
K-B (n=9)	DMSO-B sv (n=10)	DMSO-B -20°C (n=9)	DMSO-B LN ₂ (n=9)
K-C (n=9)	DMSO-C sv (n=10)	DMSO-C -20°C (n=9)	DMSO ⁴ -C LN ₂ (n=9)
Σ 27	Σ 30	Σ 27	Σ 27

¹krioprotektor dodan svežemu semenu brez zamrzovanja; ²seme zamrznjeno le na -20°C ; ³seme zamrznjeno najprej na -20°C , nato pa prestavljeno v tekoči dušik (LN₂) na -196°C ; ⁴DMSO = dimetilsulfoksid

3.6 ŠESTI DEL – TESTIRANJE POSTOPNEGA ZAMRZOVANJA V TEKOČEM DUŠIKU

V šestem delu poskusa (preglednica 7) smo seme pripravili po enakih postopkih kot v petem delu poskusa, le da smo pri vzorcih, ki smo jih zamrzovali v tekočem dušiku, predhodno ohlajevanje opravili v dveh stopnjah. Najprej smo seme za eno uro hranili v zamrzovalni skrinji na -20°C , sledilo je tri minutno ohlajanje nad parami tekočega dušika

približno 5-6 cm nad gladino tekočega dušika in v tretjem koraku spuščanje v tekoči dušik. Uporabljene doze semena po kokoši so bile naslednje: svež vzorec z DMSO 430 µl, vzorec shranjen v skrinji in vzorec dodatno shranjen v tekočem dušiku 480 µl, v kontrolni skupini je vzorec meril 420 µl.

Preglednica 7: Razporeditev skupin in število živali na skupino v šestem delu poskusa

Kontrolna	Poskusna skupina		
	DMSO (8 %)		
K-A (n=7)	DMSO-A sv ¹ (n=10)	DMSO-A -20°C ² (n=9)	DMSO-A LN ₂ ³ (n=9)
K-B (n=7)	DMSO-B sv (n=10)	DMSO-B -20°C (n=9)	DMSO-B LN ₂ (n=9)
K-C (n=7)	DMSO-C sv (n=10)	DMSO-C -20°C (n=9)	DMSO-C LN ₂ (n=9)
Σ 21	Σ 30	Σ 27	Σ 27

¹ krioprotektor dodan svežemu semenu brez zamrzovanja; ² seme zamrznjeno le na -20°C; ³ seme zamrznjeno najprej na -20°C, nato v parah tekočega dušika in na koncu predstavljeno v tekoči dušik (LN₂) na -196°C; ⁴DMSO = dimetilsulfoksid

V času petega in šestega dela poskusa so bile temperature zraka v kurnici zelo nizke (cca. 6-8°C), v zadnjih dneh šestega dela poskusa so celo padle na okrog 4°C. Prvi piščanci so se iz semena zamrznjenega v tekočem dušiku izvalili v petem ter šestem delu poskusa.

Podatke iz omenjenih dveh delov poskusa smo statistično ovrednotili. Za potrebe statistične obdelave smo podatke najprej pripravili z računalniškim programom Excel za Windows in v nadaljevanju obdelali s statističnim paketom SAS (SAS/STAT, 2003). Osnovne statistične parametre smo izračunali s pomočjo procedure MEANS. Statistično analizo smo izpeljali po metodi najmanjših kvadratov s proceduro GLM (General Linear Models). Pri obdelavi podatkov smo analizirali vplive poskusne skupine, ponovitve in valjenja.

Statistični model (1), po katerem smo ovrednotili podatke iz petega in šestega dela poskusa je bil naslednji:

$$y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + V_k + e_{ijkl} \quad \dots(1)$$

kjer je:

y_{ijkl} = opazovana lastnost

μ = srednja vrednost populacije

S_i = vpliv i-te poskusne skupine (i = štiri skupine)

P_j = vpliv j-te ponovitve (j = tri ponovitve)

V_k = vpliv k-tega valjenja (k = štiri valjenja)

e_{ijkl} = ostanek

Odstotek valilnosti/oplojenosti smo računali glede na število v inkubatorje vloženi jajc.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILACETAMIDA (DMA) IN METILACETAMIDA (MA)

Iz globoko zamrznjenega semena, kjer smo kot krioprotektorja koristili DMA in MA se ni izvalil noben piščanec, niti ni bilo nobeno jajce oplojeno ob presvetljevanju (preglednica 8).

Preglednica 8: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMA in MA

Poskusna skupina	Število vložnih jajc	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov	Število izvaljenih piščancev	% valilnosti
DMA ¹ -A	74	74	0	0	0,0
DMA-B	65	65	0	0	0,0
DMA-C	75	75	0	0	0,0
MA ² -A	90	90	0	0	0,0
MA-B	85	85	0	0	0,0
MA-C	76	76	0	0	0,0
K ³ -A	77	5	4	54	70,1
K-B	61	24	2	27	44,2
K-C	61	8	3	40	65,5
Skupaj:	664 jajc				

¹DMA = dimetilacetamid; ²MA = metilacetamid; ³K = kontrola

Osemenjene kokoši so bile že na koncu prve nesne sezone, zaradi česar jih je veliko neslo jajca s tankimi (krhkimi) lupinami. Nekaj teh jajc je med valjenjem počilo in smo jih ob presvetljevanju izločili iz inkubatorja. To je razlog, zaradi katerega seštevek izvaljenih piščancev, zamrtih zarodkov in neoplojenih jajc iz kontrolne skupine ne ustreza številu vložnih jajc (preglednica 8). Povprečna valilnost v kontrolni skupini je znašala 59,9 %. Krioprotektor DMA je v svojih raziskavah uporabilo več avtorjev (npr. Tselutin in sod., 1999, Purdy in sod., 2009). Zaradi razlik v načinih zamrzovanja, pakiranja in tajanja semena kot tudi zaradi razlik v načinih ugotavljanja oploditvene sposobnosti spermijev po tajanju, izsledke omenjenih raziskav zelo težko primerjamo z rezultati našega poskusa.

V nobeni od omenjenih raziskav namreč piščancev niso valili temveč so oploditveno sposobnost spermijev ugotavljali posredno (gibljivost spermijev, odstotek mrtvih in patološko oblikovanih spermijev) oziroma s presvetljevanjem jajc, ko so se le ta nekaj dni nahajala v inkubatorju. MA so kot krioprotektor za petelinje spermije uporabili le Sasaki in sod. (2010). V naši raziskavi ni zaščitil spermijev, poleg tega je delo z njim težavno, saj se pri sobni temperaturi nahaja v kristaliničnem (trdnem) stanju (tališče ima pri 27-30°C).

4.2 DRUGI DEL – TESTIRANJE ČASA EKVILIBRACIJE IN KONCENTRACIJE KRIOPROTEKTORJA

Čas, ki poteče od trenutka, ko smo semenu primešali krioprotektor do trenutka, ko smo pričeli z globokim zamrzovanjem, imenujemo čas ekvibracije. V tem času krioprotektor vstopa v spermije in istočasno iz njih izstopa voda. Optimalno trajanje ekvibracije se določa empirično.

Preglednica 9: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMA in MA ob podaljšanem času ekvibracije

Poskusna skupina	Število vložnih jajc	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov	Število izvaljenih piščancev	% valilnosti
DMA ¹ -A	27	27	0	0	0,0
DMA-B	15	15	0	0	0,0
DMA-C	16	16	0	0	0,0
MA ² -A	27	27	0	0	0,0
MA-B	17	17	0	0	0,0
MA-C	20	20	0	0	0,0
K ³ -A	23	2	7	14	60,8
K-B	19	0	10	9	47,3
K-C	14	2	5	7	50,0
Skupaj:	178 jajc				

¹DMA = dimetilacetamid; ²MA = metilacetamid; ³K = kontrola

Ker je lahko krioprotektor toksičen za spermije, ekvibracijski čas ne sme biti predolg. V raziskavah na semenu perutnine so raziskovalci uporabili različne ekvibracijske čase, od

0 pa vse do 120 minut (Han in sod., 2005). V prvem delu poskusa nismo dobili želenega pozitivnega rezultata, zato smo v drugem delu podaljšali čas ekvibracije pri obeh krioprotektorjih. Predvidevali smo, da je bil čas ekvibracije v prvem delu prekratek in krioprotektorja nista mogla ustrezno zaščititi spermijev pred letalnimi učinki globokega zamrzovanja. V drugem delu poskusa smo z ozirom na prvi del poskusa ekvibracijski čas podaljšali z ene minute na trideset minut. Sprememba ekvibracijskega časa ni vplivala na oplojenost jajc, saj ni bilo tudi v drugem delu poskusa po uporabi odtajanega semena nobeno jajce oplojeno (preglednica 9). Povprečna valilnost v kontrolni skupini je v drugem delu poskusa znašala 52,7 %.

4.3 TRETJI DEL – TESTIRANJE DVEH NAČINOV SHRANJEVANJA SEMENA

Ko optimiramo krioprezervacijsko metodo je način pakiranja semena eden od pomembnih dejavnikov. Perutninsko seme lahko globoko zamrzujemo v slamicah, plastičnih tubicah (epicah) ali pa mešanico semena, razredčevalca in krioprotektorja preprosto spustimo v tekoči dušik, da se tvorijo kroglice (peleti).

V tretjem delu raziskave smo kot krioprotektorja še vedno uporabljali DMA in MA, le da semena nismo shranjevali samo v epicah temveč tudi v obliki peletov. O učinkovitem zamrzovanju semena petelinov v obliki peletov poročajo Tselutin in sod. (1999). Kot krioprotektorja so uporabljali glicerol in DMA. Povprečna oplojenost jajc je v njihovem poskusu znašala 92,7 % (DMA, peleti) oziroma 26,7 % (DMA, slamice).

Ob uporabi krioprotektorjev DMA in MA ter dveh načinov shranjevanja semena v našem poskusu ni bilo nobeno jajce oplojeno (preglednica 10). Povprečna valilnost v kontrolni skupini je v tretjem delu poskusa dosegla vrednost 43,9 % (preglednica 10).

Preglednica 10: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMA in MA ter ob dveh načinih pakiranja semena

Poskusna skupina	Število vložnih jajc	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov	Število izvaljenih piščancev	% valilnosti
DMA ¹ -A-e	10	10	0	0	0,0
DMA-B-e	5	5	0	0	0,0
DMA-C-e	10	10	0	0	0,0
DMA-A-p	10	10	0	0	0,0
DMA-B-p	11	11	0	0	0,0
DMA-C-p	6	6	0	0	0,0
MA ² -A-e	10	10	0	0	0,0
MA-B-e	12	12	0	0	0,0
MA-C-e	8	8	0	0	0,0
MA-A-p	10	10	0	0	0,0
MA-B-p	7	7	0	0	0,0
MA-C-p	9	9	0	0	0,0
K ³ -A	18	3	7	8	44,4
K-B	16	2	5	6	37,5
K-C	20	3	7	10	50,0
Skupaj:	162 jajc				

¹DMA = dimetilacetamid; ²MA = metilacetamid; ³K = kontrola; ⁴e = seme v epici; ⁵p = seme v obliki peleta

4.4 ČETRTE DEL - TESTIRANJE KRIOPROTEKTORJEV DIMETILSULFOKSIDA (DMSO), GLICEROLA IN DIMETILACETAMIDA (DMA)

V četrtem delu poskusa smo poleg krioprotektorja DMA uporabili še glicerol in DMSO. Oplojenost jajc smo ugotavljali peti dan valjenja na način, da smo jajca, ki so ob presvetljevanju nakazovala razvoj zarodka, razbili na ravno površino. Ob tej priliki smo v skupini, kjer smo kot krioprotektor koristili DMSO našli tri oplojena jajca, v preostalih dveh nobenega (preglednica 11).

Preglednica 11: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorjev DMSO, glicerol in DMA

Poskusna skupina	Število vložnih jajc	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov	Število izvaljenih piščancev	% valilnosti
DMSO ¹ -A	31	30	1*	0	0,0
DMSO-B	37	35	2*	0	0,0
DMSO-C	31	31	0	0	0,0
Glicerol	37	37	0	0	0,0
DMA ² -peleti	37	37	0	0	0,0
Skupaj:	173 jajc				

¹DMSO = dimetilsulfoksid; ²DMA = dimetilacetamid; *dejansko so bili to živi in ne zamrti zarodki

Pri primerjanju učinkovitosti posameznih kemikalij kot krioprotektorjev oziroma pri ugotavljanju njihove toksičnosti za spermije perutnine je treba upoštevati več dejavnikov kot na primer koncentracijo krioprotektorja, čas in temperaturo ekvilibracije, način in hitrost zamrzovanja in postopke s semenom med in po tajanju. Praktično se nikoli ne zgodi, da bi bili vsi naštetih parametri med posameznimi raziskavami izenačeni, zaradi česar je tudi rezultate raziskav med seboj težko primerjati. Navkljub tej nekonsistentnosti Donoghue in Wishart (2000) navajata, da je najmanj učinkovit in najbolj toksičen krioprotektor za petelinje spermije DMSO, najbolj učinkovit in najmanj toksičen pa glicerol, čeprav, ironično, je to edini krioprotektor, ki po tajanju deluje na spermije kontracepcijsko.

4.5 PETI DEL – TESTIRANJE TEMPERATURNEGA PROFILA ZAMRZOVANJA

Na osnovi rezultatov iz četrtega dela poskusa, smo se v petem delu osredotočili zgolj na uporabo krioprotektorja DMSO. Zanimala nas je toksičnost omenjenega krioprotektorja za nezamrznjene spermije, učinek njegove zaščite v primeru shranjevanja semena na -20°C oziroma na -196°C . Povprečna valilnost v kontrolni skupini je znašala 43,2 %, v skupini svežega semena ob dodatku DMSO 26,3 %, v skupini semena zamrznjenega na -20°C 9,1 % in v skupini semena zamrznjenega na končnih -196°C 1,1 % (preglednica 12).

Preglednica 12: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorja DMSO

Poskusna skupina	Število vloženih jajc	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov	Število izvaljenih piščancev	% valilnosti
K-A	66	11	28	27	40,9
K-B	44	5	17	22	50,0
K-C	49	9	21	19	38,8
DMSO-A sv ¹	78	49	15	14	17,9
DMSO-B sv	58	26	13	19	32,8
DMSO-C sv	53	25	13	15	28,3
DMSO-A -20°C^2	60	52	2	6	10,0
DMSO-B -20°C	41	33	4	4	9,8
DMSO-C -20°C	67	56	6	5	7,5
DMSO-A LN_2^3	51	49	2	0	0,0
DMSO-B LN_2	61	60	0	1	1,6
DMSO-C LN_2	58	56	1	1	1,7
Skupaj:	686 jajc				

¹sveže (nezamrznjeno) seme ob dodatku krioprotektorja dimetilsulfoksida (DMSO); ² seme zamrznjeno na -20°C ob dodatku DMSO; ³ seme zamrznjeno najprej na -20°C , kasneje na -196°C ob dodatku DMSO

Teoretične simulacije kažejo, da na tvorbo ledenih kristalov v spermijih perutnine ne vplivajo hitrosti zamrzovanja do par tisoč stopinj celzija na minuto, čeprav izsledki v praksi izpeljanih raziskav nakazujejo, da je za doseganje boljše oplojenosti jajc ohlajanje semena po stopnjah $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ oziroma $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ učinkovitejše od počasnejšega ohlajanja ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (Donoghue in Wishart, 2000). Ista avtorja trdita, da postopno

zamrzovanje semena od +5°C do -35°C ohranja višje nivoje adenzin trifosfata kot trenutno ohlajanje na -196°C, kar se zgodi v primeru, ko seme spustimo neposredno v tekoči dušik.

4.6 ŠESTI DEL – TESTIRANJE POSTOPNEGA ZAMRZOVANJA V TEKOČEM DUŠIKU

V šestem delu poskusa smo želeli doseči še večjo postopnost ohlajevanja semena do končnih -196°C kot v petem delu, zato smo v eni od poskusnih skupin seme z dodanim krioprotektorjem DMSO najprej ohlajali na -20°C, nato v parah tekočega dušika približno

Preglednica 13: Oplojenost jajc in valilnost po uporabi krioprotektorja DMSO in ob ohlajevanju semena v parah tekočega dušika

Poskusna skupina	Število vloženih jajc	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov	Število izvaljenih piščancev	% valilnosti
K-A	35	3	18	14	40,0
K-B	23	2	2	19	82,6
K-C	25	8	9	8	32,0
DMSO-A sv ¹	47	29	5	13	27,7
DMSO-B sv	46	19	9	18	39,1
DMSO-C sv	27	10	8	9	33,3
DMSO-A - 20°C ²	27	24	2	1	3,7
DMSO-B - 20°C	27	25	0	2	7,4
DMSO-C - 20°C	42	39	2	1	2,4
DMSO-A LN ₂ ³	20	19	0	1	5,0
DMSO-B LN ₂	33	33	0	0	0,0
DMSO-C LN ₂	34	34	0	0	0,0
Skupaj:	386 jajc				

¹Sveže (nezamrznjeno) seme ob dodatku krioprotektorja dimetilsulfoksida (DMSO); ²Seme zamrznjeno na -20°C ob dodatku DMSO; ³Seme zamrznjeno najprej na -20°C, kasneje v parah tekočega dušika na -80°C in na koncu na -196°C ob dodatku DMSO

5-6 cm nad njegovo gladino, da bi ga nazadnje potopili v tekoči dušik na -196°C. V absolutno izraženih vrednostih se valilnost med postopkoma ni razlikovala, čeprav je treba

poudariti, da gre za majhne absolutne vrednosti. V petem delu poskusa sta se namreč v skupini s tekočim dušikom izvalila le dva piščanca, v šestem delu pa le eden (preglednici 12 in 13).

Prvi piščanci so se iz semena zamrznjenega v tekočem dušiku izvalili v petem ter šestem delu poskusa. V preglednici 14 so prikazani rezultati statistične obdelave podatkov iz petega in šestega dela poskusa.

Odstotek oplojenih jajc je bil največji v kontrolni skupini (84,74 %). V skupini, kjer smo svežemu semenu primešali DMSO je bila oplojenost značilno manjša in je znašala 57,58 %.

Preglednica 14: Odstotki oplojenosti in valilnosti v štirih poskusnih skupinah petega in šestega dela poskusa

Odstotek oplojenih jajc glede na število jajc vložnih v inkubator				
Poskusna skupina	Oplojenost (%) ¹	SE	Vplivi dejavnikov vključenih v model ²	
Kontrola	84,74 ^A	± 3,27	Vpliv poskusne skupine	p = 0,0001***
DMSO ³ (nezmrznjeno seme)	57,58 ^B		Vpliv ponovitve	p = 0,7178
DMSO (-20°C)	19,93 ^C		Vpliv valjenja	p = 0,0017**
DMSO (-20°C+LN ₂ ⁴)	2,61 ^D			
Valilnost glede na število jajc vložnih v inkubator				
Poskusna skupina	Valilnost (%) ¹	SE	Vplivi dejavnikov vključenih v model ²	
Kontrola	39,84 ^A	± 3,29	Vpliv poskusne skupine	p = 0,0001***
DMSO ³ (nezmrznjeno seme)	31,28 ^A		Vpliv ponovitve	p = 0,1793
DMSO (-20°C)	13,22 ^B		Vpliv valjenja	p = 0,1643
DMSO (-20°C+LN ₂ ⁴)	1,74 ^B			

¹Vrednosti znotraj stolpca z različnima nadpisoma se značilno razlikujeta (p<0,05). Vrednosti za posamezne lastnosti so izražene v obliki ocenjenih srednjih vrednosti (LSM).; ²*** p≤0,001 statistično zelo visoko značilna razlika, ** p≤0,01 statistično visoko značilna razlika, * p≤0,05 statistično značilna razlika, p>0,05 statistično neznačilna razlika; SE = standardna napaka ocene; ³DMSO = dimetilsulfoksid; ⁴LN₂ = tekoči dušik

Iz tega sklepamo, da je dodatek krioprotektorja deloval toksično na sveže seme in zmanjšal njegovo oploditveno sposobnost. Izmed skupin, pri katerih smo v seme primešali DMSO je bila najslabša oplojenost jajc zabeležena v skupini s tekočim dušikom (2,61 %), boljša v skupini, kjer smo seme zmrznili le na -20°C (19,93 %) in najboljša v skupini, kjer smo semenu sicer dodali DMSO, vendar ga nismo zamrznili (57,58 %) (preglednica 14). Razlike med omenjenimi skupinami so bile statistično značilne. Vsem skupinam smo primešali enako količino krioprotektorja, zato razliko v oplojenosti jajc pojasnjujemo z zniževanjem temperature shranjevanja. Če predvidevamo, da je z zniževanjem temperature shranjevanja oplojenost jajc padala linearno, potem je bil omenjeni padec pri prehodu iz +4°C na -20°C 1,56 % na vsako stopinjo Celzija $[(57,58-19,93)/24^{\circ}\text{C} = 1,56]$, pri prehodu iz -20°C na -196°C pa 0,09 % na vsako stopinjo Celzija $[(19,93-2,61)/176^{\circ}\text{C} = 0,09]$. Spermiji so potemtakem doživeli večji šok pri prehodu iz +4°C na -20°C (absolutna razlika 24°C), kot pri prehodu iz -20°C na -196°C (absolutna razlika 176°C).

Odstotek valilnosti je v kontrolni skupini znašal 39,84 %, v skupini s svežim, nezamrznjenim semenom s primešanim DMSO pa 31,28 %. Kljub značilno boljši oplojenosti jajc v kontrolni skupini kot v skupini s svežim, nezamrznjenim semenom s primešanim DMSO, v valilnosti razlika med omenjenima skupinama ni bila značilna. Razlog za to gre iskati v odstotku zamrtih zarodkov (preglednica 15).

Preglednica 15: Odstotki zamrtih zarodkov v štirih poskusnih skupinah petega in šestega dela poskusa

Odstotek zamrtih zarodkov glede na število jajc vložnih v inkubator				
Poskusna skupina	Zamrti zarodki (%) ¹	SE	Vplivi dejavnikov vključenih v model ²	
Kontrola	44,90 ^A	± 2,94	Vpliv poskusne skupine	p = 0,0001 ^{***}
DMSO ³ (nezamrznjeno seme)	26,30 ^B		Vpliv ponovitve	p = 0,4710
DMSO (-20°C)	6,70 ^C		Vpliv valjenja	p = 0,0065
DMSO (-20°C+LN ₂ ⁴)	0,86 ^C			

¹Vrednosti znotraj stolpca z različnima nadpisoma se značilno razlikujeta (p<0,05). Vrednosti za posamezne lastnosti so izražene v obliki ocenjenih srednjih vrednosti (LSM); ²*** p≤0,001 statistično zelo visoko značilna razlika, ** p≤0,01 statistično visoko značilna razlika, * p≤0,05 statistično značilna razlika, p>0,05 statistično neznačilna razlika; SE = standardna napaka ocene; ³DMSO = dimetilsulfoksid; ⁴LN₂ = tekoči dušik

Glede na število vloženih jajc v kontrolni skupini je odstotek zamrtih zarodkov znašal 44,90 %, kar je bilo značilno ($p < 0,001$) več kot v skupini s nezmrazjenim semenom in primešanim DMSO, kjer je ta vrednost znašala 26,30 % (preglednica 15). Najverjetnejši vzrok za večje število zamrtih zarodkov v kontrolni skupini so porozne jajčne lupine. V času petega in šestega dela poskusa so bile kokoši stare 82-85 tednov, torej za približno 2 meseca starejše od klasične amortizacijske dobe za enoletne nesnice, ki znaša okrog 72-76 tednov. Zaradi poroznejših jajčnih lupin starejših kokoši, jajca med valjenjem dehidrirajo in piščanci se ne izvalijo temveč med valjenjem zamrejo. Ob oblikovanju poskusnih skupin smo sicer posamezne kokoši vanje vključevali po sistemu naključnega izbora, vendar kljub temu se je lahko zgodilo, da je bil v posamezni skupini delež kokoši, ki so nesle jajca s tanko lupino večji kot v drugi skupini.

5 SKLEPI

Na osnovi raziskave, v kateri smo ugotavljali vplive več krioprotektorjev, dveh načinov pakiranja semena in treh temperaturnih profilov ohlajanja na oploditveno sposobnost petelinjih spermijev, moremo napraviti naslednje sklepe:

- a) Ob shranjevanju semena v plastičnih tubicah (epicah) in njegovem takojšnjem ohlajanju na temperaturo -196°C , nobeden od treh uporabljenih krioprotektorjev (DMA, MA in glicerol) ni zaščitil semena pred letalnimi učinki globokega zamrzovanja.
- b) Različen način shranjevanja semena (epice/peleti) ob uporabi krioprotektorjev DMA oziroma MA ni izboljšal oploditvene sposobnosti spermijev – v nobenem primeru se ni izvalil noben piščanec.
- c) Krioprotektor MA ni zaščitil semenčic pred učinki globokega zamrzovanja, poleg tega je rutinsko delo z njim težavno, saj se pri sobni temperaturi nahaja v kristalinični obliki.
- d) DMSO je bil edini od štirih krioprotektorjev, ki je petelinjim spermijem zagotovil določeno zaščito pred poškodbami v času zamrzovanja.
- e) Dodatek krioprotektorja DMSO je deloval toksično na sveže seme in značilno zmanjšal njegovo oploditveno sposobnost.
- f) Z zniževanjem temperature hranjenja semena se je značilno zmanjševala oplojenost jajc. Najboljša je bila v skupini, kjer smo semenu sicer dodali DMSO, vendar ga nismo zamrznili (57,58 %), značilno manjša v skupini, kjer smo seme zmrznili le na -20°C (19,93 %) in najslabša v skupini, kjer smo seme hranili v tekočem dušiku na -196°C (2,61 %).
- g) Zaradi slabe valilnosti, v naši raziskavi testirane metode niso primerne za rutinsko zamrzovanje petelinjega semena. V prihodnjih raziskavah bi veljalo dodatno testirati krioprotektor DMSO ob hkratnem spreminjanju drugih parametrov (različne koncentracije, programi zamrzovanja, načini pakiranja semena), ki vplivajo na uspeh globokega zamrzovanja petelinjega semena. Za potrebe krajšega trajanja skladiščenja bi bilo koristno ugotoviti, kako se s časom spreminja oploditvena sposobnost spermijev, če seme hranimo pri -20°C .

6 POVZETEK

V literaturi je bilo opisanih že veliko tehnik globokega zamrzovanja perutninskega semena. Cilj diplomske naloge je bil, da bi iz niza opisanih tehnik izbrali tiste, ki so v eksperimentalnih pogojih dale dobre rezultate in preverili njihovo uporabnost tudi v »farmskih« pogojih reje. V raziskavi smo poskušali priti so enostavne, učinkovite in robustne metode shranjevanja petelinjega semena. Na osnovi dosedanjih znanj na tem področju smo skušali izdvojiti metodo, ki bi ob minimalnem vložku dela in materialnih sredstev ter ob minimalni logistični podpori dala dobre rezultate in bi jo kasneje uporabili kot referenčno metodo za shranjevanje semena slovenskih lokalnih pasem kokoši.

Poskus smo izvedli na kokoših pasme slovenska rjava kokoš. V individualne kletke trinadstropne baterije smo uhlevili 32 petelinov starih 25 tednov in 125 kokoši starih 77 tednov. Kokoši smo razdelili v več poskusnih skupin, znotraj katerih so obstajale tri ponovitve. Ena skupina kokoši je skozi celotno trajanje poskusa služila za kontrolo. Kokoši v tej skupini smo osemenjevali s svežim, razredčenim vendar nezamrznjenim semenom. Po metodi trebušne masaže smo vsakemu petelinu odvzeli seme, ga vizualno ocenili in seme, ki je zadostilo vizualnim kriterijem kakovosti takoj po odvzemu združili v skupno stekleničko. Združeno seme smo redčili z razredčevalcem vedno enake kemijske sestave. Na združenem semenu smo testirali uporabnost štirih krioprotektorjev (MA, DMA, DMSO, glicerol) za zaščito petelinjega semena pred škodljivimi učinki globokega zamrzovanja. Ker na oploditveno sposobnost globoko zmrznjenega semena vpliva način shranjevanja semena, smo se odločili testirati dva načina shranjevanja semena in sicer shranjevanje v plastičnih epicah (tubicah) in v obliki peletov. Na preživetje spermijev ima določen vpliv tudi temperatura zamrzovanja, tajanja in temperatura pri kateri seme hranimo. V ta namen smo seme izpostavili različnim temperaturam (-20°C, -196°C) shranjevanja in različnim temperaturnim profilom zamrzovanja (postopno do -196°C, nenadno na -196°C). Z odtajanim semenom smo osemenjevali kokoši v posameznih skupinah, zbirali valilna jajca in jih tedensko vlagali v inkubatorje. Ob izvalitvi smo pobrali vse izvaljene piščance. Neizvaljena jajca smo razbili in ugotavljali, ali so bila oplojena ali ne.

Ob uporabi krioprotektorjev DMA, MA in glicerol ni bilo nobeno jajce oplojeno in posledično se ni izvalil noben piščanec. S podaljšanjem ekvilibracijskega časa iz ene na trideset minut se pri krioprotektorjih DMA in MA rezultat ni izboljšal, niti ni k izboljšanju prispeval način pakiranja semena (epice, peleti). Iz zamrznjenega semena so se piščanci valili, ko smo kot krioprotektor uporabili DMSO, čeprav naj bi bil ta krioprotektor, po podatkih iz literature izmed vseh uporabljenih najmanj učinkovit v zaščiti spermijev in najbolj toksičen zanje. Toksičnost DMSO za petelinje spermije se je potrdila tudi v naši raziskavi. Ob dodatku DMSO k svežemu petelinjemu semenu se je oplojenost jajc v primerjavi s svežim semenom brez DMSO poslabšala. Glede na večji odstotek izvaljenih piščancev pri skladiščenju semena na -20°C , bi v prihodnje veljalo preveriti učinkovitost te metode za kratkotrajnejše (enoletno) shranjevanje semena slovenskih lokalnih pasem kokoši. Kratkotrajno shranjevanje semena v zamrzovalni skrinji je enostavno in stroškovno ugodnejše od shranjevanja v tekočem dušiku.

7 VIRI

Blackburn H.D. 2006. The national animal germplasm program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poultry Science*, 85: 210-215

Blackburn H.D., Silversides F., Purdy P.H. 2009. Inseminating fresh or cryopreserved semen for maximum efficiency: Implications for gene banks and industry. *Poultry Science*, 88: 2192-2198

Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129: 371-378

Blesbois E. 2006. Advances in avian semen cryopreservation. V: EPC 12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14 sept. 2006 (neobjavljeno)

Blesbois E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63, 2: 213-222

Blesbois E., Brillard J. P. 2007. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal*, 1, 10: 1472-1481

Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon D., Coquerelle G., Tixier-Boichard M. 2007. Semen cryopreservation for ex-situ management of genetic diversity in chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*, 86: 555-564

Blesbois E. 2011. Freezing avian semen. *Avian Biology Research*. 4, 2: 52-58

Donoghue A.M., Wishart G.J. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 213-232

Dubos F., Seigneurin F., Mialon-Richard M.M., Grasseau I., Guy G., Blesbois E. 2006. Cryopreservation of landese gander semen. V: Proceeding of Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture between Council of Agriculture (Taiwan, R.O.C.) and Institute National de la Recherche Agronomique (France). Tainan, 7-10 nov. 169-172.

<http://www.angrin.tlri.gov.tw/%5C/INRA/o17.pdf> (13. avg. 2012)

- Fahy M., MacFarlane D.R., Angell C.A., Meryman H.T. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426
- Fulton J.E. 2006. Avian genetic stock preservation: An industry perspective. *Poultry Science*, 85: 227-231
- Floote R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80: 1-10
- Gliozzi T.M., Zaniboni L., Cerolini S. 2011. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75: 1613-1622
- Han X.F., Niu Z.Y., Liu F.Z., Yang C.S. 2005. Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *International Journal of Poultry Science*, 4, 4: 197-201
- Herrera J.A., Quintana J.A., López M.A., Betancourt M., Fierro R. 2005. Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of Andrology*, 51, 5: 353-360
- Iaffaldano N., Romagnoli L., Manchisi A., Rosato M.P. 2011. Cryopreservation of turkey semen by the pellet method: Effects of variables such as the extender, cryoprotectant concentration, cooling time and warming temperature on sperm quality determined through principal components analysis. *Theriogenology*, 76: 794-801
- Larivière J.-M., Leroy P. 2008. Conservation et valorisation de la diversité des ressources génétiques du poulet en Europe: initiatives et perspectives. *Les Annales de Médecine Vétérinaire*, 152: 203-220
- Long J.A., Kulkarni G. 2004. An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Science*, 83: 1594-1601
- Long J.A., Bongalhardo D.C., Pelaéz J., Saxena S., Settar P., O'Sullivan N.P., Fulton J.E. 2010. Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science*, 89: 966-973

Łukaszewicz E., 2002. An effective method for freezing white Italian gander semen. *Theriogenology*, 58: 19-27

Makhafola M.B., Lehloenya K.C., Mphaphathi M.L., Dinnyes A., Nedambale T.L. 2009. The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *South African Journal of Animal Science*, 39, supplement 1: 242-245

Male reproductive track. Sperm. Jorum. Learning to share.

<http://open.jorum.ac.uk/xmlui/bitstream/handle/123456789/2502/content/sperm.htm>

(12. jul. 2012)

Morris J. 2007. *Asymptote guide of cryopreservation*. 2nd edition. Cambridge. Asymptote Ltd.: 42 str.

Mosenene T.M.B. 2009. Characterization and cryopreservation of semen of four south african chicken breeds. *Magister Scientiae Agriculturae*. Bloemfontein, Faculty of Natural in Agricultural Sciences, University of the Free State Bloemfontein: 114 str.

Özkavukcu S., Erdemli E. 2002. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 24, 4: 187-196

Parrish J. Sperm images from various species (rooster (chicken) and stallion sperm).

University of Wisconsin-Madison.

http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/lab9/sperm_images/sperm_images.html (12. jul. 2012)

Partyka A., Nizański W., Łukaszewicz E. 2010 Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*, 74, 6: 1019-1027

Partyka A., Łukaszewicz E., Nizański W., Twardoń J. 2011a. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C₁₁-BODIPY^{581/591}. *Theriogenology*, 75: 1623-1629

Partyka A., Łukaszewicz E., Nizański W. 2011b. Flow cytometric assessment of fresh and frozen-thawed Canada goose (*Brenta canadensis*) semen. *Theriogenology*, 76, 5: 843-850

- Pegg D.E. 2007. Principles of Cryopreservation. V: Methods in molecular biology. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Day J.G., Stacey G.N., (ur.). Totova, NJ USA: Humana Press. 39-58
- Petitte J.N. 2006. Avian Germplasm Preservation: Embryonic Stem Cells or primordial Germ Cells. Poultry Science, 85: 237-242
- Purdy P.H., Song Y., Silversides F.G., Blackburn H.D. 2009. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. Poultry Science, 88: 2184-2191
- Santiago-Moreno J., Castaño C., Coloma C.A., Gómez-Brunet A., Toledano-Díaz A., López-Sebastián A., Campo J.L. 2009. Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. Poultry Science, 88: 2661-2669
- SAS/STAT. 2003. The System for Windows Release 8.02. Cary NC, USA, SAS Institute
- Sasaki K., Tatsumi T., Niinomi T., Imai T., Naito M., Tajima A., Nishi Y. 2010. A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-Methylacetamide as a cryoprotective agent. The Journal of Poultry Science, 47, 4: 297-301
- Surai P.F., Wishart G.J. 1996. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. World's Poultry Science Journal, 52: 227-243
- Tabatabaei S., Batavani R.A., Talebi A.R. 2009. Comparism of oviductal sperm age on fertility, hatchability and embryonic death rates in Iranian indigenous and ross-308 broiler breeder chickens. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8,1: 85-89
- Tabatabaei S. 2011. Effect of ascorbic acid on chicken semen quality during liquid storage. Comparative clinical pathology, DOI 10.1007/s00580-010-1145-8. <http://www.springerlink.com/content/dr203434266500g9/> (11. avg. 2012)
- Tabatabaei S., Batavani R., Ayen E. 2011. Effect of vitamin E addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. Veterinary Research Forum, 2, 2: 103-111

Tai J.J.L., Chen J.C., Wu K.C., Wang S.D., Tai C. 2001. Cryopreservation of gander semen. *British Poultry Science*, 42: 384-388

Telolecital zygotes. Lecture review notes: Lecture 10. Cleavage patterns.
<http://translate.google.com/#en/sl/prerez%20blastodiska%0A%0A%20Cleavage%20Patterns> (12. jul. 2012)

Tselutin K., Seigneurin F., Blesbois E. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 78: 586-590

What came first: the chicken or the egg? University of Illinois Urbana-Champaign
<http://chickscope.beckman.uiuc.edu/explore/embryology/day05/ovary.html>
(12. jul. 2012)

Woelders H., Zuidberg C.A., Hiemstra S.J. 2006. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: Poultry perspective. *Poultry Science*, 85: 216-222

Wowk B. 2007. How cryoprotectants work. *Cryonics*, 28, 3: 3-7.
<http://www.alcor.org/cryonics/cryonics0703.pdf> (16. dec. 2012)

ZAHVALA

Ob koncu študija se želim zahvaliti mentorju doc. dr. Dušanu TERČIČU za vsestransko in strokovno pomoč, vodenje in usmerjanje ob nastajanju diplomske naloge. Zahvaljujem se za pomoč pri statistični obdelavi podatkov in pomoč pri izvedbi poskusa.

Zahvaljujem se predsednici komisije prof. dr. Antoniji HOLCMAN in recenzentu doc. dr. Silvestru ŽGURJU za pregled diplomske naloge.

Hvala Jerneji BOGATAJ za pomoč pri iskanju virov in dr. Nataši SIARD za oblikovni pregled diplomske naloge ter ostalemu osebju knjižnice za iskanje literature v času študija.

Sabini KNEHTL se zahvaljujem za pomoč pri vseh administrativnih obveznostih v zvezi z študijem in glede diplomske naloge.

Hvala vsem sošolcem, ki so mi pomagali med študijem, prijateljem za spodbudne besede in družini za moralno podporo.

Hvala tudi vsem, ki ste me kakorkoli spremljali v času študija.