



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KARJUN SIITTIÖIDEN MORFOLOGINEN TUTKIMINEN

Elina Takalo

Opinnäytetyö
Joulukuu 2016
Laboratorioalan koulutusohjelma



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

TAKALO, ELINA:
Karjun siittiöiden morfologinen tutkiminen

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Joulukuu 2016

Morfologian tutkiminen on tärkeä osa siemennesteanalyysiä, sillä se antaa tietoa siemennesteen laadusta sekä karjun kehon ja kivesten terveydestä. Siittiö sisältää kolmesta viiteen morfologista osaa, joissa kaikissa voi olla poikkeamia. Arvioitaessa siemennesteen morfologiaa osa siittiöistä on aina poikkeavia. Morfologiset poikkeamat jaotellaan kolmeen luokkaan niiden vakavuuden perusteella: primäärisiin, sekundäärisiin ja tertiäärisiin.

Opinnäytetyö tehtiin Finnpig Oy:n karjuasemalla Sastamalassa. Finnpig Oy on HKScan Finland Oy:n ja A-Tuottajat Oy:n omistama sian keinosiemennysannoksia valmistava yritys, joka hankkii eläinaineksensa kahdesta jalostusorganisaatiosta, tanskalaisesta DanAvl:sta sekä norjalaisesta Norsvin:sta. DanAvl Yorkshire karjuilla on ollut ongelmia hedelmöittää emakoita. Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää morfologinen värjäysmenetelmä karjun siittiöiden tutkimista varten ja tarkoituksena tutkia DanAvl ja Norsvin emärotojen siittiöiden rakennepoikkeamia, mitkä saattavat vaikuttaa hedelmöittymiseen. Lisäksi työssä seulottiin asemalla olleet emärodun karjut.

Työssä tutkimusmateriaalina käytettiin 58 emärodun karjun siemennestettä ja rakennepoikkeamien havaitsemiseen siittiöitä laskettiin yhteensä 34 800 kappaletta. Värjäysmenetelminä käytettiin kahta Minituben menetelmää, Farelly- ja Spermac-sarjaa. Värjäysmenetelmät valikoituivat niiden helppokäyttöisyyden ja edullisuuden vuoksi. Vaihtoehtoina olivat myös Papanicolaou ja May-Grünwald Giemsa, jotka hylättiin niiden monimutkaisuuden ja kustannusten vuoksi. Värjäyssarjan valinnan jälkeen etsittiin sopiva laimennusaine ja -suhde. Laimentimena kokeiltiin Androstar Plus-antibiootti- ja 0,9 % NaCl-liuosta.

Käytettäväksi värjäysmenetelmäksi valittiin Farelly-sarja sen selkeyden, nopeuden ja helppokäyttöisyyden vuoksi. Lisäksi rakennepoikkeamat näkyivät selvästi ja menetelmä oli riittävän tarkka karjuaseman laboratorioon. Valintaan vaikutti myös, että Spermac-sarjan värjäystä ei saatu onnistumaan toivotulla tavalla, mikä saattoi johtua värjäyksen hankaluudesta tai siemennesteen sisältämästä plasmasta. Jatkossa värjäysmenetelmää hyödynnetään hedelmättömien ja asemalle tulevien uusien karjujen siittiöiden morfologian tutkimiseen. Lisäksi värjäyksessä saatuja tuloksia verrataan siemennesteelle annettuun elävyyteen (%). Jatkotutkimusaiheena voitaisiin luoda emärodun karjujen siemennesteen tuotantoon hyväksymisraja.

Asiasanat: karju, siittiö, morfologia, sivelynäyte, värjäys

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

TAKALO, ELINA:
Morphological Examination of Boar's Sperm

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 9 pages
December 2016

The thesis was carried out for Finnpig's boar stud in Sastamala. Finnpig Oy is owned by two Finnish food companies, A-tuottajat and HKScan Finland. The company produces artificial insemination doses of boar sperm for sow farms. Finnpig's boars come from two refinement organizations, DanAvl from Denmark and Topigs Norsvin from Norway. The aim of this thesis was to find a morphological staining method for boar's sperm because DanAvl Yorkshire boars have had problems with their ability to fertilize sows. The purpose was to examine the spermatozoa of the parent (pig) breed used at Norsvin and DanAvl.

The thesis compared two Minitube's staining methods, Farelly and Spermac Stain. These methods were selected for their ease of use and inexpensiveness. The research material consisted of semen from 58 boars representing the parent breed, and 34 800 pieces of spermatozoa were counted for the morphology analysis. After the selection of the method diluents and dilution were tested. Sperm samples were diluted to Minitube's Androstar Plus antibiotic and 0,9 % NaCl solutions.

Farelly Stain was selected for use at Finnpig's laboratory because of its clarity and speed. Spermac Stain did not work correctly which could be caused by distractions in the semen. Therefore, the method was rejected. A 0,9 % NaCl solution was selected as diluent because antibiotic solution disturbed the spermatozoa staining. In the future, the chosen method will be used in the screening of new parent breed boars and the staining results are compared to the semen viability. Further research could potentially be conducted to develop the pass limit used in the semen production of the parent breed boars.

Key words: boar, spermatozoon, morphology, prepare, staining

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	SIITTIÖ	9
2.1	Siittiön rakenne	9
2.2	Spermatogeneesi	12
2.2.1	Proliferatiivinen vaihe	14
2.2.2	Meioottinen vaihe.....	14
2.2.3	Spermiogeneesi	15
2.3	Siittiön morfologia	16
3	TOPIGS NORSVIN JA DANAVL	18
3.1	Topigs Norsvin ja emärodut	18
3.2	DanAvl ja emärodut.....	18
4	SOLUVÄRJÄYS.....	20
4.1	Soluvärjäyksen periaate	20
4.2	Värjäysprosessi	21
4.3	Morfologiset värjäysmenetelmät	22
5	KOKEELLINEN OSUUS	24
5.1	Materiaalit ja menetelmät	24
5.2	Työn suoritus	25
6	TULOKSET	27
6.1	Värjäysmenetelmä	27
6.2	Rakennepoikkeamat.....	29
7	POHDINTA.....	32
7.1	Värjäysmenetelmät	32
7.2	Morfologia	34
7.3	Värjäysmenetelmän käyttö jatkossa.....	36
	LÄHTEET.....	38
	LIITTEET	42
	Liite 1. Työohje	42
	Liite 2. Seulonta tulokset.....	46
	Liite 3. Papanicolaou ja Giemsa värjäyksien työvaiheet.....	47
	Liite 4. Seulonta tulokset verrattuna elävyyksiin	49

ERITYISSANASTO

absorboida	situa, imeä itseensä
amorfinen	muodoton
aneuploidia	kromosomistomutaatio, jossa yksittäisiä kromosomeja on kromosomistossa normaalista poikkeava määrä
apoptoosi	ohjelmoitu solukuolema
dehydraatio	veden poistaminen
diploidi	sisältää kaksinkertaisen kromosomiston
distaalinen	kauempana jostakin
efferenttikanava	vievä/kuljettava kanava
elävyys	elävien ja normaalien siittiöiden prosenttiosuus
flagelli	siima, rihmamainen liikuntaelin
geneettinen	perimään liittyvä
haploidi	sisältää yksinkertaisen kromosomiston
hydrofobinen	vettähylkivä
hyperosmoottinen	liuos, jonka osmoottinen paine suurempi kuin vertailuliuoksen
hypotoninen	liuos, jonka osmoottinen paine on pienempi kuin vertailuliuoksen
hyppy	siemenkeräystapahtuma
indikaattori	jonkin asian ilmaisun/osoitin
kapasitaatio	siittiön solukalvon valkuaisaineiden ja rasva-aineiden uudelleen järjestäytyminen
liikkuvuus	elävien siittiöiden määrä
luumeni	siementiehyen ontto sisäosa
metabolia	aineenvaihdunta
morfologia	solun rakenteen tutkiminen
nukleosomi	kromatiinin järjestäytymismuoto
oosyytti	munasolun esiaste
osmolaliteetti	liuenneiden molekyylien/ionien lukumäärä liuotinkilossa (osm/kg)
parakriininen	kuva hormonin tai muun vapautumista umpierityssoluja ympäröivään kudokseen mieluummin kuin verenkiertoon

paternaalinen mitokondriogenomi	isän mitokondriogenomi
preparaatti	sivelynäyte
proksimaalinen	lähellä jotakin
protamiini	proteiini, joka sisältää yli 60% arginiinia
proteaasi	yhteisnimitys entsyymeille, jotka pilkkovat proteiineja
proteiinikinaasi	entsyymi, joka kykenee fosforyloimaan substraattinsa
proteolyysi	valkuaisaineiden hajoaminen peptideiksi ja aminohapoiksi
regeneraatio	kudoksen/elimen uudelleen kasvattaminen
reseptori	vastaanottava kohta/elin
rete kives	kivesverkko
spermatidi	perimältään haploidi siittiön esiaste
spermatogeneesi	siittiön kehittyminen
spermatoosyytti	siittiön esiaste
spermiogeneesi	siittiön erilaistuminen
toonisuus	kuvastaa liuoksen osmolaarisuutta verrattuna solunulkoiseen nesteeseen
transkriptio	proteiinisynteesin ensimmäinen vaihe, DNA-juosteen kopiointi lähetti-RNA:ksi
UHP-vesi	ultrapuhdas vesi
vakuoli	solurakkula
visuaalinen	näköaistiin perustuva
ATP	adenosiinitrifosfaatti
DNA	deoksiribonukleiinihappo
LL	DanAvl Maatiainen
MM	Norsvin Maatiainen
YY	DanAvl Yorkshire
ZZ	Norsvin Z-linja (Yorkshire)

1 JOHDANTO

Morfologisesta luokituksesta on tullut olennainen osa siemennesteanalyysiä. Se on yksi tärkeimmistä perusteista, kun määritetään siemennesteen laatua, sillä huono morfologia on tärkeä indikaattori hedelmällisyyden laskussa. (Garsia-Herreros, ym 2006, 553.) Morfologian uskotaan olevan läheistä sukua siittiön toimintahäiriöille (Schiff ym. 2007, 1326). Erityisesti keinosiemennyksen kannalta siittiöiden morfologisten poikkeavuuksien tunnistaminen on ensiarvoisen tärkeää sekä taloudellisesti että geneettisestä näkökulmasta (Lipenský, Lustyková & Čerovský 2010, 466).

Kausivaihtelu on huomattava tekijä sikojen lisääntymisessä, koska ne ovat hyvin herkkiä vuodenaikojen muutoksille (Lipenský, ym. 2010, 466). Siittiöiden morfologiassa on havaittu olevan negatiivista vaihtelua korkean lämpötilan sekä kosteuden vaikutuksesta (Garsia-Herreros, ym 2006, 557). Lämpö voi vaikuttaa siittiöiden tuotantoon ja liikkumiseen, akrosomin eheyteen, morfologiaan sekä aiheuttaa lieviä tai kohtalaisia kivesrappeutumia (Lipenský, ym. 2010, 466). Siittiöiden morfologia onkin merkittävä indikaattori osoitettaessa karjun kehon ja kiveksen terveyttä. Siittiöt reagoivat vahvasti ympäristön stressiin ja kehon fysiologisiin muutoksiin. (Menkveld, Holleboom & Rhemrev 2010, 59.)

Värjättäessä soluja voidaan paremmin havainnollistaa niiden osia ja rakenteita. Solut voidaan värjätä käyttämällä kahta tai useampaa väriä, jolloin osat erottuvat paremmin toisistaan. (Bruckner n.d.; Elliott 2012, 35.) Värjäysmenetelmät perustuvat kemiallisiin reaktioihin, kuten happo-emäs tai hapetus-pelkistys reaktioihin (Wulff 2004, 14). Morfologisen arvioinnin luotettavuus riippuu siittiöiden huolellisesta valmistelusta, kiinnityksestä sekä värjäyksestä. Yksi värjäysmenetelmän valinnan tärkeimmistä kriteereistä on, että värjäysprosessi aiheuttaisi mahdollisimman vähän muutoksia siittiön morfologiaan. (Horst & Maree 2009, 1.) Siittiöiden morfologian tutkimiseen on käytössä useita erilaisia värjäysmenetelmiä, esimerkiksi Papanicolaou, Giemsa, Diff-Guik, Hemacolor tai SpermBlue.

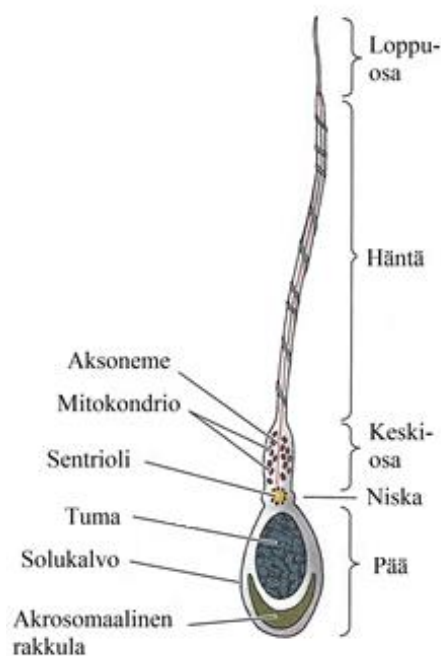
Opinnäytetyö tehtiin Finnpig Oy:n karjuasemalla Sastamalassa. Finnpig Oy on HKScan Finland Oy:n ja A-Tuottajat Oy:n omistama eläinhankintayhtiö, joka hankkii eläinaineksen kahdesta jalostusorganisaatiosta, norjalaisesta Topigs Norsvinista sekä tanskalaisesta DanAvl:sta. Karjuasemalla on noin 160 isärodun Duroc karjua ja 70 neljän eri emärodun

karjua. Emärodut ovat Norsvin Yorkshire (ZZ) ja Maatiainen (MM) sekä DanAvl Yorkshire (YY) ja Maatiainen (LL). DanAvl Yorkshire karjuilla on ollut ongelmia hedelmöittää emakoita. Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää menetelmä siittiöiden rakennepoikkeamien tutkimiseen ja tarkoituksena tutkia Norsvin ja DanAvl-emärotujen siittiöiden rakennepoikkeamia, mitkä saattavat vaikuttaa hedelmöittymiseen. Lisäksi seulottiin karjusemalla olevat emärodun karjut.

2 SIITTIÖ

2.1 Siittiön rakenne

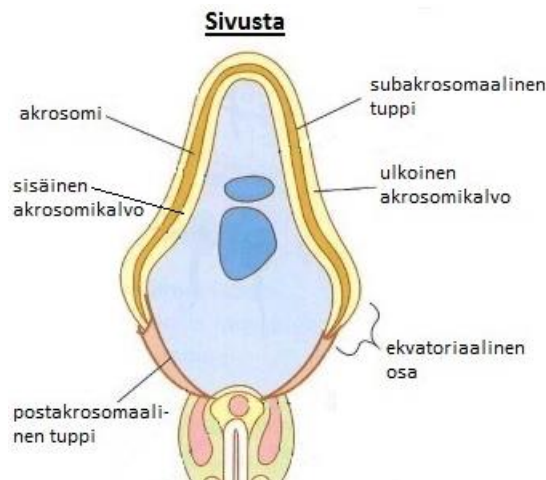
Siittiösolun rakenne on hyvin riisuttu. Se koostuu kolmesta yhden solukalvon rajaamasta osasta: päästä, keskiosasta ja hännästä (flagella) (kuvio 1). Jokaisella osalla on oma morfologia ja toiminnallisuus. (Alberts, Johnson & Lewis 2002.) Siittiön pää sisältää tuman, jossa DNA on tiiviisti pakkautuneena. Tumaa ympäröi proteiinkerros (akrosomi), joka voidaan jakaa kolmeen eri segmenttiin: subakrosomaalinen, ekvatoriaalinen sekä postakrosomaalinen tuppi (kuvio 2). (Sutovsky & Manandhar 2006, 3.)



KUVIO 1. Siittiön rakenne (Gilbert 2000, muokattu)

Akrosomaalinen rakkula rajaa Golgin laitteen sekä suojelee proteaaseja ja reseptoreita, joita tarvitaan siittiön ja oosyytin vuorovaikutuksessa. Se koostuu sisemmästä ja ulomasta akrosomikalvosta. Kalvot rakentuvat tiheästä akrosomimatriisista, joka sisältää proteaasin ja reseptorit. Subakrosomaalinenkerros sijaitsee akrosomaalisen rakkulan alla. Se on sulautunut sisäisen akrosomikalvon kanssa ja kiinnittää reseptorimolekyylit ulkoiseen akrosomikalvoon. Ekvatoriaalinen kerros on taittunut kompleksi proteiinkerroksesta sekä sisäisestä ja ulkoisesta akrosomikalvosta. Sen tehtävänä on reseptorimolekyy-

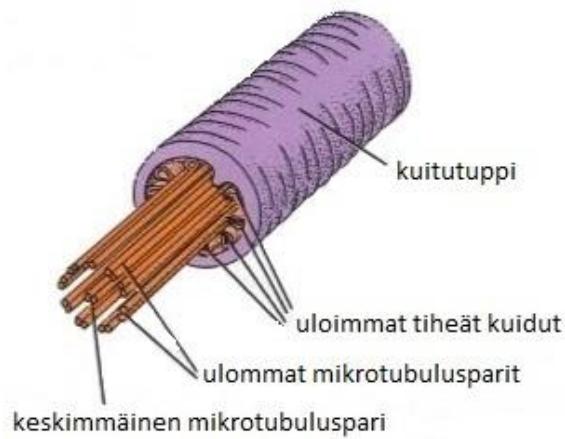
lien kuljetus siittiön päästä munasoluun. Postakrosomaalinen tuppi sisältää todennäköisesti munasolun aktivointiin tarvittavia signaalintiproteiineja. (Sutovsky & Manandhar 2006, 3–5, 6.)



KUVIO 2. Akrosomin rakenne (Evered & Sambayati 2015, muokattu)

Siittiön tuma on 40 kertaa pienempi kuin somaattisen solun (Agarwal, Erenpreiss & Sharma 2009, 67). Se määräytyy kahden merkittävän tapahtuman aikana spermiogeneesissä: tuman rakenteen lopullisessa muovautumisessa ja histonien korvautuessa protamiineilla. Nämä kaksi tapahtumaa johtavat erittäin pakattuun kromatiiniin, missä DNA on pakattu tiukasti ja täyttää lähes koko tuman. (Agarwal & Said 2005, 93.)

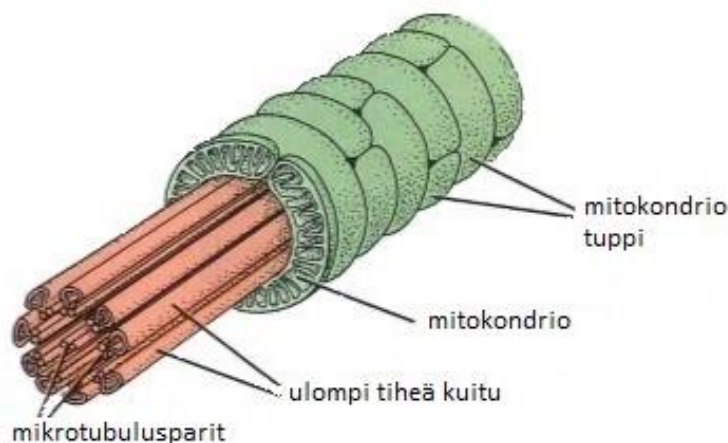
Siittiön häntä säätelee siittiön liikkumista ja sen toiminta perustuu ainutlaatuihin yhdeksän plus kaksi-järjestelmään (Sutovsky & Manandhar 2006, 6). Se sisältää moottorin tavoin toimivia osia, aksoneemeja. Aksoneemat (kuvio 3) muodostuvat mikrotubuluksista, jotka ovat peräisin keskusjyvästä. Aksoneeman ydin koostuu kahdesta keskusputkesta, joita ympäröi kehämikrotubulukset (yhdeksän kappaletta kaksoismikrotubuluksia). Vaikka mikrotubulukset ovat hännän perusrakennetta, myös muut proteiinit ovat kriittisiä rakenneosia sen toiminnan kannalta. (Gilbert 2000, 186–187.)



KUVIO 3. Aksoneeman rakenne (Ross & Pawlina 2011, muokattu)

Siittiön häntä voidaan jakaa neljään suureen segmenttiin: liitoskappaleeseen, keskiosaan, pääosaan ja loppuosaan. Segmenteillä on yhteinen sisin rakenne, aksoneema, mutta eri ulkoinen rakenne. Liitoskappale koostuu yhdeksästä poikkijuovaisesta tai segmentoidusta pylväsrakenteista. Pylväsrakenteiden sisällä on tiheä massa, joka useimmilla lajeilla sisältää keskusjyväsien. (Sutovsky & Manandhar 2006, 6–7.) Keskusjyväsien avulla siittiön häntä on kiinnittynyt päähän.

Hännän keskiosa on peittynyt mitokondriotupella (kuvio 4), joka muodostuu 75–100 siittiön mitokondriosta. Mitokondriot tuottavat energiaa hännän rakenneseosien liikkumiseen. Jokainen siittiö kuljettaa useita kopioita paternaalisesta mitokondriogenomista, jotka poistetaan proteolyysillä hedelmöittyneen munasolun sisällä. Pääosa erotellaan keskiosasta renkaan avulla. Poikittainen, rakenteeltaan tiheä rengas sijaitsee distaalisesti mitokondriotuppeen nähden. (Sutovsky & Manandhar 2006, 6–7.)



KUVIO 4. Mitokondriotuppi (Ross & Pawlina 2011, muokattu)

Pääosa on peittynyt suojaavalla kuitutupella. Kuitutuppi muodostuu kahdesta pitkittäisestä, samansuuntaisesta pylväsrakenteesta, jotka ovat toisiinsa liitettyinä sarjalla poikittaisia kaaria. Kuitumainen tuppi tukee siittiön aksoneemaa ja samaan aikaan proteiinit näyttävät rajaavan proteiinikinaaseja kuitutupen sisälle. Proteiinikinaasit ovat välttämättömiä siittiön kapasitaatiolle ja ylivilkkaudelle ennen hedelmöitystä. Loppuosa sisältää keskimmäisen mikrotubulusparin, ulomman tiheän kuidun ja kuitumaisen tupen. (Sutovsky & Manandhar 2006, 6–7.)

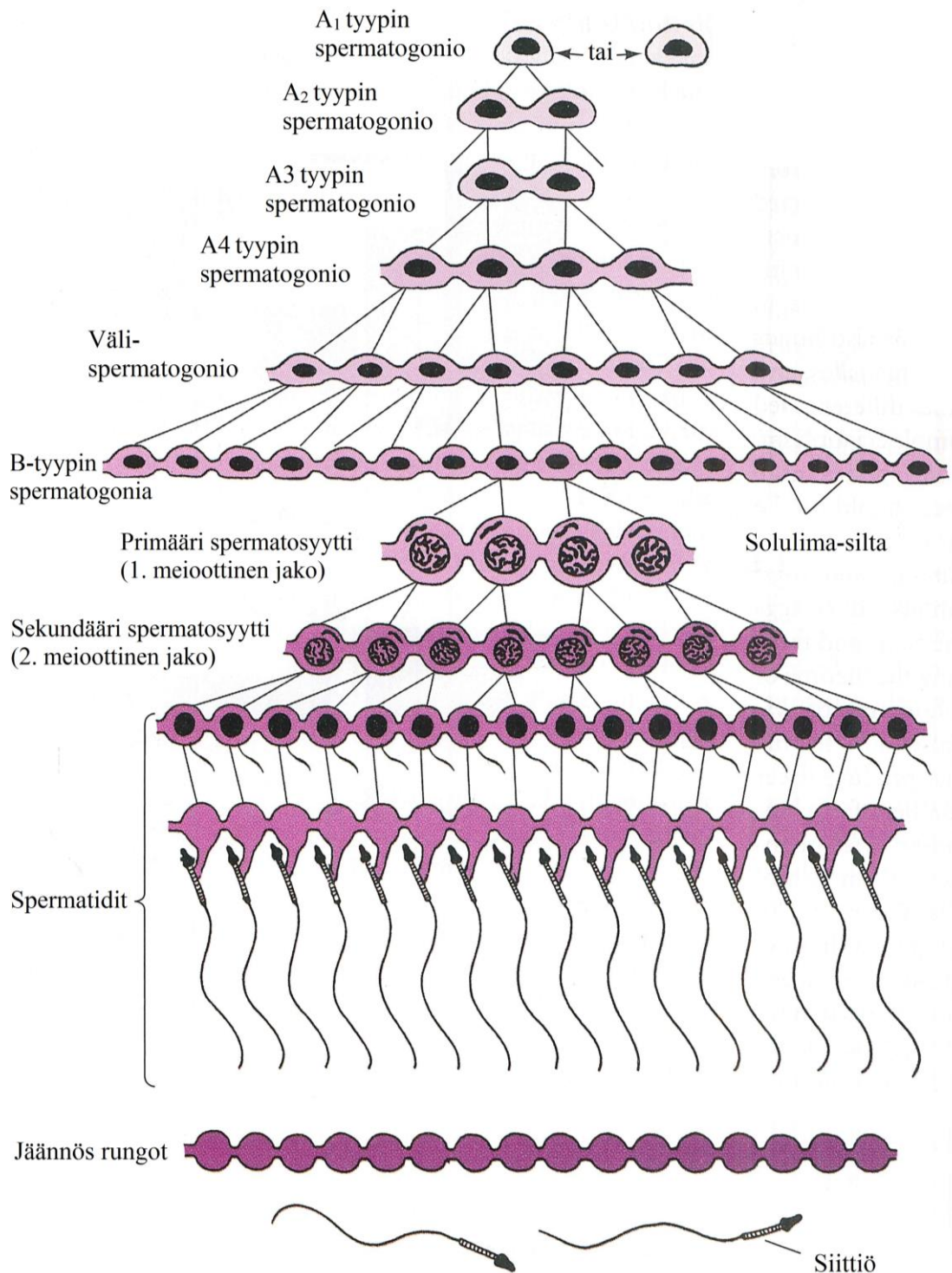
Hännän työntövoiman saa aikaan dyneiini-proteiini, joka hydrolysoi ATP-molekyyliä ja muuntaa vapautuneen kemiallisen energian mekaaniseksi energiaksi. Mekaaninen energia saa aikaan ulomman mikrotubulusparin liukumisen, minkä seurauksena häntä taipuu. Dyneiinin lisäksi histonit ovat tärkeitä proteiineja hännän rakenneosana. Histonit löytyvät yleensä tuman sisältä siittiön päästä, mutta niitä esiintyy myös hännässä stabilisoimassa mikrotubuluksia, jotta ne eivät purkaannu. (Gilbert 2000, 187.)

2.2 Spermatogeneesi

Spermatogeneesin tarkoituksena on luoda ja ylläpitää siittiöiden päivittäistä tuotantoa, mikä vaihtelee nisäkkäillä ihmisen yli 200 miljoonasta sonnin 2–3 miljardiin siittiöön. Massiivinen siittiöiden tuotanto edellyttää ainutlaatuista rakennetta siementiehyiden epi-teelisoluisissa sekä hyvin verenkierrosta eristettyä itsenäistä järjestelmää, joka on selektiivinen vain parakriinisille tekijöille. Parakriinisella tasolla spermatogeneesia ohjaa hypotalamuksen erittämä gonadotropiinihormoni, joka stimuloi kahta aivolisäkkeen erittämää hormonia: follikkelia stimuloivaa (FSH) ja luteinisoivaa hormonia (LH) (Sutovsky & Manandhar 2006, 7, 15.)

Spermatogeneesi vaatii sukusolujen jatkuvaa erilaistumista ja uusimista. Se jaetaan kolmeen vaiheeseen: proliferatiivinen vaihe, meioottinen vaihe ja spermiogeneesi. (Sutovsky & Manandhar 2006, 12.) Spermatogeneesi kestää kokonaisuudessaan 70–80 vuorokautta (Martin 2015). Proliferatiivinen vaihe käsittää alkuitusolujen ja spermatogonioiden peräkkäiset mitoottiset jaot. Meioottisessa vaiheessa spermatogonioiden kromosomiluku puolittuu, jolloin ne kykenevät erilaistumaan siittiöiksi. Siementiehyissä proliferatiivinen ja meioottinen vaihe voivat esiintyä samanaikaisesti tai peräkkäin. (Sutovsky & Manandhar 2006, 12.)

Spermatogeneesissä siittiöt kehittyvät alkuitusoluista karjun kiveksissä sijaitsevista siementiehyissä. Hiirikokeilla on osoitettu, että spermatogeneesiä säätelee todennäköisesti BMP8B-säätelyaineen synteesi. Säätelyaineen pitoisuuden noustessa kriittiseksi, alkuitusolujen erilaistuminen käynnistyy. Erilaistuvat alkuitusolut tuottavat suuria määriä BMP8B-säätelyainetta, jota voidaan edelleen hyödyntää alkuitusolujen erilaistumisessa. (Gilbert 2000, 599.) Spermatogeneesin vaiheet on esitetty kuviossa 5.



KUVIO 5. Spermatogeneesin vaiheet (Gilbert 2000, muokattu)

2.2.1 Proliferatiivinen vaihe

Alkuitusolut muodostuvat alkionkehityksen aikana ja jakautuvat A₁-tyypin spermatogonioiksi, minkä jälkeen sukupuolijuosteet kovertuvat siementiehyiksi ja kypsyneet solut erottuvat johtimista osaksi Sertoli-soluja. Spermatogeneesikierron sukusolut kiinnittyvät Sertoli-soluihin N-kadheriinimolekyylien sekä galaktosyyli transferaasimolekyylien avulla. N-kadheriinimolekyylit ja galaktosyyli transferaasimolekyylit sitoutuvat Sertoli-solun pinnalla oleviin hiilihydraatti reseptoreihin. Sertoli-solut ravitsevat ja suojaavat kehittyviä siittiösoluja. (Gilbert 2000, 599.)

A₁-spermatogonioille tyypillistä on munanmuotoinen tuma, jossa kromatiini on kiinnittynyt tumakalvoon. Lisäksi ne ovat pienempiä kuin alkuitusolut. A₁-spermatogoniot sijaitsevat ulomman tyvikalvon vieressä sukupuolijohtimissa. Ne ovat kantasoluja, jotka kykenevät regeneroitumaan sekä erilaistumaan uudeksi solutyypiksi, tässä tapauksessa A₂-tyypin spermatogonioiksi. Spermatogonioiden jakaantuminen ei ole täydellistä, sillä solukalvo ei jakaudu täysin vaan solut jäävät kiinni toisiinsa solukalvosillalla (kuvio 5.). (Gilbert 2000, 599.)

A₂-spermatogoniot jakaantuvat tuottaen A₃-spermatogonioita ja A₃-solut edelleen, tuottaen A₄-spermatogonioita. A₄-spermatogonioilla on kolme vaihtoehtoa; ne voivat muodostaa toisia A₄-soluja, suorittaa apoptoosin tai erilaistua ensimmäiseksi kantasolutyypiksi eli väli-spermatogonioksi. Väli-spermatogoniot jakaantuvat kerran mitoottisesti muodostaen B-tyypin spermatogonioita. Nämä spermatogoniot ovat spermatosyyttien edeltäjiä ja spermatogeneesin viimeisiä soluvaiheita, jotka jakaantuvat mitoottisesti. (Gilbert 2000, 599–600.)

2.2.2 Meioottinen vaihe

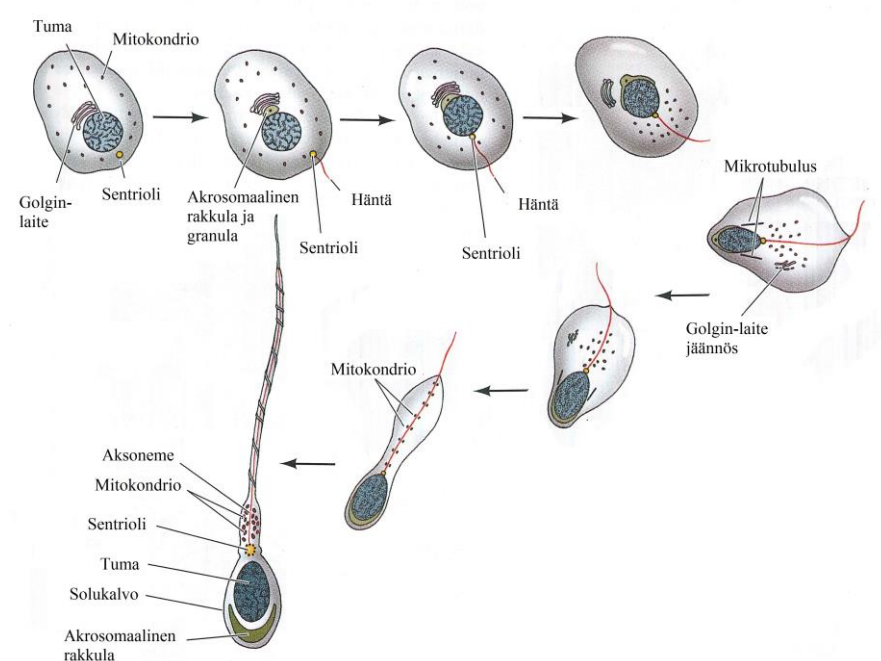
Spermatogoniot jakaantuvat kerran tuottaen primäärisen spermatosyytin. Jokainen syntynyt primääri spermatosyytti käy läpi spermatogeneesin ensimmäisen meioottisen jaon, jolloin syntyy sekundääri spermatosyyttipari. Sekundääri spermatosyytit jakaantuvat toisessa meiosisissa tuottaen haploidisia spermatidejä. Spermatidit ovat myös toisissaan

kiinni solukalvosillalla. Vaikka spermatidit ovat perimältään haploidisia, voivat ne toiminnallisesti olla diploideja, sillä geeniperimä voi solukalvosillan välityksellä siirtyä viereiseen soluun. (Gilbert 2000, 599–600.)

Kehittyessään A-tyypin spermatogoniosta spermatidiksi, solut siirtyvät kauemmaksi siementiehyen tyvikalvosta kohti lumenia. Spermatidit sijaitsevat lumenin rajalla, jossa ne menettävät solukalvoyhteyden toistensa välillä. Solukalvoyhteyden hävitessä spermatogeneesin meioottinen vaihe päättyy ja spermatidit kykenevät erilaistumaan siittiöiksi. Meioottisessa vaiheessa syntyneet haploidit spermatidit ovat pyöreitä, hännättömiä soluja, jotka eivät muistuta rakenteeltaan lainkaan siittiöitä. (Gilbert 2000, 600.)

2.2.3 Spermiogeneesi

Viimeinen vaihe spermatogeneesissä on spermiogeneesi (kuvio 6) eli siittiöiden erilaistuminen. Kun siittiö on saavuttanut spermatidi-muodon ja jättänyt siementiehyiden tubulussolut, sen on tehtävä joukko fysiologisia muutoksia kyetäkseen hedelmöittämään munasolu (Bearer & Friend, 1990). Spermiogeneesissä siittiö valmistellaan kohtaamaan munasolu kehittämällä muun muassa sen liikkuvuutta. Saavuttaessaan liikkuvuutta siittiön on luovuttava useimmista soluelimistä ja suurimmasta osasta sytoplasmista tilavuuttaan. (Sutovsky & Manandhar 2006, 18.)



KUVIO 6. Spermiogeneesin vaiheet (Gilbert 2000, muokattu)

Spermiogeneesi alkaa pään akrosomirakkulan muodostumisella Golgin laitteesta. Akrosomirakkulan muodostumisen jälkeen solun tuma kääntyy, jotta keskusjyvänen (sentrili) on ytimen vastakkaisella puolella akrosomiin nähden. Kääntyminen on tärkeää hännän muodostumisen vuoksi, sillä häntä kiinnittyy keskusjyväsen avulla solun ytimeen. Viimeisessä vaiheessa tuma litistyy ja tiivistyy, jäljelle jäänyt solulima häviää ja mitokondriot järjestäytyvät hännän molemmin puolin. (Gilbert 2000, 600.)

Spermiogeneesissä suurin muutos tuman kannalta on histonien korvautuminen. Spermiogeneesin aikana nukleosomit erottuvat, jolloin histonit korvautuvat protamiineilla. Histonien korvautuminen pysäyttää transkription tumassa ja helpottaa siittiölle tyypillisen rakenteen muodostumista. Rakenteen muodostumisen jälkeen kehittyneet siittiöt vapautuvat lumeniin. (Gilbert 2000, 600.)

2.3 Siittiön morfologia

Siittiöiden morfologia on yksi tapa arvioida siittiön elinkelpoisuutta sekä antaa lisätietoja siemennesteen laadusta sen sijaan, että arvioitaisiin pelkkää elävyyttä (Rozeboom 2000). Siittiön morfologian on osoitettu yhdessä DNA:n eheyden kanssa olevan luotettavin ja vakain parametri arvioitaessa siittiöitä, verrattuna esimerkiksi liikkuvuuden arviointiin (Abu Hassan Abu, Franken, Hoffman & Henkel 2012, 575). Arvioitaessa visuaalisesti karjun siittiöiden morfologiaa, saadaan tietoa siittiön kehitys- ja kypsymistapahtumasta sekä siemensyöksystä. Jos näytteessä on suuri määrä morfologisesti epänormaaleja siittiöitä, on todennäköistä, että siittiöiden kehittämisessä on tapahtunut häiriöitä tai siemennestettä käsitelty väärin. (Althouse 1997.)

Morfologisesti kypsä siittiö sisältää minimaalisen määrän rakenteita, joilla se kykenee hoitamaan tehtävänsä, eli uimaan munasoluun, tunnistamaan ja hedelmöittämään sen. Siittiö on rakenteeltaan virtaviivainen ja kukin sen osista vaikuttaa tiettyyn vaiheeseen munasolun hedelmöittämisessä. Vaikka siittiö on rakenteeltaan pitkälle erikoistunut, on sen käyttäytyminen analogista muihin soluihin nähden. (Baerer & Friend 1990, 281.)

Osa siittiöistä on aina morfologialtaan poikkeavia. Kun poikkeavia osia on liikaa, vaikuttavat ne hedelmällisyyteen. Poikkeamat siittiöiden rakenteissa voivat olla päässä, keskiosassa tai hännässä, ja joillakin siittiöillä samanaikaisesti useammassa paikassa. (Rouge

2004.) Siittiön pään ja hännän ollessa normaalirakenteisia on se morfologisesti normaali. Kaikki rajatapaukset luokitellaan morfologiselta rakenteeltaan epänormaaleiksi. Siittiön pään tulee olla sileä, säännöllisesti muotoiltu ja yleiseltä muodoltaan hieman soikea. Akrosomaalisen rakkulan tulee kattaa 40–70 % päästä. Keskiosan tulee olla hoikka, säännöllinen ja suunnilleen samanpituinen pään kanssa. Hännän tulisi olla suora ja ohuempi kuin keskiosan. (World Health Organization 2010, 68.)

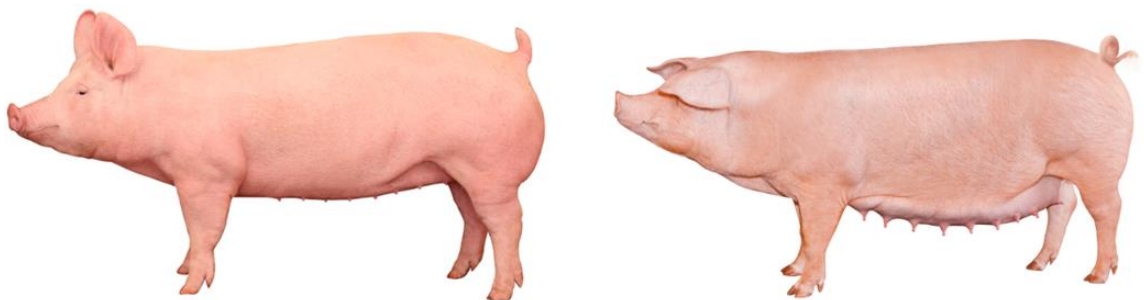
Rakennepoikkeamat jaotellaan kolmeen luokkaan vakavuuden perusteella: primäärisiin, sekundäärisiin ja tertiäärisiin. Primääriset rakennepoikkeamat sijaitsevat päässä tai hännässä, jolloin ne vahingoittavat geneettistä materiaalia tai heikentävät hännän toimintaa. Niiden ajatellaan muodostuvan siementiehyissä siittiön kehitysvaiheessa. Sekundäärisiä rakennepoikkeamia ovat proksimaaliset ja distaaliset sytoplasman pisarat. Tertiääriset rakennepoikkeamat johtuvat vääränlaisesta siemennesteen käsittelystä ja niihin luokitellaan esimerkiksi kietoutuneet hännät. Sekundäärisiä ja tertiäärisiä poikkeamia voidaan kompensoida lisäämällä siittiöiden määrää keinosiemennysannoksessa. (Rodríguez 2012, 16; Rouge 2004.)

3 TOPIGS NORSVIN JA DANAVL

3.1 Topigs Norsvin ja emärodut

Topigs Norsvin on yhtiö, joka syntyi vuonna 2014 Topigs Internationalin ja Norsvin Internationalin fuusioituessa. Topigs Norsvin on yksi maailman suurimmista eläinaineksen toimittajista. Sen tuotanto on yli 1,6 miljoonaa risteytysensikkoo ja yli yhdeksän miljoonaa siemenannosta vuodessa. Se on tunnettu innovatiivisesta lähestymistavastaan uusien teknologioiden käytössä ja jatkuvassa kehityksessä. Yrityksen kulmakiviä ovat tutkimus, innovaatio ja geneettisen levittämisen parantaminen. (Topigs Norsvin 2015a.)

Norsvin-emärotuja ovat Z-linja ja Maatiainen (kuva 1). Norsvin ZZ on puhdasrotuinen York-linja, joka tunnetaan hyvästä hedelmällisyydestä ja luotettavuudesta. Norsvin MM on puhdas maatiainen, jossa ei ole vaikutteita muiden rotujen genetiikasta. Tästä johtuen sillä on vahva geneettinen profiili. (Topigs Norsvin 2015b.)



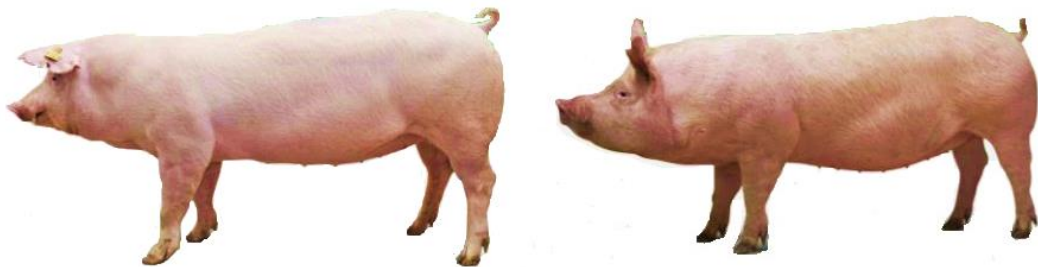
KUVA 1. Norsvin ZZ ja MM (Topigs Norsvin 2015b, muokattu)

3.2 DanAvl ja emärodut

DanAvl on jalostusorganisaatio, jota hallinnoi tanskalainen sikatutkimuskeskus, Pig Research Centre (PRC). PRC on hallitus, joka koostuu osittain tanskalaisista sikatuottajien yhdistyksistä, Tanskan teurastamoista, viljelijöiden yhdistyksistä, siankasvattajista ja vapaaehtoisista siankasvattajista, jotka ovat liittyneet järjestelmään omasta tahdostaan. DanAvl on avoin järjestelmä kaikille, jotka ovat sitoutuneet noudattamaan PRC:n laati-

mia yhteisiä sääntöjä ja allekirjoittaneet sopimukset tutkimuskeskuksen kanssa. Avoimuudella varmistetaan oikeudenmukainen sisäinen kilpailu eri osapuolten välillä organisaatiossa. (DanAvl n.d.)

DanAvl-emärotuja ovat Maatiainen (LL) ja Yorkshire (YY) (kuva 2). DanAvl-maatiainen on voimakas sika, jolla on erilainen fyysinen ulkonäkö. Niillä on pitkä ja laiha ruumiinrakenne sekä ohut karvapeite. Väriltään ne ovat valkoisia ja niillä on isot roikkuvat korvat. (Oklahoma State University 1996.) Yorkshirea käytetään emärotuna kuten maatiaistakin. Se on voimakas sika, jolla on korkea hedelmällisyys sekä hyvät äidinvaistot. (SBPork 2016.) DanAvl maatiaista ja Yorkshirea käytetään tuottamaan hybridiemakoita eli LY/YL.



KUVA 2. DanAvl LL ja YY (DanAvl n.d., muokattu)

4 SOLUVÄRJÄYS

4.1 Soluvärjäyksen periaate

Soluvärjäyksen avulla voidaan paremmin havainnollistaa soluja ja solujen osia mikroskoopilla. Se onkin tärkein syy värjäykseen. Käyttämällä erilaisia värejä saadaan värjättyä koko solu tai solun komponentteja. Soluja voidaan värjätä korostamaan metabolisia prosesseja, erottamaan kuolleet elävistä tai luokitella biomassasta vain osa soluista. Useimpia värejä voidaan käyttää kiinteisiin tai ei-eläviin soluihin, kun taas vain harvoja elävien solujen värjäykseen. Värjäyksessä voidaan käyttää kahta tai useampaa väriainetta solun eri osien erottamiseen toisistaan. Solujen värjäys- ja valmistelutekniikat riippuvat käytettävistä värjäys- ja analysointimenetelmistä (Bruckner n.d.; Elliott 2012, 35.)

Monet värjäysmenetelmät perustuvat happo-emäs, hapetus-pelkistys tai muihin alkeisKemiallisiin reaktioihin (Wulff 2004, 14). Eri solun osat voidaan erotella niiden värinsitomiskyvyn mukaan, jolloin värjäys tapahtuu selektiivisesti. Värjäys voi olla joko progressiivinen tai regressiivinen. Progressiivisessa värjäyksessä solun värjäysaika rajoitetaan, jolloin saavutetaan sopiva värikylläisyys. Regressiivisessä värjäyksessä solu yli-värjätään, minkä jälkeen ylimääräinen väri pestään pois. (Suomen virtuaaliyliopisto 2006.) Väriaineen konsentraatio vaikuttaa sen kykyyn värjätä progressiivisesti tai regressiivisesti. Konsentraatioltaan matala väriaine värjää hitaasti ja progressiivisesti. Yli-värjäytyminen regressiivisessä värjäyksessä saadaan aikaan korkeakonsentraatioisella väriaineella. (Bibbo 1991, 885; Bancroft & Stevens 1982, 95–107.)

Solun värjäytymiseen vaikuttavat solujen kiinnitys, näytteen ja väriaineen pH sekä reaktioaika ja värin poistuminen solusta. Väriaineiden näkyminen värillisinä perustuu niiden kykyyn absorboida sähkömagneettista säteilyä näkyvän valon alueella, aallonpituuksilla 400–650 nm. Solun värjäytyminen riippuu solun ja väriaineen välisestä affiniteetistä eli sitoutumisvoimakkuudesta. (Horobin 2008, 105–106, 113.) Väriaineet voivat muodostaa ioni-, vety-, Van der Waals- tai kovalenttisia sidoksia sekä hydrofobisia vuorovaikutuksia solujen kanssa (Cook 2006, 68).

Ionisidosten muodostuminen perustuu pH:sta riippuvaan Coulombin voimaan. Mitä suurempi varausero solun ja väriaineen välillä on, sitä voimakkaampia sidokset ovat. (Horbis 2008, 105–106.) Vetysidokset eivät ole riippuvaisia pH:sta tai suolapitoisuudesta mutta niihin vaikuttavat voimakkaasti vetysidosaineet kuten urea tai vesi. Van der Waals sidokset ovat lyhyen kantaman voimia ja vaikuttavat vain, jos kaksi atomia ovat noin 0,12–0,2 nanometrin päässä toisistaan. Ne voivat muodostua minkä tahansa kahden atomin välille. Kovalenttiset sidokset ovat voimakkaita mutta harvinaisia. Hydrofobiset vuorovaikutukset ovat lyhyen kantamia kuten Van der Waals sidokset ja niihin ei vaikuta vetysidosaineet tai suolat. (Cook 2006, 68–73.)

4.2 Värjäysprosessi

Ennen värjäystä objektilasit tulee värjäysmenetelmästä riippuen antaa kuivua ja kiinnittää kuivumisen jälkeen tai kiinnittää välittömästi levityksen jälkeen. Näytteiden kiinnittäminen ennen värjäystä on välttämätöntä, jotta näytteiden tuhoutuminen saadaan pysäytettyä ja morfologia säilytettyä. Kiinnitys on tehtävä mahdollisimman pian, sillä solut kuivuvat nopeasti. Kuivuneiden solujen värjäytyminen saattaa olla vaihtelevaa tai ne värjäytyvät vain toisella värillä. (Holliday 2004, 17.)

Kiinnittäminen voidaan tehdä fysikaalisesti tai kemiallisesti. Fysikaalisia tapoja ovat esimerkiksi kuumentaminen, mikroaalloilla tehty tai jäädyttäminen. Kemiallisessa kiinnityksessä käytetään orgaanisia ja ei-orgaanisia liuottimia ylläpitämään riittävää morfologiaa. Kemiallisia tekniikoita ovat esimerkiksi saostus, kuivasaostus, formaldehydi, glutaraldehydi tai alkoholikiinnitys. Kiinnittämisen tehtävänä on säilyttää solu tai kudokse myöhempää käsittelyä varten. Sitä käytetään lopettamaan solun aineenvaihdunta, estämään entsymaattinen toiminta sekä tappamaan patogeeniset mikro-organismit, kuten bakteerit. (Grizzle, Fredenburgh & Myers 2008, 55–61; Ross & Pawlina 2011, 2.)

Kiinnityksellä on vaihteleva vaikutus soluun ja sen avulla voi jopa päättää onko solussa mitään nähtävää (Elliott 2012, 35). Elinkykyisillä soluilla on koteloitu kalvo, minkä kiinnitysliuos hajottaa ja mahdollistaa näin suurienkin molekyylien pääsyn soluun. Kiinnityksnesteen vaatimukset vaihtelevat värjäystekniikoiden mukaan, esimerkiksi ennen Giemsa-värjäystä tulee tehdä ilmakeiväus ja Papanicolaou-menetelmää varten märkäkiinnitys (Holliday 2004, 17.) Yleisin käytetty kiinnitysliuos on formaliini. (Elliott 2012,

35). Formaliinin tehtävänä on pysäyttää solun aineenvaihdunta ja säilyttää sen rakenne. Se muodostaa ristisidoksia solun proteiinien välille sekä kiinnittää ja kovettaa solun jatkokäsittelyä varten. (Reagena 2016.)

Jotkut väriaineet tarvitsevat peittausta ennen varsinaisen värjäyksen suorittamista. Sen avulla voidaan tehdä useita värjäyksiä peräkkäin ja väriaine ei katoa vesipesun tai -poiston yhteydessä. Peittausaineita ovat usein metallisuolat tai hydroksidit. Ne sitoutuvat väriaineen kanssa muodostaen liukenemattoman yhdisteen. (Suomen virtuaaliyliopisto. 2006.) Peittauksen ja kiinnittämisen jälkeen värjäys voidaan suorittaa valitun menetelmän mukaisesti.

4.3 Morfologiset värjäysmenetelmät

Siittiöiden morfologian arviointia varten on kehitetty eri värjäysmenetelmiä. (Henkel ym. 2008, 449). Tällä hetkellä ei kuitenkaan ole saatavilla morfologista värjäysmenetelmää, joka olisi yksinkertainen (yksi liuos), nopea ja värjäisi siittiön osat erottelevasti värjäämättä taustamateriaalia. Lisäksi menetelmä olisi osmoottisesti ja/tai fysiologisesti sovitettu siemennesteeseen ja sitä voitaisiin soveltaa kaikkiin lajeihin selkärangattomista ihmiseen. (Horst & Maree 2009, 2.)

Papanicolaou- ja Shorr-värjäyksistä on tullut standardisoituja menetelmiä, sillä ne täyttävät Maailman terveysjärjestön ja Tugerbeginin asettamat kriteerit (Horst & Maree 2009, 2). Papanicolaou-menetelmän tilalle tutkijat ovat etsineet yksinkertaisempaa ja nopeampaa menetelmää, sillä se sisältää yli 20 käsittelyvaihetta ja 12 reagenssia. Lisäksi kiinnitys ja/tai ksyleenikuivatus saattavat aiheuttaa siittiöiden kutistumista. (Maree ym. 2010, 1370.)

Diff-Quik, Hemacolor ja Giemsa ovat nopeita arviointimenetelmiä siittiön morfologiasta ja kromatiinin tilasta. Ne sisältävät lyhyet kiinnitysajat sekä kaksi värjäysvaihetta, jotka vievät vain muutamia sekunteja. Huolimatta Diff-Quik:n aiheuttamasta siittiöiden turvotuksesta ja taustan värjäytymisestä on se rutiininomaisesti laajalti käytetty menetelmä. Spermac on myös nopea menetelmä siittiöiden morfologian tutkimiseen. Sen haittapuolina ovat taustanvärjäytyminen ja hankaluus saada värjäys onnistumaan. Uutena menetel-

mänä on tullut SpermBlue, jonka tärkeimmät edut ovat yksinkertainen ja nopea värjäystoimenpide sekä siittiön osia erotteleva värjäys. Eosin-nigrosin värjäys kehitettiin osoittamaan elävät ja kuolleet solut. Sitä on käytetty myös siittiön morfologian arvioimiseen, vaikka se ei erottelekaan siittiön osia selkeästi toisistaan. (Horst & Maree 2009, 2; Maree ym. 2010, 1370.)

Morfologisen arvioinnin luotettavuus riippuu huolellisesta valmistelusta, kiinnityksestä ja värjäyksestä, sillä kyseiset tapahtumat voivat muun muassa vaikuttaa siittiön pään mittoihin ja/tai muotoon. Värjäysmenetelmän valinta riippuu sen vaikutuksista siittiön morfologiaan sekä kyvystä värjätä siittiöt erottelevasti, jolloin pää, akrosomi, post-akrosomin alue, keskiosa ja häntä erottuvat selkeästi toisistaan. Värjäystekniikoiden välillä on havaittu olevan suuria eroja pään akrosomin koossa, jolloin myös tämä vaikuttaa menetelmän valintaan. Taustan värjäytymistä voidaan vähentää pesemällä siemenneste ennen levitystä. (Maree, Plessis, Menkveld & Horst 2010, 1370, 1376.)

Siittiöiden kokoon vaikuttavat kaksi tekijää, ympäröivän aineen, tässä tapauksessa väriaineen, osmolaliteetti ja toonisuus. Mareen ym (2010, 1376) tutkimuksissa on raportoitu, että siittiöt paisuvat hypotonisessa liuoksessa ja kutistuvat hyperosmoottisissa olosuhteissa. Kiinnitysliuoksia ja värejä vertailtaessa ksyleeni, alkoholi ja dehydraatio voivat aiheuttaa äärimmäisiä hypo-osmoottisia olosuhteita muihin verrattuna ja kutistaa soluja. SpermBlue menetelmällä on osoitettu olevan vähemmän vaikutusta siittiöiden pään kokoon kuin Papanicolaoulla, mikä johtuu tasapainoisesta suolojen suhteesta SpermBlue liuoksissa. (Maree ym. 2010, 1376.)

5 KOKEELLINEN OSUUS

5.1 Materiaalit ja menetelmät

Tutkimuksen tavoitteena oli löytää morfologinen värjäysmenetelmä karjun siittiöiden tutkimiseen. Menetelmää haettaessa siemennestenäytteitä otettiin satunnaisista tuotantohyppyistä, jotka värjättiin kahdella eri Minituben värjäysmenetelmällä (Farelly ja Spermac). Värjäysmenetelmän valitsemisen jälkeen kokeiltiin laimennussuhteita ja laimentimia. Näytteet laimennettiin Androstar Plus-antibiootti- ja 0,9 % NaCl-liuoksella 1:1 ja 1:2.

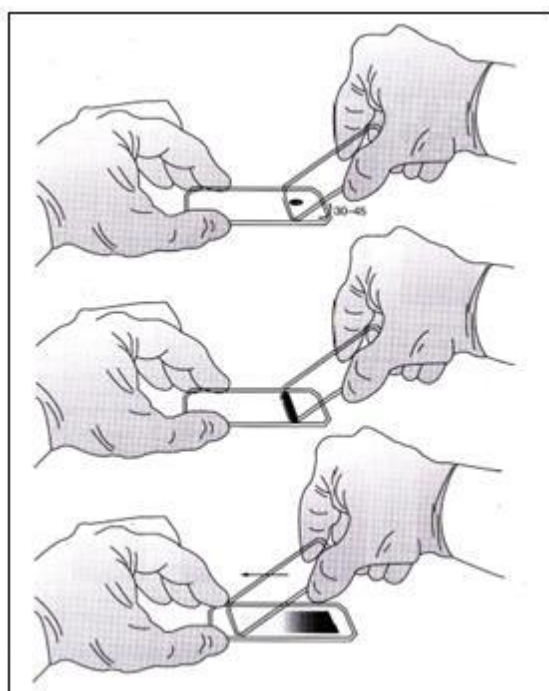
Farelly Stain on tarkoitettu tuoreiden tai laimennettujen siittiösolujen diagnostiseen värjäykseen. Sitä ei voida käyttää jäädytettyihin soluihin, jotka sisältävät glyserolia. Kitti sisältää kolme komponenttia, fiksaatioliuoksen (Formaliini 3,5 %), Aniliini-sinisen 5 % ja Kristallivioletin 0,5 %. (Minitube nd.) Erotteleva värjäys mahdollistaa pään, akrosomin, ekvatoriaalisen alueen, keskipisteen ja hännän visualisoinnin (Minitube 2016).

Spermac Stain on Minituben morfologinen värjäyssarja, joka sisältää fiksaatioliuoksen ja kolme väriliuosta (akrosmoniväri, siittiön pään- ja keskiosan värit) Sitä käytetään pään, akrosomin ja hännän visualisointiin, jotta morfologiset epämuodostumiset eri solun alueilla voidaan tunnistaa. Spermac Stain-sarjalla siittiösolun pää värjäytyy punaiseksi, akrosomi ja häntä vihreiksi. Erotteleva värjäys mahdollistaa poikkeamien havaitsemisen ja sitä voidaan käyttää myös pakastettujen siittiöiden värjäämiseen. (Minitube n.d.)

Siittiöiden morfologiaa tutkittaessa materiaalina käytettiin 58 emärodun karjua, 18 YY-karjua, 16 ZZ-karjua, 14 LL-karjua sekä 10 MM-karjua. Jokaisesta karjasta otettiin yksi siemennestenäyte, joka värjättiin Farelly-sarjalla. Näytteistä laskettiin virheelliset siittiöt 100 siittiötä kohti. Rakennepoikkeamien havaitsemista varten laskettiin yhteensä 34 800 siittiötä.

5.2 Työn suoritus

Värjäyksiä varten kustakin siemennestenäytteestä valmistettiin kuusi kappaletta preparaatteja. Siemenneste laimennettiin 1:1 suolaliuokseen pipetoimalla korkilliseen putkeen 1 ml suolaliuosta ja 1 ml raakasiementä. Seos sekoitettiin hyvin ja jokaiselle objektilasille pipetoitiin käänteisesti 5 µl. Levitys tehtiin toisella objektilasilla asettamalla lasi 30–40° kulmaan kuvion 7 mukaisesti ja vetämällä lasia, jotta pisara levisi sen alle. Pisaran levitetyä lasin alle, lasi työnnettiin varovasti itsestä poispäin objektilasin toiseen päähän. Objektilasit jätettiin kuivumaan huoneenlämpöön yön yli.



KUVIO 7. Preparaatti (Rodak & Carr 2013)

Yön yli kuivuneet objektilasit värjättiin Minituben Farelly- ja Spermac-väreillä. Farelly-värjäyksessä objektilasit upotettiin kiinnitysluokseen 10 sekunniksi, ravisteltiin ylimääräinen liuos pois ja upotettiin Aniliini-siniseen 20 sekunniksi. Ylimääräinen väri ravisteltiin, minkä jälkeen objektilaseja käytettiin 5–6 kertaa UHP-vedessä ja lasien reunat kuivattiin varovasti suodatinpaperilla. Pesun jälkeen objektilasit upotettiin kristallivioletti -liuokseen viideksi sekunniksi ja toistettiin pesu sekä kuivaus. Värjäyksen jälkeen objektilasit jätettiin kuivumaan pystyasennossa huoneenlämpöön yön yli.

Spermac-värjäys suoritettiin upottamalla objektilasit kiinnitysluokseen viideksi minuutiksi, minkä jälkeen niitä kuivattiin lämpökaapissa +37 °C 15 minuutin ajan. Kuivaamisen

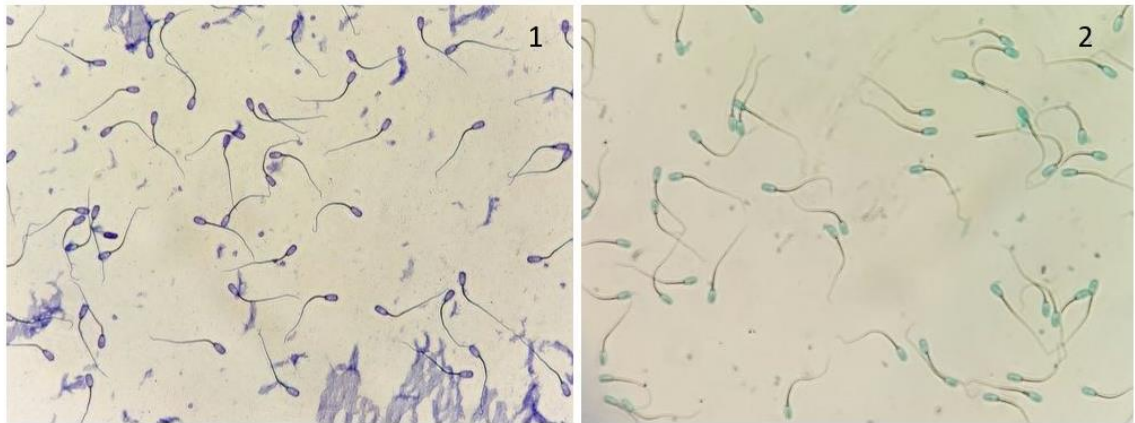
jälkeen lasit upotettiin A-liuokseen yhden minuutin ajaksi, minkä jälkeen ne pestiin käyttämällä muutaman kerran UHP-vedessä. Pesun jälkeen lasit laitettiin B-liuokseen minuutin ajaksi ja toistettiin pesu. Lopuksi lasit upotettiin C-liuokseen minuutin ajaksi ja toistettiin pesu. Värjäyksen jälkeen objektilasien annettiin kuivua pystyasennossa 12 tuntia.

Kuivuneita objektilaseja tarkasteltiin Olympus CX31 mikroskoopilla 20x, 40x ja 100x objektiiveilla. Rakennepoikkeamat laskettiin käyttäen 100x objektiivia, immersioöljyä ja kahta solulaskuria. Karjuja seulottaessa rakennepoikkeamat laskettiin kaikista kuudesta näytteestä, joista otettiin keskiarvo. Lasketut rakennepoikkeamakeskiarvot karjukohtaisesti on esitetty liitteen 2, taulukoissa 1–4. Lisäksi kokeelliseen osuuteen liittyen tehtiin työohje (liite 1) preparaatin ja Farelly-värjäyksen suorittamisesta.

6 TULOKSET

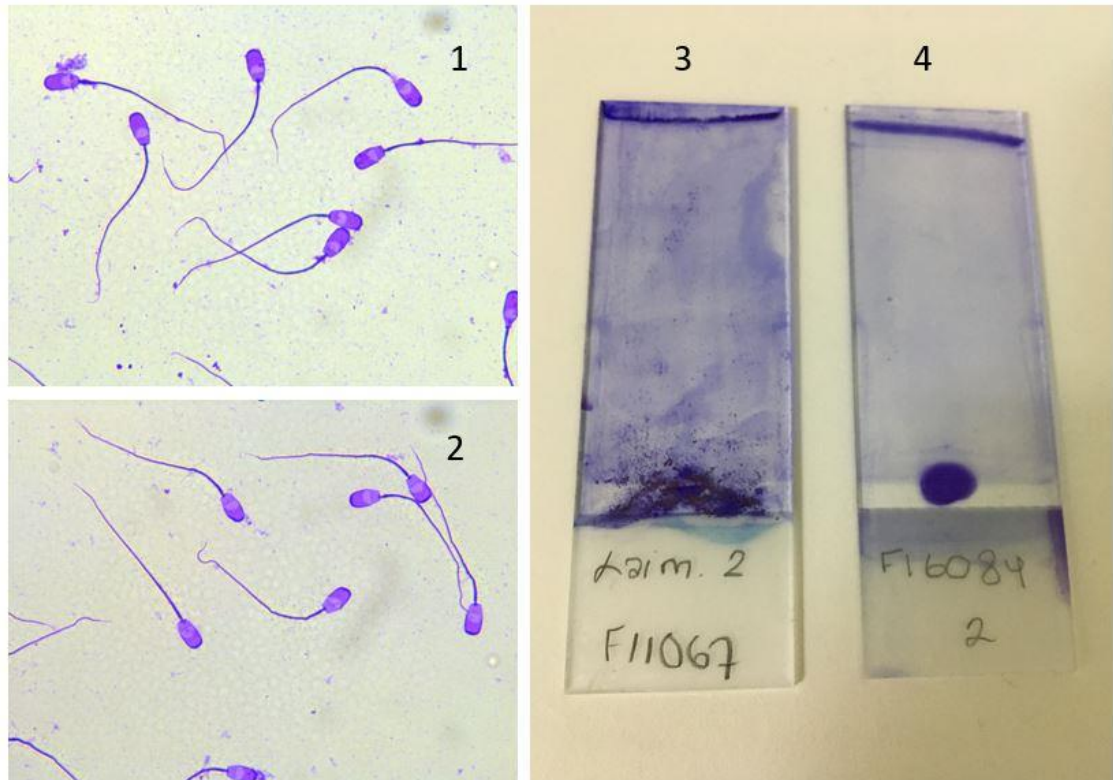
6.1 Värjäysmenetelmä

Värjäysmenetelmää valittaessa kokeiltiin kahta Minituben eri menetelmää, Spermac- ja Farelly-värjäyksiä. Farelly-sarja valittiin sen selkeyden ja paremman toimivuuden vuoksi, sillä pään muodot erottuivat selkeämmin (kuva 3). Lisäksi Spermac -sarjalla värjätessä siittiöiden päät värjäytyivät kokonaan vihreiksi, vaikka vain akrosomaalisen rakulan olisi pitänyt värjäytyä (kuva 3).



KUVA 3. Värjäysmenetelmien vertailu: 1. Farelly ja 2. Spermac (Kuva Olympus CX31 mikroskooppi, kamera Huawei Honor 7, kokonaissuurennos 400x).

Siemennestenäytteiden laimennusaineeksi valittiin suolaliuos suhteessa 1:1, koska antibioottiliuos häiritsi pään värjäytymistä ja näytteistä tuli värjäyksen jälkeen sotkuisia (kuva 4). Lisäksi laimennusaineessa olleet hiilihydraatit ynnä muut värjäytyivät myös, jolloin näytteiden taustoista tuli tummempia ja siittiöt oli hankalampi erottaa taustasta.



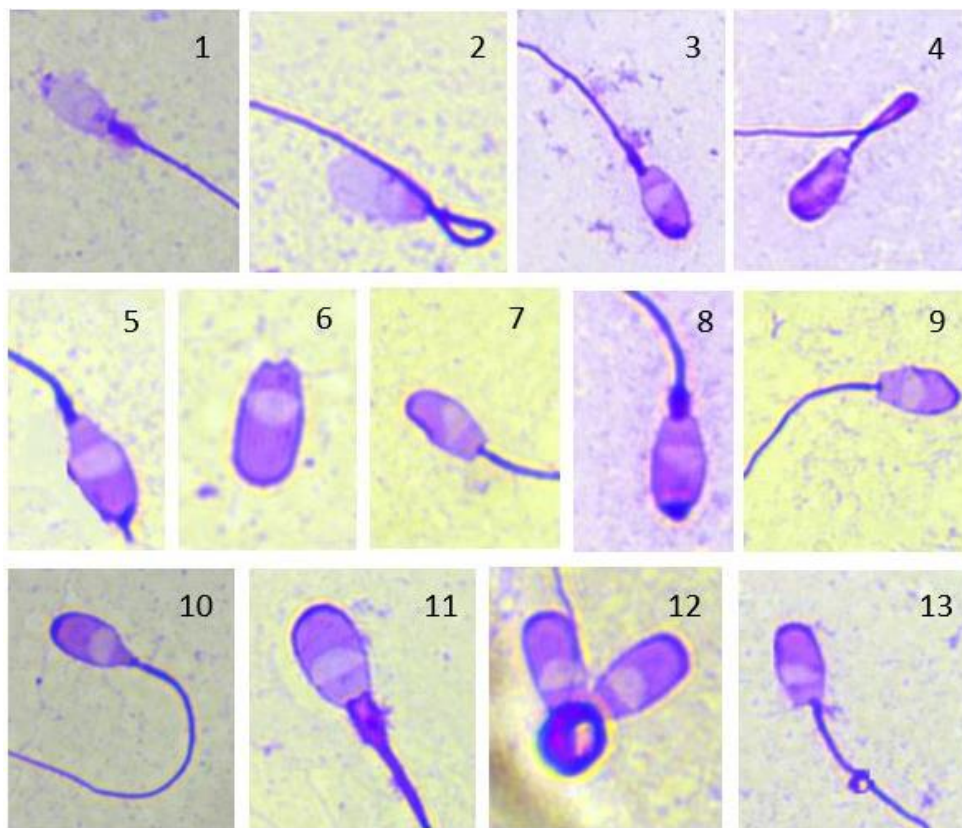
KUVA 4. Laimentimen valintaan liittyvät kuvat: 1. antibioottiliuos 2. suolaliuos (Kuva: Zeiss Primo Star mikroskooppi, Leica DFC 450-kamera, kokonaissuurennos 1000x) 3. antibioottiliuos-preparaatti 4. suolaliuos-preparaatti.

Siittiöitä tarkasteltiin Olympus CX31 mikroskoopin 20x, 40x ja 100x suurennoksilla ja kokonaissuurennoksilla 200x, 400x, ja 1000x. 20x suurennoksella värjäyksen onnistumisesta ja siittiöiden tiheydestä saatiin yleiskuva. Sillä ei vielä voinut arvioida rakennepoikkeamia. 40x suurennoksella siittiöistä näkyivät sytoplasman pisarat ja hännän kiertymiset. Pään akrosomirakkulan muutokset näkyivät vain käytettäessä 100x suurennosta ja immersioöljyä.

6.2 Rakennepoikkeamat

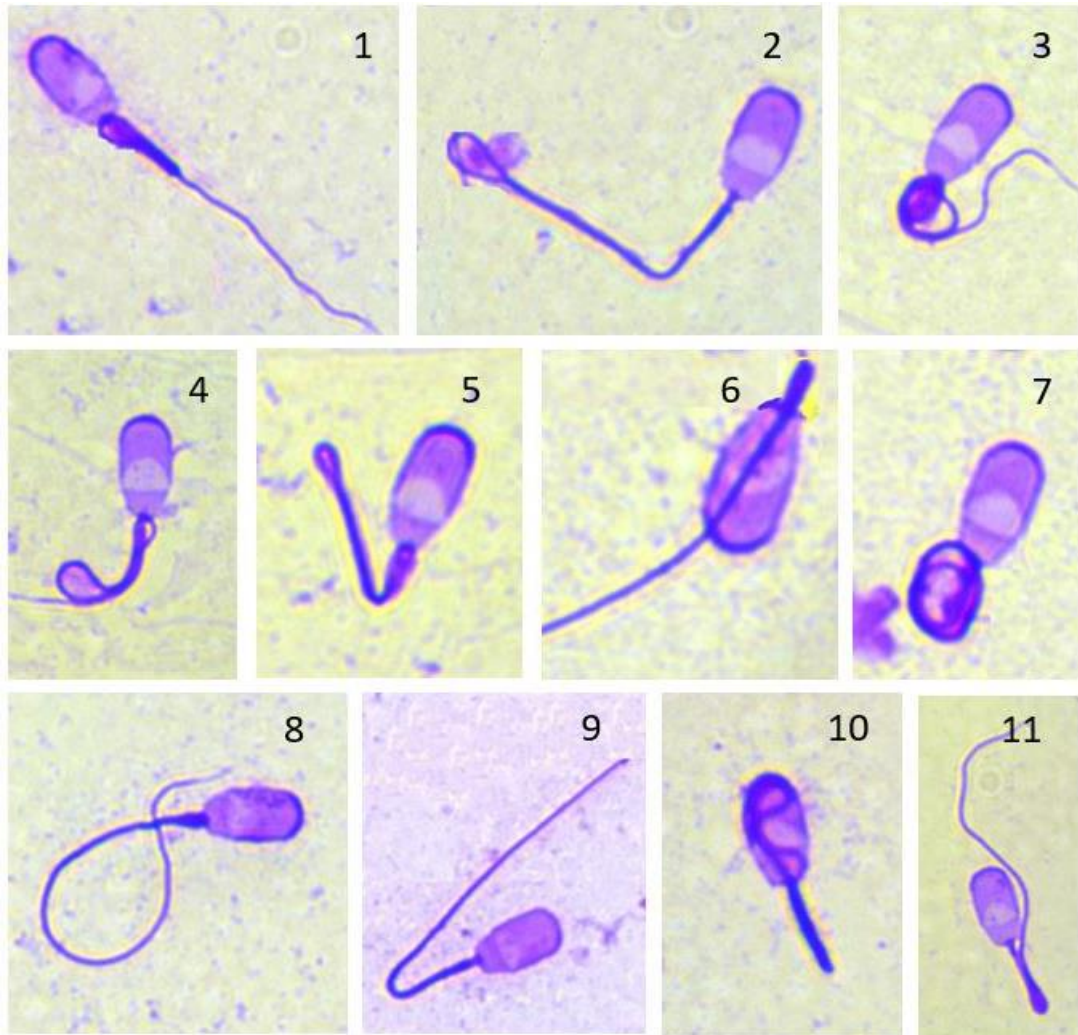
Pään rakennepoikkeamia ovat esimerkiksi pieni/suuri pää, kartiomainen, pyöreä, päärynänmuotoinen ja amorfinen pää, pieni/suuri akrosomaalinen alue, kaksinkertainen pää, vakuoleja sisältävä (enemmän kuin kaksi) tai jokin edellä mainittujen yhdistelmä (World Health Organization 2010, 69). Pään koon ja muotojen viat ovat tärkeitä kriteerejä morfologiaa arvioitaessa. Niiden on osoitettu vaikuttavan vakavasti akrosomin reaktioon, sioutumiseen munanjohtimeen sekä munasolun hedelmöittämiseen. (Maree ym. 2010, 1370.)

Niskan ja keskiosan vikoja ovat esimerkiksi keskiosan epäsymmetrinen kiinnittyminen päähän, jyrkkä taipuminen, poikkeuksellisen ohut keskiosa tai jokin edellä mainittujen yhdistelmä (World Health Organization 2010, 69). Kuvassa 5 on esitetty seulotuista näytteistä löytyneet pään, niskan ja keskiosan poikkeamat.



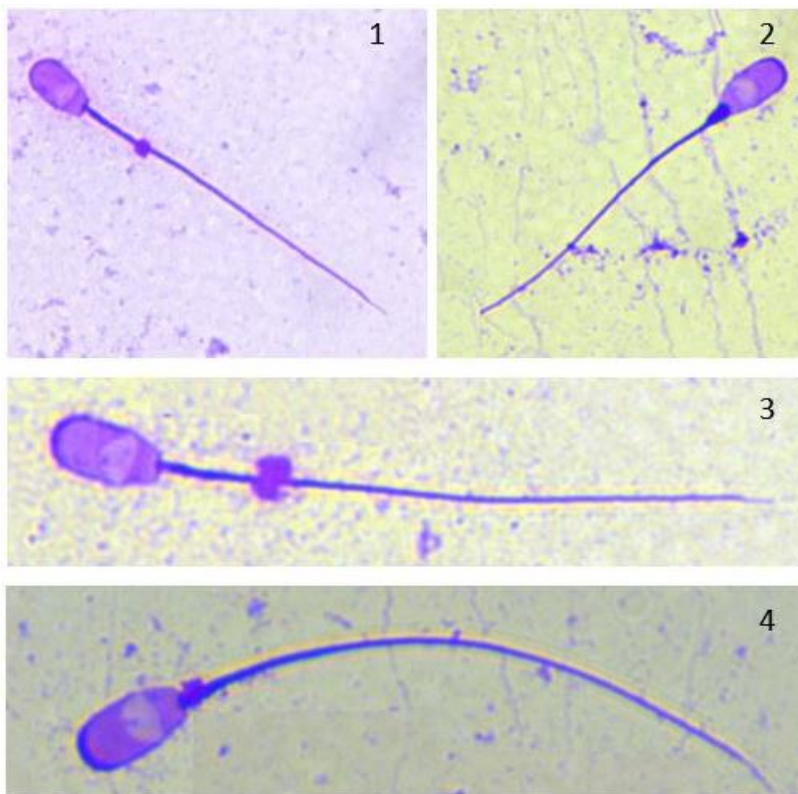
KUVA 5. Pään, niska ja keskiosan poikkeamat: 1-2 akrosomikalvon häviäminen 3. tummentunut akrosomikalvo 4. päärynänmuotoinen pää 5. ylimääräistä solulimaa 6. irtopää 7. muutos solukalvossa 8. muutos akrosomikalvossa 9. solukalvomuuotos 10. kaventunut pää 11. iso pää ja laajentunut niska 12. kaksi päätä 13. laitaan kiinnittynyt häntä. (Kuva: Zeiss Primo Star mikroskooppi, Leica DFC 450-kamera, kokonaissuurennos 1000x)

Hännän poikkeamia ovat sen lyhyys ja rikkinäisyys, voimakas taipuminen, kiertyminen rullalle tai pään ympäri sekä edellä mainittujen yhdistelmät (World Health Organization 2010, 69). Löytyneet hännän rakennepoikkeamat on esitetty kuvassa 6.



KUVA 6. Hännän poikkeamat: 1. pään alle osittain kiertynyt 2. hännän loppuosa taipunut 3. rullalla pään alla 4. kiertynyt 5. kiertynyt ja taipunut 6. niskasta taipunut 7. täysin rullalla pään alla 8. taipunut häntä 9. taipunut 10. pään päälle kiertynyt 11. taipunut distaalipisaran kohdalta (Kuva: Zeiss Primo Star mikroskooppi, Leica DFC 450-kamera, kokonaissuurennos 1000x).

Sytoplasminen pisara on jäänne spermatidien solulimasta, joka on kietoutunut siittiön hännän liitoskappaleeseen. Sytoplasminen pisara pysyy kiinnittyneenä liitoskappaleeseen siittiön kulkeutuessa kivesverkosta efferenttikanaaviin. Liitoskappaleeseen kiinnittynyttä sytoplasman pisaraa kutsutaan proksimaalipisaraksi (kuva 7, kohdat 2 ja 4) ja se koostuu pääasiassa kalvomaisesta rakkulasta. Lisäkiveksissä siittiön kypsyessä ja kulkeutuessa niiden läpi, proksimaalipisara liukuu alaspäin keskiosaan pysähtyen renkaaseen, jolloin sitä kutsutaan distaalipisaraksi (kuva 7, kohdat 1 ja 3). Useimmilla nisäkkäillä sytoplasman pisara poistuu siittiön kulkeutuessa lisäkiveksen läpi tai siemensyöksyn yhteydessä. (Sutovsky & Manandhar 2006, 15.)



KUVA 7. Sytoplasman pisarat: 1. distaalinen pisara 2. proksimaalinen pisara 3. levinnyt distaalinen pisara ja levinnyt proksimaalinen pisara. (Kuva: Zeiss Primo Star mikroskooppi, Leica DFC 450-kamera, kokonaissuurennos 1000x).

DanAvl Yorkshire karjuilta morfologisia virheitä löytyi muita emärodun karjuja enemmän. Poikkeamat eivät kuitenkaan olleet poikkeuksellisia vaan suurimmaksi osaksi sytoplasman pisaroita ja hännän eriaisteisia taipumisia.

7 POHDINTA

7.1 Värjäysmenetelmät

Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää morfologinen värjäysmenetelmä siittiöiden rakennepoikkeamien tutkimiseen ja tarkoituksena tutkia karjuasemalla olevien Norsvin ja DanAvl emärotujen siittiöiden rakennepoikkeamia. Työssä käytettiin kahta värjäysmenetelmää (Farely ja Spermac). Värjäysmenetelmää pohdittaessa tärkeimpänä kriteerinä oli, että laboratorion henkilökunta suorittaisi värjäyksen muun työn ohessa. Tämän vuoksi sen tulisi olla nopea ja yksinkertainen.

Värjäysmenetelmää valittaessa vaihtoehtoina Farelyn ja Spermacin lisäksi olivat Papanicolaou- ja May-Grünwald Giemsa-värjäykset. Papanicolaou sisältää 21 työvaihetta (liite 3, taulukko 5) ja on siten hidas. Lisäksi menetelmässä kiinnitysliuoksena käytetään etanolia, jonka käyttöön ja säilytykseen liittyvät valtioneuvoston asetukset vaarallisten kemikaalien käsittelyn ja varastoinnin valvonnasta ([685/2015](#)), teollisen käsittelyn ja varastoinnin turvallisuusvaatimuksista ([856/2012](#)) sekä räjähdyskelpoisten ilmaseosten työntekijöille aiheuttaman vaaran torjunnasta ([576/2003](#)) (Työterveyslaitos 2015). Finnpigin laboratoriossa ei käytetä etanolia, joten värjäysmenetelmän vuoksi olisi jouduttu tekemään tarkka selvitys etanolin käytöstä ja hankkimaan asianmukainen varastointipaikka. Papanicolaou-menetelmä hylättiin sen monimutkaisuuden ja etanolin käyttöön liittyvien lisätöiden vuoksi.

May-Grünwald Giemsa-menetelmässä värjäysvaiheita on neljä, mutta liuokset tulee laimentaa ja niiden pH:t säätää ennen varsinaisen värjäyksen suorittamista (liite 3, taulukko 6). Finnpigin laboratoriossa ei valmisteta tarkkoja liuoksia tai mitata pH:ta, joten värjäysmenetelmää varten olisi jouduttu hankkimaan tarvittavat välineet sekä asianmukainen vetokaappi. Kustannussyistä värjäysmenetelmä hylättiin. Lisäksi Farely- ja May-Grünwald Giemsa-menetelmät ovat lopputulokseltaan hyvin samankaltaisia, jolloin päädyttiin valitsemaan Farely.

Valittu Minituben Farely-sarja värjäsi siittiöt selkeästi ja rakennepoikkeamat oli helppo havaita. Lisäksi menetelmä on riittävän tarkka laboratoriossa käytettäväksi, sillä siemenestenäytteitä värjätään satunnaisesti ja värjäysmenetelmän avulla halutaan varmistaa,

että siemennesteelle annettu elävyys vastaa siemennesteen todellista laatua. Farelly-värjäyksen huonoina puolina olivat fiksaatioliuoksen vaikutus häntiin ja siittiöiden pään reunojen voimakas rajautuminen. Fiksaatioliuoksena käytetty formaliini sai aikaan häntien taipumista, jolloin niistä tuli hyvin kulmikkaita. Kulmikkaus ja pään rajautuminen eivät kuitenkaan häirinneet rakennepoikkeamien havaitsemista.

Farelly-menetelmän värjäys oli helppo suorittaa ja se onnistui joka kerta. Kiinnitysliuosta menetelmässä kului eniten, sillä se värjäytyi helposti värjättäessä useita näytteitä peräkkäin. Objektilasitelineeseen tuli pestä värjäyksien välissä huolellisesti, muutoin kiinnitysliuos värjäytyi vaalean violetiksi ja ei enää toiminut. Lisäksi menetelmän väreillä pystyi värjäämään kolme kertaa peräkkäin, minkä jälkeen värjäysliuokset oli suodatettava. Ilman värien suodatusta näytteistä tuli tummia ja sotkuisia, jolloin siittiöitä oli vaikea erottaa taustasta.

Spermac-sarjalla siittiöitä ei saatu värjäytymään kunnolla, sillä värjätyt siittiöt olivat kokonaan vihreitä (kuva 3). Lisäksi siittiöiden akrosomaaliset ongelmat eivät näkyneet lainkaan, mikä vaikutti myös osaltaan sen hylkäämiseen. Minituben (2014,17) manuaalin mukaan siemenneste tulisi pestä ja sentrifugoida ennen preparaatin tekemistä, jotta siemennesteen plasma saadaan pois. Pesua ei tarvitse tehdä, jos preparaatti kiinnitetään heti kuivumisen jälkeen (Minitube 2014, 17). Siemennesteen peseminen katsottiin tarpeettomaksi, sillä siemenneste otettiin suodattimelliseen pussiin ja preparaatti kiinnitettiin heti kuivumisen jälkeen. Näytteisiin on kuitenkin ilmeisesti jäänyt siemennesteen plasmaa, mikä häiritsi sitten värjäytymistä (Minitube 2014, 17). Värjäytymisen epäonnistuminen on kuitenkin hieman kyseenalainen, sillä Minituben (n.d.) ohjeen mukaan akrosomikalvon ja hännän kuuluisi värjäytyä vihreäksi ja pään muun osan punaiseksi. Kun taas Spermac- värien mukana tulleessa Minituben (2014, 20) manuaalissa sanotaan siittiöiden värjäytyvän vihreän ja sinisen eri sävyillä.

Laimentimena päädyttiin käyttämään 0,9 % NaCl-liuosta, sillä värien mukana tulleessa manuaalissa suositeltiin sitä ja laboratoriossa muuten käytössä ollut Androstar Plus-antibioottiliuos häiritsi siittiöiden värjäytymistä. Antibioottiliuoksen tehtävänä on säilyttää siittiöt hengissä, joten ne kuolivat vasta kuivuessa tai kiinnityksen yhteydessä. Tämä saattoi aiheuttaa muutoksia siittiöiden rakenteessa tai väriaineen sitoutumisessa. Suolaliuoksen vaikutuksesta siittiöt kuolevat saman tien, jolloin niiden rakenne säilyy muuttumattomana. Lisäksi antibioottiliuoksella laimennettujen näytteiden suolapitoisuuden ollessa

pieni väriaineet sitoutuvat soluun voimakkaammin, jolloin ylimääräinen väri ei peseydy pois ja näin ollen näytteet värjäytyvät tummemmiksi ja epäselvemmiksi (Cook 2006, 71). NaCl-liuos toimi myös peittauksena ennen värjäystä, jolloin värit sitoutuvat paremmin soluun.

Käytettäväksi laimennussuhteeksi valittiin 1:1 (1 ml raakasiementä, 1 ml suolaliuosta), sillä se oli riittävä usean karjun siemennesteelle. Joidenkin karjujen raakasiemenneste oli laimeaa ja laimennettaessa suolaliuksella siittiöiden laskeminen oli hieman hankalaa. Toisaalta taas osa raakasiemenneste näytteistä oli todella vahvoja ja laimennuksesta huolimatta siittiöt olivat päällekkäin.

Värjäyksessä saatuja tuloksia verrattiin hypyille annettuihin elävyyksiin (liite 4, taulukot 7 ja 8). Siemennesteille annetut elävyydet olivat hyvin lähellä morfologian perusteella laskettua elävyyttä, muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta. Luotettavia tuloksia karjukohtaisesti ei kuitenkaan voida antaa, sillä tulokset on laskettu vain yhdestä hypystä. Samoja karjuja ei kuitenkaan lähdetty hyppyyttämään useita kertoja, sillä opinnäytetyössä keskityttiin värjäysmenetelmän löytämiseen ja rakennepoikkeamiin, jotka saattavat vaikuttaa hedelmöittymiseen.

7.2 Morfologia

Arvioitaessa siittiöiden rakennepoikkeamia emärodun karjuilta, löydettiin poikkeamia, joita arveltiin löytyvän (sytoplasman pisarat). Seulotuista karjuista yhden Norsvin Maatiaisen tulos yllätti, sillä siemennesteelle annettu elävyys ja tiineytystulokset eivät vastanneet lainkaan morfologia tuloksia. Anderssonin (2016) mukaan kyseisestä karjusta ei kuitenkaan kannata huolestua, sillä morfologiset poikkeamat ovat kiinni myös karjun iästä ja osa poikkeamista häviää karjun vanhetessa.

Työssä seulotuista siemennestenäytteissä huomattava osa morfologisista poikkeavuuksista oli sytoplasman pisaroita. Niitä esiintyy eniten siemennesteessä kesäkuukausina, jolloin kivesten lämpötila on hieman kohonnut (Lipenský, Lustyková & Čerovský 2010, 467). Opinnäytetyö tehtiin kesä-syyskuussa, mikä selittää sytoplasmisten pisaroiden löytymisen. Sytoplasman pisaroiden katsominen morfologiseksi poikkeamaksi on hieman

kiistanalainen, koska jokainen siittiö sisältää pisaran ennen poistumista kiveksistä (Andersson 2016). Lisäksi siemennestenäytteistä löytyi harvinaisempia poikkeuksia, esimerkiksi kaksihäntäinen tai -päinen siittiö, akrosomikalvon muutokset sekä hännän kiertyminen pään alle tai ympärille.

Siittiöiden normaali morfologia on kiistanalaisesti yhteydessä onnistuneeseen hedelmöitykseen (Schiff ym. 2007, 1328; Shabtaie, Gerkowicz, Kohn & Ramasamy 2016, 1). Viallinen spermatogeneesi ja jotkut lisäkivesten poikkeamat liittyvät yleisesti siittiöiden epänormaaliin muotoon. Epänormaaleilla siittiöillä on yleensä alhaisempi hedelmöityspotentiaali riippuen poikkeavuuden tyypistä tai epänormaalista DNA:sta. Pään muodon poikkeamat saattavat liittyä DNA:n pirstoutumiseen, kromosomin rakenteellisiin poikkeamiin, epäkypsään kromatiiniin tai aneuploidiaan. Siksi painopiste morfologiassa onkin annettu päälle, vaikka hännän poikkeamia ei myöskään saa unohtaa. (World Health Organization 2010, 69.)

Tutkimukset osoittavat, että kohtu toimii esteenä morfologialtaan epänormaaleille siittiöille, koska kohdun ja munanjohtimien risteyksessä lähes 100 % siittiöistä on morfologialtaan normaaleja. Tuloksille on kaksi selitystä: kohtu valitsee siittiöt morfologian perusteella ja/tai kohdun ympäristö edistää sytoplasmisten pisaroiden irtoamista. Useimmilla nisäkäslajeilla kohdun ja munanjohtimien välillä toimii selektiivinen risteys liikkuvien siittiöiden morfologian tutkimista varten. Päästyään munanjohtimeen siittiöt kiinnittyvät epiteelisolujen värekarvoihin, missä niiden elinkelpoisuutta, morfologiaa ja hedelmöityskykyä arvioidaan. Morfologisesti normaaleilla siittiöillä on suurempi kyky sitoutua munanjohtimeen kuin epänormaaleilla. Epänormaali siittiöt kerääntyvät vastavirtasulkuun. Sioilla siemennesteen takaisinvirtaus on fysiologinen prosessi, ja sitä esiintyy lähes 100 % emakoista (García-Vázquez ym. 2015, 410–411; Waberski ym. 2006, 311.)

Monet morfologiset poikkeavuudet liittyvät hedelmättömyystapauksiin (Lipenský, Lustyková & Čerovský 2010, 466). On olemassa useita selityksiä morfologialtaan epänormaalin siittiön hedelmällisyyden alhaisuudelle. Karjuilla siemenneste sisältää usein suuren määrän sytoplasmapisarallisia siittiöitä, jotka laskevat siemennesteen hedelmällisyyttä (Sutovsky & Manandhar 2006, 15). Sytoplasmiset pisarat voivat muuttaa hiilihydraattien sitoutumiskohtia, jolloin siittiöiden kyky sitoutua munanjohtimen epiteelisoluihin heikentyy (García-Vázquez ym. 2015, 411).

On osoitettu, että proksimaaliset pisarat haittaavat siittiöiden liikkumista, jolloin ne eivät kykene uimaan munanjohtimeen. Toisaalta sytoplasmisten pisaroiden läsnäoloon liittyy myös muutos siittiöiden solukalvossa, minkä myötä hedelmällisyys laskee. Lisäksi kromatiinin epänormaalilla tiivistymisellä uskotaan olevan haitallinen vaikutus siittiön kiinnittymiselle munanjohtimeen. (García-Vázquez ym. 2015, 411.) Siittiöiden vakavat morfologiset poikkeamat, kuten hännän silmukoituminen, haittaavat niiden pääsyä munanjohtimeen. (Waberski ym. 2006, 314.)

Emärodun karjuilta löytyneet morfologiset poikkeamat liittyvät olennaisesti niiden hedelmällisyyteen. Pääasiassa siittiöistä löytyneet poikkeamat olivat sekundäärisiä tai tertiärisiä. Primäärisiä poikkeamia löytyi hyvin vähän. DanAvl Yorkshire karjujen siemennesteestä löytyi muita enemmän siittiöiden rakennepoikkeamia, mikä osaltaan selittää niiden alhaisen hedelmällisyyden muihin karjuihin verrattuna. Pääasiallisesti poikkeamat olivat kuitenkin sekundäärisiä, jolloin niiden vaikutusta voidaan kompensoida siittiöpitoisuuden lisäämisellä keinosiemennysannoksessa.

7.3 Värjäysmenetelmän käyttö jatkossa

Jatkossa laboratoriossa tullaan käyttämään Farelly-värjäystä uusien asemalle tulevien karjujen siemennesteen myyntiin hyväksymiseksi sekä vertailemaan siemennesteelle annettua elävyyttä (%) värjäyksessä saatuun virhemäärään sataa siittiötä kohti. Jotta värjäys- ja elävyytulokset ovat vertailukelpoisia, tulisi vertailla useita hyppyjä karjukohtaisesti. Hyppyjen välillä morfologiassa saattaa olla suuria vaihteluita lämpötilan muutoksen tai kausivaihtelun takia (Lipenský, Lustyková & Čerovský 2010, 466; Garsia-Herberos, ym 2006, 557).

Lisäksi vertailuun vaikuttaa olennaisesti, että elävyys annetaan käyttämällä 200x kokonaissuurennosta, kun värjätyille näytteille käytetään 1000x kokonaissuurennosta. Elävyydessä arvioidaan siemennesteessä olevien elävien ja morfologialtaan normaalien määrä prosentteina. Tulokset eivät tämän vuoksi ole täysin vertailukelpoisia, sillä 1000x suurennoksella näkyvät virheet (esim. proksimaaliset pisarat), joita 200x suurennoksella ei näy. Luotettavien tuloksien saavuttamiseksi näytteitä tulisi tarkastella samankokoisella suurennoksella.

Jatkotutkimusaiheena morfologisen värjäysmenetelmän avulla voitaisiin luoda emärodun karjujen tuotantoon hyväksymisraja. Tällä hetkellä laboratoriossa myyntiin hyväksytään karjut, joiden siemenneste saa elävyydeksi 80 % tai 90 %. Tuotantoon hyväksymisrajan löytämiseksi emärodun karjuilta tulisi kerätä tuloksia useista hyppyistä. Lisäksi tuloksia tulisi verrata siemennesteelle annettuun elävyyteen sekä asiakkailta saataviin tiineytystuloksiin.

LÄHTEET

Abu Hassan Abu, D., Franken, D., Hoffman, B. & Henkel, R. 2011. Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia* (2012) 44, 571–577.

Agarwal, A., Erenpreiss, J. & Sharman, R. 2009. Sperm chromatin assessment. Teoksessa Gardnaer, D., Weissman, A., Howles, C. & Shoham, Z. (toim.) *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*. 4. painos. Lontoo: Informa Healthcare.

Agarwal, A. & Said, T. Sperm chromatin assessment. Teoksessa Gardnaer, D., Weissman, A., Howles, C. & Shoham, Z. (toim.) *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*. 3. painos. Lontoo: Informa Healthcare.

Alberts, B., Johnson, A. & Lewis, J. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4. painos. New York: Garland Science.

Althouse, G. 1997. *Evaluating Porcine Semen for Artificial Insemination. Part I. Standard Tests*. Urbana: University of Illinois.

Andersson, M. Kotieläinten lisääntymistieteen professori. 2016. Haastattelu 7.9.2016. Haastattelija Takalo, E. Mäntsälä.

Avantor Performance. n.d. Product information May-Grünwald Giemsa[pdf]. Tulostettu 18.6.2016.

Baerer, E. & Friend, D. 1990. Morphology of Mammalian Sperm Membranes During Differentiation, Maturation, and Capacitation. *J Electron Microsc Tech* 16 (4), 281–297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666711/pdf/nihms736241.pdf>

Bancroft, J. & Cook, H. 1994. *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. 2. painos. Lontoo: Churchill Livingstone.

Bibbo, M. 1991. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Bruckner, M. n.d. Microscopy. Päivitetty 3.11.2016. Luettu 4.11.2016. http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/index.html

Cook, D. 2006. *Cellular Pathology: An Introduction to Techniques and Applications*. 2. painos. Bloxham: Scion Publishing Limited.

DanAvl. n.d. Luettu 09.07.2016. <http://danavl.com/>

Elliott, H. 2012. Staining—principles and demonstration techniques. Teoksessa Orchard, G. & Nation, B. (toim.) *Histopathology*. New York: Oxford University Press.

Evered, A. & Shambayati, B. 2015. Reproductive cells and gametogenesis. Teoksessa Orchard, G. & Nation, B. (toim.) *Cell structure & function*. New York: Oxford University Press.

Garcia-Herreros, M., Aparicio, I., Baron, F., Garcia-Marin, L. & Gil, M. 2006. Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology* 29 (2006), 553–563.

García-Vázquez, F., Hernández-Caravaca, I., Matás, C., Soriano-Úbeda, C., Abril-Sánchez, S. & Izquierdo-Rico, M. 2015. Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *Journal of Reproduction and Development* 61 (5), 407–413.

Gilbert, S. 2000. *Developmental Biology*. 6. painos. Sunderland: Sinauer Associates.

Grizzle, W., Fredenburgh, J. & Myers, R. 2008. *Fixation of Tissues*. Teoksessa Bancroft, J. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practise of Histological Techniques*. 6. painos. Lontoo: Churchill Livingstone Elsevier.

Henkel, R., Schreiber, G., Sturmhoefel, A., Hipler, U., Zermann, D. & Menkveld, R. 2008. Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. *American Society for Reproductive Medicine*. 89 (2), 449–455.

Holliday, J. 2004. *Fixatin and Tissue Processing*. Teoksessa Wulff, S. (toim.) *Guide to Special Stains*. Kalifornia: DakoCytomation.

Horobin, R. 2008. *How do Histological Stains Work?* Teoksessa Bancroft, J. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practise of Histological Techniques*. 6. painos. Lontoo: Churchill Livingstone Elsevier.

Horst, G. & Maree, L. 2009. *SpermBlue: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis*. Etelä-Afrikka: University of the Western Cape. Tulostettu 2.9.2016.

[http://www.leja.nl/data/FCK/File/Biotech%20Histochem%20-%20Horst%20-%2084\(6\)-299_308-2009-12%20-%20SB%20universal.pdf](http://www.leja.nl/data/FCK/File/Biotech%20Histochem%20-%20Horst%20-%2084(6)-299_308-2009-12%20-%20SB%20universal.pdf)

Ikonen, S. & Routa, K. 2007. Sytosentrifugivalmisteiden Papanicolaou-värijäyksen optimointi. Bioanalyttikon koulutusohjelma. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia. Opin- näytetyö.

Lipenský, J., Lustyková, A. & Čerovský, J. 2010. Effect of season on boar sperm morphology. *Journal of Central European Agriculture* (2010) 11:4, 465–468.

Maree, L., Plessis, S., Menkveld, R. & Horst, G. 2010. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Human Reproduction* 25 (6), 1369–1382.

Menkveld, R., Holleboom, C. & Rhemrev, J. 2010. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian Journal of Andrology* (2011) 13, 59–68.

Minitube. nd. *Sperm Stains*. Stains for the morphological analysis of sperm cells. Tulostettu 2.9.2016. http://www.minitube.com.br/var/StorageMinitube/Datenblaetter/15405-0000_Leaflet-SpermStains_en_120808.pdf

Minutube. 2014. Spermac stain. Julkaistu 2014. Manuaali 15405/0000. Tiefenbach: Minitube GmbH.

Minitube. 2016. Farelly Stain. Julkaistu 2016. Manuaali 15405/0026. Tiefenbach: Minitube GmbH.

Oklahoma State University. 1996. Breeds of Livestock – Danish Landrace Swine. Julkaistu 24.3.1996. Tulostettu 20.7.2016. <http://www.ansi.okstate.edu/breeds/swine/danishlandrace>

Reagen. 2016. Reagenan värjäys – reagenssit ja puskurit patologiaan. Julkaistu 2016. Tulostettu 2.9.2016. <http://tuoteluettelo.mediq.fi/liitteet/d376199/>

Rodak, B. & Carr, J. 2013. Clinical Hematology Atlas. 4. painos. St. Louis: Elsevier Saunders.

Rodríguez, A. 2012. Fresh boar semen: quality control and production. Julkaistu 29.3.2012. Tulostettu 2.9.2016. http://www.rohh.ugent.be/v3/research/phd/2012/Lopez-Rodriguez_A.pdf

Ross, M. & Pawlina, W. 2011. Histology A Text and Atlas. 6. painos. Baltimore: Lippincott Wolters Kluwer.

Rouge, M. 2004. Sperm Morphology. Päivitetty 6.6.2004. Tulostettu 22.8.2016. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/morph.html>

Rozeboom, K. 2000. Evaluating Boar Semen Quality. Julkaistu 1.6.2000. Animal Science Facts. North Carolina State University. Tulostettu 20.7.2016. https://www.ncsu.edu/project/swine_extension/publications/factsheets/812s.htm

Said, T. & Agarwal, A. 2005. Sperm chromatin assessment. Teoksessa Gardner, D., Weissman, A., Howles, C. & Shoham, Z. (toim.) Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives. 2. painos. Lontoo: Informa Healthcare.

SBPork. 2016. Quality. Päivitetty 2016. Tulostettu 7.10.2016. <https://www.sbpork.eu/en/quality.html>

Schiff, J., Luna, M., Barritt, J., Duket, M., Copperman, A. & Bar-Chama, N. 2007. The morphology of extracted testicular sperm correlates with fertilization but not pregnancy rates. *Bju International* (2007) 100, 1326–1329.

Shabtaie, S., Gerkowicz, S., Kohn, T. & Ramasamy, R. 2016. Role of Abnormal Sperm Morphology in Predicting Pregnancy Outcomes. *Curr Urol Rep* (17) 67, 1–9.

Shaman, J. & Ward, W. 2006. Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. Teoksessa Barrat, C. & De Jonge, C. (toim.) The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge: Cambridge University Press.

Suomen virtuaaliyliopisto. 2006. Värjäysmenetelmät. Julkaistu 2006. Tulostettu 19.11.2016. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/varjaysmenetelmat/>

Sutovsky, P & Manandhar, G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. Teoksessa Barrat, C. & De Jonge, C. (toim.) The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertiliation, Regeneration. Cambridge: Cambridge University Press.

Topigs Norsvin. 2015a. More about us, Topigs Norsvin. Julkaistu 2015. Tulostettu 16.8.2016. <http://topignorsvin.us/about/topigs-norsvin/>

Topigs Norsvin. 2015b. Our Products. All products. Julkaistu 2015, Tulostettu 16.8.2016. <http://topignorsvin.us/category/products/>

Työterveyslaitos. 2015. OVA-ohje: Etanoli. Päivitetty 10.12.2015. Luettu 7.11.2016. <https://www.ttl.fi/ova/etanoli.html#ots5>

Waberski, D., Magnus, F., Ardón, F., Petrunkina, A., Weitze, K. & Töpfer-Petersen, E. 2006. Binding og boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time. Reproduction (2006) 131, 311–318.

World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the Examination and Processing of human semen. 5. painos. Sveitsi: World Health Organization.

Wulff, S. 2004. The Chemistry of Special Stains. Teoksessa Wulff, S. (toim.) Guide to Special Stains. California: DakoCytomation.

LIITTEET

Liite 1. Työohje

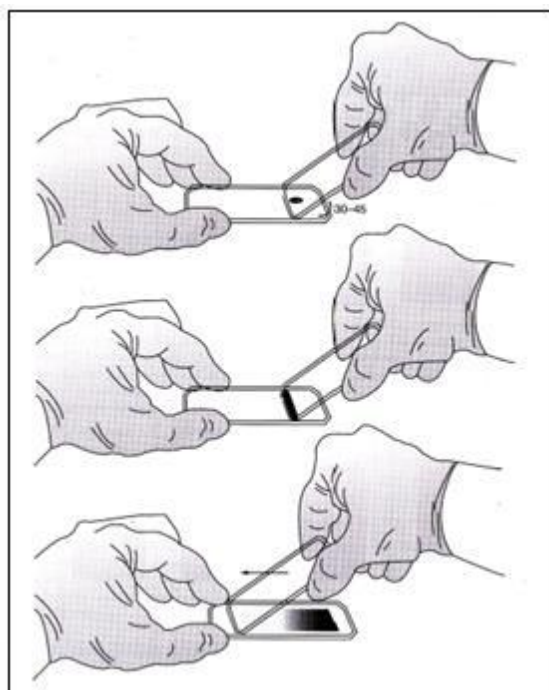
1(4)

Värjäysohje

Farelyly Stain

Preparaatti

1. Laita 1 ml suolaliuosta ja raakasiementä korkilliseen 10ml putkeen. Kirjoita karjun numero putken kylkeen.
2. Ota pöydälle kaksi objektilasia, kirjoita laseihin karjun numero ja numeroi lasit.
3. Pipetoi 5 µl seosta kummankin lasin ylälaitaan (tekstiosan alapuolelle). Ota puhdas objektilasi ja tuo se pisaran lähelle 30-40° kulmassa. Vedä lasi pisaran alalaitaan, jolloin pisara leviää lasin alle. Työnnä vetolasi rauhallisesti itsestäsi poispäin objektilasin loppuun asti (kuva 1). Samalla lasilla voit tehdä kaksi levitystä, kun käännät lasin levitysten välillä.
4. Anna preparaattien kuivua 12 tuntia huoneenlämmössä.



KUVA 1.Preparaatin tekeminen (Rodak & Carr)

Kiinnittäminen ja värjäys

Käytä suojakäsineitä ja suorita värjäys kohdepoistoimurin alla!

2(4)

Suojaa pöytä muovilla ja ota kuvassa 2 näkyvät välineet esille (värjäysastiat, objektilasiteline, värit, yön yli kuivuneet preparaatit, suodatinpaperi). Objektilasitelineeseen mahtuu yhtä aikaa 12 objektilasia. Laita lasit telineeseen tekstipuoli ylöspäin (kantta kohti). Merkitse värjäysastiat (A, B, C & 2 x vesi)



KUVA 2. Tarvittavat välineet

Täytä värjäysastiat maksimissaan kavennetun osan ylälaitaan (kuva 3), jotta koko preparatti värjäytyy, mutta tekstiosa ei. Tee kiinnittäminen ja värjäys alla olevan ohjeen mukaan. Samoilla väreillä voi värjätä korkeintaan kolme kertaa ilman suodatusta. **Pese objektilasiteline hyvin saippualla värjäyksen välillä, jotta fiksaatioliuos ei värjäänny.**



KUVA 3. Täyttöohje

1. Kiinnittäminen, liuos A

- Laita objektilasiteline 10 sekunniksi liuokseen A
- Ravista ylimääräinen liuos pois

2. Väri B

- Laita objektilasiteline 20 sekunniksi liuokseen B
- Ravista ylimääräinen väri pois

3. Pesu

- Käytä objektilasitelinettä 5–6 kertaa vedessä
- Valuta ylimääräinen vesi pois
- Kuivaa objektilasitelineen reunat varovasti suodatinpaperilla

4. Väri C

- Laita objektilasi/-teline 5 sekunniksi liuokseen C
- Ravista ylimääräinen väri pois

5. Pesu

- Käytä objektilasia 5–6 kertaa vedessä
- Valuta ylimääräinen vesi pois
- Kuivaa objektilasitelineen reunat varovasti suodatinpaperilla

6. Kuivaus

- Jätä objektilasit pystyasennossa kuivumaan 12 tunniksi (yön yli) huoneenlämpöön

Kaada käytetyt pesuvedet erilliseen kanisteriin.

Pese kädet huolellisesti saippualla värjäyksen jälkeen.

Suodatus

Suodata kiinnitysliuos ja värit aina käytön jälkeen VWR:n Folded qualitative filter 310 paperilla. Suorita suodatus kohdepoistoimurin alla. Pese suppilo liuoksien välillä.

Mikroskopiointi

Tarkastele kuivuneita näytteitä 20x, 40x ja 100x objekteilla. Käytä immersioöljyä käyttäessäsi 100x objektiivia. Laske solulaskurin avulla sata siittiötä ja merkitse toiseen lasuriin morfologiset virheet. Virheitä (kuva 4) ovat mm. distaalinen pisara, proksimaalinen pisara, hännän kiertymät, irronneet päät ja hännät, pään epämuodostumat.

4(4)



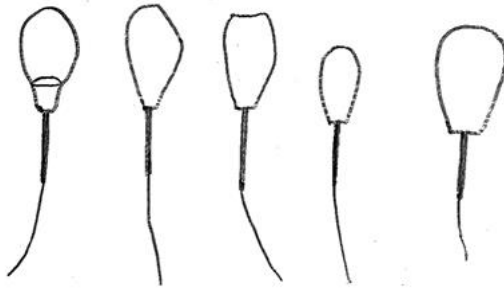
Proksimaalinen pisara



Distaalinen pisara



Hännän kiertymät



Pään epämuodostumat

KUVA 4. Esimerkkejä rakennepoikkeamista

Lähteet

Rodak, B. & Carr, J. 2013. Clinical Hematology Atlas. 4. painos. St. Louis: Elsevier Saunders.

Liite 2. Seulonta tulokset

TAULUKKO 1. DanAvl Yorkshire

Karju	virheellisiä/100 siittiötä
YY6069	9
YY6070	12
YY6072	59
YY6073	18
YY6075	82
FI6079	25
FI6084	30
FI6086	27
FI6087	25
FI6088	16
FI6089	18
FI6090	21
FI6091	67
FI6093	89
FI6095	61
FI6096	23
FI6097	16
FI6098	15

TAULUKKO 2. DanAvl Maatiainen

Karju	virheellisiä/100 siittiötä
LL1037	5
LL1041	4
LL1043	45
LL1049	60
FI1053	19
FI1057	22
FI1059	42
FI1061	13
FI1063	17
FI1064	6
FI1065	13
FI1066	7
FI1067	26
FI1068	14

TAULUKKO 3. Norsvin Yorkshire

Karju	virheellisiä/100 siittiötä
ZZ3034	24
ZZ3035	23
ZZ3036	3
ZZ3038	9
ZZ3040	26
ZZ3042	52
ZZ3044	4
ZZ3045	40
ZZ3047	18
ZZ3048	9
ZZ3051	8
ZZ3050	16
ZZ3052	23
ZZ3053	10
ZZ3054	14
ZZ3055	25

TAULUKKO 4. Norsvin Maatiainen

Karju	virheellisiä/100 siittiötä
MM0287	44
MM0288	28
MM0289	72
MM0290	34
MM0291	32
MM0292	23
MM0293	13
MM0294	14
MM0295	17
MM0296	13

TAULUKKO 5. Papanicolaou-värjäyksen työvaiheet (Ikonen & Routa 2007, muokattu)

STEP nro.	Reagenssi	Aika
1	96 % etanoli	10:00
2	70 % etanoli	05:00
3	50 % etanoli	02:00
4	Aqua	00:15
5	Tumaväri	02:00
6	Juokseva vesi	03:00
7	Differentiaatio	00:02
8	Juokseva vesi	03:00
9	Sinistys	00:30
10	Aqua	02:00
11	70 % etanoli	02:00
12	80 % etanoli	02:00
13	96 % etanoli	02:00
14	Syttoplasmaväri OG-6	02:30
15	96 % etanoli	02:00
16	96 % etanoli	02:00
17	Syttoplasmaväri EA	02:30
18	96 % etanoli	02:00
19	96 % etanoli	02:00
20	Absoluuttinen etanoli	02:00
21	Ksyleeni	

Giemsa-värjäyksen työvaiheet (Avantor Performance n.d., muokattu)

2(2)

1. Sørensen puskuri pH 7

100 ml Sørensen fosfaattipuskuriliuosta 1,9 l UHP-vettä

2. May-Grünwald työliuos

250 ml May-Grünwald -liuosta, 250 ml Sørensen puskuriliuosta pH 7

3. Giemsa työliuos

50 ml Giemsa -liuosta, 450 ml Sørensen puskuriliuosta pH 7

4. Värjäys taulukon mukaan

TAULUKKO 6. Giemsa-värjäyksen suoritus (Avantor Performance n.d., muokattu)

Step nro.	Reagenssi	Aika (min)
1	Laimentamaton May-Grünwald	03:00
2	May-Grünwald työliuos	05:00
3	Sørensen puskuri	01:00
4	Giemsa työliuos	25:00
5	Vesi	

Liite 4. Seulonta tulokset verrattuna elävyyksiin

1(2)

Punaisella merkityt tulokset poikkeavat toisistaan. Morfologisille virheille saadaan suoraan prosenttiosuus, kun virheet on laskettu 100 siittiötä kohti. Eli jos virheitä on 9/100, elävyydeksi saadaan 91%. Elävyyden mennessä alle 80 % sillä ei ole enää kovinkaan paljon merkitystä, koska siemenneste ei mene myyntiin (merkitty violetilla). Lisäksi siemenneste saa elävyydeksi aina 10 % kun näytteestä löytyy siittiöitä, siitä huolimatta, vaikka kaikki olisivat virheellisiä tai kuolleita.

TAULUKKO 7. DanAvl Yorkshire ja Maatiainen

Karju	Morfologia (virheitä/ 100 siittiötä)	Laskettu elävyys (%)	Siemennesteelle annettu elävyys (%)
YY6069	9	91	90
YY6070	12	88	90
YY6072	59	41	80
YY6073	18	82	80
YY6075	82	18	60
FI6079	25	75	90
FI6084	30	70	90
FI6086	27	73	80
FI6087	25	75	90
FI6088	16	84	90
FI6089	18	82	90
FI6090	21	79	90
FI6091	67	33	60
FI6093	89	11	40
FI6095	61	39	80
FI6096	23	77	80
FI6097	16	84	90
FI6098	15	85	90
LL1037	5	95	90
LL1041	4	96	90
LL1043	45	55	50
LL1049	60	40	80
FI1053	19	81	90
FI1057	22	78	90
FI1059	42	58	80
FI1061	13	87	90
FI1063	17	83	80
FI1064	6	94	90
FI1065	13	87	80
FI1066	7	93	90
FI1067	26	74	90
FI1068	14	86	80

TAULUKKO 8. Norsvin Yorkshire ja Maatiainen

Karju	Morfologia (virheitä/100 siittiötä)	Laskettu elävyys (%)	Siemennesteelle annettu elävyys (%)
ZZ3034	24	76	80
ZZ3035	23	77	80
ZZ3036	3	97	90
ZZ3038	9	92	90
ZZ3040	26	74	90
ZZ3042	52	48	80
ZZ3044	4	96	90
ZZ3045	40	60	80
ZZ3047	18	82	90
ZZ3048	9	91	90
ZZ3051	8	92	90
ZZ3050	16	84	90
ZZ3052	23	77	90
ZZ3053	10	90	90
ZZ3054	14	86	90
ZZ3055	25	75	90
MM0287	44	56	90
MM0288	28	72	80
MM0289	72	28	60
MM0290	34	66	80
MM0291	32	68	90
MM0292	23	77	80
MM0293	13	87	80
MM0294	14	86	90
MM0295	17	83	90
MM0296	13	87	90