

Univerza
v Ljubljani Veterinarska
fakulteta



Nataša Šterbenc

**VPLIV ANTIOKSIDANTOV IN DETERGENTA TER ENOSLOJNEGA
CENTRIFUGIRANJA SKOZI VRSTNO SPECIFIČNI KOLOID NA
KVALITETO ODMRZNJENEGA OVNOVEGA SEMENA**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2015

Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



UDK 636.3.082.4:612.2:57.086.13(043.3)

Nataša Šterbenc, dr. vet. med.

**VPLIV ANTIOKSIDANTOV IN DETERGENTA TER ENOSLOJNEGA
CENTRIFUGIRANJA SKOZI VRSTNO SPECIFIČNI KOLOID NA
KVALITETO ODMRZNJENEGA OVNOVEGA SEMENA**

Doktorska disertacija

**THE EFFECT OF ANTIOXIDANTS AND SINGLE LAYER
CENTRIFUGATION THROUGH SPECIES SPECIFIC COLLOID ON POST
THAW QUALITY OF RAM SPERMATOZOA**

Doctoral thesis

Ljubljana, 2015

Nataša Šterbenc

VPLIV ANTIOKSIDANTOV IN DETERGENTA TER ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA SKOZI VRSTNO SPECIFIČNI KOLOID NA KVALITETO ODMRZNJENEGA OVNOVEGA SEMENA

Doktorska disertacija je zaključek interdisciplinarnega podiplomskega študija biomedicine s področja veterine. Delo je bilo opravljeno na Kliniki za reprodukcijo in konje na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani, v laboratoriju na Institut für Reproduktionsmedizin, Klinik für Rinder na Stiftung Tierärztliche Hochschule v Hannoveru in v laboratoriju na Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Institut für Nutztiergenetik v Neustadt.

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentor: doc. dr. Primož Klinc

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno zagovora:

Predsednica: prof. dr. Marinka Drobnič-Košorok

Član: prof. dr. Marjan Kosec

Član: prof. dr. Tomislav Dobranič

Če bi vedeli, kaj je tisto, kar smo delali, temu ne bi rekli raziskovanje, kajne?

Albert Einstein

IZVLEČEK

Ključne besede: Reprodukcijska — veterinarska; umetno osemenjevanje; zamrzovanje — metode; antioksidanti — farmakologija; koloidi; centrifugiranje — metode; spermiji, gibljivost; celica, preživetje; spermiji — citologija; DNA razdrobitev; ovce; samec

Membrana ovnovih semenčic je zaradi visoke vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin zelo dovzetna za lipidno peroksidacijo, zaradi česar prihaja med procesom globokega zamrzovanja do poškodb semenčic, pri tem pa se zmanjša njihova kvaliteta in oploditvena sposobnost. V raziskavi smo ugotavljali, kateri razredčevalec z vključenimi antioksidanti in detergentom Equex STM® nudi najboljše pogoje za zamrzovanje ovnovih semen in kakšen vpliv ima na uspešnost osemenitve ovac. Poleg tega smo preučevali vpliv enoslojnega centrifugiranja skozi vrstno specifični koloid na kvaliteto zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic. Analizo vzorcev na gibljivost in test na preživitveno sposobnost semenčic smo opravili z računalniško analizo semen, in sicer po tajanju in inkubaciji semen po 10 minutah, 6, 12 in 24 urah na 37 °C. Integriteto DNK semenčic ter integriteto membrane semenčic smo dokazovali s pomočjo pretočne citometrije po tajanju in triurni inkubaciji semen na 37 °C. Integriteto membrane semenčic smo dodatno ugotavljali s HOS testom s pomočjo fazno-contrastnega mikroskopa, ki smo ga uporabili tudi za določanje morfoloških sprememb na semenčicah po tajanju in inkubaciji semen na 37 °C. Detergent Equex STM® ter postopek enoslojnega centrifugiranja sta imela na kakovost zamrznjenega/odmrznjenega ovnovih semen ugoden učinek. Izboljšala se je skupna gibljivost semenčic, integriteta plazma membrane in preživitvena sposobnost semenčic po tajanju. Vključen detergent je izboljšal hitrosti semenčic, medtem ko ni imel vpliva na integriteto DNK. Antioksidanta natrijev piruvat in katalaza nista imela pozitivnega vpliva na preživitveno sposobnost semenčic, hitrosti semenčic, odstotek morfoloških sprememb ter na integriteto membrane in DNK. Vključitev antioksidantov v razredčevalec za zamrzovanje ovnovih semenčic ni izboljšala kvalitete po tajanju. Prav tako z *in vivo* poskusom nismo dokazali višjega odstotka brejih ovac. S postopkom SLC ter dodatkom detergenta Equex STM®, lahko izboljšamo kakovost zamrznjenega/odmrznjenega ovnovih semen. Z analizami smo ugotovili pozitiven vpliv na gibljivost, preživitveno sposobnost, integriteto membrane in DNK semenčic.

ABSTRACT

Key words: Reproduction — veterinary; insemination, artificial; freezing — methods; antioxidants — pharmacology; colloids; centrifugation — methods; sperm motility; cell survival; spermatozoa — cytology; DNA fragmentation; sheep; male

Membrane of ram spermatozoa contains high percentage of polyunsaturated fatty acids and is therefore very vulnerable to lipid peroxidation. The process of deep-freezing leads to the damage of spermatozoa, resulting in a lower quality and fertilizing ability of spermatozoa. In our research we investigated the influence of antioxidants and Equex STM® on the freezability of ram semen and its effect on the fertilizing capacity of frozen/thawed ram spermatozoa. Further we tested the effect of single-layer centrifugation through a species-specific colloid on the quality of F/T ram spermatozoa. Analyses of the samples on motility and viability were performed by computer analyses after thawing and incubation at 37 °C for 10 min, 6 h, 12 h and 24 h. The membrane and DNA integrity of the spermatozoa was analysed by flow cytometry after thawing and incubation at 37 °C and for three hours afterwards. The membrane integrity of the spermatozoa was further evaluated by the HOS test using a phase-contrast microscope, which was also used for determination morphology in the spermatozoa after thawing and incubation at 37 °C for 10 min, 6 h, 12 h and 24 h. Equex STM® and the SLC procedure had a beneficial effect on the quality of F/T ram semen. The motility, plasma membrane integrity and viability of spermatozoa had improved after thawing and incubation at 37 °C. The Equex STM® also improved the spermatozoa velocity but had no effect on the integrity of DNA. The antioxidants sodium pyruvate and catalase had no positive effect on the viability and velocity of spermatozoa nor on the percentage of abnormal morphology and the membrane and DNA integrity. Addition of antioxidants in extender for freezing of ram spermatozoa did not improve quality after thawing. Experiment *in vivo* also did not display a higher percentage of pregnant ewes. Therefore, we can conclude that the SLC procedure and the addition of Equex STM®, can assure a better quality of F/T ram spermatozoa with a better motility, viability, membrane and DNA integrity.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	5
ABSTRACT	7
KAZALO VSEBINE	9
KAZALO SLIK	13
KAZALO TABEL	15
SEZNAM OKRAJŠAV	17
1 UVOD	19
1.1 HIPOTEZE	21
2 PREGLED LITERATURE	23
2.1 Zamrzovanje semena	23
2.1.1 Pomen globokega zamrzovanja semena	23
2.1.2 Zgodovina zamrzovanja semena	23
2.1.3 Zamrzovanje ovnovnega semena	24
2.1.4 Odvzem semena	25
2.1.5 Postopki dolgotrajnega konzerviranja semena	27
2.1.6 Razredčevalci	28
2.1.7 Krioprotektanti	32
2.1.8 Procesiranje, hitrost ohlajanja in zamrzovanja semena	34
2.1.9 Tajanje semena	36
2.2 Vzroki za poškodbe semenčic med postopkom globokega zamrzovanja	37
2.2.1 Oksidativni stres	39
2.3 Antioksidanti	42
2.3.1 Encimski antioksidanti	43
2.3.2 Neencimski antioksidanti	46
2.4 Sintetični detergent	46
2.5 Postopki za izboljšanje kvalitete semena	47
2.5.1 Prepiranje semena	48
2.5.2 Migracija – "swim up"	48
2.5.3 Filtracija	48

2.5.4	Gradientno centrifugiranje	49
3	MATERIAL IN METODE	53
3.1	Odbira živali	53
3.2	Odvzem semena	53
3.3	Prepiranje repov nadmodkov (<i>cauda epididymis</i>)	54
3.4	Pregled semena po odvzemu	54
3.4.1	Vizualna ocena gibljivosti	54
3.4.2	Določanje koncentracije semenčic s pomočjo spektrofotometra	55
3.4.3	Določanje koncentracije semenčic s pomočjo Neubauer števne kamrice	55
3.4.4	Določanje gibljivosti semenčic s pomočjo računalniške analize	56
3.4.5	Priprava vzorcev za določanje morfoloških sprememb semenčic	56
3.5	Standardni postopek obdelave semena in zamrzovanje	57
3.5.1	Prvi poskus: Vpliv detergenta (Equex STM®)	57
3.5.2	Drugi poskus: Vpliv antioksidantov	58
3.5.3	Tretji "in vivo" poskus: uspešnost osemenitve ovac s konzerviranim semenom	59
3.5.4	Četrti poskus: Vpliv enoslojnega centrifugiranja	60
3.6	Tajanje semena	60
3.6.1	Tajanje semena in priprava vzorcev za enoslojno centrifugiranje	61
3.7	Preiskave semena po tajanju	62
3.7.1	Računalniška analiza semena	62
3.7.2	Hipoozmotski test (HOST)	64
3.7.3	Določanje morfoloških sprememb	65
3.7.4	SCSA™ (<i>sperm chromatin structure assay</i>) test	65
3.7.5	SYBR-14/PI test	68
3.7.6	Sinhronizacija estrusa ter priprava ovac na umetno osemenjevanje	71
3.8	Statistične metode	72
4	REZULTATI	73
4.1	Ugotavljanje vpliva detergenta (Equex STM®)	73
4.1.1	Gibljivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic	73
4.1.2	Hipoozmotski test semenčic	77
4.1.3	Morfološke spremembe semenčic	78
4.1.4	SCSA™ (<i>sperm chromatin structure assay</i>) test	80

4.1.5	SYBR-14/PI test	81
4.2	Ugotavljanje vpliva antioksidantov katalaze in natrijevega piruvata	83
4.2.1	Giblјivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic	83
4.2.2	Hipoozmotski test semenčic	87
4.2.3	Morfološke spremembe semenčic	89
4.2.4	SCSA™ (<i>sperm chromatin structure assay</i>) test	91
4.2.5	SYBR-14/PI test	93
4.3	Ugotavljanje uspešnosti osemenitve ovac s konzerviranim semenom	96
4.3.1	Giblјivost in progresivna giblјivost semenčic	96
4.3.2	Brežost ovac – uspešnost umetne osemenitve	98
4.4	Ugotavljanje vpliva enoslojnega centrifugiranja	99
4.4.1	Giblјivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic	99
4.4.2	Hipoozmotski test semenčic	105
4.4.3	Morfološke spremembe semenčic	107
4.4.4	SCSA™ (<i>sperm chromatin structure assay</i>) test	109
4.4.5	SYBR-14/PI/PNA test	110
5	RAZPRAVA	115
6	SKLEPI	129
7	POVZETEK	131
8	SUMMARY	135
9	ZAHVALA	139
10	LITERATURA	141
11	PRILOGE	163
11.1	Kemikalije in materiali	163
11.2	Sestava raztopin	163
11.3	Giblјivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic – vpliv detergenta (Equex STM®)	165
11.4	Hipoozmotski test semenčic – vpliv detergenta (Equex STM®)	166
11.5	Morfološke spremembe semenčic – vpliv detergenta (Equex STM®)	167

11.6	SCSA™ (<i>sperm chromatin structure assay</i>) test – vpliv detergenta (Equex STM®)	168
11.7	SYBR-14/PI test – vpliv detergenta (Equex STM®)	169
11.8	Gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) – vpliv antioksidantov katalaze in natrijevega piruvata	170
11.9	Hitrost semenčic – vpliv antioksidantov katalaze in natrijevega piruvata	171
11.10	Hipoozmotski test semenčic – vpliv antioksidantov katalaze in natrijevega piruvata	172
11.11	Morfološke spremembe semenčic – vpliv antioksidantov katalaze in natrijevega piruvata	173
11.12	SCSA™ (<i>sperm chromatin structure assay</i>) test – vpliv antioksidantov katalaze in natrijevega piruvata	174
11.13	SYBR-14/PI test – vpliv antioksidantov katalaze in natrijevega piruvata	175
11.14	Gibljivost in progresivna gibljivost semenčic – uspešnost osemenitve ovac s konzerviranim semenom	176
11.15	Gibljivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic v ejakulatu – vpliv enoslojnega centrifugiranja	177
11.16	Gibljivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic v nadmodkovem semenu – vpliv enoslojnega centrifugiranja	178
11.17	Hipoozmotski test semenčic – vpliv enoslojnega centrifugiranja	179
11.18	Morfološke spremembe semenčic – vpliv enoslojnega centrifugiranja	180
11.19	SCSA™ (<i>sperm chromatin structure assay</i>) test – vpliv enoslojnega centrifugiranja	181
11.20	SYBR-14/PI test – vpliv enoslojnega centrifugiranja	182
11.21	SYBR-14/PNA test – vpliv enoslojnega centrifugiranja	183

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Neubauer števna kamrica</i>	55
<i>Slika 2: Računalniška analiza semena</i>	56
<i>Slika 3: Epruveti pred in po enoslojnem centrifugiranju</i>	62
<i>Slika 4: Semenčice izpostavljene HOS testu</i>	64
<i>Slika 5: Semenčice obarvane z barvilom Giemsa</i>	65
<i>Slika 6: Semenčice, obarvane z barvilom AO; nepoškodovana, dvovijačna DNK (zelena fluorescenca) in denaturirana, enovijačna DNK (rdeča fluorescenca)</i>	66
<i>Slika 7: Semenčice, obarvane z barvilom AO; nepoškodovana, dvovijačna DNK (zelena fluorescenca)</i>	67
<i>Slika 8: Semenčici, obarvani z barvilom Sybr-14 (zelena fluorescenca) in PI (rdeča fluorescenca)</i>	69
<i>Slika 9: Grafični prikaz subpopulacij semenčic po enoslojnem centrifugiranju, obarvanih z barvili SYBR-14/PI/PNA, določenih s pretočnim citometrom</i>	70
<i>Slika 10: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih (n = 36) in preiskovanih (n = 36) vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	73
<i>Slika 11: Primerjava povprečne hitrosti semenčic med kontrolnimi (n = 36) in preiskovanimi (n = 36) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	75
<i>Slika 12: Prikaz razlik v povprečnem odstotku hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic med kontrolnimi (n = 36) in preiskovanimi (n = 36) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	77
<i>Slika 13: Morfološke spremembe semenčic v kontrolnih (n = 34) in preiskovanih (n = 34) vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	78
<i>Slika 14: Prikaz razlik v povprečnem odstotku fragmentirane DNK semenčic pri kontrolnih (n = 36) in preiskovanih (n = 36) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	80
<i>Slika 15: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi, morbidnimi in mrtvimi semenčicami v kontrolnih (n = 31) in preiskovanih (n = 31) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	81
<i>Slika 16: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih (n = 42) in preiskovanih (n = 42) vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	83
<i>Slika 17: Primerjava povprečne hitrosti semenčic med kontrolnimi (n = 42) in preiskovanimi (n = 42) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	85
<i>Slika 18: Prikaz razlik v povprečnem odstotku hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic med kontrolnimi (n = 42) in preiskovanimi (n = 42) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	87

<i>Slika 19: Morfološke spremembe semenčic v kontrolnih (n = 42) in preiskovanih (n = 42) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	89
<i>Slika 20: Prikaz razlik v povprečnem odstotku fragmentirane DNK semenčic pri kontrolnih (n = 42) in preiskovanih (n = 42) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	91
<i>Slika 21: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi, morbidnimi in mrtvimi semenčicami v kontrolnih (n = 37) in preiskovanih (n = 37) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	93
<i>Slika 22: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena (n = 6) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	96
<i>Slika 23: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih v ejakulatu (n = 36) ter nadmodkovem semenu (n = 6) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	99
<i>Slika 24: Primerjava povprečne hitrosti semenčic med kontrolnimi (n = 36) in preiskovanimi (n = 36) vzorci semena – ejakulat v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	101
<i>Slika 25: Primerjava povprečne hitrosti semenčic med kontrolnimi (n = 36) in preiskovanimi (n = 36) vzorci semena – nadmodkovo seme v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	102
<i>Slika 26: Prikaz razlik v povprečnem odstotku hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci v ejakulatu (n = 36) ter nadmodkovem semenu (n = 6) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	105
<i>Slika 27: Morfološke spremembe semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih v ejakulatu (n = 36) ter nadmodkovem semenu (n = 6) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	107
<i>Slika 28: Prikaz razlik v povprečnem odstotku fragmentirane DNK semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih v ejakulatu (n = 30) v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	109
<i>Slika 29: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi, morbidnimi in mrtvimi semenčicami v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu (n = 30) in nadmodkovem semenu (n = 6) po odmrzovanju.</i>	110
<i>Slika 30: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi (Sybr-14+/PNA-), živimi (Sybr-14+/PNA+) in mrtvimi semenčicami (Sybr-14-/PNA+) v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu (n = 30) in nadmodkovem semenu (n = 6) po odmrzovanju.</i>	112

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1: Prikaz povprečnih odstotkov brejih ovac in števila osemenjenih ovac s kontrolnim semenom (n = 60), semenom z dodatkom detergenta Equex STM® (n = 60) ter semenom z dodatkom detergenta Equex STM® in natrijevega piruvata (n = 60).</i>	98
<i>Tabela 2: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivost, preživitveno sposobnost (Viadent®) ter hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	165
<i>Tabela 3: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hipoozmotsko pozitivno reagirane semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju</i>	166
<i>Tabela 4: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za morfološko spremenjene semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	167
<i>Tabela 5: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za DFI semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	168
<i>Tabela 6: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive, morbidne in mrtve semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	169
<i>Tabela 7: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivosti in preživitveno sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	170
<i>Tabela 8: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	171
<i>Tabela 9: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hipoozmotsko pozitivno reagirane semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	172
<i>Tabela 10: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za morfološko spremenjene semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	173
<i>Tabela 11: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za DFI semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	174
<i>Tabela 12: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive, morbidne in mrtve semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	175
<i>Tabela 13: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivost in progresivno gibljivost v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	176
<i>Tabela 14: Prikaz vrednosti \bar{X}, SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivost in preživitveno sposobnost (Viadent®) ter hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena – ejakulat v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.</i>	177

- Tabela 15: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivosti in preživitveno sposobnost (Viadent®) ter hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena – nadmodkovo seme v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju. 178*
- Tabela 16: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hipoozmotsko pozitivno reagirane semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih v ejakulatu ter nadmodkovem semenu v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju. 179*
- Tabela 17: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za morfološko spremenjene semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu in nadmodkovem semenu v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju. 180*
- Tabela 18: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za DFI semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju. 181*
- Tabela 19: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive, morbidne in mrtve semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu in nadmodkovem semenu po odmrzovanju. 182*
- Tabela 20: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive semenčice z nepoškodovanimi akrosomi (Sybr-14+/PNA-), žive z aktiviranimi akrosomi (Sybr-14+/PNA+) in mrtve semenčice s poškodovanjo zunanjo akrosomalno membrano (Sybr-14-/PNA+) v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu in nadmodkovem semenu po odmrzovanju. 183*

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
AO	akridin oranž
CIDR®	(ang. <i>Controlled Internal Drug Release</i>)
DFI	DNK fragmentacijski indeks
DGC	(ang. <i>Density gradient centrifugation</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
eCG	(ang. <i>Equine chorionic gonadotrophin</i>) konjski horionski gonadotropin
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
F/T	(ang. <i>frozen/thawed</i>)
GSH	glutation
GPx	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
H ⁺	vodikov ion
HEPES	N-(2-hidroksietil)piperazin-N`-2-etansulfonska kislina
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HOST	(ang. <i>hyposmotic swelling test</i>) hipoozmotski test
KCl	kalijev klorid
M	molarna
MgCl ₂	magnezijev klorid
mM	milimol
mOsm	miliosmol
N	normalna
Na ₂ HPO ₄	natrijev hidrogenfosfat
NaHCO ₃	natrijev bikarbonat
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
O ₂ ^{•-}	superoksidni radikal
•OH	hidroksilni radikal
PI	propidijev jodid

PIPES	piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kislina)
PMI	integriteta plazma membrane
PNA	(ang. <i>peanut agglutinin</i>)
PVA	polivinil alkohol
PVP	polivinil pirolidon
RKS	reaktivne kisikove spojine
SCSA TM	(ang. <i>sperm chromatin structure assay</i>)
SLC	enoslojno centrifugiranje
SMN	skupne morfološke napake
SOD	superoksid dismutaza
STR	(ang. <i>Straightness</i>)
SYBR-14/PI	LIVE/DEAD [®] Sperm Viability Kit
TES	N-tris(hidroksimetil)metil-2-aminoetan sulfonska kislina
TEST	TRIS titriran s TES
TNE	TRIS-NaCl-EDTA
TRIS	tris-(hidroksimetil)-aminometan
TRIS-HCl	tris-(hidroksimetil)-aminometan-klorovodikova kislina
Triton X-100	Polietilen glikol-mono-[p-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil]eter
VAP	povprečna hitrost krivulje gibanja
VCL	hitrosti krivulje gibanja semenčic
VSL	hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke
xg	centrifugalna sila

1 UVOD

Globoko zamrzovanje semena v tekočem dušiku omogoča dolgotrajno konzerviranje in skladiščenje oploditveno sposobnih semenčic tako pri človeku kot pri živalih. Pri različnih živalskih vrstah so poznane številne metode za globoko zamrzovanje semena. Proces globokega zamrzovanja semena vključuje več stopenj, pri katerih lahko pride do poškodb semenčic. Posledično se zmanjša njihova kvaliteta in oploditvena sposobnost. Pred zamrzovanjem seme razredčimo v mediju – razredčevalcu, ki semenčicam nudi čimbolj optimalne pogoje za preživetje. Na tržišču obstaja veliko različnih razredčevalcev tako za tekoče konzerviranje kot za zamrznjeno seme. Največ raziskav za pripravo semena na zamrzovanje je bilo opravljenih na bikovem in žrebčevem semenu. Glavni razlog je v tem, da se pri teh dveh vrstah domačih živali zamrznjeno seme tudi v praksi največ uporablja.

Kvaliteta in število semenčic, ki preidejo maternični vrat pri ovci, sta glavna dejavnika, ki vplivata na oploditveno sposobnost semenčic po umetni osemenitvi z globoko zamrznjenim semenom. Domneva se, da sta glavna vzroka za nižjo plodnost pri ovcah po intra-cervikalni osemenitvi slaba vitalnost globoko zamrznjenih semenčic in specifična zgradba materničnega vratu pri ovci. Pri umetnem osemenjevanju ovac se poslužujemo intrauterine in intracervikalne osemenitve, pri čemer je intracervikalni postopek bolj praktičen. Glede na to, da je uspešnost oploditve pri ovcah po intracervikalni osemenitvi z zamrznjenim semenom relativno nizka, potekajo raziskave v dveh smereh. Z razvojem novih postopkov zamrzovanja se poskuša zagotoviti čimbolj kvalitetno seme, vzporedno pa poteka tudi razvoj samih tehnik umetnega osemenjevanja pri ovcah.

Enega izmed glavnih problemov pri konzerviranju semena predstavljajo nenasičene maščobne kisline v membrani semenčic, ki so med postopkom konzerviranja podvržene oksidaciji. Proces globokega zamrzovanja semena zviša koncentracijo RKS v semenu različnih vrst živali (1, 2, 3). RKS predstavljajo veliko različnih prostih radikalov. Med najpogostejše oblike RKS, ki nastajajo med biološkim procesom in poškodujejo semenčice, vplivajo na preživitveno sposobnost in njihovo funkcionalnost, sodijo hidroksilni radikali, superoksidni radikali, vodikov peroksid, peroksidni radikali, alkilperoksilni in hipokloritni radikali (4, 5). RKS inaktivirajo različne proteine in sprožijo peroksidacijo nenasičenih maščobnih kislin v celičnih

membranah (6). Membrana semenčic je zaradi visoke vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin zelo dovzetna za lipidno peroksidacijo (7). Globoko zamrzovanje semena vpliva tudi na stabilnost DNK (8). RKS so citotoksične, inaktivirajo veliko proteinov prek oksidacije sulfhidrilnih skupin in nastanek karbonilnih spojin ter povzročajo razpad DNK verig. Pri dozorevanju semenčic, spermatogenezi, kapacitaciji, akrosomalni reakciji in tudi pri spojitvi semenčice z jajčno celico so pomembne vse lipidne komponente v membrani. Peroksidacija maščobnih kislin lahko prekine omenjene funkcije in celo zaustavi spermatogenezo. Peroksidacija nenasičenih maščobnih kislin v membrani semenčice povzroči izgubo njene funkcije in integritete. Proces lipidne peroksidacije se zaključi s formiranjem toksičnih produktov, kot so malondialdehid, konjugirani dieni ter sekundarni produkti peroksidacije (nasičeni in nenasičeni aldehidi, ketoni, okso- in hidroksi kisline, nasičeni in nenasičeni ogljikovodiki) (9). RKS motijo proces spermatogeneze, zaradi česar se iz zarodnega epitelijskega sproščajo večje količine nezrelh semenčic (semenčice s citoplazmatskimi kapljicami). Zaradi oksidativnega stresa semenčice izgubijo sposobnost gibanja, oploditve, posledica stresa pa so tudi DNK poškodbe v jedru semenčice (10). Manjše koncentracije RKS pa imajo tudi pozitiven učinek, saj pomagajo regulirati funkcije semenčic, npr. vodikov peroksid v manjših količinah (25 μ M) stimulira kapacitacijo semenčic, hiperaktivacijo, akrosomalno reakcijo in fertilizacijo (11, 12, 13). Tudi mrtve in poškodovane semenčice predstavljajo vir RKS, ki imajo škodljiv vpliv na gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic (14), škodljivo pa vplivajo tudi na integriteto membrane semenčic (15) in na integriteto DNK (16).

V naravnih mehanizmih za zaščito semenčic pred lipidno peroksidacijo sodelujejo različni antioksidanti in encimi, kot so SOD, katalaza, GPx, GR, ipd. Ti antioksidanti so zelo pomembni za zaščito semenčic pri različnih živalskih vrstah (17, 18, 19, 20).

1.1 HIPOTEZE

1. Dodana antioksidanta in detergent imajo pozitiven vpliv na vitalnost, oploditveno sposobnost in stabilnost DNK zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic

1.1. Natrijev piruvat

1.2. Katalaza

1.3. Detergent (Equex STM®)

1.4. Kombinacija antioksidantov

2. Dodana antioksidanta (katalaza in natrijev piruvat) v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena imata pozitiven vpliv na oploditveno sposobnost v *in vivo* pogojih in tako izboljšata brejost

3. Enoslojno centrifugiranje skozi vrstno specifični koloid ima pozitiven vpliv na vitalnost in stabilnost DNK odmrznjenih ovnovih semenčic

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ZAMRZOVANJE SEMENA

2.1.1 Pomen globokega zamrzovanja semena

S pomočjo globokega zamrzovanja semena lahko dolgoročno shranjujemo genetski material izbrane živalske vrste. To ima velik vpliv na razvoj in ohranjanje kmetijstva ter akvakulture, poleg tega pa postopek predstavlja tudi izredno pomembno orodje v biotehnologiji ter pri ohranjanju ogroženih živalskih vrst (21, 22). V kmetijstvu se zamrzovanje genetskega materiala uporablja za izboljšanje proizvodnih lastnosti ter večjo odpornost posameznih vrst domačih živali in prilagojenost na spremembe v okolju. Poleg tega pa se postopek uporablja tudi za ohranitev redkih živalskih vrst in mednarodno genetsko izmenjavo (21). Zamrzovanje genetskega materiala je pomembno tudi za proizvodnjo in konzerviranje transgenih živali in ima veliko vlogo v biomedicinskih raziskavah, še posebno na področju imunologije, virologije, nevrobiologije, toksikologije in v farmacevtski industriji. Za potrebe genske oz. semenske banke se zamrzuje seme redkih in avtohtonih pasem domačih živalskih vrst ter v zadnjem času tudi ogroženih divjih živalskih vrst (23). Obstaja več razlogov za zamrzovanje spolnih celic: ohranjanje genetske raznolikosti pri domačih in divjih populacijah (24), lažja dostopnost genetsko zanimivih linij udomačenih vrst in zdravljenje iatrogene neplodnosti (25, 26, 27, 28, 29). Nepogrešljivo je tudi za potrebe genske banke genetsko spremenjenih živalskih modelov, ki se bodo lahko uporabili za zdravljenje ljudi (24, 30). Dolgotrajno konzerviranje semenčic pa je zelo pomembno tudi za izvajanje IVF in/ali umetnega osemenjevanja v prihodnosti (31).

2.1.2 Zgodovina zamrzovanja semena

Prvi podatki o konzerviranju semena z nizkimi temperaturami segajo v leto 1776, ko je italijanski fiziolog Spallanzani opazil, da semenčice v snegu postanejo neaktivne, vendar pa ob segrevanju zopet oživijo. V novejši dobi je bilo zelo pomembno odkritje iz leta 1949, ko so Polge, Smith in Parkes ugotovili, da glicerol lahko zaščiti semenčice med postopkom zamrzovanja in deluje kot krioprotektant (32). Prvi opisan protokol zamrzovanja semena sega v leto 1950 (33). Prvi poskusi z glicerolom pa so bili opravljeni na petelinjem semenu. Zelo

hitro so sledili uspešni poskusi konzerviranja bikovega semena in leta 1951 rojstvo prvega teleta po umetni osemenitvi z zamrznjenim/odmrznjenim bikovim semenom (34, 35). Po letu 1950 je zamrzovanje semena in umetno osemenjevanje z uporabo zamrznjenega/odmrznjenega semena dobilo glavno vlogo v goveji proizvodnji. Uporaba zamrznjenega/odmrznjenega semena v drugih živinorejskih panogah je manj pogosta, vendar so vpeljani protokoli zamrzovanja semena za vse večje vrste domačih živali (36).

2.1.3 Zamrzovanje ovnovnega semena

Postopek uspešnega dolgotrajnega konzerviranja semena vključuje ohlajevanje, dehidracijo celic in zamrzovanje ter tajanje semena (37). Ohlajanje semenčic na 5 °C zmanjša njihovo metabolično aktivnost in jim s tem podaljša življenjsko dobo. Po tajanju se semenčicam povrnejo normalne funkcije, ki so potrebne za uspešno oploditveno sposobnost (38). Znanе so vrstno specifične razlike semenčic v velikosti in morfologiji, kot tudi v sestavi membrane in v metabolizmu. Vse te razlike izražajo velike variacije v občutljivosti na postopke zamrzovanja med vrstami in v nekaterih primerih tudi med posameznimi osebki iste vrste. Stopnje v postopku zamrzovanja semena pa so enake pri vseh vrstah, in sicer ne glede na vrstno specifične razlike med semenčicami. Vsi protokoli vključujejo odvzem semena in redčenje, dodajanje krioprotektantov ter ohlajanje, zamrzovanje in tajanje semena. Postopek zamrzovanja semenčic je zaradi razlik v obliki, volumnu, velikosti in kompoziciji celičnih organel specifičen za določeno živalsko vrsto (37). Pri vseh vrstah, kljub izbiri dobrega protokola zamrzovanja in upoštevanja individualnih razlik, med samim postopkom propade od 40–50 % semenčic (39, 40). Zamrznjeno/odmrznjeno seme ovnov ima visok odstotek gibljivih semenčic (40–60 %), vendar je le 20–30 % semenčic morfološko in funkcionalno normalnih. Semenčice pa so lahko gibljive, toda poškodovane, zaradi česar so slabše oploditveno sposobne (37).

Celična membrana ovnovih semenčic je zaradi svoje sestave bolj občutljiva na zamrzovanje kot pri drugih živalskih vrstah (bik, zajec) ali človeku (41). Membrana ovnovih semenčic ima večji odstotek nenasičenih maščobnih kislin in manjšo količino fosfolipidov, zaradi česar med postopkom zamrzovanja prihaja do večjih poškodb (42, 43, 44).

Zamrzovanje semena vključuje več stopenj, pri katerih lahko pride do poškodb semenčic. Ohlajanje semena po odvzemu (37 °C) na temperaturo 5 °C sproži spremembo strukture membrane semenčic. V membrani semenčic med zamrzovanjem in tajanjem nastanejo mehanske in ozmotske spremembe, ki posledično poškodujejo semenčice in zmanjšajo njihovo kvaliteto in oploditveno sposobnost (43, 45, 46).

Kvaliteta in število semenčic, ki preidejo maternični vrat pri ovci, sta glavna dejavnika, ki vplivata na oploditveno sposobnost semenčic po umetni osemenitvi z zamrznjenim semenom. Domneva se, da sta glavna vzroka za nižjo plodnost pri ovcah po intracervikalni osemenitvi slaba vitalnost globoko zamrznjenih semenčic in specifična zgradba materničnega vratu pri ovci. Na ovnovih semenčicah prihaja med postopkom globokega zamrzovanja do ultra strukturnih in biokemičnih sprememb ter posledično do zmanjšane funkcije, kar se kaže v slabši vitalnosti in gibljivosti semenčic v reproduktivnem traktu ovac (47). Ultra strukturne spremembe nastanejo med zamrzovanjem in tajanjem semena zaradi spremembe položaja lipidov v membrani. Spremenita se vezi lipid-lipid in lipid-protein, ki sta nujni za normalno delovanje membrane semenčic (48). Pri ovcah osemenjenih z zamrznjenim semenom po intracervikalni metodi so bili doseženi zelo slabi rezultati v primerjavi s svežim (49). Pri umetnem osemenjevanju ovac se lahko izvaja intrauterino in intracervikalno osemenitev, pri čemer je intracervikalni postopek bolj praktičen. Po intrauterini osemenitvi ovac z zamrznjenim semenom so bili doseženi zadovoljivi rezultati (50, 51). Glede na to, da je uspešnost oploditve pri ovcah po intracervikalni osemenitvi z zamrznjenim semenom relativno nizka, potekajo raziskave v dveh smereh. Z razvojem novih postopkov zamrzovanja se poskuša zagotoviti čimbolj kvalitetno seme, vzporedno pa poteka tudi razvoj samih tehnik umetnega osemenjevanja.

2.1.4 Odvzem semena

Najpogostejša načina odvzema semena pri ovnih sta odvzem s pomočjo umetne vagine ali s pomočjo elektroejakulacije. Prednost elektroejakulacije pred odvzemom semena z umetno vagino je v tem, da tehnika ne zahteva ovce v pojatvi in urjenja ovnov, ki lahko traja tudi več tednov (52). Seveda pa je odvzem s pomočjo umetne vagine prijaznejši do živali.

Ejakulati ovnov, odvzeti s pomočjo elektroejakulacije, imajo pogosto nižjo koncentracijo semenčic v primerjavi z ejakulati, odvzetimi s pomočjo umetne vagine (53). Elektroejakulator je naprava, ki proizvaja naraščajoče električne impulze. Rektalno sondo namažemo s primernim gelom in vstavimo v danko, tako da so elektrode obrnjene ventralno proti semenovodu in akcesornim spolnim žlezam. Elektroejakulator večinoma uporabljamo v avtomatski nastavitvi z naraščajočimi električnimi impulzi, kjer se intervali stimulacije in mirovanja izmenjujejo na 2 sekundi. Pri tem načinu odvzema je potrebno penis ovna potisniti iz prepucija in med stimulacijo z električnimi impulzi seme ujeti v ogreto epruveto (45).

Elektroejakulacija predstavlja prednost pred odvzemom z umetno vagino, saj se odvzame več semena v krajših časovnih intervalih, lahko pa se odvzame tudi seme ovnom, ki ne pokažejo interesa za samice (54, 55, 56). Ejakulati, odvzeti s pomočjo elektroejakulacije, imajo v povprečju večji volumen, vendar nižjo koncentracijo semenčic (57, 58, 59). Marco-Jimenez s sodelavci je z raziskavo na zamrznjenem/odmrznjenem ovnovem semenu, odvzetem s pomočjo elektroejakulacije, ugotovil višje število stabilnih in funkcionalnih semenčic (več živih, nekapacitiranih semenčic, več živih semenčic z intaktnimi akrosomi in živih semenčic z aktiviranimi akrosomi) v primerjavi s semenčicami, odvzetimi s pomočjo umetne vagine (45).

Semenčice se lahko pridobi tudi med postopkom prepiranja repa nadmodka iz mod ob kastraciji ali *post mortem* (60). Prepiranje repa nadmodka je alternativna metoda zbiranja semena, ki se največkrat uporablja po smrti visoko vrednih živali. Metoda je razmeroma enostavna, vendar je potrebno moda *post mortem* odvzeti v kratkem času, saj število vitalnih semenčic prične upadati že 24 ur po smrti. V laboratoriju se moda očistijo in izpreparirata se rep nadmodka in semenovod. Semenčice iz repov nadmodkov lahko pridobimo na dva načina. Poznani sta metoda retrogradnega prepiranja z ustreznim razredčevalcem ter flotacijska tehnika, pri kateri se z ostrim skalpelom opravi 10–15 horizontalnih rezov v distalni del repa nadmodka in semenovod. Rezine repa nadmodka se prestavi v petrijevko, doda 5 mL ustreznega razredčevalca, premeša ter pokrito inkubira 10 minut (61). Bolj primereno metodo za pridobivanje semenčic iz repa nadmodka predstavlja retrogradno prepiranje, saj je v semenu pri tem načinu prisotnih manj kontaminantov (eritrociti), dokazano pa so semenčice po zamrzovanju boljše kvalitete (62).

2.1.5 Postopki dolgotrajnega konzerviranja semena

Za dolgotrajno konzerviranje genetskega materiala se lahko uporablja klasično nadzorovano zamrzovanje, nitrifikacija in multitermalni gradient (63, 64).

2.1.5.1 Klasično nadzorovano zamrzovanje

Pri postopku klasičnega nadzorovanega zamrzovanja je zelo pomembna hitrost ohlajanja in zamrzovanja semena predvsem v kritičnem temperaturnem območju (-10 do -60 °C). Ta hitrost vpliva na semenčice tako, da ali ostanejo v ravnovesju z zunajceličnim okoljem ali pa se ohlajajo prehitro, zaradi česar se poveča možnost nastanka ledenih kristalov v semenčici (65). Pri postopku globokega zamrzovanja se semenčice, ogrete na telesno ali temperaturo okolja, najprej ohladijo na 5 °C, pri čemer so izpostavljene temperaturnemu šoku (66). Negativnemu vplivu temperaturnega šoka, ki povzroča poškodbo celične membrane ter posledično izgubo kalija, encimov, maščobe, holesterola, lipoproteinov ter ATP-ja, se lahko izognemo s pomočjo različnih dodatkov, kot so npr. jajčni rumenjaki ali mleko (67, 68) in postopnim zniževanjem temperature.

Po končanem ohlajevanju sledi dodajanje krioprotektanta in ekvilibracija. Krioprotektant sicer lahko dodamo že pri sobni temperaturi, vendar je pri tem načinu bolj izražena njegova toksičnost (69).

Nato sledi zamrzovanje semena. Semenčice se pri tem postopku ohlajajo dovolj hitro, da ne pride do poškodb in sočasno dovolj počasi (0,5–100 °C/min), da je omogočena dehidracija celice ter je s tem v celici onemogočen nastanek ledenih kristalov. Temperatura semenčic in razredčevalca, ki jih obdaja, se med postopkom počasnega zamrzovanja spusti pod ledišče. Iz vode, ki izstopi iz zunaj celičnega prostora, pa se tvorijo ledeni kristali. V zunaj celičnem prostoru se poveča koncentracija sladkorjev, soli in proteinov – hipertonično okolje. Ob počasnem ohlajanju voda, ki je v semenčici, lahko izstopi. Zaradi dehidracije se v semenčici med postopkom zamrzovanja ne tvorijo ledeni kristali. Zaradi toksičnosti in povzročitve ozmotskega šoka se uporabljajo nižje koncentracije krioprotektantov (5–10 %) (31, 44, 64). Semenčice se med postopkom globokega zamrzovanja zamrznejo v tekočem dušiku na temperaturo -196 °C.

2.1.5.2 Vitifikacija

Vitifikacija je postopek hitrega zamrzovanja s prehodom tekočine v trdno obliko, brez nastanka ledenih kristalov. Uporabljajo se visoke koncentracije krioprotektantov (30–50 %), ki zavrejo nastanek ledenih kristalov v celici in tako zmanjšajo temperaturni šok zaradi nizkih temperatur (31, 70). Čeprav se z vitifikacijo doseže boljše rezultate po tajanju, ima večina sesalskih semenčic nizko ozmotsko toleranco in visoko občutljivost na povečane koncentracije krioprotektantov (71, 72). Za zamrzovanje semena se ne uporablja prav pogosto tudi zato, ker je prenos temperature v semenčici prepočasen, da bi omogočal vitifikacijo brez nastanka ledenih kristalov (40, 64).

2.1.5.3 Multitermalni gradient

Multitermalni gradient, novejša tehnika, s katero je med postopkom zamrzovanja kontroliran in optimiziran nastanek ledenih kristalov ter omogoča zamrzovanje večjih količin (64, 73). Vzorci so s konstantno hitrostjo podvrženi linearnemu spustu temperature, do točke, kjer je kontroliran nastanek ledenih kristalov in njihove morfološke posebnosti. Metoda daje dobre rezultate kvalitete semenčic po tajanju (45 % merjasec, 65 % bik) (64, 74).

2.1.6 Razredčevalci

Razredčevalci za konzerviranje semena morajo imeti ustrezen pH in puferske lastnosti, primerno ozmolarnost in elektrolitsko sestavo, varovati morajo semenčice pred poškodbami, ki bi nastale med postopkom zamrzovanja in tajanja (47). Biti morajo izotonični, vsebujejo pa sestavine, ki povečajo volumen ejakulata, ščitijo semenčice pred temperaturnim šokom in spremembami pH, vsebujejo sestavine, ki predstavljajo vir energije za semenčice in zavirajo rast bakterij.

Razredčevalci za zamrzovanje semena vključujejo krioprotektante, ki ne prehajajo skozi membrano (mleko ali jajčni rumenjaki), krioprotektante, ki prehajajo skozi membrano (glicerol, etilen glikol ali DMSO), puferski sistem (TRIS ali TEST), enega ali več sladkorjev (glukoza, fruktoza, laktoza, rafinoza, saharoza ali trehaloza), soli (natrijev citrat, citronska kislina) in antibiotike (penicilin, streptomycin) (75).

pH razredčevalcev za pripravo zamrznjenega semena variira v območju od 6,7 do 7,0, glede na seme sesalcev, katerega pH je od 7,2 do 7,8 (47).

Laktoza, sukroza, rafinoza, trehaloza in dekstrani ne prehajajo skozi celično membrano, zaradi česar ustvarijo povečan ozmotski pritisk, ki sproži celično dehidracijo in zmanjša možnost nastanka ledenih kristalov v celici. Ti sladkorji sodelujejo s fosfolipidi v celični membrani in povečajo sposobnost preživetja med postopkom zamrzovanja (76). V kombinaciji s TRIS delujejo monosaharidi kot boljši krioprotektanti od disaharidov (77). V zadnjem času se v razredčevalce, namenjene zamrzovanju, vključuje tudi višje koncentracije trehaloze, kar omogoča boljšo zaščito med postopkom zamrzovanja in izboljša rezultate po tajanju (gibljivost semenčic, njihovo stopnjo preživetja, odpornost na spremembe temperature in integriteto akrosoma) (78).

Razredčevalci za konzerviranje ovnovnega semena, kot tudi za ostale vrste, morajo imeti primeren pH in pufersko kapaciteto, primerno ozmolarnost in morajo zaščititi semenčice pred poškodbami, ki bi nastale med procesom zamrzovanja. Razredčevalci, opisani spodaj, so razvrščeni na podlagi njihove uporabe ali glede na kronološki razvoj s poudarkom na njihovi učinkovitosti v povezavi s plodnostjo (47).

2.1.6.1 Razredčevalci z dodatkom citrata in sladkorjev

Razredčevalce z dodatkom citrata in sladkorjev, ki so se uspešno uporabljali za zamrzovanje bikovega semena, so raziskovalci testirali tudi na ovnovem semenu. Vendar so imeli ti razredčevalci za ovnove semenčice določene omejitve, zaradi česar so jih modificirali. Raziskovalci si niso bili enotni, kateri sladkor je najbolj primeren za citratni medij (arabinoza, fruktoza ali glukoza). Ob dodatku glicerola v razredčevalca se zniža ozmotski pritisk, zato se za ovno seme največ uporabljata razredčevalca na bazi citrata, glukoze in jajčnega rumenjaka ali citrata, fruktoze in jajčnega rumenjaka (79). Ovnove semenčice lahko prenašajo višjo koncentracijo glukoze ali fruktoze zaradi sposobnosti njunega pronicanja v semenčico in izenačitve ozmotskega tlaka (47).

2.1.6.2 Razredčevalci z dodatkom mleka

Mleko predstavlja izotonični medij in se je prvotno uporabljalo za razredčevanje bikovega semena. Mleko kot razredčevalec se je uporabljalo predvsem za redčenje svežega in tekoče konzerviranega ovnovnega semena (80). Razredčevalci na osnovi mleka nudijo zaščito preko proteinske frakcije – kazeina (37). Pogosto se je za zamrzovanje ovnovnega semena mleko kombiniralo z arabinozo, fruktozo ali jajčnim rumenjacom. Vendar dodatek jajčnega rumenjaka termično obdelanemu, homogeniziranemu mleku ni povečal preživetja semenčic po tajanju (81). Zamrzovanje v homogeniziranem mleku nudi boljšo preživitveno sposobnost semenčic kot zamrzovanje v Norman–Johnson razredčevalcu (82). Posneto mleko se je v praktične namene na Švedskem uporabljalo v razredčevalcu 1 in razredčevalcu 2 pri dvostopenjskem načinu redčenja in zamrzovanja semena (83).

2.1.6.3 Razredčevalci z dodatkom sestavljenih sladkorjev

Zaradi uspešne uporabe laktoze v razredčevalcu za zamrzovanje bikovega semena so laktozo pričeli uporabljati tudi pri zamrzovanju ovnovnega semena. Kombinacija laktoze in jajčnega rumenjaka se je uporabljala tako za razredčevalce, ki glicerol vsebujejo, kot tudi za tiste, ki glicerola ne vsebujejo (47, 84).

Saharoza se je uporabljala kot glavna sestavina sintetičnih razredčevalcev zaradi njene boljše zaščitne vloge na integriteto akrosoma v primerjavi z glukozo, fruktozo ali laktozo. Razredčevalci z dodatkom saharoze so vsebovali tudi sintetične antioksidante, da so preprečili lipidno peroksidacijo predvsem nenasičenih maščobnih kislin v membrani semenčice (47). Raziskovalci, ki so v raziskavi primerjali disaharida saharozo in trehalozo, so ugotovili podoben učinek obeh sladkorjev, vendar je imela trehaloza boljši zaščitni učinek na zamrznjene ovnove semenčice. Dodatek 100 mM trehaloze v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena lahko izboljša kvaliteto semenčic po tajanju s poudarkom na preživitveni sposobnosti, gibljivosti in linearni hitrosti. Dodatek disaharidov v razredčevalcu lahko zaščiti akrosom in membrano ovnovih semenčic (85).

Aisen s sodelavci je ugotovil, da dodatek trehaloze in EDTA v osnovnem razredčevalcu, v različnih stopnjah zamrzovanja (86), omogoča boljšo zaščito ovnovih semenčic pred temperaturnim šokom.

Dodatek trisaharidov, kot npr. rafinoze, je imel v razredčevalcu za zamrzovanje ovnevega semena boljši učinek na stabilizacijo kompleksa protein–lipid v membrani semenčice v primerjavi z mono in disaharidi (47, 87). Dodatek rafinoze v razredčevalcu je povečal odstotek gibljivih in progresivno gibljivih ovnovih semenčic po tajanju. Razredčevalec z dodatkom rafinoze v kombinaciji s hipotavrinom pa je povečal odstotek semenčic z boljšo preživitveno sposobnostjo in integriteto akrosomov ter zaščitil semenčice pred kripoškodbami (88).

2.1.6.4 Razredčevalci z dodatkom TRIS

Razredčevalci z dodatkom TRIS se pogosto uporabljajo za zamrzovanje bikovega, ovnevega in kozlovega semena (89). Ovneve semenčice prenesajo koncentracijo TRIS v območju med 250 do 400 mM. Glukoza kot sladkorna komponenta v TRIS razredčevalcu je ustrenejša od fruktoze, laktoze ali rafinoze (90). Fischer s sodelavci je ugotovil, da TRIS z dodatkom jajčnega rumenjaka najbolje zaščiti ovneve semenčice med postopkom zamrzovanja. V določenih raziskavah so ugotovili, da razredčevalci za zamrzovanje ovnevega semena z dodatkom TRIS zagotavljajo boljše rezultate *in vitro* kot razredčevalci na osnovi laktoze in jajčnega rumenjaka ali saharoze in laktoze z dodatkom jajčnega rumenjaka (47, 91). TRIS razredčevalec s fruktozo je bil uporabljen kot razredčevalec 1 pri dvostopenjskem načinu redčenja in zamrzovanja semena, TRIS pa je predstavljal tudi eno od komponent v nekaterih razredčevalcih na bazi laktoze in saharoze (91). TRIS razredčevalec z dodatkom glukoze se pogosto uporablja in priporoča za zamrzovanje ovnevega semena (75).

2.1.6.5 Ostali razredčevalci

Razredčevalci z dodatkom TES, HEPES ali PIPES so se pri ovnih za zamrzovanje uporabljali z različnim uspehom. Oploditvena sposobnost semenčic, zamrznjenih v teh razredčevalcih, je bila slabša kot v razredčevalcu s TRIS, glukozo in jajčnim rumenjaki (47). TEST v kombinaciji s posnetim mlekom in razredčevalci na osnovi TES, HEPES in PIPES so omogočali boljšo gibljivost semenčic po tajanju v primerjavi s TRIS razredčevalcem z dodano glukozo in jajčnim rumenjaki, vendar so semenčicam nudili slabšo zaščito akrosomalne integritete (92).

2.1.7 Krioprotektanti

V razredčevalce za zamrzovanje semena so vključeni krioprotektanti z namenom, da zmanjšajo fizikalni in kemični stres, ki nastane med postopki ohlajanja, zamrzovanja in tajanja (89, 93). Krioprotektanti povečajo skupno koncentracijo vseh topljencev v celici ter tako zmanjšajo nastanek ledenih kristalov, ki bi povzročili nepovratne poškodbe celičnih membran (94).

2.1.7.1 Krioprotektanti, ki prehajajo skozi celično membrano

Krioprotektanti te skupine morajo biti dobro topni v vodi in morajo obdržati to lastnost tudi pri nizkih temperaturah. Lahko prehajajo skozi celično membrano semenčic in delujejo tako zunaj kot znotraj celice. Da lahko delujejo kot krioprotektanti ne smejo biti zelo toksični, saj se morajo uporabiti v koncentracijah, ki še lahko zagotavijo njihovo krioprotektivno delovanje (94). Krioprotektanti te skupine (glicerol, DMSO, etilen glikol, propilen glikol) imajo nizko molekularno težo in povzročajo preureditev proteinov in fosfolipidov v celični membrani, s tem povečajo prehodnost membrane semenčic in njeno dehidracijo. Ob izpostavitvi semenčic nižjim temperaturah, zmanjšajo nastanek ledenih kristalov v celici in povečajo stopnjo preživetja med postopkom zamrzovanja (95, 96). Krioprotektanti te skupine, v razredčevalcih za zamrzovanje, delujejo kot topila za sladkorje in soli (89).

Glicerol je krioprotektant, ki prehaja skozi celično membrano in se najpogosteje uporablja kot krioprotektant za zamrzovanje ovnovega semena. Glicerol deluje tako, da povečuje število nezamrznjenih kanalov in s tem redči visoko koncentracijo soli ter preprečuje prevelik izstop vode iz semenčic (97). Na semenčice ima toksičen vpliv in lahko povzroči ozmotski stres. Pomembna koraka pri zmanjševanju toksičnosti glicerola sta postopno dodajanje pred zamrzovanjem in redčenje koncentracije glicerola po odmrzovanju semena (71). Obsežnost poškodb na semenčicah je odvisna od vrste živali in od koncentracije glicerola v razredčevalcu (89). Na količino glicerola v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovega semena vpliva postopek ohlajanja in zamrzovanja, sestava razredčevalca in čas ko se glicerol doda. Raziskovalci so ugotovili, da je za klasično zamrzovanje ovnovega semena, ob uporabi hipertoničnih razredčevalcev, optimalna koncentracija glicerola 6–8 % (81, 82, 98).

Glicerol kot krioprotektant se lahko semenu doda takoj ali kasneje po ohlajanju. Tako se ločita enostopenjski ali dvostopenjski način redčenja semena.

Pri enostopenjskem načinu redčenja se seme takoj po odvzemu redči s celotnim razredčevalcem, ki vsebuje glicerol.

Dvostopenjski način pa je postopek, kjer se seme po odvzemu redči z delom razredčevalca (brez glicerola) in po ohlajanju na 5 °C z drugim delom razredčevalca z dodatkom glicerola. Z dvostopenjskim načinom redčenja je seme pred zamrzovanjem krajši čas izpostavljeno glicerolu, s tem pa se zmanjša ozmotski stres in toksičen vpliv glicerola na semenčice (71, 75).

Glicerol je najbolj učinkovit krioprotektant za zamrzovanje semena sesalcev (99).

2.1.7.2 Krioprotektanti, ki ne prehajajo skozi celično membrano

Krioprotektanti te skupine (jajčni rumenjaki, posneto mleko, trehaloza, aminokisliline, dekstrani, sukroza) ne prehajajo skozi celično membrano in delujejo le v izvenceličnem prostoru (86). Krioprotektanti te skupine povzročijo dehidracijo semenčic, vplivajo na celično membrano ali delujejo kot topilo in z zniževanjem temperature razredčevalca preprečijo nastanek ledenih kristalov (100).

Jajčni rumenjak v razredčevalcu za zamrzovanje ovnevega semena zaščiti semenčice pred temperaturnim šokom in celično membrano med postopkom zamrzovanja in tajanja. Zaščitno vlogo se pripisuje fosfolipidu lecitinu in lipoproteinom z nizko gostoto (37, 89). Pravi mehanizem delovanja lipoproteinov z nizko gostoto še ni pojasnjen. Ti naj bi se med postopkom zamrzovanja in tajanja oprijeli celične membrane, preprečili izgubo fosfolipidov in povečali odpornost semenčic na postopek globokega zamrzovanja (101). Jajčni rumenjak ima večji vpliv na celično membrano bikovih kot ovnovih semenčic. V razredčevalcu za zamrzovanje ovnevega semena, pakiranega v slamice, se priporoča 15–17 % jajčnega rumenjaka (47). Oploditvena sposobnost in gibljivost semenčic po tajanju je bila dokazano najboljša, če je bilo seme pred tem redčeno z razredčevalcem, ki je vseboval 15 % jajčnega rumenjaka (102).

Razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena se lahko doda tudi disaharid trehaloza primerne koncentracije, ki nudi toplotno zaščito ovnovim semenčicam in zveča stopnjo preživetja (76, 86). Trehaloza izboljša oploditveno sposobnost zamrznjenih/odmrznjenih semenčic po intracervikalni osemenitvi. Trehaloza v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena deluje kot antioksidant (103).

Novejši protokoli zamrzovanja ovnovnega semena v razredčevalcu vključujejo tudi dodatek proteinov semenske plazme, ki naj bi zaščitili membrano semenčice pred temperaturnim šokom (104, 105, 106). Proteini semenske plazme se lahko dodajo ovnovim semenčicam v sveže seme po temperaturnem šoku (5 minut na 10 °C) (107, 108) ali po tajanju (109, 110, 111). Vežejo se na membrano semenčice, predvsem na akrosom, stabilizirajo membrano in sodelujejo v procesu kapacitacije (107, 108). Proteini semenske plazme ugodno vplivajo na ovnove semenčice, saj med postopkom zamrzovanja zmanjšajo poškodbe tako na funkcionalni kot na ultra strukturni stopnji (112, 113).

2.1.8 Procesiranje, hitrost ohlajanja in zamrzovanja semena

Kvaliteta semenčic po zamrzovanju in tajanju je odvisna tudi od postopka redčenja, pravilne izbire razredčevalca ter hitrosti ohlajanja in zamrzovanja.

Pri vseh živalskih vrstah je ob odvzemu seme ogreto na telesno temperaturo. Da bi preprečili temperaturni šok semenčic, je treba seme pred razredčevanjem ohranjati toplo. Nadaljnje procesiranje semena, ki vključuje postopno ohlajanje semena na 5 °C, je podobno tako za seme, ki se ga zamrzuje, kot za sveže konzervirano seme (114). Ohlajanje semena mora potekati postopoma, saj zaradi prehitrega ohlajanja med 30 °C in 0 °C nastanejo nepovratne poškodbe semenčic. Pri ohlajanju semena pod 0 °C se pričnejo tvoriti ledeni kristali (115).

Med procesiranjem semena se semenčice redči z vrstno specifičnim razredčevalcem, da se jih zaščiti pred škodljivimi vplivi ohlajevanja, zamrzovanja in tajanja (75). Redčenje semena je potrebno tudi zato, da se zagotovi primerno število semenčic, ki so potrebne za zagotovitev visoke stopnje plodnosti. Za zamrzovanje ovnovnega semena se priporoča 2–5 kratno redčenje (75). Preveliko redčenje (10 in več krat) ovnovnega semena močno zmanjša oploditveno sposobnost semenčic (114).

Po redčenju se seme ohladi na temperaturo 5 °C in predstavlja čas za prilagoditev in ekvilibracijo semenčic. V času ohlajanja se semenčice prilagodijo na počasnejši metabolizem. Ekvilibracija je časovni interval, v katerem so semenčice pred zamrzovanjem izpostavljene glicerolu. Glicerol prehaja skozi celično membrano semenčic, se vzpostavi ravnovesje med znotraj in zunajcelično koncentracijo glicerola in ostalimi ozmotsko aktivnimi elementi razredčevalca (75). V času ekvilibracije glicerol lahko povzroči spremembe v strukturi in biokemični integriteti semenčic, sproži akrosomalno reakcijo ter posledično zmanjša oploditveno sposobnost semenčic.

Pri dvostopenjskem načinu redčenja se glicerol doda semenu na temperaturi 5 °C, pri enostopenjskem pa takoj po odvzemu, pri čemer ima odvzeto seme ob kontaktu z glicerolom, temperaturo približno 30 °C. Pri obeh načinih redčenja je potreben določen čas ohlajanja semena do 5 °C, ki variira od ene do treh ur. Razredčevanje in ohlajanje na 15 °C lahko poteka hitro, brez negativnega vpliva na preživitveno sposobnost semenčic (116). Nadaljnje ohlajevanje semena med 15 in 5 °C pa mora zaradi zaščite semenčic pred temperaturnim šokom, ki povzroči nepovratne spremembe celične membrane, potekati dovolj počasi. Razredčeno seme ovnov je treba ohladiti na 5 °C v 1,5 do 3-urnem časovnem obdobju (44). Hitro ohlajanje semena na 5 °C zmanjša gibljivost ovnovih semenčic po tajanju in njihovo oploditveno sposobnost (117).

Po končanem ohlajevanju in ekvilibraciji sledi zamrzovanje semena. Zamrzovanje ovnovnega semena se lahko izvaja nad dušikovimi hlapi ali z uporabo računalniško programiranih zamrzovalnikov (118).

Pri postopku zamrzovanja nad dušikovimi hlapi se napolnjene slamice postavi horizontalno 4–5 centimetrov nad nivo dušika za 10–20 minut (44). Hitrost zamrzovanja pri tem načinu se lahko uravnava z oddaljenostjo slamic s semenom od nivoja tekočega dušika. Semenčice v slamicah, zamrznjenih nad dušikovimi hlapi v temperaturnem območju -55 °C, so imele slabšo stopnjo preživetja v primerjavi s semenčicami v slamicah, zamrznjenih v temperaturnem območju -75 do -125 °C (75, 84). Med postopkom zamrzovanja so semenčice podvržene dvema kritičnima temperaturnima območjema, ki sta povezana s poškodbami, in sicer območje podhladitve (0 do 5°C) in območje nastanka ledenih kristalov (od -6 do -15 °C) (119). Za zamrzovanje ovnovnega semena se v območju od 5 do -10 °C, največkrat izvaja hitrost

zamrzovanja od 20 do 30 °C na minuto (65). V območju od -10 do -60 °C mora zamrzovanje potekati s hitrostjo nad 50 °C/min, nato pa se hitrost zamrzovanja do končne zamrznitve zopet upočasni na 20 do 30 °C/min (44, 120). Večina poškodb na ovnovih semenčicah nastane v temperaturnem območju od -10 do -25 °C (50).

Programirani zamrzovalniki so v uporabi na centrih za umetno osemenjevanje, kjer se zamrzuje večje število doz za osemenjevanje. Zamrzovanje semena v takih zamrzovalnikih poteka s hitrostjo od 4 do 5 °C - 20 °C/min, od -5 do -110 °C - 55 °C/min in od -110 do -140 °C - 35 °C/min do potopitve v tekoči dušik (-196 °C) (44).

2.1.9 Tajanje semena

Prav tako kot zamrzovanje ima tudi tajanje pomemben vpliv na kakovost odmrznjenega semena (91). Med postopkom tajanja je zamrznjeno seme izpostavljeno kritičnemu temperaturnemu območju -15 in -60 °C. Stopnja tajanja semena je odvisna od hitrosti zamrzovanja. Previsoka hitrost zamrzovanja povzroči nastanek ledenih kristalov v celici v nasprotju s hitrostjo, ki je dovolj počasna, da zagotovi dehidracijo celice. Hitrost tajanja v prvem primeru mora biti višja, da se prepreči nastanek večjih ledenih kristalov iz majhnih, ki so nastali v semenčici med postopkom zamrzovanja (115). Semenčice, tajane s hitrejšim načinom, so krajši čas izpostavljene koncentrirani okolici in krioprotektantu ter hitreje dosežejo ravnovesje med zunaj- in znotrajceličnim prostorom kot pri počasnem tajanju (91). Najpogosteje se za tajanje ovnovnega semena uporablja temperaturo od 38 do 42 °C v času 30 sekund. Tajanje semena na višjih temperaturah ima podoben učinek na semenčice, vendar zaradi nevarnosti pregretja semena poteka krajši čas (60–75 °C/5–7 sekund) (75). Tajanje semena na višjih temperaturah poteka krajši čas, s čimer je onemogočen proces rekristalizacije manjših ledenih kristalov, ki so prisotni v semenčici. Med postopkom hitrega tajanja na višji temperaturi so semenčice prav tako krajši čas izpostavljene koncentrirani raztopini in krioprotektantu, hitreje pa se vzpostavi tudi zunaj- in znotrajcelično ravnovesje kot pri počasnejšem tajanju (91).

2.2 VZROKI ZA POŠKODBE SEMENČIC MED POSTOPKOM GLOBOKEGA ZAMRZOVANJA

Ovnove semenčice imajo po postopku globokega zamrzovanja slabo kvaliteto in preživitveno sposobnost, kar predstavlja veliko oviro za uporabo omenjenega semena pri ovcah.

Čeprav visok odstotek ovnovih semenčic (40–60 %) po zamrzovanju in tajanju ohrani gibljivost je le od 20 do 30 % biološko aktivnih. Semenčice, ki so gibljive, vendar poškodovane, se niso sposobne združiti z jajčno celico. Gibljivost in struktura semenčic sta prizadeti do različnih stopenj, vendar še ni znano, ali spremembe nastanejo enkratno ali v različnih fazah med postopkom zamrzovanja in tajanja (47).

Globoko zamrzovanje ovnovnega semena vključuje več stopenj, kot so redčenje, hlajenje, zamrzovanje in tajanje. V vsaki od stopenj lahko prihaja do poškodb semenčic, ki oslabijo normalno delovanje semenčic in njihovo oploditveno sposobnost. Glavne poškodbe semenčic med postopkom globokega zamrzovanja nastanejo zaradi temperaturnega šoka (115), ozmotskega stresa (115) in oksidativnega stresa (121, 122, 123).

Hlajenje lahko povzroči stres semenčic zaradi spremembe temperature, ki se manifestira s poškodbo semenčic in se imenuje temperaturni šok (115). Ovnove semenčice so med ohlajanjem občutljive na temperaturni šok, ki spremeni prepustnost membrane (124), povzroči poškodbe akrosoma in zmanjša gibljivost semenčic (125). Med ohlajanjem in segrevanjem ovnovih semenčic nastajajo poškodbe plazemske membrane zaradi spremembe položaja lipidov v kritičnem temperaturnem območju med 17 in 22 °C (126) in 26 °C (127). Poleg spremembe položaja lipidov je motena tudi asimetrija fosfolipidnega dvoslojnika v plazma membrani ovnovih semenčic (128, 129). Spremembe med vrstami v občutljivosti semenčic na postopek ohlajanja se pripisujejo tudi različnim variacijam v sestavi plazma membrane semenčic. Dovzetnost plazma membrane na spremembo položaja lipidov med ohlajanjem je obratno sorazmerna z vsebnostjo prisotnega holesterola (130). V ovnovih in bikovih semenčicah je v plazma membrani prisotna manjša količina holesterola, zato menijo, da so semenčice ovna in bika bolj občutljive na ohlajanje kot humane in zajčje (131).

Glavne poškodbe semenčic zaradi zamrzovanja so ultra strukturne, biokemične in posledično zmanjšana funkcionalnost semenčic. Ultra strukturne poškodbe zajamejo

plazemsko in akrosomalno membrano, akrosom, mitohondrije in osni cilindar ali aksonemo. Za ultra strukturne poškodbe so ovnove semenčice bolj dovzetne kot bikove. Bolj kot jedro in gibalni aparat ovnove semenčice sta za poškodbe občutljivi plazemska in akrosomalna membrana. Zunanja akrosomalna membrana semenčice je bolj dovzetna za poškodbe kot akrosom in notranji del membrane. Destabilizacija membrane ima za posledico večje morfološke spremembe semenčic, kot sta izguba ali nenormalni akrosomi. Postopek zamrzovanja in tajanja vpliva tudi na mitohondrije, pri čemer se spremeni njihova zgradba. Postopek pa ne povzroča zaznavnih sprememb filamentov in fibril v repu semenčice (47).

Poleg ultra strukturnih poškodb na semenčici med postopkom zamrzovanja in tajanja prihaja tudi do biokemičnih sprememb ali izgube pomembnih komponent, kot so: sprostitvev glutamin-oksalocetne-transaminaze, izguba lipoproteinov in aminokislin, zmanjšana aktivnost fosfataze, povečana vsebnost natrija in zmanjšana vsebnost kalija, inaktivacija akrosomalnih encimov hialuronidaze in akrozina, izguba prostaglandinov, zmanjšana sinteza ATP in ADP, zmanjšana proteolitična aktivnost akrosoma (42). V semenčicah bika, merjasca, mačke, človeka in ovna se zaradi strukturnih sprememb kromosoma lahko sproži denaturacija DNK (132). Ultra strukturne in biokemične spremembe semenčic so odgovorne za zmanjšano funkcionalnost, preživitveno in oploditveno sposobnost (47).

Zaradi temperaturnih in ozmotskih nihanj tako zamrzovanje kot tajanje povzročata velike spremembe v količini vode v celici, kar povzroči mehanski stres na plazma membrani (96, 133, 134). Med postopkom zamrzovanja semenčic se poruši ozmotsko ravnovesje zaradi ledenih kristalov, ki se tvorijo v izvenceličnem prostoru. Z zniževanjem temperature se povečuje količina ledenih kristalov. Semenčice, ki so izpostavljene hiperozmotskemu okolju, se skrčijo in dehidrirajo zaradi vode, ki izstopi iz celice (38). Med postopkom tajanja semenčic je proces obrnjen; tako prihaja do vstopa vode v celico in povzroči njeno nabrekanje, kar zopet povzroča poškodbo membrane (95). Kadar je hitrost zamrzovanja prehitra, voda iz celice ne more izstopiti in v celici nastajajo ledeni kristali, ki se med postopkom tajanja združujejo v večje in poškodujejo membrano semenčic (95). Sprememba ozmolarnosti škodljivo vpliva na gibljivost ovnovih kot tudi mačjih, človeških in žrebčevih semenčic (135, 136, 137). Zaradi spremenjenega ozmotskega stanja je oslabiljeno delovanje mitohondrijev, kar vodi v zmanjšano gibljivost semenčic (93).

Postopek globokega zamrzovanja sproži tudi prezgodnje dozorevanje membrane semenčic, zaradi česar se poveča razmerje kapacitiranih semenčic in semenčic z aktiviranimi akrosomi (124, 138). Zaradi vplivov, ki jih ima zamrzovanje na semenčice, se zmanjša selektivna prepustnost membrane in se poveča prekomeren vnos kalcijevih ionov v celico. Kalcijevi ioni, ki vstopijo v semenčice, vplivajo na proces kapacitacije semenčic in na proces združevanja plazemske in akrosomalne membrane. (31). Semenčice s spremenjenimi membranami ohranijo gibljivost, vendar se jim zmanjša življenjska doba in sposobnost oploditve (47).

Zelo pomemben dejavnik, ki povzroča poškodbe semenčic v postopku zamrzovanja, je tudi oksidativni stres (121, 122, 123). Več raziskav je pokazalo, da oksidativni stres povzroča poškodbe plazemske membrane semenčic in DNK pri človeku, žrebcu, ovnu in biku (16, 122, 139, 140, 141).

2.2.1 Oksidativni stres

V zdravem telesu se RKS in antioksidanti nahajajo v ravnovesju. Ko se poruši ravnovesje med proizvodnjo ali kopičenjem RKS in oslabljenim mehanizmom delovanja antioksidantov, nastane oksidativni stres (122, 123). Celice, ki so med postopkom hlajenja, zamrzovanja in tajanja izpostavljene aerobnim pogojem, potrebujejo kisik za vzdrževanje normalnega metabolizma (122). Prekomerna količina presnovkov, ki nastanejo med oksidacijskimi procesi kot so RKS lahko povzročijo poškodbe ali celo propad celic (142). RKS predstavljajo veliko različnih prostih radikalov, vsak pa ima prosti elektron, ki je zelo nestabilen. Prosti elektron se mora zato, da preide v stabilno obliko, vezati z drugim elektronom. Prosti radikali imajo težnjo, da se vežejo na druge molekule, s čimer preidejo v stabilno obliko (143). Med najpogostejše oblike RKS, ki vplivajo na funkcionalnost semenčic, sodijo hidroksilni radikali ($\cdot\text{OH}$), superoksidni radikali ($\text{O}_2\cdot$), vodikov peroksid (H_2O_2), peroksidni radikali ($\text{ROO}\cdot$), alkilperoksilni ($\text{RO}_2\cdot$) in hipokloritni radikali (4, 5). Vodikov peroksid je zadnji proizvod v procesu oksidacije in predstavlja najbolj toksičen oksidant (143, 144, 145). Prvi, ki je opisal škodljive vplive RKS na sesalske semenčice in reprodukcijske procese, je bil McLeod (146). Kasneje so sledile raziskave, ki so dokazale povezavo RKS z moško neplodnostjo (121, 122, 123). Visoka količina RKS v semenski plazmi človeka je povezana s slabo morfologijo semenčic, slabo gibljivostjo in

z nizko koncentracijo semenčic (147). Prekomerno proizvodnjo in kopičenje RKS lahko povzročajo levkociti in endotelne celice, pomanjkanje antioksidantov v semenski plazmi in semenčicah, negibljive, poškodovane in mrtve semenčice (131, 145, 148). Mrtve in poškodovane semenčice predstavljajo vir RKS, ki imajo škodljiv vpliv na gibljivost in preživitveno sposobnost nepoškodovanih semenčic (14). Med drugim imajo škodljiv vpliv na integriteto membrane semenčic (15) in DNK (16). Količina RKS se lahko poveča tudi zaradi odstranitve semenske plazme s centrifugiranjem. Semenska plazma kot produkt reprodukcijskega trakta samcev ima pomembno vlogo v dozorevanju semenčic (112). Proteini semenske plazme obdajo semenčice in jih med ejakulacijo zaščitijo (149). Dodatek semenske plazme ovnovim semenčicam po tajanju je povečal odpornost na temperaturni šok (108) ter zmanjšal škodljive vplive zamrzovanja, (111) pri čemer so specifične komponente semenske plazme omogočile stabilizacijo membran zamrznjenih/odmrznjenih semenčic (138). Rovegno s sod. je dokazal, da dodatek semenske plazme ovnovim semenčicam po tajanju izboljša zaščito pred temperaturnim šokom, prepreči prezgodnjo kapacitacijo ter pripomore k boljši preživitveni sposobnosti (150).

Zaradi oksidativnega stresa semenčice izgubijo sposobnost gibanja, oploditve, posledica stresa pa so tudi poškodbe DNK v jedru semenčice (10).

2.2.1.1 Proizvodnja RKS

Nenasičene maščobne kisline v membrani semenčic, ki so med postopkom konzerviranja podvržene oksidaciji, predstavljajo velik problem pri konzerviranju semena. Proces globokega zamrzovanja semena povzroči tudi dvig koncentracije RKS v semenu različnih vrst živali (1, 2, 3). Semenčice lahko proizvajajo RKS na dva načina: z NADPH oksidazo v plazma membrani semenčic in z NADPH odvisno oksidoreduktazo v mitohondrijih semenčic (122, 151). NADH/NADPH oksidaza se lahko nahaja tako v plazma membrani semenčic kot tudi v drugih celicah (152). Zaradi prisotnosti mrtvih semenčic v ovnovem in bikovem semenu je bila kot glavni vir RKS ugotovljena aktivacija aromatične aminokislinske oksidaze. Ovnove semenčice imajo višjo stopnjo aktivnosti aromatične aminokislinske oksidaze kot bikove semenčice (153). Za normalno delovanje celice pa je potrebna minimalna količina RKS (122). Manjše koncentracije RKS pomagajo regulirati funkcije semenčic, npr. vodikov peroksid v manjših količinah stimulira kapacitacijo semenčic, hiperaktivacijo, akrosomalno reakcijo in fertilizacijo

(12, 154, 155, 156). Prekomerno kopičenje RKS, kot sta O_2^* in H_2O_2 lahko povzročata poškodbe plazma membrane semenčic pri žrebcih (140), bikih (3), ljudeh in poškodbe jedrne in mitohondrijske DNK (121). Zaradi prevelike količine RKS prihaja do motenj v delovanju zunanje in notranje mitohondrijske membrane in do aktivacije kaspaz, cisteinskih proteaz, ki imajo vlogo v indukciji apoptoze (122). Lozano z sodelavci je z raziskavo dokazal, da H_2O_2 z aktivacijo kaspaze-3 povzroči apoptozo humanih semenčic (157). H_2O_2 ima najbolj škodljive oksidacijske sposobnosti (158, 159), lahko prosto prehaja skozi plazma membrano in povzroči poškodbe DNK (16, 144). V *in vitro* pogojih inkubacija bizonovih semenčic z H_2O_2 povzroči zmanjšanje gibljivosti semenčic (160). Eksogena generacija RKS s ksantin-ksantin-oksidazo lahko znatno dvigne odstotek fragmentirane DNK v žrebčevih (16) in humanih semenčicah (161). Preko Fentonove reakcije lahko iz H_2O_2 nastaja *OH , ki sproži lipidno peroksidacijo (145). Globoko zamrzovanje semena vpliva tudi na stabilnost DNK (8). *OH lahko tudi neposredno reagira s proteini in DNK ter povzroča poškodbe DNK (16). Zaradi delovanja RKS v semenčicah nastanejo poškodbe DNK, kot so modifikacije baz, izguba baz, podvojitve, premik bralnega okvirja, navzkrižne povezave DNK in prerazporeditve kromosomov (162). RKS povzročajo tudi različne oblike mutacij genov, kot sta točkasta mutacija in polimorfizem, zaradi česar se zmanjša kvaliteta semenčic (163). RKS so citotoksične, inaktivirajo veliko proteinov prek oksidacije sulfhidrilnih skupin in sprožijo nastanek karbonilnih spojin ter povzročajo razpad DNK verig. Z raziskavami je bilo dokazano, da prosti kisikovi radikali kot O_2^* nastajajo med postopki zamrzovanja in tajanja v humanih, govejih in pasjih semenčicah (3, 164, 165, 166). Med postopkom zamrzovanja in tajanja se zmanjša količina antioksidantov, kot sta GPx in SOD v humanih in bikovih semenčicah (1, 167). Zmanjšana količina antioksidantov ne more onesposobiti RKS, zaradi česar prihaja med postopkom zamrzovanja in tajanja do poškodb semenčic.

2.2.1.1.1 Lipidna peroksidacija

Plazma membrana semenčic sesalcev vsebuje veliko nenasičenih maščobnih kislin (168). Semenčice ovna, bika in merjasca so zaradi večje količine nenasičenih maščobnih kislin bolj občutljive na temperaturni šok kot semenčice človeka, zajca in psa (169). RKS inaktivirajo različne proteine in sprožijo peroksidacijo nenasičenih maščobnih kislin v celičnih membranah (6). Membrana semenčic je zaradi visoke vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin zelo

dovzetna za lipidno peroksidacijo (7). Lipidno peroksidacijo sestavljajo tri stopnje: sprožitev, razvoj in zaključna faza (143). Pri sprožitvi preko RKS nastajajo lipidni radikali. V drugi stopnji se lipidni radikali vežejo z molekulami nenasičenih maščobnih kislin na plazma membrani ali pa odvzamejo elektron kisiku in se oblikujejo lipidni peroksidni radikali. Lipidni peroksidni radikali odvzamejo vodikov atom drugim lipidnim molekulam in nastanejo lipidni hidroperoksidi, ki ostanejo stabilni, dokler se ne vežejo na prehodne kovinske ione. Nastanejo alkoksili in lipidni peroksidni radikali, ki se lahko naprej vežejo z ostalimi molekulami nenasičenih maščobnih kislin v plazma membrani. Proces se ne zaustavi, zaradi česar se reakcijo lipidne peroksidacije označi tudi kot verižno reakcijo (122, 170). V zaključni fazi lipidne peroksidacije, se prosti radikali med seboj kombinirajo in oblikujejo parne stabilne elektrone. Zaključna faza lipidne peroksidacije se lahko zaključi hitreje, kadar so prisotni antioksidanti, ki inaktivirajo proste radikale (145). Pri spermatogenezi, dozorevanju semenčic, kapacitaciji, akrosomalni reakciji ter tudi pri spojitvi semenčic z jajčno celico, so pomembne vse lipidne komponente v membrani. Peroksidacija maščobnih kislin lahko prekine omenjene funkcije in celo zaustavi spermatogenezo. Peroksidacija nenasičenih maščobnih kislin v membrani semenčic povzroči izgubo njenih funkcij in integritete (171). Proces lipidne peroksidacije se zaključi s formiranjem toksičnih produktov, kot so malondialdehid, konjugirani dieni ter sekundarni produkti peroksidacije (nasičeni in nenasičeni aldehidi, ketoni, okso- in hidroksi kisline, nasičeni in nenasičeni ogljikovodiki) (9).

2.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti delujejo kot zaščitni sistem proti poškodbam celic, ki jih povzročajo RKS ali drugi prosti radikali (144). Antioksidanti so razvrščeni v encimske in neencimske (145), lahko pa so topni v vodi ali maščobah (172). Encimski antioksidanti zaustavijo kopičenje prostih radikalov tako, da jih razgradijo (172). V naravnih mehanizmih za zaščito semenčic pred lipidno peroksidacijo sodelujejo različni encimski antioksidanti, kot so SOD, katalaza, GPx in GR (173). Ti antioksidanti so zelo pomembni za zaščito semenčic pri različnih živalskih vrstah (17, 18, 19, 20). Antioksidanti se nahajajo tudi v serumu in celicah, lahko pa so prisotni tudi v hrani. Kadar je v telesu premajhna količina antioksidantov ali je porušeno ravnotežje med antioksidanti ali RKS, tako stanje vodi v slabše delovanje celic in razvoj bolezni (172).

Semenska plazma predstavlja bogat vir antioksidantov, kot so α -tokoferol, vitamin C, sečna kislina, katalaza in SOD (174). GPx in SOD sta prisotni v nadmodku (173, 174), poleg tega pa sta GPx/GR par in SOD prisotni tudi v citoplazmi veznega dela semenčice (173). Naravni mehanizem obrambe z antioksidanti v semenčicah ni dovolj učinkovit, da bi semenčice popolnoma zaščitil pred poškodbami zaradi delovanja RKS (173). Ovnov ejakulat vsebuje zaznavne količine SOD in manjše količine GPx in katalaze (17), vendar se njihova koncentracija z redčenjem zelo zmanjša. Raziskave pri neplodnih moških so pokazale, da imajo le ti v semenski plazmi, v primerjavi z normalno oploditveno sposobnimi, manjšo količino ali popolno pomanjkanje nekaterih antioksidantov (175, 176). Semenska plazma, ki je pred postopkom konzerviranja semena bogata z antioksidanti, postane osiromašena zaradi postopka globokega zamrzovanja. Veliko kliničnih poskusov in proučevanj *in vitro* ter *in vivo* z antioksidanti je bilo opravljenih na humanem in živalskem semenu z namenom zmanjšati poškodbe semenčic, ki so posledica delovanja RKS in lipidne peroksidacije.

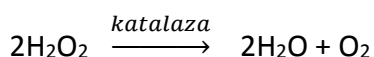
Dodatek antioksidantov, kot so GPx, cistein, vitamin E ali C v razredčevalce za seme, oralne pripravke ali hrano je izboljšal kvaliteto semena po zamrzovanju in tajanju pri človeku (177, 178), merjascu (179, 180, 181), biku (182), žrebcu (183) in psu (164). Oralni pripravek z vitaminom E pa pri človeku ni izboljšal kvalitete svežega semena (184).

2.3.1 Encimski antioksidanti

V aerobnih organizmih je prisotnih veliko encimskih antioksidantov, ki delujejo kot čistilni sistem za RKS. To skupino predstavljajo katalaza, GPx in SOD, ki sodelujejo in tvorijo katalitično triado (145, 185).

2.3.1.1 Katalaza

Vloga katalaze kot antioksidanta je v razgradnji H_2O_2 (145).



Enačba 1: Reakcija prikazuje cepitev vodikovega peroksida na vodo in kisik s pomočjo katalaze (145)

Equation 1: The reaction demonstrates that catalase converted hydrogen peroxide to oxygen and water (145)

Katalaza je prisotna v humani (186) in kunčji (187) semenski plazmi in v humanih semenčicah (188). Vir katalaze pri kuncu so sertolijeve celice in akcesorne spolne žleze (187, 189). Mišje in bikove semenčice pa katalaze ne vsebujejo (1, 190). Katalaza sodeluje skupaj s SOD, ki deluje kot prvi obrambni mehanizem in pretvori O_2^{\bullet} v H_2O_2 , nato pa nanj deluje katalaza (191). Dodatek katalaze v razredčevalcu za zamrzovanje je imel pozitiven vpliv na zamrznjene/odmrznjene pasje semenčice (164). Kombinacija katalaze in SOD pa je imela pozitiven vpliv na kvaliteto in oploditveno sposobnost merjaščevih semenčic (192). Previsoka (400 in 800 IE/mL) koncentracija katalaze je imela škodljiv vpliv na ovnove semenčice (193).

2.3.1.2 Glutation peroksidaza

Ta antioksidant se nahaja v semenčicah ali se izloča iz nadmodkov pri različnih živalskih vrstah, npr. pri žrebcu, biku in merjascu (185, 194). Neplodnost pri človeku je povezana z nezmožnostjo izločanja GPx v semenčicah (185), kar sovpada s pojavom zmanjšane plodnosti pri GPx miših z izbitim genom (194).

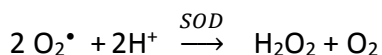
GPx je antioksidant, ki vsebuje selen in GPx kot darovalca elektrona (191). Njegova glavna vloga je odstranjevanje peroksidnih radikalov, pri čemer sproži lipidno peroksidazno verižno reakcijo in razgradnjo H_2O_2 (191). Čeprav sta katalaza in GPx zelo učinkovita pri inaktiviranju H_2O_2 , katalaze določene živalske vrste nimajo ali pa je prisotna le v sledovih. V primerjavi s katalazo predstavlja GPx glavni encimski antioksidant pri zaščiti semenčic sesalcev pred oksidativnim stresom (185).

Dodatek GPx v razredčevalec za seme je imel pozitiven vpliv na integriteto akrosomov ovnovih semenčic (193), izboljšala pa se je tudi gibljivost tako ovnovih (193) kot bikovih semenčic (182).

2.3.1.3 Superoksid dismutaza

SOD deluje kot prvi obrambni mehanizem pred oksidativnim stresom v celicah (145). Aktivnost encima so našli v oslovi in žrebčevi semenski plazmi (195) in v pasjih semenčicah (196). Količina SOD v bikovih semenčicah je višja kot GPx (1). Glavni vir encima pri samcih so akcesorne spolne žleze, kot sta prostata in semenski mešički (197, 198).

SOD kot encimski antioksidant odstrani O_2^{\bullet} iz citoplazme celic in ga pretvori v H_2O_2 (145).



Enačba 2: Encimski antioksidant, SOD katalizira ali odstrani superoksidni radikal in ga pretvori v vodikov peroksid in kisik (191)

Equation 2: The antioxidative enzyme, SOD catalyses or removes the superoxide radical, generating hydrogen peroxide and oxygen (191)

SOD skupaj s katalazo in GPx sodeluje pri odstranjevanju prostega radikala H_2O_2 . Dodatek SOD v razredčevalcu za seme je izboljšal kvaliteto semena, in sicer gibljivost, aktivnost mitohondrijev, integriteto akrosomov in DNK ovnovih semenčic (193) ter semenčic pri človeku (199) in rdečem jelenu (200).

2.3.1.4 Uporaba encimskih antioksidantov

Dodatek antioksidantov, kot so SOD, GPx in katalaza, je med tekočim konzerviranjem ovnevega semena omogočil zaščito semenčic pred delovanjem RKS (193). Kljub temu pa dodatek omenjenih treh antioksidantov v razredčevalcu za globoko zamrzovanje ovnevega semena ni izboljšal kvalitete semena po tajanju (201). Nasprotno pa so Silva in sodelavci dokazali, da SOD (100 E/mL) in reduciran GSH (2 in 5 mM) ohranita integriteto akrosoma zamrznjenega ovnevega semena, medtem ko dodatek SOD (100 E/mL) v TRIS razredčevalcu z dodanim jajčnim rumenjkom zaščiti plazma membrano semenčic po tajanju (202). Odstotek gibljivih semenčic in semenčic z intaktnimi akrosomi v ohlajenem bikovem semenu se je povečal ob dodatku SOD, katalaze in GPx (203). Raziskave pri različnih živalskih vrstah so pokazale pozitiven vpliv katalaze na gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic (164, 192, 204). Dodatek katalaze v razredčevalcu za konzerviranje po spolu ločenega ovnevega semena pa ni imel pozitivnega vpliva na kvaliteto semenčic po tajanju (205). Prav tako ni bilo pozitivnega učinka katalaze na izboljšanje gibljivosti ovnovih semenčic z dodatkom le-te v kemijsko definiran razredčevalec RSD-1 (206). Dodatek le katalaze ali SOD v razredčevalcu za zamrzovanje pri človeku ni imel vpliva na izboljšanje kvalitete semena. Značilno izboljšanje tako v gibljivosti kot v preživitveni sposobnosti semenčic pa je bilo zaznati ob dodatku kombinacije obeh antioksidantov (199). Vključitev katalaze in SOD ali obeh antioksidantov posamično v razredčevalcu za zamrzovanje merjaščevega semena je imela pozitiven vpliv na preživitveno sposobnost in gibljivost semenčic po tajanju (192).

2.3.2 Neencimski antioksidanti

Glavna naloga neencimskih antioksidantov je zaustaviti začetek verižne reakcije v procesu lipidne peroksidacije ter eliminacija ostalih RKS (143). Neencimski antioksidanti se imenujejo tudi čistilci prostih radikalov in se delijo na dve skupini, in sicer topne v vodi in topne v maščobah (143). Antioksidanti te skupine, ki se nahajajo v semenu, so minerali, vitamini, aminokisliline in sestavine proteinov (cink, tokoferol, albumin, GSH, taurin, hipotaurin, karnitin, karotenoidi, urati in prostasomi) (5) ter piruvat (159). V skupini neencimskih antioksidantov se nahajajo tudi vitamin A, C in E in urinska kislina (143, 145).

2.3.2.1 Uporaba neencimskih antioksidantov

Uporaba antioksidantov, kot so cistamin, taurin, trehaloza in vitamin E v razredčevalcih za konzerviranje ovnovnega semena izboljšajo gibljivost, preživitveno sposobnost in integriteto plazma membrane semenčic po tajanju (18, 76, 207, 208). Bucak s sodelavci je raziskoval vpliv trehaloze, tavrina cistamina in hialuronske kisline na eliminacijo RKS v TRIS razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena. Ugotovili so, da dodatek antioksidantov zviša odstotek gibljivih semenčic po tajanju v primerjavi s kontrolno skupino (207). Dokazan je bil tudi pozitiven vpliv dodane trehaloze na kvaliteto zamrznjenega kozlovega semena (78). Različni nivoji vitamina B₁₂ v TRIS razredčevalcu za ovno seme značilno izboljšajo preživitveno sposobnost, gibljivost, progresivno gibljivost in zmanjšajo morfološke spremembe semenčic (209). Vitamin E in B₁₆ imata najbolj izrazit vpliv na kvaliteto ohlajenega pasjega semena (210). Raziskave pri različnih živalskih vrstah so pokazale pozitiven vpliv natrijevega piruvata na gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic (141, 211). Hipotaurin izboljša parametre semena po tajanju pri merino ovnih (88). Opravljena je bila raziskava, kjer pa hipotaurin ni izboljšal gibljivosti ovnovih semenčic po tajanju (212).

2.4 SINTETIČNI DETERGENT

Poleg dodatka antioksidantov predstavlja dodatek sintetičnega detergenta v razredčevalcu za zamrzovanje semena dodatni mehanizem za zaščito plazma membrane semenčic med postopkom globokega zamrzovanja. Ta postopek, poleg pozitivne strani, ki jo predstavlja časovno neomejena ohranitev oploditvene sposobnosti, povzroči tudi motnje v

delovanju semenčic. Celična in akrosomalna membrana semenčic sta glavni strukturi, kjer prihaja do sprememb zaradi termične, mehanske, kemijske in osmotske napetosti in sta kritični za pravilno delovanje semenčic. Detergent izboljša preživitveno sposobnost semenčic po tajanju. Deluje kot površinsko aktivna snov in stabilizira celično membrano, predvsem akrosomalno, in ščiti semenčice pred škodljivimi vplivi med postopkom zamrzovanja in tajanja (213, 214).

Detergent, dodan v razredčevalec, ki vključuje jajčni rumenjaki, ima pozitiven vpliv na stabilnost membrane med postopkom zamrzovanja in tajanja semenčic. Dodatek detergenta Equex STM® v razredčevalcu za zamrzovanje pasjega semena zaščiti semenčice pred poškodbami, ki nastanejo med postopkom globokega zamrzovanja (215). Raziskave o uporabi detergenta v TRIS razredčevalcih za zamrzovanje semena so pokazale izboljšanje kavalitete semenčic po tajanju pri različnih živalskih vrstah. Uporaba detergenta Equex STM® izboljša kvaliteto zamrznjenih semenčic psa (216, 217), mačka (218), merjasca (219), bika (213), žrebca (214) in jelena (220).

2.5 POSTOPKI ZA IZBOLJŠANJE KVALITETE SEMENA

Postopki za izboljšanje kvalitete semena temeljijo na selekciji normalnih ter nepoškodovanih semenčic v *in vitro* pogojih. Normalne semenčice se gibljejo progresivno, linearno na način, da lahko preidejo naravno bariero, ki jo predstavlja maternični vrat z gubami in obroči ter veliko pojatvene sluzi (221). Najpogostejši postopki za selekcijo semenčic so prepiranje z razredčevanjem in centrifugiranjem, filtracija oz. gradient separacija ali "*swim up*" postopek (migracija semenčic) (222). Novejši postopki pa izkoriščajo alternativno metodo "*multiple micro fluidic flow streams*" za samostojno migracijo semenčic, s pomočjo katere se ločijo gibljive semenčice podobno kot v *in vivo* pogojih (223). Vendar ti postopki niso primerni za izolacijo večjega števila semenčic, zato se pri domačih živalih uporabljajo alternativne metode, kot so filtriranje skozi kolono adhezivnih delcev, Sephadex ali stekleno volno (224) ter gradientno centrifugiranje skozi kremenčeve kroglice, obdane s silanom (222). Centrifugiranje skozi enoslojni vrstno specifični koloid je do sedaj dokazano najboljši postopek za selekcioniranje normalnih ter nepoškodovanih semenčic pri večini testiranih živalskih vrst (225, 226, 227).

2.5.1 Prepiranje semena

Odvzetemu ejakulatu se takoj po odvzemu doda vrstno specifičen razredčevalec. Tako razredčeno seme se centrifugira, nato se odstrani supernatant (semenska plazma in razredčevalec), peleta semenčic pa se ponovno razredči z zelenim volumnom. Na ta način se semenčice ločijo od večine komponent, ki se nahajajo v semenski plazmi (228). S postopkom prepiranja se ne odstrani RKS, ki imajo negativen vpliv na semenčice. Po centrifugiranju se v peleti nahajajo mrtve, morbidne, nenormalne kot tudi vitalne semenčice (229).

Pri merjascu so raziskovalci iz semenske plazme uspeli odstraniti komponente z nizko molekularno težo s pomočjo modificirane tehnike prepiranja – dialize (230).

2.5.2 Migracija – "swim up"

Postopek izkorišča sposobnost gibljivih semenčic, da migrirajo iz ene raztopine, kot sta razredčen ejakulat ali peleta semena pridobljena po izpiranju, v medij ali razredčevalec z drugačno sestavo (228). Semenčice se uspešno oddelijo od semenske plazme. Semenska populacija pa se po koncu postopka lahko nahaja na vrhu, pod ali na eni strani raztopine (228). Selekcija temelji na sposobnosti gibanja semenčic, vendar ta način ne zagotovi selekcije vitalnih semenčic z normalno morfologijo glave ter nepoškodovanimi kromosomi in akrosomi (231). Semenčice s poškodovanimi repi ne morejo migrirati iz ene v drugo raztopino, kar nakazuje na boljše rezultate morfologije repa in veznega dela po metodi migracije v primerjavi s postopkom izpiranja (229). Glavna pomanjkljivost metode je v stopnji preživetja, ki je le 10–20 % (229). Prav zaradi tega ter tudi dolgotrajnosti metoda pri večini živalskih vrst ni primerna za pripravo osemenjevalnih doz za umetno osemenjevanje (226).

2.5.3 Filtracija

Efekt filtracije se doseže z vzajemnim delovanjem semenčic in filtra, ki ga lahko predstavljajo steklene kroglice, Sephadex ali membranski filtri in sposobnost semenčic, da se gibljejo (232). Težnja nevitnih semenčic je, da se lepijo na podlago veliko bolj kot normalno aktivne semenčice (233). Pri postopku filtracije skozi Sephadex G-10 se zaradi spremembe naboja na površini negibljivih in mrtvih semenčic te pričnejo zlepljati (234) ali pa se protein, ki je prisoten na površini kapacitiranih semenčic, veže na Sephadex delce (235). S postopkom

filtracije se uspešno odstrani levkocite (nastanek RKS) ter selekcionira gibljive, morfološko normalne semenčice (236) in morda tudi semenčice z intaktnimi akrosomi (237). Stopnja preživetja semenčic po filtraciji je 63 %, med postopkom pa se izgubi manj semenčic kot pri ostalih metodah (224).

2.5.4 Gradientno centrifugiranje

Razredčeno seme se centrifugira skozi plasti koloida, ki učinkovito loči semenčice od semenske plazme ter selekcionira subpopulacijo vitalnih semenčic z dobro gibljivostjo in ohranjeno integriteto kromatina. Med postopkom DGC se semenčice gibljejo proti točki v koloidu, ki ustreza njihovi specifični teži (238). S spreminjanjem pogojev centrifugiranja (centrifugalna sila in čas) in fizikalnih lastnosti koloida se oblikuje peleta semena, ki vsebuje normalne, nepoškodovne semenčice (226).

2.5.4.1 Centrifugiranje skozi gostotni gradient ("*Density gradient centrifugation*")

DGC loči gibljive, morfološko normalne semenčice z intaktnim kromatinom od preostalega ejakulata (239). Po postopku DGC se lahko obdelata le majhna volumna ejakulatov, (240) stopnja preživetja pa je pogosto nizka (222).

Najbolj široko uporabljen koloid za živalsko seme doslej je Percoll™, ki sestoji iz PVP obdanih kremenčevih delcev v slani raztopini ter iz dveh ali več plasti različne specifične teže (226). Problem predstavlja spremenljiva raven endotoksina v različnih plasteh koloida, poročali pa so tudi o toksičnosti prostega PVP v koloidu (241).

V zadnjem desetletju je Percoll™ zamenjal s silanom obdan kremenčev koloid za uporabo v humani asistirani reprodukciji (228) in nekaj vrstno specifičnih oblik za uporabo v živalski asistirani reprodukciji (239, 242, 243, 244). S silanom obdan kremenčev koloid ima prednosti pred s PVP obdanim koloidom zaradi termične obdelave, pri čemer se zmanjša raven endotoksina. Koloid je tudi dlje časa obstojen v slani raztopini in se ga lahko pripravi za takojšnjo uporabo v komercialne namene (226). Produkti, ki se uporabljajo v komercialne namene za semenčice človeka, so Isolate, Silselect, Suprasperm, PureSperm®, BoviPure™ za bika, EquiPure™ za žrebca in PorciPure™ za merjasca (226). Postopek selekcije semenčic z metodo DGC je pri ovnih izboljšal kvaliteto semenčic po tajanju z izjemo % DFI (245).

2.5.4.2 Centrifugiranje skozi enoslojni koloid ("*Single layer centrifugation*")

Postopek je poenostavitev DGC, pri čemer je uporabljena samo ena plast koloida. Postopek izključuje zamudno pripravo in namestitev več plasti koloida z različno specifično težo. Med centrifugiranjem se semenčice gibljejo proti dnu epruvete, semenska plazma pa se zadrži na vrhu koloida (226). Z uporabo nove vrstno specifične formule koloida (Androcoll) za živalske semenčice, razvite na "Swedish University of Agricultural Sciences", je mogoče pridobiti vzorce semena enake kvalitete po DGC in SLC postopku. Postopek se lahko uporablja za sveže žrebčevo seme (246, 247), zamrznjeno/odmrznjeno bikovo seme (248) ter sveže in skladiščeno merjaščevo seme (249). Nov postopek SLC skozi vrstno specifični koloid, Androcoll, je bil razvit za žrebca, merjasca, bika, psa in mačka (227).

V raziskavah z zamrznjenim/odmrznjenim žrebčevim semenom, obdelanim po postopku SLC po tajanju, se je povečal odstotek progresivno gibljivih semenčic, preživitvena sposobnost ohranjena pa je bila tudi aktivnost mitohondrijev (250). SLC nudi alternativni, bolj praktičen postopek kot DGC za selekcioniranje vitalnih, oploditveno sposobnih živalskih semenčic po odmrzovanju. SLC postopek je primeren za učinkovito selekcioniranje semenčic dobre kvalitete brez poškodb. Prednost SLC postopka je tudi, da omogoča obdelavo ejakulatov večjega volumna (žrebec, merjasec) (226). S SLC postopkom se lahko iz vzorca semena odstrani tudi patogene organizme (251). Postopek zahteva samo eno plast koloida, zaradi česar je manj zahteven in hitrejši v primerjavi s postopkom DGC (226).

Pri žrebcih se s postopkom SLC izboljša kvaliteta "problematičnih" ejakulatov za pripravo osemenjevalnih doz (252). SLC z uporabo AndrocollTM – E je enostavna in zanesljiva metoda za pridobitev semenčic žrebca najboljše kvalitete po tajanju ter najbolj optimalno oploditveno sposobnostjo, pri čemer se izboljšajo praktično vsi parametri, s katerimi ugotavljamo kvaliteto in oploditveno sposobnost semenčic (250). Pri žrebcih lahko z uporabo metode SLC na svežem semenu dosežemo višji delež semenčic z normalno morfologijo in ohranjeno integriteto kromatina (247) ter gibljivih in vitalnih semenčic (246), v primerjavi s neobdelanim vzorcem semena.

Pri merjascih z vključitvijo SLC postopka izboljšamo kvaliteto semenčic s poudarkom na normalni morfologiji in premočrtni gibljivosti (253). Prav tako se s postopkom SLC selekcionira

subpopulacija semenčic dobre kvalitete zamrznjenih/odmrznjenih žrebčevih semenčic (254), pri bikih pa imajo zamrznjene/odmrznjene semenčice, pridobljene po postopku SLC, dobro oploditveno sposobnost (248). Pri mačkah postopka SLC pred zamrzovanjem in "swim up" izboljšata kvaliteto semenčic, pridobljenih s prepiranjem nadmodkov. Izboljša se morfolologija semenčic, integriteta DNK in membrane, postopek pa odstrani tudi celične kontaminante (255). Tudi kvaliteta semenčic pri psih, selekcioniranih s postopkom SLC z uporabo Androcoll™ – C po tajanju, je bila boljša v primerjavi s kontrolnimi vzorci (256).

SLC trenutno predstavlja najbolj praktičen postopek za selekcioniranje semenčic v živalski industriji (226).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ODBIRA ŽIVALI

V poskus, ki je bil razdeljen na štiri dele, smo vključili šest ovnov jezersko-solčavske pasme, oplemenitenih z romanovsko ovco, tri ovne in sto osemdeset ovac avtohtone pasme istrska pramenka. Ovne smo odbrali med rednim androloškim pregledom na testni postaji za mlade ovne v Logatcu, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Ovnom smo odvzeli ejakulate ter določili koncentracijo in gibljivost semenčic. Izbrali smo ovne z različno koncentracijo ejakulata ter progresivno gibljivostjo semenčic 60 % in več. V času odvzema semena smo imeli ovne nastanjene na Kliniki za reprodukcijo in konje, Veterinarske fakultete v Ljubljani, kjer smo opravljali tudi zamrzovanje semena. Poskusno umetno osemenjevanje pa smo opravili na ovcah, ki so se nahajale na Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica, Veterinarske fakultete v Ljubljani.

V prvi poskus smo vključili 6 ejakulatov šestih ovnov, v drugi poskus 7 ejakulatov šestih ovnov, v tretji poskus 6 ejakulatov treh ovnov ter 180 ovac, v četrti poskus 6 ejakulatov ter seme odvzeto s prepiranjem nadmodkovih vodov šestih ovnov. V poskus je bilo skupno vključenih 180 ovac, 132 ejakulatov ter 6 vzorcev semena, odvzetega s prepiranjem nadmodkovih vodov.

3.2 ODVZEM SEMENA

Odvzem semena smo izvajali s pomočjo elektroejakulacije. Seme smo odvzeli s prenosnim elektroejakulatorjem (ELEKTROJAKTM-III, Ideal Instrument Inc., Chicago, ZDA in EE e320, Mini Tüb GmbH, Tiefenbach, Nemčija), ki proizvaja naraščajoče električne impulze. Sestavljajo ga baterija s polnilcem (12–17 V), mala rektalna sonda in upravljalac impulzov. Pri odvzemu je oven ležal na boku, dobro fiksiran. Rektalno sondo smo namazali z gelom za rektalne preglede in jo vstavili v rektum. Pred električno stimulacijo smo s pomočjo sonde narahlo masirali območje akcesornih spolnih žlez. Nato smo sprožili električno stimulacijo tega področja. Impulzi, ki jih je aparat proizvajal, so postopoma naraščali in sprožili ejakulacijo. Za prvi, tretji in četrti poskus smo od vsakega ovna odvzeli po 6 ejakulatov ter 7 ejakulatov za drugi del poskusa. Skupno smo za prvi in četrti poskus odvzeli 36, za drugi 42 in tretji poskus

pa 18 ejakulatov. Odvzem ejakulatov smo pri posameznem ovnu izvajali enkrat tedensko. S pomočjo spektrofotometra z vgrajenim filtrom valovne dolžine 546 nm (photometer SDM 5 in SDM 6, Mini Tüb GmbH, Tiefenbach, Nemčija) smo izmerili koncentracijo ejakulatov. Gibljivost semenčic pa smo ocenili s fazno-kontrastnim mikroskopom z vgrajeno grelno mizico, segreto na 37 °C, pri 100-kratni povečavi. Uporabili smo predmetnice in pokrovna stekelca, ki so bila ogreta na 37 °C. Odvzete ejakulate smo pred nadaljnjo obdelavo hranili v vodni kopeli (model 1003, GFL, Burgwedel, Nemčija), ogreti na 27 °C.

3.3 PREPIRANJE REPOV NADMODKOV (*CAUDA EPIDIDYMIS*)

V četrtem poskusu smo po odvzemu zadostnega števila ejakulatov opravili kastracijo ter iz nadmodkov pridobili semenčice. Moda smo v temperaturno izolirani posodi (stiroporni zaboj) takoj po kastraciji prenesli v laboratorij, kjer smo repe nadmodkov ločili od preostalega tkiva mod in nadmodkov. Tako pridobljene repe nadmodkov smo v petrijevki narezali na tanke rezine in jih preprali s približno 10 mL TRIS razredčevalca z dodatkom jajčnega rumenjaka–razredčevalec 1. Razredčevalec je bil ogret na 27 °C. Pridobljeno seme smo nato prefiltrirali skozi filter za žrebčevo seme, mu s pomočjo spektrofotometra izmerili koncentracijo in ga pred nadaljnjo obdelavo hranili v vodni kopeli, ogreti na 27 °C.

3.4 PREGLED SEMENA PO ODVZEMU

3.4.1 Vizualna ocena gibljivosti

Vizualno oceno gibljivosti smo opravili na nerazredčenih vzorcih. Za oceno smo iz dobro premešanega ejakulata odvzeli kapljico velikosti 8 µL, ki smo jo prekrili s pokrovnim stekelcem in opravili pregled. Pregled smo opravljali s pomočjo fazno-kontrastnega mikroskopa (Olympus BX 40) z vgrajeno grelno mizico, segreto na 37 °C. Tako predmetnice kot pokrovna stekelca so bila ogreta na 37 °C, s čimer smo preprečili temperaturni šok semenčic. Pod 100-kratno povečavo smo nato, na treh vidnih poljih, ocenili gibljivost semenčic. Končna ocena gibljivosti je pomenila povprečje ocene treh vidnih polj posameznega vzorca.

3.4.2 Določanje koncentracije semenčic s pomočjo spektrofotometra

Iz vzorca, namenjenega preiskavi, smo odvzeli 8 μL ejakulata ter ga v kiveti razredčili s 4 mL fiziološke raztopine. Razredčen vzorec smo dobro premešali, ga vstavili v spektrofotometer ter tako izmerili koncentracijo semenčic za dani vzorec. Pri vsakem vzorcu semena smo opravili dve meritvi. Končna ocena koncentracije je pomenila povprečje dveh meritev posameznega vzorca.

3.4.3 Določanje koncentracije semenčic s pomočjo Neubauer števne kamrice

Ta način smo uporabili pri vzorcih, na katerih koncentracije semenčic ni bilo mogoče določiti s pomočjo spektrofotometra, in sicer:

Iz vzorca, namenjenega preiskavi, smo odvzeli 25 μL ejakulata ter ga v epruveti razredčili z 10 mL destilirane vode, v volumskem razmerju 1:400. Razredčen vzorec smo dobro premešali ter z njim po principu kapilarnega vleka napolnili števne kamrice. Po preteku desetih minut smo s pomočjo fazno-kontrastnega mikroskopa pri 200-kratni povečavi prešteli semenčice. Za vsak vzorec smo opravili dve meritvi. Končna koncentracija je pomenila povprečje dveh meritev posameznega vzorca. Izračun, pri katerem smo določili koncentracijo semenčic v milijonih na mililiter, smo opravili z uporabo formule

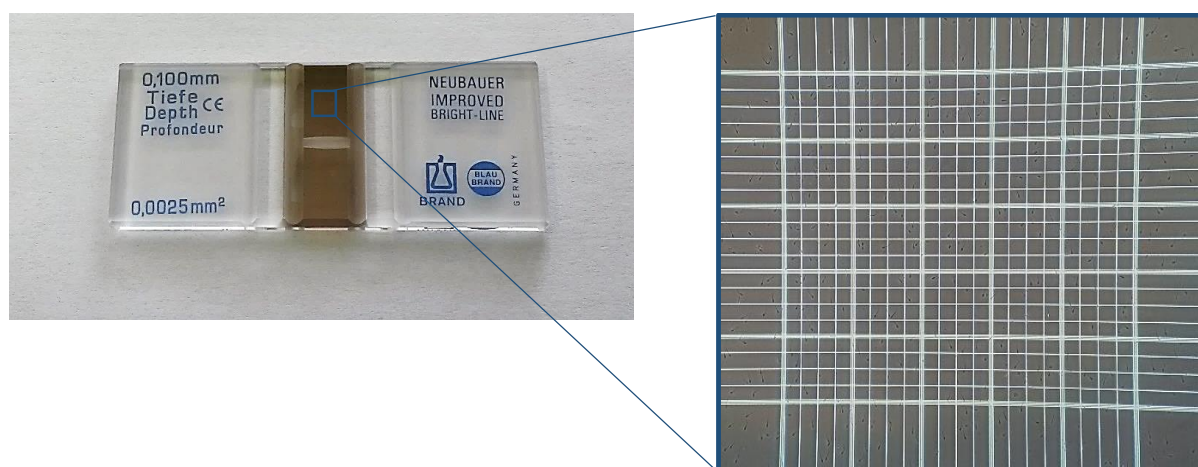
$$C = N \times R \times (1\text{mm}^3/\text{VP mm}^3) \times 1000$$

C = koncentracija semenčic $10^6/\text{mL}$

N = število prešteti semenčic

R = razredčitev

VP = volumen, v katerem so preštete semenčice

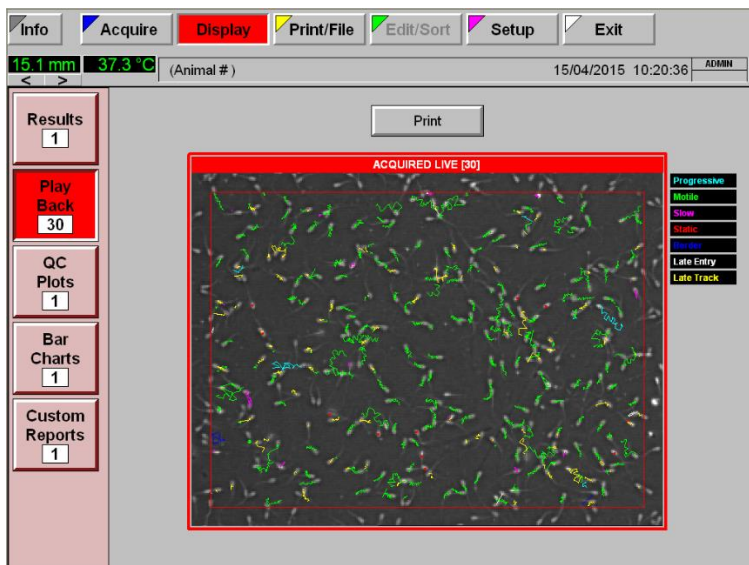


Slika 1: Neubauer števna kamrica
Figure 1: Neubauer counting chamber

3.4.4 Določanje gibljivosti semenčic s pomočjo računalniške analize

Gibljivost v preiskovanih vzorcih smo določili s pomočjo računalniške analize (Hamilton Thorne Biosciences, HTM-IVOS Version 12,3, Beverly, MA) ob uporabi Maklerjeve kamrice, predhodno ogrete na 37 °C.

Iz vzorca, namenjenega preiskavi, smo odvzeli 200 µL ejakulata ter ga razredčili s 3800 µL razredčevalca 1. Razredčevalec je bil segret na 27 °C. Iz razredčenega vzorca smo s pipeto odvzeli 5 µL veliko kapljico ter jo prestavili v Maklerjevo kamrico, ogreto na 37 °C. Na vsaki kapljici smo opravili preiskavo treh naključno izbranih polj. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali povprečno gibljivost, progresivno gibljivost ter koncentracijo semenčic v posameznem vzorcu.



Slika 2: Računalniška analiza semena

Figure 2: Computer assisted sperm analysis

3.4.5 Priprava vzorcev za določanje morfoloških sprememb semenčic

Iz skupnega vzorca smo naredili razmaz, namenjen fiksiranju in barvanju po Giemsi ter določanju morfoloških sprememb semenčic. Po pripravi predmetnic s posušeni vzorci smo preparate, namenjene določanju morfoloških sprememb, fiksirali v pripravljeni formalinski raztopini. Fiksacijo, ki je trajala 30 minut, smo opravili v posebnih steklenih kadičkah. Po končani fiksaciji smo odlili fiksativ in predmetnice večkrat sprali pod tekočo vodo. Spiranju je

sledilo 16-urno barvanje s pripravljeno raztopino po Giemsi. Po končanem barvanju smo odlili barvilo ter predmetnice večkrat sprali pod tekočo vodo in posušili na zraku.

3.5 STANDARDNI POSTOPEK OBDELAVE SEMENA IN ZAMRZOVANJE

Po odvzemu smo določili volumen, konzistenco in koncentracijo ejakulata. Volumen in konzistenco smo določili ob samem rokovanju z vzorcem, koncentracijo pa s spektrofotometrom. Ejakulate smo nato razredčili in zamrznili po standardnem dvostopenjskem postopku s TRIS razredčevalcem z dodanim jajčnim rumenjacom–razredčevalcem 1 (257).

3.5.1 Prvi poskus: Vpliv detergenta (Equex STM®)

3.5.1.1 Stopenjsko redčenje semena pri sobni temperaturi

V prvem poskusu smo ugotavljali vpliv dodanega detergenta Equex STM® na kvaliteto globoko zamrznjenega/odmrznjenega ovnovnega semena. Iz vsakega ejakulata smo odvzeli dvakrat po 200 µL vzorca in ju predstavili v dve 10 mL epruveti. En del je predstavljal kontrolno skupino, drugi del pa preiskovano skupino. Oba dela smo postopoma razredčili z razredčevalcem 1, v razmerju 1:10, ogretim na 27 °C.

3.5.1.2 Hlajenje semena

Po končanih razredčitvah z razredčevalcem 1 smo razredčene vzorce, ki so bili shranjeni v 10 mL epruvetah, predstavili v plastenke z ogreto destilirano vodo na 27 °C (90 mL) ter vse skupaj predstavili v posebej pripravljen zaboj iz stiropora. Zaboje smo za tri ure predstavili v hladilno komoro s temperaturo 5 °C. Tako pripravljene in zaprte zaboje so omogočali počasno hlajenje (tri ure) semena v hladilni komori s temperaturo 5 °C. Po treh urah smo vzorce predstavili iz vodne kopeli na stojalo za epruvete in jih pred nadaljnjim postopkom pustili še 15 minut. Po končanem hlajenju smo vzorce previdno premešali na stresalniku ter jim postopoma dodali razredčevalec–razredčevalec 2, ohlajen na 5 °C.

3.5.1.3 Stopenjsko redčenje semena pri temperaturi 5 °C

V prvem poskusu je razredčevalec 2 poleg sestavin, ki so bile vključene v razredčevalec 1, dodatno vseboval le krioprotektant in je predstavljal kontrolno skupino ali krioprotektant in detergent Equex STM® (0,75 %), preiskovana skupina. Vzorce smo redčili v razmerju 1:10.

3.5.1.4 Zamrzovanje semena

Po razredčevanju vzorcev smo ročno napolnili 0,5 mL slamice za zamrzovanje. Za polnjenje slamic smo uporabljali mikropipetor (Mini Tüb, Nemčija). Za zaporo slamic smo v prvem in drugem poskusu uporabili steklene kroglice primerne velikosti. Zaporo smo opravili s pomočjo polavtomatskega polnilnika (Mini Tüb, Nemčija). V tretjem in četrtem poskusu smo zaporo slamic opravili s strojčkom za varjenje slamic (SYMS, model 016399, Cryo Bio System, Groupe IMV Technologies, L'Aigle, Francija) in slamice zavarili. Celotni postopek od pričetka hlajenja do pričetka zamrzovanja smo opravljali v hladilni komori, ohlajeni na 5 °C. Napolnjene, zaprte in primerno označene slamice smo zložili na zamrzovalne grede ter jih prenesli v stiroporni zaboj, primerne velikosti. Eno uro po dodatku razredčevalca 2 smo slamice z vzorci zamrzili nad dušikovimi hlapi, in sicer 4 cm nad nivojem tekočega dušika. Po končanem zamrzovanju smo slamice potopili v tekoči dušik (-196 °C). Slamice smo shranili v kontejnerju s tekočim dušikom do pričetka nadaljnjih raziskav, in sicer najmanj za dva meseca pred pričetkom analiz.

3.5.2 Drugi poskus: Vpliv antioksidantov

3.5.2.1 Stopenjsko redčenje semena pri sobni temperaturi

V drugem poskusu smo uporabili rezultate iz prvega poskusa, poskus pa smo nadaljevali s preiskavo vpliva dveh antioksidantov, katalaze in natrijevega piruvata, na kvaliteto odmrznjenega ovnovega semena. Iz vsakega ejakulata smo odvzeli po 200 µL vzorca in jih predstavili v štiri 10 mL epruvete. Vsak del smo postopno razredčili z razredčevalcem 1, v razmerju 1:10, ogretim na 27 °C. V tem poskusu je bil razredčevalec 1 bodisi brez dodanega antioksidanta– kontrola skupina, z dodatkom natrijevega piruvata (5 mM)– skupina 1, z dodatkom katalaze (500 IE)– skupina 2 ali z dodatkom kombinacije natrijevega piruvata (5 mM) in katalaze (500 IE)– skupina 3.

3.5.2.2 Hlajenje semena po enakem postopku, kot je opisano pri prvem poskusu (3.5.1.2)

3.5.2.3 Stopenjsko redčenje semena pri temperaturi 5 °C

V drugem poskusu je razredčevalec 2 poleg sestavin, ki so bile vključene v razredčevalec 1, dodatno vseboval le krioprotektant in detergent Equex STM® (0,75 %), brez dodanega antioksidanta (kontrolna skupina). V ostalih treh skupinah pa je razredčevalec 1 poleg krioprotektanta in detergenta dodatno vseboval še natrijev piruvat (5 mM) – skupina 1, katalazo (500 IE) – skupina 2 in kombinacijo natrijevega piruvata (5 mM) in katalaze (500 IE) – skupina 3. Vzorce smo redčili v razmerju 1:10.

3.5.2.4 Zamrzovanje semena po enakem postopku, kot je opisano pri prvem poskusu (3.5.1.4)

3.5.3 Tretji "in vivo" poskus: uspešnost osemenitve ovac s konzerviranim semenom

3.5.3.1 Stopenjsko redčenje semena pri sobni temperaturi

V tretjem poskusu smo ugotovitve iz prvih dveh poskusov prenesli še v prakso in ugotavljali uspešnost osemenitve ovac s konzerviranim semenom, ki smo mu dodali detergent Equex STM® in antioksidant – natrijev piruvat. V poskusu smo vsak ejakulat razdelili na tri enake dele. Vsak del smo razredčili z razredčevalcem 1, ogretim na 27 °C. V tem poskusu je bil razredčevalec 1 – bodisi brez dodanega antioksidanta – kontrola skupina in skupina 1 ali z dodatkom natrijevega piruvata (5 mM) – skupina 2. Vzorce smo razredčili v takem razmerju, da bo v posamezni slamici po zamrzovanju 200 milijonov semenčic.

3.5.3.2 Hlajenje semena po enakem postopku, kot je opisano pri prvem poskusu (3.5.1.2)

3.5.3.3 Stopenjsko redčenje semena pri temperaturi 5 °C

V tretjem poskusu je razredčevalec 2 poleg sestavin, ki so bile vključene v razredčevalec 1, dodatno vseboval le krioprotektant in je predstavljal kontrolno skupino, krioprotektant in detergent Equex STM® (0,75 %) – skupina 1 ali krioprotektant, detergent in natrijev piruvat (5 mM) – skupina 2. Vzorce smo razredčili v takem razmerju, da je bilo v posamezni slamici po zamrzovanju 200 milijonov semenčic.

3.5.3.4 Zamrzovanje semena po enakem postopku, kot je opisano pri prvem poskusu (3.5.1.4)

3.5.4 Četrty poskus: Vpliv enoslojnega centrifugiranja

3.5.4.1 Stopenjsko redčenje semena pri sobni temperaturi

V četrtem poskusu smo ugotavljali vpliv enoslojnega centrifugiranja skozi vrstno specifični koloid (Androcoll™ – O; v postopku pridobitve patenta, J. M. Morrell) na kvaliteto globoko zamrznjenega/odmrznjenega ovnovnega semena. Za vsak vzorec smo pripravili 10 mL epruveto, ki je vsebovala 500 µL razredčevalca 1 z dodatkom natrijevega piruvata (5mM), ogretega na 27 °C. V epruveto smo dodali celoten odvzeti ejakulat in ga postopno razredčili z razredčevalcem 1 v razmerju 1:1, prav tako ogretim na 27 °C.

3.5.4.2 Hlajenje semena po enakem postopku, kot je opisano pri prvem poskusu (3.5.1.2)

3.5.4.3 Stopenjsko redčenje semena pri temperaturi 5 °C

V četrtem poskusu smo ohlajene vzorce v hladilni komori pri temperaturi 5 °C najprej razredčili z razredčevalcem 1, z dodatkom natrijevega piruvata (5mM), ohlajenim na 5 °C. Redčenje z razredčevalcem 1 smo opravili do končne koncentracije semenčic 600×10^6 /mL. Razredčevalec 2 je poleg sestavin, ki so bile vključene v razredčevalec 1 dodatno vseboval še krioprotektant in detergent Equex STM® (0,75 %). Redčenje z razredčevalcem 2 smo opravili do končne koncentracije semenčic 300×10^6 /mL.

3.5.4.4 Zamrzovanje semena, po enakem postopku kot je opisano pri prvem poskusu (3.5.1.4)

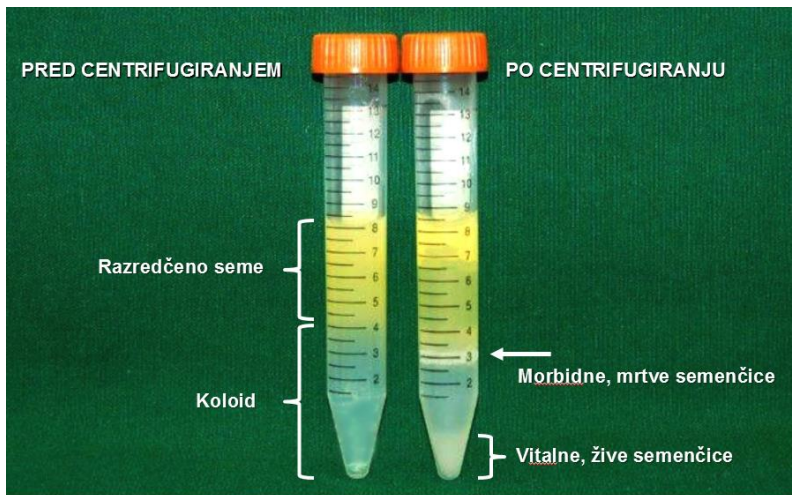
3.6 TAJANJE SEMENA

Za prvi del poskusa smo od vsake serije zamrznjenega semena odtajali eno kontrolno slamico in eno slamico z dodatkom detergenta. Za drugi del poskusa smo odtajali eno kontrolno slamico ter še po eno slamico z dodatkom natrijevega piruvata, katalaze in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze. Za tretji del poskusa smo odtajali eno kontrolno slamico ter še po eno slamico z dodatkom detergenta in detergenta ter natrijevega piruvata.

Za tajanje slamic smo uporabili vodno kopel, segreto na 37 °C. Slamice smo v omenjeni kopeli tajali 17 sekund. Takoj po tajanju smo vsebino slamice prelili v epruveto. Epruvete z vzorci smo prestavili v vodno kopel, segreto na 37 °C. Večino preiskav na semenu po tajanju smo opravili po inkubaciji v omenjeni kopeli po 10 minutah, 6, 12 in 24 urah, SCSA™ in SYBR-14/PI test pa po 10–15 minutah in treh urah.

3.6.1 Tajanje semena in priprava vzorcev za enoslojno centrifugiranje

Za četrti del poskusa smo od vsake serije zamrznjenega semena odtajali šest slamic. Za tajanje slamic smo uporabili vodno kopel, segreto na 37 °C. Slamice smo v omenjeni kopeli tajali 17 sekund. Po tajanju smo vsebino slamic prelili v epruveto in vzorec redčili z osnovnim TRIS razredčevalcem do skupne količine 6 mL in končne koncentracije semenčic 100×10^6 /mL. Po redčenju smo vzorec razdelili v dve 10 mL epruveti. En del je predstavljal kontrolno skupino (1,5 mL), drugi del (4,5 mL) pa preiskovano skupino. V 15 mL Falcon epruvete smo odpipetirali 4 mL vrstno specifičnega koloida (Androcoll™ – O) ter ga segreli na sobno temperaturo. Na vrh koloida smo postopno s Pasteurjevo pipeto nanесли 4,5 mL preiskovanega vzorca ter epruvete previdno vstavili v centrifugo (Heraeus, Varifuge 3.0R, Nemčija) za 20 minut pri hitrosti 285–292xg in temperaturi 23 °C. Po končanem centrifugiranju smo supernatant in večino koloida odstranili, peleta semena pa smo prestavili v čisto epruveto, ki je vsebovala 1 mL razredčevalca 1. Epruvete z vzorci smo prestavili v vodno kopel, segreto na 37 °C. Na semenu smo opravili preiskave po inkubaciji v omenjeni kopeli po 10 minutah, 6, 12 in 24 urah, SCSA™ in SYBR-14/PI/PNA test pa po 10–15 minutah in treh urah. Pred izvajanjem testov SCSA™ in SYBR-14/PI/PNA smo vzorec semena (0,5 mL) dvakrat spirali z 10 mL osnovnega TRIS razredčevalca z uporabo centrifuge (Heraeus, Minifuge, Nemčija) pri hitrosti 764xg in času 10 minut. Supernatant smo odstranili, peleta semena pa smo prestavili v Eppendorf epruveto, ki je vsebovala 200 µL osnovnega TRIS razredčevalca. Obe preiskavi na semenu po tajanju in enoslojnem centrifugiranju smo opravili po inkubaciji v ogrevanih aluminijevih blokih (HT 200, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Nemčija) na 37 °C po 10–15 minutah in treh urah.



Slika 3: Epruveti pred in po enoslojnem centrifugiranju
Figure 3: Tubes before and after SLC

3.7 PREISKAVE SEMENA PO TAJANJU

Po tajanju smo na vzorcih opravili računalniško analizo gibljivosti in koncentracije semena, test na preživitveno sposobnost semenčic (Viadent[®]), hipoozmotski test, določili morfološke spremembe semenčic, SCSA[™] test ter SYBR-14/PI test. Na vzorcih četrtega poskusa pa smo v SYBR-14/PI test vključili še test PNA.

3.7.1 Računalniška analiza semena

Gibljivost in preživitveno sposobnost (Viadent[®]) semenčic v preiskovanih vzorcih smo določili po inkubaciji semena v vodni kopeli na 37 °C. Analize smo opravili s pomočjo računalniške analize ob uporabi Maklerjeve kamrice (*Makler counting chamber*[®]), predhodno ogrete na 37 °C, in sicer 10 minut ter 6, 12 in 24 ur po tajanju.

Osnovne nastavitve računalniškega programa za analizo so bile:

Image capture:

- frame rate (Hz): 60
- frames aquired: 30

Cell detection:

- minimum contrast: 60
- minimum cell size: 5

Defaults:

- cell size: 5
- cell intensity: 55

Progressive cells:

- path velocity (VAP): 75,0
- straightness (STR): 80,0

Slow cells:

- VAP cut-off: 21,9
- VSL cut-off: 6,0

Optics setup:

- illumination intensity: 2162
- photometer: 60
- magnification: 1,89

Video source:

- 60 Hz, dark field
- stage temperature: 37 °C
- chamber: Makler
- field selection: automatic
- ident fluorescence options: Viadent

Iz vsakega vzorca smo s pipeto odvzeli 5 μ L veliko kapljico ter jo prestavili v Maklerjevo kamrico, ogreto na 37 °C. Na vsaki kapljici smo opravili preiskavo petih naključno izbranih polj. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali povprečno gibljivost, progresivno gibljivost ter preživitveno sposobnost (Viadent®) semenčic v posameznem vzorcu.

Test semenčic na preživitveno sposobnost (Viadent®) smo opravili po navodilih proizvajalca. V VIADENT (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA) epruvete z barvilom smo dodali 1000 μ L osnovnega TRIS razredčevalca in premešali na stresalniku. VIADENT epruvete z barvilom so bile hranjene v hladilniku. Po dodatku TRIS razredčevalca smo epruveto z barvilom hranili pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo ter jo po končani uporabi

prestavili nazaj v hladilnik. Iz epruvete z razredčenim barvilom smo odpipetirali 30 μ L in jih prestavili v novo epruveto (Eppendorf), jo prestavili v vodno kopel (37 °C) ter inkubirali 5 minut. Po pretečenem času smo v epruveto dodali 30 μ L semena in zopet premešali na stresalniku. Epruveto z barvilom in dodanim vzorcem smo pred analiziranjem inkubirali še 5 minut v vodni kopeli, ogreti na 37 °C.

3.7.2 Hipoozmotski test (HOST)

Za HOST smo pripravili raztopino z ozmolarnostjo 100 mOsm/L (258, 259, 260). Istočasno smo pripravili tudi Hancock raztopino za imobilizacijo semenčic.

Iz preiskovanega semena smo odvzeli 50 μ L vzorca in mu dodali 500 μ L 100 mOsm/L hipoozmotske raztopine. Pripravljeno raztopino semena, hipoozmotsko raztopino in Hancock raztopino smo inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C 30 minut. Po tem času smo iz raztopine semena, ki smo ji dodali 10 μ L Hancock raztopine in dobro premešali, odvzeli dve kapljici po 6 μ L, ju prenesli na ogreto predmetnico ter prekrili s pokrovnim stekelcem. Preiskavo smo opravili s pomočjo fazno-kontrastnega mikroskopa pri 400-kratni povečavi. Na vsaki predmetnici smo na dveh pokritih kapljicah pregledali 200 semenčic. V preiskavi smo semenčice razdelili v dve skupini, in sicer na HOS-pozitivne (zaviti repi) in HOS-negativne (nezaviti repi) ter določili odstotek HOS-pozitivnih semenčic.



Slika 4: Semenčice izpostavljene HOS testu
Figure 4: Spermatozoa exposed to HOS test

Legenda: A – HOS-negativna semenčica skupaj s HOS-pozitivnimi semenčicami
Legend: A – HOS-negative spermatozoa compared with HOS-positive spermatozoa

3.7.3 Določanje morfoloških sprememb

Preparate smo pregledali pri 1000-kratni povečavi. Na vsaki predmetnici smo preiskali 200 semenčic. V preparatih smo preiskovali akrosomalne spremembe, spremembe na glavi, vratu, veznem delu in repu. Spremembe smo razdelili v dve skupini in določili odstotek akrosomalnih in skupnih sprememb.



Slika 5: Semenčice obarvane z barvilom Giemsa
Figure 5: Spermatozoa stained with the Giemsa stain

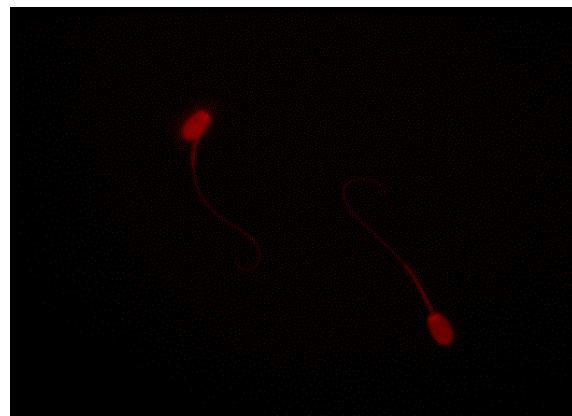
Legenda: A – morfološko normalna semenčica; B – semenčica z odlepljenim akrosomom
Legend: A – morphological normal spermatozoa; B – spermatozoa with detached acrosom

3.7.4 SCSA™ (*sperm chromatin structure assay*) test

Ugotavljanje integritete DNK semenčic smo opravili s pomočjo pretočne citometrije (EPICS XL – MCL™, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, ZDA) z uporabo programskega paketa (EXPO 32 ADC XL 4 Color™, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, ZDA) po inkubaciji semena v vodni kopeli ogreti na 37 °C v času 10 minut in po treh urah. Pretočni citometer je s pretokom 200 semenčic na sekundo analiziral 10.000 semenčic v posameznem vzorcu. Od treh vgrajenih filtrov sta bila za meritve uporabljena dva, filter 1 (515–530 nm, zelena fluorescenca) in filter 3 (>630 nm, rdeča fluorescenca). Vzorce smo obarvali s fluorescenčnim barvilom AO ter s

pomočjo pretočne citometrije ugotavljali odstotek denaturirane-enovijačne DNK (fluorescira rdeče) in nepoškodovane-dvovijačne DNK (fluorescira zeleno). Nepravilna struktura kromatina pokaže na dovzetnost DNK semenčice za denaturacijo ob prisotnosti kisline. Nadaljnja izpostavljenost DNK barvilu AO pa nam po analiziranju poda odstotek fragmentirane DNK (DFI %). Pri vsakem vzorcu smo določili fragmentacijo DNK z uporabo SCSA™ testa, kot sta ga predhodno že opisala Evenson in Jost (261).

Po odtajanju smo vzorce inkubirali v vodni kopeli, ogreti na 37 °C, ter jih po 10 minutah razredčili s TNE pufrom, ki smo ga hranili v hladilniku na 4 °C. Razredčitve s TNE pufrom smo naredili v razmerju, da je bila končna koncentracija semenčic 2 milijona na mL. Istočasno smo si pripravili AO barvilo. Iz končnega vzorca, v katerem je bila koncentracija semenčic 2 milijona na mL, smo odpipetirali 200 µL vzorca ter ga prestavili v novo epruveto. Vzorcju smo dodali 0,4 mL kisline ter na stresalniku mešali 30 sekund, nato smo vzorcju dodali še 1,2 mL barvila AO. Potem smo epruveto prestavili v vodo z ledom (+4°C), vzorce pa smo po treh minutah analizirali s pomočjo pretočne citometrije. Za vsak vzorec smo opravili dve meritvi. Končna ocena je pomenila povprečje dveh meritev posameznega vzorca. Po končanih meritvah smo dobljene podatke analizirali z uporabo računalniškega programskega paketa (XDAS 4,40).



Slika 6: Semenčice, obarvane z barvilom AO; nepoškodovana, dvovijačna DNK (zelená fluorescenca) in denaturirana, enovijačna DNK (rdeča fluorescenca)

Figure 6: Spermatozoa stained with AO stain; stable, double-stranded DNA (green fluorescence) and denaturated, single-stranded DNA (red fluorescence)

3.7.4.1 SCSA™ test vzorcev po enoslojnem centrifugiranju

Ugotavljanje integritete DNK semenčic v četrtem poskusu smo opravili s pomočjo pretočne citometrije (Gallios™, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Nemčija) z uporabo programskega paketa (Gallios™, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Nemčija). Analize smo opravili po inkubaciji semena v ogrevanih aluminijevih blokih na 37 °C v času 10 minut in po treh urah. Pretočni citometer je s pretokom 100–200 semenčic na sekundo analiziral 10.000–20.000 semenčic enega vzorca. Za meritve sta bila uporabljena dva filtra, filter 1 (525–540 nm, zelena fluorescenca) in filter 3 (620–630 nm, rdeča fluorescenca). Vzorce smo obarvali s fluorescenčnim barvilom AO ter s pomočjo pretočne citometrije pri vsakem vzorcu določili fragmentacijo DNK z uporabo SCSA™ testa, kot je opisano zgoraj in kot sta ga predhodno že opisala Evenson in Jost (5).

Za vsak vzorec smo opravili dve meritvi. Končna ocena je pomenila povprečje dveh meritev posameznega vzorca. Po končanih meritvah smo dobljene podatke analizirali z uporabo računalniškega programskega paketa (FCS Express V3, De Novo Software™, Ontario, Kanada).

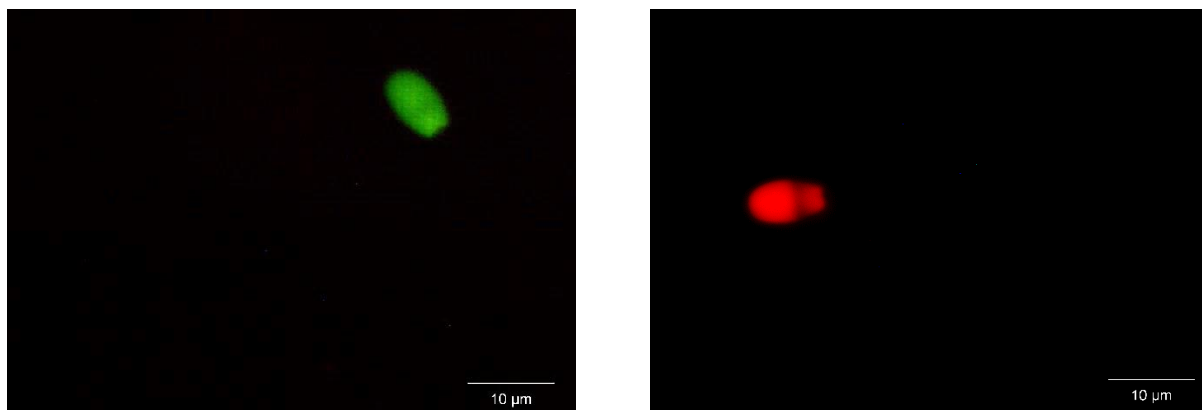


Slika 7: Semenčice, obarvane z barvilom AO; nepoškodovana, dvovijačna DNK (zelena fluorescenca)
Figure 7: Spermatozoa stained with AO stain; stable, double-stranded DNA (green fluorescence)

3.7.5 SYBR-14/PI test

Ugotavljanje integritete membrane semenčic smo opravili s pomočjo pretočne citometrije z uporabo programskega paketa XPO 32 ADC XL 4 Color™ po tajanju in inkubaciji semena v vodni kopeli, ogreti na 37 °C v času 10 minut in po treh urah. Pretočni citometer je analiziral 10.000 semenčic enega vzorca. Vzorce smo obarvali s pomočjo dveh fluorescenčnih barvil, ki se vežeta na DNK– SYBR-14 in PI. S pomočjo pretočne citometrije smo ugotavljali odstotek živih semenčic z nepoškodovanimi membranami (filter 1,515–545 nm, zelena fluorescenca) in negibljevih, domnevno mrtvih semenčic s poškodovanimi membranami (filter 3, >670 nm, rdeča fluorescenca). SYBR-14 (zelena fluorescenca) prodre skozi nepoškodovano membrano in se veže na DNK vseh semenčic. Barvilo PI (rdeča fluorescenca) ni permeabilno in se veže na DNK semenčic s poškodovanimi membranami. S kombinacijo obeh barvil dobimo dve do tri subpopulacije semenčic. Prva subpopulacija z nepoškodovanimi membranami semenčic, fluorescira zeleno. Druga, s poškodovanimi membranami semenčic fluorescira rdeče. Tretja subpopulacija predstavlja morbidne semenčice z delno poškodovanimi membranami, katerih DNK veže obe barvili, take semenčice fluorescirajo zeleno in rdeče.

Vzorce smo po tajanju inkubirali v vodni kopeli, ogreti na 37 °C ter jih po 10 minutah razredčili s Tyrode pufrom, ki smo ga hranili v inkubatorju ogretega na 37 °C. Razredčitve s Tyrode pufrom smo naredili v razmerju, da je bila končna koncentracija semenčic 5 milijonov na mL. Istočasno smo odtajali obe barvili, PI ter barvilo SYBR-14, ki smo mu dodali DMSO v razmerju 1:10. Iz končnega vzorca, ki je vseboval 5 milijonov semenčic na mL smo odpipetirali dvakrat po 500 µL vzorca ter ga prestavili v dve epruveti. Vzorcju za takojšnjo analizo smo dodali 5 µL barvila SYBR-14 in 3 µL PI, premešali na stresalniku ter odnesli v inkubator, ogret na 37 °C z vlažno atmosfero in 5 % CO₂ za 15 minut. Vzorce, ki smo jih analizirali po treh urah, smo prestavili v inkubator za 2 uri in 45 minut ter po inkubaciji ponovili postopek barvanja. Po preteku petnajstih minut smo vzorec analizirali s pomočjo pretočne citometrije ter ugotavljali odstotek semenčic s poškodovanimi in nepoškodovanimi membranami.



Slika 8: Semenčici, obarvani z barvilom Sybr-14 (zelena fluorescenca) in PI (rdeča fluorescenca)
Figure 8: Spermatozoa stained with Sybr-14 stain (green fluorescence) and PI (red fluorescence)

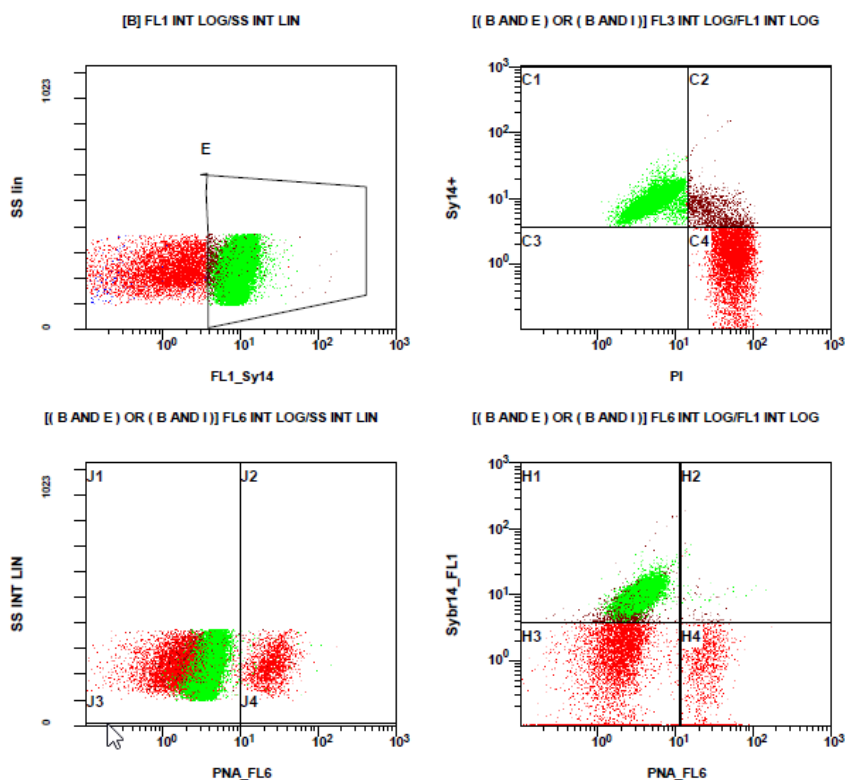
3.7.5.1 SYBR-14/PI/PNA test vzorcev po enoslojnem centrifugiranju

Ugotavljanje integritete membrane semenčic ter integritete akrosoma v četrtem poskusu smo opravili s pomočjo pretočne citometrije z uporabo programskega paketa Gallios™ po inkubaciji semena v ogrelih aluminijevih blokih na 37 °C v času 10 minut in po treh urah. Pretočni citometer je s pretokom 100–400 semenčic na sekundo analiziral 10.000–20.000 semenčic enega vzorca.

Vzorci smo obarvali s trojno tehniko barvanja. Uporabili smo barvili, ki se vežeta na DNK– SYBR-14 in PI in barvilo PNA-Alexa Fluor® 647, ki se veže na notranjo akrosomalno membrano semenčic s poškodovanimi, aktiviranimi akrosomi. S pomočjo pretočne citometrije smo ugotavljali odstotek živih semenčic z nepoškodovanimi membranami (filter 1, 525–540 nm, zelena fluorescenca), negibljevih, domnevno mrtvih semenčic s poškodovanimi membranami (filter 3, 620–630 nm, rdeča fluorescenca) in semenčic s poškodovanimi, aktiviranimi akrosomi (filter 6, 650–670 nm, temno rdeča fluorescenca). Barvilo PNA ni permeabilno in se veže na notranjo akrosomalno membrano semenčic s poškodovanimi, aktiviranimi akrosomi in prekinjeno zunanjo akrosomalno membrano.

Vzorci smo po tajanju in enoslojnem centrifugiranju inkubirali v ogrevanih aluminijevih blokih na 37 °C ter jih po 10 minutah razredčili z osnovnim TRIS razredčevalcem, ki smo ga hranili v inkubatorju (MELAG 80, Melag Apparate GmbH, Berlin, Nemčija), ogretim na 37 °C. Razredčitve z osnovnim TRIS razredčevalcem smo naredili, da je bila končna koncentracija semenčic milijon na mililiter. Pripravili smo barvila. Vzorcju za takojšnjo analizo smo dodali 5

μL barvila SYBR-14, ga premešali na stresalniku ter odnesli v inkubator, ki je bil ogret na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ z vlažno atmosfero in 5% CO_2 za 15 minut. Po preteku petih minut smo vzorcu dodali še $5\ \mu\text{L}$ barvila PNA in $3\ \mu\text{L}$ barvila PI. Vzorce, ki smo jih analizirali po treh urah, smo prestavili v inkubator za 2 uri in 45 minut ter po inkubaciji ponovili postopek barvanja. Po preteku petnajstih minut smo vzorec analizirali s pomočjo pretočne citometrije ter ugotavljali odstotek semenčic s poškodovanimi in nepoškodovanimi membranami ter poškodovanimi, aktiviranimi akrosomi.



Slika 9: Grafični prikaz subpopulacij semenčic po enoslojnem centrifugiranju, obarvanih z barvili SYBR-14/PI/PNA, določenih s pretočnim citometrom

Figure 9: Graphic diagram of spermatozoa subpopulations after SLC stained with SYBR-14/PI/PNA, as defined with flow cytometry

Legenda: FL1 – fluorescenčni detektor FL1 omogoča detekcijo semenčic, obarvanih s Sybr-14; FL3 – fluorescenčni detektor FL3 omogoča detekcijo semenčic, obarvanih s PI; FL6 – fluorescenčni detektor FL6 omogoča detekcijo semenčic, obarvanih s PNA; C1 – žive semenčice (Sybr-14+/PI-); C2 – morbidne semenčice (Sybr-14+/PI+); C4 – mrtve semenčice (Sybr-14-/PI+); H1 – žive semenčice z nepoškodovanimi akrosomi (Sybr-14+/PNA-); H2 – žive semenčice, pri katerih je prišlo do akrosomske reakcije (Sybr-14+/PNA+); H4 – mrtve semenčice s poškodovanjo zunanjo akrosomalno membrano (Sybr-14-/PNA+).

Legend: FL1 – fluorescence detector FL1 detects spermatozoa stained with Sybr-14; FL3 – fluorescence detector FL3 detects spermatozoa stained with PI; FL6 – fluorescence detector FL6 detects spermatozoa stained with PNA; C1 – live spermatozoa (Sybr-14+/PI-); C2 – moribund spermatozoa (Sybr-14+/PI+); C4 – dead spermatozoa (Sybr-14-/PI+); H1 – live spermatozoa with intact acrosome (Sybr-14+/PNA-); H2 – live spermatozoa with reacted acrosome (Sybr-14+/PNA+); H4 – dead spermatozoa with damaged acrosome external membrane (Sybr-14-/PNA+).

3.7.6 Sinhronizacija estrusa ter priprava ovac na umetno osemenjevanje

Po preteku dveh mesecev smo pri 180 ovcah izvedli sinhronizacijo estrusa po naslednjem protokolu: vstavev CIDR[®]-progesteronskih intravaginalnih vložkov za 12 dni. Po 12 dnevih smo odstranili CIDR[®] ter v mišico aplicirali 300 IE eCG. Intracervikalno umetno osemenitev s preiskovanimi zamrznjenimi vzorci smo opravili 48 ur po odstranitvi CIDR[®]. Ovce smo razdelili na tri skupine in jih osemenili s preiskovanim semenom. Prva skupina ovac je predstavljala kontrolno skupino. Drugo in tretjo skupino ovac smo osemenili s semenom, kateremu je bil dodan bodisi detergent ali detergent in antioksidant. V vsako izmed treh preiskovanih skupin smo vključili 60 naključno izbranih živali.

Po treh tednih smo opravili UZ kontrolo brejosti in na ta način ugotovili oploditveno sposobnost semenčic v preiskovanih vzorcih.

3.8 STATISTIČNE METODE

Za vse spremenljivke (parametre) smo s Shapiro-Wilk testom preverili, ali se porazdeljujejo normalno. Ker smo pri večini parametrov ugotovili, da se ne porazdeljujejo normalno in ker smo načeloma analizirali manjše vzorce (N (6–36)), smo v celotni analizi uporabili neparametrične teste. Pri analizi smo rezultate neparametričnih testov primerjali z rezultati ekvivalentnih parametričnih testov in le-ti so običajno zagotovili podobne rezultate; pri interpretaciji rezultatov jih posebej ne izpostavljamo.

Za vse parametre smo v okviru opisnih statistik izračunali povprečno vrednost (\bar{X}), standardno napako povprečja (SE), standardni odklon (SD), mediano (ME), prvi (Q1) in tretji kvartil (Q3), minimalno (MIN) ter maksimalno vrednost (MAX). Pri interpretaciji rezultatov pa smo, kot že rečeno, uporabili statistiko neparametričnih testov s statistično značilnostjo ter povprečnih vrednosti s standardnim odklonom ($\bar{X} \pm SD$). Povprečne vrednosti smo uporabili kljub temu, da analiza temelji na neparametričnih metodah. Menimo namreč, da je povprečna vrednost za razumevanje interpretacije bolj nazorna in hitreje razumljiva od mediane, ki jo v analizi sicer navajamo, je pa natančneje v rezultatih ne interpretiramo.

Wilcoxonov test predznačenih rangov za dva odvisna vzorca smo uporabili za primerjavo med dvema skupinama (kontrolne in preiskovane) v isti časovni točki. V tekstu poročamo Z–statistiko in statistično značilnost (P). Rezultate smo kot statistično značilne opredelili pri $P < 0,05$.

Friedmanov test za več odvisnih vzorcev smo uporabili v primeru, ko smo znotraj iste skupine (bodisi kontrolne ali preiskovane) preverjali razliko med posameznimi časovnimi točkami (0, 6, 12 in 24 ur ali 0 in 3 ure). V tekstu poročamo χ^2 – statistiko in statistično značilnost (P). Rezultate smo kot statistično značilne opredelili pri $P < 0,05$.

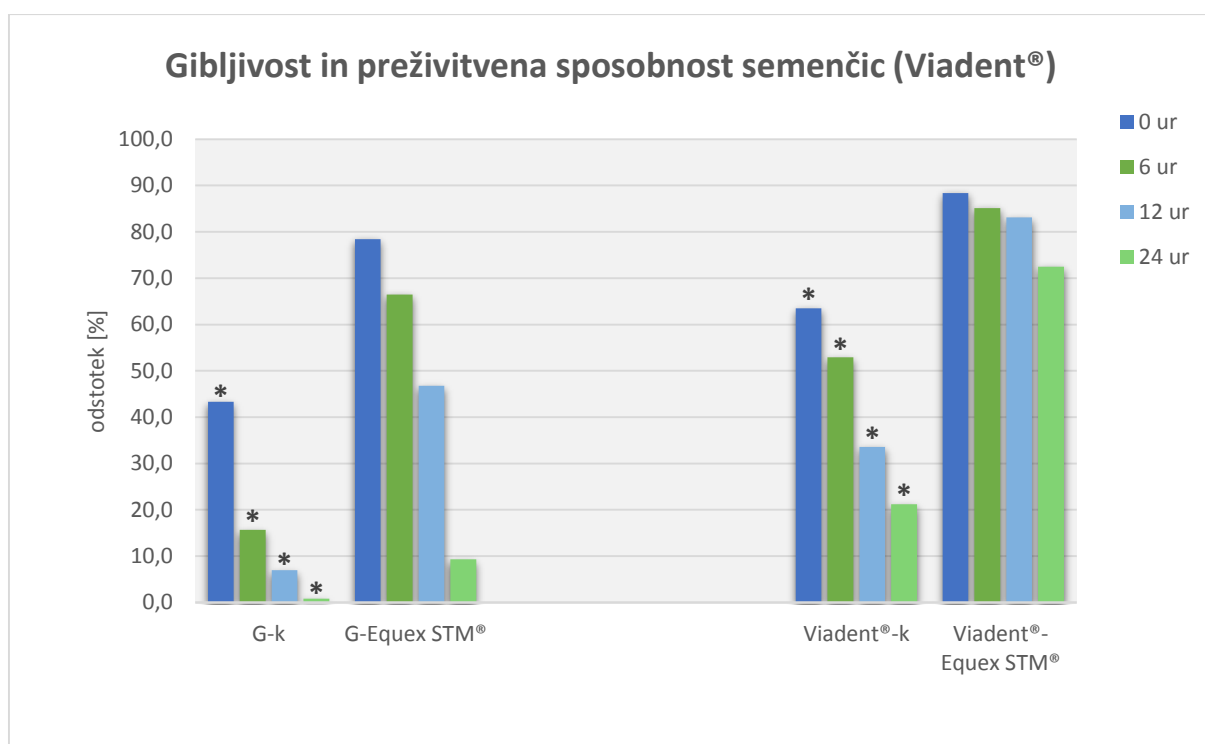
Pri analizi podatkov smo uporabili statistični program SPSS 17.0 for Windows.

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE VPLIVA DETERGENTA (EQUEX STM®)

4.1.1 Gibljivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic

Na sliki 10 in 11 so prikazani povprečni odstotki gibljivosti in preživitvene sposobnosti (Viadent®) semenčic v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih (n = 36) in preiskovanih (Equex STM®) (n = 36) semenčicah. Poleg tega so prikazana povprečja treh različnih hitrosti semenčic (VAP, VSL, VCL) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.



Slika 10: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih (n = 36) in preiskovanih (n = 36) vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 10: The average motility and viability (Viadent®) of spermatozoa in the control (n = 36) and examined (n = 36) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: G – gibljivost, Viadent® – preživitvena sposobnost, k – kontrola, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

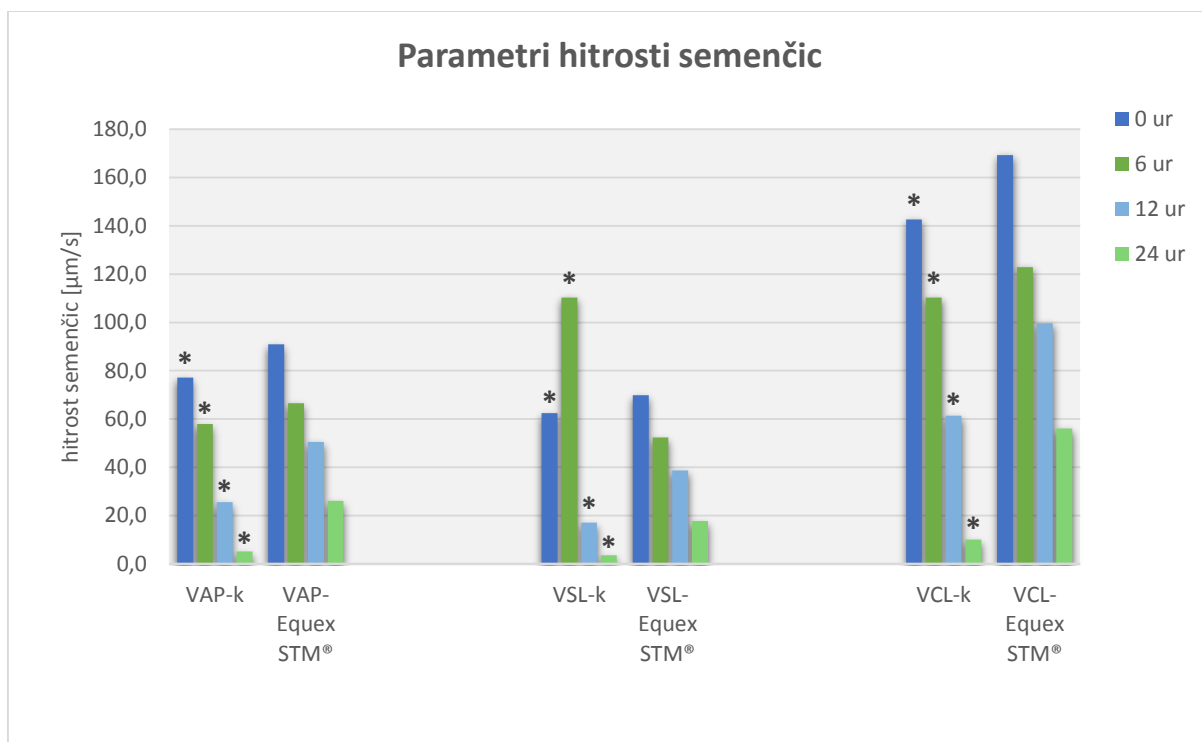
Legend: G – motility, Viadent® – viability, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,001$

Iz slike 10 lahko razberemo, da je prišlo glede na kontrolne vzorce semena ob dodatku detergenta Equex STM® v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena do statistično značilnega porasta odstotka gibljivih semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, in sicer iz $43,3 \pm 23,9$ na $78,4 \pm 15,7$ ($Z = -5,161$; $P = 0,000$) po 0, iz $15,7 \pm 20,6$ na $66,5 \pm 16,9$ ($Z = -5,233$; $P = 0,000$) po 6, iz $7,0 \pm 16,6$ na $46,8 \pm 26,3$ ($Z = -5,160$; $P = 0,000$) po 12 ter iz $0,8 \pm 3,5$ na $9,3 \pm 11,4$ ($Z = -4,201$; $P = 0,000$) po 24 urah. Prav tako smo ugotovili tudi statistično značilen porast odstotka semenčic z boljšo preživitveno sposobnostjo glede na kontrolne vzorce, in sicer iz $63,5 \pm 17,7$ na $88,4 \pm 8,3$ po 0, iz $52,9 \pm 21,2$ na $85,1 \pm 11,8$ po 6, iz $33,6 \pm 30,3$ na $83,1$ $14,0$ ($Z = -5,232$; $P = 0,000$) po 12 ter iz $21,1 \pm 26,1$ na $72,5 \pm 23,1$ ($Z = -5,159$; $P = 0,000$) po 24 urah.

Tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 95,202$; $P = 0,000$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 101,761$; $P = 0,000$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev do statistično značilnega znižanja odstotka gibljivih semenčic.

Statistično značilen padec preživitvene sposobnosti semenčic smo ugotovili tako znotraj kontrolnih ($\chi^2 = 87,174$; $P < 0,000$) kot tudi znotraj preiskovanih vzorcev semena ($\chi^2 = 43,567$; $P < 0,05$) v vseh časovnih obdobjih meritev z izjemo časovnega obdobja 6 in 12 ur ($Z = -1,571$; $P = 0,116$) pri preiskovani skupini, kjer statistično značilnega padca preživitvene sposobnosti semenčic nismo ugotovili.



Slika 11: Primerjava povprečne hitrosti semenčic med kontrolnimi (n = 36) in preiskovanimi (n = 36) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 11: Comparison of the average speed of spermatozoa between control (n = 36) and examined (n = 36) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, k – kontrola, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, k – control, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: P < 0,001

Iz slike 11 lahko razberemo, da smo ugotovili statistično značilno večjo hitrost semenčic v preiskovani skupini, kjer smo v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena dodali detergent Equex STM®, glede na kontrolno skupino vzorcev semena, v primeru povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP) pri vzorcih po odmrzovanju in 0-, 6-, 12- in 24-urni (P = 0,000) inkubaciji na 37 °C. Prav tako smo ugotovili statistično značilno večjo hitrost krivulje gibanja semenčic (VCL) in hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL) v preiskovani skupini, glede na kontrolno skupino vzorcev semena, v vseh štirih časovnih obdobjih meritev (P = 0,000) po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C.

Tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 103,061$; P = 0,000) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 97,461$; P = 0,000) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih

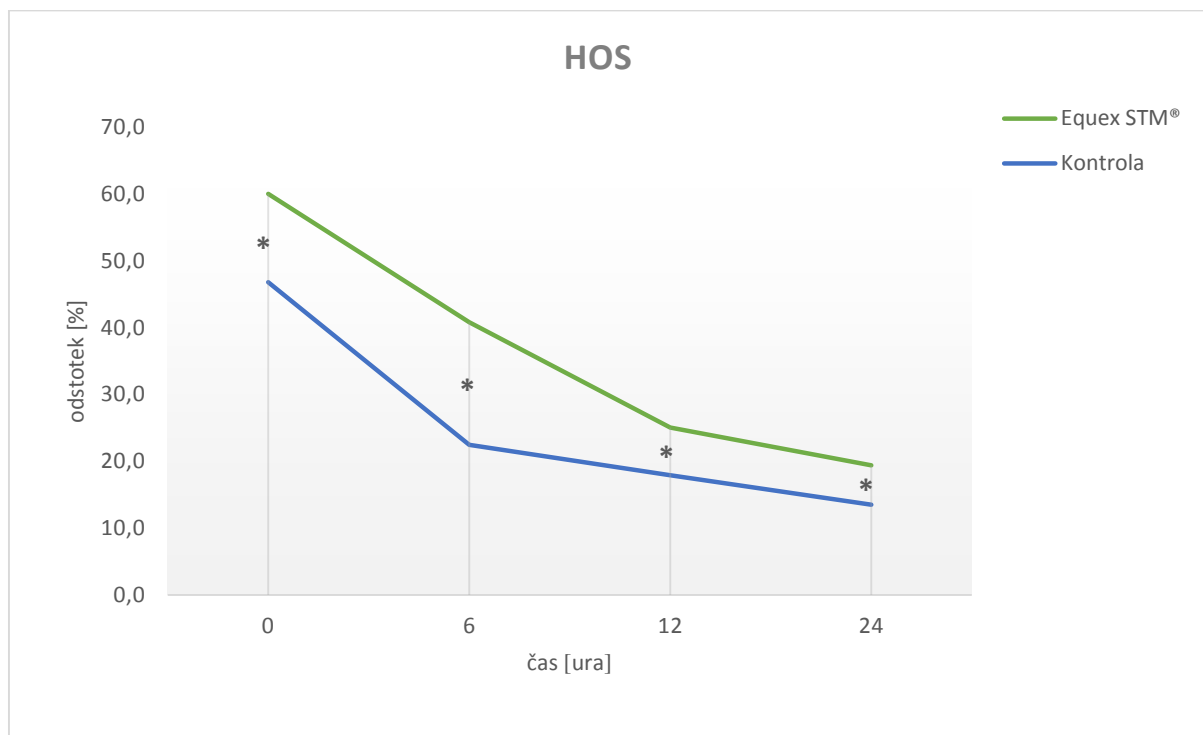
časovnih obdobjih meritev v ejakulatu do statistično značilnega zmanjšanja povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP).

Statistično značilno zmanjšanje hitrosti krivulje gibanja semenčic (VCL) v ejakulatu smo ugotovili tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 105,401$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 98,813$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev.

Statistično značilno zmanjšanje hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL) v ejakulatu smo ugotovili tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 101,908$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 100,124$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev.

4.1.2 Hipoozmotski test semenčic

Na sliki 12 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik med hipoozmotsko pozitivno reagiranimi semenčicami v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih ($n = 36$) in preiskovanih (Equex STM®) ($n = 36$) semenčicah.



Slika 12: Prikaz razlik v povprečnem odstotku hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic med kontrolnimi ($n = 36$) in preiskovanimi ($n = 36$) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 12: Differences in average percentage of positive hypoosmotic reacted spermatozoa between control ($n = 36$) and examined ($n = 36$) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: HOS – odstotek hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: HOS – percentage of hypoosmotic swelling positive reacted spermatozoa, * – statistically significant differences between control and examined samples within the time groups.

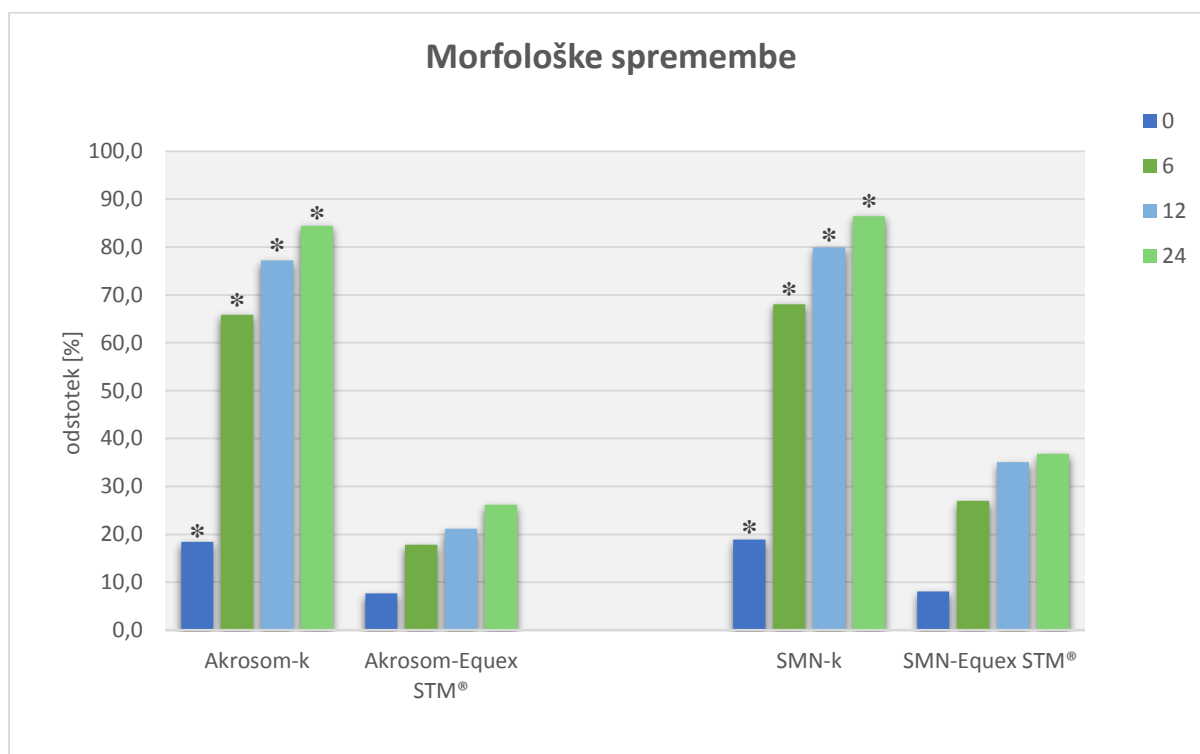
*: $P \leq 0,001$

Iz slike 12 lahko razberemo, da je prišlo do statistično značilnega porasta odstotka hipoozmotsko pozitivnih semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C pri vzorcih, ki so v razredčevalcu vsebovali detergent Equex STM®, v primerjavi s kontrolnimi vzorci, in sicer iz $46,8 \pm 16,9$ na $60,0 \pm 16,2$ ($Z = -5,153$; $P = 0,000$) po 0, iz $22,5 \pm 11,5$ na $40,8 \pm 12,5$ ($Z = -4,776$; $P = 0,000$) po 6, iz $17,9 \pm 9,4$ na $25,1 \pm 9,0$ ($Z = -3,865$; $P = 0,000$) po 12 ter iz $13,5 \pm 7,6$ na $19,4 \pm 7,8$ ($Z = -3,390$; $P = 0,001$) po 24 urah.

Poleg tega je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev do statistično značilnih razlik v odstotku hipoozmotsko pozitivnih semenčic tudi med časovnimi skupinami znotraj kontrolnih ($\chi^2 = 86,081$; $P = 0,000$) in preiskovanih skupin ($\chi^2 = 92,567$; $P \leq 0,001$).

4.1.3 Morfološke spremembe semenčic

Na sliki 13 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik morfoloških sprememb na akrosomu ter skupnih morfoloških sprememb semenčic v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih ($n = 34$) in preiskovanih (Equex STM®) ($n = 34$) semenčicah.



Slika 13: Morfološke spremembe semenčic v kontrolnih ($n = 34$) in preiskovanih ($n = 34$) vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 13: The abnormal spermatozoa morphology of control ($n = 34$) and examined ($n = 34$) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: SMN – skupne morfološke napake, k – kontrola, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: SMN – morphological abnormal spermatozoa, k – control, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,001$

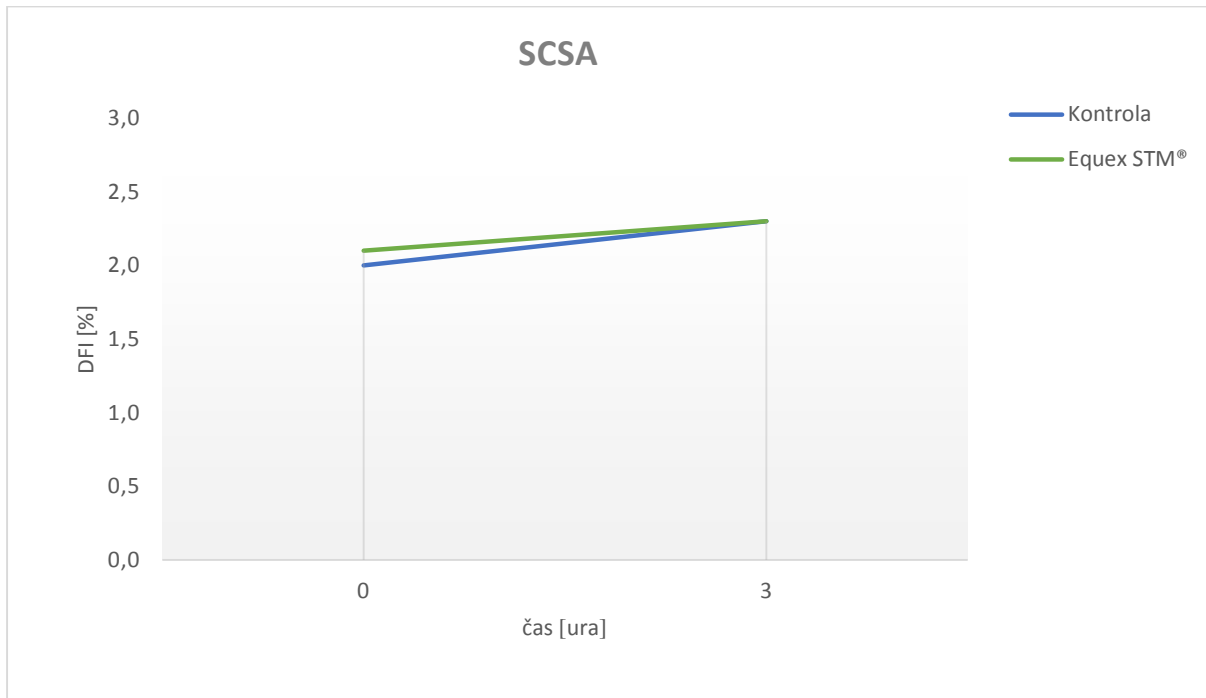
Iz slike 13 lahko razberemo, da je po dodatku detergenta Equex STM® v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena prišlo do statistično značilnega znižanja ($P < 0,001$) odstotka morfoloških sprememb akrosoma ter skupnih morfoloških sprememb semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena. Odstotek morfoloških sprememb akrosoma semenčic se je statistično značilno znižal iz $18,4 \pm 21,5$ na $7,7 \pm 8,0$ ($Z = -4,709$; $P = 0,000$) po 0, iz $65,8 \pm 13,0$ na $17,8 \pm 8,3$ po 6, iz $77,2 \pm 10,5$ na $21,2 \pm 8,8$ po 12 ter iz $84,4 \pm 9,8$ na $26,2 \pm 9,5$ ($Z = -5,086$; $P = 0,000$) po 24 urah. Prav tako se je statistično značilno znižal odstotek skupnih morfoloških sprememb semenčic, in sicer iz $18,9 \pm 21,4$ na $8,1 \pm 8,0$ ($Z = -4,805$; $P = 0,000$) po 0, iz $68,0 \pm 13,2$ na $27,0 \pm 9,7$ po 6, iz $79,9 \pm 9,9$ na $35,1 \pm 7,5$ po 12 ($Z = -5,086$; $P = 0,000$) ter iz $86,4 \pm 9,2$ na $37,2 \pm 9,2$ ($Z = -5,087$; $P = 0,000$) po 24 urah.

Tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 60,239$; $P < 0,05$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 92,965$; $P = 0,000$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev, do statistično značilnega zvišanja odstotka semenčic z morfološkimi spremembami akrosoma.

Statistično značilen porast odstotka skupnih morfoloških sprememb semenčic smo ugotovili tako znotraj preiskovanih vzorcev semena ($\chi^2 = 80,612$; $P = 0,000$) razen v časovnem obdobju 12 in 24 ur ($Z = -1,556$; $P = 0,120$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev ($\chi^2 = 90,988$; $P = 0,000$) semena v vseh časovnih obdobjih meritev.

4.1.4 SCSA™ (*sperm chromatin structure assay*) test

Na sliki 14 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik med semenčicami s fragmentirano DNK v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih ($n = 36$) in preiskovanih (Equex STM®) ($n = 36$) semenčicah.



Slika 14: Prikaz razlik v povprečnem odstotku fragmentirane DNK semenčic pri kontrolnih ($n = 36$) in preiskovanih ($n = 36$) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 14: Differences in the average percentage of DNA fragmented spermatozoa in the control ($n = 36$) and examined ($n = 36$) samples of semen in two different time periods after thawing.

Legenda: SCSA – *sperm chromatin structure assay*, DFI (%) – odstotek fragmentirane DNK semenčic.

Legend: SCSA – *sperm chromatin structure assay*, DFI (%) – percentage of spermatozoa DNA fragmentation.

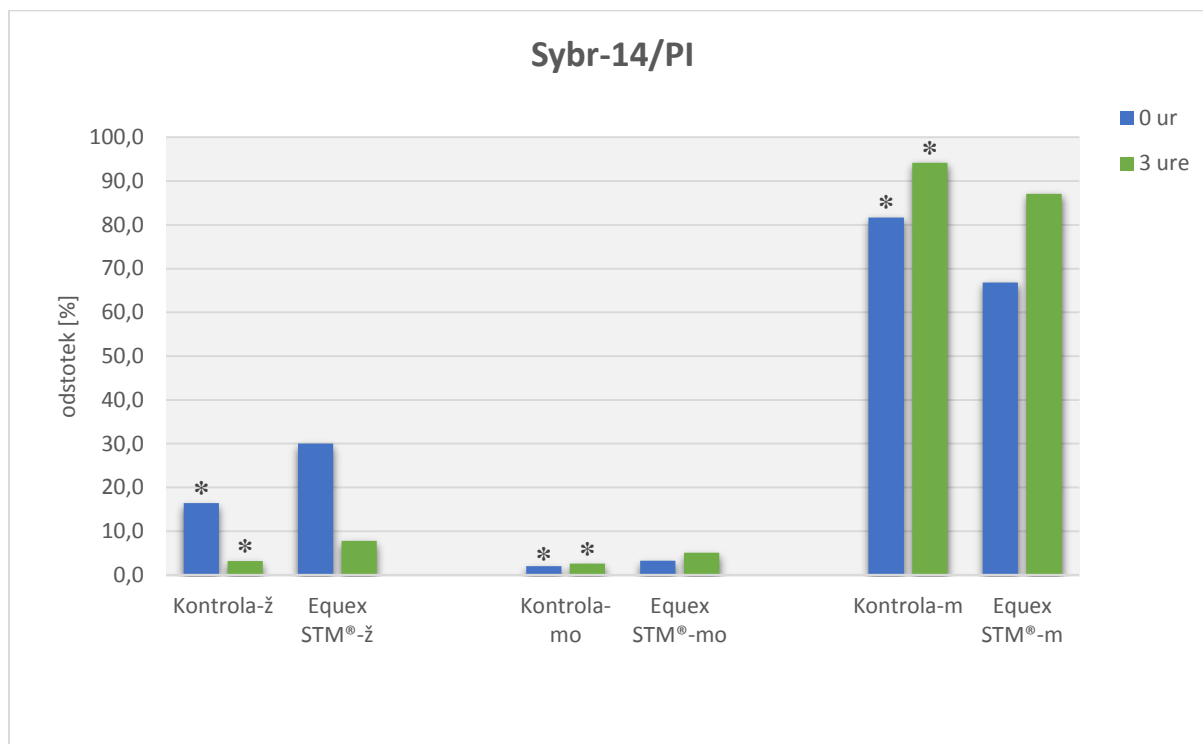
$P > 0,05$

Iz slike 14 lahko razberemo, da v odstotku semenčic s fragmentirano DNK tako pri preiskovanih kot pri kontrolnih vzorcih semena takoj po odmrzovanju, po 0- ($Z = -0,377$; $P = 0,706$) in tudi po 3-urni ($Z = -0,031$; $P = 0,975$) inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ni bilo zaznani statistično značilne razlike.

Tako znotraj preiskovanih ($Z = -2,883$; $P = 0,004$) kot znotraj kontrolnih ($Z = -3,009$; $P = 0,003$) vzorcev semena je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ med dvema časovnima skupinama do statistično značilnega porasta odstotka semenčic s fragmentirano DNK.

4.1.5 SYBR-14/PI test

Na sliki 15 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik v odstotku živih, morbidnih in mrtvih semenčic v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju v kontrolnih (n = 31) in preiskovanih (Equex STM®) (n = 31) semenčicah.



Slika 15: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi, morbidnimi in mrtvimi semenčicami v kontrolnih (n = 31) in preiskovanih (n = 31) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 15: Differences in the average percentage among the living, moribund and dead spermatozoa in the control (n = 31) and examined (n = 31) samples of semen in two different time periods after thawing.

Legenda: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, ž – žive, mo – morbidne, m – mrtve semenčice, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, ž – live, mo – moribund, m – dead spermatozoa, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: P < 0,001

Iz slikeSlika 15 lahko razberemo, da je prišlo, glede na kontrolne vzorce semena ob dodatku detergenta Equex STM® v razredčevalac za zamrzovanje ovnovnega semena, do statistično značilnega porasta odstotka živih semenčic takoj po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C ter tri ure kasneje, in sicer iz $16,4 \pm 13,7$ na $30,0 \pm 14,4$ ($Z = -4,067$; $P = 0,000$) po 0 ter iz $3,2 \pm 4,0$ na $7,8 \pm 3,3$ ($Z = -4,488$; $P = 0,000$) po 3 urah. Poleg tega ugotovimo statistično značilen porast odstotka morbidnih semenčic med preiskovanimi vzorci po odmrzovanju in triurni inkubaciji na 37 °C v primerjavi s kontrolnimi vzorci, in sicer iz $2,0 \pm 2,6$ na $3,3 \pm 2,3$ ($Z = -3,586$;

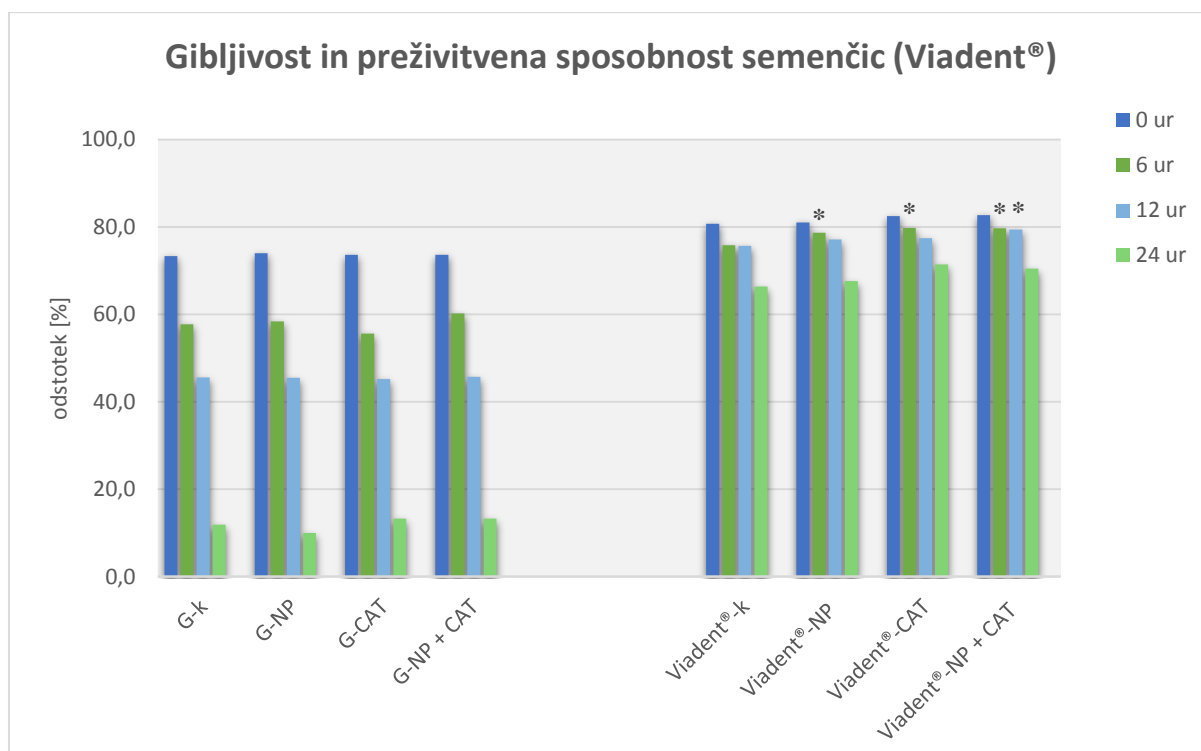
P = 0,000) po 0 ter iz $2,6 \pm 2,0$ na $5,1 \pm 2,7$ ($Z = -4,478$; $P = 0,000$) po 3 urah. Pri preiskovanih vzorcih se je takoj po odmrzovanju in triurni inkubaciji na 37 °C statistično značilno znižal odstotek mrtvih semenčic v primerjavi s kontrolnimi vzorci, in sicer iz $81,7 \pm 14,5$ na $66,8 \pm 14,8$ ($Z = -4,194$; $P = 0,000$) po 0 ter iz $94,2 \pm 5,0$ na $87,1 \pm 5,0$ ($Z = -4,625$; $P = 0,000$) po 3 urah.

Tako znotraj preiskovanih ($Z = -4,860$; $P = 0,000$) kot znotraj kontrolnih ($Z = -4,860$; $P = 0,000$) vzorcev semena je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v dveh časovnih obdobjih meritev do statistično značilnega znižanja odstotka živih semenčic. Statistično značilen porast odstotka morbidnih semenčic je razviden med časovnimi skupinami znotraj preiskovanih ($Z = -3,782$; $P = 0,000$) in kontrolnih ($Z = -3,390$; $P = 0,001$) vzorcev semena, prav tako pa smo po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C znotraj preiskovanih ($Z = -4,860$; $P = 0,000$) in kontrolnih ($Z = 4,801$; $P = 0,000$) vzorcev semena ugotovili statistično značilen porast odstotka mrtvih semenčic.

4.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA ANTIOKSIDANTOV KATALAZE IN NATRIJEVEGA PIRUVATA

4.2.1 Gibljivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic

Na sliki 16 in 17 so prikazani povprečni odstotki gibljivosti in preživitvene sposobnosti (Viadent®) semenčic v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih (n = 42) in preiskovanih (natrijev piruvat, katalaza, natrijev piruvat in katalaza) (n = 42) semenčicah. Poleg tega so prikazana povprečja treh različnih hitrosti semenčic (VAP, VSL, VCL) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.



Slika 16: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih (n = 42) in preiskovanih (n = 42) vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 16: The average motility and viability (Viadent®) of spermatozoa in the control (n = 42) and examined (n = 42) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: G – gibljivost, Viadent® – preživitvena sposobnost, k – kontrola, NP – natrijev piruvat, CAT – katalaza, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: G – motility, Viadent® – viability, NP – sodium pyruvate, CAT – catalase, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: P < 0,05

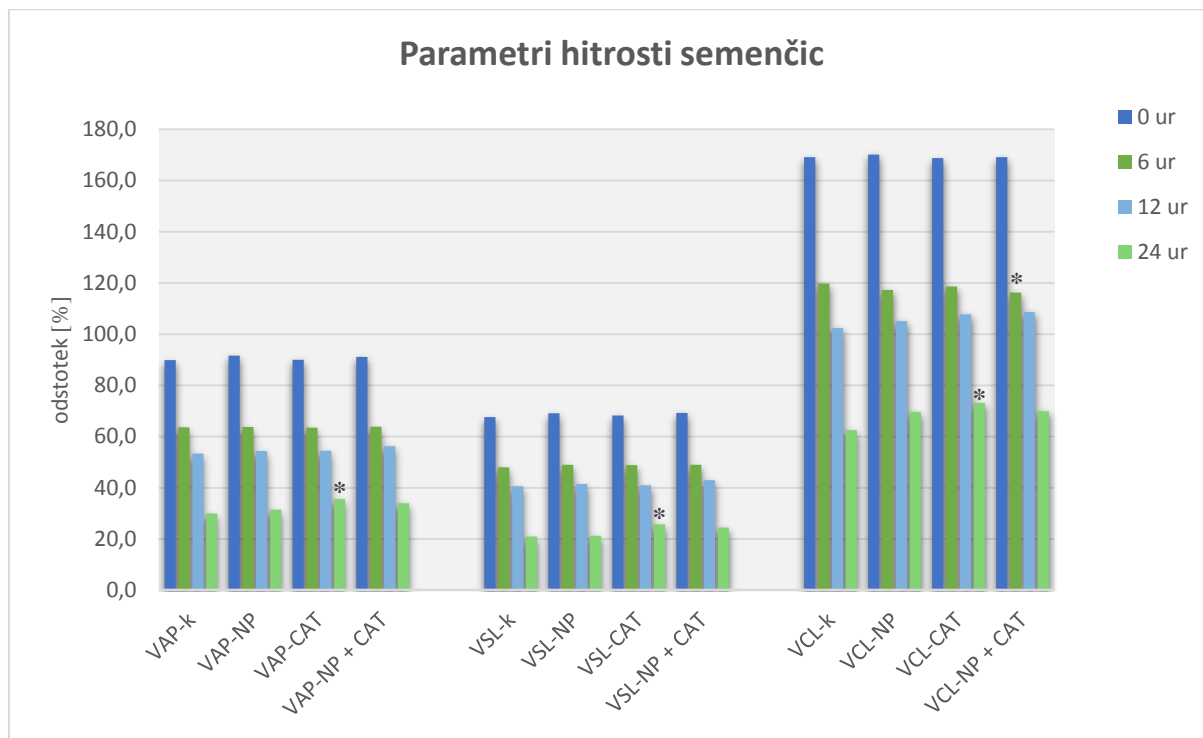
Iz slike 16 lahko razberemo, da ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata ($73,3 \pm 22,9$ proti $74,0 \pm 23,6$ ($Z = -0,798$; $P = 0,425$) po 0, $57,7 \pm 26,8$ proti $58,4 \pm 25,4$ ($Z = -0,240$; $P = 0,810$) po 6, $45,6 \pm 24,3$ proti $45,5 \pm 25,6$ ($Z = -0,340$; $P = 0,734$) po 12 ter $11,9 \pm 11,7$ proti $10,0$

$\pm 9,4$ ($Z = -1,686$; $P = 0,092$) po 24 urah), katalaze ($73,3 \pm 22,9$ proti $73,6 \pm 23,8$ ($Z = -0,654$; $P = 0,513$) po 0, $57,7 \pm 26,8$ proti $55,6 \pm 24,3$ ($Z = -1,439$; $P = 0,150$) po 6, $45,6 \pm 24,3$ proti $45,2 \pm 23,1$ ($Z = -0,566$; $P = 0,572$) po 12 ter $11,9 \pm 11,7$ proti $13,3 \pm 11,5$ ($Z = -1,105$; $P = 0,269$) po 24 urah) ter kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($73,3 \pm 22,9$ proti $73,6 \pm 23,7$ ($Z = -0,371$; $P = 0,711$) po 0, $57,7 \pm 26,8$ proti $60,2 \pm 25,1$ ($Z = -1,598$; $P = 0,110$) po 6, $45,6 \pm 24,3$ proti $45,7 \pm 22,4$ ($Z = -0,141$; $P = 0,888$) po 12 ter $11,9 \pm 11,7$ proti $13,3 \pm 12,1$ ($Z = -0,882$; $P = 0,378$) po 24 urah) v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena glede na kontrolne vzorce semena v nobenem od štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ni prišlo do statistično značilnega porasta odstotka gibljivih semenčic. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnega porasta odstotka semenčic z boljšo preživitveno sposobnostjo glede na kontrolne vzorce za natrijev piruvat ($80,7 \pm 17,0$ proti $81,0 \pm 16,2$ ($Z = -0,144$; $P = 0,886$) po 0, $75,7 \pm 19,1$ proti $77,1 \pm 17,7$ ($Z = -0,836$; $P = 0,403$) po 12 ter $66,4 \pm 27,2$ proti $67,6 \pm 26,2$ ($Z = -0,892$; $P = 0,372$) po 24 urah), katalazo ($80,7 \pm 17,0$ proti $82,5 \pm 13,5$ ($Z = -1,200$; $P = 0,230$) po 0, $75,7 \pm 19,1$ proti $77,4 \pm 14,3$ ($Z = -0,381$; $P = 0,703$) po 12 ter $66,4 \pm 27,2$ proti $71,4 \pm 19,9$ ($Z = -1,371$; $P = 0,170$) po 24 urah) ter kombinacijo natrijevega piruvata in katalaze ($80,7 \pm 17,0$ proti $82,7 \pm 13,2$ ($Z = -1,407$; $P = 0,160$) po 0, ter $66,4 \pm 27,2$ proti $70,5 \pm 23,4$ ($Z = -0,612$; $P = 0,541$) po 24 urah). Statistično značilen porast odstotka semenčic z boljšo preživitveno sposobnostjo glede na kontrolne vzorce smo ugotovili v naslednjih primerih, in sicer za natrijev piruvat ($75,8 \pm 18,9$ proti $78,7 \pm 15,0$ ($Z = -2,632$; $P = 0,008$) in katalazo ($75,8 \pm 18,9$ proti $79,8 \pm 13,9$ ($Z = -2,545$; $P = 0,011$) po 6 urah) ter za kombinacijo natrijevega piruvata in katalaze ($75,8 \pm 18,9$ proti $79,7 \pm 14,8$ ($Z = -2,932$; $P = 0,003$)) po 6, ($75,7 \pm 19,1$ proti $79,4 \pm 12,8$ ($Z = -2,545$; $P = 0,011$) in po 12 urah).

Tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 115,399$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 115,374$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 118,704$; $P = 0,000$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 116,411$; $P = 0,000$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v štirih časovnih obdobjih meritev do statistično značilnega znižanja odstotka gibljivih semenčic.

Statistično značilen padec preživitvene sposobnosti semenčic smo ugotovili v vseh časovnih obdobjih meritev tako znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 47,520$; $P \leq 0,001$) z izjemo časovnega obdobja 6 in 12 ur ($Z = -0,056$; $P = 0,955$) kot tudi znotraj vzorcev semena z

dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 44,399$; $P < 0,05$), z izjemo časovnega obdobja 6 in 12 ur ($Z = -0,944$; $P = 0,345$), katalaze ($\chi^2 = 47,031$; $P < 0,05$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 36,543$; $P < 0,05$), z izjemo časovnega obdobja 6 in 12 ur ($Z = -0,538$; $P = 0,591$).



Slika 17: Primerjava povprečne hitrosti semenčič med kontrolnimi ($n = 42$) in preiskovanimi ($n = 42$) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 17: Comparison of the average speed of spermatozoa between control ($n = 42$) and examined ($n = 42$) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčič po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, k – kontrola, NP – natrijev piruvat, CAT – katalaza, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, k – control, NP – sodium pyruvate, CAT – catalase, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,05$

Iz slike 17 lahko razberemo, da ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata, katalaze in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena, glede na kontrolne vzorce semena v štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ni prišlo do statistično značilnega dviga povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčič (VAP) pri vzorcih po odmrzovanju po 0, 6, 12 in 24 urah ($P > 0,05$) glede na kontrolno skupino vzorcev semena, z izjemo časovnega obdobja 24 ur, ob dodatku antioksidanta katalaze, kjer pa smo ugotovili statistično značilen dvig povprečne hitrosti krivulje gibanja

semenčic ($P = 0,021$). Prav tako nismo ugotovili statistično značilne večje hitrosti krivulje gibanja semenčic (VCL) ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata, katalaze in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovoga semena glede na kontrolne vzorce semena v štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C ($P > 0,05$), z izjemo časovnega obdobja 24 ur, ob dodatku antioksidanta katalaze ($P = 0,005$), kjer smo ugotovili statistično značilen dvig hitrosti krivulje gibanja semenčic v preiskovani skupini ter časovnega obdobja 6 ur, ob dodatku kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($P = 0,029$), kjer smo ugotovili višjo hitrost krivulje gibanja semenčic v kontrolni skupini.

Statistično značilne večje hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL) nismo ugotovili ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata, katalaze in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovoga semena, glede na kontrolne vzorce semena v štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C ($P > 0,05$), z izjemo časovnega obdobja 24 ur, ob dodatku antioksidanta katalaze, kjer pa smo ugotovili statistično značilen dvig povprečne hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke ($P = 0,044$).

Tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 116,800$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 115,971$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 114,780$; $P = 0,000$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 119,971$; $P = 0,000$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev do statistično značilnega zmanjšanja povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP).

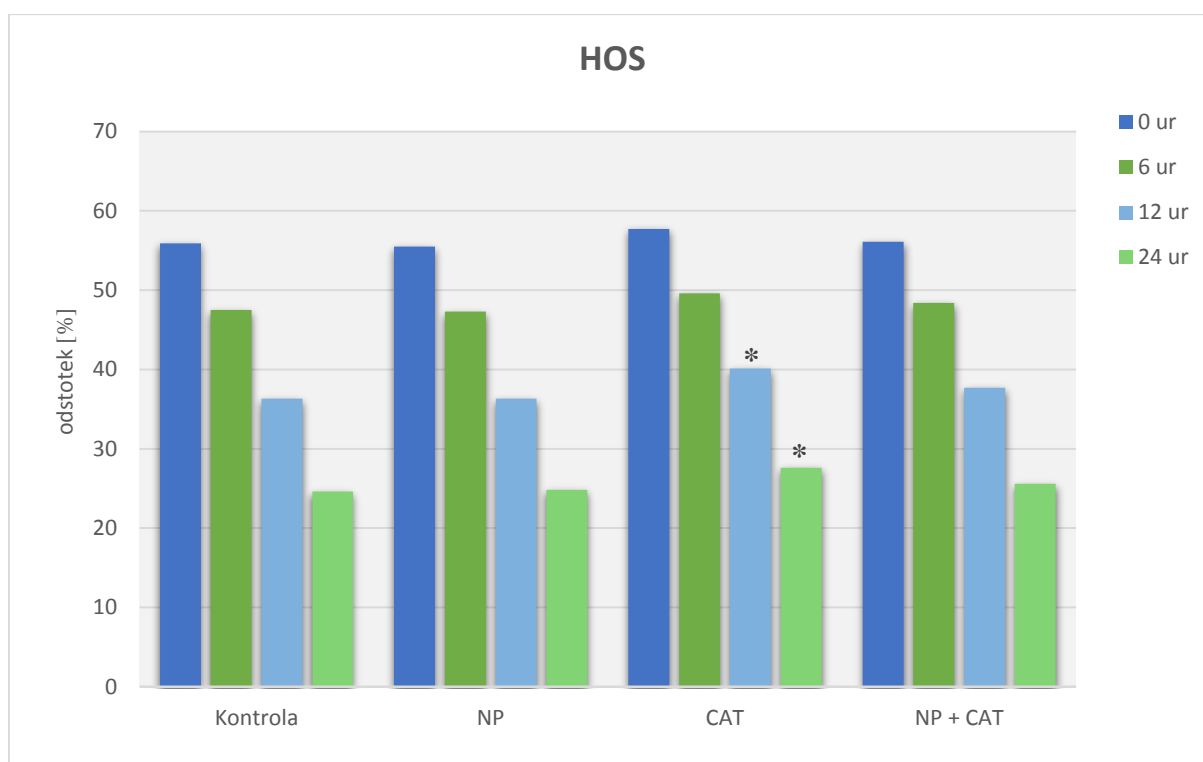
Statistično značilno zmanjšanje hitrosti krivulje gibanja semenčic (VCL) smo ugotovili tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 113,592$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 112,461$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 112,543$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 119,053$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev.

Statistično značilno zmanjšanje hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL) smo ugotovili tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 109,325$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 107,286$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega

piruvata in katalaze ($\chi^2 = 114,496$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 114,488$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev.

4.2.2 Hipoozmotski test semenčic

Na sliki 18 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik med hipoozmotsko pozitivno reagiranimi semenčicami v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih ($n = 42$) in preiskovanih (natrijev piruvat, katalaza, natrijev piruvat in katalaza) ($n = 42$) semenčicah.



Slika 18: Prikaz razlik v povprečnem odstotku hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic med kontrolnimi ($n = 42$) in preiskovanimi ($n = 42$) vzorci semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 18: Differences in the average percentage of positive hypoosmotic reacted spermatozoa between control ($n = 42$) and examined ($n = 42$) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: HOS – odstotek hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic, NP – natrijev piruvat, CAT – katalaza, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: HOS – percentage of hypoosmotic swelling positive reacted spermatozoa, NP – sodium pyruvate, CAT – catalase, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,001$

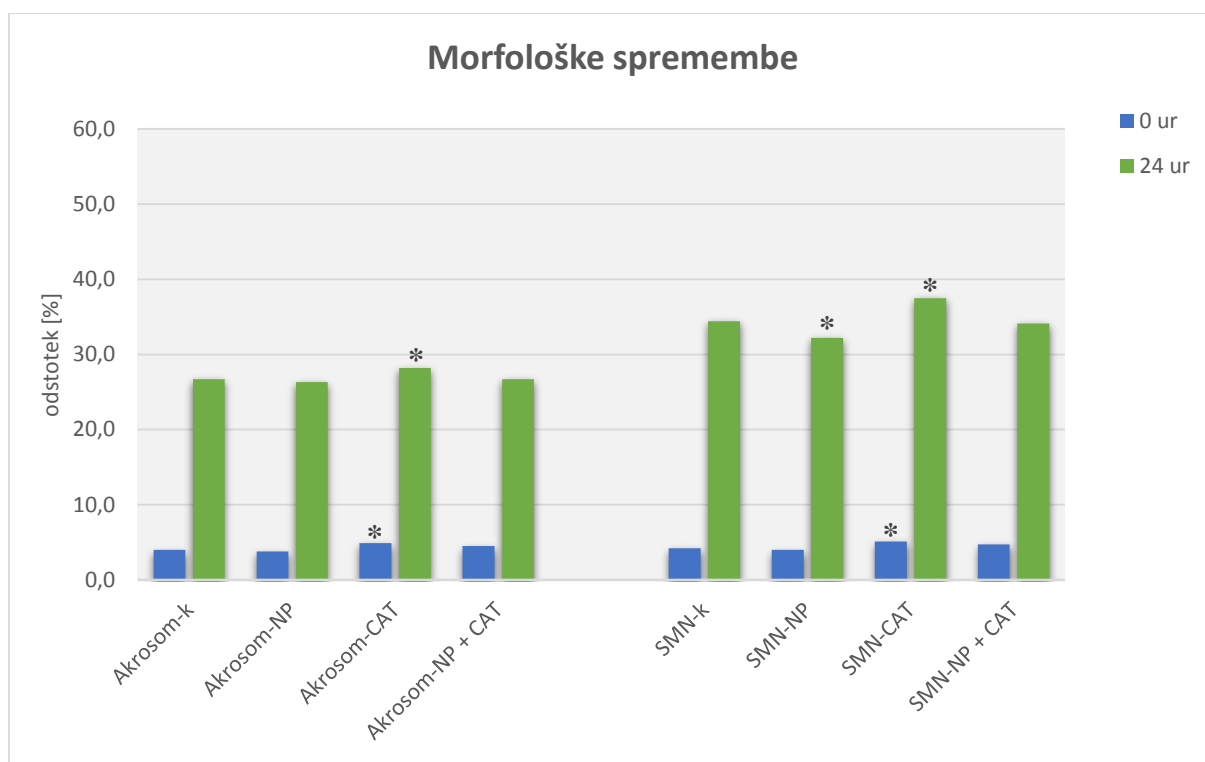
Iz slike 18 lahko razberemo, da ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata ($55,9 \pm 25,2$ proti $55,5 \pm 25,0$ ($Z = -0,047$; $P = 0,962$) po 0, $47,5 \pm 22,5$ proti $47,3 \pm 21,8$ ($Z = -0,581$; $P =$

0,561) po 6, $36,3 \pm 20,7$ proti $36,3 \pm 21,5$ ($Z = -0,065$; $P = 0,948$) po 12 ter $24,6 \pm 17,6$ proti $24,8 \pm 17,6$ ($Z = -0,538$; $P = 0,591$) po 24 urah), katalaze ($55,9 \pm 25,2$ proti $57,7 \pm 26,3$ ($Z = -1,938$; $P = 0,053$) po 0, $47,5 \pm 22,5$ proti $49,6 \pm 22,9$ ($Z = -1,926$; $P = 0,054$) ter po 6 urah in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($55,9 \pm 25,2$ proti $56,1 \pm 25,6$ ($Z = -0,262$; $P = 0,793$) po 0, $47,5 \pm 22,5$ proti $48,4 \pm 21,6$ ($Z = -1,089$; $P = 0,276$) po 6, $36,3 \pm 20,7$ proti $37,7 \pm 20,6$ ($Z = -1,179$; $P = 0,238$) po 12 ter $24,6 \pm 17,6$ proti $25,6 \pm 17,0$ ($Z = -1,344$; $P = 0,179$) po 24 urah) v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena glede na kontrolne vzorce semena v štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ni prišlo do statistično značilnega porasta odstotka hipoozmotsko pozitivnih semenčic. Izjemo, kjer smo potrdili statistično značilen porast odstotka hipoozmotsko pozitivnih semenčic, smo ugotovili ob dodatku antioksidanta katalaze v časovnih obdobjih ($36,3 \pm 20,7$ proti $40,1 \pm 22,0$ ($Z = -3,985$; $P = 0,000$) 12 ter $24,6 \pm 17,6$ proti $27,6 \pm 18,2$ ($Z = -3,558$; $P = 0,000$) 24 ur.

Statistično značilne razlike v odstotku hipoozmotsko pozitivnih semenčic smo ugotovili tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 112,600$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 111,474$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 111,343$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 114,800$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3 Morfološke spremembe semenčic

Na sliki 19 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik morfoloških sprememb na akrosomu ter skupnih morfoloških sprememb semenčic v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih (n = 42) in preiskovanih (natrijev piruvat, katalaza, natrijev piruvat in katalaza) (n = 42) semenčicah.



Slika 19: Morfološke spremembe semenčic v kontrolnih (n = 42) in preiskovanih (n = 42) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 19: The abnormal spermatozoa morphology of control (n = 42) and examined (n = 42) samples of semen in two different time periods after thawing.

Legenda: k – kontrola, NP – natrijev piruvat, CAT – katalaza, SMN – skupne morfološke napake, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: k – control, NP – sodium pyruvate, CAT – catalase, SMN – morphological abnormal spermatozoa, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: P < 0,05

Iz slike 19 lahko razberemo, da dodatek antioksidantov natrijevega piruvata ($4,0 \pm 2,9$ proti $3,8 \pm 3,6$ ($Z = -1,510$; $P = 0,131$) po 0 ter $26,7 \pm 11,4$ proti $26,3 \pm 11,5$ ($Z = -0,538$; $P = 0,591$) po 24 urah) ter kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($4,0 \pm 2,9$ proti $4,5 \pm 4,2$ ($Z = -0,901$; $P = 0,368$) po 0 ter $26,7 \pm 11,4$ proti $26,3 \pm 10,5$ ($Z = -0,781$; $P = 0,435$) po 24 urah) v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena glede na kontrolne vzorce semena v dveh

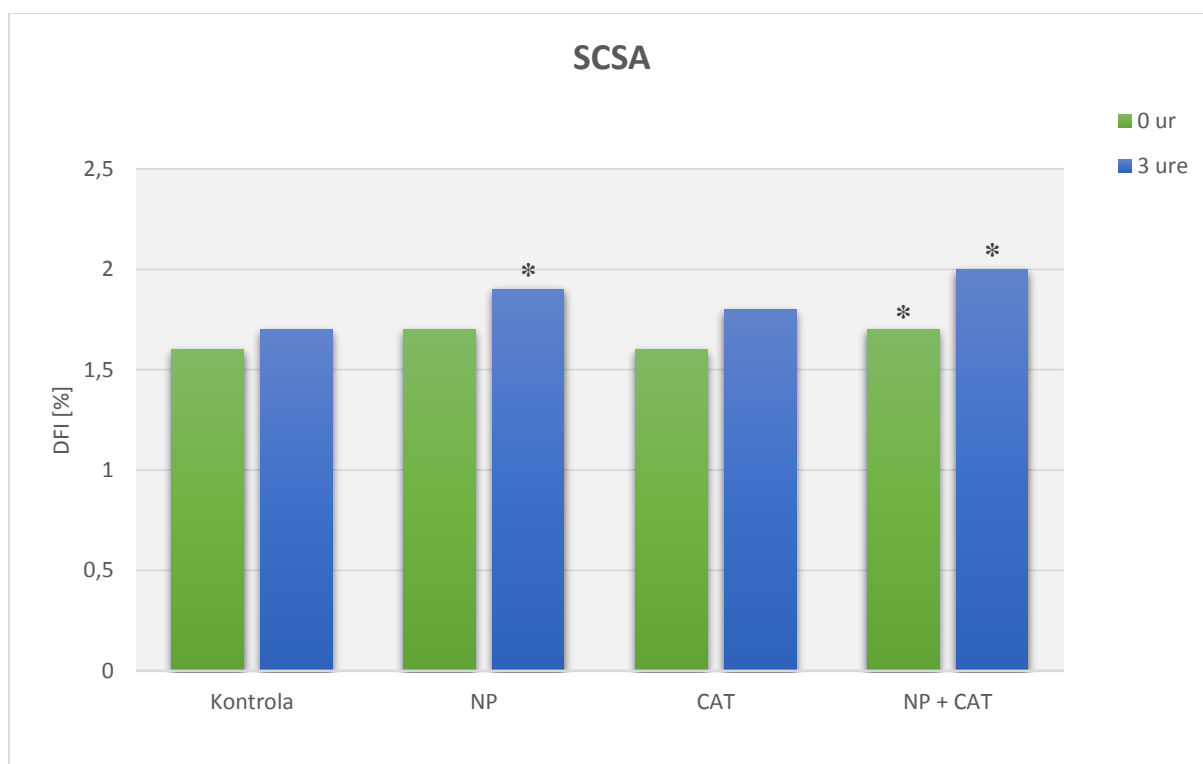
časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C ni statistično značilno znižal odstotka morfoloških sprememb akrosoma semenčic v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena. Statistično značilno se je zvišal odstotek morfoloških sprememb akrosoma semenčic v primerjavi s kontrolnimi vzorci, ob dodatku antioksidanta katalaze v obeh časovnih obdobjih ($4,0 \pm 2,9$ proti $4,9 \pm 4,1$ ($Z = -2,695$; $P = 0,007$) 0 ter $26,7 \pm 11,4$ proti $28,2 \pm 11,3$ ($Z = -2,444$; $P = 0,015$) 24 ur. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnega nižjega odstotka skupnih morfoloških sprememb semenčic glede na kontrolne vzorce za natrijev piruvat ($4,2 \pm 3,0$ proti $4,0 \pm 3,8$ ($Z = -1,212$; $P = 0,226$) po 0 urah) ter kombinacijo natrijevega piruvata in katalaze ($4,2 \pm 3,0$ proti $4,7 \pm 4,1$ ($Z = -0,901$; $P = 0,368$) po 0, ter $34,4 \pm 9,7$ proti $34,1 \pm 9,8$ ($Z = -0,181$; $P = 0,856$) po 24 urah). Statistično značilno se je znižal odstotek skupnih morfoloških sprememb semenčic, v primerjavi s kontrolnimi vzorci, ob dodatku antioksidanta natrijevega piruvata ($34,4 \pm 9,7$ proti $32,2 \pm 10,8$ ($Z = -2,344$; $P = 0,019$) v časovnem obdobju 24 ur, medtem ko je bil ob dodatku antioksidanta katalaze ($4,2 \pm 3,0$ proti $5,1 \pm 4,1$ ($Z = -2,482$; $P = 0,013$) po 0 ter $34,4 \pm 9,7$ proti $37,5 \pm 10,4$ ($Z = -3,732$; $P = 0,000$) po 24 urah) odstotek skupnih morfoloških sprememb semenčic nižji v kontrolnih vzorcih.

Statistično značilen porast odstotka semenčic z morfološkimi spremembami akrosoma smo ugotovili tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$) v obeh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C.

Statistično značilen porast odstotka skupnih morfoloških sprememb semenčic smo ugotovili tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 42,000$; $P = 0,000$) v obeh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C.

4.2.4 SCSA™ (*sperm chromatin structure assay*) test

Na sliki 20 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik med semenčicami s fragmentirano DNK, v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih ($n = 42$) in preiskovanih (natrijev piruvat, katalaza, natrijev piruvat in katalaza) ($n = 42$) semenčicah.



Slika 20: Prikaz razlik v povprečnem odstotku fragmentirane DNK semenčic pri kontrolnih ($n = 42$) in preiskovanih ($n = 42$) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 20: Differences in the average percentage of DNA fragmented spermatozoa in the control ($n = 42$) and examined ($n = 42$) samples of semen in two different time periods after thawing.

Legenda: SCSA – *sperm chromatin structure assay*, DFI (%) – odstotek fragmentirane DNK semenčic, NP – natrijev piruvat, CAT – katalaza, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: SCSA – *sperm chromatin structure assay*, DFI (%) – percentage of spermatozoa DNA fragmentation, NP – sodium pyruvate, CAT – catalase, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,05$

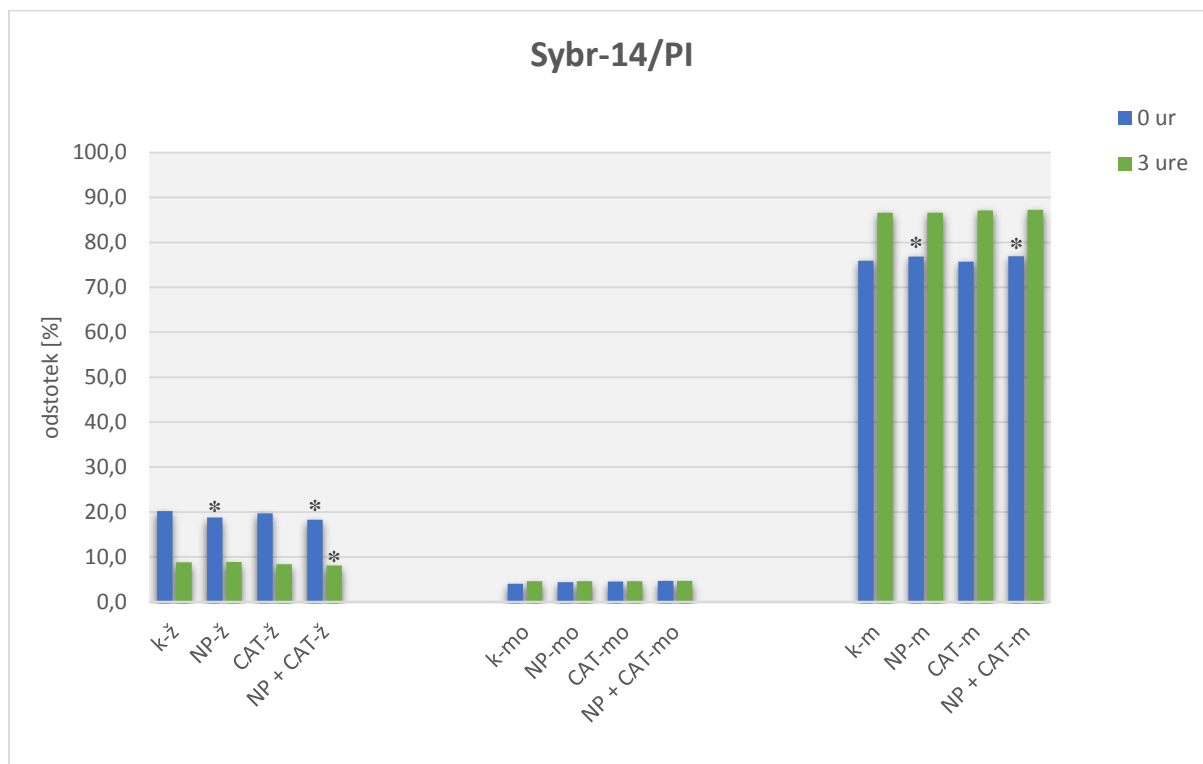
Iz slike 20 lahko razberemo, da dodatek antioksidantov natrijevega piruvata ($1,6 \pm 1,1$ proti $1,7 \pm 1,1$ ($Z = -0,865$; $P = 0,387$) po 0 urah) ter katalaze ($1,6 \pm 1,1$ proti $1,6 \pm 0,9$ ($Z = -1,458$; $P = 0,145$) po 0 ter $1,7 \pm 1,3$ proti $1,8 \pm 1,0$ ($Z = -1,119$; $P = 0,263$) po 3 urah) v razredčevalcu za zamrzovanje ovnevega semena glede na kontrolne vzorce semena v dveh

časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C ni statistično značilno znižal odstotka semenčic s fragmentirano DNK v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena. Statistično značilno nižji odstotek semenčic s fragmentirano DNK smo ugotovili v kontrolni skupini glede na vzorce semena ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata ($1,7 \pm 1,3$ proti $1,9 \pm 1,3$ ($Z = -2,553$; $P = 0,011$) po 3 urah) ter kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($1,6 \pm 1,1$ proti $1,7 \pm 1,0$ ($Z = -2,808$; $P = 0,005$) po 0 ter $1,7 \pm 1,3$ proti $2,0 \pm 1,2$ ($Z = -2,689$; $P = 0,007$) po 3 urah).

Statistično značilen porast odstotka semenčic s fragmentirano DNK smo ugotovili znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 12,902$; $P = 0,001$), katalaze ($\chi^2 = 1,976$; $P = 0,037$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 1,976$; $P = 0,006$) v obeh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C, z izjemo kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 0,220$; $P = 0,070$), znotraj katerih statistično značilnega porasta odstotka semenčic s fragmentirano DNK nismo ugotovili.

4.2.5 SYBR-14/PI test

Na sliki 21 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik v odstotku živih, morbidnih in mrtvih semenčic, v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih (n = 37) in preiskovanih (natrijev piruvat, katalaza, natrijev piruvat in katalaza) (n = 37) semenčicah.



Slika 21: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi, morbidnimi in mrtvimi semenčicami v kontrolnih (n = 37) in preiskovanih (n = 37) vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 21: Differences in the average percentage among the living, moribund and dead spermatozoa in the control (n = 37) and examined (n = 37) samples of semen in two different time periods after thawing.

Legenda: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, k – kontrola, NP – natrijev piruvat, CAT – katalaza, ž – žive, mo – morbidne, m – mrtve semenčice, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, k – control, NP – sodium pyruvate, CAT – catalase, ž – live, mo – moribund, m – dead spermatozoa, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: P < 0,05

Iz slike 21 lahko razberemo, da dodatek antioksidantov natrijevega piruvata ($8,8 \pm 7,4$ proti $8,9 \pm 8,6$ ($Z = -0,453$; $P = 0,651$) po 3 urah) ter katalaze ($20,2 \pm 16,3$ proti $19,7 \pm 16,6$ ($Z = -0,754$; $P = 0,451$) po 0 ter $8,8 \pm 7,4$ proti $8,4 \pm 8,4$ ($Z = -1,780$; $P = 0,075$) po 3 urah) v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena glede na kontrolne vzorce semena v dveh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C ni statistično značilno zvišal

odstotka živih semenčic. Statistično značilno višji odstotek živih semenčic smo ugotovili v kontrolni skupini glede na vzorce semena ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata ($20,2 \pm 16,3$ proti $18,8 \pm 16,2$ ($Z = -3,070$; $P = 0,002$) po 0 urah) ter kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($20,2 \pm 16,3$ proti $18,3 \pm 14,8$ ($Z = -2,361$; $P = 0,018$) po 0 ter $8,8 \pm 7,4$ proti $8,1 \pm 7,7$ ($Z = -2,225$; $P = 0,026$) po 3 urah). Prav tako nismo ugotovili statistično značilnega nižjega odstotka morbidnih semenčic glede na kontrolne vzorce za natrijev piruvat ($4,0 \pm 2,8$ proti $4,4 \pm 2,9$ ($Z = -0,075$; $P = 0,940$) po 0 ter $4,6 \pm 3,9$ proti $4,6 \pm 3,3$ ($Z = -0,588$; $P = 0,556$) po 3 urah), katalazo ($4,0 \pm 2,8$ proti $4,5 \pm 3,4$ ($Z = -0,219$; $P = 0,827$) po 0 ter $4,6 \pm 3,9$ proti $4,6 \pm 3,7$ ($Z = -0,551$; $P = 0,582$) po 3 urah) ter kombinacijo natrijevega piruvata in katalaze ($4,0 \pm 2,8$ proti $4,7 \pm 4,4$ ($Z = -0,302$; $P = 0,763$) po 0 ter $4,6 \pm 3,9$ proti $4,7 \pm 3,9$ ($Z = -0,694$; $P = 0,488$) po 3 urah). Nismo ugotovili statistično značilno nižjega odstotka mrtvih semenčic glede na kontrolne vzorce za natrijev piruvat ($86,6 \pm 9,6$ proti $86,6 \pm 10,1$ ($Z = -0,385$; $P = 0,700$) po 3 urah), katalazo ($75,9 \pm 17,1$ proti $75,7 \pm 18,2$ ($Z = -0,566$; $P = 0,572$) po 0- ter $86,6 \pm 9,6$ proti $87,1 \pm 9,7$ ($Z = -0,883$; $P = 0,377$) po 3 urah) ter kombinacijo natrijevega piruvata in katalaze ($86,6 \pm 9,6$ proti $87,2 \pm 9,4$ ($Z = -1,335$; $P = 0,182$) po 3 urah). Statistično značilno nižji odstotek mrtvih semenčic smo ugotovili v kontrolni skupini glede na vzorce semena ob dodatku antioksidantov natrijevega piruvata ($75,9 \pm 17,1$ proti $76,8 \pm 17,2$ ($Z = -2,089$; $P = 0,037$)) ter kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($75,9 \pm 17,1$ proti $76,9 \pm 17,2$ ($Z = -2,678$; $P = 0,007$)) po 0 urah.

Statistično značilno nižji odstotek živih semenčic smo ugotovili tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 14,297$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 14,297$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 14,297$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 14,297$; $P = 0,000$) v obeh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^\circ\text{C}$.

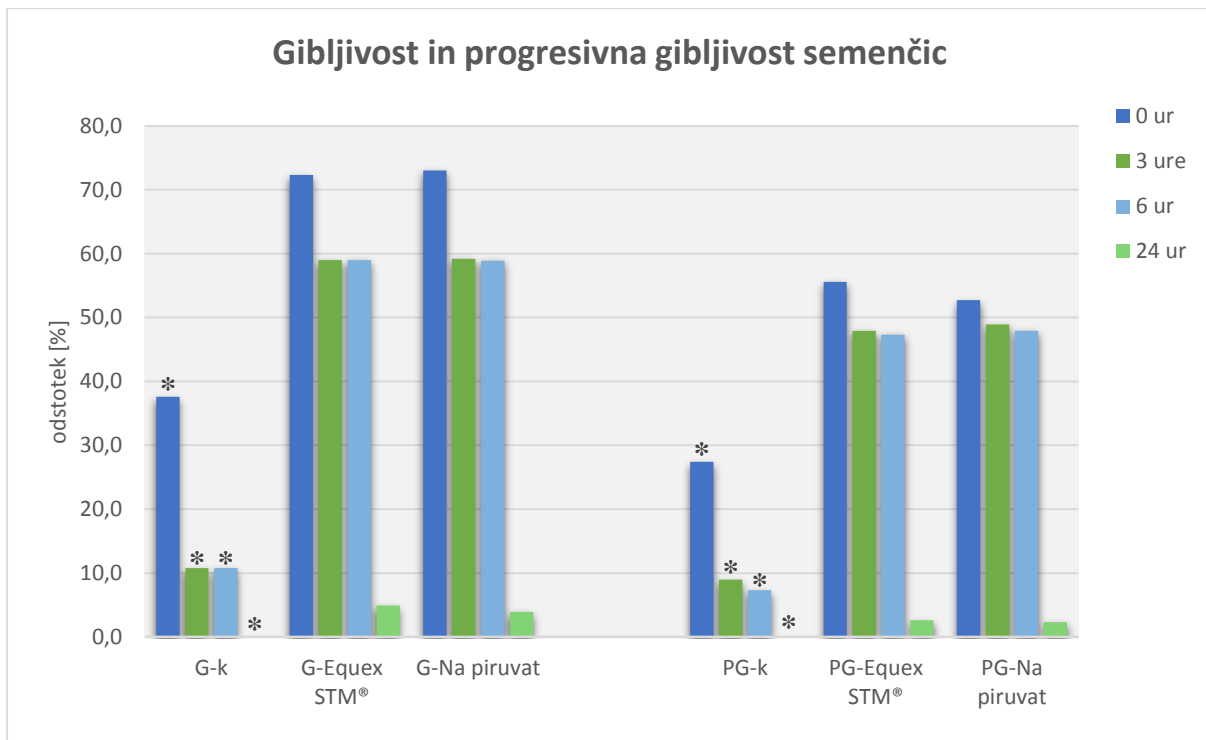
Statistično značilnega višjega odstotka morbidnih semenčic pa nismo ugotovili znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 1,324$; $P = 0,613$), katalaze ($\chi^2 = 0,027$; $P = 0,684$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 0,027$; $P = 0,780$) kot tudi ne znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 0,027$; $P = 0,689$) v obeh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Statistično značilno višji odstotek mrtvih semenčic smo ugotovili tako znotraj vzorcev semena z dodatkom natrijevega piruvata ($\chi^2 = 14,297$; $P = 0,000$), katalaze ($\chi^2 = 16,892$; $P = 0,000$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($\chi^2 = 14,297$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 16,892$; $P = 0,000$) v obeh časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C.

4.3 UGOTAVLJANJE USPEŠNOSTI OSEMENITVE OVAC S KONZERVIRANIM SEMENOM

4.3.1 Gibljivost in progresivna gibljivost semenčič

Na sliki 22 so prikazani povprečni odstotki gibljivosti in progresivne gibljivosti semenčič v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih ($n = 9$) semenčicah in semenčicah, ki so imele v razredčevalcu za zamrzovanje ovnevega semena dodatek detergenta Equex STM® ($n = 9$) ter semenčicah, ki so imele v razredčevalcu za zamrzovanje ovnevega semena poleg detergenta Equex STM® še dodatek antioksidanta natrijevega piruvata ($n = 9$).



Slika 22: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčič v kontrolnih ($n = 9$) in preiskovanih ($n = 9$) vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 22: The average motility and progressive motility of spermatozoa in the control ($n = 9$) and examined ($n = 9$) samples of semen in four time periods after thawing.

Legenda: G – gibljivost, PG – progresivna gibljivost, k – kontrola, Na – natrij, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: G – motility, PG – progressive motility, k – control, Na – sodium, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,05$

Iz slike 22 lahko razberemo, da je prišlo glede na kontrolne vzorce semena ob dodatku detergenta ter detergenta in natrijevega piruvata v razredčevalec za zamrzovanje ovnovnega semena v povprečju do statistično značilnega porasta odstotka gibljivih semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, in sicer ob dodatku detergenta Equex STM[®], iz 37,6 ± 13,7 na 72,3 ± 5,0 po 0, iz 10,8 ± 13,4 na 59,0 ± 5,9 po 6 (Z = -2,670; P = 0,008), iz 10,8 ± 9,8 na 59,0 ± 10,1 (Z = -2,666; P = 0,008) po 3 ter iz 0,0 ± 0,0 na 4,9 ± 6,9 (Z = -2,023; P = 0,043) po 24 urah ter ob dodatku detergenta Equex STM[®] in natrijevega piruvata, iz 37,6 ± 13,7 na 73,0 ± 6,0 (Z = -2,666; P = 0,008) po 0, iz 10,8 ± 9,8 na 59,2 ± 8,7 po 3, iz 10,8 ± 13,4 na 58,9 ± 10,5 po 6 ter iz 0,0 ± 0,0 na 3,9 ± 4,4 po 24 urah (Z = -2,207; P = 0,027).

Prav tako smo ugotovili tudi statistično značilen porast odstotka semenčic z boljšo progresivno gibljivostjo glede na kontrolne vzorce, in sicer ob dodatku detergenta Equex STM[®], iz 27,4 ± 10,4 na 55,6 ± 9,0 po 0, iz 9,0 ± 9,2 na 47,9 ± 9,0 po 3 (Z = -2,668; P = 0,008), iz 7,3 ± 11,1 na 47,3 ± 5,3 (Z = -2,666; P = 0,008) po 6 ter iz 0,0 ± 0,0 na 2,6 ± 3,6 (Z = -2,023; P = 0,043) po 24 urah ter ob dodatku detergenta Equex STM[®] in natrijevega piruvata, iz 27,4 ± 10,4 na 52,7 ± 5,1 (Z = -2,670; P = 0,008) po 0, iz 9,0 ± 9,2 na 48,9 ± 7,8 po 3, iz 7,3 ± 11,1 na 47,9 ± 8,5 po 6 (Z = -2,668; P = 0,008) ter iz 0,0 ± 0,0 na 2,3 ± 2,7 po 24 urah (Z = -2,214; P = 0,027).

Ob dodatku detergenta Equex STM[®] v razredčevalec za zamrzovanje ovnovnega semena je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev do statistično značilnega znižanja odstotka gibljivih semenčic tako znotraj preiskovanih vzorcev ($\chi^2 = 22,733$; P < 0,05), razen v časovnem obdobju 3 in 6 ur (Z = -0,059; P = 0,953), kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 24,170$; P < 0,05), razen v časovnem obdobju 3 in 6 ur (Z = -2,536; P = 1,000). Prav tako smo ob dodatku detergenta Equex STM[®] in natrijevega piruvata v razredčevalec za zamrzovanje ovnovnega semena ugotovili statistično značilno znižanje povprečnega odstotka gibljivih semenčic znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 21,400$; P < 0,05) razen v časovnem obdobju 3 in 6 ur (Z = -0,119; P = 0,905) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 24,170$; P < 0,05), z izjemo časovnega obdobja 3 in 6 ur (Z = -0,000; P = 1,000).

Ob dodatku detergenta Equex STM[®] v razredčevalec za zamrzovanje ovnovnega semena je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev do statistično značilnega znižanja odstotka gibljivih semenčic tako znotraj preiskovanih vzorcev

($\chi^2 = 23,148$; $P < 0,05$), razen v časovnem obdobju 3 in 6 ur ($Z = -0,297$; $P = 0,766$), kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 23,791$; $P < 0,05$), razen v časovnem obdobju 3 in 6 ur ($Z = -1,131$; $P = 0,258$). Prav tako smo ob dodatku detergenta Equex STM® in natrijevega piruvata v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena ugotovili statistično značilno znižanje povprečnega odstotka gibljivih semenčic znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 17,697$; $P < 0,05$), z izjemo časovnih obdobjih 0 in 3 ure ($Z = -1,960$; $P = 0,050$), 0 in 6 ur ($Z = -1,823$; $P = 0,680$) in 3 in 6 ur ($Z = -0,358$; $P = 0,720$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 23,791$; $P < 0,05$), z izjemo časovnega obdobja 3 in 6 ur ($Z = -1,131$; $P = 0,258$).

4.3.2 Brejost ovac – uspešnost umetne osemenitve

V tabeli 1 so prikazani povprečni odstotki brejih ovac ter skupno število ovac, osemenjenih s kontrolnimi ($n = 60$) semenčicami, semenčicami, ki so imele v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena dodatek detergenta Equex STM® ($n = 60$) ter semenčicami, ki so imele v razredčevalcu za zamrzovanje ovnovnega semena poleg detergenta Equex STM® še dodatek antioksidanta natrijevega piruvata ($n = 60$).

Tabela 1: Prikaz povprečnih odstotkov brejih ovac in števila osemenjenih ovac s kontrolnim semenom ($n = 60$), semenom z dodatkom detergenta Equex STM® ($n = 60$) ter semenom z dodatkom detergenta Equex STM® in natrijevega piruvata ($n = 60$).

Table 1: A review of the average percent of pregnant ewes and ewes inseminated with the control semen ($n = 60$), semen with the addition of a detergent Equex STM® ($n = 60$) and semen with the addition of a detergent Equex STM® and sodium pyruvate ($n = 60$).

POSTOPEK	N	Breje ovce (%)
KONTROLA	60	1,7
EQUEX STM®	60	6,7
EQUEX STM® + Na PIRUVAT	60	8,3

Legenda: N – skupno število osemenjenih ovac, Na – natrij.
Legend: N – number of inseminated ewes, Na – sodium.

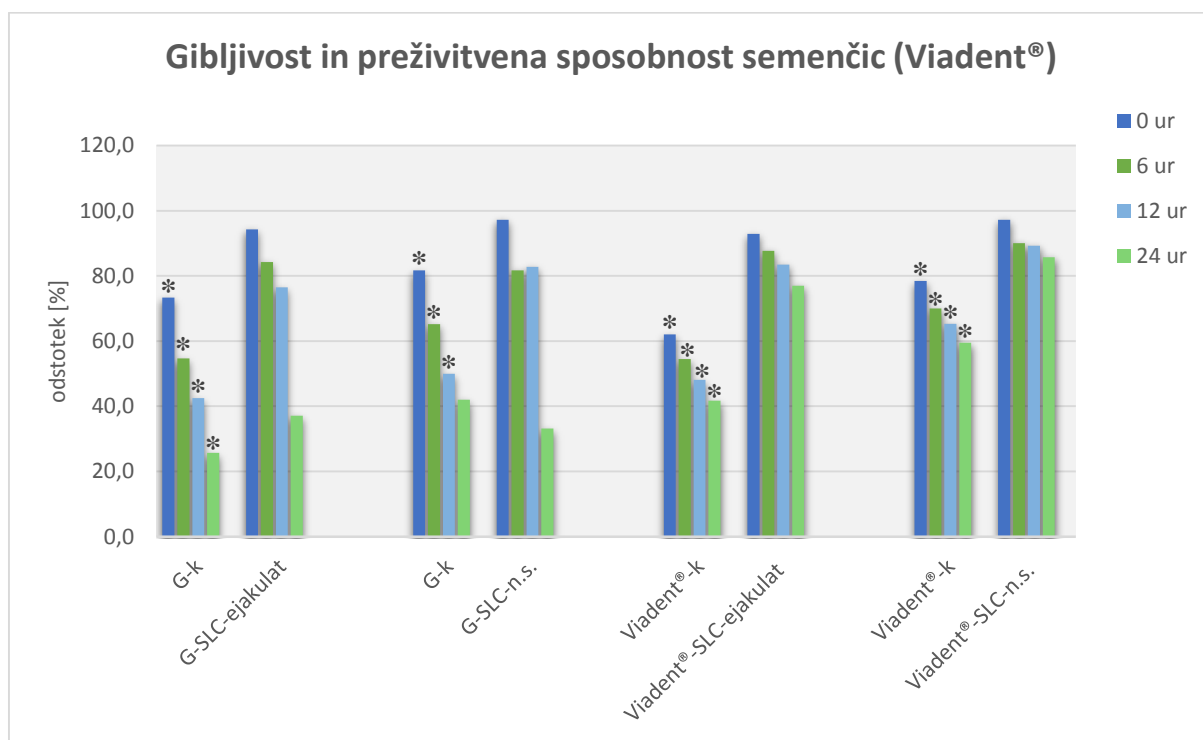
Pri uspešnosti umetne osemenitve ovac ugotovimo, da ni statistično značilne povezanosti med brejostjo s kontrolnimi vzorci semena ter brejostjo z vzorci semena ob dodatku detergenta Equex STM® ($\chi^2 = 0,139$; $P > 0,05$). Prav tako nismo ugotovili statistično

značilne povezanosti med brejostjo s kontrolnimi vzorci semena ter brejostjo z vzorci semena ob dodatku dodatku detergenta Equex STM® in natrijevega piruvata ($\chi^2 = 0,176$; $P > 0,05$).

4.4 UGOTAVLJANJE VPLIVA ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

4.4.1 Gibljivost, preživitvena sposobnost (Viadent®) in hitrost semenčic

Na sliki 23, 24 in 25 so prikazani povprečni odstotki gibljivosti in preživitvene sposobnosti (Viadent®) semenčic v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih semenčicah in semenčicah po SLC postopku v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo in v nadmodkovem semenu. Poleg tega so prikazana povprečja treh različnih hitrosti semenčic (VAP, VSL, VCL) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.



Slika 23: Povprečna gibljivost in preživitvena sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih v ejakulatu ($n = 36$) ter nadmodkovem semenu ($n = 6$) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 23: The average motility and viability (Viadent®) of spermatozoa in the control and examined samples of ejaculate ($n = 36$) and epididymal semen ($n = 6$) in four time periods after thawing.

Legenda: G – gibljivost, Viadent® – preživitvena sposobnost, k – kontrola, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: G – motility, Viadent® – viability, k – control, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

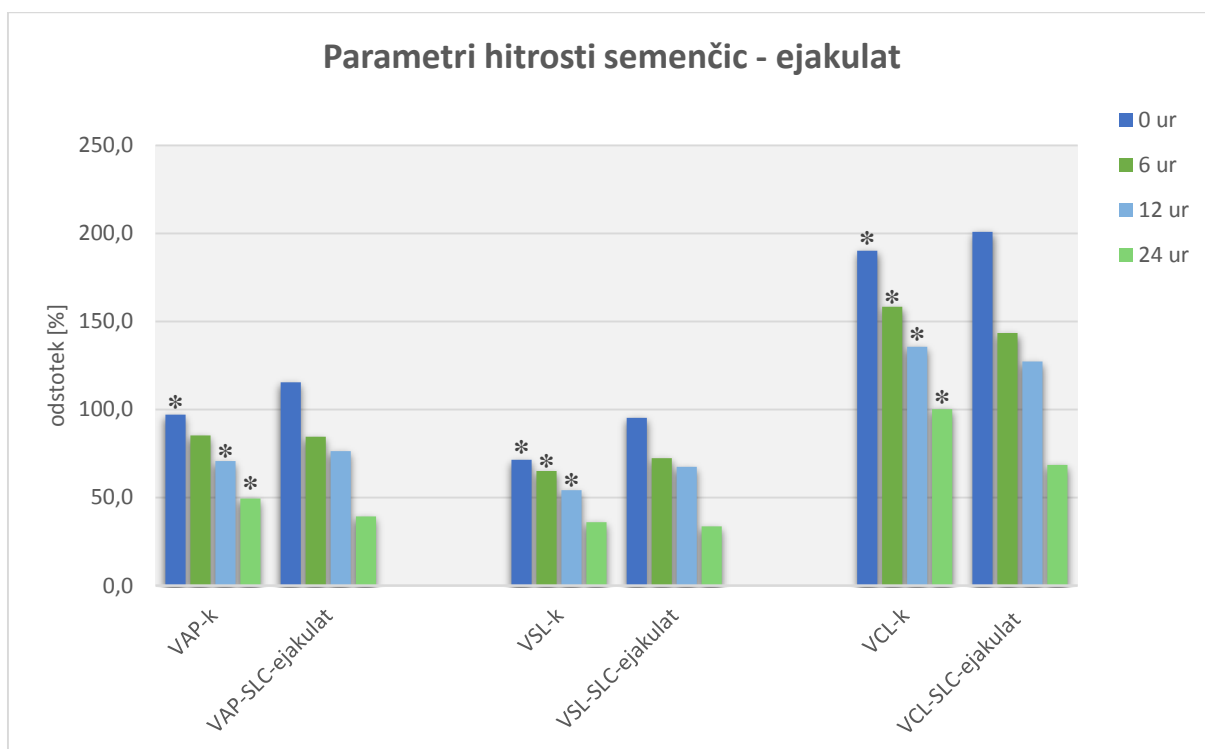
*: $P < 0,05$

Iz slike 23 lahko razberemo, da je prišlo glede na kontrolne vzorce semena po SLC postopku v povprečju do statistično značilnega porasta odstotka gibljivih semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v semenu pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $73,3 \pm 19,9$ na $94,3 \pm 7,2$ ($Z = -5,170$; $P = 0,000$) po 0, iz $54,7 \pm 21,8$ na $84,2 \pm 9,5$ po 6, iz $42,5 \pm 18,5$ na $76,5 \pm 13,4$ ($Z = -5,233$; $P = 0,000$) po 12 ter iz $25,7 \pm 18,5$ na $37,1 \pm 39,2$ ($Z = -2,151$; $P = 0,031$) po 24 urah ter v nadmodkovem semenu iz $81,7 \pm 8,8$ na $97,2 \pm 2,2$ ($Z = -2,201$; $P = 0,028$) po 0, iz $65,2 \pm 9,5$ na $81,7 \pm 6,9$ ($Z = -1,997$; $P = 0,046$) po 6, ter iz $50,0 \pm 7,3$ na $82,8 \pm 6,4$ ($Z = -2,207$; $P = 0,027$) po 12 urah, z izjemo časovnega obdobja 24 ur ($Z = -0,943$; $P = 0,345$), kjer statistično značilnega porasta odstotka gibljivih semenčic nismo ugotovili. Prav tako smo ugotovili tudi statistično značilen porast odstotka semenčic z boljšo preživitveno sposobnostjo glede na kontrolne vzorce, in sicer v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo iz $62,0 \pm 22,9$ na $92,9 \pm 8,2$ po 0, iz $48,1 \pm 22,8$ na $83,5 \pm 8,2$ po 12, iz $41,7 \pm 24,0$ na $77,0 \pm 10,4$ ($Z = -5,232$; $P = 0,000$) po 24 ter iz $54,5 \pm 22,2$ na $87,7 \pm 6,6$ ($Z = -5,233$; $P = 0,000$) po 6 urah ter v nadmodkovem semenu iz $78,5 \pm 6,0$ na $97,2 \pm 3,7$ ($Z = -2,207$; $P = 0,027$) po 0, iz $70,0 \pm 5,2$ na $90,0 \pm 4,1$ po 6, iz $65,3 \pm 6,2$ na $89,3 \pm 3,8$ po 12 urah ter iz $59,5 \pm 8,3$ na $85,7 \pm 5,1$ ($Z = -2,201$; $P = 0,028$) po 24 urah.

Tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 85,689$; $P = 0,000$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 97,279$; $P = 0,000$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, do statistično značilnega znižanja odstotka gibljivih semenčic. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilno znižanje povprečnega odstotka gibljivih semenčic znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 16,200$; $P < 0,05$), razen v časovnem obdobju 6 in 12 ur ($Z = -0,314$; $P = 0,753$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 15,800$; $P < 0,05$), z izjemo časovnega obdobja 12 in 24 ur ($Z = -1,892$; $P = 0,058$).

Statistično značilen padec preživitvene sposobnosti semenčic v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, smo ugotovili tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 86,475$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 86,693$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilen padec preživitvene sposobnosti semenčic znotraj preiskovanih vzorcev semena ($\chi^2 = 9,508$; $P < 0,05$), razen časovnih časovnih obdobj 6 in 12 ur ($Z = -0,315$; $P = 0,752$) ter 6 in 24 ur ($Z = -0,943$; $P = 0,345$).

ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 15,610$; $P < 0,05$), z izjemo časovnih obdobjih 6 in 12 ur ($Z = -1,633$; $P = 0,102$) ter 12 in 24 ur ($Z = -1,782$; $P = 0,075$).



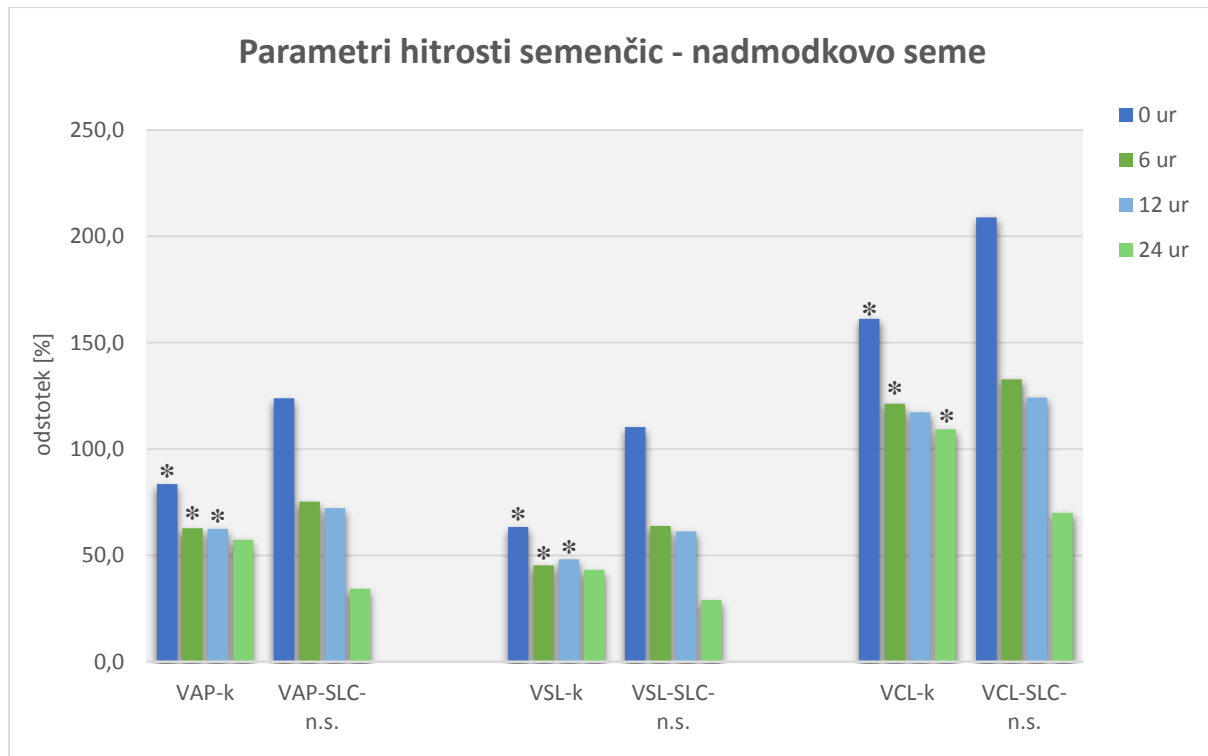
Slika 24: Primerjava povprečne hitrosti semenčic med kontrolnimi ($n = 36$) in preiskovanimi ($n = 36$) vzorci semena – ejakulat v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 24: Comparison of the average speed of spermatozoa between control ($n = 36$) and examined ($n = 36$) samples of semen – ejaculate in four time periods after thawing.

Legenda: VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, k – kontrola, SLC – enoslojno centrifugiranje, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, k – control, SLC – single layer centrifugation, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,05$



Slika 25: Primerjava povprečne hitrosti semenčic med kontrolnimi (n = 36) in preiskovanimi (n = 36) vzorci semena – nadmodkovo seme v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 25: Comparison of the average speed of spermatozoa between control (n = 36) and examined (n = 36) samples of semen – epididymal semen in four time periods after thawing.

Legenda: VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, k – kontrola, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, k – control, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,05$

Iz slike 24 in 25 lahko razberemo, da smo v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, ugotovili statistično značilno večjo hitrost semenčic v preiskovani skupini po SLC postopku glede na kontrolno skupino vzorcev semena v primeru povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP) pri vzorcih po 0- in 12-urni ($P < 0,05$) inkubaciji na 37 °C. Po 6 urah ($P = 0,768$) statistično značilno večje hitrosti semenčic nismo dokazali. Po 24 urah ($P = 0,037$) pa je bila hitrost semenčic v preiskovani skupini statistično značilno nižja glede na kontrolne vzorce semena. V nadmodkovem semenu smo statistično značilno večjo hitrost semenčic v preiskovani skupini glede na kontrolno skupino vzorcev semena ugotovili v primeru povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP) pri vzorcih po 0-, 6- in 12-urni ($P < 0,05$) inkubaciji na 37 °C. Po 24 urah ($P = 0,074$) pa statistično značilno večje hitrosti semenčic nismo dokazali.

V semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo smo ugotovili statistično značilno večjo hitrost krivulje gibanja semenčic (VCL) v preiskovani skupini, glede na kontrolno skupino vzorcev semena le pri vzorcih v časovnem obdobju 0 ur ($P = 0,019$). V časovnih obdobjih 6, 12, in 24 ur ($P < 0,05$) po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa je bila hitrost krivulje gibanja semenčic večja v kontrolnih vzorcih. V nadmodkovem semenu smo ugotovili statistično značilno večjo hitrost krivulje gibanja semenčic glede na kontrolno skupino vzorcev semena po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri vzorcih v časovnem obdobju 0 in 6 ur ($P < 0,05$). V časovnem obdobju 12 ur ($P = 0,248$) hitrost krivulje gibanja semenčic ni bila statistično značilno večja. V časovnem obdobju 24 ur ($P = 0,043$) pa je bila hitrost krivulje gibanja semenčic večja v kontrolnih vzorcih.

V semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, smo ugotovili statistično značilno večjo hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL) v preiskovani skupini glede na kontrolno skupino vzorcev semena po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v časovnih obdobjih 0, 6, in 12 ($P \leq 0,001$) ur. V časovnem obdobju 24 ur ($P = 0,724$) pa hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke ni bila statistično značilno večja. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilno večjo hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v časovnih obdobjih 0, 6, in 12 ($P < 0,05$) ur. V časovnem obdobju 24 ur ($P = 0,173$) pa hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke zopet ni bila statistično značilno večja.

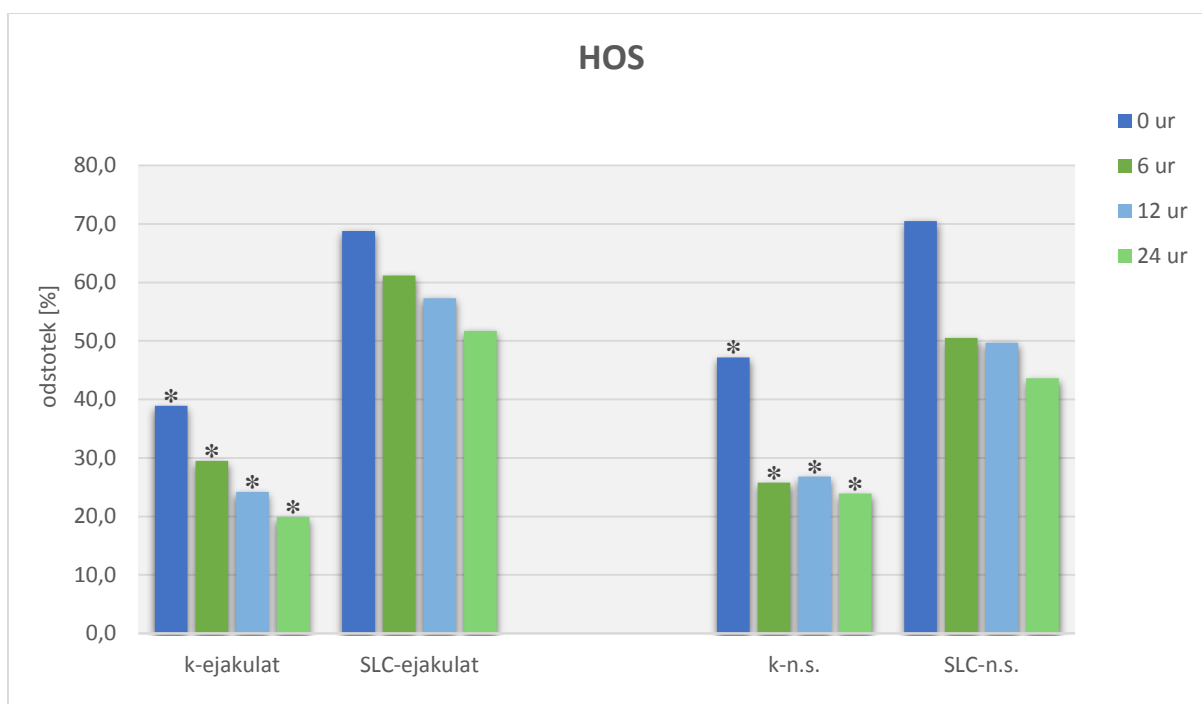
Tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 85,408$; $P = 0,000$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 75,531$; $P = 0,000$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v štirih časovnih obdobjih meritev v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, do statistično značilnega zmanjšanja povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP). V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilno zmanjšanje povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 15,000$; $P < 0,05$), razen v časovnem obdobju 6 in 12 ur ($Z = -0,736$; $P = 0,462$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 13,200$; $P < 0,05$) z izjemo časovnih obdobjih 6 in 12 ur ($Z = -0,105$; $P = 0,916$), 6 in 24 ur ($Z = -1,782$; $P = 0,075$) ter 12 in 24 ur ($Z = -1,572$; $P = 0,116$).

Statistično značilno zmanjšanje hitrosti krivulje gibanja semenčic (VCL) v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, smo ugotovili tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 89,101$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 66,911$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilno zmanjšanje hitrosti krivulje gibanja semenčic znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 16,400$; $P < 0,05$), razen v časovnem obdobju 6 in 12 ur ($Z = -1,572$; $P = 0,116$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 12,600$; $P < 0,05$) z izjemo časovnih obdobj 6 in 12 ur ($Z = -1,156$; $P = 0,248$), 6 in 24 ur ($Z = -1,577$; $P = 0,115$) ter 12 in 24 ur ($Z = -1,572$; $P = 0,116$).

Statistično značilno zmanjšanje hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL) v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, smo ugotovili tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 77,397$; $P \leq 0,001$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 71,275$; $P < 0,05$) v vseh časovnih obdobjih meritev. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilno zmanjšanje hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 15,000$; $P < 0,05$), razen v časovnem obdobju 6 in 12 ur ($Z = -0,949$; $P = 0,343$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 12,600$; $P < 0,05$) z izjemo časovnih obdobj 6 in 12 ur ($Z = -1,581$; $P = 0,114$), 6 in 24 ur ($Z = -0,734$; $P = 0,463$) ter 12 in 24 ur ($Z = -1,687$; $P = 0,092$).

4.4.2 Hipoozmotski test semenčic

Na sliki 26 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik med hipoozmotsko pozitivno reagiranimi semenčicami v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih semenčicah in semenčicah po SLC postopku v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in v nadmodkovem semenu.



Slika 26: Prikaz razlik v povprečnem odstotku hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci v ejakulatu ($n = 36$) ter nadmodkovem semenu ($n = 6$) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 26: Differences in the average percentage of positive hypoosmotic reacted spermatozoa between the control and examined samples of ejaculate ($n = 36$) and epididymal semen ($n = 6$) in four time periods after thawing.

Legenda: HOS – odstotek hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic, k – kontrola, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: HOS – percentage of hypoosmotic swelling positive reacted spermatozoa, k – control, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

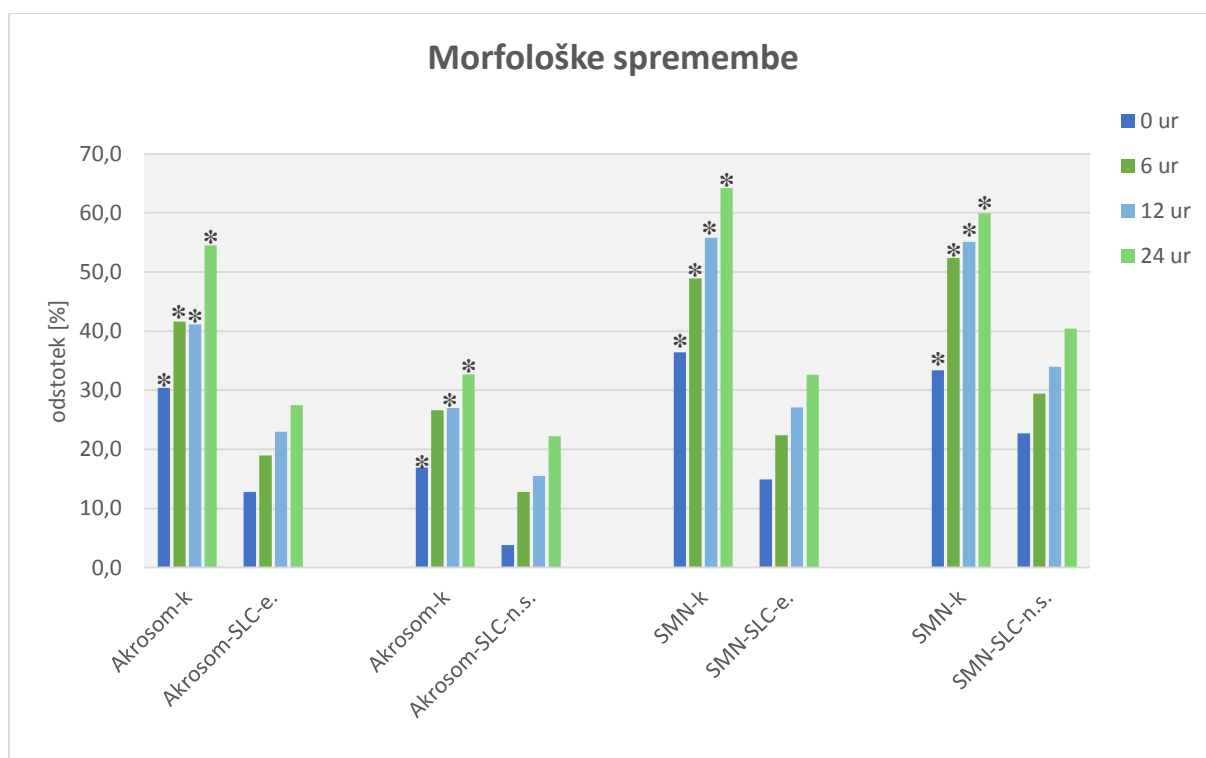
*: $P < 0,05$

Iz slike 26 lahko razberemo, da je prišlo glede na kontrolne vzorce semena po SLC postopku v povprečju do statistično značilnega porasta odstotka hipoozmotsko pozitivnih semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $38,9 \pm 10,6$ na $68,8 \pm 9,5$ po 0, iz $29,5 \pm 6,6$ na $61,2 \pm 8,2$ po 6, iz $24,2 \pm 7,6$ na $57,3 \pm 9,3$ po 12 ter iz $19,9 \pm 5,2$ na $51,7 \pm 8,8$ po 24 urah ($Z = -5,232$; $P = 0,000$) ter v nadmodkovem semenu iz $47,2 \pm 8,1$ na $70,5 \pm 10,2$ po 0, iz $25,8 \pm 3,1$ na $50,5 \pm 8,7$ po 6 ter iz $26,8 \pm 7,1$ na $49,7 \pm 5,7$ po 12 ter iz $23,9 \pm 6,6$ na $43,6 \pm 8,8$ ($Z = -2,201$; $P = 0,028$) po 24 urah.

Tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 65,507$; $P < 0,05$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 76,014$; $P = 0,000$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C v štirih časovnih obdobjih meritev v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, do statistično značilnega zmanjšanja odstotka hipoozmotsko pozitivnih semenčic. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilno zmanjšanje odstotka hipoozmotsko pozitivnih semenčic znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 11,121$; $P < 0,05$), z izjemo časovnih obdobj 6 in 12 ur ($Z = -0,105$; $P = 0,916$), 6 in 24 ur ($Z = -1,363$; $P = 0,173$) ter 12 in 24 ur ($Z = -1,214$; $P = 0,225$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 11,400$; $P = 0,028$) z izjemo časovnih obdobj 6 in 12 ur ($Z = -0,105$; $P = 0,917$), 6 in 24 ur ($Z = -0,524$; $P = 0,600$) ter 12 in 24 ur ($Z = -1,153$; $P = 0,249$).

4.4.3 Morfološke spremembe semenčic

Na sliki 27 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik morfoloških sprememb na akrosomu ter skupnih morfoloških sprememb semenčic v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju, pri kontrolnih semenčicah in semenčicah po SLC postopku v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in v nadmodkovem semenu.



Slika 27: Morfološke spremembe semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih v ejakulatu (n = 36) ter nadmodkovem semenu (n = 6) v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 27: The abnormal spermatozoa morphology of control and examined samples of ejaculate (n = 36) and epididymal semen (n = 6) in four time periods after thawing.

Legenda: SMN – skupne morfološke napake, k – kontrola, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, e. – ejakulat, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: SMN – morphological abnormal spermatozoa, K – control, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, e. – ejaculate, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: P < 0,05

Iz slike 27 lahko razberemo, da se je pri semenu, pri katerem smo izvedli SLC postopek, v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena, statistično značilno znižal odstotek morfoloških sprememb akrosoma semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $30,4 \pm 13,1$ na $12,8$

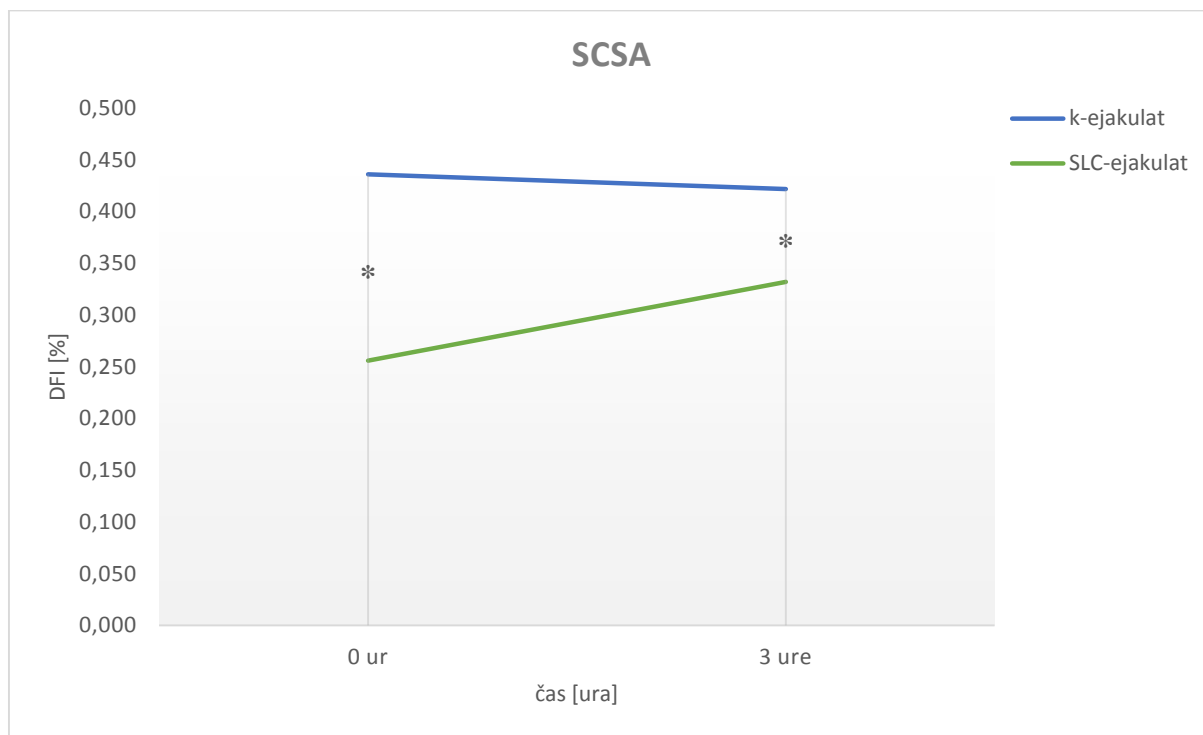
$\pm 7,3$ ($Z = -5,185$; $P = 0,000$) po 0, iz $41,6 \pm 13,8$ na $19,0 \pm 8,9$ po 6, iz $54,5 \pm 10,3$ na $27,5 \pm 8,1$ ($Z = -5,232$; $P = 0,000$) po 24 ter iz $47,1 \pm 12,4$ na $23,0 \pm 9,5$ ($Z = -5,200$; $P = 0,000$) po 12 urah ter v nadmodkovem semenu iz $16,9 \pm 3,2$ na $3,8 \pm 2,0$ po 0, iz $27,0 \pm 7,3$ na $15,5 \pm 3,1$ po 12, iz $32,7 \pm 5,4$ na $22,2 \pm 5,2$ ($Z = -2,201$; $P = 0,028$) po 24 ter iz $26,6 \pm 9,6$ na $12,8 \pm 5,0$ po 6 ($Z = -1,782$; $P = 0,075$) urah. Odstotek morfoloških sprememb akrosoma semenčic pri semenu, pri katerem smo izvedli SLC postopek, v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena po 6- urah, predstavlja mejni primer, kjer so razlike v povprečju in mediani zelo velike, vendar niso statistično značilne pri 5-odstotni stopnji značilnosti ($P = 0,1$). Odstotek skupnih morfoloških sprememb semenčic se je prav tako statistično značilno znižal v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $36,4 \pm 13,0$ na $14,9 \pm 6,7$ po 0, iz $48,9 \pm 12,1$ na $22,4 \pm 9,3$ po 6, iz $55,8 \pm 12,0$ na $27,1 \pm 8,7$ po 12 ter iz $64,2 \pm 8,5$ na $32,6 \pm 7,6$ ($Z = -5,232$; $P = 0,000$) po 24 urah ter v nadmodkovem semenu iz $33,4 \pm 3,6$ na $22,7 \pm 5,3$ po 0, iz $52,4 \pm 7,0$ na $29,4 \pm 10,0$ po 6, iz $55,1 \pm 6,9$ na $34,0 \pm 5,4$ po 12 ter iz $59,9 \pm 8,9$ na $40,4 \pm 8,4$ ($Z = -2,201$; $P = 0,028$) po 24 urah.

Tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 67,099$; $p < 0,05$) kot znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 76,047$; $p \leq 0,001$) je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na 37°C v štirih časovnih obdobjih meritev v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, do statistično značilnega porasta odstotka semenčic z morfološkimi spremembami akrosoma. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilen porast odstotka semenčic z morfološkimi spremembami akrosoma znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 14,172$; $P < 0,05$), razen v časovnih obdobjih 6 in 12 ur ($Z = -1,153$; $P = 0,249$) ter 12 in 24 ur ($Z = -1,753$; $P = 0,080$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 9,800$; $P < 0,05$) z izjemo časovnih obdobjih 6 in 12 ur ($Z = -0,314$; $P = 0,753$) ter 6 in 24 ur in 12 in 24 ur ($Z = -1,153$; $P = 0,249$).

Statistično značilen porast odstotka skupnih morfoloških sprememb semenčic v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, smo ugotovili tako znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 77,700$; $P = 0,000$) kot tudi znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 79,538$; $P = 0,000$) v vseh časovnih obdobjih meritev. V nadmodkovem semenu smo prav tako ugotovili statistično značilen porast odstotka skupnih morfoloških sprememb semenčic znotraj preiskovanih ($\chi^2 = 11,000$; $P < 0,05$), razen v časovnih obdobjih 0 in 6 ur ($Z = -1,572$; $P = 0,116$), 6 in 12 ur ($Z = -1,261$; $P = 0,207$), ter 12 in 24 ur ($Z = -1,363$; $P = 0,173$) ter znotraj kontrolnih vzorcev semena ($\chi^2 = 11,000$; $P = 0,028$) z izjemo časovnih obdobjih 6 in 12 ur, 6 in 24 ur ($Z = -0,943$; $P = 0,345$) ter 12 in 24 ur ($Z = -0,734$; $P = 0,463$).

4.4.4 SCSA™ (*sperm chromatin structure assay*) test

Na sliki 28 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik med semenčicami s fragmentirano DNK v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju pri kontrolnih semenčicah in semenčicah po SLC postopku v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo.



Slika 28: Prikaz razlik v povprečnem odstotku fragmentirane DNK semenčic v kontrolnih (n = 30) in preiskovanih vzorcih v ejakulatu (n = 30) v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Figure 28: Differences in the average percentage of DNA fragmented spermatozoa in the control (n = 30) and examined samples of ejaculate (n = 30) in two different time periods after thawing.

Legenda: SCSA – *sperm chromatin structure assay*, DFI (%) – odstotek fragmentirane DNK semenčic, SLC – enoslojno centrifugiranje, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: SCSA – *sperm chromatin structure assay*, DFI (%) – percentage of spermatozoa DNA fragmentation, SLC – single layer centrifugation, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

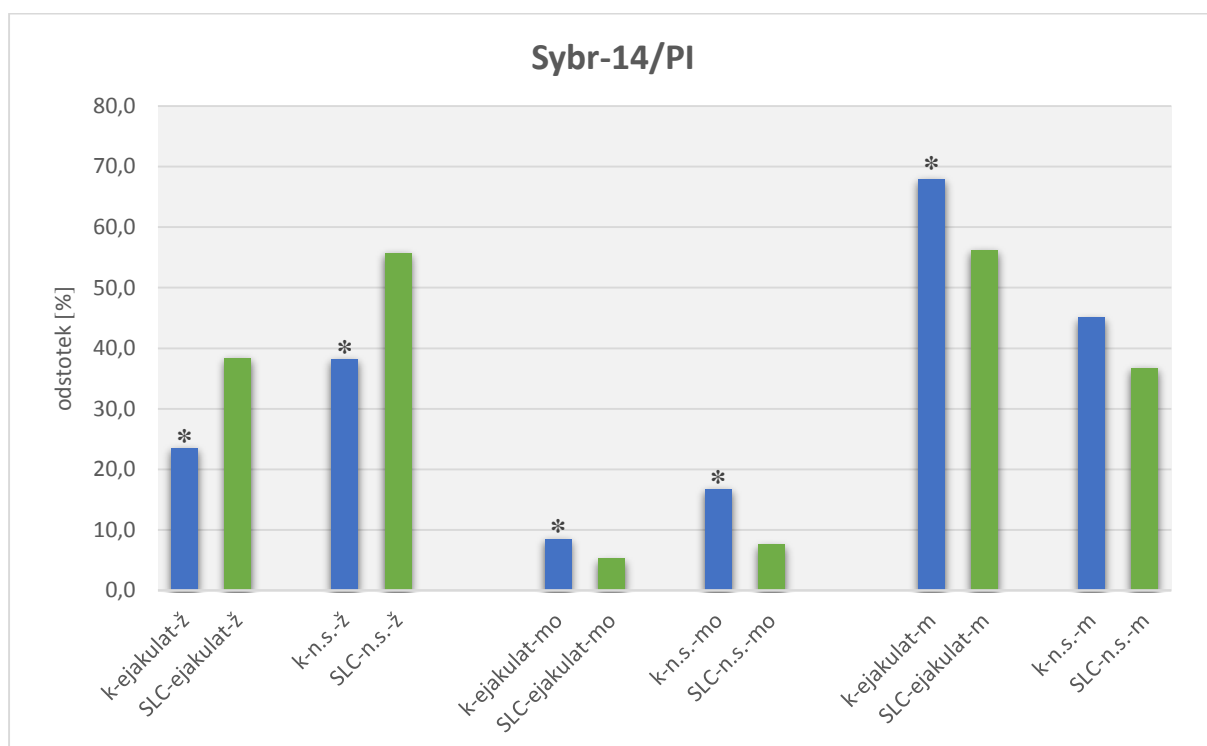
*: P < 0,05

Iz slike 28 lahko razberemo, da se je pri semenu, kjer smo izvedli SLC postopek v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena statistično značilno znižal odstotek semenčic s fragmentirano DNK po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $0,4358 \pm 0,1852$ na $0,2560 \pm 0,1483$ ($Z = -4,145$; $P = 0,000$) po 0 ter iz $0,4215 \pm 0,0966$ na $0,3320 \pm 0,1699$ ($Z = -2,705$; $P = 0,007$) po 3 urah.

Znotraj preiskovanih ($Z = -3,066$; $P = 0,002$) vzorcev semena je prišlo po odmrzovanju ter inkubaciji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ med dvema časovnima skupinama v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, do statistično značilnega porasta odstotka semenčic s fragmentirano DNK, z izjemo kontrolnih ($Z = -0,123$; $P = 0,902$) vzorcev semena, znotraj katerih statistično značilnega porasta odstotka semenčic s fragmentirano DNK med časovnima skupinama nismo ugotovili.

4.4.5 SYBR-14/PI/PNA test

Na sliki 29 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik v odstotku živih, morbidnih in mrtvih semenčic po odmrzovanju pri kontrolnih semenčicah in semenčicah po SLC postopku v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in v nadmodkovem semenu.



Slika 29: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi, morbidnimi in mrtvimi semenčicami v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu ($n = 30$) in nadmodkovem semenu ($n = 6$) po odmrzovanju.

Figure 29: Differences in the average percentage among the living, moribund and dead spermatozoa in the control and examined samples of semen in ejaculate ($n = 30$) and epididymal semen ($n = 6$) after thawing.

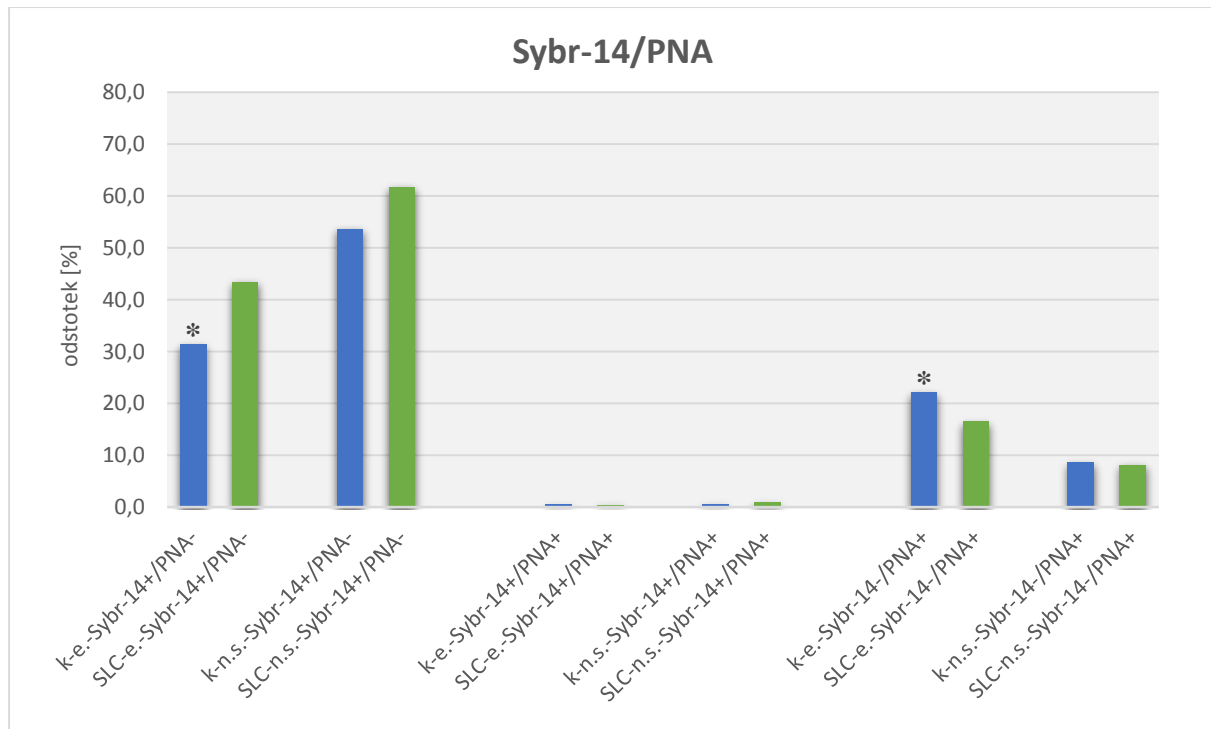
Legenda: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, k – kontrola, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, ž – žive, mo – morbidne, m – mrtve semenčice, * - statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, k – control, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, ž – live, mo – moribund, m – dead spermatozoa, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: $P < 0,05$

Iz slike 29 lahko razberemo, da je prišlo glede na kontrolne vzorce semena po SLC postopku v povprečju do statistično značilnega porasta odstotka živih semenčic takoj po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $23,5 \pm 12,4$ na $38,4 \pm 12,7$ ($Z = -4,433$; $P = 0,000$) ter v nadmodkovem semenu iz $38,2 \pm 7,8$ na $55,7 \pm 12,7$ ($Z = -1,992$; $P = 0,046$). Ugotovimo tudi, da se je v primerjavi s kontrolnimi vzorci statistično značilno znižal odstotek morbidnih semenčic med preiskovanimi vzorci po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $8,5 \pm 4,5$ na $5,3 \pm 1,7$ ($Z = -2,972$; $P = 0,003$) ter v nadmodkovem semenu iz $16,7 \pm 6,1$ na $7,6 \pm 2,8$ ($Z = -2,201$; $P = 0,028$). Pri preiskovanih vzorcih se je takoj po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C statistično značilno znižal odstotek mrtvih semenčic v primerjavi s kontrolnimi vzorci v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $68,0 \pm 15,0$ na $56,2 \pm 12,3$ ($Z = -3,630$; $P = 0,000$). V nadmodkovem semenu se je odstotek mrtvih semenčic v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena sicer znižal iz $45,1 \pm 9,5$ na $36,7 \pm 15,1$ ($Z = -1,782$; $P = 0,075$), vendar predstavlja mejni primer, kjer so razlike v povprečju in mediani zelo velike, vendar niso statistično značilne pri 5–odstotni stopnji značilnosti ($P = 0,1$).

Na sliki 30 so prikazani povprečni odstotki in statistična značilnost razlik v odstotku živih semenčic z nepoškodovanimi akrosomi (Sybr-14+/PNA-) živih semenčic, pri katerih je prišlo do akrosomske reakcije (Sybr-14+/PNA+), ter mrtvih semenčic (Sybr-14-/PNA+) s poškodovanjo zunanjo akrosomalno membrano po odmrzovanju pri kontrolnih semenčicah in semenčicah po SLC postopku v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in v nadmodkovem semenu.



Slika 30: Prikaz razlik v povprečnem odstotku med živimi (Sybr-14+/PNA-), živimi (Sybr-14+/PNA+) in mrtvimi semenčicami (Sybr-14-/PNA+) v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu (n = 30) in nadmodkovem semenu (n = 6) po odmrzovanju.

Figure 30: Differences in the average percentage among the living (Sybr-14+/PNA-), living (Sybr-14+/PNA+) and dead (Sybr-14-/PNA+) spermatozoa in the control and examined samples of semen in ejaculate (n = 30) and epididymal semen (n = 6) after thawing.

Legenda: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Sybr-14+/PNA – žive semenčice z nepoškodovanimi akrosomi, Sybr-14+/PNA+ – žive semenčice pri katerih je prišlo do akrosomske reakcije, Sybr-14-/PNA+ – mrtve semenčice s poškodovano zunanjo akrosomalno membrano, PNA – peanut agglutinin, k – kontrola, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, ž – žive, mo – morbidne, m – mrtve semenčice, * – statistično značilne razlike med kontrolnimi in preiskovanimi vzorci znotraj časovnih skupin.

Legend: Sybr-14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Sybr-14+/PNA – live spermatozoa with intact acrosome, Sybr-14+/PNA+ – live spermatozoa with reacted acrosome, Sybr-14-/PNA+ – dead spermatozoa with damaged acrosome external membrane, PNA – peanut agglutinin, k – control, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, ž – live, mo – moribund, m – dead spermatozoa, * – statistically significant differences between the control and examined samples within the time groups.

*: P < 0,05

Iz slike 30 lahko razberemo, da je prišlo glede na kontrolne vzorce semena po SLC postopku v povprečju do statistično značilnega porasta odstotka živih semenčic z nepoškodovanimi akrosomi (Sybr-14+/PNA-) takoj po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, in sicer iz $31,4 \pm 14,9$ na $43,4 \pm 12,4$ ($Z = -3,713$; $P = 0,000$). V nadmodkovem semenu se je odstotek živih semenčic z nepoškodovanimi akrosomi v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena sicer zvišal iz $53,6 \pm 8,5$ na $61,7 \pm 14,6$ ($Z = -1,782$; $P = 0,075$), vendar predstavlja mejni primer, kjer so razlike v povprečju in mediani zelo velike,

vendar niso statistično značilne pri 5–odstotni stopnji značilnosti ($P = 0,1$). Ugotovimo tudi, da se odstotek živih semenčic, pri katerih je prišlo do akrosomske reakcije (Sybr-14+/PNA+) v primerjavi s kontrolnimi vzorci, ni statistično značilno znižal med preiskovanimi vzorci po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C, in sicer se je odstotek v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, znižal iz $0,5 \pm 0,3$ na $0,4 \pm 0,4$ ($Z = -1,667$; $P = 0,095$) ter v nadmodkovem semenu zvišal iz $0,6 \pm 0,3$ na $0,9 \pm 0,6$ ($Z = -1,363$; $P = 0,173$). Pri preiskovanih vzorcih se je takoj po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C statistično značilno znižal odstotek mrtvih semenčic s poškodovano zunanjo akrosomalno membrano (Sybr-14-/PNA+) v primerjavi s kontrolnimi vzorci, in sicer le v semenu, pridobljenem z elektroejakulacijo, iz $22,1 \pm 8,8$ na $16,5 \pm 8,1$ ($Z = -2,931$; $P = 0,003$). V nadmodkovem semenu so se vrednosti sicer znižale iz $8,6 \pm 1,3$ na $8,1 \pm 4,4$ po ($Z = -0,524$; $P = 0,600$), vendar pa statistično značilnega znižanja odstotka mrtvih semenčic s poškodovano zunanjo akrosomalno membrano nismo ugotovili.

5 RAZPRAVA

Zelo nizka stopnja brejosti ovac po klasičnem umetnem osemenjevanju v maternični vrat z zamrznjenim/odmrznjenim ovnovim semenom (259, 262) je eden od razlogov, da umetna osemenitev v ovčjereji ni pogosteje zastopana. Zamrzovanje ovnovega semena lahko vpliva na zmanjšanje gibljivosti semenčic in povzroči motnje v integriteti plazma membrane semenčic. Akrosomalna in plazma membrana semenčic predstavljata primarni mesti, ki sta med postopkom zamrzovanja izpostavljeni temperaturnim, mehničnim, kemičnim in ozmotskim vplivom (124, 138) ter sta bistveni za preživetje semenčic. Spremembe, ki nastanejo med postopkom ohlajanja, zamrzovanja in tajanja imajo škodljiv vpliv na funkcije semenčic in so povezane z izgubo oploditvene sposobnosti (138). Z razvojem novih postopkov za pripravo semena za umetno osemenjevanje ovac, s katerimi se poskuša doseči višjo kakovost semenčic, bi lahko izboljšali tudi stopnjo koncepcije (259).

V prvem poskusu smo ugotavljali vpliv dodanega detergenta Equex STM® na kvaliteto globoko zamrznjenega/odmrznjenega ovnovega semena. Ugotovili smo, da je imela vključitev detergenta v razredčevalec z dodatkom jajčnega rumenjaka ugoden učinek na kakovost zamrznjenega/odmrznjenega ovnovega semena. Izboljšala se je skupna gibljivost semenčic, integriteta plazma membrane in preživitvena sposobnost semenčic po tajanju. Prav tako smo v raziskavi ugotovili statistično značilno višjo hitrost semenčic v skupini z vključenim detergentom Equex STM® glede na kontrolno skupino vzorcev semena, v primeru povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP), hitrosti krivulje gibanja semenčic (VCL) in hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL) v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C. V naši raziskavi smo v skupini z vključenim detergentom Equex STM® ugotovili tudi nižji odstotek morfoloških sprememb akrosoma ter skupnih morfoloških sprememb semenčic v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C.

Rezultati naše raziskave kažejo, da vključitev detergenta Equex STM® v razredčevalec za zamrzovanje ovnovega semena zaščiti semenčice med postopkom zamrzovanja in tajanja. Podobne rezultate je potrdil Akourki s sod. (263). V primerjavi z rezultati Akourki in sod. je bila v naši raziskavi začetna gibljivost semenčic po odmrzovanju višja, v skupini z dodanim

detergentom (263). Prav tako je analiza po odmrzovanju in inkubaciji na 37 ° C po 24 urah, pokazala ugoden učinek detergenta Equex STM® na gibljivost, preživitveno sposobnost, HOST in integriteto plazma membrane semenčic. Za ocenjevanje kakovosti semena ter ugotavljanje plodnosti pri živalih in človeku se uporablja test SCSA, ki določa stopnjo integritete DNK semenčic. Podatki na več tisoč vzorcih semena bikov, žrebcev in merjascev kažejo klinično vrednost SCSA testa za ocenjevanje plodnosti pri živalih (264, 265, 266). SCSA test se izvaja s pomočjo pretočne citometrije, pri čemer lahko uporabljamo sveže ali zamrznjeno/odmrznjeno seme. S testom SCSA se v nekaj minutah analizira podatke na 5000 ali več celicah ter se oceni kakovost semena in dodatno določi razmerje med kakovostjo in oploditveno sposobnostjo semena (261). SCSA™ test se uporablja za preučevanje strukture kromatina semenčic, ki temelji na metakromatičnih lastnostih barvila akridin oranž, ki v primeru denaturirane DNK semenčic fluorescira rdeče, v primeru intaktne DNK pa fluorescira zeleno (267).

Nekatere do sedaj opravljene raziskave so pokazale negativno korelacijo med deležem semenčic z denaturirano DNK in oploditveno sposobnostjo semenčic (264, 268). V nasprotju z Bucak in sod. (88) v naši raziskavi nismo ugotovili vpliva detergenta Equex STM® na integriteto DNK, saj se DFI v skupini z dodanim detergentom in kontrolno skupino ni statistično značilno razlikoval. Rezultati, ki prikazujejo stopnjo denaturacije DNK v obliki DFI, so bili v primerjavi z Bucak in sod. (88) v naši raziskavi nižji. Peris s sod. je z raziskavo ugotovil, da zamrzovanje semenčic nima vpliva oz. ima majhen vpliv na denaturacijo DNK ovnovih semenčic *in situ* izmerjeno takoj po tajanju ali po treh urah inkubacije, toda izrazite DNK poškodbe nastanejo kasneje, v fizioloških pogojih (8). Rezultati, ki prikazujejo stopnjo integritete DNK, in rezultati drugih semenskih parametrov, kot so gibljivost, preživitvena sposobnost, integriteta akrosoma, odstotek SMN, PMI in HOST kažejo, da tudi standardni protokol zamrzovanja, ki smo ga uporabili v naši raziskavi omogoča visoko kvalitetno zamrzovanje ovnovih semenčic ter da detergent Equex STM® dodatno izboljša kvaliteto zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic.

Ti rezultati kažejo, da bi lahko imele semenčice, zamrznjene v prisotnosti detergenta Equex STM®, tudi boljšo oploditveno sposobnost v primerjavi z vzorci, ki so zamrznjeni brez dodanega detergenta. Pursel in sod. so ugotovili pozitivno korelacijo med odstotkom gibljivih semenčic po odtajanju in njihovo oploditveno sposobnostjo (219). Intravaginalna osemenitev

psice z zamrznjenim pasjim semenom, z dodanim detergentom Equex STM[®], je pokazala podobno stopnjo brejosti kot po naravni paritvi (216). Vključitev detergenta Equex STM[®] v razredčevalca za zamrzovanje je imela pozitiven učinek na gibljivost in PMI takoj po zamrzovanju in tajanju pri različnih vrstah (213, 214, 219, 220).

Aktivna spojina v detergentu Equex STM[®] je natrijev dodecil sulfat (SDS), v vodi topen anionski detergent, ki raztaplja aktivne molekule, vendar ima toksični učinek na membrano semenčic (213, 219, 269). Menijo, da je vloga detergenta modifikacija lipoproteinov jajčnega rumenjaka, kar povzroči izboljšanje prepustnosti membrane semenčic in zmanjšanje ozmotskega stresa med postopkom zamrzovanja in odmrzovanja (213, 219). Equex STM[®] izboljša preživitveno sposobnost semenčic po tajanju tako, da učinkuje kot surfaktant, ki stabilizira plazma membrano, predvsem akrosomalno membrano in zaščiti semenčice pred toksičnim delovanjem glicerola med postopkom zamrzovanja in odmrzovanja (213, 214). Krioprotektivni učinek detergenta Equex STM[®] je opazen le v prisotnosti jajčnega rumenjaka (213, 217). Večja stabilnost integritete plazma membrane semenčic ob uporabi TRIS razredčevalca z dodatkom jajčnega rumenjaka in detergenta Equex STM[®] se je pokazala tudi v naši raziskavi. Vendar smo v naši raziskavi ugotovili nekoliko višji odstotek morbidnih semenčic v skupini z vključenim detergentom. Dolga izpostavljenost semenčic razredčevalcu za zamrzovanje, v katerega je vključen detergent Equex STM[®], ima lahko negativen vpliv na membrano in preživitveno sposobnost semenčic zaradi toksičnega delovanja detergenta (218). V *in vivo* pogojih so okoliščine nekoliko drugačne, saj se semenčice v razredčevalcu z dodanim detergentom Equex STM[®] ob umetni osemenitvi pomešajo s tekočino v maternici ter je toksičen vpliv detergenta na semenčice manj izražen (218). Pozitivni učinek detergenta Equex STM[®] na kakovost semenčic po tajanju so ugotovili v več raziskavah pri različnih živalskih vrstah, kot so pes (215, 216, 217), bik (213, 270), merjasec (219, 271, 272, 273), žrebec (214) in mačka (274). Ponglowhapan in Chatdarong sta ugotovila, da ima dodatek detergenta Equex STM[®] v razredčevalcu za zamrzovanje semenčic iz nadmodka psa pozitiven vpliv na preživitveno sposobnost semenčic in zaščito membrane akrosoma, vendar pa nima vpliva na gibljivost semenčic in PMI (215). To je v nasprotju s predhodnimi raziskavami na ejakulatih psa, kjer so ugotovili pozitiven vpliv detergenta takoj po tajanju na PMI (216) in gibljivost semenčic (275).

V predhodnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da se optimalna koncentracija detergenta v razredčevalcu za zamrzovanje semena giblje med 0,5 in 1 % za razredčevalec, ki vsebuje 20 % jajčnega rumenjaka (219). Višje koncentracije detergenta Equex STM® so imele škodljiv vpliv na stabilnost membrane semenčic in njihovo kakovost (213). Axner s sod. je ugotovil, da vključitev detergenta Equex STM® v razredčevalec za zamrzovanje zmanjša poškodbe akrosoma, vendar skrajša preživitveno sposobnost semenčic po tajanju med *in vitro* inkubacijo mačjih semenčic, pridobljenih iz nadmodka (218). Ti rezultati pa so v nasprotju s poskusi na drugih živalskih vrstah, kot so bik (213), pes (216) in oven (263), kjer so ugotovili izboljšanje preživitvene sposobnosti semenčic. Pozitiven učinek detergenta Equex STM® na gibljivost, progresivno gibljivost, preživitveno sposobnost in integriteto akrosoma semenčic kozla je bil ugotovljen zlasti v prvih dveh urah po odtajanju. Daljša inkubacija kozlovih semenčic v detergentu pa je imela negativen vpliv na semenčice, kar je bilo potrjeno že po treh urah inkubacije na 37 °C (276). Detergent je imel pozitiven učinek tudi na gibljivost semenčic alpake po odtajanju, medtem ko je bila integriteta akrosoma nespremenjena (277). Podobne pozitivne vplive na gibljivost semenčic smo ugotovili tudi v naši raziskavi.

Tako smo potrdili, da ima dodatek detergenta Equex STM® v modificiran razredčevalec z jajčnim rumenjekom, pozitiven vpliv na kakovost ovnovih semenčic po odtajanju.

Enega izmed večjih problemov pri konzerviranju semena predstavljajo nenasičene maščobne kisline v membrani semenčic, ki so med postopkom konzerviranja podvržene oksidaciji. V naravnih mehanizmih za zaščito semenčic pred lipidno peroksidacijo sodelujejo različni antioksidanti in encimi, kot so SOD, katalaza, GPx, GR ipd. Ti antioksidanti so zelo pomembni za zaščito semenčic pri različnih živalskih vrstah (17, 18, 19, 20). Z dodajanjem različnih antioksidantov v razredčevalec se zmanjšata lipidna peroksidacija in oksidativni stres semenčic, ki se sprožita med postopkom zamrzovanja semena (179, 182, 278). Ovnov ejakulat vsebuje zaznavne količine SOD ter nekoliko nižje količine GPx in katalaze (17), vendar se koncentracija teh encimov zelo zmanjša ob razredčitvi semena.

V drugem poskusu smo ugotovitve iz prvega poskusa nadgradili ter v razredčevalec za zamrzovanje ovnovnega semena dodali antioksidanta natrijev piruvat ali katalazo ter kombinacijo obeh. Ugotavljali smo njun vpliv na gibljivost, preživitveno sposobnost, integriteto plazma membrane in integriteto DNK zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic.

Vloga natrijevega piruvata kot antioksidanta je v razgradnji H_2O_2 , pri čemer se ne sprošča kisik (279). Ob razgradnji vsakega mola H_2O_2 s pomočjo encimskega antioksidanta katalaze se sprostí pol mola kisika, zaradi česar je kot antioksidant primernejši natrijev piruvat, ki v razredčevalcu očisti sledi kisika (153). Pomanjkljivost piruvata je, da se med kemično razgradnjo H_2O_2 piruvat porablja, za razliko od katalaze, ki v reakciji razgradnje H_2O_2 deluje kot katalizator (153).

Dodatek različnih antioksidantov v razredčevalce za konzerviranje semena je imel pozitiven vpliv na preživitveno sposobnost semenčic pri številnih živalskih vrstah (164, 179, 192, 280, 281). Nasprotno kot pri ostalih živalskih vrstah pa dodatek različnih antioksidantov ovnovemu semenu pred zamrzovanjem v številnih primerih ni imel pozitivnega vpliva na kvaliteto odmrznjenega semena (153, 206, 207). Kljub temu pa so Stefanov in sodelavci ugotovili pozitiven vpliv dodanega antioksidanta na gibljivost ovnovih semenčic (282). Dosedanje raziskave pri različnih živalskih vrstah so pokazale pozitiven učinek natrijevega piruvata (141, 211) in katalaze (164, 192, 204) na gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic. Pozitiven učinek katalaze in natrijevega piruvata na progresivno gibljivost so ugotovili pri kozlovih semenčicah (283). V naši raziskavi vključitev natrijevega piruvata in katalaze v razredčevalec za zamrzovanje semena ni imela pozitivnega vpliva na gibljivost ovnovih semenčic po odmrzovanju. Dodatek katalaze v razredčevalec pred sortiranjem ovnovih semenčic ni imel pozitivnega učinka na kvaliteto semena po odtajanju, pri čemer so katalazo med postopkom sortiranja odstranili (205). Ravno tako katalaza ni imela učinka na semenčice v kemijsko definiranem razredčevalcu, v katerem so imele pozitiven učinek na semenčice že njegove lastne komponente (153, 206). Kljub temu pa so de Graaf in sodelavci v preliminarni raziskavi ugotovili pozitiven vpliv dodane katalaze visoko razredčenemu ovnovemu semenu (205). Pozitiven vpliv katalaze na gibljivost, integriteto akrosomov in preživetveno sposobnost ovnovih semenčic pa so ugotovili tudi v raziskavi, kjer so ovno seme tekoče konzervirali (193). V nekaterih raziskavah so ugotovili, da ima na ovnove semenčice pozitiven vpliv le natrijev piruvat (149, 153), medtem ko dodatek katalaze ni imel vpliva na analizirane parametre (201, 205, 206). Baumber s sod. prav tako ni ugotovil pozitivnega vpliva dodane katalaze (200 E/mL) v razredčevalec za zamrzovanje na kvaliteto žrebčevih semenčic po tajanju (284). V naši raziskavi z dodajanjem antioksidantov natrijevega

piruvata in katalaze v razredčevalcu za zamrzovanje semena prav tako nismo ugotovili statistično značilnega vpliva na preživitveno sposobnost odmrznjenih ovnovih semenčic. Njun vpliv smo ugotovili le v primeru 6-urne inkubacije semenčic po odtajanju v razredčevalcu z dodatkom natrijevega piruvata ($P = 0,008$), katalaze ($P = 0,011$) ter kombinacije obeh po 6 ($P = 0,003$) in 12 urah ($P = 0,011$).

Prav tako v raziskavi nismo ugotovili statistično značilnega vpliva antioksidantov na hitrosti semenčic v primerjavi s kontrolno skupino vzorcev semena, v štirih časovnih obdobjih meritev po odmrzovanju ter inkubaciji na 37 °C. Statistično značilno razliko smo ugotovili ob dodatku katalaze po 24-urni inkubaciji, v primeru povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic ($P = 0,021$), hitrosti krivulje gibanja semenčic ($P = 0,005$) in hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke ($P = 0,044$).

V skupini z vključenimi antioksidanti tudi nismo ugotovili nižjega odstotka morfoloških sprememb akrosoma ter SMN po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C v primerjavi s kontrolno skupino, razen po 24-urni inkubaciji ob dodatku natrijevega piruvata ($P = 0,019$), kjer smo potrdili statistično značilno nižji odstotek SMN. V primeru, ko smo v razredčevalcu za zamrzovanje semena vključili antioksidant katalazo, smo ugotovili nižji odstotek morfoloških sprememb akrosoma ter SMN semenčic v kontrolni skupini.

S testom SCSATM nismo ugotovili pozitivnega vpliva natrijevega piruvata in katalaze na integriteto DNK. Nasprotno smo v primeru inkubacije semenčic na 37 °C ugotovili nižje vrednosti DFI v kontrolni skupini kot v razredčevalcu z dodatkom kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($P = 0,011$) takoj po odtajanju ter po 3-urni inkubaciji z dodatkom natrijevega piruvata ($P = 0,005$) in kombinacije natrijevega piruvata in katalaze ($P = 0,007$). Nekatero do sedaj opravljene raziskave so pokazale negativno korelacijo med odstotkom semenčic z denaturirano DNK in oploditveno sposobnostjo semenčic (264, 268). V naši prvi raziskavi, v kateri smo primerjali razredčevalcu z dodanim detergentom Equex STM[®] na kvaliteto ovnovih semenčic po tajanju, prav tako nismo ugotovili vpliva detergenta na integriteto DNK, saj se DFI med preiskovano in kontrolno skupino ni statistično značilno razlikoval.

S preiskavo Sybr-14/PI prav tako nismo potrdili pozitivnega vpliva natrijevega piruvata in katalaze na integriteto plazma membrane semenčic. Nasprotno smo v naši raziskavi

ugotovili nekoliko višji odstotek morbidnih in mrtvih semenčic v skupini z dodatkom natrijevega piruvata ter kombinacije natrijevega piruvata in katalaze po odmrzovanju in inkubaciji na 37 °C. Pri določanju PMI s HOST pa smo ugotovili statistično značilno razliko med kontrolno skupino in skupino z dodatkom katalaze po 12 in 24 ($P < 0,001$) urah inkubacije. Čeprav po 0 ($P = 0,053$) in 6 ($P = 0,054$) urah statistično značilne razlike med kontrolno skupino in skupino z dodatkom katalaze nismo ugotovili, je bila vrednost P precej nizka, kar nakazuje na morebitno težnjo k pozitivnemu učinku katalaze na integriteto plazma membrane semenčic.

V primeru hitrosti semenčic ter HOST smo v raziskavi v določenih obdobjih meritev ugotovili pozitiven vpliv antioksidanta katalaze, vendar bodo za dokončno potrditev katalaze kot antioksidanta, ki ima pozitiven vpliv na kakovost zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, potrebne še dodatne raziskave. Čeprav z rezultati nismo v celoti ugotovili statistično značilnega vpliva antioksidantov natrijevega piruvata in katalaze, lahko zaključimo, da so bili vsi parametri v naši raziskavi, kot so gibljivost, preživitvena sposobnost, HOST, integriteta DNK, akrosoma in plazma membrane, v vseh skupinah, vključno s kontrolno skupino zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic zelo dobri. Iz teh ugotovitev in podatkov iz literature (216) je mogoče domnevati, da je vključitev detergenta Equex STM® v razredčevalec za zamrzovanje ovnovih semenčic odgovorna za visoko kakovost zamrznjenih/odmrznjenih semenčic v naši raziskavi, saj je njegova vključitev zagotovila zadostno zaščito semenčic pred zamrzovanjem, pri čemer dodatna vključitev antioksidantov ne predstavlja koristi. Glede na ugotovitve, da dodatna vključitev antioksidantov v razredčevalec za zamrzovanje ovnovih semenčic ni izboljšala kvalitete po tajanju, lahko zaključimo, da so za poškodbe semenčic, ki nastanejo med postopkom zamrzovanja poleg oksidativnega stresa odgovorni tudi drugi mehanizmi. Zamrzovanje in tajanje semenčic povzroča različne strukturne in funkcionalne spremembe semenčic. Ugotovljeno je bilo, da zaradi stresa semenčic med zamrzovanjem prihaja do prerazporeditve lipidov v plazma membrani humanih semenčic, zaradi česar nastanejo večje poškodbe semenčic, kot če so semenčice izpostavljene lipidni peroksidaciji (167). Membrana ovnovih semenčic ima večje molarno razmerje nenasičenih/nasičenih maščobnih kislin in manjše molarno razmerje holesterola/fosfolipidov, zaradi česar med postopkom zamrzovanja lahko prihaja do večjih poškodb (42, 43, 44). Poleg tega dodatek

antioksidantov v zunanji ali znotrajcelični prostor med postopkom zamrzovanja ovnovim semenčicam morebiti ne zagotovi zadostne zaščite pred oksidativnim stresom. Opraviti bi bilo potrebno dodatne raziskave z razredčevalcem za zamrzovanje ovnovih semenčic, kateremu bi dodali v maščobah topen antioksidant, ki bi se vključil v membrano semenčic in tako bolje zaščitil semenčice pred škodljivimi vplivi lipidne peroksidacije.

Umetno osemenjevanje v ovčjereji je lahko dragoceno orodje v genetskih programih za izboljšanje genetske raznolikosti ter ohranjanje avtohtonih in ogroženih vrst. Vendar pa umetno osemenjevanje pri ovcah ni tako razširjeno, kot je pri drugih domačih živalskih vrstah, predvsem zaradi nizke uspešnosti oploditve ovac po umetnem osemenjevanju z zamrznjenimi/odmrznjenimi ovnovimi semenčicami (259, 262). Domneva se, da sta glavna vzroka za nižjo uspešnost oploditve pri ovcah po intracervikalni osemenitvi slaba vitalnost globoko zamrznjenih semenčic in specifična zgradba materničnega vratu pri ovci. Pomembna dejavnika, ki vplivata na oploditveno sposobnost semenčic po umetni osemenitvi z zamrznjenim semenom sta kvaliteta in število semenčic, ki preidejo maternični vrat pri ovci. Z razvojem novih postopkov zamrzovanja se poskuša zagotoviti čimbolj kvalitetno seme, vzporedno pa poteka tudi razvoj samih tehnik umetnega osemenjevanja.

V tretjem poskusu smo ugotovitve iz prvih dveh poskusov prenesli še v prakso in ugotavljali uspešnost osemenitve ovac s konzerviranim semenom, kateremu smo dodali detergent Equex STM® ter detergent in antioksidant – natrijev piruvat. Ovce smo pred umetno osemenitvijo sinhronizirali s pomočjo progesteronskih intravaginalnih vložkov ter jih 48 ur po odstranitvi vložkov umetno osemenili s preiskovanimi zamrznjenimi vzorci. Ugotovili smo, da sta imela preiskovana vzorca semena z vključenim detergentom Equex STM® ter detergentom in antioksidantom natrijevim piruatom v razredčevalcu z dodatkom jajčnega rumenjaka, v vseh obdobjih meritev, boljšo skupno gibljivost semenčic ($P < 0,05$) v primerjavi s kontrolno skupino. Prav tako se je izboljšala tudi progresivna gibljivost semenčic po tajanju v obeh preiskovanih skupinah ($P < 0,05$) v vseh obdobjih meritev.

Tri tedne po osemenitvi smo opravili UZ kontrolo brejosti in na ta način ugotavljali oploditveno sposobnost semenčic v preiskovanih skupinah. Naše ugotovitve niso potrdile pričakovanj, saj v preiskovani skupini z vključenim detergentom, kot tudi v skupini z vključenim

detergentom in antioksidantom v razredčevalcu za zamrzovanje semena, nismo dokazali višjega odstotka brejih ovac ($P > 0,05$) v primerjavi s kontrolno skupino.

Na uspešnost umetne osemenitve vpliva več različnih dejavnikov (notranjih in zunanjih) povezanih s samico (ravnanje, sezonski vpliv, oblika spolnih organov itd.), plemenjakom (sezonski vpliv, kvaliteta semena, konzerviranje semena itd.), kmetijo (pogoji okolja, sanitarni status itd.) in tudi s samo tehniko (področje osemenitve, število semenčic za osemenitev, osemenjevalec itd.) (285, 286, 287). Holt je z raziskavo ugotovil, da zamrzovanje semena povzroči prezgodnjo kapacitacijo semenčic pri sesalcih (288). Prezgodnja kapacitacija zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic in specifična zgradba materničnega vratu pri ovci sta lahko vzroka, da so bili v raziskavah, kjer so opravili AI pri ovcah z laparoskopskim intrauterinim postopkom (50, 51), doseženi boljši rezultati v primerjavi z intracervikalnim postopkom (289). Maternični vrat ovce je dolg, vlaknast in cevasto zaviti organ (290). Povprečna dolžina kanala materničnega vratu meri 6,7 cm in vsebuje približno šest ventralno postavljenih lijakastih obročev (290). Drugi raziskovalci so poročali o podobnih ugotovitvah (291, 292). Znotraj in med pasmami ovac obstajajo razlike v kompleksnosti cervikalnih obročev, lumna, dolžini in anatomski povezavi s telesom maternice in vagino. Uspešna vstavitev katetra za osemenjevanje skozi maternični vrat je izredno težavna zaradi zapletenega kanala in majhnega premera cervikalnih obročev (293). Poleg tega cervikalni obroči niso vedno koncentrično razporejeni (294). Drugi in tretji cervikalni obroč sta v primerjavi s prvim obročem zamaknjena, zato je vstavitev katetra za osemenjevanje skozi drugi cervikalni obroč zelo težka in se redko doseže. Nekateri avtorji poročajo, da se pri globoki intracervikalni osemenitvi izboljšajo rezultati oploditve pri ovcah (295, 296, 297). Pri nekaterih pasmah ovac pa je transcervikalna pasaža s katetrom za osemenjevanje mogoča (298), kar nakazuje na pomembnost genetskih dejavnikov. Obstaja velika variabilnost v obliki materničnega vratu med ovcami, zaradi česar je težko oblikovati standardni osemenjevalni kateter za to vrsto (299). Pri različnih vrstah ovac so bili po AI doseženi različni rezultati uspešnosti osemenitve (287), kar je lahko v povezavi z različnimi značilnostmi materničnega vratu (296). Nizko uspešnost oploditve z zamrznjenim/odmrznjenim semenom po intracervikalnem postopku so ugotovili tudi v primerih, kjer so izvedli indukcijo estrusa (36). Predhodna indukcija in sinhronizacija estrusa ima lahko negativen vpliv na plodnost (299). V

raziskavi, v kateri so izvedli AI pri ovcah v naravni pojatvi, so imeli 72 % uspešnost osemenitve z zamrznjenim/odmrznjenim ovnovim semenom (298). Najpomembnejši faktorji, ki vplivajo na uspešnost osemenitve po intracervikalnem postopku, so: vrsta semena (sveže, ohlajeno, zamrznjeno), oblika pojatve (naravna, inducirana) in globina, ki jo ob osemenjevanju dosežemo (296).

Za doseganje boljših uspehov na področju oploditve ovac, osemenjenih po intracervikalnem postopku, bi bilo potrebno poleg razvoja postopkov za pridobitev kvalitetno zamrznjenega ovnovnega semena povečati tudi število semenčic, potrebnih v dozi za osemenitev, ter izboljšati tehniko osemenjevanja.

Pri vseh vrstah se kljub izbiri optimalnega protokola zmrzovanja in tajanja izgubi 40–50 % semenčic (39, 40). Zamrznjene/odmrznjene ovnove semenčice imajo visok odstotek gibljivih semenčic (40–60 %), vendar je le 20–30 % semenčic morfološko in funkcionalno normalnih. Znano je, da so semenčice lahko gibljive, če pa so kakorkoli poškodovane, so slabše oploditveno sposobne (37). Ovnove semenčice so med postopkom zmrzovanja izpostavljene ultrastrukturnim, biokemičnim in posledično funkcionalnim spremembam, kar vodi do izgube preživitvene sposobnosti in gibljivosti (47). Zmrzovanje semenčic povzroči motnje v integriteti membrane z ultrastrukturnimi spremembami, zaradi česar se sproži prezgodnje dozorevanje, poveča se število kapacitiranih semenčic in semenčic z aktiviranimi akrosomi (124, 138). Vse te spremembe škodljivo vplivajo na semenčice in so povezane z izgubo oploditvene sposobnosti (138). Z odstranjevanjem odmrlih in poškodovanih semenčic iz ejakulata se živim semenčicam omogoči daljšo preživitveno sposobnost. Mrtve in poškodovane semenčice predstavljajo vir RKS, ki imajo škodljiv vpliv na gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic (14), škodljivo pa vplivajo tudi na integriteto membrane semenčic (15) in na integriteto DNK (16). Z razvojem novih postopkov za konzerviranje semena, s katerimi se poskuša doseči višjo kakovost semena za umetno osemenjevanje, bi lahko pripomogli k izboljšanju uspešnosti oploditve (259).

V četrtem poskusu smo ugotavljali vpliv postopka SLC skozi enoslojni vrstno specifični koloid na kakovost globoko zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic. Ugotavljali smo vpliv SLC na gibljivost, preživitveno sposobnost, integriteto plazma membrane in integriteto DNK zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, pridobljenih z elektroejakulacijo (v nadaljevanju

seme), ter semenčic pridobljenih ob rutinski kastraciji s prepiranjem repov nadmodkov (v nadaljevanju nadmodkovo seme). Glavni namen postopka SLC je ločitev gibljivih in vitalnih semenčic od negibljivih, nezrelih in iztrošenih semenčic (239). Z različnimi analizami smo potrdili, da je postopek SLC primeren tudi za ločevanje ovnovih semenčic. S postopkom SLC se odstranijo ne le poškodovane semenčice, temveč tudi semenska plazma, kar lahko pomembno vpliva na izboljšanje preživitvene in oploditvene sposobnosti semenčic. Semenska plazma je koristna za delovanje semenčic, vendar ima škodljiv vpliv na njihovo preživetje. Semenska plazma vsebuje številne dejavnike, ki pomagajo ohranjati delovanje semenčic (300) pa tudi dejavnike (301), ki zmanjšujejo gibljivost semenčic, in reaktivne kisikove spojine (RKS), ki so škodljive za preživetje semenčic (302). Humane semenčice so visoko oploditveno sposobne, če se s pomočjo separacijskih postopkov odstranijo iz semenske plazme (228). Maxwell s sod. (303) pa je ugotovil nasprotno, da odstranitev semenske plazme lahko spremeni beljakovine na površini semenčic, kar destabilizira membrane in sledi prezgodnja kapacitacija semenčic, s čimer se zmanjša njihova oploditvena sposobnost. V naši raziskavi je imela odstranitev semenske plazme, skupaj s toksičnimi produkti in poškodovanimi semenčicami, pozitiven učinek na kakovost zamrznjenih/odmrznjenih semenčic. Mrtve in poškodovane semenčice v vzorcu semena prav tako negativno vplivajo na morfološko normalne in vitalne semenčice. Predstavljajo vir RKS, ki imajo škodljiv vpliv na gibljivost in preživitveno sposobnost semenčic (14). Z raziskavo so dokazali, da nezrele humane semenčice proizvajajo več RKS kot zrele in da RKS lahko poškodujejo normalne zrele semenčice (304). S postopkom centrifugiranja skozi koloid se selekcionira zrele semenčice (305). V naši raziskavi smo v preiskovani skupini po tajanju in opravljenem SLC postopku ugotovili boljšo integriteto plazma membrane, akrosoma in DNK. Razlog teh izboljšav v naši raziskavi je verjetno posledica odstranitve virov RKS s postopkom SLC. Prav tako smo v preiskovanih vzorcih semena v primerjavi s kontrolnimi vzorci semena ugotovili statistično značilno boljšo skupno gibljivost po 0, 6, 12 ($P < 0,001$) in 24 urah ($P = 0,031$) in preživitveno sposobnost semenčic ($P < 0,001$) v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po tajanju in opravljenem SLC postopku. To ugotovitev so potrdili tudi drugi raziskovalci, kjer se je po SLC postopku prav tako izboljšala kakovost semena pri različnih živalskih vrstah (248, 250, 256). Boljšo skupno gibljivost po 0, 6, 12 ($P < 0,05$) urah in preživitveno sposobnost semenčic ($P < 0,05$) v vseh štirih časovnih obdobjih meritev po tajanju in opravljenem SLC postopku smo ugotovili tudi v nadmodkovem semenu, razen v primeru

skupne gibljivosti semenčic po 24 urah ($P = 0,345$). V raziskavi smo po tajanju in opravljenem SLC postopku v preiskovani skupini semena v primerjavi s kontrolno skupino ugotovili statistično značilno večje hitrosti semenčic v primeru VAP semenčic po 0 in 12 ($P < 0,05$), VCL po 0 ($P = 0,019$) in VSL po 0, 6 in 12 ($P \leq 0,001$) urah. V primeru VAP semenčic po 6 urah statistično značilno večje hitrosti semenčic nismo dokazali, po 24 urah pa je bila hitrost semenčic v preiskovani skupini semena celo nižja glede na kontrolne vzorce semena. VCL semenčic v preiskovani skupini semena po 0, 6 in 12 urah je bila prav tako nižja v primerjavi s kontrolnimi vzorci. V primeru VSL v preiskovanih vzorcih semena v primerjavi s kontrolno skupino po 24 urah statistično značilno večje hitrosti semenčic nismo ugotovili. Statistično značilno večje hitrosti semenčic po tajanju in opravljenem SLC postopku smo ugotovili tudi v nadmodkovem semenu v primeru VAP semenčic po 0, 6 in 12 ($P < 0,05$), VCL semenčic po 0 in 6 ($P < 0,05$) in VSL po 0, 6 in 12 ($P < 0,05$) urah. V ostalih časovnih obdobjih meritev, pa hitrosti semenčic v nadmodkovem semenu niso bile statistično značilno višje ali so bile v primerjavi s kontrolnimi vzorci celo nižje. V raziskavi, v kateri so ugotavljali vpliv antioksidantov in časa ekvibracije pred zamrzovanjem na zamrznjene/odmrznjene ovnove semenčice, so prav tako ugotovili nižje vrednosti za VAP, VCL in VSL (201), kar je v nasprotju z ugotovitvami drugih avtorjev (120, 250, 306). VAP in VSL semenčic sta v pozitivni korelaciji s številom semenčic, ki jim uspe penetrirati v jajčno celico (307). VSL je pokazatelj premočrtnega napredovanja semenčic in VAP napoveduje kapacitacijo semenčic (307). V raziskavi nismo ugotovili neposredne povezave z dobljenimi rezultati za VAP, VCL in VSL ter vplivom na kvaliteto ovnovih semenčic po tajanju. S SLC postopkom smo ugotovili izboljšave na področju kakovosti ovnovih semenčic, vendar bi bilo potrebno za oceno oploditvene sposobnosti semenčic opraviti še dodatne preiskave, saj se je izkazalo, da parametri hitrosti niso bili statistično značilno boljši oz. so bili slabši od kontrolne skupine vzorcev v vseh časovnih obdobjih meritev, ampak šele po daljši inkubaciji. Z uporabo SLC postopka je mogoče selekcionirati visok odstotek semenčic z normalno morfologijo. Morfologija je pomemben dejavnik, ki vpliva na kakovost semena (226). V raziskavi smo v preiskovani skupini vzorcev semena ugotovili višji delež semenčic z intaktnimi akrosomi ($P < 0,001$) in morfološko normalnih semenčic ($P < 0,001$) po tajanju in SLC postopku v vseh štirih časovnih obdobjih meritev v primerjavi s kontrolno skupino. Podobne ugotovitve, povezane z integriteto akrosomov, so potrdili v raziskavi na pasjih zamrznjenih/odmrznjenih semenčicah (256). Podobno statistično značilno nižji

odstotek morfoloških sprememb akrosoma ($P = 0,028$), z izjemo 6-urne inkubacije ($P = 0,075$) ter skupnih morfoloških sprememb semenčic ($P = 0,028$) v štirih časovnih obdobjih meritev po tajanju, opravljenem SLC postopku, smo ugotovili tudi v nadmodkovem semenu. Pri določanju PMI s HOST smo po tajanju in SLC postopku prav tako ugotovili statistično značilno razliko med kontrolno skupino in preiskovano skupino vzorcev semena ($P < 0,001$) ter nadmodkovim semenom ($P = 0,028$) v vseh štirih časovnih obdobjih meritev. V prejšnjih raziskavah se je pokazalo, da je DGC postopek prav tako uporabna metoda za selekcioniranje ovnovih semenčic. Po končanem postopku se je kakovost semenčic bistveno izboljšala, z izjemo DFI %, ki se je v selekcioniranih vzorcih povečal (245). Podobne rezultate sta ugotovila tudi Stevanato s sod. (308) v svežem humanem semenu z uporabo DGC in Pichardo s sod. (309) v ovnovem semenu z uporabo "swim up" postopka. To je v nasprotju z našo raziskavo, kjer je postopek SLC povzročil znatno zmanjšanje vrednosti DFI v preiskovani skupini vzorcev semena takoj po tajanju ($P < 0,001$) in po treh urah ($P = 0,007$) inkubacije na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Menimo, da je ta razlika posledica SLC postopka, ki predstavlja boljšo izbiro za selekcioniranje semenčic z normalno DNK v primerjavi z DGC. S postopkom SLC smo s SYBR-14/PI/PNA analizo ob uporabi pretočne citometrije v preiskovanih vzorcih semena takoj po tajanju in SLC postopku ugotovili višji odstotek živih ovnovih semenčic z intaktnimi akrosomi ($P < 0,001$) in nižji odstotek morbidnih ($P = 0,003$) in mrtvih ($P < 0,001$) ovnovih semenčic v primerjavi s kontrolno skupino. Nižji odstotek mrtvih ovnovih semenčic s poškodovanimi akrosomi je rezultat pozitivne selekcije živih semenčic z intaktnimi akrosomi, ki smo ga dosegli s postopkom SLC. Le odstotek živih semenčic z aktiviranimi akrosomi ($P = 0,095$) v preiskovanih vzorcih takoj po tajanju in SLC postopku se ni bistveno znižal v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Glavni razlog za takšen rezultat je verjetnost, da je bil odstotek semenčic z aktiviranimi akrosomi v vzorcu semena že tako nizek, da bi se težko bistveno izboljšal. S SYBR-14/PI/PNA analizo smo takoj po tajanju in SLC postopku tudi v nadmodkovem semenu ugotovili višji odstotek živih ovnovih semenčic ($P = 0,046$) ter nižji odstotek morbidnih ($P = 0,028$) ovnovih semenčic v primerjavi s kontrolno skupino. Vendar pa statistično značilne razlike v nadmodkovem semenu v primerjavi s kontrolnimi vzorci v odstotku živih semenčic z intaktnimi akrosomi ($P = 0,075$), živih semenčic s poškodovanimi akrosomi ($P = 0,173$) ter mrtvih semenčic s poškodovanimi akrosomi ($P = 0,600$) nismo ugotovili.

V raziskavi smo ugotavljali vpliv SLC postopka na kakovost zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, pridobljenih z elektroejakulacijo, ter semenčic, pridobljenih ob rutinski kastraciji s prepiranjem repov nadmodkov ter ugotovili nekoliko boljše rezultate za semenčice, pridobljene s pomočjo elektroejakulacije. Ta spoznanja nas pripeljejo do ugotovitve, da so ovnovne semenčice, pridobljene s prepiranjem repov nadmodkov, nekoliko slabše odporne na procese hlajenja, zamrzovanja in tajanja, saj ob ejakulaciji semenčice potujejo skozi nadmodek in pride do redčenja z izločki akcesornih spolnih žlez, pri čemer prihaja do stabilizacije membrane semenčice ter njene dokončne dozoritve.

Sklepamo lahko, da SLC postopek za pripravo zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic ponuja učinkovito metodo za izboljšanje preživitvene sposobnosti ovnovih semenčic. S postopkom SLC bomo lahko zagotovili boljšo kakovost zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, kar pomeni boljšo gibljivost, preživitveno sposobnost, integriteto membrane in DNK. Vendar lahko kljub temu, da bi bile za oceno oploditvene sposobnosti semenčic po SLC postopku potrebne še nadaljnje preiskave, zaključimo, da so vse izboljšave na področju kakovosti ovnovih semenčic predpogoj za boljšo oploditveno sposobnost.

6 SKLEPI

- Vključitev detergenta Equex STM® v razredčevalec za zamrzovanje ovnovega semena z dodatkom jajčnega rumenjaka ima pozitiven vpliv na kvaliteto zamrznjenega/odmrznjenega ovnovega semena.
- V vseh štirih časovnih obdobjih se v skupini z dodanim detergentom Equex STM® izboljša skupna gibljivost semenčic, integriteta plazma membrane in preživitvena sposobnost ovnovih semenčic.
- Vključen detergent Equex STM® v razredčevalec za zamrzovanje ovnovega semena zaščiti semenčice med postopkom zamrzovanja in tajanja.
- V skupini z vključenim detergentom Equex STM® se izboljša hitrost ovnovih semenčic v primeru povprečne hitrosti krivulje gibanja semenčic (VAP), hitrosti krivulje gibanja semenčic (VCL) in hitrosti gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke (VSL).
- Antioksidanta natrijev piruvat, katalaza ter njuna kombinacija, vključena v razredčevalec za zamrzovanje semena, nista izboljšala kvalitete zamrznjenega/odmrznjenega ovnovega semena po tajanju in inkubaciji na 37 °C.
- Številni parametri, kot so skupna gibljivost, preživitvena sposobnost, integriteta DNK, akrosoma in plazma membrane zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic so, navkljub vsemu, v vseh skupinah zelo dobri.
- Sklepamo, da je vključitev detergenta Equex STM® v razredčevalec za zamrzovanje ovnovega semena odgovorna za visoko kakovost zamrznjenih/odmrznjenih semenčic, saj je njegova vključitev zagotovila zadostno zaščito semenčic pred zamrzovanjem, pri čemer dodatna vključitev antioksidantov ne predstavlja koristi.
- Pri ovcah, osemenjenih s semenom z dodatkom detergenta Equex STM® ter detergenta in antioksidanta natrijevega piruvata, se izboljša skupna gibljivost in progresivna gibljivost semenčic, vendar višjega odstotka brejosti nismo potrdili.
- Sklepamo, da bi bilo za doseganje boljših uspehov na področju oploditve ovac, osemenjenih po intracervikalnem postopku potrebno poleg razvoja postopkov za pridobitev kvalitetno zamrznjenega ovnovega semena povečati tudi število semenčic, potrebnih v dozi za osemenitev, ter izboljšati tehniko osemenjevanja.

- Globoko zamrznjene/odmrznjene ovnove semenčice, pridobljene z elektroejakulacijo ter s prepiranjem repov nadmodkov, ki smo jih po tajanju izpostavili SLC postopku, so imele v času 0, 6, 12 in 24 ur po tajanju in inkubaciji na 37 °C boljšo skupno gibljivost, preživitveno sposobnost, integriteto plazma membrane in DNK.
- Sklepamo, da smo s postopkom SLC odstranili negibljive, nezrele, iztrošene semenčice in ostale vire RKS, ki poškodujejo semenčice ter vplivajo na preživitveno sposobnost in njihovo funkcionalnost.
- Ugotovili smo nekoliko boljše parametre za semenčice, pridobljene s pomočjo elektroejakulacije, iz česar sklepamo, da so ovnove semenčice, pridobljene s prepiranjem repov nadmodkov, nekoliko slabše odporne na procese hlajenja, zamrzovanja in tajanja.
- SLC postopek za pripravo zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic ponuja učinkovito metodo za izboljšanje preživitvene sposobnosti ovnovih semenčic. S postopkom SLC lahko zagotovimo boljšo kakovost zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, kar pomeni boljšo gibljivost, preživitveno sposobnost, integriteto membrane in DNK.
- Potrdili smo hipotezi, da imata dodani detergent ter enoslojno centrifugiranje skozi vrstno specifični koloid pozitiven vpliv na vitalnost in stabilnost DNK zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic.
- Pozitivnega vpliva na vitalnost, oploditveno sposobnost in stabilnost DNK zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic nismo ugotovili v primeru dodanih antioksidantov natrijevega piruvata, katalaze ter njune kombinacije in s tem nismo potrdili hipoteze.

7 POVZETEK

Globoko zamrzovanje semena v tekočem dušiku omogoča dolgotrajno konzerviranje in skladiščenje oploditveno sposobnih semenčic, vendar pa proces vključuje več stopenj, pri katerih lahko pride do poškodb semenčic, pri tem pa se zmanjša njihova kvaliteta in oploditvena sposobnost. Velik problem pri konzerviranju semena predstavljajo nenasičene maščobne kisline v membrani semenčic, ki so med postopkom konzerviranja podvržene oksidaciji. Membrana ovnovih semenčic ima večji odstotek nenasičenih maščobnih kislin in manjšo količino fosfolipidov, zaradi česar med postopkom zamrzovanja prihaja do večjih poškodb. Ovce se lahko umetno osemenuje bodisi intrauterino ali intracervikalno, pri čemer je po intracervikalnem postopku z zamrznjenim/odmrznjenim semenom uspešnost oploditve relativno nizka. Glavna vzroka za nižjo plodnost pri ovcah po intracervikalni osemenitvi sta slaba vitalnost globoko zamrznjenih ovnovih semenčic in specifična zgradba materničnega vratu pri ovci.

Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv antioksidantov natrijevega piruvata in katalaze, detergenta Equex STM® in enoslojnega centrifugiranja skozi vrstno specifični koloid na vitalnost, oploditveno sposobnost in stabilnost plazma membrane in DNK zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic.

V *in vitro* poskuse smo vključili po šest ovnov jezersko-solčavske pasme, oplemenitenih z romanovsko ovco. V poskus oploditvene sposobnosti pa so bili vključeni trije ovni in sto osemdeset ovac avtohtone pasme istrska pramenka. Ovni so bili nastanjeni na Kliniki za reprodukcijo in konje, Veterinarske fakultete v Ljubljani, kjer smo opravljali tudi zamrzovanje semena. Umetno osemenje pa smo opravili na ovcah, ki so se nahajale na Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica, Veterinarske fakultete v Ljubljani. V prvi poskus smo vključili 6 ejakulatov šestih ovnov, v drugi poskus 7 ejakulatov šestih ovnov, v tretji poskus 6 ejakulatov treh ovnov ter 180 ovac in v četrti poskus 6 ejakulatov ter seme, odvzeto s prepiranjem nadmodkovih vodov šestih ovnov. Izbrali smo ovne z različno koncentracijo ejakulata ter progresivno gibljivostjo semenčic 60 odstotkov in več. Po končanih analizah smo ejakulate razredčili in zamrznili po standardnem dvostopenjskem postopku s TRIS razredčevalcem z dodatkom jajčnega rumenjaka.

V prvem poskusu smo ugotavljali vpliv dodanega detergenta Equex STM® na kvaliteto globoko zamrznjenega/odmrznjenega ovnovnega semena. V drugem poskusu smo uporabili rezultate iz prvega poskusa, poskus pa nadaljevali s preiskavo vpliva dveh antioksidantov natrijevega piruvata in katalaze na kvaliteto odmrznjenega ovnovnega semena. V tretjem poskusu smo ugotovitve iz prvih dveh poskusov prenesli še v prakso in ugotavljali uspešnost osemenitve ovac s konzerviranim semenom, ki smo mu dodali detergent Equex STM® in antioksidant natrijev piruvat. V četrtem poskusu smo ugotavljali vpliv enoslojnega centrifugiranja skozi vrstno specifični koloid (Androcoll™ – O; v postopku pridobitve patenta, J. M. Morrell) na kvaliteto globoko zamrznjenega/odmrznjenega ovnovnega semena.

Po tajanju in inkubaciji semena v vodni kopeli na 37 °C smo v času 10 minut, 6, 12 in 24 ur na vzorcih opravili računalniško analizo gibljivosti in koncentracije semena, test na preživitveno sposobnost semenčic (Viadent®), s pomočjo fazno-kontrastnega mikroskopa smo opravili HOST ter določili morfološke spremembe semenčic. Ugotavljanje integritete DNK in plazma membrane semenčic smo opravili s pomočjo pretočne citometrije ob uporabi testa SCSA™ v času 10 minut in tri ure ter SYBR-14/PI test v času 15 minut in tri ure po tajanju in inkubaciji na 37 °C. V četrtem poskusu pa smo SYBR-14/PI test dopolnili še s testom PNA. V tretjem poskusu smo pri 180 ovcah izvedli sinhronizacijo estrusa s pomočjo CIDR® – progesteronskih intravaginalnih vložkov. Intracervikalno umetno osemenitev s preiskovanimi zamrznjenimi vzorci smo opravili 48 ur po odstranitvi CIDR® ter po treh tednih opravili še UZ kontrolo brejosti.

Ugotovili smo, da je imela vključitev detergenta Equex STM® v TRIS razredčevalec z dodatkom jajčnega rumenjaka, ugoden učinek na kakovost zamrznjenega/odmrznjenega ovnovnega semena. Izboljšala se je skupna gibljivost semenčic, hitrost semenčic, integriteta plazma membrane in preživitvena sposobnost semenčic po tajanju. V skupini z vključenim detergentom Equex STM® smo ugotovili tudi nižji odstotek morfoloških sprememb akrosoma ter skupnih morfoloških sprememb semenčic. Čeprav dodatek detergenta ni imel vpliva na integriteto DNK, je stopnja denaturacije DNK v obliki DFI v naši raziskavi izredno nizka. Rezultati naše raziskave kažejo, da vključitev detergenta Equex STM® v razredčevalec za zamrzovanje ovnovnega semena zaščiti semenčice med postopkom zamrzovanja in tajanja.

Po vključitvi antioksidantov, natrijevega piruvata in katalaze v razredčevalec za zamrzovanje semena nismo ugotovili vpliva na gibljivost, morfološke spremembe akrosoma

ter SMN, hitrost in preživitveno sposobnost ovnovih semenčic. Antioksidanta natrijev piruvat in katalaza prav tako nista imela vpliva na integriteto DNK in plazma membrane ovnovih semenčic. Čeprav z rezultati nismo potrdili vpliva antioksidantov natrijevega piruvata in katalaze na kvaliteto semenčic, lahko zaključimo, da so bili vsi parametri v naši raziskavi, kot so gibljivost, preživitvena sposobnost, HOST, integriteta DNK, akrosoma in plazma membrane zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, zelo dobri. Sklepamo, da vključitev detergenta Equex STM® v razredčevalce za zamrzovanje ovnovega semena zagotovi zadostno zaščito semenčic pred zamrzovanjem, pri čemer dodatna vključitev antioksidantov ne predstavlja koristi.

V poskusu, v katerem smo ovce osemenili intracervikalno s semenom, ki je vseboval detergent Equex STM® oz. detergent in antioksidant natrijev piruvat, nismo potrdili vpliva na brejost ovac. Na uspešnost umetne osemenitve ovac vpliva več različnih dejavnikov, zato bi bilo potrebno v prihodnje poleg razvoja postopkov za pridobitev kvalitetno zamrznjenega ovnovega semena povečati tudi število semenčic, potrebnih v dozi za osemenitev ter izboljšati tehniko osemenjevanja.

Potrdili smo, da SLC ugodno vpliva na kakovost globoko zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic. Izboljšala se je skupna gibljivost, preživitvena sposobnost, integriteta plazma membrane in integriteta DNK zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, pridobljenih z elektroejakulacijo, ter semenčic, pridobljenih ob rutinski kastraciji s prepiranjem repov nadmodkov. Ovnove semenčice, pridobljene s prepiranjem repov nadmodkov, so nekoliko slabše odporne na procese hlajenja, zamrzovanja in tajanja, saj ob ejakulaciji semenčice potujejo skozi nadmodek, poleg tega pa se razredčijo z izločkom akcesornih spolnih žlez, pri čemer prihaja do stabilizacije membrane semenčice ter njene dokončne dozoritve. S postopkom SLC lahko zagotovimo boljšo kakovost zamrznjenih/odmrznjenih ovnovih semenčic, kar pomeni boljšo gibljivost, preživitveno sposobnost, integriteto membrane in DNK.

Zaključimo lahko, da smo z različnimi izboljšavami razredčevalcev in postopkov obdelave semena zagotovili kvalitetnejše seme, vendar pa kljub temu nismo bili uspešni pri dvigu oploditvene sposobnosti po intracervikalni osemenitvi ovac.

8 SUMMARY

Deep freezing of the semen in liquid nitrogen enables a longterm preservation and storage of viable spermatozoa with good fertilizing ability. Freezing of the semen involves several stages which are harmful to spermatozoa and reduce their quality and fertilizing capacity. Polyunsaturated fatty acids in the membranes of spermatozoa, which are exposed to lipid peroxidation during the freezing and thawing process, are believed to be one of the main reasons for reduced fertility. The membrane of ram spermatozoa has a higher percentage of unsaturated fatty acids and a small amount of phospholipids and thus is believed to be the reason for major damage occurring during freezing process. Ewes can be inseminated either intracervically or via intrauterine. A low fertility rate after intracervical insemination in sheep caused the development of different techniques to overcome this obstacle. It is believed that the main reasons for lower fertility in ewes after intracervical insemination are poor viability of F/T spermatozoa and the specific structure of the ewe's cervix.

The purpose of the research was to establish the effect of antioxidants catalase and sodium pyruvate, detergent Equex STM® and SLC procedure through a species specific colloid on vitality, fertilizing ability and stability of the plasma membrane and DNA of F/T ram spermatozoa.

In the *in vitro* experiments we included six rams of *Jezersko–Solčava* breed processed with the *Romanov* breed. The experiment in connection with fertilizing ability included three rams and a hundred and eighty ewes of autochthonous *Istrian pramenka* breed. The rams were housed at the Clinic for Reproduction and Horses, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, where we also performed the freezing of semen. Artificial insemination of ewes was performed at the Centre for Sustainable Recultivation Vremščica, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, where the animals were also housed. In the first experiment we included 6 ejaculates of six rams; in the second experiment 7 ejaculates of six rams; in the third experiment 6 ejaculates of three rams and 180 ewes; and in the fourth experiment 6 ejaculates and epididymal semen of six rams. Ejaculates with different concentrations and ejaculates with at least 60 % progressively motile sperm were used in experiment. After completing the analysis, ejaculates were frozen according to the standard procedure after two step dilution with TRIS egg yolk based extender.

In the first experiment we examined the effect of detergent Equex STM® in freezing media on the quality of F/T ram spermatozoa. In the second experiment we applied the results from the

first experiment and further examined the effect of antioxidants sodium pyruvate and catalase on post thaw quality of ram spermatozoa. In the third experiment findings from the first two were transmitted in practice and evaluated the ewe insemination effectiveness with cryopreserved semen with addition of detergent Equex STM® and antioxidant sodium pyruvate. In the fourth experiment, we examined the effect of SLC through a species specific colloid (Androcoll™ – O, in the process of obtaining a patent, JM Morrell) on the quality of F/T ram spermatozoa.

After the semen was thawed and incubate in a water bath at 37 °C for 10 min, 6 h, 12 h and 24 hours, we performed the computer assisted analysis of motility, concentration and viability of spermatozoa (Viadent®). By using a phase contrast microscope we performed HOST and defined MAS. Determination of the integrity of DNA and plasma membrane of spermatozoa were performed by flow cytometry using an SCSA™ assay after 10 minutes and three hours and the SYBR-14/PI test after 15 minutes and three hours after thawing and incubation at 37 °C. In the last experiment we sustained the SYBR-14/PI test with test PNA. In the third experiment synchronization of oestrus in 180 ewes was performed using CIDR® - intravaginal progesterone inserts. Intracervical artificial insemination with frozen ram semen was performed 48 hours after the CIDR® removal and after three weeks the UZ control of pregnancy was completed.

We established that the addition of the detergent Equex STM® in TRIS egg yolk base extender has a beneficial effect on the quality of F/T ram spermatozoa. The total motility, velocity, plasma membrane integrity and viability of spermatozoa were improved post thawing. We also established a lower percentage of spermatozoa with abnormal acrosomes and MAS in group with addition of detergent Equex STM®. Although the addition of detergent had no effect on the integrity of DNA, the denaturation of DNA in the form of DFI in our research was very low. The results indicate that the addition of detergent Equex STM® in extender for freezing ram semen protects spermatozoa during the freezing and thawing process.

Addition of antioxidants, sodium pyruvate and catalase in freezing extender had no effect on total motility, a lower percentage of spermatozoa with abnormal acrosomes and MAS, velocity and viability of ram spermatozoa. Antioxidants, sodium pyruvate and catalase also had no effect on the integrity of DNA and plasma membrane of ram spermatozoa. Although the results did not confirm the impact of antioxidants sodium pyruvate and catalase on the quality of spermatozoa, it can be concluded that all the parameters in our research, such as motility, viability, HOST, DNA, acrosome and plasma membrane integrity of F/T ram spermatozoa were very good. We concluded

that the addition of detergent Equex STM® in freezing extender for ram semen ensure adequate protection of spermatozoa before freezing, where the additional inclusion of antioxidants has no benefit.

In the experiment in which we performed intracervical insemination of ewes with semen containing the detergent Equex STM®, detergent and antioxidant sodium pyruvate, we could not confirm the effect on pregnancy rate. Several factors influence efficient artificial insemination of ewes; hence, in the future it would be necessary to allow more time for developing new methods to obtain a better quality of frozen ram spermatozoa; increase the number of spermatozoa required for insemination dose and improve techniques of artificial insemination.

The SLC procedure has a beneficial effect on the quality of F/T ram spermatozoa. We determined improvement of total motility, viability, plasma membrane and DNA integrity of F/T ram spermatozoa acquisition by electroejaculation and during a routine castration by flushing the *cauda epididymis*. Ram spermatozoa gained by flushing the *cauda epididymis* are somewhat less resistant to the cooling, freezing and thawing process. Within the ejaculation spermatozoa travel through *epididymis*, where the dilution with extract from accessory sex glands is performed. This provides stabilization of the spermatozoa membrane and its final maturation. The SLC procedure can provide the best quality of F/T ram spermatozoa, with better motility, viability, membrane and DNA integrity.

We can conclude that different modification of extenders and semen procedures caused the improvement of the quality of frozen/thawed ram semen. However, we were not able to improve the fertilizing capacity of frozen/thawed ram semen after intracervical insemination.

9 ZAHVALA

Mentorju doc. dr. Primožu Klincu se zahvaljujem za številne strokovne nasvete pri organiziranju raziskave, za potrpežljivost, vzpodbudo, predvsem pa strokovno pomoč pri izvedbi poskusov. Hvala za hiter pregled osnutkov doktorske naloge, konstruktivne pripombe ter razbremenitev na delovnem mestu. Sodelavcu in nenazadnje tudi prijatelju se tudi iskreno zahvaljujem za pripravljenost vedno priskočiti na pomoč.

Zahvaljujem se vsem članom komisije, predsednici prof. dr. Marinki Drobnič Košorok, prof. dr. Marjanu Koscu in prof. dr. Tomislavu Dobraniću za pregled doktorske naloge in koristne pripombe. Prof. dr. Marjanu Koscu bi se še posebej rada zahvalila za usmeritev v raziskavo in za vse spodbudne besede v času raziskovanja in nastajanja doktorske naloge.

Iskreno se zahvaljujem kolegom z Biotehniške fakultete, prof. dr. Dragu Kompanu, Dušanu Birtiču in Domnu Drašlerju, da so mi omogočili delo z njihovimi živalmi, saj brez njihovega sodelovanja raziskava ne bi bila mogoča.

Barbari Šteblaj in Katji Hladnik Trček iskrena hvala za pomoč pri izvedbi prvega dela raziskave.

Hvaležna sem prof. dr. Jane M. Morrell z Univerze v Utrechtu, da je z odločitvijo o sodelovanju z našo fakulteto pristopila k moji raziskavi ter mi posredovala material (Androcoll™ – O) za zadnji del raziskave. Zahvaljujem se ji tudi za vse koristne nasvete in pripombe, vezane na raziskavo.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Heinrichu Bollweinu iz Univerze v Hannoveru ter prof. dr. Detlefu Rathu in dr. Sabine Klein iz Inštituta Friedrich – Loeffler v Marienseeju, da sem v njihovem laboratoriju ob uporabi pretočne citometrije opravila velik del analiz. Zahvaljujem se Meike Stünkel in Ronaldu Wittigu, tehničnima sodelavcema na Inštitutu v Marienseeju, za pomoč pri izvedbi analiz.

Zahvalila bi se rada tudi novim prijateljem, ki sem jih pridobila v času opravljanja svojih analiz ter bivanja v Hannoveru, in sicer Eleni Malama, Burcu Cinar in Duygu Karul Calisici za njihovo nesebično pomoč v laboratoriju, vzpodbudo, predvsem pa prijateljsko druženje, ki mi je pomagalo, da mi je čas, ločen od družine, hitreje minil.

Za statistično obdelavo podatkov se lepo zahvaljujem Mateji Nagode z Inštituta RS za socialno varstvo. Hvala za potrpežljivost, številna elektronska sporočila ter hitre in izčrpne odgovore ter nasvete. V času statistične obdelave moje doktorske naloge je postala tudi mamica, za kar ji iskreno čestitam.

Svakinji in prijateljici Ani Šterbenc se iskreno zahvaljujem za lektoriranje doktorske naloge, Demari Ivanič za pregled angleškega besedila in Valeriji Kranjec iz Srednje medijske in grafične šole Ljubljana za tisk in ročno vezavo.

Za natančen pregled citirane literature se zahvaljujem mag. Brigiti Grecc – Smole. Hvala Stanki Ujc in Slavici Sekulič za pomoč pri naročanju in hitri dostavi člankov.

Jerneju Alifu se najlepše zahvaljujem, da si je vzel čas in poskrbel, da je doktorska naloga dobila lepo končno obliko.

Rada bi se zahvalila vsem nekdanjim in sedanjim sodelavcem: Mihū Šavcu, Tadeju Oberstarju, Janku Mrkunu, Igorju Klobučarju, Petri Zrimšek, Tomažu Budefeldu, ki so kakorkoli, posredno in neposredno, pomagali pri raziskavi in tako pripomogli k nastali doktorski nalogi.

Matjažu Petroviču, Mateji Bogataj, Mateju Lončarju in Fahrudinu Botonjiču se zahvaljujem za vso tehnično pomoč pri izvedbi raziskave. Hvala tudi Mateju Lončarju in Fahrudinu Botonjiču, ki sta skrbela tudi za prehrano in dobrobit živali.

Črt Borko, hvala za vse spodbudne besede in za jutranje pogovore ob kavi, ki so pripomogli k boljšemu razpoloženju in temu primerno bolj učinkovitemu pristopu k raziskavi.

Zahvaljujem se Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo, ki mi je v okviru javnega razpisa "Inovativna shema za sofinanciranje doktorskega študija za spodbujanje sodelovanja z gospodarstvom in reševanja aktualnih družbenih izzivov–generacija2010 Univerza v Ljubljani" sofinanciralo doktorski študij.

Mami Alenki in očiju Jožetu se zahvaljujem za vso podporo, vzpodbudne besede in vso pomoč v času podiplomskega študija. Rada vaju imam.

Moji družini, Marku, Maju in Maši se zahvaljujem za vso podporo, vso njihovo ljubezen in predanost, izjemno potrpljenje, male radosti, polne smeha, ki so me napolnile s pozitivno energijo, da je nastalo moje doktorsko delo. Anže, hvala ti, ker si. Rada vas imam.

10 LITERATURA

1. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 282–8.
2. Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res* 2001; 62: 508–15.
3. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 451–8.
4. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989: 22–85.
5. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129: 357–67.
6. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 31: 531–7.
7. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183–97.
8. Peris SI, Morrier A, Dufour M, et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl* 2004; 25: 224–33.
9. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 12.
10. Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon – not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* 2003; 518: 85–98.
11. de Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16: 21–5.
12. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20: 61–9.
13. Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 1994; 17: 300–7.
14. Perez-Crespo M, Moreira P, Pintado B, et al. Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *J Androl* 2008; 29: 47–54.
15. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, et al. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 2002; 65: 301–4.

16. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 2003; 24: 621–8.
17. Abu-Erreish G, Magnes L, Li TK. Isolation and properties of superoxide dismutase from ram spermatozoa and erythrocytes. *Biol Reprod* 1978; 18: 554–60.
18. Sarlos P, Molnar A, Kokai M, et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet Hung* 2002; 50: 235–45.
19. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 581–8.
20. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004; 25: 5–18.
21. Holt WV. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 309–19.
22. Andrabi SM, Maxwell WM. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci* 2007; 99: 223–43.
23. Pickard AR, Holt WV. Cryopreservation as a supporting measure in species conservation: "Not the frozen zoo!". In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, eds. *Life in the Frozen State*: Boca Raton: CRC Press, 2004: 393–414.
24. Critser JK, Russell RJ. Genome resource banking of laboratory animal models. *ILAR J* 2000; 41: 183–6.
25. Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, et al. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa – a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2001; 16: 2109–13.
26. Ranganathan P, Mahran AM, Hallak J, et al. Sperm cryopreservation for men with nonmalignant, systemic diseases: a descriptive study. *J Androl* 2002; 23: 71–5.
27. Tash JA, Applegarth LD, Kerr SM, et al. Postmortem sperm retrieval: the effect of instituting guidelines. *J Urol* 2003; 170: 1922–5.
28. Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N, et al. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril* 2004; 81: 342–8.
29. Nalesnik JG, Sabanegh ES, Jr., Eng TY, et al. Fertility in men after treatment for stage 1 and 2A seminoma. *Am J Clin Oncol* 2004; 27: 584–8.
30. Knight J, Abbott A. Full house. *Nature* 2002; 417: 785–6.
31. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009; 10: 49–62.
32. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.

33. Watson PF. The preservation of semen in mammals. In: Finn CA, ed. Oxford reviews of reproductive biology: ed. Vol. 1. Oxford: University Press, 1979: 283–350.
34. Smith AU, Polge C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature* 1950; 166: 668–9.
35. Stewart D. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet Rec* 1951; 63: 65–6.
36. Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 2000; 5: 46–52.
37. Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 2002; 57: 327–44.
38. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247: C125–42.
39. Curry MR, Millar JD, Tamuli SM, et al. Surface area and volume measurements for ram and human spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; 55: 1325–32.
40. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, et al. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 191–200.
41. Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1989; 26: 64–9.
42. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 1995; 38: 1–36.
43. Ollero M, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, et al. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 1998; 37: 1–12.
44. Byrne GP, Lonergan P, Wade M, et al. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 265–75.
45. Marco-Jimenez F, Puchades S, Gadea J, et al. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 64: 1756–65.
46. Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD, et al. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4 degrees C. *Anim Reprod Sci* 2007; 101: 60–73.
47. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 77–111.
48. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38: 209–22.
49. Molinia FC, Evans G, Maxwell WM. Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents. *Reprod Nutr Dev* 1996; 36: 21–9.

50. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 1995; 37: 185–249.
51. King ME, McKelvey WA, Dingwall WS, et al. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 2004; 62: 1236–44.
52. Ortiz de Montellano M, Galindo Maldonado F, Cavazos Arizpe EO, et al. Effect of electroejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (*Capra hircus*). *Small Rumin Res* 2007; 69: 228–31.
53. Marco-Jimenez F, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reprod Domest Anim* 2008; 43: 403–8.
54. Barker CAV. The collection of semen from bulls, rams and bucks by electro-ejaculator. *Can J Comp Med* 1958; 22: 3–8.
55. Giuliano S, Director A, Gambarotta M, et al. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 359–69.
56. Sundararaman MN, Kalatharan J, Edwin MJ. Attempts to Achieve Semen Collections from Incapacitated Boer Bucks by Electro-ejaculation. *Asian J Anim Vet Adv* 2007; 2: 244–6.
57. Dziuk SP, Graham FE, Donker DJ, et al. Some observations in collection of semen from bulls, goats, boars and rams by electrical stimulation. *Vet Med* 1954; 69: 455–8.
58. Quinn PJ, White IG. Variation in semen cations in relation to semen quality and methods of collection. *Fertil Steril* 1966; 17: 815–25.
59. Pineda MH, Dooley MP. Effect of method of seminal collection on the retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res* 1991; 52: 307–13.
60. Curry MR. Cryopreservation of mammalian semen. *Methods Mol Biol* 2007; 368: 303–11.
61. Sathe S, Shipley CF. Applied andrology in sheep, goats and selected cervides. In: Chenoweth PJ, Lorton S, eds. *Animal andrology: theories and applications*. Wallingford: CABI, 2014: 226–53.
62. Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 2006; 65: 471–85.
63. Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim Reprod Sci* 2002; 74: 35–44.
64. Arav A, Yavin S, Zeron Y, et al. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 77–81.

65. Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 2003; 46: 246–53.
66. Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 1981; 62: 483–92.
67. Salisbury GW, Vandemark NL, Lodge JR. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. 2nd ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1978: 442–93.
68. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 23–53.
69. Polge C. The storage of bull semen at low temperatures. *Vet Rec* 1953; 65: 557–64.
70. Dinnyes A, Liu J, Nedambale TL. Novel gamete storage. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19: 719–31.
71. Gao DY, Liu J, Liu C, et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 1995; 10: 1109–22.
72. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 357–64.
73. Arav A. Inventor. Interface multigradient technology. Device and methods for multigradient directional cooling and warming of biological samples. US Patent no. 5,873,254, 23. February 1999.
74. Gacitua H, Arav A. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology* 2005; 63: 931–8.
75. Evans G, Maxwell WMC. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Sydney: Butterworths, 1987: 107–41.
76. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002; 57: 1801–8.
77. Molinia FC, Evans G, Casares PI, et al. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1994; 36: 113–22.
78. Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 2003; 69: 1245–50.
79. Ostashko FI, Bugrov AD, Zvereva AP. The action of temperature shock on the quality of frozen semen (in Russian). *Skh Biol* 1969; 4: 131–3.
80. Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 613–38.
81. First NL, Henneman HA, Magee WT, et al. The frozen storage of ram semen. *J Anim Sci* 1961; 20: 74–8.

82. Patt JA, Jr., Nath J. Effects of diluents, equilibration time, and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology* 1969; 5: 385–92.
83. Soderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 1997; 48: 1115–25.
84. Colas G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fertil* 1975; 42: 277–85.
85. Quan GB, Hong QH, Hong QY, et al. The effects of trehalose and sucrose on frozen spermatozoa of Yunnan semi-fine wool sheep during a non-mating season. *Cryo Letters* 2012; 33: 307–17.
86. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, et al. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000; 53: 1053–61.
87. Nauk VA. Change in membrane permeability and resistance of protein-cholesterol complexes under the influence of technological processing of semen. *Skh Biol* 1974; 1: 102–8.
88. Bucak MN, Keskin N, Taspinar M, et al. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 2013; 67: 34–9.
89. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* 2006; 6: 215–25.
90. Salamon S, Visser D. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust J Biol Sci* 1972; 25: 605–18.
91. Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 1987; 28: 599–607.
92. Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. Further evaluations of zwitterion buffers in freezing diluents for ram spermatozoa. *Proc Aust Soc Reprod Biol* 1992; 18.
93. Gao D, Mazur P, Critiser JK. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow A, Critiser JK, eds. *Reproductive tissue banking: scientific principles*. ed. San Diego: Academic Press, 1997: 263–328.
94. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 2007; 368: 39–57.
95. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3–22.
96. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11: 73–88.
97. Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996; 12: 131–47.
98. Graham EF, Crabo BG, Pace MM. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J Anim Sci* 1978; 47 (Suppl 2): 80–119.

99. Molina FC, Evans G, Maxwell WM. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 42: 849–58.
100. Kundu CN, Chakrabarty J, Dutta P, et al. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction* 2002; 123: 907–13.
101. Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987; 24: 42–52.
102. Valente SS, Pereira RM, Baptista MC, et al. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim Reprod Sci* 2010; 117: 74–7.
103. Aisen EG, Quintana M, Medina VH, et al. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 2005; 50: 239–49.
104. Leahy T, Marti JI, Evans G, et al. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2010; 119: 147–53.
105. Leahy T, Marti JI, Evans G, et al. Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 571–8.
106. Vadnais ML, Kirkwood RN, Tempelman RJ, et al. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 121–32.
107. Barrios B, Fernandez-Juan M, Muino-Blanco T, et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl* 2005; 26: 539–49.
108. Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M, et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 2000; 63: 1531–7.
109. Ollero M, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *J Androl* 1997; 18: 732–9.
110. Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, et al. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 2008; 69: 564–73.
111. Evans G, McPhie CA, Maxwell WMC. The effect of seminal plasma on the motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. In: 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm: International Congress on Animal Reproduction, 2000: 74.
112. Muino-Blanco T, Perez-Pe R, Cebrian-Perez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (Suppl 4): 18–31.

113. Colas C, Junquera C, Perez-Pe R, et al. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microsc Res Tech* 2009; 72: 566–72.
114. Hafez ESE. *Reproduction in farm animals*. 6th ed. Philadelphia: Lea-Febiger, 1993: 515–25.
115. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60/61: 481–92.
116. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 113–41.
117. Fiser PS, Fairfull RW. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 1986; 23: 518–24.
118. Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LH, et al. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008; 108: 298–308.
119. Woelders H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Q* 1997; 19: 135–8.
120. Anel L, de Paz P, Alvarez M, et al. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* 2003; 60: 1293–308.
121. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497–506.
122. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829–43.
123. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851–62.
124. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871–91.
125. Quinn PJ, White IG, Cleland KW. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil* 1969; 18: 209–20.
126. Holt WV, North RD. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 447–57.
127. Wolf DE, Maynard VM, McKinnon CA, et al. Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6893–6.
128. Hinkovska-Galcheva V, Petkova D, Koumanov K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology* 1989; 26: 70–5.

129. Muller K, Pomorski T, Muller P, et al. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 1): 11–20.
130. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 1993; 265: 432–7.
131. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21: 1–7.
132. Gillan L, Maxwell WM. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 271–83.
133. Noiles EE, Bailey JL, Storey BT. The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 degrees C. *Cryobiology* 1995; 32: 220–38.
134. Noiles EE, Mazur P, Watson PF, et al. Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. *Biol Reprod* 1993; 48: 99–109.
135. Curry MR, Watson PF. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 1994; 31: 39–46.
136. Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 2001; 22: 1061–9.
137. Pukazhenti B, Noiles E, Pelican K, et al. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology* 2000; 40: 139–50.
138. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 55–65.
139. Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, et al. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 878–92.
140. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 2000; 21: 895–902.
141. Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 2002; 57: 1105–22.
142. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995; 10 (Suppl 1): 15–21.
143. Noguchi N, Niki E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: Papas AM, ed. *Antioxidant status in diet, nutrition and health*. Washington: CRC Press, 1999: 3–19.

144. Halliwell B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 3–20.
145. Silva PFN. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. Utrecht: Utrecht University, 2006. PhD Thesis
146. McLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943; 138: 512–8.
147. Aitken RJ. The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int J Androl* 1989; 12: 95–7.
148. Engel S, Schreiner T, Petzoldt R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrologia* 1999; 31: 17–22.
149. Ashworth PJ, Harrison RA, Miller NG, et al. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 173–80.
150. Rovegno M, Feitosa WB, Rocha AM, et al. Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. *Cell Tissue Bank* 2013; 14: 333–9.
151. Gavella M, Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 1992; 28: 135–41.
152. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 468–82.
153. Upreti GC, Jensen K, Munday R, et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci* 1998; 51: 275–87.
154. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 157–66.
155. de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784: 106–15.
156. Roy SC, Atreja SK. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008; 107: 68–84.
157. Lozano GM, Bejarano I, Espino J, et al. Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev* 2009; 55: 615–21.
158. Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 1989; 23: 77–90.
159. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13: 368–78.

160. Garg A, Kumaresan A, Ansari MR. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on fresh and cryopreserved buffalo sperm functions during incubation at 37 degrees C in vitro. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 907–12.
161. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 896–900.
162. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74: 1200–7.
163. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; 6: 139–48.
164. Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 68: 204–12.
165. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 1995; 26: 145–8.
166. Tselkas K, Saratsis P, Karagianidis A, et al. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2000; 107: 69–72.
167. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992; 13: 232–41.
168. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 334–46.
169. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 639–58.
170. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 2001; 57: 43–56.
171. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 203–13.
172. Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. In: Papas AM, ed. *Antioxidant status, diet, nutrition and health*. Washington: CRC Press, 1999: 24–30.
173. Irvine DS. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev Reprod* 1996; 1: 6–12.
174. Therond P, Auger J, Legrand A, et al. alpha-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 739–44.
175. Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, et al. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995; 64: 868–70.

176. Ochsendorf FR, Buhl R, Bastlein A, et al. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13: 353–9.
177. Askari HA, Check JH, Peymer N, et al. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 1994; 33: 11–5.
178. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17: 530–7.
179. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 85–98.
180. Funahashi H, Sano T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology* 2005; 63: 1605–16.
181. Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, et al. alpha-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology* 2007; 68: 958–65.
182. Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 2001; 56: 275–86.
183. Almeida J, Ball BA. Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2005; 87: 321–37.
184. Bolle P, Evandri MG, Saso L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 2002; 65: 313–5.
185. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250: 70–9.
186. Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clin Pathol* 2007; 7: e6 (6 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1906821/pdf/1472-6890-7-6.pdf>
(07.07.2014)
187. Foote RH, Hare E. High catalase content of rabbit semen appears to be inherited. *J Androl* 2000; 21: 664–8.
188. Jeulin C, Soufir JC, Weber P, et al. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* 1989; 24: 185–96.
189. Ihrig TJ, Renston RH, Renston JP, et al. Catalase activity in the developing rabbit testis. *J Reprod Fertil* 1974; 39: 105–8.
190. Alvarez JG, Storey BT. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1984; 30: 833–41.
191. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl* 1995; 16: 464–8.

192. Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, et al. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl* 2005; 26: 15–24.
193. Maxwell WM, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 1013–20.
194. Chabory E, Damon C, Lenoir A, et al. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J Anim Sci* 2010; 88: 1321–31.
195. Mennella MR, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochem J* 1980; 191: 289–97.
196. Cassani P, Beconi MT, O'Flaherty C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Anim Reprod Sci* 2005; 86: 163–73.
197. Chen H, Chow PH, Cheng SK, et al. Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *J Androl* 2003; 24: 704–11.
198. Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, et al. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum Reprod* 1992; 7: 81–5.
199. Rossi T, Mazzilli F, Delfino M, et al. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell Tissue Bank* 2001; 2: 9–13.
200. Fernandez-Santos MR, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, et al. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J Androl* 2007; 28: 294–305.
201. Camara DR, Silva SV, Almeida FC, et al. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology* 2011; 76: 342–50.
202. Silva SV, Soares AT, Batista AM, et al. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod Domest Anim* 2011; 46: 874–81.
203. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 13–23.
204. Bilodeau JF, Le Bras A. Catalase addition prevented a decrease in sperm motility of cryopreserved bovine semen exposed to reactive oxygen species. *Theriogenology* 1999; 51: 337.
205. de Graaf SP, Evans G, Gillan L, et al. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 67: 217–27.

206. Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 269–78.
207. Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 2007; 67: 1060–7.
208. Uysal O, Bucak MN, Yavas I, et al. Evaluation of ram sperm frozen with various taurine concentrations. *Ind Vet J* 2005; 82: 1059–61.
209. Hamedani MA, Tahmasbi AM, Ahangari YJ. Effects of vitamin B 12 supplementation on the quality of ovine spermatozoa. *Open Vet J* 2013; 3: 140–44.
[http://www.openveterinaryjournal.com/2013/Volume 3 \(2\)/OVJ-111-09-13 M.A. Hamedani et al.pdf](http://www.openveterinaryjournal.com/2013/Volume 3 (2)/OVJ-111-09-13 M.A. Hamedani et al.pdf) (17.04.2015)
210. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; 112: 119–35.
211. Fabbrocini A, Del Sorbo C, Fasano G, et al. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean buffalo (*B.bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54: 193–207.
212. Sanchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WM. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 689–96.
213. Arriola J, Foote RH. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci* 1987; 70: 1664–70.
214. Martin JC, Klug E, Gunzel AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil Suppl* 1979; 27: 47–51.
215. Ponglowhapan S, Chatdarong K. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 2008; 69: 666–72.
216. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, et al. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 degrees C. *Theriogenology* 1997; 47: 1093–101.
217. Pena A, Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54: 859–75.
218. Axner E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 179–91.
219. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J Anim Sci* 1978; 47: 198–202.

220. Cheng FP, Wu JT, Chan JP, et al. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology* 2004; 61: 1605–16.
221. Rodriguez-Martinez H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim Reprod* 2013; 148–59.
222. Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 297–308.
223. Wang W, Liang GT, Peng YY, et al. [Effects of a microfluidic sperm sorter on sperm routine parameters and DNA integrity]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2011; 17: 301–4.
224. Januskauskas A, Lukoseviciute K, Nagy S, et al. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology* 2005; 63: 160–78.
225. Morrell JM, Rodriguez-Martinez H, Johannisson A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. *Equine Vet J* 2010; 42: 579–85.
226. Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *Open Androl J* 2009; 1: 1–9.
<http://benthamopen.com/contents/pdf/TOANDROJ/TOANDROJ-1-1.pdf> (17.04.2015)
227. Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Vet Med Int* 2011; 2011.
228. Mortimer D. Sperm preparation methods. *J Androl* 2000; 21: 357–66.
229. Hallap T, Haard M, Jaakma U, et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology* 2004; 62: 702–13.
230. Fraser L, Dziekonska A, Strzezek R, et al. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 2007; 67: 994–1003.
231. Somfai T, Bodo S, Nagy S, et al. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 285–90.
232. Mogas T, Rigau T, Piedrafita J, et al. Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. *Theriogenology* 1998; 50: 1171–89.
233. Bussalleu E, Pinart E, Rivera MM, et al. Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns. *Reprod Domest Anim* 2008; 43: 48–52.
234. Ahmad Z, Anzar M, Shahab M, et al. Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology* 2003; 59: 1189–202.

235. Samper JC, Hamilton DW, Pryor, J. L, et al. Mechanism of sephadex trapping of capacitated stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 729–37.
236. Ibrahim NM, Foster DN, Crabo BG. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *J Androl* 2001; 22: 891–902.
237. Anzar M, Graham EF, Iqbal N. Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a Sephadex ion-exchange column. *Theriogenology* 1997; 47: 845–56.
238. Pertoft H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods* 2000; 44: 1–30.
239. Morrell JM. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Domest Anim* 2006; 41: 63–7.
240. Edmond AJ, Teague AR, Brinsko SP, et al. Effect of density gradient centrifugation on quality and recovery of equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008; 107: 318.
241. Avery B, Greve T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 1995; 44: 871–8.
242. Morrell JM, Geraghty RM. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Vet J* 2006; 38: 224–9.
243. Macpherson ML, Blanchard TL, Love CC, et al. Use of silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallion. *Theriogenology* 2002; 58: 317–20.
244. Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, et al. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci* 2006; 91: 237–47.
245. Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Ramon M, et al. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 2010; 74: 979–88.
246. Morrell JM, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Vet J* 2009; 41: 53–8.
247. Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, et al. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 512–7.
248. Thys M, Vandaele L, Morrell JM, et al. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 390–4.
249. Wallgren M, Saravia F, Rodriguez Martinez H, et al. Effect of density gradient and single layer centrifugation on motility and survival of boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2008; 43(Suppl 3): P 241.

250. Macias Garcia B, Morrell JM, Ortega-Ferrusola C, et al. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2009; 114: 193–202.
251. Morrell JM, Wallgren M. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Anim Reprod Sci* 2011; 123: 64–9.
252. Morrell JM, Mari G, Kutvolgyi G, et al. Pregnancies following artificial insemination with spermatozoa from problem stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll-E. *Reprod Domest Anim* 2010; 46: 642–5.
253. van Wienen M, Johannisson A, Wallgren M, et al. Single layer centrifugation with androcoll-p can be scaled-up to process larger volumes of boar semen. *ISRN Vet Sci* 2011; 2011: 548385 (8 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3667637/pdf/ISRN.VS2011-548385.pdf>
(20.05.2015)
254. Macias Garcia B, Gonzalez Fernandez L, Morrell JM, et al. Single-layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 523–6.
255. Chatdarong K, Thuwanut P, Morrell JM. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology* 2010; 73: 1284–92.
256. Dorado J, Galvez MJ, Morrell JM, et al. Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 2013; 80: 955–62.
257. Gil J, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* 2000; 54: 93–108.
258. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl* 1992; 29: 105–16.
259. Grasa P, Perez-Pe R, Baguena O, et al. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J Androl* 2004; 25: 982–90.
260. Garcia-Artiga C. Test de endosmosis en ovino. In: 7th International Meeting on Animal Reproduction. Murcia: Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca and Consejería de Cultura y Educación, 1994: 77–81.
261. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000; 22: 169–89.
262. Maxwell WM, Evans G, Mortimer ST, et al. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11: 123–6.
263. Akourki A, Gil L, Echegaray A, et al. Effect of the extender supplement Equex-STM on cryopreserved semen in the Assaf sheep. *Cryo Letters* 2004; 25: 147–54.

264. Ballachey BE, Hohenboken WD, Evenson DP. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol Reprod* 1987; 36: 915–25.
265. Evenson DP, Jost LK, Varner DD. Relationship between sperm nuclear protamine free -SH status and susceptibility to DNA denaturation. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 401–6.
266. Evenson DP, Thompson L, Jost L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994; 41: 637–51.
267. Darzynkiewicz Z. Probing nuclear chromatin by flow cytometry. In: Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML, eds. *Flow Cytometry and Sorting*: 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1990: 315–40.
268. Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, et al. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand* 2008; 50: e2 (7 str.)
<http://www.actavetscand.com/content/pdf/1751-0147-50-2.pdf> (05.01.2012)
269. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 1975; 415: 29–79.
270. Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WM, et al. Development of procedures for sex-sorting frozen-thawed bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 460–6.
271. Wu TW, Cheng FP, Chen IH, et al. The combinatorial effect of different Equex STM paste concentrations, cryoprotectants and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality. *Reprod Domest Anim* 2013; 48: 53–8.
272. Buranaamnuay K, Tummaruk P, Singlor J, et al. Effects of straw volume and Equex-STM on boar sperm quality after cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 69–73.
273. Abaigar T, Holt WV, Harrison RA, et al. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* 1999; 60: 32–41.
274. Zambelli D, Iacono E, Raccagni R, et al. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology* 2010; 73: 886–92.
275. Alhaider AK, Watson PF. Cryopreservation of dog semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim Reprod Sci* 2009; 110: 147–61.
276. Anakkul N, Suwimonteerabutr J, Singlor J, et al. Effect of Equex STM paste on the quality and motility characteristics of post thawed cryopreserved goat semen *Thai J Vet Med* 2011; 41: 345–351.
277. Morton KM, Evans G, Maxwell WM. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 2010; 74: 311–6.

278. Roca J, Gil MA, Hernandez M, et al. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl* 2004; 25: 397–405.
279. Melzer E, Schmidt HL. Carbon isotope effects on the decarboxylation of carboxylic acids. Comparison of the lactate oxidase reaction and the degradation of pyruvate by H₂O₂. *Biochem J* 1988; 252: 913–5.
280. Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, et al. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 2008; 70: 1225–33.
281. Klinc P, Rath D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod Domest Anim* 2007; 42: 63–7.
282. Stefanov R, Angelova M, Stefanova T, et al. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions in vitro. *Andrologia* 2004; 36: 51–6.
283. Khalifa TA, El-Saidy BE. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Anim Reprod Sci* 2006; 93: 303–15.
284. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res* 2005; 66: 772–9.
285. Paulenz H, Soderquist L, Adnoy T, et al. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology* 2004; 61: 1719–27.
286. Shackell GH, Kyle B, Littlejohn RP. Factors influencing the success of a large scale artificial insemination programme in sheep. *Proc New Zeal Soc Anim Prod* 1990; 50: 427–30.
287. Donovan A, Hanrahan JP, Kummen E, et al. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 359–68.
288. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47–58.
289. Sanchez-Partida LG, Windsor DP, Eppleston J, et al. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J Androl* 1999; 20: 280–8.
290. More J. Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)* 1984; 120: 156–9.
291. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, et al. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology* 1990; 33: 993–1010.

292. Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 2005; 64: 1225–35.
293. Naqvi SM, Pandey GK, Gautam KK, et al. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Anim Reprod Sci* 2005; 85: 337–44.
294. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, et al. The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 1990; 33: 977–92.
295. Windsor DP, Szell AZ, Buschbeck C, et al. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1994; 42: 147–57.
296. Eppleston J, Salamon S, Moore NW, et al. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 1994; 36: 211–25.
297. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, et al. Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology* 1990; 33: 1231–43.
298. Paulenz H, Soderquist L, Adnoy T, et al. Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Vet Rec* 2005; 156: 372–5.
299. Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 2006; 41 (Suppl 2): 30–42.
300. Perez-Pe R, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 2001; 56: 425–34.
301. Kordan W, Holody D, Eriksson B, et al. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) - A plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 1998; 33: 347–354.
302. Hammadeh ME, Al Hasani S, Rosenbaum P, et al. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 277: 515–526.
303. Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui Rel H, et al. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64: 13–38.
304. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1922–30.
305. Le Lannou D, Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 551–6.

306. Maia Mda S, Bicudo SD, Azevedo HC, et al. Motility and viability of ram semen cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin Res* 2009; 85: 85–90.
307. Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998; 49: 871–9.
308. Stevanato J, Bertolla RP, Barradas V, et al. Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation rates. *Fertil Steril* 2008; 90: 889–90.
309. Pichardo AI, Aragon-Martinez A, Ayala-Escobar ME, et al. Viability tests, active caspase-3 and -7, and chromatin structure in ram sperm selected using the swim-up procedure. *J Androl* 2010; 31: 169–76.

11 PRILOGE

11.1 KEMIKALIJE IN MATERIALI

V raziskavi smo uporabljali kemikalije proizvajalca Merck, Darmstadt, Nemčija; glicerol proizvajalca Kemika, Zagreb, Hrvatska; detergent Equex STM[®] proizvajalca Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, ZDA; katalazo in natrijev piruvat proizvajalca Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, ZDA; barvilo VIADENT proizvajalca Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA; barvilo AO chromatographically purified No 04539 in C.I. 46005, very high purity, No 04539 proizvajalca, Polysciences Inc., Warrington, PA, ZDA in Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Nemčija; LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit, L7011 proizvajalca Invitrogen[™], Molecular Probes Inc., Eugene, OR, ZDA; barvilo PNA - Alexa Fluor[®] 647, L-32460 proizvajalca Molecular Probes Inc., Life Technologies GmbH, Darmstadt, Nemčija in DMSO proizvajalca Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nemčija. Za sinhronizacijo estrusa pri ovcah smo uporabili intravaginalne progesteronske vložke CIDR[®] proizvajalca EAZI-BREED[™] CIDR[®], InterAg, Hamilton, New Zealand in hormon eCG Folligon[®], Intervet International B.V., Boxmeer, Holland.

11.2 SESTAVA RAZTOPIN

- Osnovni TRIS razredčevalec: 263 mM tris-(hidroksimetil)-aminometan, 85 mM citronska kislina, 73 mM fruktoza: 340 mOsm, pH 7,0
- Razredčevalec 1 – TRIS razredčevalec z dodatkom jajčnega rumenjaka: enaka sestava kot osnovni TRIS razredčevalec, z razliko, da vsebuje 20 % jajčnega rumenjaka
- Razredčevalec 2: enaka sestava kot razredčevalec 1, z razliko, da vsebuje krioprotektant – glicerol (14 %)
- Formalinska raztopina: 125 mL 35 % formalin, 0,5 g NaHCO₃, 10 g NaCl in destilirana voda do 1000 mL
- Raztopina po Giemsi: 17,1 mL Giemsa barvila[®], 8,4 mL Soerensenovega fosfatnega pufra, pH 7,0, 150 mL destilirane vode
- Hipoozmotska raztopina: 13,51 g fruktoze, 7,35 g natrijevega citrata-dihidrata in destilirane vode do 1000 mL (100 mOsm/L)

- Hancock raztopina: 2,784 g trinatrijev citrat-dihidrat, 4 mL 37 % formaldehid in destilirana voda do 100 mL
- TNE pufer: 0,01 M TRIS HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA: pH 7,4
- Barvni pufer: 0,1 M citronska kislina 0,2 M Na₂HPO₄, 1 Mm EDTA, 0,15 M NaCl: pH 6,0
- AO barvilo: 6μg AO in 1 mL barvnega pufra
- Kislina: 0,08 N HCl, 0,15 M NaCl in 0,1–odstotni Triton-X 100: pH 1,2
- Tyrode pufer: 5,844 g NaCl, 0,231 g KCl, 0,294 g CaCl₂, 0,081 g MgCl₂, 0,061 g Na₂HPO₄, 0,11 g Na-piruvat, 4,04 ml Na-laktat sirup, 2,383 g HEPES, 0,05 g Penicilin K, 0,5 g PVP, 0,5 g PVA, 2,1 g NaHCO₃ in destilirana voda do 1000 mL: 320 mOsm, pH 7,4

11.3 GIBLJIVOST, PREŽIVITVENA SPOSOBNOST (VIADENT®) IN HITROST SEMENČIC – VPLIV DETERGENTA (EQUEx STM®)

Tabela 2: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivost, preživitveno sposobnost (Viadent®) ter hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 2: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for motility, viability (Viadent®) and speed of spermatozoa in the control and examined samples of semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																									
		0-UR							6-UR							12-UR							24-UR				
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	
G (%)	KONTROLA	36	43,3	4,0	23,9	41,0	26,3	58,5	15,7	3,4	20,6	5,5	3,0	22,5	7,0	2,8	16,6	1,0	0,0	3,8	0,8	0,6	3,5	0,0	0,0	0,0	
	EQUEx STM®	36	78,4	2,6	15,7	82,5	71,3	89,8	66,5	2,8	16,9	69,5	55,3	81,5	46,8	4,4	26,3	53,5	24,3	69,0	9,3	1,9	11,4	3,0	0,0	15,3	
Viadent® (%)	KONTROLA	36	63,5	3,0	17,7	66,1	47,6	79,3	52,9	3,5	21,2	56,1	38,3	66,5	33,6	5,0	30,3	37,6	0,0	56,3	21,1	4,3	26,1	5,4	0,0	44,1	
	EQUEx STM®	36	88,4	1,4	8,3	91,7	83,0	94,6	85,1	2,0	11,8	87,6	79,4	94,4	83,1	2,3	14,0	86,9	76,5	92,1	72,5	3,8	32,1	80,0	69,0	86,8	
VAP (µm/s)	KONTROLA	36	77,1	2,0	11,9	76,5	68,1	86,2	57,9	2,3	13,8	60,9	48,2	66,4	25,6	3,6	21,8	29,6	0,0	39,3	5,1	2,2	12,9	0,0	0,0	0,0	
	EQUEx STM®	36	91,0	2,4	14,5	93,8	77,9	102,2	66,6	1,1	6,8	67,5	63,0	70,6	50,5	2,1	12,5	52,6	44,3	58,8	26,1	3,3	20,0	33,5	0,0	40,8	
VSL (µm/s)	KONTROLA	36	62,4	1,6	9,3	63,1	56,3	68,9	44,6	2,2	13,5	47,4	96,0	121,3	17,0	2,8	17,0	14,4	0,0	25,7	3,6	1,6	9,4	0,0	0,0	0,0	
	EQUEx STM®	36	69,9	1,9	11,6	73,8	60,9	78,8	52,4	1,1	6,8	52,9	49,3	55,9	38,8	1,8	10,9	40,4	34,2	47,0	17,7	2,5	14,7	19,7	0,0	25,8	
VCL (µm/s)	KONTROLA	36	142,6	4,1	24,6	140,9	193,3	160,9	110,3	2,7	16,5	112,5	155,4	121,3	61,3	8,5	51,1	81,9	138,3	106,5	10,1	4,4	26,3	0,0	84,6	0,0	
	EQUEx STM®	36	169,2	5,0	30,1	172,4	227,1	191,4	122,9	2,0	12,1	122,8	145,1	129,4	99,7	3,5	21,2	103,4	124,7	111,1	56,1	6,9	41,3	76,4	108,2	87,1	

Legenda: G – gibljivost, Viadent® – preživitvena sposobnost, VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: G – motility, Viadent® – viability, VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.4 HIPOOZMOTSKI TEST SEMENČIC – VPLIV DETERGENTA (EQUEx STM®)

Tabela 3: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hipoozmotsko pozitivno reagirane semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju

Table 3: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for hypoosmotic positively reacted spermatozoa in the control and examined samples of semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																								
		0-UR							6-UR					12-UR					24-UR							
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
HOS (%)	KONTROLA	36	46,8	20,8	16,9	48,3	33,5	59,5	22,5	1,9	11,5	21,0	14,3	30,5	17,9	1,6	9,4	15,7	11,9	26,3	13,5	1,3	7,6	10,9	8,0	19,8
	EQUEx STM®	36	60,1	20,7	16,2	61,8	52,3	70,6	40,8	2,1	12,5	40,2	33,1	52,3	25,1	1,5	9,0	24,6	18,8	30,1	19,4	1,3	7,8	18,9	13,3	24,9

Legenda: HOS (%) – odstotek hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: HOS (%) – percentage of hypoosmotic swelling positive reacted spermatozoa, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.5 MORFOLOŠKE SPREMEMBE SEMENČIC – VPLIV DETERGENTA (EQUEx STM®)

Tabela 4: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za morfološko spremenjene semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 4: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for abnormal spermatozoa morphology in the control and examined samples of semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																								
		0-UR						6-UR						12-UR						24-UR						
VRSTA POŠKODBE	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
Akrosom (%)	KONTROLA	34	18,4	3,7	21,5	9,9	6,0	15,1	65,8	2,2	13,0	68,3	57,3	75,7	77,2	1,8	10,5	79,6	70,3	86,4	84,4	1,7	9,8	85,9	80,1	91,8
	EQUEx STM®	34	7,7	1,4	8,0	4,9	2,0	12,6	17,8	1,4	8,3	17,5	11,8	23,2	21,2	1,5	8,8	18,3	14,5	28,1	26,2	1,6	9,5	26,1	20,0	32,2
SMN (%)	KONTROLA	34	18,9	3,7	21,4	10,5	6,0	15,6	68,0	2,3	13,2	70,2	59,7	78,4	79,9	1,7	9,9	81,8	76,4	87,5	86,4	1,6	9,2	87,4	83,1	92,6
	EQUEx STM®	34	8,1	1,4	8,0	4,9	2,0	12,9	27,0	1,7	9,7	25,2	19,6	34,2	35,1	1,3	7,5	33,4	29,0	39,8	37,2	1,6	9,2	36,8	31,2	42,8

Legenda: SMN – skupne morfološke napake, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: SMN – morphological abnormal spermatozoa, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.6 SCSA™ (SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY) TEST – VPLIV DETERGENTA (EQUEX STM®)

Tabela 5: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za DFI semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 5: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for DFI of spermatozoa in the control and examined samples of semen in two different time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU												
		0-UR						3-URE						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
DFI (%)	KONTROLA	36	2,0	0,2	1,3	1,6	1,3	2,5	2,3	0,2	1,1	1,9	1,5	3,0
	EQUEX STM®	36	2,1	0,2	1,3	1,8	1,2	2,6	2,3	0,2	1,1	2,0	1,4	3,2

Legenda: DFI (%) – odstotek fragmentirane DNK, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: DFI (%) – percentage of DNA fragmentation, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.7 SYBR-14/PI TEST – VPLIV DETERGENTA (EQUEx STM®)

Tabela 6: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive, morbidne in mrtve semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.
Table 6: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for live, moribund and dead spermatozoa in the control and examined samples of semen in two different time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU												
		0-UR						3-URE						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
Žive semenčice (%)	KONTROLA	31	16,4	2,5	13,7	10,8	5,6	23,3	3,2	0,7	4,0	1,8	0,7	3,6
	EQUEx STM®	31	30,0	2,6	14,4	26,1	19,4	38,1	7,8	0,6	3,3	7,9	5,1	10,0
Morbidne semenčice (%)	KONTROLA	31	2,0	0,5	2,6	1,4	0,7	2,6	2,6	0,4	2,0	2,1	1,3	3,6
	EQUEx STM®	31	3,3	0,4	2,3	2,6	1,7	4,3	5,1	0,5	2,7	4,7	2,8	6,9
Mrtve semenčice (%)	KONTROLA	31	81,7	2,6	14,5	86,9	70,8	92,8	94,2	0,9	5,0	95,4	92,7	97,7
	EQUEx STM®	31	66,8	2,7	14,8	68,9	56,8	76,1	87,1	0,9	5,0	87,1	84,0	92,2

Legenda: N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.8 GIBLJIVOST IN PREŽIVITVENA SPOSOBNOST (VIADENT®) – VPLIV ANTIOKSIDANTOV KATALAZE IN NATRIJEVEGA PIRUVATA

Tabela 7: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivosti in preživitveno sposobnost (Viadent®) semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 7: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for motility and the viability (Viadent®) of spermatozoa in the control and examined samples of semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																								
		0-UR							6-UR					12-UR					24-UR							
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
G (%)	KONTROLA	42	73,3	3,5	22,9	82,5	63,8	90,0	57,7	4,1	26,8	66,0	42,5	80,0	45,6	3,7	24,3	48,5	30,5	65,0	11,9	1,8	11,7	9,0	0,8	20,5
	Na PIRUVAT	42	74,0	3,6	23,6	84,5	68,5	90,0	58,4	3,9	25,4	65,0	40,5	77,0	45,5	3,9	25,6	52,0	23,8	66,3	10,0	1,4	9,4	7,0	1,0	17,3
	KATALAZA	42	73,6	3,7	23,8	82,5	68,0	90,0	55,6	3,7	24,3	63,5	41,3	73,5	45,2	3,6	23,1	47,0	25,8	63,3	13,3	1,8	11,5	13,0	2,8	21,0
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	73,6	3,7	23,7	81,5	71,0	90,0	60,2	3,9	25,1	67,0	45,0	79,0	45,7	3,5	22,4	52,0	26,5	63,3	13,3	1,9	12,1	13,0	2,0	22,0
Viadent® (%)	KONTROLA	42	80,7	2,6	17,0	86,5	71,8	93,9	75,8	2,9	18,9	81,3	65,7	89,9	75,7	3,0	19,1	82,7	67,6	88,5	66,4	4,2	27,2	76,6	57,9	85,8
	Na PIRUVAT	42	81,0	2,5	16,2	86,1	72,7	94,1	78,7	2,3	15,0	82,3	70,5	90,3	77,1	2,7	17,7	81,5	68,6	91,0	67,6	4,1	26,2	76,3	64,5	84,9
	KATALAZA	42	82,5	2,1	13,5	85,9	73,4	93,9	79,8	2,2	13,9	81,4	69,6	92,0	77,4	2,2	14,3	80,2	69,1	87,1	71,4	3,1	19,9	74,8	67,1	82,7
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	82,7	2,0	13,2	87,7	75,0	93,3	79,7	2,3	14,8	83,0	70,0	92,1	79,4	2,0	12,8	83,7	73,4	88,8	70,5	3,6	23,4	76,3	68,1	85,0

Legenda: G – gibljivost, Viadent® – preživitvena sposobnost, Na – natrij, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: G – motility, Viadent® – viability, Na – sodium, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.9 HITROST SEMENČIC – VPLIV ANTIOKSIDANTOV KATALAZE IN NATRIJEVEGA PIRUVATA

Tabela 8: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.
Table 8: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for spermatozoa speed in the control and examined samples of semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																								
		0-UR						6-UR						12-UR						24-UR						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
VAP ($\mu\text{m/s}$)	KONTROLA	42	89,9	2,7	17,3	87,6	75,4	103,2	63,6	1,2	7,7	64,3	61,3	67,8	53,3	2,4	15,4	57,4	50,7	61,8	29,9	2,6	16,7	35,7	26,8	40,3
	Na PIRUVAT	42	91,6	3,1	20,3	89,6	74,7	104,8	63,7	1,1	7,0	63,7	60,7	67,6	54,3	1,8	11,7	57,4	51,4	61,6	31,5	2,0	12,7	34,9	31,3	39,0
	KATALAZA	42	90,0	2,9	18,9	85,3	76,1	102,0	63,5	1,0	6,8	63,7	59,1	67,8	54,5	1,6	10,1	56,2	50,0	61,5	35,6	2,3	14,9	39,2	33,9	43,4
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	91,1	2,8	18,3	90,0	76,1	101,1	63,8	1,0	6,8	63,5	60,0	68,2	56,2	1,4	9,1	59,5	51,7	63,2	34,0	2,4	15,7	37,3	32,0	43,2
VSL ($\mu\text{m/s}$)	KONTROLA	42	67,6	2,3	14,7	65,0	57,5	80,8	48,0	1,2	7,5	47,7	43,9	53,6	40,6	1,9	12,3	43,5	36,6	47,8	21,0	1,9	12,3	24,0	16,8	29,5
	Na PIRUVAT	42	69,1	2,6	16,7	67,9	54,2	81,2	49,0	1,0	6,5	48,1	43,5	54,0	41,4	1,6	10,1	44,6	38,0	47,6	21,2	1,5	9,5	23,6	18,3	26,5
	KATALAZA	42	68,2	2,4	15,6	65,1	56,6	80,1	48,8	1,0	6,3	48,1	43,4	53,5	40,9	1,4	9,3	43,3	36,3	46,6	25,7	1,9	12,2	28,4	21,1	32,5
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	69,2	2,3	14,8	67,1	57,8	79,2	48,9	1,1	6,8	47,7	44,0	54,4	42,9	1,1	7,3	44,1	39,9	48,0	24,4	1,9	12,5	25,6	21,3	30,7
VCL ($\mu\text{m/s}$)	KONTROLA	42	169,1	5,3	34,1	165,9	141,4	191,2	119,8	1,8	11,4	121,6	115,0	125,8	102,3	4,4	28,7	111,9	101,7	117,7	62,4	5,3	34,6	76,7	60,5	84,3
	Na PIRUVAT	42	170,1	6,0	39,1	163,7	138,2	194,1	117,3	1,6	10,4	117,0	112,1	124,6	105,1	3,3	21,1	110,4	101,7	115,8	69,6	4,4	28,5	76,4	69,3	87,8
	KATALAZA	42	168,8	5,7	37,2	158,9	139,6	197,3	118,6	1,5	10,0	118,3	112,3	123,5	107,7	2,3	14,9	110,2	105,1	114,9	73,1	4,6	29,7	84,2	70,4	91,1
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	169,1	5,7	37,1	165,0	139,9	190,2	116,3	1,7	10,9	116,7	111,4	123,1	108,6	2,2	14,5	111,6	102,9	117,3	69,9	4,7	30,3	78,8	70,1	88,2

Legenda: VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, Na – natrij, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, Na – sodium, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.10 HIPOOZMOTSKI TEST SEMENČIC – VPLIV ANTIOKSIDANTOV KATALAZE IN NATRIJEVEGA PIRUVATA

Tabela 9: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hipoozmotsko pozitivno reagirane semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 9: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for hypoosmotic positively reacted spermatozoa in the control and examined samples of semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																									
		0-UR							6-UR							12-UR							24-UR				
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	
HOS (%)	KONTROLA	42	55,9	3,9	25,2	64,2	34,5	77,3	47,5	3,5	22,5	49,3	30,0	66,6	36,3	3,2	20,7	35,5	18,1	53,7	24,6	2,7	17,6	19,3	11,4	42,9	
	Na PIRUVAT	42	55,5	3,9	25,0	60,0	34,6	76,4	47,3	3,4	21,8	50,0	31,9	63,6	36,3	3,3	21,5	31,3	18,2	56,9	24,8	2,7	17,6	17,3	13,3	41,1	
	KATALAZA	42	57,7	4,1	26,3	59,1	33,6	79,4	49,6	3,5	22,9	49,2	32,7	70,9	40,1	3,4	22,0	36,1	23,0	61,3	27,6	2,8	18,2	22,2	13,5	42,8	
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	56,1	4,0	25,6	62,4	34,4	78,3	48,4	3,3	21,6	51,1	32,6	65,4	37,7	3,2	20,6	30,2	23,6	57,7	25,6	2,6	17,0	20,9	12,5	39,6	

Legenda: HOS (%) – odstotek hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic, Na – natrij, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: HOS (%) – percentage of hypoosmotic swelling positive reacted spermatozoa, Na – sodium, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.11 MORFOLOŠKE SPREMEMBE SEMENČIC – VPLIV ANTIOKSIDANTOV KATALAZE IN NATRIJEVEGA PIRUVATA

Tabela 10: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za morfološko spremenjene semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 10: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for abnormal spermatozoa morphology in the control and examined samples of semen in two different time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU												
		0-UR						24-UR						
VRSTA POŠKODBE	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
Akrosom (%)	KONTROLA	42	4,0	0,4	2,9	2,9	2,0	4,9	26,7	1,8	11,4	26,4	18,0	33,5
	Na PIRUVAT	42	3,8	0,6	3,6	2,2	1,9	4,4	26,3	1,8	11,5	24,5	17,7	34,8
	KATALAZA	42	4,9	0,6	4,1	3,7	2,9	5,1	28,2	1,7	11,3	26,9	20,3	35,9
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	4,5	0,6	4,2	3,4	2,0	4,9	26,3	1,6	10,5	23,7	19,5	31,0
SMN (%)	KONTROLA	42	4,2	0,5	3,0	3,2	2,0	5,3	34,4	1,5	9,7	33,2	28,0	41,5
	Na PIRUVAT	42	4,0	0,6	3,8	2,5	1,9	4,7	32,2	1,7	10,8	32,2	22,8	40,9
	KATALAZA	42	5,1	0,6	4,1	3,9	2,9	5,5	37,5	1,6	10,4	36,6	31,1	47,3
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	4,7	0,6	4,1	3,5	2,5	5,7	34,1	1,5	9,8	33,4	25,9	42,7

Legenda: SMN – skupne morfološke napake, Na – natrij, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: SMN – morphological abnormal spermatozoa, Na – sodium, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.12 SCSA™ (SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY) TEST – VPLIV ANTIOKSIDANTOV KATALAZE IN NATRIJEVEGA PIRUVATA

Tabela 11: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za DFI semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 11: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for DFI of spermatozoa in the control and examined samples of semen in two different time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU												
		0-UR						3-URE						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
DFI (%)	KONTROLA	42	1,6	0,2	1,1	1,3	0,8	2,0	1,7	0,2	1,3	1,3	0,9	2,2
	Na PIRUVAT	42	1,7	0,2	1,1	1,2	0,9	2,2	1,9	0,2	1,3	1,6	1,1	2,3
	KATALAZA	42	1,6	0,1	0,9	1,4	0,9	2,0	1,8	0,2	1,0	1,5	0,9	2,3
	Na PIRUVAT + KATALAZA	42	1,7	0,2	1,0	1,5	1,0	2,1	2,0	0,2	1,2	1,6	1,1	2,4

Legenda: DFI (%) – odstotek fragmentirane DNK, Na – natrij, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: DFI (%) – percentage of DNA fragmentation, Na – sodium, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.13 SYBR-14/PI TEST – VPLIV ANTIOKSIDANTOV KATALAZE IN NATRIJEVEGA PIRUVATA

Tabela 12: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive, morbidne in mrtve semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 12: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for live, moribund and dead spermatozoa in the control and examined samples of semen in two different time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU												
		0-UR							3-URE					
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
Žive semenčice (%)	KONTROLA	37	20,2	2,7	16,3	17,4	6,9	30,1	8,8	1,2	7,4	7,4	3,3	12,0
	Na PIRUVAT	37	18,8	2,7	16,2	15,7	5,4	27,0	8,9	1,4	8,6	7,0	2,9	11,4
	KATALAZA	37	19,7	2,7	16,6	16,3	6,3	26,4	8,4	1,4	8,4	7,2	2,6	10,5
	Na PIRUVAT + KATALAZA	37	18,3	2,4	14,8	16,6	6,0	27,2	8,1	1,3	7,7	7,1	3,1	10,3
Morbidne semenčice (%)	KONTROLA	37	4,0	0,5	2,8	2,7	2,0	6,6	4,6	0,6	3,9	3,5	1,9	6,2
	Na PIRUVAT	37	4,4	0,5	2,9	4,4	2,0	6,0	4,6	0,5	3,3	4,0	1,9	5,7
	KATALAZA	37	4,5	0,6	3,4	3,8	2,0	5,4	4,6	0,6	3,7	3,8	2,0	5,3
	Na PIRUVAT + KATALAZA	37	4,7	0,7	4,4	3,9	2,1	5,4	4,7	0,6	3,9	3,5	1,9	5,9
Mrtve semenčice (%)	KONTROLA	37	75,9	2,8	17,1	80,0	65,9	89,8	86,6	1,6	9,6	87,6	80,6	94,2
	Na PIRUVAT	37	76,8	2,8	17,2	80,4	65,5	90,3	86,6	1,7	10,1	88,7	80,8	93,6
	KATALAZA	37	75,7	3,0	18,2	80,9	67,3	90,5	87,1	1,6	9,7	88,2	81,5	94,3
	Na PIRUVAT + KATALAZA	37	76,9	2,8	17,2	78,9	65,0	91,1	87,2	1,5	9,4	89,6	82,0	94,2

Legenda: Na – natrij, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: Na – sodium, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.14 GIBLJIVOST IN PROGRESIVNA GIBLJIVOST SEMENČIC – USPEŠNOST OSEMENITVE OVAC S KONZERVIRANIM SEMENOM

Tabela 13: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivost in progresivno gibljivost v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.
Table 13: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for motility and progressive motility in the control and examined samples of semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																									
		0-UR						3-URE						6-UR						24-UR							
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	
G (%)	KONTROLA	9	37,6	4,6	13,7	41,0	21,0	49,5	10,8	3,3	9,8	11,0	3,0	14,0	10,8	4,5	13,4	6,0	1,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	EQUEx STM®	9	72,3	1,7	5,0	73,0	69,0	75,5	59,0	3,4	10,1	58,0	49,5	66,5	59,0	2,0	5,9	56,0	55,5	63,0	4,9	2,3	6,9	3,0	0,0	7,5	
	EQUEx STM® + Na PIRUVAT	9	73,0	2,0	6,0	76,0	68,5	76,5	59,2	2,9	8,7	59,0	53,0	64,5	58,9	3,5	10,5	60,0	54,0	65,0	3,9	1,5	4,4	1,0	0,0	8,0	
PG (%)	KONTROLA	9	27,4	3,5	10,4	32,0	14,5	33,5	9,0	3,1	9,2	9,0	2,0	11,0	7,3	3,7	11,1	4,0	0,0	11,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	EQUEx STM®	9	55,6	3,0	9,0	55,0	49,0	64,5	47,9	3,0	9,0	46,0	39,5	54,5	47,3	1,8	5,3	46,0	43,5	52,0	2,6	1,2	3,6	1,0	0,0	5,0	
	EQUEx STM® + Na PIRUVAT	9	52,7	1,7	5,1	54,0	46,5	56,5	48,9	2,6	7,8	50,0	41,5	56,0	47,9	2,8	8,5	49,0	44,0	53,0	2,3	0,9	2,7	1,0	0,0	4,0	

Legenda: G – gibljivost, PG – progresivna gibljivost, Na – natrij, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: G – motility, PG – progressive motility, Na – sodium, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.15 GIBLJIVOST, PREŽIVITVENA SPOSOBNOST (VIADENT®) IN HITROST SEMENČIC V EJAKULATU – VPLIV ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

Tabela 14: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivost in preživitveno sposobnost (Viadent®) ter hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena – ejakulat v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 14: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for motility, viability (Viadent®) and speed of spermatozoa in the control and examined samples of semen – ejaculate in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																								
		0-UR						6-UR						12-UR						24-UR						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
G (%)	KONTROLA	36	73,3	3,3	19,9	79,0	57,5	89,0	54,7	3,6	21,8	56,5	39,0	74,3	42,5	3,1	18,5	47,5	28,5	58,5	25,7	3,1	18,5	26,0	9,3	39,0
	SLC-ejakulat	36	94,3	1,2	7,2	95,0	93,0	99,0	84,2	1,6	9,5	86,0	80,0	91,0	76,5	2,2	13,4	79,0	71,0	87,0	37,1	6,5	39,2	10,5	0,0	81,0
Viadent® (%)	KONTROLA	36	62,0	3,8	22,9	67,5	50,0	85,0	54,5	3,7	22,2	59,0	35,5	73,8	48,1	3,8	22,8	52,5	30,8	68,5	41,7	4,0	24,0	45,5	24,3	64,0
	SLC-ejakulat	36	92,9	1,4	8,2	95,5	90,3	98,0	87,7	1,1	6,6	89,0	84,5	91,0	83,5	1,4	8,2	85,0	81,0	89,0	77,0	1,7	10,4	75,5	70,0	86,0
VAP (µm/s)	KONTROLA	36	97,0	2,9	17,6	96,5	82,8	110,8	85,2	2,0	12,1	82,5	79,0	90,8	70,8	2,2	13,2	72,0	64,5	81,0	49,4	4,0	23,9	51,0	41,3	67,0
	SLC-ejakulat	36	115,5	2,7	16,4	115,5	104,3	126,8	84,6	0,9	5,6	83,0	81,0	89,8	76,4	1,5	9,2	79,0	71,0	82,8	39,3	6,0	36,0	34,5	0,0	76,0
VSL (µm/s)	KONTROLA	36	71,4	1,7	10,1	70,5	65,0	78,8	65,1	1,6	9,6	65,5	58,0	69,0	54,2	1,8	11,0	56,0	47,5	62,3	36,0	3,2	19,4	38,5	25,5	53,8
	SLC-ejakulat	36	95,3	1,8	10,5	99,0	86,3	103,8	72,3	0,8	4,9	71,0	69,3	76,5	67,4	1,4	8,5	69,0	62,0	74,0	33,6	5,5	33,1	26,0	0,0	70,8
VCL (µm/s)	KONTROLA	36	190,1	6,6	39,5	186,5	161,0	213,5	158,3	3,7	22,0	152,0	143,5	170,8	135,6	3,9	23,2	139,5	127,0	147,0	100,2	7,7	46,5	107,0	92,5	130,0
	SLC-ejakulat	36	200,8	6,1	36,8	205,0	172,5	226,3	143,4	1,5	9,2	141,5	138,0	150,8	127,2	2,5	15,1	128,5	119,3	135,0	68,5	9,9	59,3	83,5	0,0	126,0

Legenda: G – gibljivost, Viadent® – preživitvena sposobnost, VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, SLC – enoslojno centrifugiranje, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: G – motility, Viadent® – viability, VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, SLC – single layer centrifugation, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.16 GIBLJIVOST, PREŽIVITVENA SPOSOBNOST (VIADENT®) IN HITROST SEMENČIC V NADMODKOVEM SEMENU – VPLIV ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

Tabela 15: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za gibljivosti in preživitveno sposobnost (Viadent®) ter hitrosti semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena – nadmodkovo seme v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 15: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for motility, viability (Viadent®) and speed of spermatozoa in the control and examined samples of semen – epididymal semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																								
		0-UR							6-UR						12-UR						24-UR					
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
G (%)	KONTROLA	6	81,7	3,6	8,8	80,5	74,0	89,8	65,2	3,9	9,5	65,0	55,8	75,0	50,0	3,0	7,3	48,5	45,3	56,5	42,0	2,2	5,4	42,5	36,5	46,3
	SLC-n.s.	6	97,2	0,9	2,2	98,0	94,8	99,0	81,7	2,8	6,9	81,5	76,0	86,3	82,8	2,6	6,4	84,0	78,0	87,8	33,2	8,9	21,8	30,5	15,3	53,8
Viadent® (%)	KONTROLA	6	78,5	2,4	6,0	77,5	74,0	83,5	70,0	2,1	5,2	69,0	66,0	75,5	65,3	2,5	6,2	64,5	59,8	71,0	59,5	3,4	8,3	62,0	55,8	65,0
	SLC-n.s.	6	97,2	1,5	3,7	99,0	92,8	100,0	90,0	1,7	4,1	89,0	87,0	92,0	89,3	1,5	3,8	88,0	86,0	94,0	85,7	2,1	5,1	83,5	82,5	89,8
VAP (µm/s)	KONTROLA	6	83,5	3,1	7,6	83,0	78,5	87,3	62,7	2,4	6,0	65,0	59,3	66,3	62,5	2,6	6,5	61,0	57,8	69,0	57,3	1,3	3,3	58,5	54,3	59,5
	SLC-n.s.	6	123,8	7,5	18,4	129,5	103,8	138,3	75,3	3,5	8,6	80,0	67,5	81,0	72,2	2,8	6,9	70,0	67,0	79,8	34,3	9,8	24,0	29,5	20,3	54,0
VSL (µm/s)	KONTROLA	6	63,3	1,7	4,2	62,5	59,8	67,0	45,2	2,7	6,6	48,0	37,5	50,3	48,2	2,9	7,1	47,0	43,3	55,5	43,2	2,0	5,0	43,5	39,5	47,5
	SLC-n.s.	6	110,3	6,6	16,2	117,5	92,0	122,8	63,8	4,6	11,2	69,0	57,0	70,3	61,3	3,2	7,9	61,5	56,3	68,5	29,0	9,5	23,3	22,5	14,3	48,5
VCL (µm/s)	KONTROLA	6	161,2	7,5	18,3	159,0	148,8	171,5	121,3	4,5	11,1	126,5	109,3	129,0	117,2	2,5	6,2	117,0	112,5	122,3	109,2	2,5	6,2	108,0	103,5	115,8
	SLC-n.s.	6	209,0	13,6	33,3	210,0	181,8	241,8	132,7	3,4	8,2	134,0	129,0	138,0	124,2	4,3	10,4	125,0	115,8	133,0	70,0	15,0	36,6	79,0	52,5	90,0

Legenda: G – gibljivost, Viadent® – preživitvena sposobnost, VAP – povprečna hitrost krivulje gibanja, VSL – hitrost gibanja semenčic po premici od začetne do končne točke, VCL – hitrost krivulje gibanja, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: G – motility, Viadent® – viability, VAP – average path velocity, VSL – straight line velocity, VCL – curvilinear velocity, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.17 HIPOOZMOTSKI TEST SEMENČIC – VPLIV ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

Tabela 16: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za hipoozmotsko pozitivno reagirane semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih v ejakulatu ter nadmodkovem semenu v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 16: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for hypoosmotic positively reacted spermatozoa in the control and examined samples of ejaculate and epididymal semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																									
		0-UR							6-UR							12-UR							24-UR				
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	
HOS (%)	KONTROLA	36	38,9	1,8	10,6	39,5	31,7	46,4	29,5	1,1	6,6	27,8	25,0	34,8	24,2	1,3	7,6	23,9	18,4	27,7	19,9	0,9	5,2	20,0	15,1	23,9	
	SLC-ejakulat	36	68,8	1,6	9,5	69,0	62,0	74,0	61,2	1,4	8,2	60,9	57,3	65,5	57,3	1,5	9,3	56,0	51,0	64,8	51,7	1,5	8,8	52,8	45,3	58,0	
	KONTROLA	6	47,2	3,3	8,1	46,7	39,5	55,0	25,8	1,2	3,1	27,3	21,9	28,0	26,8	2,9	7,1	25,3	22,0	31,2	23,9	2,7	6,6	23,0	19,6	28,4	
	SLC-n.s.	6	70,5	4,1	10,2	74,5	59,0	77,5	50,5	3,5	8,7	50,1	42,0	56,8	49,7	2,3	5,7	49,0	44,0	56,0	43,6	3,6	8,8	42,0	36,5	53,6	

Legenda: HOS (%) – odstotek hipoozmotsko pozitivno reagiranih semenčic, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: HOS (%) – percentage of hypoosmotic swelling positive reacted spermatozoa, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.18 MORFOLOŠKE SPREMEMBE SEMENČIC – VPLIV ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

Tabela 17: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za morfološko spremenjene semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu in nadmodkovem semenu v štirih časovnih obdobjih po odmrzovanju.

Table 17: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for abnormal spermatozoa morphology in the control and examined samples of semen in ejaculate and epididymal semen in four time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU																									
		0-UR							6-UR							12-UR							24-UR				
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	
Akrosom (%)	KONTROLA	36	30,4	2,2	13,1	31,2	19,4	39,9	41,6	2,3	13,8	40,4	32,7	53,2	41,1	2,1	12,4	48,0	35,7	57,3	54,5	1,7	10,3	53,0	49,5	58,1	
	SLC-ejakulat	36	12,8	1,2	7,3	12,1	7,8	16,6	19,0	1,5	8,9	16,7	12,0	22,8	23,0	1,6	9,5	22,0	16,0	30,4	27,5	1,3	8,1	27,0	22,1	34,0	
	KONTROLA	6	16,9	1,3	3,2	18,0	13,5	19,3	26,6	3,9	9,6	26,4	16,9	35,9	27,0	3,0	7,3	25,8	21,0	32,9	32,7	2,2	5,4	31,0	28,2	39,0	
	SLC-n.s.	6	3,8	0,8	2,0	4,0	3,0	5,3	12,8	2,0	5,0	12,9	8,2	17,0	15,5	1,3	3,1	15,0	12,8	18,5	22,2	2,1	5,2	21,7	17,2	28,0	
SMN (%)	KONTROLA	36	36,4	2,2	13,0	36,1	26,4	45,6	48,9	2,0	12,1	51,2	40,0	56,8	55,8	2,0	12,0	55,5	48,0	66,0	64,2	1,4	8,5	63,6	58,2	68,5	
	SLC-ejakulat	36	14,9	1,1	6,7	14,6	8,2	18,6	22,4	1,6	9,3	21,8	16,2	26,8	27,1	1,4	8,7	24,8	20,8	34,0	32,6	1,3	7,6	32,2	27,3	37,5	
	KONTROLA	6	33,4	1,5	3,6	33,0	31,3	35,2	52,4	2,9	7,0	54,3	43,9	59,0	55,1	2,8	6,9	55,7	48,4	61,9	59,9	3,6	8,9	56,7	52,4	69,0	
	SLC-n.s.	6	22,7	2,2	5,3	24,0	18,5	25,5	29,4	4,1	10,0	29,0	20,5	39,0	34,0	2,2	5,4	33,0	30,5	40,0	40,4	3,4	8,4	38,6	33,3	48,0	

Legenda: SMN – skupne morfološke napake, SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: SMN – morphological abnormal spermatozoa, SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.19 SCSA™ (SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY) TEST – VPLIV ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

Tabela 18: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za DFI semenčic v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu v dveh časovnih obdobjih po odmrzovanju.
Table 18: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for DFI of spermatozoa in the control and examined samples of semen in ejaculate in two different time periods after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU												
		0-UR						3-URE						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
DFI (%)	KONTROLA	30	0,4358	0,0338	0,2	0,3700	0,3	0,5	0,4215	0,0176	0,1	0,4150	0,4	0,5
	SLC-ejakulat	30	0,2560	0,0271	0,1	0,2350	0,2	0,3	0,3320	0,0310	0,2	0,2880	0,2	0,4

Legenda: DFI (%) – odstotek fragmentirane DNK, SLC – enoslojno centrifugiranje, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: DFI (%) – percentage of DNA fragmentation, SLC – single layer centrifugation, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.20 SYBR-14/PI TEST – VPLIV ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

Tabela 19: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive, morbidne in mrtve semenčice v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu in nadmodkovem semenu po odmrzovanju.

Table 19: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for live, moribund and dead spermatozoa in the control and examined samples of semen in ejaculate and epididymal semen after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU [0 UR]						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
Žive semenčice (%)	KONTROLA	30	23,5	2,3	12,4	24,0	13,3	29,3
	SLC-ejakulat	30	38,4	2,3	12,7	38,3	30,1	44,8
	KONTROLA	6	38,2	3,2	7,8	39,5	33,4	44,2
	SLC-n.s.	6	55,7	5,2	12,7	55,1	44,7	67,9
Morbidne Semenčice (%)	KONTROLA	30	8,5	0,8	4,5	8,1	4,4	12,4
	SLC-ejakulat	30	5,3	0,3	1,7	5,0	4,1	6,8
	KONTROLA	6	16,7	2,5	6,1	17,5	10,3	22,4
	SLC-n.s.	6	7,6	1,2	2,8	6,3	5,5	11,0
Mrtve Semenčice (%)	KONTROLA	30	68,0	2,7	15,0	65,7	57,9	82,6
	SLC-ejakulat	30	56,2	2,2	12,3	56,3	49,8	63,1
	KONTROLA	6	45,1	3,9	9,5	44,3	38,1	52,3
	SLC-n.s.	6	36,7	6,2	15,1	39,0	20,7	49,5

Legenda: SLC – enoslojno centrifugiranje, n.s. – nadmodkovo seme, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me - mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: SLC – single layer centrifugation, n.s. – epididymal semen, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.

11.21 SYBR-14/PNA TEST – VPLIV ENOSLOJNEGA CENTRIFUGIRANJA

Tabela 20: Prikaz vrednosti \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 in Q3 za žive semenčice z nepoškodovanimi akrosomi (Sybr-14+/PNA-), žive z aktiviranimi akrosomi (Sybr-14+/PNA+) in mrtve semenčice s poškodovano zunanjo akrosomalno membrano (Sybr-14-/PNA+) v kontrolnih in preiskovanih vzorcih semena v ejakulatu in nadmodkovem semenu po odmrzovanju.

Table 20: Values of \bar{X} , SE, SD, Me, Q1 and Q3 for live spermatozoa with intact acrosome (Sybr-14+/PNA-), live spermatozoa with reacted acrosome (Sybr-14+/PNA+) and dead spermatozoa with damaged outer acrosomal membrane (Sybr-14-/PNA+) in the control and examined samples of semen in ejaculate and epididymal semen after thawing.

PARAMETER		PO ODMRZOVANJU [0 UR]						
	POSTOPEK	N	\bar{X}	SE	SD	Me	Q ₁	Q ₃
Sybr-14+/PNA- (%)	KONTROLA	30	31,4	2,7	14,9	33,7	17,0	41,6
	SLC-ejakulat	30	43,4	2,3	12,4	43,1	36,7	49,7
	KONTROLA	6	53,6	3,5	8,5	53,9	48,0	59,7
	SLC-n.s.	6	61,7	6,0	14,6	60,0	49,2	76,8
Sybr-14+/PNA+ (%)	KONTROLA	30	0,5	0,1	0,3	0,5	0,3	0,7
	SLC-ejakulat	30	0,4	0,1	0,4	0,3	0,2	0,4
	KONTROLA	6	0,6	0,1	0,3	0,5	0,4	0,7
	SLC-n.s.	6	0,9	0,2	0,6	0,9	0,4	1,4
Sybr-14-/PNA+ (%)	KONTROLA	30	22,1	1,6	8,8	20,0	15,4	30,0
	SLC-ejakulat	30	16,5	1,5	8,1	16,8	10,5	22,4
	KONTROLA	6	8,6	0,5	1,3	8,8	7,9	9,3
	SLC-n.s.	6	8,1	1,8	4,4	6,7	4,9	11,2

Legenda: SLC – enoslojno centrifugiranje, Sybr – 14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, PNA – peanut agglutinin, n.s. – nadmodkovo seme, N – število vzorcev, \bar{X} – povprečna vrednost, SE – standardna napaka, SD – standardna deviacija, Me – mediana, Q₁ – kvartil 1, Q₃ – kvartil 3.

Legend: SLC – single layer centrifugation, Sybr – 14/PI – LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, PNA – peanut agglutinin, n.s. – epididymal semen, N – number of samples, \bar{X} – mean, SE – standard error, SD – standard deviation, Me – median, Q₁ – quartile 1, Q₃ – quartile 3.