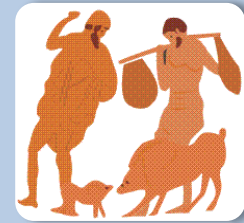


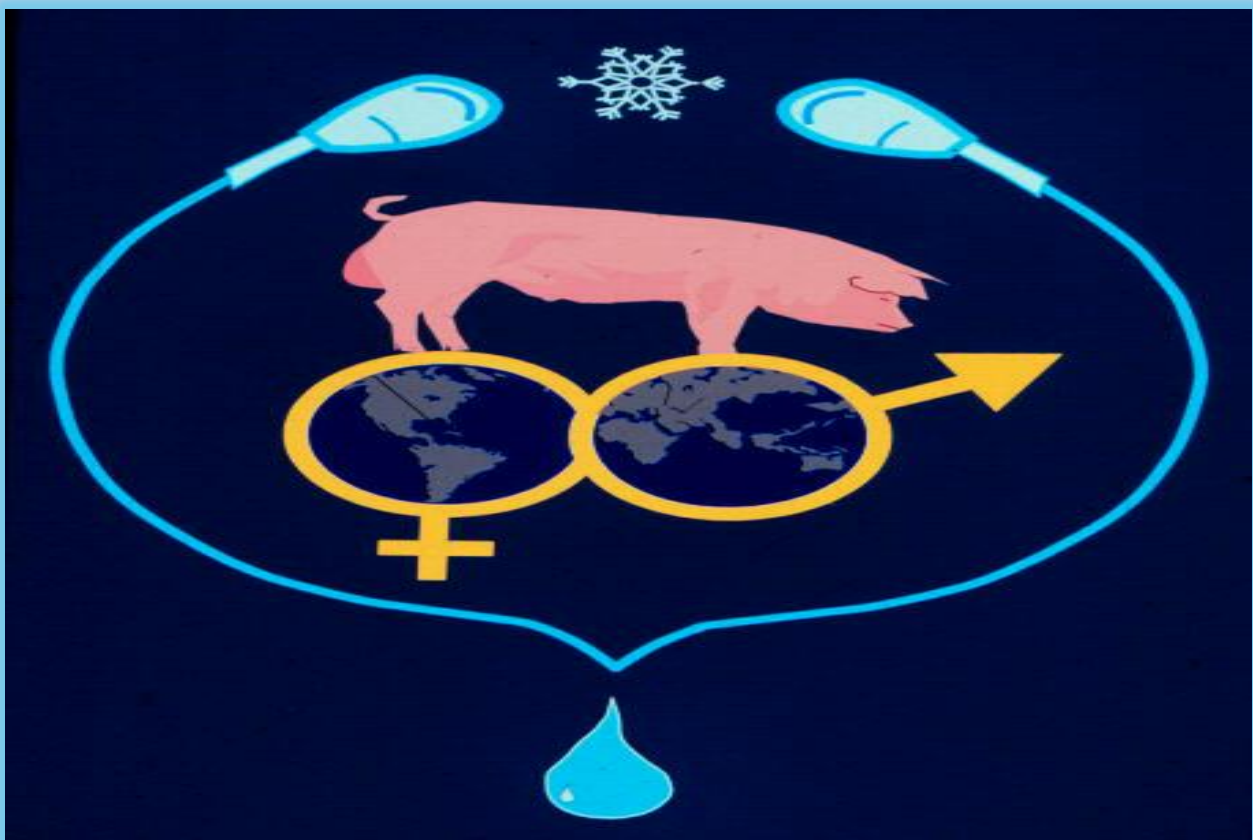


**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**



**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ &
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΘΕΜΑ:<< ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΥΛΛΟΥ
ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΚΑΠΡΟΥ>>**



ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΔΗΜΗΤΡΑ ΣΕΒΑΣΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ.Γ.ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

Η παρούσα εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου και στον σύντροφο μου για την υποστήριξη τους. Μα κυρίως, στον καθηγητή Αριστοτέλη Λυμπερόπουλο για την αμέριστη βοήθεια και την μοναδική ευκαιρία που μου πρόσφερε.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας της Δήμητρας Σεβαστοπούλου, σπουδάστριας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Αναπαραγωγής της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Μούρθια-Ισπανία στα πλαίσια της πρακτικής άσκησης μέσω του προγράμματος ERASMUS. Η εργασία έγινε με την καθοδήγηση των καθηγητών Δρ Jordi Roca και του Δρ Αριστοτέλη Λυμπερόπουλου.

Στόχος της εργασίας είναι η απόκτηση εμπειρίας σε βασικά θέματα που σχετίζονται με τον προσδιορισμό του φύλου των σπερματοζωαρίων του κάπρου, τόσο από θεωρητική όσο και από πρακτική άποψη.

Το περιεχόμενο της εργασίας κατανέμεται σε δυο μέρη.

Στο πρώτο μέρος γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση η οποία περιλαμβάνει τρία κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναδρομή στο σπερματοζωάριο και τη δομή του καθώς και στην εκτίμηση του σπέρματος. Επίσης, γίνεται αναφορά στον ορισμό και στις βασικές αρχές του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στις στρατηγικές της τεχνητής σπερματέγχυσης με σπέρμα προσδιορισμένου φύλου, στη χρήση σπέρματος προσδιορισμένου φύλου στην εξωσωματική γονιμοποίηση και στη βαθιά ενδομήτρια σπερματέγχυση καθώς και στις δυσκολίες που παρουσιάζονται κατά τη διαδικασία του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων.

Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση σε ότι αφορά τον προσδιορισμό του φύλου στον κάπρο και σε άλλα αγροτικά ζώα.

Στο δεύτερο μέρος, περιγράφεται η μέθοδος προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων με την χρήση κυτταρομετρητή ροής υψηλής ταχύτητας. Τέλος, γίνεται συζήτηση σχετικά με τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της.

Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δρ Jordi Roca για την επιστημονική του καθοδήγηση και βοήθεια κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης μου στη μέθοδο προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων του κάπρου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και επόπτη της εργασίας μου Δρ Αριστοτέλη .Γ. Λυμπερόπουλο, για την ανάθεση του θέματος, την αμέριστη παροχή βοήθειας και καθοδήγησης καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να περατωθεί αυτή η εργασία.

Θεσσαλονίκη, 2013

Δήμητρα Σεβαστοπούλου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση της μεθόδου για τον προσδιορισμό του φύλου των σπερματοζωαρίων του κάπρου με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής υψηλής ταχύτητας. Για τις ανάγκες της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 2 κάπροι φυλής Large White υψηλής γενετικής αξίας. Μια φορά την εβδομάδα γινόταν συλλογή του κλάσματος του εκσπερματίσματος που είναι πλούσιο σε σπερματοζωάρια με τη μέθοδο του «γαντιού». Για τη διαδικασία του προσδιορισμού του φύλου χρησιμοποιούνταν εκσπερματίσματα που έφεραν μαζική προοδευτική κίνηση >80%, ζωτικότητα >85% και συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων ανά εκσπερμάτισμα >20x10⁹. Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας του σπέρματος του κάπρου 50 μL από το δείγμα του σπέρματος αραιώνονταν με 5 ml του ειδικού αντιδραστηρίου και τοποθετούνταν στον ειδικό μετρητή του αριθμού των σπερματοζωαρίων τύπου SP-100. Στη συνέχεια το εκσπερμάτισμα που πληρούσε τα παραπάνω χαρακτηριστικά αραιώνονταν (1:1) με το αραιωτικό Beltsville Thawing Solution (BTS) ώστε να έχει πυκνότητα 1x10⁶ σπερματοζωάρια/ml. Για τον προσδιορισμό της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε αναλυτής σπέρματος υποβοηθούμενος από H/Y (CASA). Για τον προσδιορισμό της ζωτικότητας του σπέρματος χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής ροής συνοδευόμενος από H/Y. Τα αποτελέσματα εμφανίζονταν με την μορφή ιστογράμματος στα όποια με πράσινο χρώμα εμφανίζονταν τα ζωντανά σπερματοζωάρια και με κόκκινο τα νεκρά. Στη συνέχεια το υπόλοιπο σπέρμα αραιώνονταν με το αραιωτικό Beltsville Thawing Solution (BTS), μέχρις η τελική πυκνότητα να είναι 100x10⁶ σπερματοζωάρια/ml. Κλάσμα 1 ml του αραιωμένου σπέρματος στη συνέχεια μεταφέρονταν σε πλαστικά κυλινδρικά σωληνάρια (Falcon) και γινόταν προσθήκη 5 μl μητρικού διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής ουσίας Hoechst 33342 (5 mg/ml). Ακολουθούσε επώαση σε σκοτεινό χώρο (υδατόλουτρο) στους 35°C για 50 λεπτά της ώρας. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία του διαχωρισμού σε κάθε δείγμα γινόταν προσθήκη 1 μl χρωστικής τροφίμων από το μητρικό διάλυμα (25 mg/ml). Για το διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής ροής υψηλής ταχύτητας ο οποίος συνοδευόταν από λέιζερ αργού και λειτουργούσε με υπεριώδεις ακτίνες

(μήκος κύματος 351-364 nm) στα 175 mW. Το φθορίζον χρώμα, που εξέπεμπαν τα σπερματοζώαρια, προσλαμβάνονταν από δυο ανιχνευτές, οι οποίοι ανέλυναν τη εκπομπή του φωτός και ξεχώριζαν τα θηλυκά από τα αρσενικά σπερματοζώαρια. Ακολουθούσε ο διαχωρισμός τους και ανάλογα με το φύλο φορτίζονταν με ηλεκτρικό φορτίο. Τα μεν θηλυκά φορτίζονταν με θετικό φορτίο, ενώ τα αρσενικά με αρνητικό φορτίο. Στην έξοδο ο κυτταρομετρητής φέρει δυο μαγνητικές πλάκες φορτισμένες η μία θετικά και η άλλη αρνητικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα θηλυκά σπερματοζώαρια που φέρουν θετικό φορτίο να έλκονται από την αρνητικά φορτισμένη πλάκα και να οδηγούνται στο πλαστικό σωληνάριο που περιέχει τα θηλυκά σπερματοζώαρια. Αντίστοιχα, τα αρσενικά σπερματοζώαρια που φέρουν αρνητικό φορτίο να έλκονται από τη θετικά φορτισμένη πλάκα και να οδηγούνται στο αντίστοιχο πλαστικό σωληνάριο που περιέχει τα αρσενικά σπερματοζώαρια. Τέλος τα νεκρά σπερματοζώαρια μη φέροντας κάποιο φορτίο οδηγούνται σε ξεχωριστό πλαστικό σωληνάριο που περιείχε τα νεκρά σπερματοζώαρια. Ως συμπέρασμα μπορούμε να αναφέρουμε ότι ο προσδιορισμός των σπερματοζωαρίων σε αρσενικά και θηλυκά μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα και στον κάπρου όπως έχει γίνει και στον ταύρο. Στους περιορισμούς Για τον προσδιορισμό των σπερματοζωαρίων του κάπρου περιλαμβάνονται κάποιοι περιορισμοί όπως είναι α) ο μεγάλος αριθμός σπερματοζωαρίων που απαιτείται όταν χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης, β) η ευαισθησία των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων που παρουσιάζει το σπέρμα του κάπρου σε υψηλά επίπεδα αραίωσης και κατά την κατάψυξη του και γ) ο χρόνος που απαιτείται για την παραγωγή μιας ικανοποιητικής, σε αριθμό, δόσης φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων για χρήση σε τεχνητή σπερματέγχυση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛ.

Εισαγωγή

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο πρώτο

1.1 Σπέρμα	10
1.1.1 Δομή του σπερματοζωαρίου	10
1.1.2 Ωρίμανση – αποθήκευση – ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων	12
1.1.3 Εκτίμηση σπέρματος	14
1.2 Ορισμός του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων	21
1.3 Βασικές αρχές του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων	22

Κεφάλαιο δεύτερο

2.1 Στρατηγικές τεχνητής σπερματέγχυσης με φυλοπροσδιορισμένα σπερμ/αρια	26
2.2 In vitro γονιμοποίηση με την χρήση φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος	27
2.3 Βαθιά ενδομητριαία σπερματέγχυση	29
2.4 Οι δυσκολίες του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων	30
2.5 Η σημαντικότητα του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων	31

Κεφάλαιο τρίτο

3.1 Προσδιορισμός φύλου σπερματοζωαρίων στον κάπρο	33
--	----

3.1.1 Εφαρμογή σπερματέγχυσης στο χοίρο με μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων	36
3.2 Προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων στα άλλα ζώα	37
3.2.1 Προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων στα βοοειδή	37
3.2.2 Προσδιορισμός του φύλου του σπέρματος στα μικρά μηρυκαστικά	38
3.2.3 Προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων στα άλογα	42
4. Εξέλιξη της τεχνολογίας από πρακτική άποψη	43
5. Σκοπός της εργασίας	44

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

Μέθοδος προσδιορισμού φύλλου σπερματοζωαρίων με την χρήση κυτταρομετρητή ροής υψηλής ταχύτητας

1. Τοποθεσία και ζώα	46
2. Συλλογή σπέρματος	46
3. Εκτίμηση σπέρματος	46
4. Προσδιορισμός της πυκνότητας του σπέρματος του κάπρου	47
5. Αραίωση του σπέρματος	48
6. Προσδιορισμός της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων με τη βοήθεια του αναλυτή σπέρματος υποβοηθούμενος από ηλεκτρονικό υπολογιστή (CASA)	48
7. Προετοιμασία των δειγμάτων	49
8. Διαχωρισμός σπερματοζωαρίων με κυτταρομετρητή ροής	51
Συμπεράσματα	54
Βιβλιογραφία	55

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τα πρώτα χρόνια της ανθρωπότητας, οι άνθρωποι προσπάθησαν να εξημερώσουν τα σημερινά αγροτικά ζώα και να εκμεταλλευτούν τις παραγωγικές τους ικανότητες.

Σήμερα ο άνθρωπος, λόγω της σημαντικότητας και της χρησιμότητας αυτών των ζώων, προσπαθεί να αυξήσει και να βελτιώσει την παραγωγή των προϊόντων που αυτά παράγουν καθώς υπάρχει σταθερά αυξανόμενη ζήτηση των προϊόντων ζωικής προέλευσης.

Για να μπορέσει λοιπόν να κορεστεί η ζήτηση τροφής μετά από την αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού καταστάθηκε απαραίτητο η χρήση σύγχρονων βιοτεχνολογικών μεθόδων με σκοπό την προώθηση επαρκούς παραγωγής προϊόντων ζωικής προέλευσης.

Γι αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί κάποιες μέθοδοι, όπως η τεχνητή σπερματέγχυση, η κατάψυξη του σπέρματος, η μεταφορά εμβρύων και ο προσδιορισμός του φύλλου από το σπέρμα του αρσενικού ζώου, με στόχο την κορεσμό των παραπάνω αναγκών.

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών έχει αναγνωρίσει πως η παραγωγή των αγροτικών ζώων με προγεννητική επιλογή φύλου, όταν αυτή συνδυαστεί με άλλες βιοτεχνολογικές μεθόδους όπως την γονιδιωματική και την πρωτεομική, για παράδειγμα την μεταφορά γονιδίου μέσω σπερματοζωαρίου (Kues και συν., 2008, De Cecco και συν., 2010, Niemann και συν., 2011), προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική αναπαραγωγής η οποία θα βοηθήσει στον κορεσμό της υψηλής ζήτησης τροφίμων.

Πέραν όμως από τα μακροπρόθεσμα οφέλη, οι κτηνοτρόφοι θα μπορούν να επωφεληθούν άμεσα από την χρήση σπέρματος προσδιορισμένου φύλου, καθώς θα παράγουν τις βέλτιστες αναλογίες αρσενικών και θηλυκών ζώων στην εκμετάλλευσή τους. Η χρήση του παραπάνω σπέρματος αυξάνει τον ρυθμό της γενετικής βελτίωσης, ειδικά σε συνδυασμό με τη γονιδιωματική επιλογή προγόνων.

Επίσης, στις αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις υπάρχει η δυνατότητα βελτίωσης της διαχείρισης της εκμετάλλευσής και ταυτόχρονα του αποκλεισμού των περιστατικών δυστοκίας, καθώς αποφεύγονται τα αρσενικά μοσχάρια. Η προεπιλογή

του φύλου ακόμη, αποσυνδέει την ποσότητα των γαλακτοπαραγωγικών μοσχίδων αντικατάστασης από εκείνες που απαιτούνται για την παραγωγή γάλακτος. Εν συνεχεία, στην αγορά θα εμφανιστεί περισσότερο γάλα και κρέας με αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής αγοράς των μοσχίδων αλλά και του γάλατος (De Vries και συν., 2008).

Ένα ακόμη οικονομικό όφελος είναι η παραγωγή μοσχίδων αντικατάστασης και μοσχίδων για εξαγωγή σε αναπτυσσόμενες χώρες.

Η εργασία αυτή έχει σκοπό να ενημερώσει τον αναγνώστη για την πρόοδο μιας εργαστηριακή μέθοδος που εφαρμόζεται στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, κυρίως των αγροτικών ζώων, και η όποια έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό του φύλου και το διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων σε θηλυκούς και αρσενικούς πληθυσμούς, για την περαιτέρω χρήση τους στη γονιμοποίηση των θηλυκών ζώων.

Στα θηλαστικά, το φύλο καθορίζεται από τα χρωμοσώματα, όπου ένας χρωμοσωμικός συνδυασμός XX αποφέρει ένα θηλυκό, ενώ ένας συνδυασμός χρωμοσωμάτων XY αποφέρει ένα αρσενικό. Από τη στιγμή που τα φυλετικά χρωμοσώματα διαφέρουν σημαντικά σε μήκος, ο διαχωρισμός μεταξύ των σπερματοζωαρίων που φέρουν το X χρωμόσωμα από τα σπερματοζωάρια που φέρουν το Y χρωμόσωμα είναι εφικτός.

Διάφοροι μέθοδοι για τον διαχωρισμό των σπερματικών πληθυσμών με X χρωμόσωμα από αυτούς με Y χρωμόσωμα έχουν διερευνηθεί, αλλά μέχρι στιγμής μόνο ποσοτικά, με βάση την συνολική ποσότητα DNA έχουν υπάρξει διαχωρισμοί, με τη βοήθεια κυτταρομετρητή υψηλής ροής, και έχουν αποδειχθεί επανειλημμένα επιτυχείς και πολύ ακριβείς.

Παρακάτω περιγράφετε η στοιχειώδης διαδικασία της μεθόδου αυτής (sex-sorting) στον προσδιορισμό του φύλου των σπερματοζωαρίων του κάπρου. Επίσης, γίνονται αναφορές για την εφαρμογή του προσδιορισμού του φύλου (sex-sorting) στα κυριότερα παραγωγικά ζώα και κυρίως στα χοιρινά και τέλος έχουμε αναφορές της σημαντικότητας της μεθόδου αυτής αλλά και τα προβλήματα που αντιμετωπίζει..

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.1. Σπέρμα

Το **σπέρμα** είναι το προϊόν εκσπερμάτισης και αποτελείται από δύο μέρη τα σπερματοζωάρια και το σπερματικό πλάσμα. Κατά την εκσπερμάτιση, αυτά τα δύο μέρη ενώνονται σε ένα στην πυελική μοίρα της ουρήθρας.

Το **σπερματικό πλάσμα** είναι το προϊόν έκκρισης των όρχεων, της επιδιδυμίδας, των κυστοειδών αδένων, του προστάτη και των βολβουρηθραίων αδένων.

Το σπερματικό πλάσμα έχει τριπλή αποστολή:

- α) μεταφέρει τα σπερματοζωάρια έξω από το γεννητικό σωλήνα
- β) χρησιμεύει ως ρυθμιστικό μέσο για την προοδευτική κίνηση των σπερματοζωαρίων
- γ) εφοδιάζει τα σπερματοζωάρια με ουσίες που είναι απαραίτητες για το μεταβολισμό τους.

Είναι ισότονο υγρό, ουδέτερης αντίδρασης, περιέχει διάφορες οργανικές ενώσεις όπως η φρουκτόζη, το κιτρικό οξύ, η ινοσιτόλη, η σορβιτόλη και η εργοθειονίνη. Η φρουκτόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τα σπερματοζωάρια. Από τις ουσίες αυτές, άλλες αποτελούν έμμεσες και άλλες άμεσες πηγές ενέργειας. Επίσης, περιέχει πρωτεΐνες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, βιταμίνες καθώς και ορισμένα ανόργανα συστατικά, κυρίως Na και K ενώ το Ca και το Mg περιέχονται σε μικρότερες ποσότητες.

1.1.1 Δομή σπερματοζωαρίου

Τα **σπερματοζωάρια** παράγονται στους όρχεις και εναιωρούνται στο σπερματικό πλάσμα. Αποτελούν το σπουδαιότερο συστατικό του εκσπερμάτισματος. Είναι πολύ εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία μετά τη δημιουργία τους αυξάνονται σε μέγεθος και δεν πολλαπλασιάζονται.

Η φυσιολογική τους δραστηριότητα και η ικανότητά τους προς γονιμοποίηση δεν αποκτάται παρά μόνο λίγες ώρες μετά την είσοδο τους στη μήτρα και δη στην περιοχή συνάντησης τους με τα ωάρια.

Τα σπερματοζωάρια είναι δύο ειδών. Αυτά που φέρουν το X χρωμόσωμα (θηλεοπροσδιοριστικά) και αυτά που έχουν το Y χρωμόσωμα (αρρενοπροδιοριστικά). Τα X και Y χρωμοσώματα είναι τα φυλετικά χρωμοσώματα, που καθορίζουν το φύλο του εμβρύου. Ένα τυπικό σπερματοζωάριο αποτελείται από μια επίπεδη **κεφαλή** και μία μακριά λεπτή **ουρά** ή μαστίγιο που το καθιστά ικανό να κινείται (Εικόνα 3).

Το μεγαλύτερο τμήμα της **κεφαλής** καταλαμβάνεται από τον πυρήνα, που περιέχει το γενετικό υλικό (χρωμοσώματα και το DNA). Το πρόσθιο τμήμα καλύπτεται από την ακροσωμική καλύπτρα ή ακρόσωμα, ενώ το οπίσθιο τμήμα από το οπισθακροσωμικό έλυτρο. Το ακρόσωμα, είναι μια διπλή και κλειστή μεμβράνη που περιέχει ένζυμα απαραίτητα για τη γονιμοποίηση, καλύπτει την πρόσθια πλευρά του πυρήνα και θεωρείται σήμερα ένα εξειδικευμένο λυσοσωμάτιο, που πιστεύεται ότι διευκολύνει ή συμμετέχει στη διείδυση της κεφαλής στο ωάριο. Περιέχει υδρολυτικά ένζυμα όπως είναι η υαλουρονιδάση, η ακροσίνη και η όξινη φωσφατάση. Τα ένζυμα αυτά είναι ικανά να διασκορπίσουν τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και του ακτινωτού στεφάνου, που περιβάλλουν το ωάριο κατά την ωοθηλακιορρηξία, καθώς επίσης και να προκαλέσουν λύση της διαφανούς ζώνης του ωαρίου.

Τέλος, η οπισθοπυρηνική καλύπτρα που καλύπτει την οπίσθια πλευρά του πυρήνα και η κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Η **ουρά** ή μαστίγιο περιλαμβάνει τον αυχένα, το μέσο τμήμα, το κύριο τμήμα και το τελικό τμήμα.

Αυχένας : Βρίσκεται αμέσως πίσω από την κεφαλή, την οποία συνδέει με το μέσο τμήμα. Έχει μήκος 0,5-1,5 μm. Ο αυχένας είναι η πιο ευαίσθητη και εύθραυστη μοίρα του σπερματοζωαρίου. Σε σπερματοζωάρια που παρουσιάζουν αποκόλληση της κεφαλής, η ουρά εξακολουθεί να κινείται.

Μέσο τμήμα : Έχει μήκος 10-15 μm και διάμετρο 1 μm. Αποτελεί το παχύτερο τμήμα της ουράς και είναι πλούσιο σε φωσφολιπίδια και λεκιθίνη. Διατρέχεται καθ' όλο το μήκος από το σύμπλεγμα του αξονικού νηματίου, που αρχίζει από τον αυχένα και καταλήγει στο τελικό τμήμα της ουράς.

Στο ύψος του μέσου τμήματος το σύμπλεγμα του νηματίου περιβάλλεται από μιτοχόνδρια, που αποτελούν το σημείο όπου γίνεται ο μεταβολισμός των σπερματοζωαρίων. Περιέχουν διάφορα ένζυμα που ρυθμίζουν τις μεταβολικές

δραστηριότητες του σπερματοζωαρίου από τις οποίες παράγεται η απαραίτητη για την κίνηση ενέργεια.

Για το λόγο αυτό το μέσο τμήμα θεωρείται ως το όργανο κίνησης του σπερματοζωαρίου. Το έλυτρο των μιτοχονδρίων καταλήγει σε ένα δακτύλιο από τον οποίο αρχίζει το κύριο τμήμα της ουράς.

Κύριο τμήμα : Έχει μήκος 35-45 μm περίπου και είναι το μακρύτερο τμήμα της ουράς. Αρχίζει από τον τελικό δακτύλιο και εκτείνεται μέχρι το τελικό τμήμα. Καλύπτεται από ένα ινώδες χιτώνιο, ενώ το τελικό τμήμα είναι ελεύθερο. Το αξονικό νηματίο, στο ύψος του κύριου τμήματος, περιβάλλεται από το ινώδες έλυτρο, που σχηματίζεται από ίνες λιποπρωτεϊνικής φύσεως. Στο κύριο τμήμα της ουράς συναντάται ενίοτε (συχνά στον κάπρο) προσκολλημένο ένα κυτταροπλασματικό σταγονίδιο, δείγμα ελλιπούς ωρίμανσης του σπερματοζωαρίου.

Τελικό τμήμα : Έχει μήκος 35-45 μm, αποτελείται από το περιφερικό άκρο του αξονικού νηματίου και μένει ακάλυπτο από το ινώδες έλυτρο. Το πρώτο ερέθισμα το οποίο προκαλεί την κίνηση του σπερματοζωαρίου ξεκινά από το κεντρόλιο του αυχένα και μεταδίδεται στις ίνες του αξονικού νηματίου. Ο τρόπος με τον οποίο κινούνται τα σπερματοζωάρια δεν έχει εξηγηθεί με σαφήνεια.

Κυτταρική μεμβράνη: Αποτελείται από λιποπρωτεΐνες και υδατάνθρακες και καλύπτει ολόκληρη την κεφαλή και την ουρά του σπερματοζωαρίου. Το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών είναι ένζυμα τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης και στη μεταφορά ουσιών μέσα και έξω από το σπερματοζωάριο.

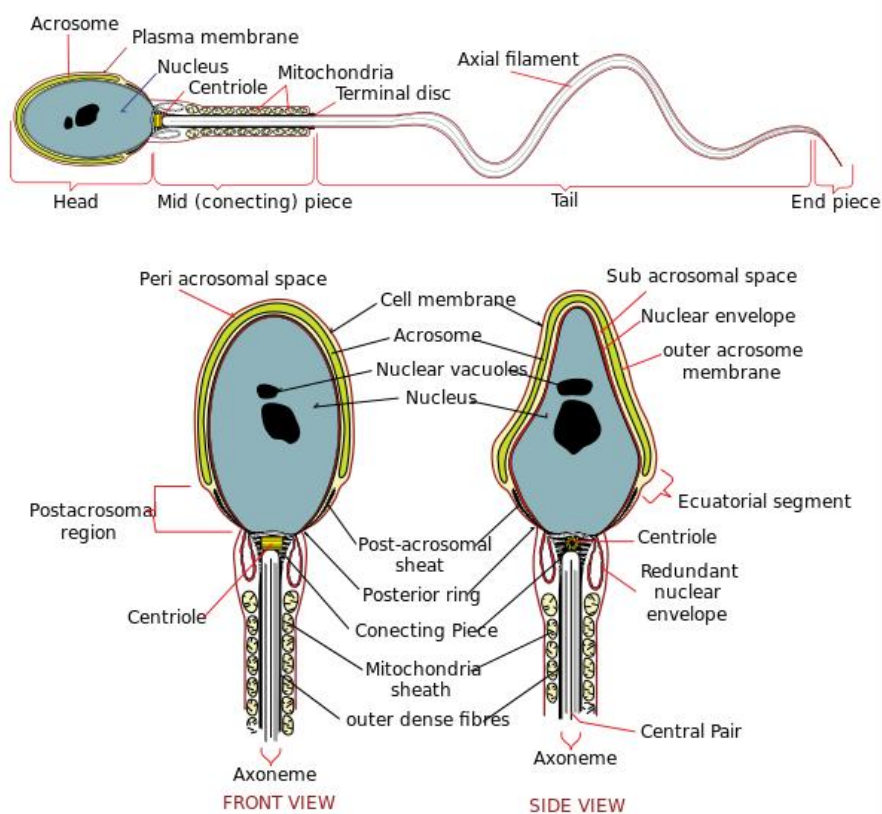
1.1.2 Ωρίμανση – αποθήκευση – ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων

Επιδιδυμική ωρίμανση : Τα σπερματοζωάρια ωριμάζουν στην επιδιδυμίδα. Κατά την επιδιδυμική ωρίμανση τα σπερματοζωάρια αποκτούν την ικανότητα να κινούνται και τη γονιμοποιητική τους ικανότητα.

Ενεργοποίηση : Η ενεργοποίηση συμβαίνει στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού κατά το στάδιο του οίστρου. Ο τράχηλος απομακρύνει το σπερματικό πλάσμα το οποίο αναστέλλει την ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση ξεκινά στη μήτρα. Τα σπερματοζωάρια που είναι ικανά για τη γονιμοποίηση του ωαρίου παραμένουν για κάποιο χρονικό διάστημα στον ισθμό του ωαγωγού πριν προωθηθούν στη λήκυθο, όπου λαμβάνει χώρα η γονιμοποίηση του ωαρίου.

Τα συστατικά της επιφάνειας του σπερματοζωαρίου μεταβάλλονται και απομακρύνονται από τις εκκρίσεις του γεννητικού σωλήνα του θηλυκού. Η ενεργοποίηση οδηγεί σε αλλαγές του ακροσώματος που οδηγούν στην διείσδυση των σπερματοζωαρίων στο ωάριο. Η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων ολοκληρώνεται με την αντίδραση του ακροσώματος.

Στην επιδιδυμίδα τα σπερματοζωάρια επιζούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από οποιοδήποτε σημείο του γεννητικού σωλήνα του αρσενικού ζώου. Τα σπερματοζωάρια παραμένουν στην ουρά της επιδιδυμίδας 1-2 μήνες (60 ημέρες) χωρίς να χάνουν τη γονιμοποιητική τους ικανότητα. Αν δεν λάβει χώρα εκσπερμάτιση, τα σπερματοζωάρια καταστρέφονται εν μέρει με φαγοκυττάρωση, ενώ το μεγαλύτερο μέρος (50%) των σπερματοζωαρίων απορροφώνται.



Εικόνα 1 : Δομή του σπερματοζωαρίου (<http://en.wikipedia.org/wiki/Sperm>)

1.1.3 Εκτίμηση σπέρματος

Με την εκτίμηση του σπέρματος συνήθως προσδιορίζεται η ποσοστιαία αναλογία των ζωντανών σπερματοζωαρίων, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανά ml εκσπερματίσματος, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (την ικανότητα των σπερματοζωαρίων να παρουσιάζουν μαζική προοδευτική κίνηση προς τα εμπρός) και τέλος η μορφολογία (σχήμα) καθώς και οι μορφολογικές ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων.

Ζωτικότητα : Η εκτίμηση της ζωτικότητας του εκσπερματίσματος είναι μία από τις σημαντικότερες εξετάσεις του σπέρματος που διενεργούνται στο εργαστήριο. Η ζωτικότητα εκφράζει το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που είναι ζωντανά και παρουσιάζουν στο οπτικό πεδίο ζωηρή προοδευτική κίνηση σε σχέση με τα νεκρά.

Τα αποτελέσματα είναι υποκειμενικά και απαιτείται εμπειρία για τον εξεταστή για να δώσει μια αξιόπιστη εκτίμηση του δείγματος, το δε ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων δεν σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την γονιμοποιητική ικανότητα (Graham 1996).

Η εκτίμηση γίνεται ως εξής : Μια σταγόνα αραιωτικού διαλύματος τοποθετείται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα που βρίσκεται στη θερμαινόμενη τράπεζα του μικροσκοπίου. Στη σταγόνα αυτή τοποθετείται μια ελάχιστη ποσότητα σπέρματος και τη καλύπτουμε με μια καλυπτρίδα. Το αραιωτικό και το σπέρμα κατανέμονται ομοιόμορφα μεταξύ αντικειμενοφόρου και καλυπτρίδας. Στη συνέχεια εκτιμούμε τη ζωτικότητα στο οπτικό πεδίο. Για να χρησιμοποιηθεί το σπέρμα για τεχνητή σπερματέγχυση η ζωτικότητά του θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 65-70%.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 πρωτοπαρουσιάστηκε από τους Jasko και συν. (1988) μια νέα μέθοδος εκτίμησης του σπέρματος με τη βοήθεια υπολογιστή αναλυτή (CASA) και από τότε, στα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιείται στην καθημερινή διαδικασία εκτίμησης του σπέρματος. Αυτή η τεχνική είναι αντικειμενική και εξετάζει τη ζωτικότητα σε σχέση με τα δεδομένα που έχουν καταχωρηθεί. Οι πιο σημαντικές παράμετροι που εκτιμώνται με τη χρήση του CASA είναι η προοδευτική κίνηση, το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων με προοδευτική κίνηση (Palmer και Magistrini, 1992).

Η σχέση μεταξύ της γονιμοποιητικής ικανότητας και των διαφορετικών παραμέτρων στη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων που αναλύονται από το CASA δεν έχουν καθοριστεί ακόμη (Magistrini και συν., 1996).

Κινητικότητα : Η κινητικότητα εκφράζει την ποιότητα της κίνησης των σπερματοζωαρίων, δηλαδή το είδος της κίνησης και την ταχύτητα με την οποία διασχίζουν το οπτικό πεδίο. Η κινητικότητα μαζί με τη ζωτικότητα αποτελούν το ποιοτικό κριτήριο εκτίμησης του σπέρματος. Η κινητικότητα του σπέρματος καθορίζεται με μια αυθαίρετη κλίμακα από 0-5 ως εξής :

- 0 = τέλεια ακινησία (νεκρά σπερματοζωάρια)
- 1 = αργές κυματοειδείς κινήσεις
- 2 = το 50% των ζωντανών σπερματοζωαρίων έχουν καλή κίνηση
- 3 = το 50 – 80% των ζωντανών σπερματοζωαρίων έχουν προοδευτική κίνηση
- 4 = το 90% των ζωντανών σπερματοζωαρίων έχουν ζωννή προοδευτική κίνηση
- 5 = το 100% των ζωντανών σπερματοζωαρίων έχουν ζωννή προοδευτική κίνηση

Η εκτίμηση της κινητικότητας όταν στηρίζεται στην μικροσκοπική παρατήρηση είναι υποκειμενική, ενώ όταν στηρίζεται σε κινηματογραφικές ή φωτογραφικές μεθόδους είναι αντικειμενική.

Το είδος των κινήσεων που μπορούμε να διακρίνουμε είναι :

1. Μαζική κίνηση: Στο σπέρμα παρατηρούνται «κύματα ή στρόβιλοι» και οφείλονται σε επανασυνάθροιση των σπερματοζωαρίων. Η μαζική κίνηση εξαρτάται από την πυκνότητα. Η εξέταση γίνεται σε μια σταγόνα σπέρματος που τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο πλάκα χωρίς καλυπτρίδα με τη μικρή μεγέθυνση x10.
2. Ισχυρή προοδευτική κίνηση: Τα σπερματοζωάρια κινούνται ευθύγραμμα προς τα εμπρός και διασχίζουν το οπτικό πεδίο σε ελάχιστο χρόνο με μεγάλη ταχύτητα.
3. Επιτόπια κίνηση: Τα σπερματοζωάρια παραμένουν στο οπτικό πεδίο στην ίδια θέση και κάνουν σπασμωδικές ή οφιοειδείς κινήσεις με την ουρά τους.
4. Κυκλική κίνηση: Τα σπερματοζωάρια διαγράφουν κύκλους και παρατηρείται σε περιπτώσεις βλάβης των σπερματοζωαρίων.

5. Οπισθοδρομική κίνηση: Παρατηρείται όταν το σπέρμα αραιωθεί με ακατάλληλα αραιωτικά διαλύματα ή έρθει σε επαφή με νερό, ούρα, κ.λ.π. Οφείλεται σε βλάβη της ουράς (συστροφή, κύρτωση, κ.λ.π.)

Εκτός από τη μαζική και την ισχυρή προοδευτική κίνηση, όλα τα άλλα είδη κινήσεων δεν είναι φυσιολογικά.

Πυκνότητα: Η πυκνότητα προσδιορίζεται από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που υπάρχουν σε κάθε κυβικό εκατοστό σπέρματος. Ο προσδιορισμός της πυκνότητας του σπέρματος είναι απαραίτητος για τον υπολογισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων σε κάθε δόση σπέρματος και τον καθορισμό του βαθμού αραιώσής του.

Ο προσδιορισμός της πυκνότητας του σπέρματος μπορεί να γίνει με τους παρακάτω τρόπους :

A) Με το αιματοκυττόμετρο Neubauer (πλάκα Neubauer), το οποίο φέρει στο κέντρο του ειδικό θάλαμο, στο κέντρο του οποίου υπάρχουν 25 τετράγωνα που χωρίζονται μεταξύ τους με δύο χαραγές. Κάθε τετράγωνο από αυτά χωρίζεται με μια χαραγή σε 16 τετράγωνα.

Με το σιφώνιο που χρησιμοποιούμε για τη μέτρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων αναρροφούμε 0,5 ml σπέρματος και στη συνέχεια συμπληρώνουμε με διάλυμα NaCl 3% μέχρι την ένδειξη 101 (αραίωση 1:200) αραιώση στην οποία τα σπερματοζωάρια ακινητοποιούνται. Κατά την αναρρόφηση θα πρέπει να αποφεύγεται ο σχηματισμός φυσαλίδων. Κατόπιν, το σιφώνιο τοποθετείται μεταξύ της κορυφής του δείκτη και του αντίχειρα και ανακινείται, ώστε το διάλυμα NaCl και το σπέρμα να αναμιχθούν καλά. Μετά την ανακίνηση αφήνουμε να πέσουν 4-5 σταγόνες για να πετύχουμε καλά αραιωμένο σπέρμα. Στη συνέχεια τοποθετούμε την καλυπτρίδα στο αιματοκυττόμετρο. Αγγίζουμε το χείλος της καλυπτρίδας με την κορυφή του σιφωνίου, αφήνουμε μια σταγόνα αραιωμένου σπέρματος να διεισδύσει στο θάλαμο που βρίσκεται κάτω από την καλυπτρίδα και προσέχουμε να μη σχηματισθούν φυσαλίδες αέρα.

Μετά την πλήρωση του θαλάμου τοποθετούμε το αιματοκυττόμετρο στο μικροσκόπιο και στη μεγέθυνση x100 προσπαθούμε να βρούμε το δίκτυο που θα μετρήσουμε τα σπερματοζωάρια.

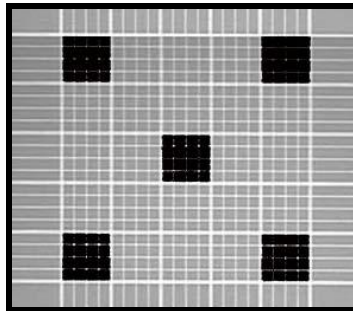
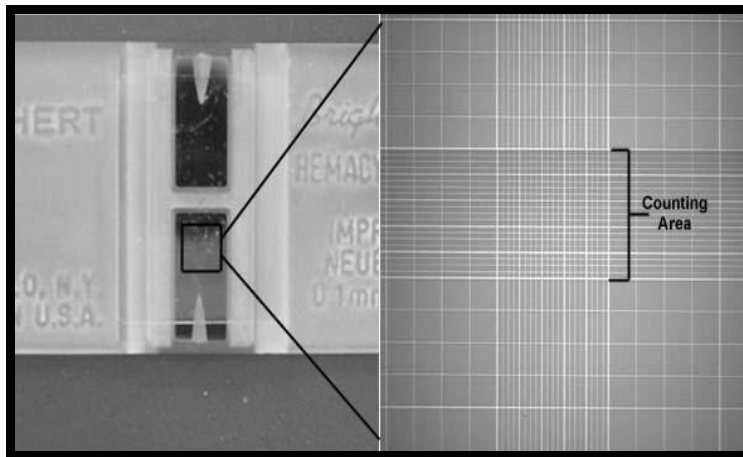
Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τη μεγέθυνση x400-600 καλύπτουμε ένα μεγάλο τετράγωνο (περιέχει 16 τετραγωνίδια) όπου και μετράμε όλα τα σπερματοζώαρια που υπάρχουν. Συνολικά μετράμε τα σπερματοζώαρια των 5 μεγάλων τετραγώνων (τα τέσσερα ακραία και το μεσαίο του δικτύου). Μετράμε δε μόνο τα σπερματοζώαρια που βρίσκονται στην κορυφή και δεξιά της διπλής γραμμής του μεγάλου τετραγώνου χωρίς να μετρήσουμε εκείνα που βρίσκονται στη διπλή γραμμή, στην αριστερή και κάτω πλευρά κάθε τετραγώνου.

Στο τέλος αθροίζουμε τα σπερματοζώαρια που μετρήσαμε στο καθένα από τα 5 τετράγωνα ($5 \times 16 = 80$ τετραγωνίδια) και τα πολλαπλασιάζουμε επί 10×10^6 . Το γινόμενο θα μας δώσει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων σε 1ml σπέρματος (Εικόνες 2 και 3).



Εικόνα 2. Αιματοκυττόμετρο Neubauer (πλάκα Neubauer)

B) Με το ηλεκτροφωτόμετρο (Εικόνα 4): Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας του σπέρματος τοποθετούμε μέσα σε ειδικό φιαλίδιο (κυβέτα) 0,1 ml σπέρματος, το οποίο αραιώνουμε σε 4 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου (N/15-9‰). Μετά από καλή ανάμειξη τοποθετούμε το ειδικό φιαλίδιο στην υποδοχή του φωτομέτρου και διαβάζουμε την ένδειξη της συσκευής. Η ένδειξη μεταφράζεται σύμφωνα με ένα πίνακα σε εκατομμύρια σπερματοζώαρια σε κάθε ml σπέρματος.



Εικόνα 3. Περιοχή καταμέτρησης των σπερματοζωαρίων



Εικόνα 4. Φωτόμετρο για τη μέτρηση της πυκνότητας

Γ) Με τον κυτταρομετρητή : Τοποθετούμε μέσα σε ειδικό φιαλίδιο (κυβέτα) 20 μl σπέρματος, το οποίο αραιώνουμε σε 2 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου (N/15-99%). Στη συνέχεια μετά από καλή ανάμιξη τοποθετούμε το ειδικό φιαλίδιο στην

υποδοχή του κυτταρομετρητή δίνοντας τον όγκο και τη ζωτικότητα του εκσπερματίσματος.

Ο κυτταρομετρητής μας δίνει αυτόματα στον φωτεινό πίνακα την πυκνότητα του σπέρματος που καταγράφεται σε ειδικό φωτοχημικό χαρτί, καθώς και το βαθμό αραιώσης και τις δόσεις.

Εάν τα εκσπερματίσματα πληρούν όλες τις προδιαγραφές καταλληλότητας τότε αρχίζει η διαδικασία της αραιώσης.

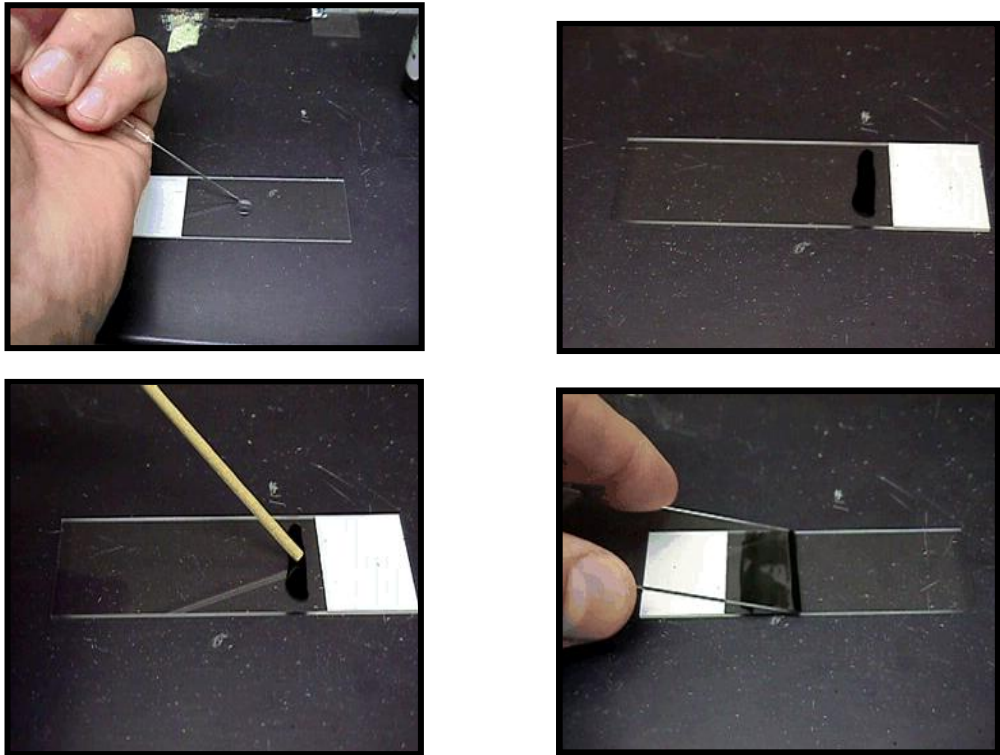
Προσδιορισμός των νεκρών και ζωντανών σπερματοζωαρίων: Γίνεται μετά από παρασκευή επιχρίσματος σπέρματος και χρώση του με εωσίνη-νιγροσίνη. Η κυτταρική μεμβράνη των ζωντανών σπερματοζωαρίων δεν είναι διαπερατή για ορισμένες ουσίες όπως είναι η εωσίνη-νεγροσίνη, ενώ των νεκρών σπερματοζωαρίων είναι διαπερατή λόγω αλλοιώσεων. Παίρνουμε 0,67 γρ. εωσίνης και 10γρ. νιγροσίνης και τα διαλύουμε σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Από το διάλυμα παίρνουμε 0,5 ml και το τοποθετούμε σε πλαστικό φιαλίδιο (ependorf) σε θερμοκρασία 37°C και προσθέτουμε 1-2 σταγόνες μη αραιωμένου σπέρματος. Στη συνέχεια το αναμιγνύουμε και το αφήνουμε 5 λεπτά.

Τοποθετούμε μια σταγόνα σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια με μια άλλη αντικειμενοφόρο πλάκα ή καλυπτρίδα την οποία κρατάμε κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζει με την αντικειμενοφόρο πλάκα γωνία 45°, ωθούμε τη σταγόνα προς τη μία κατεύθυνση για να κατανεμηθεί η σταγόνα σε λεπτό στρώμα σ' όλη την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου. Η μικροσκοπική παρατήρηση γίνεται με τον καταδυτικό φακό σε μεγέθυνση x400. Όσα σπερματοζωάρια φαίνονται ελαφρά χρωματισμένα θεωρούνται ζωντανά, ενώ εκείνα που είναι έντονα χρωματισμένα θεωρούνται νεκρά.

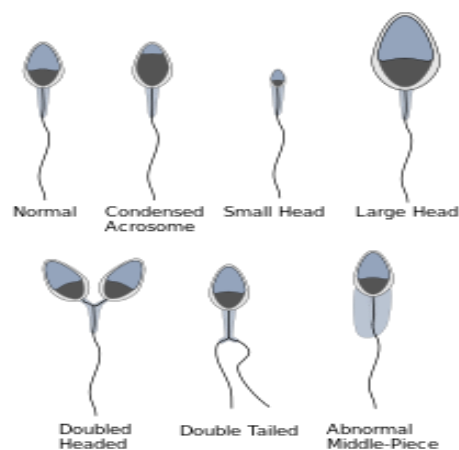
Προσδιορισμός των μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων: Γίνεται μετά από παρασκευή επιχρίσματος σπέρματος και χρώση του με ειδικές χρωστικές (εωσίνη-νιγροσίνη, χρωστική Burri ή σινική μελάνη, κ.ά.). Ποσοστό μορφολογικών ανωμαλιών από 15-20% θεωρείται φυσιολογικό, ενώ όταν αυτό είναι μεγαλύτερο από 20% το σπέρμα είναι ακατάλληλο για τεχνητή σπερματέγχυση.

Η τεχνική της εωσίνης-νιγροσίνης: Μια σταγόνα σπέρματος και μια εωσίνης-νεγροσίνης τοποθετούνται στην άκρη μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Με τη βοήθεια μιας καλυπτρίδας γίνεται ανάμειξη και στην συνέχεια επίχρισμα. Επιδιώκεται η κατανομή του μείγματος να γίνει σε λεπτό στρώμα, σε ολόκληρη την επιφάνεια της

αντικειμενοφόρου. Όταν το επίχρισμα στεγνώσει εξετάζεται στο μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Προετοιμασία επιχρισμάτων σπέρματος με τη χρώση εωσίνη νιγροσίνη.



Εικόνα 6: Μορφολογικές ανωμαλίες σπερματοζωαρίων.

Μετρούνται 300 σπερματοζωάρια σε αρκετά οπτικά πεδία, αρχίζοντας από αριστερά προς τα δεξιά. Πάντα σημειώνουμε εκείνα από τα 300 που παρουσιάζουν μορφολογικές ανωμαλίες.

1.2 Ορισμός προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων

Ο προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων είναι μια μέθοδος επιλογής του είδους του σπερματοζωαρίου που θα γονιμοποιήσει το ωάριο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει τα σπερματοζωάρια με την υψηλότερη ποσοστιαία αναλογία ζωντανών, αλλά ταυτόχρονα και συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως είναι το φύλο των σπερματοζωαρίων.

Στην τελευταία περίπτωση τα σπερματοζωάρια μπορούν να διαχωριστούν σε εκείνα που φέρουν το X- (θηλυκό) χρωμόσωμα και σε αυτά που φέρουν το Y- (αρσενικό) χρωμόσωμα με βάση τις διαφορές που παρουσιάζουν στο γενετικό τους υλικό (DNA).

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνεργασία με άλλες αναπαραγωγικές μεθόδους όπως είναι η τεχνητή σπερματέγχυση, η εξωσωματική γονιμοποίηση με σκοπό την παραγωγή απογόνων του επιθυμητού φύλου.

Μέχρι την ανάπτυξη της μεθόδου του κυτταρομετρητή υψηλής ροής, η μόνη μέθοδος που ήταν διαθέσιμη για την εκτίμηση του προσδιορισμού του φύλου ενός δείγματος σπέρματος ήταν ο προσδιορισμός της αναλογίας των φύλων μεταξύ των απογόνων. Το υψηλό κόστος, οι χρονικοί περιορισμοί, και, ίσως το πιο σημαντικό, οι καθυστερήσεις στην αξιολόγηση της μεθοδολογίας. Όλα αυτά συντέλεσαν στο να μειωθεί το κίνητρο για την ανάπτυξη των μεθόδων διαχωρισμού.

Η δύναμη της μεθόδου του κυτταρομετρητή υψηλής ροής έγκειται στο γεγονός ότι χιλιάδες κύτταρα μπορούν να αναλυθούν μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα ή λεπτά. Τα χρωμοσώματα του φύλου στα θηλαστικά περιγράφηκαν για πρώτη φορά αμέσως μετά την αλλαγή του αιώνα (Guyer, 1910). Το 1944, ο Avery και συν. δημοσίευσαν πειραματικά αποτελέσματα που καθόριζαν το DNA ως φορέα των γενετικών πληροφοριών.

Ο Moruzzi (1979) προσδιόρισε σε μεγάλο αριθμό θηλαστικών τις μεγάλες διαφορές που υπάρχουν στη χρωματίνη μεταξύ των σπερματοζωαρίων που φέρουν το X- και το Y-χρωμόσωμα και θεώρησε ότι θα ήταν καλοί υποψήφιοι για πειραματισμούς που αφορούν στο διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων. Τη βάση για το διαχωρισμό αποτέλεσε η οπτική εκτίμηση του καρυοτύπου.

Οι Gledhill και συν., (1976) πρωτοστάτησαν στη χρήση του κυτταρομετρητή ροής για την αξιολόγηση του DNA που περιέχουν τα σπερματοζώαρια.

Το DNA του πυρήνα των σπερματοζωαρίων διαφέρει σε ότι αφορά στα χρωμοσώματα X- και Y- που φέρουν τα σπερματοζώαρια σε όλα τα θηλαστικά με μερικές εξαιρέσεις π.χ. the creeping vole του είδους *Microtus oregonil* (Pinkel και συν., 1982, Johnson και Clarke, 1989).

Το σπερματοζώαριο που φέρει το X-χρωμόσωμα φέρει πάντα περισσότερο DNA από ότι φέρει το σπερματοζώαριο που φέρει το Y-χρωμόσωμα, επειδή το X-χρωμόσωμα είναι μεγαλύτερο από το Y-χρωμόσωμα. Η περιεκτικότητα σε DNA των αυτόσωμων χρωμοσωμάτων δεν διαφέρει στα σπερματοζώαρια που φέρουν τα X- και Y-χρωμοσώματα, ενώ στα ετερόλογα χρωμοσώματα διαφέρει. Αυτή η διαφορά στη μάζα του DNA μεταξύ των X- και Y- χρωμοσωμάτων που φέρουν τα σπερματοζώαρια εξακολουθεί να είναι η μόνη ταυτοποιημένη και πιστοποιημένη παράμετρος.

Με την ακριβή μέτρηση της περιεκτικότητας του DNA σε τόσο λίγα όσο 1.000 σπερματοζώαρια, μπορεί κανείς σε ένα δείγμα σπέρματος να προσδιορίσει την αναλογία των σπερματοζωαρίων που φέρουν τα X- και Y-χρωμοσώματα. Η μέτρηση αυτή μπορεί να γίνει σε σχεδόν οποιοδήποτε δείγμα όπου το σπέρμα έχει τουλάχιστον 3% διαφορά μάζας του DNA μεταξύ των X- και Y-χρωμοσωμάτων (Johnson and Pinkel, 1986. Johnson και συν., 1987α).

1.3 Βασικές αρχές του προσδιορισμού του φύλου

Η βιοτεχνολογία του προσδιορισμού του φύλου βασίζεται στις πληροφορίες ότι τα X-σπερματοζώαρια έχουν περίπου 4% περισσότερο γενετικό υλικό από τα Y σπερματοζώαρια. Κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού των X και Y σπερματοζωαρίων ο κυτταρομετρητής ροής, τη στιγμή της ανάγνωσης, συνδυάζει τις ακτίνες λέιζερ, το διαφορετικό χρωματισμό των ζωντανών και των νεκρών σπερματοζωαρίων και την υδροδυναμική δύναμη που κατευθύνει τα σπερματοζώαρια.

Επιπλέον, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των φυλών των βοοειδών ανάλογα με την ποσότητα του DNA που υπάρχει στο Y χρωμόσωμα. Σύμφωνα με τον Garner (2006), τα σπερματοζώαρια X και Y εμφανίζουν μεταξύ τους διαφορά (%) στην

περιεκτικότητα του DNA του πυρήνα τους. Η διαφορά αυτή, είναι: 4,22 για τη φυλή Jersey, 4,07 για τη φυλή Angus, 4,01 για τη φυλή Holstein, 3,98 για τη φυλή Hereford και 3,7 για τη φυλή Brahman.

Αυτές οι διαφορές, δεν είναι δυνατόν να καθορίζουν τη γονιμότητα μετά από τη διαδικασία του προσδιορισμού του φύλου. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη χρήση του κυτταρομετρητή ροής, διότι καθορίζουν κυρίως την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα της παραγωγής των φυλο-προσδιορισμένων σπερματοζωαρίων.

Πρόσφατα έχει επέλθει πρόοδος στη μορφή του ρύγχους που χρησιμοποιείται στον κυτταρομετρητή ροής, στη θέση των σπερματοζωαρίων κατά τη στιγμή της διόδου τους μέσω του λέιζερ, καθώς και αλλαγές στην πίεση και τον τύπο των χρωστικών ουσιών. Όλες αυτές οι αλλαγές έχουν βελτιώσει σημαντικά την διαδικασία διαχωρισμού των γαμετών X και Y (Garner, 2006).

Η ταχύτητα διαχωρισμού των σπερματοζωαρίων σε X και Y είναι σχετικά βραδεία με τη δυνατότητα διαχωρισμού περίπου 300.000 έως 400.000 σπερματοζωαρίων ανά λεπτό. Με αυτό τον τρόπο, η διαδικασία διαχωρισμού για να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα πρέπει η δόση του σπέρματος του ταύρου στο πλαστικό σωληνάριο που χρησιμοποιείται να είναι $2,1 \times 10^6$ σπερματοζωάρια στο πλαστικό σωληνάριο των 0,25 ml.

Η διαδικασία του διαχωρισμού των σπερματοζωαρίων που φέρουν X από εκείνα που φέρουν το Y έχει ως αποτέλεσμα μια πιθανή δυσμενή επίδραση στα σπερματοζωάρια με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται μειωμένα ποσοστά σύλληψης (Sartori και συν., 2004, Garner, 2002). Σύμφωνα με τον Gonsálvez και συν., (2011), η διαδικασία του διαχωρισμού παράγει μια αλληλεπίδραση του DNA με τις φθορίζουσες ουσίες, την έκθεση τους στις ακτίνες λέιζερ, το διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων σε μικρο-σταγονίδια, την επιτάχυνση της διόδου των σπερματοζωαρίων μέσα από κανάλια γεωμετρικά συμπιεσμένου υγρού και τη φυγοκέντρωση.

Όλα αυτά τα παραβιολογικά μέσα των σπερματοζωαρίων ή οι μηχανικές αλληλεπιδράσεις θα έχουν θεωρητικά τη δυνατότητα να παράγουν αλλαγές στις δομές των σπερματοζωαρίων συμπεριλαμβανόμενων και των μορίων του DNA. Κατά τη μελέτη της κυτταρικής δομής των σπερματοζωαρίων φαίνεται ότι αυτά ενεργοποιούνται κατά τη διαδικασία χρησιμοποίησης του κυτταρομετρητή ροής για τον προσδιορισμό του φύλου (Lu και Seidel, 2004).

Αυτή η ολική ή μερική ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων οφείλεται κυρίως στις διαδικασίες που υποβάλλονται τα σπερματοζωάρια κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας των δειγμάτων και κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή (Schenk και συν., 1999).

Οι Lu και Seidel, (2004) υποστηρίζουν ότι θα μπορούσε να οφείλεται στη διαδικασία που υπόκεινται τα σπερματοζωάρια κατά την επώαση τους στους 34,5°C για 45 λεπτά της ώρας με τη φθορίζουσα χρωστική ουσία Hoechst 33342.

Κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των φύλων, τα σπερματοζωάρια υπόκεινται στη επίδραση των ακτίνων λέιζερ και διαφόρων φυσικών δυνάμεων, όπως εξέρχεται από το διαλογέα με ταχύτητα σχεδόν 90 χλμ/ώρα προτού εισέλθει στο διάλυμα συλλογής.

Η διαδικασία του διαχωρισμού καταλήγει σε ένα εξαιρετικά αραιωμένο δείγμα με 800.000 σπερματοζωάρια/ml, που στην συνέχεια φυγοκεντρείται για να παρέχει ένα συμπυκνωμένο δείγμα κατάλληλο για συσκευασία και κατάψυξη.

Έτσι, αυτή η διαδικασία θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαταραχή της διάρκειας της λειτουργίας των σπερματοζωαρίων σε σύγκριση με τη διάρκεια της λειτουργίας των σπερματοζωαρίων στα οποία δεν έχει εφαρμοσθεί διαχωρισμός (Lu και Seidel, 2004, Maxwell και συν., 2004, Peippo και συν., 2009).

Επίσης, η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να περιλαμβάνει την προ-ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και έναν μειωμένο αριθμό ζωντανών σπερματοζωαρίων για τη σπερματέγχυση (Schenk και συν., 2009, Vazquez και συν., 2003).

Η δοκιμή της θερμο-αντοχής έδειξε ότι η μείωση της κινητικότητας στα φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια ήταν ταχύτερη σε σύγκριση με εκείνη των μη φυλοπροσδιορισμένων. Επίσης, αναφέρεται από κάποιους ερευνητές ότι υπάρχει μια επίδραση που σχετίζεται με τα εκσπερματίσματα από ένα συγκεκριμένο ταύρο και τη δόση του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος που χρησιμοποιήθηκε για σπερματέγχυση (De Jarnette και συν., 2008) και ότι ορισμένα δείγματα από ορισμένους ταύρους που μπορούν να ανεχθούν την καταπόνηση του διαχωρισμού κατά ένα πιο επιθυμητό τρόπο (Seidel και Schenk, 2008).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η τεχνητή σπερματέγχυση με το φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα δεν μεταβάλλει την επιστροφή σε οίστρο και δεν επηρεάζει την πιθανότητα οι μοσχίδες να συλλάβουν από τις επόμενες τεχνητές σπερματεγχύσεις (Chebel και συν., 2010). Επίσης, Holstein μοσχίδες που

γονιμοποιήθηκαν με φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα είχαν παρόμοια ποσοστά απώλειας της εγκυμοσύνης που κυμαίνονταν από 29 ± 1 έως 50 ± 1 ημέρες μετά την τεχνητή σπερματέγχυση σε σύγκριση με μοσχίδες που γονιμοποιήθηκαν με συμβατικό σπέρμα (Seidel και Schenk, 2008).

Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στο ποσοστό των αποβολών από τον 2^ο μήνα της εγκυμοσύνης μέχρι τον τοκετό. Σε γενικές γραμμές οι αγελαδοτρόφοι θέλουν να γνωρίζουν αν τα μοσχάρια που παράγονται από φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα είναι διαφορετικά από εκείνα που παράγονται με συμβατικό σπέρμα. Οι Tubman και συν., (2004) λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ανέλυσαν στοιχεία από 1.169 μοσχάρια που παρήχθησαν από φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα και 793 μόσχων που παρήχθησαν από συμβατικό σπέρμα.

Δεν παρατήρησαν όμως καμία διαφορά στη διάρκεια της κυοφορίας, στο βάρος κατά τη γέννηση, την ευκολία του τοκετού, στο σθένος του μοσχαριού, στο βάρος μετά τον απογαλακτισμό, το ποσοστό των αποβολών και τα ποσοστά θνησιμότητας (νεογέννητων και απογαλακτισμένων) μεταξύ των μόσχων που παρήχθησαν από συμβατικό ή φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα.

Όταν χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* πρότυπα για την επαλήθευση της αποτελεσματικότητας του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος για την παραγωγή εμβρύων, τότε τα αποτελέσματα υπήρξαν αντιφατικά όσον αφορά στην ανάπτυξη του εμβρύου η οποία εξαρτάται κυρίως από το αρσενικό που χρησιμοποιείται (Lu και συν., 1999, Merton και συν., 2003, Xu και συν., 2006). Ως εκ τούτου, τα μοσχάρια που παράγονται από φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα αναπτύσσονται κανονικά τόσο πριν όσο και μετά τη γέννηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2.1 Στρατηγικές τεχνητής σπερματέγχυσης με φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια

Στα βοοειδή τα ποσοστά σύλληψης στη τεχνητή σπερματέγχυση εξαρτώνται από τον ταύρο, την επεξεργασία του σπέρματος, τη δόση του σπέρματος και τον αριθμό των σπερματεγχύσεων. Για οικονομικούς λόγους, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων σε δείγματα φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος μειώνεται περίπου στα 2 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά δόση, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ποσοστών σύλληψης κατά 15-20% σε σύγκριση με εκείνα του συμβατικού σπέρματος (Dejarnette και συν., 2011).

Από ορισμένους ερευνητές αναφέρεται ότι τα ποσοστά σύλληψης επηρεάζονται από την επεξεργασία του σπέρματος και τον ταύρο ανεξάρτητα από τη καταπόνηση που προκαλεί στα σπερματοζωάρια ο διαχωρισμός του φύλου (Den DAAS και συν., 1998). Αυτό όμως θα πρέπει να αποδειχθεί και στην πράξη, καθώς οι Dejarnette και συν., (2011) διαπίστωσαν ότι ακόμη και η εφαρμογή σπερματέγχυσης με αυξημένο αριθμό φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων (10 εκατ. ευρώ) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ποσοστών σύλληψης σε σύγκριση με εκείνα μετά από εφαρμογή σπερματέγχυσης με αυξημένο αριθμό συμβατικών σπερματοζωαρίων.

Για τις αγελάδες που βρίσκονται υπό ορμονική αγωγή για την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας απαιτείται πιο αυξημένος αριθμός σπερματοζωαρίων. Στα βοοειδή κατά την εμβρυομεταφορά η επιτυχής χρήση του φυλοπροδιορισμένου σπέρματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δόση της τεχνητής σπερματέγχυσης. Τα 2 εκατομμύρια σπερματοζωάρια που χρησιμοποιούνται θεωρείται ότι είναι ανεπαρκή (Schenk και συν., 2006)

Η επιτυχία μετά την κατάθεση υψηλότερων δόσεων που κυμαίνονταν από 10 έως 20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια φαίνεται να εξαρτάται από τον πρόγονο ή τις συνθήκες εφαρμογής των προγραμμάτων εμβρυομεταφοράς μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας [Multiple ovulation embryo transfer (MOET)].

Ο Schenk και συν., (2006) πέτυχαν χαμηλότερα ποσοστά σύλληψης μετά από τεχνητή σπερματέγχυση με 20 εκατομμύρια φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων. Σε μια άλλη μελέτη κατά την οποία σε διαστήματα 12 ωρών εφαρμόστηκαν δυο σπερματεγχύσεις με 5 εκατομμύρια φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα ανάμεσα στις ομάδες (Hayakawa και συν., 2009).

Στον άνθρωπο, η μεταφορά των γαμετών στην σάλπιγγα (GIFT) είναι ένα αποδεκτό μέσο για την επίτευξη της εγκυμοσύνης. Για τη μέθοδο αυτή, αντί της *in vitro* γονιμοποίησης, οι αρσενικοί και θηλυκοί γαμέτες μεταφέρονται μαζί στη σάλπιγγα. Η μέθοδος αυτή έχει δοκιμαστεί με επιτυχία στους χοίρους όταν χρησιμοποιήθηκαν φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια (Rath και συν., 1994). Η έγχυση του σπέρματος στη σάλπιγγα (SIFT) αντικαθιστά την ενδομητριάα σπερματέγχυση με την εναπόθεση των σπερματοζωαρίων απευθείας στη σάλπιγγα.

Αυτή η νέα τεχνική επιτρέπει μια σημαντική μείωση του αριθμού των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων που απαιτούνται ανά σπερματέγχυση. Πρόσφατα ο Grossfeld και συν., (2011) περιέγραψαν μια νέα τεχνική για την αναίμακτη μεταφορά δειγμάτων σπέρματος σε μικρούς όγκους (30 μl, 10^5 σπερματοζωάρια) απευθείας στη σάλπιγγα των βοοειδών. Στις πρώτες δοκιμές που έγιναν υπό συνθήκες στάβλου χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, το 41,2% των αγελάδων έμειναν έγκυες. Μια τέτοια τεχνική έχει τη δυνατότητα να έχει σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα της χρησιμοποίησης των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων.

2.2 *In vitro* γονιμοποίηση με την χρήση φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος

Η *in vitro* γονιμοποίηση είναι μια τεχνική ρουτίνας που απαιτεί πολύ μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων για την παραγωγή εμβρύων. Ως εκ τούτου, είναι προφανής η χρήση των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων στην *in vitro* γονιμοποίηση. Σε μια αναφορά σχετικά με τη *in vitro* γονιμοποίηση στα βοοειδή με φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια ο Cran και συν., (1993), αναφέρουν τη

γέννηση των πρώτων μοσχαριών, όπου το φύλο είχε προσδιοριστεί πριν από τη γονιμοποίηση.

Τα ποσοστά κυτταροδιαίρεσεων ήταν όμοια με εκείνα των μαρτύρων όπου είχε χρησιμοποιηθεί συμβατικό σπέρμα, αλλά το ποσοστό των βλαστοκύστεων που αναπτύχθηκαν ήταν μειωμένο μετά από *in vitro* γονιμοποίηση με φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια. Αυτό το γεγονός πιθανόν να οφείλονταν στην αναδιοργάνωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων λόγω της ενεργοποίησής τους (Lu και συν., 1999; Merton και συν., 1997).

Σε μελέτες που έγιναν τα τελευταία έτη παρατηρήθηκε ότι ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων είχε αρνητική επίδραση στην ακεραιότητα των σπερματοζωαρίων, όταν όμως το σπέρμα φυγοκεντρώνταν με διάλυμα Percoll δεν επηρεάζονταν ούτε το ποσοστό κυτταροδιαίρεσεων ούτε το ποσοστό των βλαστοκύστεων (Carvalho και συν., 2010). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τον Xu και συν. (2006) μετά από *in vitro* γονιμοποίηση καταψυγμένων ωαρίων με φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια. Η μεταγενέστερη μεταφορά των εμβρύων αποκάλυψε ότι δεν υπήρχε καμία διαφορά στην ανάπτυξη των εμβρύων στις ομάδες των μαρτύρων είτε τα έμβρυα προέρχονταν μετά από *in vitro* γονιμοποίηση με συμβατικό σπέρμα ούτε και στα έμβρυα που είχαν παραχθεί *in vivo*.

Σε αντίθεση με τα έμβρυα των αγελάδων που προέρχονταν από *in vitro* γονιμοποίηση με την χρήση συμβατικού σπέρματος, τα έμβρυα που προέκυψαν από *in vitro* γονιμοποίηση με φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα παρουσίασαν μια μείωση στα γονίδια που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη τους, όπως ο μεταφορέας της γλυκόζης 3 GLUT3 και γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση (G6PD), (Morton και συν., 2007), η οποία μπορεί να έχει δυσμενή επίδραση στην ανάπτυξη των εμβρύων.

Σε άλλες μελέτες τα ποσοστά κυτταροδιαίρεσεων μετά από *in vitro* γονιμοποίηση με φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια ήταν 30% χαμηλότερα σε σύγκριση με εκείνα που δεν είχαν υποστεί διαχωρισμό και προέρχονταν από το ίδιο εκσπερμάτισμα. Σε αυτή τη μελέτη, ο σχηματισμός της βλαστοκύστης την 8η ημέρα ήταν 30-40% χαμηλότερος σε σύγκριση με εκείνο των μαρτύρων (Bermejo-Alvarez και συν., 2008), και μειώθηκε και ο αριθμός των κύκλων του κυττάρου (Beyhan και συν., 1999).

Επιπροσθέτως, σε βλαστοκύστες 7 ημερών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές που σχετίζονταν με το φύλο στο mRNA για τα γονίδια Γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GSTM3), DNA (κυτοσίνη-5)-μεθυλοτρανσφεράση 3A (DNMT3a), και

του υποδοχέα 1 της προγεστερόνης (PGRMC1). Τα έμβρυα που προέκυψαν παρουσίασαν καθυστερημένη έναρξη της πρώτης κυτταροδιαίρεσης (Bermejo-Alvarez et al. 2010).

Επίσης, η *in vitro* γονιμοποίηση με φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα επηρεάζει τη δομή των βλαστοκύστεων. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν μεταβολές στα μιτοχόνδρια, στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και στη πυρηνική μεμβράνη (Palma και συν., 2008). Επιπλέον, οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι υπήρχε μια θετική συσχέτιση του ποσοστού των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων με μαζική προοδευτική κίνηση και της ανάπτυξης της βλαστοκύστης.

Τα αποτελέσματα της *in vitro* γονιμοποίησης επηρεάζονται από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, ο οποίος είναι απαραίτητο να είναι υψηλότερος σε σύγκριση με εκείνο που χρησιμοποιείται για την *in vitro* γονιμοποίηση με συμβατικό σπέρμα καθώς και από την υδροδυναμική πίεση που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τους στον κυτταρομετρητή ροής (Barcelo-Fimbres και συν., 2011).

Αν και η διαδικασία του διαχωρισμού έχει σημαντικές επιπτώσεις στη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων, και οι επιδράσεις του ταύρου είναι προφανείς, το DNA δεν επηρεάζει την μειωμένη γονιμότητα, καθώς τα περισσότερα από τα νεκρά σπερματοζωάρια, και αυτά που παρουσιάζουν ανευπλοειδισμό απομακρύνονται από τον διαχωρισμό χάρης στην ταυτόχρονη σήμανση με τη χρωστική Hoechst 33342 (Johnson & Welch 1999).

2.3 Βαθιά ενδομητρίαία σπερματέγχυση

Η βαθιά ενδομητρίαία σπερματέγχυση απαιτεί μακρύ και εύκαμπτο καθετήρα για να περάσει τον τράχηλο της μήτρας και να εισαχθεί στα κέρατα της μήτρας. Έχει αναφερθεί ότι είναι δυνατόν να γίνει έγχυση σπέρματος πλησίον του ισθμού του ωαγωγού μειώνοντας τον αριθμό των σπερματοζωαρίων κατά 20 φορές, χωρίς να επηρεάζεται ο ρυθμός του τοκετού ή το μέγεθος της τοκετοομάδας (Martinez και συν., 2002).

Ωστόσο, με τη μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων περισσότερο, φαίνεται ότι το μέγεθος της τοκετοομάδας τίθεται σε κίνδυνο, μολονότι τα ποσοστά εγκυμοσύνης και του τοκετού δεν επηρεάζονται σε σύγκριση με την εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης χρησιμοποιώντας δόση που περιέχει 3 δισεκατομμύρια σπερματοζωάρια. (Vazquez., 2002, Day ., 2003).

Κατά την έγχυση του σπέρματος μετά τον τράχηλο, το σπέρμα εναποτίθεται στο σώμα της μήτρας αμέσως μετά το μητριαίο στόμιο του τραχήλου της μήτρας. Στο εμπόριο κυκλοφορούν διάφοροι τύποι καθετήρων και ο σκοπός είναι να μειωθεί ο αριθμός των σπερματοζωαρίων.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνθήκες στάβλου και έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατόν να μειωθεί ο αριθμός των σπερματοζωαρίων από 3×10^9 στα 1×10^9 χωρίς να διακυβεύεται η γονιμότητα (Watson και Behan, 2002). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή απαιτεί μεγάλο αριθμό σπερματοζωαρίων στην περίπτωση που θα χρησιμοποιήσουμε φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα

2.4 Οι δυσκολίες του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων

Μια από τις κυριότερες δυσκολίες, που συναντάμε στην τεχνική του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων, είναι ο χρόνος, που απαιτείτε για την παράγωγή μιας δόσης. Για παράδειγμα στα βοοειδή, το σπέρμα του ταύρου περνάει μέσα από τον κυτταρομετρητή ροής με ταχύτητα 60 μίλια την ώρα.

Η διαδικασία του προσδιορισμού διαρκεί τρεις με τέσσερις φορές περισσότερο από ότι η συμβατική διαδικασία του χειρισμού του σπέρματος, διότι το σπέρμα περνά ένα-ένα από τον κυτταρομετρητή και μια εκσπερμάτιση περιέχει περισσότερα από επτά δισεκατομμύρια σπερματοζωάρια.

Όπως είναι προφανές η διαδικασία απαιτεί πολύ χρόνο για να ολοκληρωθεί, δημιουργώντας πρόβλημα στον παραγωγό, που δεν μπορεί να διαθέσει τόσο πολύ χρόνο για μια μόνο δόση σπέρματος.

Ακόμη ένα πρόβλημα, που χρειάζεται όσο το δυνατό γρηγορότερη επίλυση, είναι το κόστος της διαδικασίας. Ο κυτταρομετρητής ροής κοστίζει αρκετές χιλιάδες ευρώ, που ο κάθε παραγωγός δεν μπορεί να διαθέσει. Επίσης ο χειριστής του οργάνου κοστίζει αρκετές χιλιάδες σε ευρώ, μιας και μόνο ένας ειδικός πρέπει να χειρίζεται ένα τόσο πολύπλοκο μηχάνημα.

Επίσης ένα σημαντικό πρόβλημα είναι ότι μέχρι στιγμής το μόνο σπέρμα στο οποίο μπορεί να προσδιοριστεί το φύλο με αξιόλογη επιτυχία είναι το σπέρμα του ταύρου.

Η σύσταση του σπέρματος του ταύρου βοηθά στον προσδιορισμό των δυο φύλων των σπερματοζωαρίων. Το ίδιο όμως δεν συμβαίνει με τη σύσταση του σπέρματος των υπολοίπων αρσενικών ζώων.

Άλλο ένα πρόβλημα είναι ότι κατά την διάρκεια του προσδιορισμού του φύλου, το σπέρμα περνά μέσα από τον κυτταρομετρητή ροής και την ώρα της εξόδου δέχεται ηλεκτρικό φορτίο. Πιστεύεται ότι, αυτό το ηλεκτρικό φορτίο, επιδρά αρνητικά στα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη της ουράς των σπερματοζωαρίων.

Επιπλέον, ακόμη ένα πρόβλημα είναι τα ποσοστά σύλληψης των θηλυκών, που γονιμοποιούνται με φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα. Στις μοσχίδες και στις αγελάδες στις οποίες κατά τη σπερματέγχυση χρησιμοποιήθηκε συμβατικό σπέρμα τα ποσοστά σύλληψης κυμαίνονται από 70 μέχρι 90%.

Ακόμη μια δυσκολία που έχει παρατηρηθεί μετά από διάφορες έρευνες είναι ότι τα έμβρυα που προκύπτουν από τη γονιμοποίηση του ωαρίου με φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα εμφανίζουν κάποιες ανωμαλίες στην ανάπτυξη τους.

Κατά τους ερευνητές, αυτό οφείλεται στην χρήση του λέιζερ με υπεριώδεις ακτίνες, που χρησιμοποιείτε κατά τη διαδικασία του προσδιορισμού του φύλου στον κυτταρομετρητή και όχι στη χρώση Hoechst, η οποία έχει αποδειχθεί απολύτως ασφαλής. Η επίδραση του υπεριώδους φωτός εξαρτάται από την ισχύ του.

2.5 Η σημαντικότητα του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων

Με δεδομένα όλες τις πληροφορίες που αναφέρθηκαν, ο διαχωρισμός φύλου σε όλα τα αγροτικά ζώα, που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο είναι πολύ σημαντικός για την αναπαραγωγή των ζώων, για την γενετική τους βελτίωση και για την διαχείριση των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων.

Πιο συγκεκριμένα στις αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις η μέθοδος αυτή είναι πολύ σημαντική, διότι δίνει τη δυνατότητα στους αγελαδοτρόφους, να παράγουν αν επιθυμούν, αποκλειστικά αγελάδες γαλακτοπαραγωγικής ή κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης ή να παράγουν αρσενικά μοσχάρια.

Επιπρόσθετα, όσο περισσότερα θηλυκά γαλακτοπαραγωγής μπορεί να παράγει μια αγελαδοτροφική εκμετάλλευση, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα γάλακτος καλής ποιότητας παράγετε, με αποτέλεσμα ο αγελαδοτρόφος να αυξάνει τα κέρδη του, άλλα ταυτόχρονα η τιμή του γάλακτος στην αγορά να είναι μικρότερη από πριν και έτσι να βγαίνει κερδισμένος και ο καταναλωτής.

Στους χοίρους ο προσδιορισμός του φύλου μπορεί να βοηθήσει ιδιαίτερα τους χοιροτρόφους των αναπαραγωγικών φυλών, αλλά και τους υπόλοιπους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3.1. Προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων στον κάπρο

Για την χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις η εφαρμογή του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων θεωρείται ότι μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο, όπως για παράδειγμα, στην αποφυγή του ευνουχισμού. Για τη χοιροτροφία η τεχνική του προσδιορισμού του φύλου στον κάπρο είναι πολύ σημαντική, καθώς δίνει τη δυνατότητα να παραχθούν θηλυκά ή αρσενικά ζώα συγκεκριμένων φυλών (πχ. Large White, Landrace) με στόχο τη μεταξύ τους σύζευξη και την παραγωγή της F₁ γενιάς. Επίσης, έχει ως απώτερο σκοπό την καλύτερη γενετική βελτίωση, την αύξηση της παραγωγής και της ποιότητας των χοιριδίων που θα παραχθούν.

Η διαδικασία του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων του κάπρου στο εργαστήριο είναι η ίδια με αυτή που εφαρμόζεται και στα υπόλοιπα ζώα. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες διαφοροποιήσεις και συναντώνται κάποιες δυσκολίες στην όλη διαδικασία χρήσης του προσδιορισμένου σπέρματος. Οι διαφοροποιήσεις του προσδιορισμένου σπέρματος είναι εμφανείς στον κάπρο σε σύγκριση με τον ταύρο, το οποίο πλέον χρησιμοποιείτε και στο εμπόριο σε αντίθεση με εκείνο του κάπρου.

Αναλύοντας τις διαφορές των σπερματοζωαρίων αυτών των ζώων εντοπίζουμε πιο εύκολα τα προβλήματα που έχει η εφαρμογή του προσδιορισμένου σπέρματος στα χοιρινά.

Ένα κύριο πρόβλημα είναι ότι στον ταύρο το σπερματοζωάριο που φέρει το X-χρωμόσωμα (θηλυκό) περιέχει στον πυρήνα του 3,8% περισσότερο DNA από ότι το σπερματοζωάριο που φέρει το Y-χρωμόσωμα (αρσενικό). Σε αντίθεση στον κάπρο, το σπερματοζωάριο που φέρει το X-χρωμόσωμα (θηλυκό) περιέχει στον πυρήνα του 3,6% περισσότερο DNA από το σπερματοζωάριο που φέρει το Y-χρωμόσωμα (αρσενικό).

Αυτό σημαίνει πως ο προσδιορισμός του σπέρματος του ταύρου από τον κυτταρομετρητή ροής υψηλής ταχύτητας είναι ευκολότερος σε σχέση με αυτό του κάπρου, καθώς μπορεί ο κυτταρομετρητής να ξεχωρίσει τα αρσενικά από τα θηλυκά, με αποτέλεσμα ο κυτταρομετρητής να μπορεί να παράγει με μεγαλύτερη ακρίβεια και

καθαρότητα θηλυκούς και αρσενικούς πληθυσμούς σπερματοζωαρίων στα βοοειδή από ότι στα χοιρινά.

Ακόμη μια διαφορά μεταξύ των δυο ειδών είναι ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, που απαιτούνται για την εφαρμογή μιας τεχνητής σπερματέγχυσης.

Στα βοοειδή ο αριθμός των προσδιορισμένων σπερματοζωαρίων, που επαρκεί για μια επιτυχημένη τεχνητή σπερματέγχυση με ικανοποιητικά αποτελέσματα γονιμότητας είναι 2 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά δόση. Στα χοιρινά ο αριθμός αυτός πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50-100 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά δόση.

Είναι προφανές ότι εξαιτίας αυτής της διαφοράς, ο χρόνος που απαιτείται για την παραγωγή καθαρού πληθυσμού σπερματοζωαρίων, του επιθυμητού φύλου στα χοιρινά είναι πολύ μεγαλύτερος, από ότι στα βοοειδή.

Συγκεκριμένα για την παραγωγή μιας δόσης των 100 εκατομμυρίων σπερματοζωαρίων κάπρου απαιτούνται 10 ώρες εργασίας του κυτταρομετρητή ροή υψηλής ταχύτητας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διαδικασία να είναι χρονοβόρος και έτσι να αυξάνεται το κόστος της.

Τέλος, ακόμη μια πολύ σημαντική διαφορά είναι ο χειρισμός του σπέρματος μετά τον προσδιορισμό του. Στο σπέρμα του ταύρου έχουμε την ικανότητα να καταψύξουμε το σπέρμα μετά την λήψη του και να το στείλουμε όπου απαιτείται. Στη συνέχεια μπορούμε να το αποψύξουμε, να ακολουθήσει διαχωρισμός στα δυο φύλα, να το ξανακαταψύξουμε και τέλος να το αποψύξουμε και να το χρησιμοποιήσουμε όπου και όποτε εμείς επιθυμούμε, χωρίς να αλλοιωθεί αισθητά η ποιότητα του.

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, το σπέρμα του κάπρου δεν επιδέχεται κάποιους από τους προηγούμενους χειρισμούς, καθώς δεν έχει την ικανότητα να καταψύχεται και να αποψύχεται αρκετές φορές με τα ίδια ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως του ταύρου.

Θεωρητικά, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που είναι αναγκαίος για την τεχνητή σπερματέγχυση μπορεί να μειωθεί στα 3 εκατομμύρια έως 10 εκατομμύρια, εάν η εναπόθεση του σπέρματος λάβει χώρα στον ισθμό του ωαγωγού (Krueger & Rath 2000). Σε αυτό το σημείο οι μηχανισμοί της μήτρας για την επιλογή του σπέρματος έχει παρακαμφτεί (Schuberth και συν., 2008. Taylor και συν., 2008, 2009 α, β, γ).

Ως εκ τούτου, έχει αναπτυχθεί ο κατάλληλος καθετήρας σπερματέγχυσης για την εφαρμογή της βαθιάς ενδομητριάας τεχνητής σπερματέγχυσης (Martinez και συν., 2001., Vazquez και συν., 2003., Rath και συν., 2003., Grossfeld και συν., 2005). Επιτυχείς εγκυμοσύνες παρατηρήθηκαν μόνο όταν 50 -100 εκατ. φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια είχαν τοποθετηθεί στο άκρο του κέρατος της μήτρας. Περαιτέρω μείωση του αριθμού των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων θα μπορούσε να είναι επιτυχής μετά από λαπαροσκοπική σπερματέγχυση στον ωαγωγό (Vazquez και συν., 2005).

Για περιορισμένες εφαρμογές, η εμβρυομεταφορά μπορεί να είναι μια εναλλακτική λύση έναντι της τεχνητής σπερματέγχυσης. Τα πρώτα έμβρυα χοίρου που προήλθαν μέσω *in vitro* γονιμοποίησης με τη χρήση φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος παρήχθησαν το 1993 (Rath και συν., 1993) με τις πρώτες εγκυμοσύνες να επιτυγχάνονται τρία χρόνια αργότερα (Abeydeera και συν., 1998, Rath και συν., 1997, Rath και συν., 1999). Παρά την επιτυχία αυτή, η τεχνική δεν έφθασε ποτέ στο εμπόριο, καθώς το μέγεθος της τοκετοομάδας ήταν μειωμένο σε σχέση με αυτό που επιτεύχθηκε στους μάρτυρες στους οποίους το σπέρμα δεν ήταν φυλοπροσδιορισμένο.

In vitro, με τα φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια υπάρχει η τάση να εμφανίζεται πολυσπερμική διείσδυση στο ωάριο. Μια εναλλακτική λύση είναι να χρησιμοποιηθεί η ενδο-κυτταροπλασματική έγχυση του σπέρματος (*intra-cytoplasmic sperm injection*, ICSI). Αυτή είναι μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος όπου χρησιμοποιεί μόνο ένα σπερματοζωάριο το οποίο μηχανικώς εισάγεται μέσα στο ωόπλασμα (Probst και Rath 2003). Οι περιορισμοί αυτής της τεχνικής είναι ο ακριβός εξοπλισμός που απαιτείται και η ανάγκη για χειρουργική μεταφορά στον ωαγωγό, του εμβρύου που προκύπτει και βρίσκεται στο πρώιμο στάδιο.

Με τα σημερινά εργαστηριακά πρωτόκολλα, έμβρυα που βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξης είναι δύσκολο να αποκτηθούν *in vitro* μετά από ενδο-κυτταροπλασματική έγχυση του σπέρματος.

Για πρακτικούς λόγους, στους χοίρους η μεταφορά των γαμετών στον ωαγωγό (GIFT) σε συνδυασμό με χειρουργική επέμβαση μπορεί να έχει πλεονεκτήματα σε σχέση με την *in vitro* γονιμοποίηση (Rath και συν., 1994). Ωστόσο, η μεταφορά των γαμετών στον ωαγωγό (GIFT) για να βρει εφαρμογή σε ευρεία κλίμακα, θα πρέπει να

δοθεί μεγαλύτερη έμφαση στην ανάπτυξη μη-χειρουργικής πρόσβαση στον ωαγωγό (Vazquez και συν., 2008).

Η μέθοδος διαχωρισμού με την χρήση του κυτταρομετρητή ροής υψηλής ταχύτητας είναι πάρα πολύ βραδεία και αναποτελεσματική για να ικανοποιήσει πλήρως τις βιολογικές και εμπορικές απαιτήσεις της αγοράς, λόγω του μεγάλου αριθμού των σπερματοζωαρίων που απαιτείται για την τεχνητή σπερματέγχυση. Όλοι οι παραπάνω λόγοι συντελούν στο γεγονός ότι μέχρι σήμερα δεν έχει επιτευχθεί η εμπορευματοποίηση του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος του κάπρου. Γι' αυτό το λόγο απαιτείται περαιτέρω έρευνα πάνω στα προβλήματα που εμφανίζει.

3.1.1 Εφαρμογή σπερματέγχυσης στο χοίρο με μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων

Η επίτευξη των καλύτερων ποσοστών γονιμοποίησης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το διάστημα μεταξύ της σπερματέγχυσης και της ωοθυλακιορρηξίας, η ποιότητα του σπέρματος, η διάρκεια ζωής των σπερματοζωαρίων στη μήτρα και το σημείο της εναπόθεσης των σπερματοζωαρίων. Παραδοσιακά η τεχνητή σπερματέγχυση στο χοίρο διεξάγεται χρησιμοποιώντας $2,5-4 \times 10^9$ σπερματοζωάρια τα οποία εναποτίθενται στο μητριαίο στόμιο του τραχήλου.

Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των σπερματοζωαρίων φθάνει στο σημείο που λαμβάνει χώρα η γονιμοποίηση (λήκυθος ωαγωγού), λόγω του συνδυασμού της απώλειας μέσω της αντίστροφης ροής και φαγοκυττάρωσης των κυττάρων του σπέρματος από πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα. Έχει, ωστόσο, αποδειχθεί ότι τα αποδεκτά ποσοστά γονιμότητας μπορεί να επιτευχθούν εφόσον εναποτεθούν μόνο 10 εκατομμύρια σπερματοζωαρίων στον ισθμό του ωαγωγού με τη χρήση χειρουργικής σπερματέγχυσης κοντά στο χρόνο της ωοθυλακιορρηξίας (Kueger και συν., 1999).

Η χειρουργική σπερματέγχυση όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις.

Γι' αυτό και τα τελευταία 5-7 χρόνια γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων μέσων που θα είναι σε θέση να εναποθέσουν το σπέρμα είτε στο σώμα της μήτρας ή στο βάθος των κεράτων της μήτρας. Σε αυτή την περίπτωση τα κυριότερα εμπόδια είναι οι πτυχώσεις που φέρει ο τράχηλος της μήτρας και το μεγάλο μήκος των κεράτων της μήτρας (έως 1,5 μέτρο).

Παρόλα αυτά, έχουν αναπτυχθεί δύο τεχνικές για την εναπόθεση του σπέρματος στο μητριαίο στόμιο του τραχήλου της μήτρας. Είναι η βαθιά ενδομητριαία

σπερματέγχυση και η έγχυση του σπέρματος μετά τον τράχηλο της μήτρας (μητριαίο στόμιο τραχήλου).

3.2 Προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων στα άλλα ζώα

3.2.1 Προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων στα βοοειδή

Οι προσπάθειες για να αλλάξουμε το φύλο για παραγωγή μοσχαριών ή/και αγελάδων αντικατάστασης έχουν γίνει με διάφορους τρόπους, αλλά η ιδέα του διαχωρισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων, πριν την γονιμοποίηση, ήταν η πιο επιτυχής μέθοδος.

Η διαδικασία του διαχωρισμού των σπερματοζωαρίων, σε θηλυκά και αρσενικά, με την χρήση του κυτταρομετρητή ροής υψηλής ταχύτητας, είναι ακριβώς αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως. Η ίδια διαδικασία ακολουθείτε σε όλα τα υπόλοιπα αγροτικά ζώα.

Για να υπάρξει επιτυχία στον διαχωρισμό του φύλου στα βοοειδή χρειάζεται να ακολουθηθούν οι παρακάτω κανόνες:

1. Οι ταύροι πρέπει να ελέγχονται εκ των προτέρων, ώστε όσοι έχουν χαμηλή πυκνότητα σπέρματος, να εξαιρεθούν από την διαδικασία διαχωρισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων, διότι η ποσότητα των σπερματοζωαρίων τους δεν είναι ικανή να γονιμοποιήσει τα θηλυκά.
2. Ένα πλήρες σπερμιόγραμμα πρέπει να γίνεται μετά από κάθε εκσπερμάτιση των ταύρων πριν από τον διαχωρισμό. Το σπερμιόγραμμα πρέπει να περιλαμβάνει: την μακροσκοπική εκτίμηση του σπέρματος, την εκτίμηση κινητικότητας του σπέρματος, την εκτίμηση της πυκνότητας του σπέρματος και έναν πλήρη μορφολογικό έλεγχο του σπέρματος.
3. Μετά τον διαχωρισμό του φύλου, τα δείγματα από κάθε παρτίδα πρέπει να ελεγχθούν ως προς την κινητικότητα τους, την κινητικότητα τους μετά από θερμική καταπόνηση στους 38°C έπειτα από 6 ώρες, ακριβής μορφολογική εκτίμηση του ακροσώματος, συνολική μορφολογία του δείγματος και έλεγχος για τυχόν μολύνσεις του δείγματος από μικροοργανισμούς. Επιπλέον, ένα φιαλίδιο από κάθε παρτίδα πρέπει να αναλυθεί ξανά για την καθαρότητα του

(ποσοστό του επιθυμητού φύλου που υπάρχει σε κάθε φιαλίδιο) και για τον συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων που περιέχει.

4. Είναι επιβεβαιωμένο πως δεν αρκεί να ελεγχθεί η ποιότητα του σπέρματος, αμέσως μετά την απόψυξη του. Η επώαση των δειγμάτων στους 38°C έδειξε μια μείωση στον προσανατολισμό των σπερματοζωαρίων, στην ζωτικότητα τους και στην μορφολογία τους. Προτείνεται να προστίθενται το λιγότερο 2×10^6 ζωντανά σπερματοζωάρια σε κάθε φιαλίδιο. Είναι προφανές ότι χρειάζονται περισσότερα από 2×10^6 ζωντανά σπερματοζωάρια για να επιτευχθεί εγκυμοσύνη και ικανοποιητική πολυδυμία.
5. Για να αποφύγουμε απώλειες από την υψηλή αραίωση του σπέρματος, το υγρό στο φιαλίδιο πρέπει να χωρίζεται σε δυο τμήματα, στο πρώτο πρέπει να περιέχεται μόνο αραιωτικό και να καλύπτει το κομμάτι του φιαλιδίου με το βαμβάκι και το δεύτερο τμήμα, που περιέχει το σπέρμα, το οποίο διαχωρίσαμε το φύλο του. Τα δυο τμήματα πρέπει να διαχωρίζονται από φυσαλίδα αέρος. Υπάρχουν στο εμπόριο μηχανήματα που κάνουν αυτή την διαδικασία αυτόματα.
6. Προτείνεται να εφαρμόζεται τεχνητή σπερματέγχυση με φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα, κυρίως σε μοσχίδες. Η χρήση του διαχωρισμένου σπέρματος σε αναπαραγωγικές φυλές, που έχουν υποστεί γενετική βελτίωση, πρέπει να είναι προσεκτική. Τα ποσοστά της εγκυμοσύνης, με την χρήση του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος, είναι συνήθως υψηλότερο σε μοσχίδες που δεν έχουν ξανά γονιμοποιηθεί και όταν η εναπόθεση του σπέρματος γίνεται 12 ώρες μετά την εμφάνιση του οίστρου. Η εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης μαζικά δεν είναι αποδεκτή μέθοδος, όταν χρησιμοποιείται φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα. Ο χειρισμός του σπέρματος είναι παρόμοιος με αυτόν που χρησιμοποιούμε στην παραδοσιακή επεξεργασία του. Ο χειρισμός του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος στην αποθήκευση και πριν από την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης είναι κρίσιμος για την επιτυχία της.

3.2.2 Προσδιορισμός του φύλου του σπέρματος στα μικρά μηρυκαστικά

Παρόλο που η διαδικασία του προσδιορισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων κερδίζει έδαφος στις αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις, η χρήση του ακόμα δεν έχει προοδεύσει στις εκμεταλλεύσεις των μικρών μηρυκαστικών. Η χρήση των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων έχει γενετικά, διαχειριστικά και

οικονομικά οφέλη για τις εκμεταλλεύσεις των μικρών μηρυκαστικών, είτε πρόκειται για γαλακτοκομικά προϊόντα, είτε για μαλλί είτε για το κρέας.

Η χρήση της τεχνητής σπερματέγχυσης και η ενδο-κυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI) δεν είναι γενικά εμπορικά αξιοποιήσιμες σε αυτές τις εκμεταλλεύσεις. Έτσι, η έρευνα για την χρήση των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων στα πρόβατα και τις αίγες επικεντρώθηκε στην παράδοση του φυλοπροσδιορισμένου και κατεψυγμένου σπέρματος μέσω λαπαροσκοπικής ενδομητριάας σπερματέγχυσης.

Παρά ταύτα πρόσφατες προσπάθειες διαχωρισμού του φύλου των σπερματοζωαρίων, χρησιμοποιώντας τον κυτταρομετρητή ροής, σε σπέρμα κριού, έχουν πετύχει αποτέλεσμα καθαρότητας μεγαλύτερο από 90%.

Το σπέρμα του κριού πρέπει να αραιωθεί 20 φορές της αρχικής του συγκέντρωσης πριν από τον διαχωρισμό και να ακολουθήσει εκ νέου αραιώση του κατά 200 φορές όταν περνάει από τον κυτταρομετρητή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν μεταβολές στη συγκέντρωση, που οδηγούν στη μείωση της γονιμότητας του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος του κριού.

Έχει φανεί ότι, η αραιώση του σπέρματος κριού με αραιωτικό, που έχει ως βάση του το Tris, χωρίς κρόκο αυγού, βελτιώνει την ευκολία της χρώσης του DNA και την αποδοτικότητα του διαχωρισμού του σπέρματος χωρίς να μειώνει την ζωτικότητα του.

Όταν επιθυμούμε να χρησιμοποιήσουμε διαχωρισμένο και κατεψυγμένο σπέρμα κριού, συνιστάτε η συνδυασμένη χρήση της ενδομητριάας σπερματέγχυσης, για να επιτευχθούν καλύτερα ποσοστά σύλληψης. Ο ελάχιστος αριθμός σπερματοζωαρίων σε μια ενδομητριάα σπερματέγχυση ποικίλει μεταξύ $5-25 \times 10^6$.

Δεν είναι γνωστός ο ακριβής ελάχιστος αριθμός σπερματοζωαρίων κατεψυγμένου σπέρματος που χρησιμοποιείτε στην ενδομητριάα σπερματέγχυση στα πρόβατα, όμως υποστηρίζεται ότι πρέπει να είναι μέσα στο εύρος της δόσης σπέρματος που χρησιμοποιείται στην πράξη για την ενδομητριάα σπερματέγχυση.

Συνιστάται όπως ο αριθμός των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων του κατεψυγμένου σπέρματος να είναι λίγο αυξημένος, για να εξισορροπήσει τις απώλειες που ενδέχεται να επέλθουν κατά την διαδικασία του διαχωρισμού, και με αυτό τον τρόπο να μπορέσουμε να πετύχουμε υψηλά ποσοστά σύλληψης.

Στους πρώτους πειραματισμούς που διεξήχθησαν βρέθηκε ότι τα φυλοπροσδιορισμένα καταψυγμένα-αποψυγμένα σπερματοζωάρια των κριών έχουν

συμβιβαστεί λειτουργικά σε παρόμοιο βαθμό με εκείνο των βοοειδών, και παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά σύλληψης μετά από τεχνητή σπερματέγχυση σε σύγκριση με εκείνα που επιτεύχθηκαν με το συμβατικό σπέρμα (HOLLINSHEAD και συν., 2002).

Η *in vitro* εκτίμηση των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων του κριού έδειξε ότι παρουσίαζαν μειωμένη κινητικότητα και ζωτικότητα μετά την απόψυξη καθώς και μια τάση προς πρόωρη ενεργοποίηση (Hollinshead και συν., 2003).

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια του κριού εμφάνισαν μειωμένη διάρκεια ζωής της γονιμοποιητικής τους ικανότητας, η οποία θα μπορούσε να εξηγήσει και τα μειωμένα ποσοστά σύλληψης.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε εκτροφή, αυτά τα προβλήματα γονιμότητας φαίνεται εν μέρει να βελτιώθηκαν όταν για τη σπερματέγχυση χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερος αριθμός φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων (Hollinshead και συν., 2003).

Αυτό το γεγονός θεωρήθηκε ότι είναι αντιοικονομικό αν λάβει υπόψη του κανείς τις προσπάθειες που γίνονται για να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων ανά δόση τεχνητής σπερματέγχυσης.

Η αυξημένη σταθερότητα του κυτταρομετρητή υψηλής ροής καθώς και οι τροποποιήσεις που έγιναν στη διαδικασία της κατάψυξης των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων, είχε ως αποτέλεσμα να βελτιωθούν τα ποσοστά σύλληψης των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων του κριού.

Από τότε έχει καθιερωθεί ότι το φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα κριού έχει καταρρίψει το δόγμα ότι ο διαχωρισμός με τη χρήση του κυτταρομετρητή υψηλής ροής έχει αρνητικό αντίκτυπο στη λειτουργία και τη γονιμότητα των σπερματοζωαρίων από όλα τα είδη (de Graaf και συν., 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι τα φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια του κριού, έχουν επιδείξει μεγαλύτερη κινητικότητα, ζωτικότητα, ακεραιότητα του ακροσώματος, μιτοχονδριακή δραστηριότητα σε σύγκριση με εκείνα του συμβατικού σπέρματος (de Graaf και συν., 2006).

Αυτά τα *in vitro* αποτελέσματα υποστηρίζονται από *in vivo* μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια του κριού φέρουν αποτελέσματα με παρόμοια ή υψηλότερα ποσοστά σύλληψης/τοκετό από ότι έδειξαν οι μάρτυρες με συμβατικό σπέρμα, όταν σε προβατίνες που δεν παρουσίασαν

υπερωθυλακιορρηξία εφαρμόστηκε τεχνητή σπερματέγχυση με πολύ χαμηλούς αριθμούς σπερματοζωαρίων (de Graaf και συν., 2007γ, Beilby και συν., 2009, 1 εκατ. σπερματοζωάρια/προβατίνα) ή όταν γινόταν προσδιορισμός του φύλου σε δείγματα κατεψυγμένου σπέρματος το οποίο είχε αποψυχθεί και στη συνέχεια καταψύχονταν εκ νέου (de Graaf και συν., 2007β), ή σε υπερωορρηξία ζώων που χρησιμοποιούνται στα προγράμματα πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (MOET), (de Graaf και συν., 2007α).

Η διαδικασία του διαχωρισμού του φύλου φαίνεται πως επιλέγει ένα εξαιρετικά λειτουργικό υποσύνολο πληθυσμού σπερματοζωαρίων, η οποία οδηγεί σε φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια κριού τα οποία επιδεικνύουν μια αυξημένη διάρκεια ζωής της γονιμοποιητικής τους ικανότητας στο εσωτερικό του γεννητικού σωλήνα του θηλυκού σε σύγκριση με εκείνα του συμβατικού σπέρματος και τα οποία προέρχονται από το ίδιο εκσπερμάτισμα (Beilby και συν., 2009).

Αυτή η ευεργετική επίδραση του διαχωρισμού παρατηρείται επίσης όταν το φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα του κριού χρησιμοποιείται για *in vitro* γονιμοποίηση (Beilby και συν., 2010).

Ενώ δεν υπάρχει καμία αρνητική επίδραση στη γονιμότητα, τα σπερματοζωάρια του κριού δεν παραμένουν αμετάβλητα κατά τη διαδικασία του φυλοπροσδιορισμού με την χρήση του κυτταρομετρητή υψηλής ροής. Ο προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων του κριού παρουσιάζουν μειωμένα χαρακτηριστικά στην ταχύτητα και στη διαπερατότητα της βλέννας του τραχήλου της μήτρας (de Graaf και συν., 2006), καθώς και αυξημένη ευαισθησία στην οξειδωτική καταπόνηση από το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε σύγκριση με τα συμβατικά (Leahy και συν., 2010β). Επιπλέον, τα έμβρυα βοοειδών τα οποία γονιμοποιούνται *in vivo* με τα φυλοπροσδιορισμένα σπερματοζωάρια εμφανίζουν καθοδική ρύθμιση των G6PD και SLC2A3 αντιγράφων των γονιδίων, αλλά χωρίς εμφανή επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου (Beilby και συν., 2011).

Όποια και αν είναι η περίπτωση, οι πρόσφατες επιτυχίες της γονιμότητας στα πρόβατα είναι μια ενθάρρυνση για τους ερευνητές που εργάζονται για τη βελτίωση της γονιμότητας των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων σε άλλα είδη, και να κάνουν την τεχνολογία του διαχωρισμού φύλου μια εμπορικά βιώσιμη και αποτελεσματική αναπαραγωγική επιλογή διαχείρισης για τη βιομηχανία των προβάτων.

3.2.3 Προσδιορισμός του φύλου των σπερματοζωαρίων στα άλογα

Το σπέρμα από τον επιβήτορα μπορεί να διαχωριστεί, παρόλο που η αποτελεσματικότητά του είναι μικρότερη από τα υπόλοιπα παραγωγικά ζώα. Παρόλα αυτά η αξία μιας δόσης μπορεί να καλύψει πλήρως τα έξοδα παραγωγής της. Έχει αποδειχθεί ότι έχουμε 40% επιτυχημένη εγκυμοσύνη μετά από τεχνητή σπερματέγχυση, όπου η δόση είχε 25×10^6 φυλοπροσδιορισμένα μη-κατεψυγμένα σπερματοζωάρια.

Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι, μπορεί να υπάρξει επιτυχημένη εγκυμοσύνη με την χρήση φυλοπροσδιορισμένου, κατεψυγμένου και αποψυγμένου σπέρματος όταν έγινε έγχυση μόλις 5×10^6 σπερματοζωάρια με τη βοήθεια της ενδομητριάας σπερματέγχυσης.

Μη αραιωμένο σπέρμα, που εγχύθηκε σε φοράδα, που η συγκέντρωση του ήταν 5×10^8 σπερματοζωάρια, είχε ικανοποιητικά ποσοστά σύλληψης.

Ως αποτέλεσμα, η χαμηλή γονιμότητα μετά την ενδομητριάα σπερματέγχυση, με χαμηλή δόση από διαχωρισμένο ή μη διαχωρισμένο σπέρμα, οφείλεται στο μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων της δόσης, η οποία έχει καταψυχτεί και αποψυχτεί, και όχι στο γεγονός ότι το δείγμα ήταν φυλοπροσδιορισμένο ή όχι.

Οι περιορισμοί της τεχνητής σπερματέγχυσης στα ιπποειδή με την χρήση φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων είναι παρόμοιοι με εκείνους στους κάπρους. Η εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης στις φοράδες απαιτεί 0,5 έως 1×10^9 σπερματοζωάρια. Ο Buchanan και συν., (2000) ανέφερε τη γέννηση του πρώτου πουλαριού μετά από μη χειρουργική τεχνητή σπερματέγχυση με τη χρήση φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων.

Για τη μείωση της δόσης της σπερματέγχυσης βοήθησαν δυο μέθοδοι. Μια μη χειρουργική μέθοδος που περιγράφεται από τον Buchanan και συν., (2000), ο οποίος εισήγαγε ένα εύκαμπτο καθετήρα τεχνητής σπερματέγχυσης βαθιά στο κέρασ της μήτρας.

Πιο αποτελεσματική ήταν η ενδομητριάα σπερματέγχυση, όπου σπερματοζωάρια εναποτίθενται απευθείας στο κέρασ της μήτρας, στο ύψος περίπου όπου συνδέεται ο ισθμός (Rigby και συν., 2001). Η επιτυχία φαίνεται να εξαρτάται από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που περιέχει η δόση. Ο Morris και συν.,

(2000), βρήκε ένα αυξημένο ποσοστό εγκυμοσύνης που κυμαίνονταν από 29% (0,5 εκατομμύρια σπερματοζωάρια) έως 75% (5 εκατομμύρια σπερματοζωάρια).

Η αύξηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων δεν οδήγησε σε αύξηση των ποσοστών της εγκυμοσύνης. Η ικανότητα διαχωρισμού ποικίλλει μεταξύ των επιβητόρων και των εκσπερματισμάτων. Μετά την απόψυξη η αναβίωση των σπερματοζωαρίων εξαρτάται από τα αραιωτικά που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό και την κατάψυξη (Gibb και συν., 2011, Balao da Silva και συν., 2012, Clulow και συν., 2008).

Μια καλή μέθοδος για την κατάταξη του σπέρματος των επιβητόρων και την πρόβλεψη της χρησιμότητάς τους για το διαχωρισμό και την κατάψυξη είναι το ποσοστό των νεκρών σπερματοζωαρίων (Clulow και συν., 2009). Ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο κατάψυξης που χρησιμοποιήθηκε από τους παραπάνω ερευνητές βελτίωσε σημαντικά την απόψυξη και την ποιότητα των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων (Heer, 2007). Ο συγγραφέας ταξινόμησε τα σπερματοζωάρια των ιπποειδών με βάση την παρουσία διαφόρων αντιοξειδωτικών ουσιών και την προεπιλογή των σπερματοζωαρίων μετά τη συλλογή τους αφού προηγηθεί φυγοκέντρωση.

Κατά συνέπεια, ένα σημαντικά αυξημένο ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών και ζωντανών σπερματοζωαρίων που δεν εμφάνιζαν αντίδραση ακροσώματος, καθώς και ένα σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό των νεκρών σπερματοζωαρίων ελήφθησαν μετά το διαχωρισμό και την κατάψυξη/απόψυξη σε σύγκριση με τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με το συμβατικό τρόπο.

Η κύρια δυσκολία στο σπέρμα των ιπποειδών είναι η ποικιλία που παρατηρείται μεταξύ των επιβητόρων, αλλά και μεταξύ των εκσπερματισμάτων. Η εμπορευματοποίηση του προσδιορισμένου σπέρματος του επιβήτορα θα εξαρτηθεί από την συνοχή της γονιμότητας, μετά το διαχωρισμό και την κατάψυξη, από τον αριθμό των επιβητόρων με κατάλληλο σπέρμα και από τις βελτιώσεις των τωρινών τεχνικών της υστεροσκοπικής γονιμοποίησης.

4. Εξέλιξη της τεχνολογίας από πρακτική άποψη

Το φυλοπροσδιορισμένο σπέρμα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στο εμπόριο η παραγωγή σπέρματος, η ταχύτητα της διαλογής, καθώς και η καθαρότητα των προσδιορισμένων σπερματοζωαρίων είναι ζωτικής σημασίας. Η καθαρότητα

(αποτελεσματικότητα της διαλογής) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα κάνοντας αυτά τα δύο στοιχεία αντιφατικά. Όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα, τόσο χαμηλότερη είναι η καθαρότητα των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων του σπέρματος.

Με τη χρήση της σημερινής τεχνολογίας δίνεται η δυνατότητα για το διαχωρισμό 15 εκατομμυρίων σπερματοζωαρίων ανά ώρα (Johnson και συν., 2005). Παρά το γεγονός ότι η βαθιά ενδομητρίαία σπερματέγχυση μπορεί να μειώσει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που απαιτούνται για τη γονιμοποίηση σημαντικά, ο αριθμός εξακολουθεί να είναι υπερβολικά μεγάλος για να θεωρηθεί για πρακτικούς όρους.

Άλλοι μέθοδοι για τον προσδιορισμό του φύλου των σπερματοζωαρίων έχουν συζητηθεί, και ως επί το πλείστον η συζήτηση έχει εστιαστεί στη πιθανή διαφορά που μπορεί να υπάρχει στις πρωτεΐνες της επιφάνειας των σπερματοζωαρίων μεταξύ αυτών που φέρουν το X ή το Y χρωμόσωμα. Αν ισχύει αυτό, θα μπορούσε κανείς να παράγει ένα αντίσωμα που θα επισυνάπτεται ανάλογα στο σπερματοζωάριο που φέρει το X- ή το Y-χρωμόσωμα και στη συνέχεια να χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια για το διαχωρισμό των δύο πληθυσμών.

Στα κέντρα τεχνητής σπερματέγχυσης η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει μια μεγάλης κλίμακας διαδικασία προσδιορισμού του φύλου εύκολα προσαρμοζόμενη. Περίπου 1000 επιφανειακές πρωτεΐνες έχουν χαρτογραφηθεί αλλά καμία διαφορά δεν έχει ανιχνευθεί μεταξύ των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από το X- χρωμόσωμα έναντι του Y-χρωμοσώματος που φέρουν τα σπερματοζωάρια (Hendriksen και συν., 1996, Hendriksen, 1999).

5.Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκπαίδευση και η απόκτηση εμπειρίας σε βασικά θέματα που σχετίζονται με τον προσδιορισμό του φύλου των σπερματοζωαρίων του κάπρου.

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΚΑΠΡΟΥ

1. Τοποθεσία και ζώα

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Αναπαραγωγής της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Μούρθια-Ισπανία.

Για τις ανάγκες της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 2 κάπροι φυλής Large White υψηλής γενετικής αξίας. Οι κάπροι στεγάζονταν στις εγκαταστάσεις της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Μούρθια, σε ατομικά κελιά ελεγχόμενης θερμοκρασίας περιβάλλοντος ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

2. Συλλογή σπέρματος

Μια φορά την εβδομάδα γινόταν συλλογή του κλάσματος του εκσπερμάτισματος που είναι πλούσιο σε σπερματοζωάρια (2^η φάση) με τη μέθοδο του «γαντιού». Αμέσως μετά τη σπερματοληψία, τα δείγματα σπέρματος μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) μέχρι να γίνει η εκτίμησή τους.

3. Εκτίμηση σπέρματος

Το κάθε εκσπερμάτισμα υποβλήθηκε σε εξετάσεις ρουτίνας με τις κλασσικές μεθόδους και χρησιμοποιούνταν εφόσον πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια: μαζική προοδευτική κίνηση >80%, ζωτικότητα >85%, ανταπόκριση στην υπο-ωσμωτική διόγκωση >70%, συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ανά εκσπερμάτισμα > 20×10^9 , ποσοστό ανωμαλιών του ακροσώματος <10%, και ποσοστό μορφολογικών ανωμαλιών <15% .



Εικόνα 1: Πλαστικό σωληνάριο με το δείγμα σπέρματος.

4. Προσδιορισμός της πυκνότητας του σπέρματος του κάπρου

Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας του σπέρματος του κάπρου χρησιμοποιήθηκε μετρητής σπερματοζωαρίων τύπος SP-100 (Nucleocounter[®] SP-100™, Δανία) (εικόνα 2). Πενήντα μL από το δείγμα του σπέρματος αραιώνονταν με 5 ml ειδικού αντιδραστηρίου του SP-100. Μετά την ανάμειξη τους τοποθετούνταν στην ειδική κασέτα και τα αποτελέσματα της πυκνότητας εμφανίζονταν σε αριθμό εκατομμυρίων.



Εικόνα 2: Μετρητής πυκνότητας σπερματοζωαρίων

5. Αραίωση του σπέρματος

Στη συνέχεια το εκσπερμάτισμα που πληρούσε τα παραπάνω χαρακτηριστικά αραιώνονταν (1:1) με το αραιωτικό Beltsville Thawing Solution (BTS), με την τελική του πυκνότητα να ανέρχεται στα 1×10^6 σπερματοζωάρια/ml.

6. Προσδιορισμός της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων με τη βοήθεια του αναλυτή σπέρματος υποβοηθούμενος από ηλεκτρονικό υπολογιστή (CASA).

Για τον προσδιορισμό της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε αναλυτής σπέρματος υποβοηθούμενος από H/Y (CASA) (Nikon Optiphot 2; Nikon Tokyo, Japan),

Πέντε μl (5 μl) από το αραιωμένο δείγμα τοποθετούνταν σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα (Leja, IMV USA, Maple Grove, MN, USA). Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετούνταν στον αναλυτή σπέρματος (CASA) και γινόταν καταμέτρηση της κινητικότητας 200 σπερματοζωαρίων σε 8 διαφορετικά πεδία της αντικειμενοφόρου πλάκας (εικόνα 3). Τα χαρακτηριστικά που καταγράφονταν ήταν ο προσδιορισμός της κινητικότητας και της ποσοστιαίας αναλογίας των σπερματοζωαρίων με μαζική προοδευτική κίνηση.



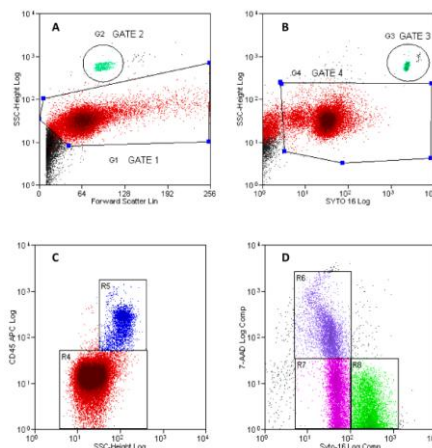
Εικόνα 3: Αναλυτής σπέρματος υποβοηθούμενος από H/Y.

Αμέσως μετά, ακολουθούσε η εκτίμηση της ζωτικότητας του σπέρματος με τη χρήση κυτταρομετρητή ροής συνοδευόμενο από H/Y.



Εικόνα 4: Κυτταρομετρητής ροής για την εξέταση της ζωτικότητας.

Σε δείγμα 500μl σπέρματος προστίθεντο 0,27 μl του διαλύματος SYBR14 και 2 μl του διαλύματος προπιδίου του ιωδίου (PI). Τα δείγματα με την χρώση παρέμειναν σε κλίβανο στους 35⁰C για 15 λεπτά της ώρας και στη συνέχεια τοποθετούνταν στον κυτταρομετρητή για τον προσδιορισμό της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων. Τα αποτελέσματα εμφανίζονταν στον συνδεδεμένο Η/Υ με την μορφή ιστογράμματος στα όποια με πράσινο χρώμα εμφανίζονταν τα ζωντανά σπερματοζωάρια και με κόκκινο τα νεκρά (Ιστόγραμμα 1).



Ιστόγραμμα 1: Απεικόνιση του διαχωρισμού των σπερματοζωαρίων

7. Προετοιμασία των δειγμάτων

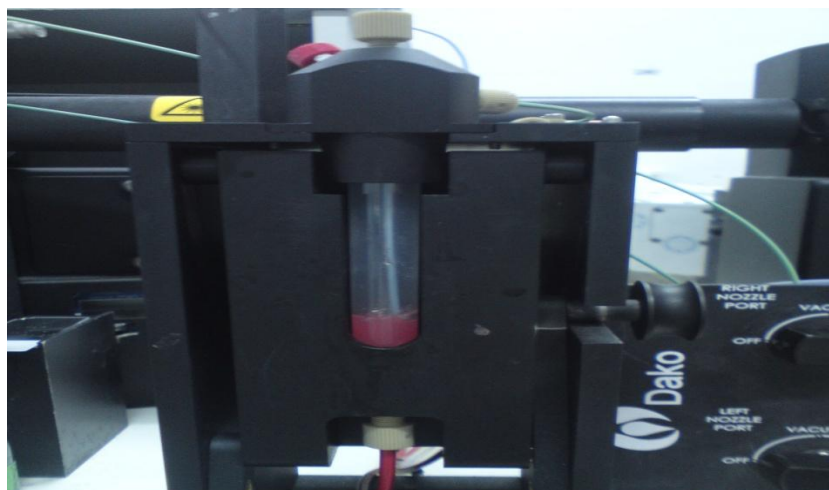
Στη συνέχεια το υπόλοιπο σπέρμα αραιώνονταν με το αραιωτικό Beltsville Thawing Solution (BTS), μέχρις η τελική πυκνότητα του σπέρματος να είναι 100×10^6

σπερματοζωάρια/ml. Κλάσμα 1 ml του αραιωμένου σπέρματος στη συνέχεια μεταφέρονταν σε πλαστικά κυλινδρικά σωληνάρια (Falcon) και γινόταν προσθήκη 5 μl μητρικού διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής ουσίας Hoechst 33342 (5 mg/ml). Ακολουθούσε επώαση σε σκοτεινό χώρο (υδατόλουτρο) στους 35°C για 50 λεπτά της ώρας (εικόνα 5).

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία του διαχωρισμού σε κάθε δείγμα γινόταν προσθήκη 1 μl χρωστικής τροφίμων (FD&C#40, Warner Jenkinson, St.Louis, MO, USA) από το μητρικό διάλυμα (25 mg/ml). Στη συνέχεια, ακολουθούσε διήθηση των δειγμάτων μέσω ενός φίλτρου 30 μm που έφερε νάilon πλέγμα με σκοπό την απομάκρυνση των σπερματοζωαρίων που παρουσίαζαν συγκόλληση ή των λευκοκυττάρων.



Εικόνα 5: Υδατόλουτρο



Εικόνα 6: Έτοιμο δείγμα μέσα στον κυτταρομετρητή ροής.

8. Διαχωρισμός σπερματοζωαρίων με κυτταρομετρητή ροής

Για τον διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής ροής υψηλής ταχύτητας (MoFlo SX[®], DakoCytomation Inc., Fort Collins, CO, USA) ο οποίος συνοδευόταν από λέιζερ αργού και λειτουργούσε με υπεριώδεις ακτίνες (μήκος κύματος 351, 364 nm) στα 175 mW (Coherent Lasers, Inc., Santa Clara, CA). Η πίεση του κυτταρομετρητή ροής ήταν 40 psi και το ποσοστό ενεργοποίησης ήταν 25.000 σπερματοζωάρια ανά δευτερόλεπτο της ώρας. Ο κυτταρομετρητής έφερε συνήθως δυο ανιχνευτές με προσανατολισμό 0° και 90° (μοίρες), σε σχέση με τη γραμμή ροής των σπερματοζωαρίων (εικόνα 7).

Το φθορίζον χρώμα, που εξέπεμπαν τα σπερματοζωάρια, προσλαμβάνονταν από τους δυο ανιχνευτές, οι οποίοι ανέλυαν τη εκπομπή του φωτός και ξεχώριζαν τα θηλυκά από τα αρσενικά σπερματοζωάρια

Αυτό συμβαίνει καθώς τα θηλυκά σπερματοζωάρια, στον πυρήνα τους εμπεριέχουν 3.6% μεγαλύτερη ποσότητα DNA, σε σχέση με το αρσενικό και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να περιέχει περισσότερη ποσότητα φθορίζουσας ουσίας με αποτέλεσμα να φθορίζει περισσότερο από ότι το αρσενικό.

Από την ώρα που ο κυτταρομετρητής ταυτοποιούσε τα αρσενικά, τα θηλυκά και τα νεκρά σπερματοζωάρια, στη συνέχεια προχωρούσε στο διαχωρισμό τους και ανάλογα με το φύλο τα φόρτιζε με ηλεκτρικό φορτίο. Τα μεν θηλυκά φορτιζόνταν με θετικό φορτίο, ενώ τα αρσενικά με αρνητικό φορτίο.

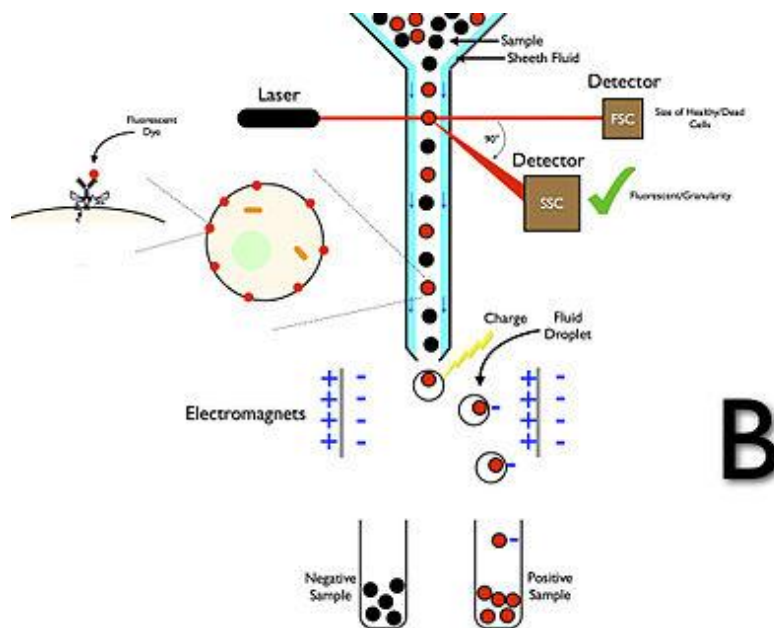
Στην έξοδο του κυτταρομετρητή υπήρχαν δυο μαγνητικές πλάκες φορτισμένες η μία θετικά και η άλλη αρνητικά. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα θηλυκά σπερματοζωάρια που έφεραν θετικό φορτίο να έλκονται από την αρνητικά φορτισμένη πλάκα και να οδηγούνται στο πλαστικό σωληνάριο που περιέχει τα θηλυκά σπερματοζωάρια. Αντίστοιχα, τα αρσενικά σπερματοζωάρια που έφεραν αρνητικό φορτίο να έλκονται από τη θετικά φορτισμένη πλάκα και να οδηγούνται στο αντίστοιχο πλαστικό σωληνάριο που περιέχει τα αρσενικά σπερματοζωάρια.

Τέλος τα νεκρά σπερματοζωάρια μη φέροντας κάποιο φορτίο οδηγούνταν σε χωριστό πλαστικό σωληνάριο που περιείχε τα νεκρά σπερματοζωάρια. Τα πλαστικά σωληνάρια χωρητικότητας 0,5 ml στα οποία κατέληγαν τα διαχωρισμένα πλέον σπερματοζωάρια ήταν επικαλυμμένα με 1 % αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) και περιείχαν αραιωτικό TES [N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-amino ethane sulfonic

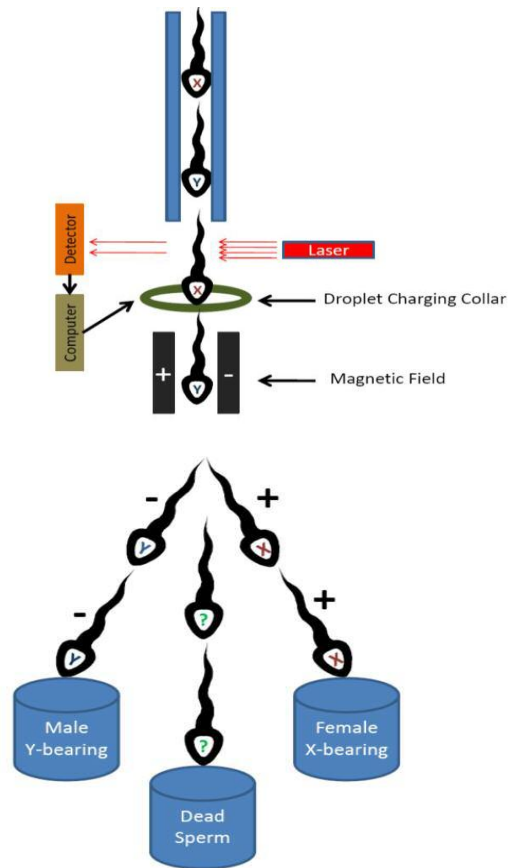
acid] κρόκο αυγού (2%) και 10% σπερματικό πλάσμα σε θερμοκρασία 20°C (εικόνα 8).

Ο κυτταρομετρητής συνήθως διαχωρίζει τους δυο πληθυσμούς ανά δέκα εκατομμύρια για κάθε πληθυσμό με ταχύτητα από 4×10^6 έως 5×10^6 σπερματοζώαρια ανά 30 λεπτά της ώρας.

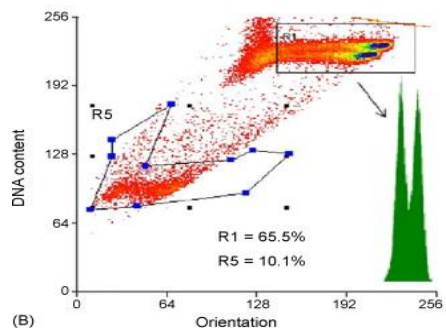
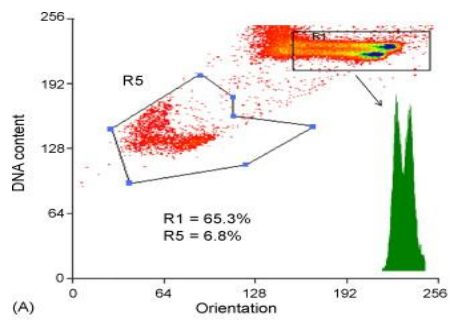
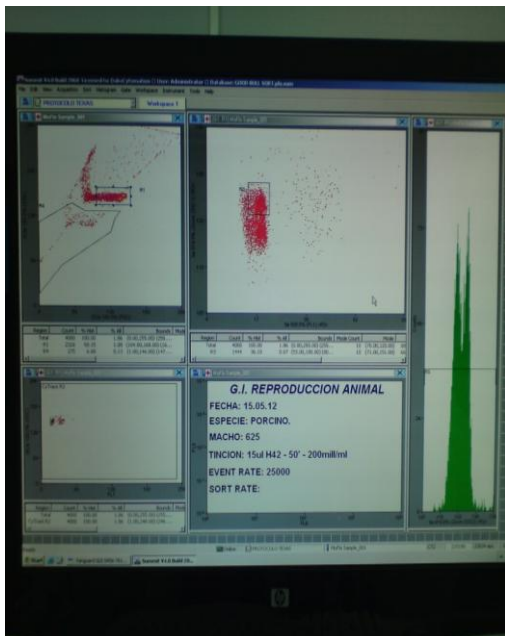
Τα δεδομένα που παίρνουμε από τον κυτταρομετρητή μπορούν να εμφανιστούν μονοδιάστατα, δυσδιάστατα ή τρισδιάστατα σε μορφή ιστογράμματος και είναι απαραίτητη η χρήση ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή, ο οποίος θα πρέπει να είναι συνδεδεμένος με τον κυτταρομετρητή ροής (εικόνα 9 και εικόνα 10).



Εικόνα 7: Διαδικασία του διαχωρισμού του σπέρματος (laser)



Εικόνα 8: Διαδικασία επιλογής σπέρματος.



Εικόνα 9 &10: Δεδομένα στον υπολογιστή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Ο προσδιορισμός των σπερματοζωαρίων σε αρσενικά και θηλυκά μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα και στον κάπρου όπως έχει γίνει και στα άλλα παραγωγικά ζώα.
2. Στους περιορισμούς για τον προσδιορισμό των σπερματοζωαρίων του κάπρου περιλαμβάνονται:
 - α) ο μεγάλος αριθμός των σπερματοζωαρίων που απαιτείται όταν χρησιμοποιηθούν για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης
 - β) η ευαισθησία των φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων που παρουσιάζει το σπέρμα του κάπρου σε υψηλά επίπεδα αραίωσης και κατά την κατάψυξη του.
 - γ) ο χρόνος που απαιτείται για την παραγωγή μιας ικανοποιητικής, σε αριθμό, δόσης φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων για χρήση σε τεχνητή σπερματέγχυση.
3. Υπάρχουν παράγοντες που συνδέονται με τη διαδικασία της επεξεργασίας του σπέρματος του κάπρου και οι οποίοι κατά τον προσδιορισμό του φύλου προκαλούν μεταβολές στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων λόγω της πρόωρης ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων.
4. Η εφαρμογή της βαθιάς ενδομητριάας σπερματέγχυσης με τη χρήση μικρού αριθμού φυλοπροσδιορισμένων σπερματοζωαρίων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ποσοστών της γονιμότητας με τη μόνη διαφορά ότι πρέπει να εφαρμόζεται στις ενήλικες χοιρομητέρες και όχι στις νεαρές σύες.
5. Η πρακτική εφαρμογή του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος του κάπρου στο εμπόριο θα είχε αξία αν χρησιμοποιηθεί σε αναπαραγωγικές εκμεταλλεύσεις-πυρήνες σε συνδυασμό με την *in vitro* γονιμοποίηση και μεταφορά εμβρύων και ή την εφαρμογή λαπαροσκοπικής ενδομητριάας σπερματέγχυσης.
6. Στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις ένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης του φυλοπροσδιορισμένου σπέρματος είναι η αποκλειστική παραγωγή θηλυκών χοιριδίων για κρεοπαραγωγή με οικονομικό όφελος τόσο από πλευράς των εκμεταλλεύσεων όσο και από την πλευρά του καταναλωτή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1- Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Boquest AC, Cantley TC, Rieke A & Day BN (1998) Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 50 981-988.
- 2- Balao da Silva C, Macias-Garcia B, Morillo Rodriguez A, Gallardo Bolanos JM, Tapia JA, Aparicio IM, Morrell JM, Rodriguez-Martinez H, Ortega-Ferrusola C & Pena FJ (2012) Effect of Hoechst 33342 on stallion spermatozoa incubated in KMT or Tyrodes modified INRA96. *Anim Reprod Sci.* 31(3):165-171.
- 3- Beilby KH, Grupen CG, Thomson PC, Maxwell WMC & Evans G (2009) The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology* 71 829-835.
- 4- Beilby KH, de Graaf SP & Grupen CG (2010) The effect of sperm and cryoprotectant concentration on the freezing success of sex sorted ram sperm for in vitro fertilization. *Theriogenology* 74 786-794.
- 5- Beilby KH, de Graaf SP, Evans G, Maxwell WMC, Wilkening S, Wrenzycki C & Grupen CG (2011) Quantitative mRNA expression in ovine blastocysts produced from X- and Y-chromosome bearing sperm, both in vitro and in vivo. *Theriogenology* 76:471-481.
- 6- Barcelo-Fimbres M, Campos-Chillon LF & Seidel GE, Jr. (2011) In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod Domest Anim* 46 495-502.
- 7- Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rath D, Gutierrez-Adan A & Rizos D (2010) Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 22 426-436.
- 8- Beyhan Z, Johnson LA & First NL (1999) Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 52 35-48.
- 9- Buchanan BR, Seidel GE, Jr., McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA & Squires EL (2000) Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology* 53 1333-1344.

- 10- Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourão GB & Dode MA (2010) Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in vitro embryo production. *Theriogenology* 74 1521-1530.
- 11- Carvalho JO, Michalczechen-Lacerda VA, Sartori R, Rodrigues FC, Bravim O, Franco MM & Dode MA (2012) The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. *Mol Reprod Dev* 79 77-84.
- 12- Chebel, R. C., Guagnini, F. S., Santos, J. E. P., Fetrow, J. P., & Lima, J. R. (2010). Sex-sorted semen for dairy heifers: Effects on reproductive and lactational performances. *J Dairy Sci*, 93(6), 2496-507.
- 13- Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LH, Evans G & Maxwell WM (2008) A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 108 298-308.
- 14- Clulow JR, Evans G, Morris LH & Maxwell WM (2009) Factors influencing the "sortability" of stallion spermatozoa into X- and Y-chromosome bearing populations. *Anim Reprod Sci* 113 220-228.
- 15- Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D & Polge C (1993) Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilisation. *Vet Rec* 132 40-41.
- 16- Day BN, Mathias K, Didion BA, Martinez EA, Caamano JN, (2003). Deep intrauterine insemination in sows: first field trial in USA commercial farm with a newly developed device [abstract]. *Theriogenology*, 59:213.
- 17- De Cecco M, Spinaci M, Zannoni A, Bernardini C, Seren E, Forni M & Bacci ML (2010) Coupling sperm mediated gene transfer and sperm sorting techniques: a new perspective for swine transgenesis. *Theriogenology* 74 856-862.
- 18- de Graaf SP, Evans G, Maxwell WMC & O'Brien JK (2006) In vitro function of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa after sex-sorting and re-freezing. *Reprod Fert & Dev* 18 867-874.
- 19- de Graaf SP, Beilby KH, O'Brien JK, Osborn D, Downing JA, Maxwell WMC & Evans G (2007a) Embryo production from superovulated sheep inseminated with sex sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 67 550-555.
- 20- de Graaf SP, Evans G, Maxwell WMC, Cran DG & O'Brien JK (2007b) Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 67 391-398.

- 21- de Graaf SP, Evans G, Maxwell WMC, Downing JA & O'Brien JK (2007c) Successful low dose insemination of flow cytometrically sorted ram spermatozoa in sheep. *Reprod Dom Anim* 42 648-653.
- 22- de Graaf SP, Beilby KH, Underwood SL, Evans G & Maxwell WMC (2009) Spermsexing in sheep and cattle: the exception and the rule. *Theriogenology* 71 89-97.
- 23- De Vries A, Overton M, Fetrow J, Leslie K, Eicker S & Rogers G (2008). Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *J Dairy Sci* 91 847-856.
- 24- De Jarnette, J. M., Nebel, R. L., Marshall, C. E., Moreno, J. F., Mc Cleary, C. R., & Lenz, R. W. (2008). Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. *J Dairy Sci*, 91(5), 1778-85.
- 25- DeJarnette JM, Leach MA, Nebel RL, Marshall CE, McCleary CR & Moreno JF (2011). Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *J Dairy Sci* 94:3477-3483.
- 26- Den Daas, JH, De Jong G, Lansbergen LM & Van Wagendonk-De Leeuw AM 1998. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J Dairy Sci* 81 1714-1723.
- 27- Garner, G. E. S. D. (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reprod*, 124(6), 733-43.
- 28- Garner, D. L. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65(5), 943-57.
- 29- Gibb Z, Morris LH, Maxwell WM & Grupen CG (2011) Use of a defined diluents increases the sex-sorting efficiency of stallion sperm. *Theriogenology* 75 610-619.
- 30- Gosálvez, J., Ramirez, M. A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K. M., Kjelland, M. E., et al. (2011). Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*, 75(2), 197-205.
- 31- Graham JK (1996). Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 12(1):119-30.
- 32- Grossfeld R, Klinc P, Sieg B & Rath D 2005 Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology* 63 2269-2277.

- 33- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A & Aoyagi Y (2009) Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71 68-73.
- 34- Heer P (2007) Adjustment of the cryopreservation of stallion spermatozoa to the Beltsville Sperm Sexing Technology. (Anpassung der Konservierungsprozesse für Hengst-sperma an die Beltsville Sperm Sexing Technology) *Thesis*, Vet Univ Hannover, Germany.
- 35- Hendriksen PJ, Welsh GR, Grootegoed JA, Van der Lende T, Johnson LA: (1996). Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. *Mol Reprod Dev*, 45:342-350.
- 36- Hendriksen PJ: (1999). Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology*, 52:1295-1307.
- 37- Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WMC & Evans G (2002) Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reprod Fert, & Dev* 14 503-508.
- 38- Hollinshead FK, Gillan L, O'Brien JK, Evans G & Maxwell WMC (2003). In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod Fert and Dev* 15:351-359.
- 39- Jasko DJ, Little TV, Smith K, Lein DH, Foote RH. (1988). Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology*. 30(6):1159-67.
- 40- Johnson LA, Welch GR & Rens W 1999 The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *J Anim Sci Suppl* 2 213-220.
- 41- Johnson LA, Rath D, Vazquez JM, Maxwell WM, Dobrinsky JR: (2005). Preselection of sex of offspring in swine production: current status of the process and its application. *Theriogenology*, 63:615-624.
- 42- Krueger C, Rath D, Johnson LA: (1999). Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*, 52:1363-1373.
- 43- Krueger C & Rath D (2000) Intrauterine insemination in sows with reduced spermnumber. *Reprod Fertil Dev* 12 113-117.

- 44- Kues W, Rath D, Niemann H (2008) Reproductive biotechnology in farm animals goes genomics. *CAB Reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* 3 036.
- 45- Leahy T, Celi P, Bathgate R, Evans G, Maxwell WMC & Marti JI (2010b) Flow-sorted ram spermatozoa are highly susceptible to hydrogen peroxide damage but are protected by seminal plasma and catalase. *Reprod Fert and Dev* 22 1131-1140.
- 46- Lu, K. H., Cran, D. G., & Seidel Jr, G. E. (1999). In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 52(8), 1393-1405.
- 47- Lu, K. H., & Seidel Jr, G. E. (2004). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*, 62(5), 819-30.
- 48-Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA & Vazquez JL (2001) Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reprod Suppl* 58 301-311.
- 49-Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN, (2002). Minimal number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, 123:163-170.
- 50-Magistrini M., Vidament M., Clement F, PalmerE (1996). Fertility prediction in stallions. *Anim Reprod Sci.*, 42 (1-4):181-188.
- 51-Maxwell, W. M. C., Evans, G., Hollinshead, F. K., Bathgate, R., de Graaf, S. P., Eriksson, B. M., et al. (2004). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 79-95.
- 52-Merton JS, Haring RM, Stap J, Hoebe RA, Aten JA, (1997): Effect of flow cytometrically sorted frozen / thawed semen on success rate of in vitro bovine embryo production. *Theriogenology* 47, 295. (Abstract).
- 53-Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. A. M., et al. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), 651-74.
- 54- Morris LH, Hunter RH & Allen WR (2000) Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J Reprod Fertil* 118 95-100.
- 55- Morton KM, Herrmann D, Sieg B, Struckmann C, Maxwell WM, Rath D, Evans G, Lucas-Hahn A, Niemann H & Wrenzycki C (2007) Altered mRNA expression

- patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol Reprod Dev* 74 931-940.
- 56- Niemann H, Kuhla B, Flachowsky G (2011). Perspectives for feed-efficient animal production. *J Anim Sci* 89 4344-4363.
- 57- Palma GA, Olivier NS, Neumuller C & Sinowatz F (2008) Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. *Anat Histol Embryol* 37 67-73.
- 58- Palmer E, Magistrini M. (1992). Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet Scand Suppl.* 88:137-52
- 59- Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Rätty, M., Korhonen, K., Hurme, T., et al. (2009). Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Anim Reprod Sci*, 111(1), 80-92.
- 60- Pinkel D, Gledhill BL, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA. (1983). Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing Y and “O” chromosomes in the vole *Microtus oregoni*. *Science* ; 218:904–5.
- 61- Probst S & Rath D (2003) Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology* 59 961-973.
- 62- Rath D, Johnson LA & Welch GR 1993 In vitro culture of porcine embryos: Development to blastocysts after in vitro fertilization (IVF) with flow cytometrically sorted and unsorted semen. *Theriogenology* 39 293 (Abstr).
- 63- Rath D, Johnson LA, Welch GR & Niemann H (1994) Successful gamete intrafallopian transfer (GIFT) in the porcine. *Theriogenology* 41 1173-1179.
- 64- Rath D, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR & Niemann H (1997) Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* 47 795-800.
- 65- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL & Johnson LA (1999) In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77 3346-3352

- 66- Rath D, Ruiz S & Sieg B (2003) Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Vet Rec* 152400-401.
- 67- Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC & Varner DD (2001) Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Anim Reprod Sci* 68 171-180.
- 68- Sartori, R., Souza, A. H., Guenther, J. N., Caraviello, D. Z., Geiger, L. N., Schenk, J. L., et al. (2004). Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod*, 1, 86-90.
- 69- Schenk, J. L., Suh, T. K., Cran, D. G., & Seidel Jr, G. E. (1999). Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52(8), 1375-91.
- 70- Schenk JL, Suh TK & Seidel GE, Jr. (2006) Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65 299-307.
- 71- Schenk, J. L., Cran, D. G., Everett, R. W., & Seidel, G. E. (2009). Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*, 71(5), 717-28.
- 72- Schubert HJ, Taylor U, Zerbe H, Waberski D, Hunter R & Rath D (2008) Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology* 70:1174-1181.
- 73- Seidel, G. E., & Schenk, J. L. (2008). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim Reprod Sci*, 105(1-2), 129-38.
- 74- Taylor U, Schubert HJ, Rath D, Michelmann HW, Sauter-Louis C & Zerbe H (2009 α). Influence of inseminate components on porcine leucocyte migration in vitro and in vivo after pre- and post-ovulatory insemination. *Reprod Domest Anim* 44 180-188.
- 75- Taylor U, Zerbe H, Seyfert HM, Rath D, Baulain U, Langner KF & Schubert HJ (2009 β) Porcine spermatozoa inhibit post-breeding cytokine induction in uterine epithelial cells in vivo. *Anim Reprod Sci* 115 279-289.

- 76-** Taylor U, Zerbe H, Seyfert HM, Rath D & Schuberth HJ (2009 γ). Binding of porcine spermatozoa to uterine epithelial cells modulates the female immune response and might indicate the formation of a pre-oviductal sperm reservoir. *Soc Reprod Fertil Suppl* 66 83-84.
- 77-** Tubman, L. M., Brink, Z., Suh, T. K., & Seidel, G. E. (2004). Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J Anim Sci*, 82(4), 1029-36.
- 78-** Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Lucas X, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Day BN, 2001: Deep intrauterine insemination in natural post-weaning oestrus sows. In Proceedings of the 6th Int Conf on Pig Reprod Columbia, MO, USA; (2001).
- 79-** Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA & Vazquez JL (2003). Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 59 1605-1614.
- 80-** Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X & Vazquez JL (2005) Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* 63 536-547.
- 81-** Vazquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Caballero I, Vazquez JL & Martinez EA (2008) Low-dose insemination in pigs: problems and possibilities. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2 347-354.
- 82-** Watson PF, Behan JR: (2002). Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 57:1683-1693.
- 83-** Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyés A, Ji W, Tian XC, Yang X & Du F (2006). Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J Dairy Sci* 89 2510-2518.