

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΟ
ΠΡΟΒΑΤΟ**

ΜΑΡΙΑ ΧΑΒΕΛΕ



ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
Ι. ΜΕΝΕΓΑΤΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Γ.Σ. ΑΜΟΙΡΙΔΗΣ ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Χ. ΜΠΑΛΑΣΚΑΣ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Αθήνα, Ιανουάριος 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΟ
ΠΡΟΒΑΤΟ**

ΜΑΡΙΑ ΧΑΒΕΛΕ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
Ι. ΜΕΝΕΓΑΤΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Γ.Σ. ΑΜΟΙΡΙΔΗΣ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Χ. ΜΠΑΛΑΣΚΑΣ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Σ. ΧΑΔΙΩ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Ι. ΜΠΙΖΕΛΗΣ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Αθήνα, Ιανουάριος 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ειδικότερα ευχαριστώ θερμά :

Τον κ. Ι. Μενεγάτο, Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών και Διευθυντή του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Ανατομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την υπόδειξη του θέματος της διατριβής μου και την πολύτιμη καθοδήγηση του όχι μόνο κατά την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης αλλά και καθ' όλο το διάστημα των πενταετών προπτυχιακών σπουδών μου. Τον ευχαριστώ θερμά για την συμπαράστασή του και τον συμβουλευτικό χαρακτήρα που επέδειξε απέναντί μου αλλά κυρίως για την τιμή που μου έκανε να με εμπιστευθεί σαν άνθρωπο και συνάδελφο.

Τον κ. Γ. Αμοιρίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής - Αναπαραγωγής του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια του και τις συμβουλές του κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπομονή που επέδειξε κατά την διάρκεια των ατελείωτων ερωτημάτων που είχα και γιατί με την συμπαράστασή του έκανε την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής πραγματικότητα.

Τον κ. Χ. Μπαλάσκα Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Ανατομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την πολυσήμαντη βοήθεια του στη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Την κ. Σ. Χαδιώ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Ανατομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την συμβολή της στη διαμόρφωση της συγγραφής της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τον κ. Ι. Μπιζέλη Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις ορθές παρατηρήσεις του στη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ με όλη μου την ψυχή την «εκτεταμένη» οικογένεια μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου Γιώργο και Κατερίνα για την υποστήριξή τους, την αγάπη τους και την αντοχή που επιδεικνύουν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου καθώς και για την αμέριστη εμπιστοσύνη τους σε εμένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
B	ABSTRACT	2
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
2	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	4
3	ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ	13
3.1	Ωοθυλακιογένεση	13
3.2	Διαφορές στη δυναμική ανάπτυξης ωοθυλακίων προβατινών και αμνάδων	15
3.2.1	Δυναμική ανάπτυξης ωοθυλακίων προβατινών	18
3.2.2	Δυναμική ανάπτυξης ωοθυλακίων αμνάδων	23
3.3	Ωογένεση (Ωαριογένεση)	
3.4	Σπερματογένεση (Σπερματοζωαριογένεση)	25
3.4.1	Παράγοντες που επηρεάζουν τη σπερματογένεση	27
3.4.2	Εκτίμηση ποιότητας σπέρματος	28
4	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	32
4.1	Τεχνητή σπερματέγχυση	32
4.2	<i>In vivo</i> παράγωγη εμβρύων	38
4.2.1	Πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας	38
4.2.1.1	Παράγοντες που επηρεάζουν την ΠΠΩ	39
4.2.1.2	Ορμόνες που χρησιμοποιούνται στην ΠΠΩ	41
4.2.2	Συγχρονισμός δοτριών και δεκτριών	44
4.2.3	Συλλογή εμβρύων	46
4.3	<i>In vitro</i> παράγωγη εμβρύων	49

4.3.1	Συλλογή ωαρίων	50
4.3.1.1	Χρησιμοποίηση έμβρων και άνηβων δοτριών	52
4.3.2	<i>In vitro</i> ωρίμαση των ωαρίων	54
4.3.3	<i>In vitro</i> γονιμοποίηση των ωαρίων	57
4.3.3.1	Χρήση νωπού ή κατεψυγμένου σπέρματος για τη γονιμοποίηση	59
4.3.3.2	Ενεργοποίηση του σπέρματος για τη γονιμοποίηση	61
4.3.4	<i>In vitro</i> καλλιέργεια των ζυγωτών	63
4.4	Μεταφορά εμβρύων	66
4.5	Κατάψυξη εμβρύων	69
4.6	Κλωνοποίηση	72
4.7	Διαίρεση εμβρύων	75
4.8	Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων	77
4.9	Επιλογή φύλου του εμβρύου	79
4.9.1	Διαχωρισμός του φύλου στο σπέρμα	79
4.9.2	Προσδιορισμός του φύλου στο έμβρυο	80
4.10	Ενδοκυτταροπλασματική εναπόθεση σπερματοζωαρίου	82
5	ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	84
5.1	Γονιμοποίηση των δεκτριών	84
5.2	Επαναλαμβανομένη αναρρόφηση ωοθυλακίων	86
5.3	Σύνδρομο των μεγάλων απογόνων	87
6	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91

Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ

ΜΑΡΙΑ ΧΑΒΕΛΕ

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο
Φυσιολογίας και Ανατομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75,
Αθήνα, 118 55, e-mail: jmen@aua.gr

Περίληψη

Η ανάγκη για ύπαρξη μεγάλου αριθμού ατόμων υψηλής γενετικής αξίας μας έχει οδηγήσει σε εξωγενείς χειρισμούς και ρυθμίσεις των γεγονότων που καθορίζουν την αναπαραγωγική διαδικασία των ζώων. Επιπρόσθετα, η έκρηξη της τεχνολογικής ανάπτυξης προσφέρει όλα εκείνα τα εργαλεία που κάνουν δυνατή την ενασχόληση και την πρακτική εφαρμογή μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όπως η κλωνοποίηση και η παραγωγή διαγονιδιακών ζώων. Η παρούσα διατριβή αποτελεί βιβλιογραφική ανασκόπηση των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στο πρόβατο. Περιλαμβάνονται θέματα όπως η Τεχνητή Σπερματέγχυση, η *in vivo* και η *in vitro* παραγωγή εμβρύων, η κλωνοποίηση και πολλές άλλες σύγχρονες τεχνικές.

Η ηθική εφαρμογή όλων αυτών των μεθόδων δεν απειλεί την ευζωία των ζώων, ενώ παράλληλα συμβάλλει αποφασιστικά στην αποκωδικοποίηση πολλών άγνωστων μέχρι πρότινος βιολογικών διεργασιών, στη διατήρηση ατόμων υψηλής γενετικής αξίας, στη διάσωση σπάνιων γενοτύπων, και στη μείωση του κινδύνου νοσημάτων των ζώων.

Λέξεις κλειδιά: Υποβοηθούμενη, Αναπαραγωγή, Πρόβατο, Γονιμοποίηση

ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES IN SHEEP

MARIA CHAVELE

Department of Animal Science and Aquaculture, Laboratory of Physiology and Anatomy of Farm Animals, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, 118 55, e-mail: jmen@aua.gr

Abstract

The need of a large number of animals with high genetic value has led scientists to intervene in events that are crucial to reproduction. Furthermore, the technological process of the last few decades has provided scientists with the necessary tools for developing techniques such as cloning and producing transgenic animals. The present thesis constitutes a literature review on the techniques used in assisted reproduction in sheep. It includes subjects such as Artificial Insemination, *in vivo and in vitro* embryo production, cloning and others currently used techniques.

Ethical application of these techniques does not necessarily interfere with the welfare of the animals; rather, it provides the means for elucidation of unknown biological pathways, and it contributes to exploitation of individuals with high genetic merit, to preservation of endangered species, and to eliminate the possibility of spread of particular diseases.

Key words: Assisted, Reproduction, Sheep, Insemination

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σύνολο των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technologies - A.R.T.) που σχετίζονται με την εμβρυοπαραγωγή και το χειρισμό του εμβρύου σε οικόσιτα μηρυκαστικά έχει αναπτυχθεί στα πρόβατα. Αυτό έγινε πολύ νωρίτερα από ότι στα βοοειδή (Loi *et al.*, 1998).

Οι τεχνικές αυτές άρχισαν να εφαρμόζονται από πολύ παλιότερα με τη μορφή της τεχνητής σπερματέγχυσης (17^ο αιώνα) (Κάζλαρης, 1996). Η αλματώδης ανάπτυξη της επιστημονικής έρευνας γενικότερα τα τελευταία χρόνια είχαν ως αποτέλεσμα τη ραγδαία ανάπτυξη της A.R.T. τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο.

Κύριος στόχος των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στα παραγωγικά ζώα είναι η εκμετάλλευση του τεράστιου αριθμού σπερματοζωαρίων και ωοκυττάρων των ζώων, που σε φυσιολογικές συνθήκες μόνο ελάχιστα από αυτά θα δώσουν απογόνους. Το ενδιαφέρον στρέφεται κυρίως στα γενετικά ανώτερα άτομα του πληθυσμού, καθώς αυτά αποτελούν την πηγή γενετικού υλικού που δυνητικά θα οδηγήσει στην δημιουργία πληθυσμών με βελτιωμένα αναπαραγωγικά και παραγωγικά χαρακτηριστικά και στοιχεία ανθεκτικότητας σε νοσήματα.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανασκόπηση των τεχνικών που χρησιμοποιούνται ή είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στην αναπαραγωγή των προβάτων με σκοπό τη διάσωση σπάνιων φυλών, την επιτάχυνση της γενετικής βελτίωσης όσον αφορά τις παραγωγικές ιδιότητες, την επιλογή ζώων ανθεκτικών σε ασθένειες και παράσιτα και τέλος τη διατήρηση των πλέον επιθυμητών γονοτύπων.

2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ενασχόληση του ανθρώπου με τον τομέα της αναπαραγωγής υπήρξε έντονη από την αρχαιότητα λόγω της άμεσης σχέσης της με την επιβίωση. Η παρακάτω ιστορική αναδρομή έχει ως βάση το βιβλίο του επίκουρου καθηγητή εμβρυολογίας στο τμήμα ιατρικής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Καζλαρή «Το χρυσό μου παιδί».

Η πρώτη ανθρώπινη αναφορά στη γονιμότητα θεωρείται ότι είναι η «Αφροδίτη του Willendorf» (Εικόνα 1). Το συγκεκριμένο αγαλματίδιο που αναπαριστά μορφή γυναίκας, πιθανότατα θεάς της γονιμότητας, εμφατικά τονισμένοι είναι οι μαστοί και το αιδοίο που αντιστοιχούν στην ανατροφή και την αναπαραγωγή, βρέθηκε στο ομώνυμο χωριό της Αυστρίας το 1908 και χρονολογείται μεταξύ 24.000-22.000 π.Χ. Πολύ αργότερα συντάσσονται τα πρώτα ιατρικά κείμενα, όπως ο πάπυρος Ebers (1550 π.Χ.), που θεωρείται το πρώτο γνωστό κείμενο με αναφορές στη γονιμότητα, αν και το κύριο αντικείμενό του είναι άλλο (περιέχει περίπου 800 συνταγές και αναφέρεται σε 700 φαρμακευτικές ουσίες).



Εικόνα 1. Αφροδίτη του Willendorf (www.eugonia.com.gr/media/book)

Στην αρχαιοελληνική περίοδο, ο Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) ασχολείται πρώτος με τη φυσική ιστορία και τη συγκριτική αναπτυξιακή ανατομική. Στα «Φυσικά» (350 π.Χ.) διατυπώνει κατ' ουσίαν την επιγενετική θεωρία (σύμφωνα με την οποία το έμβρυο αναπτύσσεται από το άμορφο αυγό με συγκεκριμένο εξελικτικό προγραμματισμό για να γίνει πλήρης οργανισμός), θεωρία που έμελλε να αποδειχθεί ορθή μόλις τον 18ο αιώνα από τον Wolff. Ο Αριστοτέλης διατυπώνει επίσης θεμελιώδεις έννοιες της εμβρυολογίας, όπως τους τύπους εμβρυϊκής ανάπτυξης (ωοτοκία, όπου η γέννηση γίνεται από αυγά,

όπως στα πτηνά, στα αμφίβια και στα ασπόνδυλα· ωοζωοτοκία, όπου τα αυγά εκκολάπτονται εντός του σώματος, όπως σε ορισμένα ερπετά και στους καρχαρίες· ζωοτοκία, όπου παρατηρείται γέννηση ζώντων νεογνών με πλακούντα, όπως στα θηλαστικά), τους τύπους αυλάκωσης των ζυγωτών (ολοβλαστική, όπως π.χ. στον βάτραχο και στα θηλαστικά, ή μεροβλαστική, όπως π.χ. στα πτηνά), τη λειτουργία του πλακούντα και του ομφαλίου λώρου, και πολλές άλλες.

Στις αρχές της Αναγέννησης η επιστήμη αρχίζει να ανθίζει και πάλι. Ο Leonardo da Vinci (1452-1519), διενεργεί τις πρώτες συστηματικές μετρήσεις της αναπτύξεως των ανθρώπινων εμβρύων *in vivo* (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Σχέδιο εμβρύου σε μήτρα (www.eugonia.com.gr/media/book)

Ο Ιταλός ανατόμος και εμβρυολόγος Hieronymus Fabricius ab Aquapendente (1553-1619) δημοσιεύει, το 1600, το σύγγραμμα «De Formato Foetu» (Περί του σχηματισμού του εμβρύου), που περιλαμβάνει τις πρώτες ρεαλιστικές απεικονίσεις εμβρύων. Ο Ιταλός ανατόμος Gabriele Fallopio (1523-1562) περιγράφει τον ωαγωγό, που φέρει σήμερα το όνομά του στην αγγλοσαξονική βιβλιογραφία («fallopian tube»). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ανακάλυψη της κυκλοφορίας του αίματος από τον μεγάλο Βρετανό ιατρό William Harvey (1578-1657). Το 1628 δημοσιεύεται το σύγγραμμά του «Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus» (Περί της ανατομικής της κυκλοφορίας του αίματος στα έμβια) και το 1651 το σύγγραμμα «Exercitationes de Generatione Animalium» (Περί της δημιουργίας των εμβίων), στο οποίο διατυπώνεται η αρχή ότι όλα τα ζώα προέρχονται από ωάρια («ex ovo omnia» ή «omne vivum ex ovo»). Οι θεωρίες αυτές έρχονται σε αντίθεση με εκείνες του Αριστοτέλη, που πίστευε ότι τα υγρά της εμμήνου ρύσεως περιέχουν την ύλη του εμβρύου, στην οποία δίνει μορφή και ψυχή το σπέρμα.

Ο 17ος αιώνας είναι ο αιώνας σημαντικών επιστημονικών επιτευγμάτων. Ένας Ολλανδός έμπορος, ο Zacharias Jansen (1632-1723) μόλις έχει εφεύρει το μικροσκόπιο (1695), Ο Ολλανδός έμπορος Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723) τελειοποιεί το μικροσκόπιο του Jansen, αυξάνοντας τη μεγεθυντική του ικανότητα (x300) και εισάγει τον κοχλία εστίασης. Ο Van Leeuwenhoek περιγράφει πρώτος τα μικρόβια (1674) και μαζί με τον Hamm περιγράφει τα σπερματοζώαρια (1677-1678). Ο Van Leeuwenhoek θεωρεί ότι στο σπερματοζώαριο υπάρχουν μυς και αρθρώσεις που εξασφαλίζουν την κινητικότητα. Οι σύγχρονοί του «σπερματιστές» (με πρώτο τον Nicolas Hartsoeker, το 1694) βλέπουν μέσα στα σπερματοζώαρια μικροσκοπικούς ανθρώπους, τα «ανθρωπάκια» (Εικόνα 3, «homunculi»: η επικρατούσα άποψη ότι ο Van Leeuwenhoek περιέγραψε τα Ανθρωπάκια μέσα σε σπερματοζώαριο, είναι λανθασμένη).



Εικόνα 3. «Homunculus» «Ανθρωπάριο» (www.eugonia.com.gr/media/book)

Ο Ιταλός ιατρός και βιολόγος Marcello Malpighi (1628-1694), μαθητής του Γαλιλαίου, θεωρείται ως ο πατέρας της Ιστολογίας. Το 1672 δημοσιεύει την πρώτη μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης της όρνιθας (στην οποία περιγράφονται η νευρική αύλακα, η κυκλοφορία του αίματος, κ.λπ.) και το 1674 μια συγκριτική περιγραφή των εμβρύων των φυτών και των πτηνών.

Ο Ιταλός ιερωμένος και βιολόγος Lazzaro Spallanzani (1729-1799) αποδεικνύει το 1775, ότι σπερματοζώαρια και ωάρια είναι εξ ίσου απαραίτητα για την αναπαραγωγή και λύει έτσι μερικώς τη διαμάχη μεταξύ «ωαριστών» (επιγενετική θεωρία) και «σπερματιστών» (θεωρία του προσχηματισμού). Το 1776, ο Spallanzani, με ένα σημαντικό για την εποχή του πείραμα, θεμελιώνει την κρυοβιολογία: χρησιμοποιώντας χιόνι καταψύχει σπέρμα και παρατηρεί τη μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Το 1780 πραγματοποιεί και την πρώτη τεχνητή σπερματέγχυση στον σκύλο, με τοποθέτηση σπέρματος στον κόλπο του θηλυκού. Λίγα χρόνια αργότερα, η νέα αυτή μέθοδος εφαρμόζεται για πρώτη φορά στον άνθρωπο από τον Βρετανό χειρουργό και

ανατόμο John Hunter (1728-1793). Το 1791 ο Hunter πραγματοποιεί, στο Λονδίνο, την πρώτη επιτυχή τεχνητή σπερματέγχυση σε ασθενή.

Ο Γερμανός ανατόμος, βιολόγος και εμβρυολόγος Kaspar Friedrich Wolff (1733-1794) είναι κατά πολλούς η πιο σημαντική μορφή της επιστήμης της εμβρυολογίας μετά τον Αριστοτέλη. Ο Wolff πρακτικά αποδεικνύει την ορθότητα της επιγενετικής θεωρίας: περιγράφει συστηματικά τα στάδια της εμβρυϊκής αναπτύξεως στα πτηνά και διατυπώνει (1759) την ιδέα της θεωρίας των τριών δερμάτων για τα έμβρυα των σπονδυλωτών στην εργασία του «Theoria generationis» (Θεωρία της δημιουργίας). Ο Wolff απέδειξε ότι τα αγγεία αναπτύσσονται εκ νέου σε κάθε έμβρυο και ότι το έντερο σχηματίζεται από την πτύχωση ενός αρχικά επίπεδου ιστού (1767) κατά συνέπεια, η επιγενετική θεωρία ισχύει και το έμβρυο καθίσταται ολόενα και πιο πολύπλοκο καθώς αναπτύσσεται. Παράλληλα, οι επιστήμονες στράφηκαν και στη μελέτη της εξέλιξης.

Ο Γάλλος βιολόγος Jean-Baptiste Pierre Antoine de Monet, Chevalier de Lamarck (1744-1829) υπήρξε ο πρώτος που πρότεινε μια θεωρία της εξέλιξης, τη θεωρία του «μετασχηματισμού». Σύμφωνα με τη θεωρία του Lamarck (1809), τα επίκτητα χαρακτηριστικά, τα οποία ο οργανισμός αποκτά κατά τη διάρκεια της ζωής του, κληροδοτούνται στους απογόνους του. Η θεωρία αυτή, ως γνωστόν, δεν ισχύει, ενώ αντιθέτως ισχύει η θεωρία της φυσικής επιλογής των Darwin και Wallace, που διατυπώθηκε όμως πολύ αργότερα.

Πατέρας της σύγχρονης εμβρυολογίας θεωρείται ο Εσθονός εμβρυολόγος Karl Ernst von Baer (1792-1876). Ο von Baer ανακαλύπτει τη νωτιαία χορδή, η οποία αποτελείται από μεσόδερμα. Επί πλέον, αποδεικνύει την ύπαρξη του ωαρίου στα θηλαστικά, ονομάζει τα κινούμενα κύτταρα του σπέρματος «σπερματοζώαρια», διατυπώνει τις τέσσερις «Αρχές της Εμβρυολογίας» και εισάγει τον κλάδο της συγκριτικής εμβρυολογίας (von Baer, 1837).

Οι τέσσερις θεμελιώδεις αρχές της εμβρυολογίας έχουν ως εξής:

- ·Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα γενικά χαρακτηριστικά μιας μεγάλης ομάδας ζώων εμφανίζονται νωρίτερα από τα ειδικά χαρακτηριστικά μιας μικρότερης ομάδας ζώων.
- ·Τα λιγότερο γενικά χαρακτηριστικά απορρέουν από τα πιο γενικά, έως ότου εμφανισθούν τα πιο ειδικά.
- ·Το έμβρυο ενός είδους δεν περνά από τα στάδια ανάπτυξης των κατωτέρων (δηλαδή απλούστερων) ειδών, αλλά αποκλίνει προοδευτικά από αυτά.
- ·Το έμβρυο ενός ανωτέρου ζώου δεν μοιάζει ποτέ με ένα κατώτερο ζώο, αλλά με μια πρόιμη μορφή του εμβρύου του.

Η επόμενη μεγάλη καμπή είναι η διατύπωση της κυτταρικής θεωρίας, η οποία αποδίδεται στο Γερμανό ζωολόγο Theodor Schwann (1810-1882), στο

Γάλλο βοτανολόγο Rene Joachim Henri Dutrochet (1776-1847) και στο Γερμανό βοτανολόγο Matthias Jacob Schleiden (1804-1881), ο οποίος μεταξύ άλλων ανακάλυψε την όσμωση. Σύμφωνα με την κυτταρική θεωρία (1839) όλα τα φυτά και τα ζώα αποτελούνται από κύτταρα. Ο Schwann θεωρεί τους πυρήνες ως οριστικό κριτήριο περιγραφής των ζωικών κυττάρων (τους πυρήνες είχε διακρίνει πρώτος ο Βρετανός βοτανολόγος Robert Brown, το 1833).

Το 1858, ο Alfred Russel Wallace (1809-1882) στέλνει στον Charles Darwin (1809-1882) μια μελέτη του, στην οποία περιγράφει τη φυσική επιλογή. Ο τελευταίος, ήδη μελετούσε μια παρόμοια θεωρία από εικοσαετίας, μετά τα ταξίδια του στις νήσους Galapagos, όπου είχε συλλέξει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες και χιλιάδες δείγματα. Ο Darwin ολοκληρώνει τη δική του μελέτη και παρουσιάζει μια κοινή ανακοίνωση της νέας θεωρίας στη Λινναϊά Εταιρεία (Linnaean Society) την 1η Ιουλίου 1858, τη «Θεωρία της Φυσικής Επιλογής των Βιολογικών Ειδών» (On the tendency of species to form varieties) (Darwin, 1858). Τα κυριότερα στοιχεία της θεωρίας αυτής βρίσκονται στο πολύκροτο σύγγραμμα «On the Origin of Species» (Περί της καταγωγής των ειδών) (Darwin, 1859). Μια από τις πιο σημαντικές ιδέες της δαρβινικής θεωρίας σχετικά με την εμβρυολογία είναι ότι η ομοιότητα των εμβρυϊκών δομών αντικατοπτρίζει την ομοιότητα των προγόνων («community of embryonic structure reveals community of descent»). Λίγα μόλις χρόνια αργότερα, το 1883, ο Francis Galton, εξάδελφος του Darwin, επινοεί τον όρο «ευγονισμός», ανοίγοντας τον δρόμο για όλες τις γνωστές αποτρόπαιες συνέπειες της εφαρμογής της ευγονικής από τα μετέπειτα ολοκληρωτικά καθεστώτα στη Γερμανία και σε πολλές άλλες χώρες.

Λίγα μόλις χρόνια νωρίτερα (1865-1866), ο Αυστριακός μοναχός και βοτανολόγος Johann Gregor Mendel (1822-1884) έχει διατυπώσει τους νόμους της κληρονομικότητας («Versuche uber Pflanzenhybriden») (Mendel, 1866). Η ανακάλυψη περνά απαρατήρητη! Δεκαετίες αργότερα (1900), ο Ολλανδός βοτανολόγος και γενετιστής Hugo de Vries (1848-1935) ανακαλύπτει και ερμηνεύει εκ νέου τους νόμους του Mendel, εισάγει μάλιστα και την έννοια της μεταλλάξεως. Σημειωτέον ότι παράλληλα και ανεξάρτητα, οι νόμοι του Mendel ανακαλύπτονται από το Γερμανό βοτανολόγο Karl Erich Correns (1864-1933) και τον Αυστριακό γεωπόνο Erich Tschermak von Seysenegg (1872-1962).

Στα τέλη του 19ου αιώνα οι ανακαλύψεις φαίνονται ανεξάντλητες: ο Ιταλός φυσιολόγος και ιστολόγος Enrico Sertoli (1842-1910) ολοκληρώνει την τελική διατύπωση όλων των φάσεων της σπερματογένεσης (από όπου και πήραν το όνομά τους τα κύτταρα Sertoli), ενώ ο Γερμανός ζωολόγος και συγκριτικός ανατόμος Franz von Leydig (1821-1908) περιγράφει το κύτταρο που εκκρίνει τεστοστερόνη και φέρει το όνομά του.

Η πειραματική εμβρυολογία φθάνει στο απόγειό της με το έργο του Γερμανού βιολόγου Hans Spemann (1869-1941) και της βοηθού του Hilde Proescoldt-Mangold (1898-1924). Η μελέτη των μηχανισμών αναπτύξεως του εμβρύου αμφιβίων οδηγεί στην απόδειξη του φαινομένου της επαγωγής το 1924. Η Hilde Mangold διενεργεί το κρίσιμο πείραμα μεταμόσχευσης ιστού από ένα έμβρυο σαλαμάνδρας σε άλλο: η μεταμόσχευση προκαλεί την ανάπτυξη δευτέρου, σιαμαίου εμβρύου. (Spemann, 1924). Για την εργασία αυτή, ο Spemann βραβεύεται το 1935 με το βραβείο Nobel Ιατρικής και Φυσιολογίας.

Βέβαια, η πρώτη απόδειξη της επαγωγής ανήκει στην Αμερικανίδα βιολόγο Ethel Browne Harvey (1885-1965), που το 1909, είχε μεταμοσχεύσει ιστό από την περιοχή του υποστόματος της ύδρας στον κορμό μιας άλλης ύδρας και είχε παρατηρήσει αναγέννηση δευτέρου οργανισμού στη θέση μεταμόσχευσης (Harvey, 1913). Η μεθοδολογία της Harvey ήταν ίδια με εκείνη του Spemann, όπως και το αποτέλεσμα, αν και η παρατήρηση είχε γίνει σε ασπόνδυλο οργανισμό. Μάλιστα η Harvey, έχοντας επίγνωση της σημασίας του ευρήματος, είχε αποστείλει τη δημοσίευσή της στον Spemann.

Ο Spemann έχει προσφέρει στην εμβρυολογία αμέτρητες τεχνικές και εργαλεία εμβρυϊκής μικροχειρουργικής. Κατά την περίοδο 1901-1903 χρησιμοποιεί τρίχες από τα μαλλιά της νεογέννητης κόρης του για να διαχωρίσει τα δύο πρώτα βλαστομερίδια εμβρύων σαλαμάνδρας. Όταν η περίσφιξη είναι πλήρης, παράγονται δύο πλήρεις δίδυμοι οργανισμοί. Όταν η περίσφιξη είναι μερική, παράγονται δύο σιαμαία έμβρυα. Την περίοδο 1920-30, ο Spemann μεταφέρει τον πυρήνα ενός βλαστομεριδίου από έμβρυο 16 κυττάρων σε ένα εκτυρηνωμένο βλαστομερίδιο και η κατασκευή εξελίσσεται σε φυσιολογική σαλαμάνδρα: η πρώτη πυρηνική κλωνοποίηση ήταν γεγονός. Το 1936, στο βιβλίο του για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την επαγωγή («Experimentelle Beitrage zu einer Theorie der Entwicklung»), ο Spemann προτείνει και το «φανταστικό πείραμα» της κλωνοποίησης ανώτερου οργανισμού από διαφοροποιημένο κύτταρο, ή και ακόμη και από κύτταρο του ενήλικα. Η σχετική τεχνολογία δεν υπήρχε τότε, αλλά αυτό έκτοτε έχει επιτευχθεί από κύτταρο εμβρύου στον βάτραχο (Briggs and King, 1955) και στα ανώτερα θηλαστικά (Willadsen, 1986 σε πρόβατο και Willadsen, 1989 στην αγελάδα). Το πιο πρόσφατο επίτευγμα, με το οποίο ανοίγει και ο δρόμος για πολύ σημαντικές εφαρμογές της πειραματικής εμβρυολογίας στον 21ο αιώνα, είναι η κλωνοποίηση του προβάτου Dolly από κύτταρο ενηλίκου (Wilmut and Campbell, 1997).

Ο 20ός αιώνας σημαδεύεται όμως και από ραγδαία εξέλιξη του τομέα της γενετικής. Ο βρετανός βιολόγος και γενετιστής William Bateson (1861-1926) περιγράφει τη γενετική σύζευξη και αποδέχεται πρώτος τους Νόμους του Mendel όταν ανακαλύπτονται εκ νέου. Ο Bateson εισάγει τον όρο «γενετική» το 1909, αλλά και τους όρους «αλληλόμορφο», «ζυγώτης» κ.λπ., ενώ

αποδέχεται τη χρωμοσωματική θεωρία μόλις το 1922, μετά από μια επίσκεψη στο εργαστήριο του Αμερικανού βιολόγου και γενετιστή Thomas Hunt Morgan (1866-1945). Μαζί με τον Bateson, ο Morgan θεωρείται θεμελιωτής της σύγχρονης γενετικής. Το 1910, ανακαλύπτει το γενετικό ανασυνδυασμό (crossing over) μεταξύ δύο ομολόγων χρωμοσωμάτων στη μύγα *Drosophila melanogaster*, επινοεί τη χαρτογράφηση των χρωμοσωμάτων, συμπεραίνει ότι τα γονίδια ακολουθούν το ένα το άλλο πάνω στα χρωμοσώματα, και αποδεικνύει ότι η ποικιλομορφία οφείλεται σε μεταλλάξεις (Morgan *et al.*, 1915). Ο Morgan βραβεύεται το 1933 με το βραβείο Nobel Ιατρικής και Φυσιολογίας για την ανακάλυψη του ρόλου των χρωμοσωμάτων στην κληρονομικότητα.

Ο Αυστριακός χημικός **Erwin Chargaff** (1905-2002) μεταναστεύει στη Νέα Υόρκη το 1935 και διατυπώνει τους κανόνες της αναλογίας νουκλεοτιδίων στο DNA το 1950 (Chargaff, 1950). Το 1952 συναντά στο Cambridge τον **James Dewey Watson** (1928) και τον **Francis Harry Compton Crick** (1916-2004) και τους εκθέτει τα ευρήματά του, βάσει των οποίων εκείνοι ανακαλύπτουν τη στερεοχημική δομή του DNA σε διπλή έλικα, το 1953 (Watson and Crick, 1953). Η ανακάλυψη αυτή θεωρείται από πολλούς ότι έχει τη σημασία της ανακάλυψης των νόμων της βαρύτητας και δικαίως βραβεύεται με το βραβείο Nobel το 1962. Ωστόσο, δεν βραβεύονται ούτε η **Rosalind Franklin**, η οποία παρείχε τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που δημοσιεύθηκαν ταυτόχρονα με τη μελέτη των Watson και Crick, ούτε ο **Erwin Chargaff**, ο οποίος ουσιαστικά τους άνοιξε τον δρόμο. Μόλις μισόν αιώνα αργότερα, στις ημέρες μας, έχει ήδη αναλυθεί σχεδόν πλήρως ολόκληρο το ανθρώπινο DNA (στο πλαίσιο του παγκόσμιου ερευνητικού προγράμματος «**ανθρώπινο γονιδίωμα**»), αλλά και το γονιδίωμα πολλών άλλων οργανισμών. Αυτό ανοίγει τον δρόμο για συγκριτικές μελέτες, οι οποίες ήδη αρχίζουν να φωτίζουν τους μοριακούς μηχανισμούς της εξέλιξης των ειδών.

Από τη δεκαετία του 1950 μέχρι και σήμερα, η βελτίωση των καλλιεργητικών μέσων κυττάρων είναι διαρκής. Οι πρώτες απόπειρες καθορισμού των αναγκών του εμβρύου *in vitro* έγιναν από τον Whitten το 1956 και μόλις το 1963 ο Brinster επιτυγχάνει την καλλιέργεια εμβρύων ποντικού (μέχρι του σταδίου της βλαστοκύστης), σε τυποποιημένο μέσο καλλιέργειας (Brinster, 1963). Στη συνέχεια, πάμπολλοι σύγχρονοί μας ερευνητές ασχολούνται με το θέμα αυτό (Biggers Whitten Whittengham, 1971; Edwards Bavister Steptoe, 1969 κ.α.) και αναπτύσσουν μέσα για την καλλιέργεια εμβρύων πολλών θηλαστικών. Ένας εξ αυτών, ο Robert G. Edwards, έμελλε να γίνει ο πιο διάσημος βιολόγος της εποχής του, όταν ανακοίνωνε, στις 25 Ιουλίου του 1978, τη γέννηση της Louise Brown, του πρώτου «παιδιού του σωλήνα», στην Αγγλία, από κοινού με τον χειρουργό μαιευτήρα Patrick Steptoe και τη μαία Jane Purdie (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Γέννηση του πρώτου «παιδιού του σωλήνα» (www.eugonia.com.gr/media/book)

Το επίτευγμα αυτό θα ήταν αδύνατο χωρίς την ανάπτυξη της λαπαροσκοπικής χειρουργικής. Παλαιότερα η εξωσωματική γονιμοποίηση, προϋπέθετε λαπαροτομική επέμβαση για τη συλλογή των ωαρίων, δεν υπήρχαν φάρμακα για τη διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας, και δεν υπήρχε τρόπος να προγραμματισθεί η ωοθυλακιορρηξία, με συνέπεια ολόκληρη η ιατροβιολογική ομάδα να πρέπει να αναμένει επί ώρες την κατάλληλη στιγμή για την ωαριοληψία. Σημειωτέον ότι η ίδια η υπερηχοτομογραφία εισήχθη, ως τεχνική, μόλις το 1958, η δε διακολπική παραλλαγή της μία δεκαετία αργότερα (Kratochwil and Eisenhut, 1967), ενώ η εφαρμογή της διακολπικής τεχνικής στην ωαριοληψία χρονολογείται μόλις στα 1983 (Wikland *et al.*, 1983).

Έκτοτε, οι εξελίξεις υπήρξαν ραγδαίες: στον τομέα της κρυοβιολογίας, η πρώτη γέννηση από κρυοσυντηρημένο έμβρυο επιτυγχάνεται το 1983 (Trounson *et al.*, 1983), το 1985 (Cohen *et al.*, 1985) ανακοινώνεται η πρώτη επιτυχής κατάψυξη ανθρώπινης βλαστοκύστης και η πρώτη επιτυχής κατάψυξη ανθρώπινου ζυγωτού (στάδιο προπυρήνων) (Lassale *et al.*, 1985). Στον τομέα της αντιμετώπισης του ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας, προτείνονται μέθοδοι μικροκαλλιέργειας και σημειώνεται επανάσταση όταν ανακοινώνεται η επιτυχής μικρογονιμοποίηση με ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI, intracytoplasmic sperm injection) το 1992 (Palermo *et al.*, 1992) και οι παραλλαγές της, MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration) (Silber & Asch, 1992) και TESE (Testicular sperm extraction) (Schoysman *et al.*, 1993). Ο ανδρικός παράγον υπογονιμότητας θεωρείται ότι έχει πρακτικά εξαλειφθεί, μετά την ανακοίνωση της χρήσης σπερματίδων στη μικρογονιμοποίηση (Fishel *et al.*, 1995; Tesarik, 1995). Παράλληλα, αναπτύσσονται νέες τεχνολογίες, εκ των οποίων οι πλέον σημαντικές θεωρούνται η απομόνωση σειρών βλαστικών εμβρυϊκών κυττάρων (Evans and Kaufman, 1981), η κατασκευή διαγονιδιακών ζώων (Palmiter *et al.*, 1983), η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (Handyside *et al.*, 1989), καθώς και η υποβοηθούμενη εκκόλαψη και η μετάγγιση κυτταροπλάσματος ωαρίου (Cohen, 1999).

Ένα τελευταίο σημαντικό επίτευγμα, το οποίο, σε συνδυασμό με την αυξημένη τεχνογνωσία, έχει επιτρέψει τη σταθεροποίηση των ποσοστών επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης σε υψηλά επίπεδα την τελευταία δεκαετία, είναι η παρασκευή συνθετικών γοναδοτροπινών, μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Σήμερα πια, ο εμβρυολόγος διαθέτει μια ποικιλία μεθόδων για την κλινική αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, ενώ παράλληλα η βασική έρευνα στην εμβρυολογία αναμένεται να φέρει και νέα επανάσταση: τη γενίκευση της χρήσεως των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων στην ιατρική του 21ου αιώνα για τη θεραπεία δεκάδων παθήσεων, μέχρι σήμερα ανίατων, αλλά και για την αναδυόμενη αναγεννητική ιατρική (δηλαδή τη δημιουργία ιστών και οργάνων από βλαστικά κύτταρα για αυτόλογη χρήση). Η εμβρυολογία, σε συνδυασμό με τη σύγχρονη γενετική και την αναπτυξιακή βιολογία, βρίσκεται σε μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα καμπή της ιστορίας της, αφού σύντομα αναμένεται να εξελιχθεί στο κεντρικό επιστημονικό υπόβαθρο της βιοϊατρικής του μέλλοντος (Καζλαρής, 1996).

3. ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ

Οι γαμέτες, το ωάριο και το σπερματοζώαριο, είναι τα μόνα απλοειδή κύτταρα και αποτελούν ένα κυτταρικό πληθυσμό ξεχωριστό από τα υπόλοιπα κύτταρα.

Γαμετογένεση είναι η διαδικασία δημιουργίας γαμετών από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (primordial germ cells). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη μετανάστευση των γεννητικών κυττάρων στις γονάδες, τον πολλαπλασιασμό τους, τη μείωση και τα τελικά στάδια της ωρίμασης και διαφοροποίησης των γαμετών σε ωάρια (ωογένεση) και σπερματοζώαρια (σπερματογένεση).

Επειδή το ωάριο βρίσκεται και εξελίσσεται στο μεγαλύτερο μέρος εντός του ωοθυλακίου και η επιβίωσή του εξαρτάται από αυτό παρατίθεται η ωοθυλακιογένεση.

3.1. ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης ξεκινά με το σχηματισμό ενός κυστιδίου (κρύπτης) που εγκλείει το πρωτοταγές ωοκύτταρο. Η ωοθυλακιογένεση είναι μια συνεχής διαδικασία που ξεκινά κατά το μέσο περίπου της εμβρυϊκής ζωής, συνεχίζεται κατά την προηβική και την αναπαραγωγική ζωή αλλά μπορεί να ολοκληρωθεί μόνο μετά την ενήβωση με το σχηματισμό των γραφιανών ωοθυλακίων. Στα έμβρυα των προβάτων ο σχηματισμός των ωοθυλακίων λαμβάνει χώρα αποκλειστικά εντός της ωοφόρου χορδής με τα πρώτα ωοθυλάκια να σχηματίζονται στην επιφάνεια σύνδεσης της φλοιώδους με τη μυελώδη ουσία της ωοθήκης. Τα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων κλιμακώνονται προς τα έξω, εντός της φλοιώδους ουσίας, με κατεύθυνση προς το επιθήλιο της ωοθήκης (Sawyer *et al.*, 2002). Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης τα ωοκύτταρα διέρχονται από διάφορες φάσεις. Συγκεκριμένα τα αρχέγονα ωοθυλάκια μεταπίπτουν σε πρωτογενή ωοθυλάκια, σε δευτερογενή ωοθυλάκια και τέλος σε τριτογενή ωοθυλάκια τα μεγαλύτερα και πιο ώριμα των οποίων αποτελούν τα γραφιανά ωοθυλάκια που έχουν την δυνατότητα να ριχθούν υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Τα κυριότερα στοιχεία των φάσεων αυτών αναφέρονται παρακάτω:

→ **Αρχέγονα ωοθυλάκια (primordial follicles):**

Μόλις το ωοκύτταρο μετατραπεί σε πρωτοταγές περιβάλλεται από ένα στίχο αποπλατυσμένων κοκκωδών κυττάρων σχηματίζοντας το αρχέγονο ωοθυλάκιο (Tassel and Kennedy, 1980; Amorin *et al.*, 2000; Juengel *et al.*, 2002; van den Hurk and Zhao, 2005). Μέχρι την 38^η ημέρα της κύησης του εμβρύου τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα προέρχονται από το μεσόνεφρο ενώ στη συνέχεια από το επιθήλιο της επιφάνειας της ωοθήκης (Sawyer *et al.*, 2002). Τα ωοκύτταρα που εγκλείονται στα αρχέγονα ωοθυλάκια έχουν διάμετρο από 17 έως 22μm, ενώ τα ελεύθερα πρωτοταγή ωοκύτταρα και τα ωογόνια έχουν διάμετρο από 17 έως 22μm και 13 έως 17μm, αντίστοιχα (van den Hurk and Zhao, 2005).

Τα πρώτα αρχέγονα ωοθυλάκια στο κυοφορούμενο έμβρυο σχηματίζονται την 75^η ημέρα της κύησης του εμβρύου, όταν η ωοθήκη περιέχει το μέγιστο αριθμό γεννητικών κυττάρων (900.000 περίπου). Από την 75^η έως την 90^η ημέρα της εμβρυικής ζωής παρατηρείται μαζική απώλεια (80% περίπου) των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (McNatty *et al.*, 1995), πιθανότατα με τη διαδικασία της απόπτωσης (Reynaud and Driancourt, 2000).

→ **Πρωτογενή ωοθυλάκια (primary follicles):**

Η μετατροπή των αρχέγονων ωοθυλακίων σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια είναι μια συνεχής διαδικασία που ξεκινά την 100^η ημέρα της εμβρυικής ζωής και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του προβάτου. Τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας γίνονται πιο στρογγυλά-κυβοειδή ή σχηματίζονται πολλές στιβάδες κυττάρων (Tassell and Kennedy, 1980). Η πρώτη μορφή αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων είναι τα πρωτογενή ωοθυλάκια. Στα πρωτογενή ωοθυλάκια τα αποπλατυσμένα κοκκώδη κύτταρα του στίχου που περιβάλλει το ωοκύτταρο έχουν μετατραπεί σε κυβοειδή ή κυλινδρικά κύτταρα (McNatty *et al.*, 1995). Η μετατροπή των αρχέγονων σε πρωτογενή ωοθυλάκια είναι κατά κάποιο τρόπο μια διαδικασία ωρίμασης παρά ανάπτυξης, δεδομένου ότι η διάμετρος του ωοκύτταρου δε μεταβάλλεται (van den Hurk and Zhao, 2005).

Μεταξύ της 75^{ης} και 100^{ης} ημέρας της κύησης ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων στην ωοθήκη του εμβρύου προβάτου μειώνεται κατά 700.000 περίπου. Μερικά από τα γεννητικά κύτταρα βρίσκονται με τη μορφή ωογόνιων (9%), κάποια άλλα εγκλείονται σε πρωτογενή (1%) και σε αρχέγονα ωοθυλάκια (28%), αλλά η πλειονότητα τους απαντάται με τη μορφή ελευθέρων ωοκυττάρων (61%). Αξιοσημείωτο είναι ότι μεταξύ της 90^{ης} και 100^{ης} ημέρας της ηλικίας του εμβρύου εντοπίζεται ο μέγιστος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων που μπορεί να παρατηρηθεί σε ωοθήκη προβάτου, τόσο στην εμβρυική όσο και στη μετεμβρυική ζωή. Ο αριθμός αυτός είναι 100.000 περίπου (McNatty *et al.*, 1995).

→ Δευτερογενή ωοθυλάκια (secondary follicles):

Μετά την 120^η ημέρα της κύησης τα ωοκύτταρα περιβάλλονται από δύο ή τρεις στίχους κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων σχηματίζοντας τα δευτερογενή ωοθυλάκια (Amorim *et al.*, 2000; Senger, 2003). Σε αυτό το στάδιο ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων εντείνεται, ενώ εξωτερικά αυτών σχηματίζεται η θήκη του ωοθυλακίου από κύτταρα του στρώματος συνδετικού ιστού της φλοιώδους ουσίας της ωοθήκης. Επίσης, σχηματίζεται η διαφανής ζώνη (zona pellucida) γύρω από το ωοκύτταρο η οποία αποτελεί προστατευτικό κάλυμμα και συμμετέχει - με διαφορετικό τρόπο για κάθε είδος ζώου - στη διαδικασία της γονιμοποίησης.

Σε αυτό το στάδιο ιδιαίτερη σημασία έχει ο σχηματισμός ενός δικτύου κυτταρικών συνδέσεων (junctional complexes) μεταξύ γειτονικών κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου. Αυτές οι συνδέσεις ονομάζονται χασματοσυνδέσεις (gap junctions) και αποτελούν περιοριστικό-προστατευτικό φραγμό στη διάχυση ουσιών απαραίτητων για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου που περικλείεται σε αυτό (O'Rahilly and Muller, 2000; Senger, 2003; van den Hurk and Zhao, 2005).

Την 120^η ημέρα τα γεννητικά κύτταρα είναι 205.000 περίπου, από τα οποία το 1% βρίσκεται υπό μορφή δευτερογενών ωοθυλακίων, το 51% ως αρχέγονα ωοθυλάκια και το υπόλοιπο 48% με τη μορφή ελεύθερων ωοκυττάρων (McNatty *et al.*, 1995).

→ Τριτογενή ωοθυλάκια (tertiary or antral follicles):

Από την 135^η ημέρα της εμβρυικής ζωής τα δευτερογενή ωοθυλάκια μεταπίπτουν σε τριτογενή. Η εξέλιξη των δευτερογενών ωοθυλακίων σε τριτογενή χαρακτηρίζεται από το συνεχή πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της έσω και της έξω θήκης, του βασικού υμένα και των στιβάδων των κοκκωδών κυττάρων, όπως επίσης και του άντρου του ωοθυλακίου (Driancourt, 1991). Το ωοθυλακικό υγρό - το οποίο πληροί το άντρο - εκκρίνεται από τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα και της έσω θήκης και αποτελείται από ουσίες που παράγονται τοπικά καθώς και από ουσίες που μεταφέρονται με το πλάσμα του αίματος. Τέτοιες ουσίες είναι οι γοναδοτροπίνες, τα στεροειδή, αυξητικοί παράγοντες, ένζυμα, πρωτεογλυκάνες και λιποπρωτεΐνες. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ο μηχανισμός του άντρου. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι ορμόνες και ενδο-ωοθυλακικοί παράγοντες διεγείρουν το σχηματισμό του (van den Hurk and Zhao, 2005).

Ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων την 135^η ημέρα της εμβρυικής ζωής υπολογίζεται σε 82.000 περίπου, αρκετά μειωμένος σε σχέση με τις 205.000 που παρατηρούνται την 120^η ημέρα. Τα γεννητικά κύτταρα περιέχονται σε

αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια σε ωοθυλακίου), σε αρχέγονα ωοθυλάκια σε ποσοστό 91%, ενώ το υπόλοιπο 5% βρίσκεται με τη μορφή ελεύθερων ωοκυττάρων. Κατά τον τοκετό, που πραγματοποιείται μεταξύ της 143^{ης} και 150^{ης} ημέρας της κύησης, οι ωοθήκες των αρνιών, ανάλογα με τη φυλή, περιέχουν μόλις 52.000 έως 98.000 αρχέγονα ωοθυλάκια περίπου (Land, 1970). Τα ωοθυλάκια αυτά αποτελούν την αποθήκη γεννητικών κυττάρων για όλη την αναπαραγωγική ζωή του προβάτου. Από τη γέννηση μέχρι την ενήβωση ο αριθμός των ωοκυττάρων και των ωοθυλακίων συνεχίζει να μειώνεται. Τελικά, ένας μικρός αριθμός από τα 30.000 έως 50.000 εναπομείναντα θα εξελιχθούν μέχρι το στάδιο του γρααφιανού ωοθυλακίου και θα ρηχθούν κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής (McNatty *et al.*, 1995).

3.2. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΜΝΑΔΩΝ

3.2.1. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΠΡΟΒΑΤΙΝΩΝ

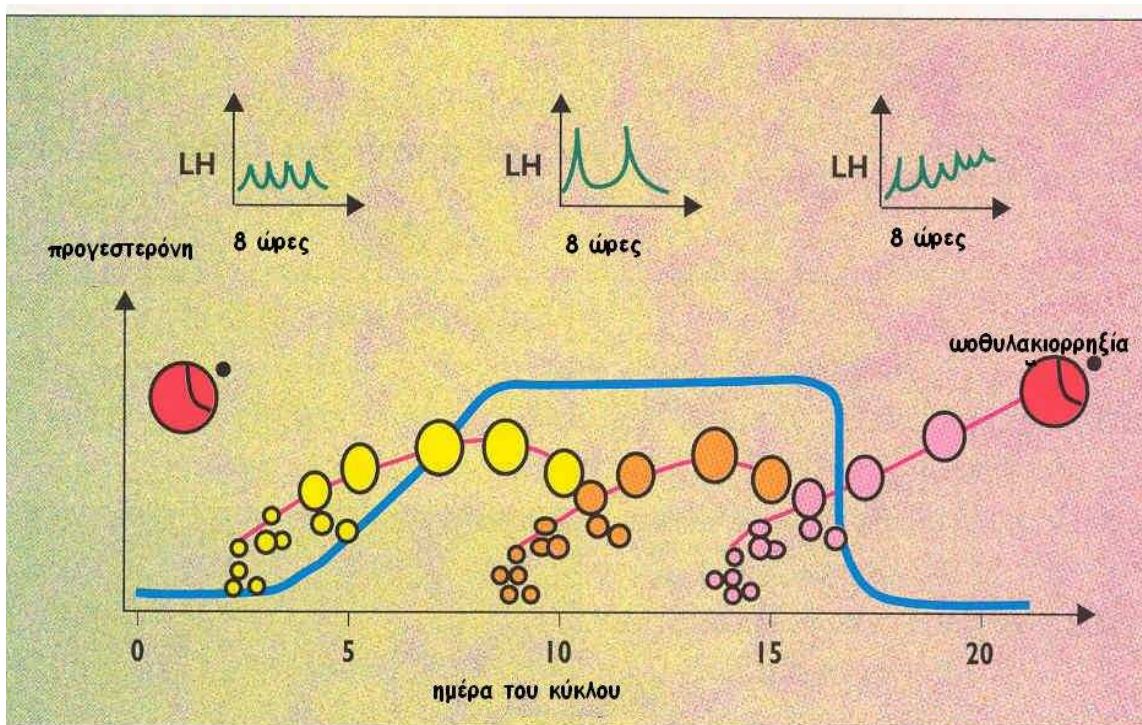
Η ωοθυλακιογένεση είναι μια συνεχής διαδικασία. Από την αποθήκη των αρχέγονων ωοθυλακίων τα ωοθυλάκια αρχίζουν να αναπτύσσονται και να μεταπίπτουν σε επόμενα στάδια ανάπτυξης ανεξάρτητα από την ηλικία του ζώου (άνηβο, ενήλικο), το στάδιο της αναπαραγωγικής ζωής (οιστρική-άνοιστη περίοδος, κυοφορία, γαλουχία) και την τελική κατάληξη τους που μπορεί να είναι ή ωοθυλακιορρηξία ή η ατρησία (Peters *et al.*, 1975; Amorim *et al.*, 2000). Η έναρξη της ανάπτυξης των αρχέγονων ωοθυλακίων συμβαίνει ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των γοναδοτροπινών (Cahill and Mauleon, 1981). Καθημερινά στις προβατίνες εισέρχονται στη φάση ανάπτυξης 2 έως 5 ωοθυλάκια διαμέτρου 100μm. Η μέγιστη διάμετρος που φθάνουν τα ωοθυλάκια απουσία της προωοθυλακιορρηκτικής έκκρισης της ωχρινοποιητικής ορμόνης (Luteinizing Hormone, LH) είναι 4,5 έως 5mm (Turnbull *et al.*, 1977; Driancourt *et al.*, 1985a, b). Ο μέσος χρόνος που χρειάζεται ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο για να αναπτυχθεί έως το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο είναι περίπου 6 μήνες (Cahill, 1981). Στα τελικά στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου χρειάζονται μόνο 124 ώρες για να αυξηθεί η διάμετρος του από τα 0,5 στα 2,2mm και επιπλέον 103 ώρες για να αποκτήσει διάμετρο 4,5mm (Turnbull *et al.*, 1977).

Η ανάπτυξη των τριτογενών ωοθυλακίων δεν αποτελεί συνεχή διαδικασία, αλλά ακολουθεί ένα **κυματοειδές πρότυπο** (Smeaton and Robertson, 1971; Mattner and Braden, 1972; Brand and de Jong, 1973). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές υποστήριξαν ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων γίνεται τυχαία (Driancourt *et al.*, 1985a), είναι ασύγχρονη (Turnbull *et al.*, 1977), διαρκής και ανεξάρτητη του σταδίου του οιστρικού κύκλου (Lahlou-Kassi and Mariana, 1984). Στα πρόβατα το κύμα ανάπτυξης ωοθυλακίων απαρτίζεται από μια ομάδα μικρών τριτογενών ωοθυλακίων που αναδύονται και αναπτύσσονται ταυτόχρονα από τη διάμετρο των 1-3mm έως εκείνη των 4-12mm (Noel *et al.*, 1993; Duggavathi *et al.*, 2003).

Ο αριθμός των κυμάτων ανάπτυξης στη διάρκεια ενός οιστρικού κύκλου δεν είναι σταθερός. Παρατηρήσεις με υπερηχογραφία ή λαπαροσκόπηση έδειξαν ότι ο αριθμός των κυμάτων μπορεί να παραλλάσσει από 2 έως 6 και με περιοδικότητα από 3 έως 6 ημέρες [2 ή 3 κύματα (Noel *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 2000), 4 κύματα (Ginther *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2000), 5 ή 6 κύματα (Ginther *et al.*, 1995)]. Η διακύμανση του αριθμού των κυμάτων αποδίδεται σε

γενετικούς (φυλή), περιβαλλοντικούς και διαχειριστικούς παράγοντες. Τα κύματα ανάπτυξης εμφανίζονται τόσο κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (συνήθως 2 ή 3 κύματα) όσο και κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του οιστρικού κύκλου (1 κύμα). Όλα τα ωοθυλάκια των κυμάτων της ωχρινικής φάσης μετατρέπονται σε ατρητικά, ενώ ένα ή περισσότερα από τα ωοθυλάκια της ωοθυλακικής φάσης θα ρηχθούν (Bister *et al.*, 1999). Τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται κατά κύματα στην άνοιστρη περίοδο όπως και κατά τη διάρκεια της οιστρικής περιόδου (Noel *et al.*, 1993; Huchkowsky *et al.*, 2002). Το ίδιο συμβαίνει και κατά τη μετάβαση από την άνοιστρη στην οιστρική περίοδο (Bartlewski *et al.*, 1999b), αλλά όχι και κατά τη μετάβαση από την οιστρική στην άνοιστρη περίοδο (Bartlewski *et al.*, 1999c).

Η εμφάνιση των κυμάτων προκαλείται από, και συμπίπτει με, παροδικές και αιφνίδιες αυξήσεις της συγκέντρωσης της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH), της ωοθυλακιότροπου ορμόνης (FSH, Follicle-Stimulating Hormone) που ακολουθείται από την κυματοειδή αύξηση της οιστραδιόλης τόσο κατά την οιστρική (Ginther *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2002), όσο και κατά την άνοιστρη περίοδο (Bister *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2001) (Εικόνα 5).



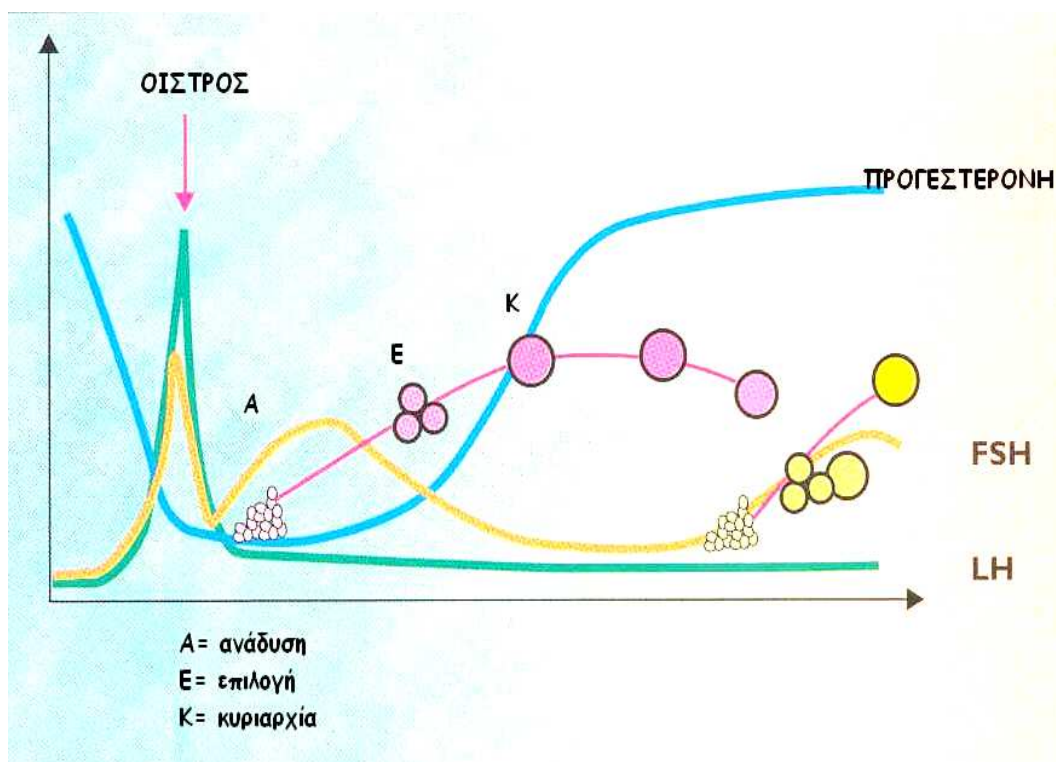
Εικόνα 5. Πρότυπο της κατά κύματα ανάπτυξης των ωοθυλακίων (Αμοιρίδης)

Στις προβατίνες η ανάπτυξη των μικρών τριτογενών ωοθυλακίων περιλαμβάνει τρία στάδια: την **προεπιλογή**, την **επιλογή** και την **κυριαρχία** (van den Hurk and Zhao, 2005). Μόλις τα μικρά τριτογενή ωοθυλάκια φτάσουν στο μέγεθος των 2 mm (βασική ανάπτυξη) (Driancourt *et al.*, 1985a, b; van den Hurk and Zhao, 2005) μπορούν να ανταποκριθούν στις αλλαγές της

συγκέντρωσης των γοναδοτροπινών και μετά από μια παροδική αύξηση της FSH (για 2 έως 3 ημέρες) προεπιλέγονται για περαιτέρω ανάπτυξη (ανάδυση κύματος) (McNeilly *et al.*, 1992; Webb *et al.*, 1999). Ο αριθμός των ωοθυλακίων που προεπιλέγονται ποικίλλει μεταξύ των ατόμων της ίδιας φυλής. Η FSH σε σχέση με την LH παίζει σημαντικότερο ρόλο στην προεπιλογή των ωοθυλακίων, ενώ η LH είναι απαραίτητη για την ωρίμαση των ωοθυλακίων μέχρι το προωθυλακιόρρηκτικό στάδιο (Webb *et al.*, 1999). Για την προεπιλογή των ωοθυλακίων, πέρα από την αυξημένη συγκέντρωση FSH, είναι απαραίτητη και η αυξημένη συγκέντρωση ακτιβίνης, ανασταλτίνης και του παρόμοιου με την ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα τύπου 1 (insulin-like growth factor, IGF-I). Η FSH διεγείρει την παραγωγή της οιστραδιόλης και της ανασταλτίνης όπως και, μέσω της εξασθένισης της παραγωγής του IGFBP-2, την παραγωγή του IGF-I. Ο IGF-I, η ακτιβίνη, ο BMPs (μορφογεννητικός παράγοντας οστών, bone morpho-genetic protein) και ο EGF (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, epidermal growth factor) συντονίζουν την παραγωγή οιστραδιόλης που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ωοθυλακίων (Bister *et al.*, 1999). Η LH και η ανασταλτίνη διεγείρουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου των οποίων η σύνθεση ελέγχεται επιπλέον από τη δράση των IGF-I, ακτιβίνης, BMPs και EGF (van den Hurk and Zhao, 2005).

Τα ωοθυλάκια που προεπιλέχθηκαν αναπτύσσονται για 2 έως 3 ημέρες μέχρι ένα από αυτά να επιλεγεί και να ωριμάσει περαιτέρω αποτελώντας το κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Ενδέχεται να φθάσουν στο σημείο της ωρίμασης και περισσότερα του ενός ωοθυλάκια (Fortune, 1994; Driancourt, 2001), ενώ τα υπόλοιπα παλινδρομούν και εκφυλίζονται. Ο μηχανισμός επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος, αλλά φαίνεται ότι ο καθοριστικός παράγοντας είναι η ευαισθησία του ωοθυλακίου στις αλλαγές της συγκέντρωσης της FSH. Η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου λαμβάνει χώρα όταν η συγκέντρωση της FSH μειωθεί κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο. Η ωρίμαση του ωοθυλακίου χαρακτηρίζεται από μείωση της εξάρτησης του από την FSH και αύξηση της εξάρτησης του από την LH. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως αποτελεί μέρος του μηχανισμού μέσω του οποίου επιλέγονται τα ωοθυλάκια που συνεχίζουν να αναπτύσσονται (Campbell *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1999). Επιπλέον, αυτή η στροφή της εξάρτησης των ωοθυλακίων από την FSH στην LH μπορεί να αποτελεί μέρος του μηχανισμού αντοχής στη χαμηλή συγκέντρωση FSH κατά την ωοθυλακική φάση (Campbell *et al.*, 1995). Η κυριαρχία είναι αποτέλεσμα της αυξημένης συγκέντρωσης υποδοχέων FSH και αυξημένου αριθμού κοκκωδών κυττάρων που επιτρέπουν στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο να αξιοποιεί ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις FSH (Hillier, 1994). Εκτός της συγκέντρωσης της FSH, τα ίδια τα κυρίαρχα ωοθυλάκια συμμετέχουν στη διαδικασία της επιλογής, μειώνοντας περαιτέρω την ευαισθησία των υποτελών στις γοναδοτροπίνες. Τα κυρίαρχα ωοθυλάκια αναπτύσσονται, παράγουν και διοχετεύουν στη συστηματική

κυκλοφορία οιστραδιόλη και ανασταλτίνη, οι οποίες μειώνουν περαιτέρω τη συγκέντρωση της FSH σε βαθμό που η αξιοποίηση της από τα υποτελή να είναι αδύνατη (Clarke *et al.*, 1986; Mann *et al.*, 1992). Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του IGF-I, ο οποίος προκαλεί το σχηματισμό υποδοχέων για την FSH στα κοκκώδη κύτταρα και για την LH στα κύτταρα της έσω θήκης του κυρίαρχου ωοθυλάκιου, γεγονός που το καθιστά περισσότερο ευαίσθητο στη χαμηλή συγκέντρωση της FSH και ικανό να ανταποκριθεί στην LH (Webb *et al.*, 1999; van den Hurk and Zhao, 2005). Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο υπό την επίδραση της LH αναπτύσσεται ταχέως και γίνεται μεγαλύτερο από τα υποτελή, αποτελώντας το ώριμο ωοθυλάκιο (van den Hurk and Zhao, 2005). Κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου, το ώριμο και το μεγαλύτερο υποτελές ωοθυλάκιο μπορούν να αποκτήσουν διάμετρο 5 έως 7 και 3 έως 5mm, αντίστοιχα (Ginther *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2000) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Επιλογή – Ανάδυση – Κυριαρχία (Αμοιρίδης)

Οι διαδικασίες που διέπουν την ωρίμαση / κυριαρχία των ωοθυλακίων στα πρόβατα δεν έχουν διευκρινιστεί στο βαθμό που έχει γίνει στις αγελάδες. Πιθανότατα αυτό σχετίζεται με παράγοντες όπως είναι το στάδιο της

αναπαραγωγικής περιόδου, η φυλή και η εποχή του έτους (Evans, 2003). Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα κυρίαρχα ωοθυλάκια των προβατίνων ωριμάζουν υπό την επίδραση της προγεστερόνης (Ravindra *et al.*, 1994; Ginther *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2000, 2002, 2003), ενώ άλλοι υποστηρίζουν το αντίθετο (Leyva *et al.*, 1998; Bartlewski *et al.*, 1999a; Flynn *et al.*, 2000). Η ωρίμαση του κυρίαρχου ωοθυλακίου ενισχύεται τουλάχιστον από δύο τοπικούς παράγοντες που είναι ο IGF-I, ο οποίος διεγείρει το σχηματισμό υποδοχέων για την LH, και ο παράγοντας VEGF (vascular endothelial growth factor, αυξητικός παράγοντας του μυϊκού ενδοθηλίου) που προάγει την αγγειογένεση. Η αυξημένη αγγείωση συμβάλλει στο να τροφοδοτηθεί το ωοθυλάκιο με περισσότερη FSH, LH, θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και αυξητικούς παράγοντες ώστε να αναπτυχθεί μέχρι το πρωοθυλακιορρηκτικό στάδιο (Βαλάση, 2006).

3.2.2. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ ΑΜΝΑΔΩΝ

Το μορφολογικό πρότυπο της ανάπτυξης ωοθυλακίων σε αμνάδες φαίνεται να είναι μια **συνεχής γραμμική διαδικασία** (Rawlings *et al.*, 2003; Bartlewski *et al.*, 2006) που δεν ακολουθεί το κατά κύματα πρότυπο. Η ‘κατά κύματα’ ανάπτυξη των ωοθυλακίων παρατηρείται στις προβατίνες τόσο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής όσο και της άνοιστρης περιόδου (Noel *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 2000). Στις προβατίνες πριν από την ανάδυση του κύματος προηγείται μια παροδική αύξηση της συγκέντρωσης της FSH. Παρότι σε αμνάδες παρατηρήθηκαν ρυθμικές αυξήσεις της συγκέντρωσης της FSH με συχνότητα και εύρος ανάλογο εκείνων που παρατηρούνται σε προβατίνες, κάθε αύξηση της FSH δεν οδηγεί σε ανάδυση ωοθυλακίου προωοθυλακιορρηκτικού μεγέθους (Bartlewski *et al.*, 2006c). Αυτός ο διαχωρισμός της ανάδυσης του κύματος και της αύξησης της συγκέντρωσης της FSH έχει παρατηρηθεί σε προβατίνες κατά τη μετάβαση από την οιστρική στην άνοιστρη περίοδο (Bartlewski *et al.*, 1999). Αν και σε αμνάδες που πλησιάζουν την ηλικία ενήβωσης έχουν ανιχνευθεί ωοθυλάκια προωοθυλακιορρηκτικού μεγέθους, δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη ωοθυλακίων κατά κύματα πριν και κατά την ενήβωση.

Σε αμνάδες φυλής Romanon κάθε ημέρα, από τη γέννηση μέχρι την ηλικία των 4 εβδομάδων, 5 αρχέγονα ωοθυλάκια περίπου αρχίζουν να αναπτύσσονται και να μεταπίπτουν σταδιακά σε δευτερογενή. Ωστόσο, καθημερινά μόνο 0,5 δευτερογενή ωοθυλάκια κατά μέσο όρο μετατρέπονται σε τριτογενή, υποδηλώνοντας ότι η πλειονότητα αυτών εκφυλίζεται. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα άνηθα ζώα εξελίσσονται περισσότερα αρχέγονα ωοθυλάκια σε σχέση με τα ενήλικα. Αυτό αποδεικνύεται από το ότι σε αμνάδες ηλικίας 12 εβδομάδων παρατηρείται μεγαλύτερος πληθυσμός τριτογενών ωοθυλακίων από ότι σε

προβατίνες (Sonjaya and Driancourt, 1989). Από τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω προκύπτει ότι το πρότυπο ανάπτυξης και ο αριθμός των ωοθυλακίων των άνηβων αμνάδων διαφοροποιούνται από αυτά των ενηλίκων.

Ο λόγος ύπαρξης του μεγάλου αριθμού ωοθυλακίων σε άνηβα ζώα παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος (Sonjaya and Driancourt, 1989). Επιπλέον, η συγκέντρωση των γοναδοτροπινών δε συσχετίζεται με την αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων (Tassell *et al.*, 1978), γεγονός που συνηγορεί στο ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων κατά τον 1^ο μήνα της ζωής των αμνάδων δεν εξαρτάται από τις γοναδοτροπίνες (Peters *et al.*, 1973). Εξάλλου, η χορήγηση PMSG σε αμνάδες φυλής Merino ηλικίας 30 ημερών περίπου δεν επηρεάζει τη μορφολογία των ωοθυλακίων, όμως αυξάνει τον αριθμό των τριτογενών ωοθυλακίων, ίσως προφυλάσσοντας τα από την ατρησία (Tassell and Kennedy, 1980). Σύμφωνα με άλλους (Meikle *et al.*, 1998), η ανάπτυξη των ωοθυλακίων αμνάδων ηλικίας 3 μηνών παρουσία ή απουσία γοναδοτροπινών εξαρτάται από τη διάμετρο τους, όπως ακριβώς ισχύει και στις προβατίνες (Scaramuzzi *et al.*, 1993; van den Hurk and Zhao, 2005). Αυτό σημαίνει ότι ωοθυλάκια με διάμετρο <2mm μπορούν να αναπτυχθούν παρά την απουσία FSH και LH (gonadotrophin-responsive follicles), ενώ η ανάπτυξη των ωοθυλακίων μεγαλύτερης διαμέτρου εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία γοναδοτροπινών.

Οι Peters *et al.* (1975) πρότειναν ότι, ανεξάρτητα από την επίδραση των γοναδοτροπινών, ενδο-ωοθηκικοί μηχανισμοί ίσως να συνδέονται με τη μεγάλη αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων στη συγκεκριμένη περίοδο. Επίσης, προτάθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ παραγόντων ανάπτυξης και ωοθυλακιογένεσης κατά την εμβρυική ζωή (Byskov and Hoyer, 1994). Στις αμνάδες ο IGF-I φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Ο παράγοντας αυτός διεγείρει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων διαμέτρου από 1 έως 2mm μέσω της αύξησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων, ακόμη και όταν οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών είναι χαμηλές (Mariana *et al.*, 1998).

3.3. ΩΟΓΕΝΕΣΗ (ΩΑΡΙΟΓΕΝΕΣΗ)

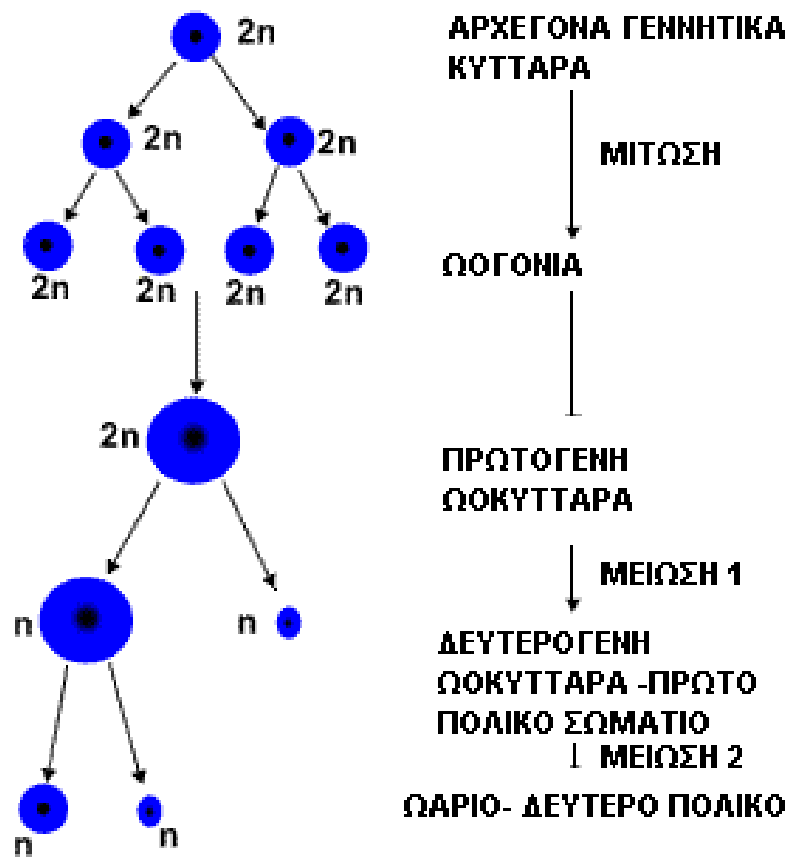
Ως ωογένεση περιγράφεται η παραγωγή και η ωρίμαση των ωοκυττάρων (ωαρίων), τα οποία προέρχονται από τα ωογόνια. Στα θηλαστικά η ωογένεση αρχίζει κατά την εμβρυική ζωή, ολοκληρώνεται μετά την ενήβωση και συνεχίζεται απρόσκοπτα καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του ενήλικου θηλυκού ζώου. Ο σχηματισμός και η ανάπτυξη των ωοκυττάρων περιλαμβάνει επτά στάδια: (1) τη δημιουργία των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (Α.Γ.Κ.), (2) τη μετανάστευση των Α.Γ.Κ. στις γονάδες, (3) την αποίκιση των γονάδων από τα Α.Γ.Κ., (4) τη διαφοροποίηση των Α.Γ.Κ. σε ωογόνια (αρχέγονα ωοκύτταρα), (5) τον πολλαπλασιασμό των ωογονίων, (6) την έναρξη της μείωσης και (7) την παραμονή των ωοκυττάρων στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης I (Βαλάση, 2006).

Η διαδικασία της ωογένεσης στο πρόβατο αρχίζει μετά την εγκατάσταση του εμβρύου στη μήτρα (16^η-18^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση), όταν τα αδέσμευτα κύτταρα της επιβλάστης μετατρέπονται σε αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Μεταξύ της 18^{ης} και 28^{ης} ημέρας της κύησης του εμβρύου, τα Α.Γ.Κ. πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στις γεννητικές ταινίες. Οι αδιαφοροποίητες γονάδες (γεννητικές ταινίες) για πρώτη φορά παρατηρούνται μεταξύ της 23^{ης} και 24^{ης} ημέρας της εμβρυικής ζωής ως παχύνσεις (van den Hurk and Zhao, 2005).

Μόλις τα Α.Γ.Κ. εισέλθουν στη γεννητική ταινία διαφοροποιούνται, μετά από πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις σε ωογόνια. Από την 38^η ημέρα της κύησης του εμβρύου τα ωογόνια συνδέονται μεταξύ τους με μεσοκυττάριας κυτταροπλασματικές γέφυρες και περιβάλλονται από τα πρόδρομα κοκκώδη κύτταρα (pregranulosa cells) (McNatty *et al.*, 1995; Juengel *et al.*, 2002; van den Hurk and Zhao, 2005).

Στο έμβρυο του προβάτου οι μειωτικές διαιρέσεις αρχίζουν γύρω στην 55^η ημέρα της κύησης του εμβρύου και επαναλαμβάνονται με μεγάλη συχνότητα μέχρι την 120^η ημέρα της κύησης του εμβρύου. Τα ωογόνια υφίστανται περαιτέρω μιτωτικές διαιρέσεις και έπειτα αφού εισέλθουν στην 1^η μειωτική διαίρεση μετατρέπονται σε ωοκύτταρα (ωάρια). Τα ωοκύτταρα διέρχονται τα στάδια της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και παραμένουν χωρίς περαιτέρω εξέλιξη στο στάδιο της διπλοταινίας, οπότε και ονομάζονται πρωτοταγή ωοκύτταρα (ωοκύτταρα 1^{ης} τάξης, διπλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων). Το πρωτοταγές ωοκύτταρο περιέχει γενετικά ανασυνδυασμένο DNA μητρικής και πατρικής προέλευσης, είναι μεγαλύτερο από το ωογόνιο και περιέχει περισσότερα κυτταροπλασματικά οργανίδια. Σε αυτό το στάδιο μπορεί να παραμείνει μέχρι το ωοθυλάκιο στο οποίο περιέχεται να εκφυλιστεί (ατρησία) ή μέχρι να επιλεγεί για να ολοκληρώσει την 1^η και τη

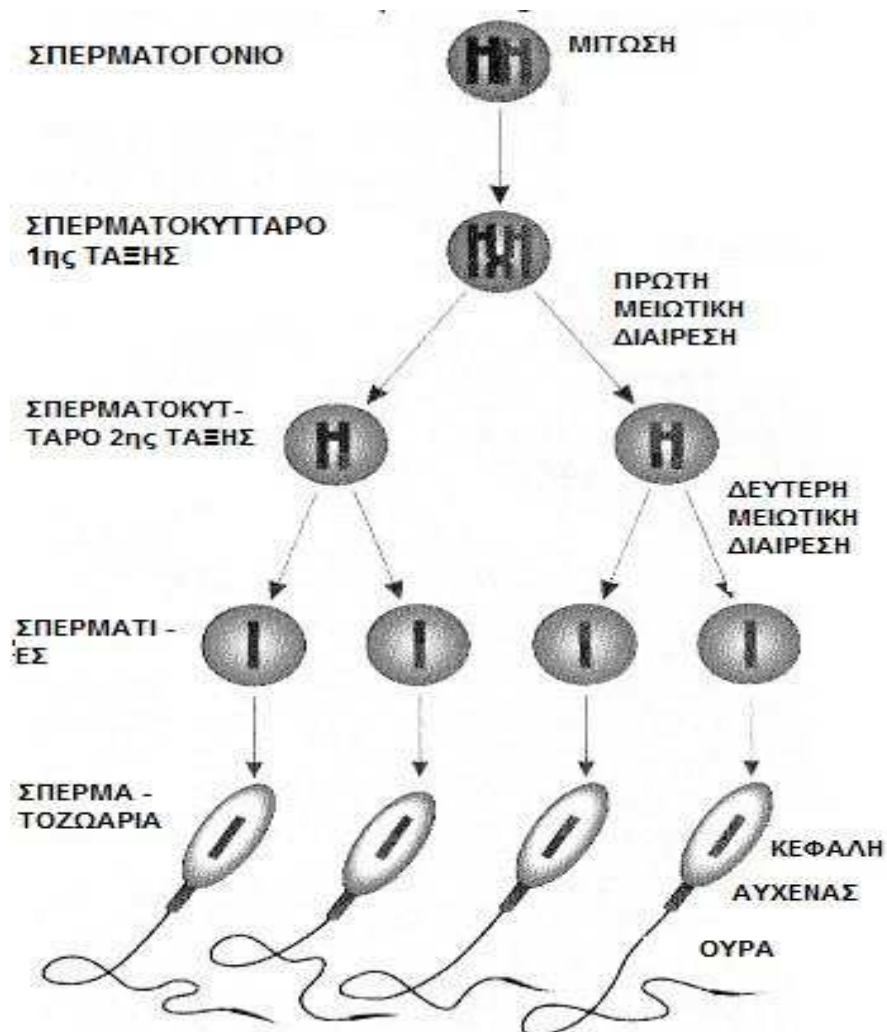
2^η μειωτική διαίρεση. Η 1^η μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται *in vivo* μετά την προωθυλακιορρηκτική έκκριση της LH ή σε *in vitro* συνθήκες μετά από προσθήκη ορμονών στο υπόστρωμα καλλιέργειας, οπότε σχηματίζεται το δευτεροταγές ωοκύτταρο (ωοκύτταρο 2^{ης} τάξης, απλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων). Τότε σχηματίζεται και το πρώτο πολικό σωματίο, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ωοκύτταρο με ελαττωμένη ποσότητα κυτταροπλάσματος. Το δευτεροταγές ωοκύτταρο είναι θηλυκός γαμέτης στον οποίο έχει ολοκληρωθεί η 1^η μειωτική διαίρεση και έχει αρχίσει η δεύτερη. Η 2^η μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται μόνο μετά τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου (O’Rahilly and Muller, 2000; McNatty *et al.*, 1995; Juengel *et al.*, 2002; van den Hurk and Zhao, 2005) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ωογένεση (www.click4biology.info.htm)

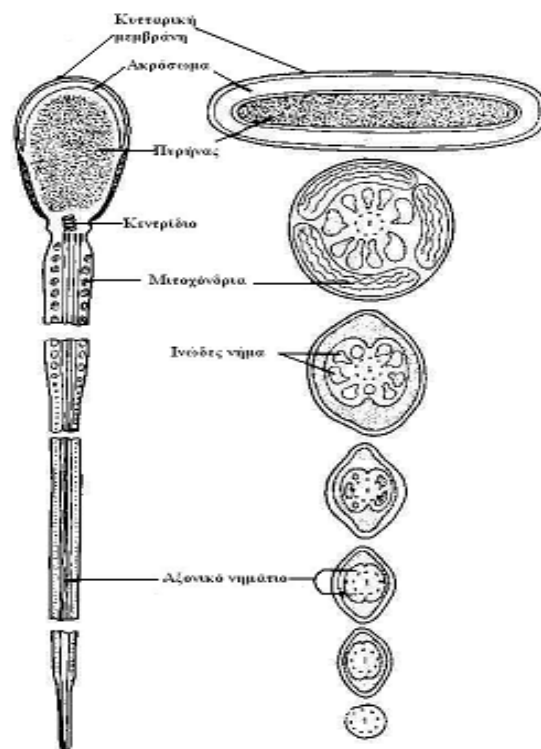
3.4. ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ (ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΓΕΝΕΣΗ)

Στο αρσενικό τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εγκαθίστανται στη γεννητική ταινία των όρχεων κατά την εμβρυϊκή περίοδο. Αμέσως μετά πολλαπλασιάζονται με μίτωση με αποτέλεσμα ο αριθμός τους να αυξάνεται σημαντικά (Patten, 1974) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σπερματογένεση και σπερμιογένεση (www.biyolejiegitim.yyu.edu.tr)

Τα μιτωτικώς ενεργά κύτταρα ονομάζονται σπερματογόνια και διακρίνονται σε τύπου Α και Β. Από τα σπερματογόνια τύπου Α προκύπτουν τα τύπου Β τα οποία με μιτωτικές διαιρέσεις δίνουν τελικά τα σπερματοκύτταρα 1^{ης} τάξης (πρωτογενή σπερματοκύτταρα). Τα σπερματοκύτταρα 1^{ης} τάξης στη συνέχεια μπαίνουν στη φάση της μείωσης και με την πρώτη μειωτική διαίρεση δίνουν τα σπερματοκύτταρα 2^{ης} τάξης (δευτεροταγή σπερματοκύτταρα). Τα δευτεροταγή σπερματοκύτταρα έχουν τον μισό αριθμό χρωματισσώματων από τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα (δηλαδή απλοειδή αριθμό χρωματισσώματων). Με την δεύτερη μειωτική διαίρεση τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα δίνουν τις σπερματίδες οι οποίες επίσης φέρουν απλοειδή αριθμό χρωματισσώματων. Από κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο προκύπτουν 4 σπερματίδες. Τελικά η διαδικασία της σπερματογένεσης ολοκληρώνεται με τη σπερμιογένεση. Κατά τη σπερμιογένεση κάθε απλοειδής σπερματίδα μετατρέπεται, μετά από μία σειρά μεταμορφώσεων, σε ένα θαυμάσια κατασκευασμένο κύτταρο, το σπερματοζωάριο (Σμοκοβίτης, 2004) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Δομή σπερματοζωαρίου (McKenzie, 1976)

3.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σπερματογένεση

Ποικίλοι παράγοντες επηρεάζουν τη σπερματογένεση και συντελούν στην τελική διαμόρφωση των σπερματοζωαρίων.

Πολύ σπουδαίο ρόλο παίζουν τα κύτταρα **Sertoli** που βρίσκονται στα σπερματικά σωληνάρια. Στηρίζουν, προστατεύουν μέσω του αιματοορχικού φραγμού που σχηματίζουν και συμβάλουν στη θρέψη των αναπτυσσόμενων γαμετών. Επίσης, διατηρούν αυξημένη τη συγκέντρωση των ανδρογόνων στα σπερματικά σωληνάρια μέσω της δεσμευτικής πρωτεΐνης που παράγουν και απομακρύνουν το υπολειμματικό κυτταρόπλασμα κατά τη σπερμιογένεση (Καλογιάννης, 2006).

Ορμονικοί παράγοντες που περιλαμβάνουν την δράση της ωοθηλακιοτρόπου (FSH) και της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) είναι επίσης πολύ σημαντικοί. Τα κύτταρα Leydig διεγείρονται από την LH για την έκκριση των ανδρογόνων. Αντίστοιχα, τα κύτταρα Sertoli διεγείρονται από την FSH για την παραγωγή ανδρογόνων. Τα ανδρογόνα (τεστοστερόνη, διυδροτεστοστερόνη) μέσω του μηχανισμού της παλίνδρομης ρύθμισης, δρώντας στον υποθάλαμο και στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης επηρεάζουν εκ νέου την έκκριση των ορμονών αυτών. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ανδρογόνων μέσα στα σπειροειδή σπερματικά σωληνάρια διεγείρουν τη σπερματογένεση (Σμοκοβίτης, 2004).

Η **θερμοκρασία** είναι ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την σπερματογένεση ιδιαίτερα. Οι όρχεις στα κατοικίδια ζώα (επομένως και στο πρόβατο) είναι τοποθετημένοι μέσα στο όσχεο και εξωτερικά του σώματος του ζώου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η θερμοκρασία φυσιολογικά να είναι μικρότερη κατά 4 – 7° C. Η σπερματογένεση είναι μειωμένη όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες και σε περίπτωση κρυσορχιδιάς όπως επίσης και λόγω παροδικής αύξησης της θερμοκρασίας (πυρετός) (Σμοκοβίτης, 2004).

Ο **φωτοπεριοδισμός** επίσης επηρεάζει την σπερματογένεση έμμεσα μέσω του φαινομένου της εποχικότητας. Στον κριό, αν και δεν παρατηρείται τόσο έντονο το φαινόμενο της εποχικότητας στην αναπαραγωγική του λειτουργία, όσο στην προβατίνα, αφού δεν παρατηρείται μεγάλη ελάττωση της libido ή της γονιμοποιητικής του ικανότητας κατά την άνοιστη περίοδο της προβατίνας, έχουν παρατηρηθεί σοβαρές μεταβολές κυρίως στην σπερματογένεση και στο ενδοκρινικό του πρότυπο κατά τη διάρκεια του έτους (Καλογιάννης, 2006). Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι το μέγεθος των όρχεων ελαττώνεται σημαντικά κατά την περίοδο από Ιανουάριο μέχρι Μάιο, διάστημα που συμπίπτει με την άνοιστη περίοδο της προβατίνας (Islam and Land, 1977: Menegatos and Karakatsiotis, 1986).

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την εποχικότητα που παρουσιάζει το ορμονικό πρότυπο του κριού (Katongole *et al.*, 1974; Schanbacher and Downing, 1976). Υπάρχει σημαντική μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης και LH κατά το διάστημα της άνοιξης της περιόδου της προβατίνας. Επίσης η ύπαρξη της εποχικότητας στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις φαίνεται από την διαφορετική απάντηση της LH μετά τη χορήγηση εκλυτικής ορμόνης στις διάφορες εποχές (Χαδιώ και Μενεγάτος, 1993). Οι μεταβολές αυτές φαίνεται ότι οφείλονται κατά κύριο λόγο στο φωτοπεριοδισμό όπως και στην προβατίνα (Lincoln and Davidson, 1977; Howles *et al.*, 1980). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη χρονική διάρκεια των αλλαγών είναι οι φυλετικές διαφορές και η θερμοκρασία.

Άλλοι παράγοντες που επεμβαίνουν στη φυσιολογική διαδικασία της σπερματογένεσης είναι η **διατροφή**, διάφορες χημικές **ουσίες** και **ακτινοβολίες** με αποτελέσματα που κυμαίνονται από μειωμένη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος έως την στειρότητα (Σμοκοβίτης, 2004).

3.4.2. Εκτίμηση ποιότητας σπέρματος

Η διαδικασία της σπερματογένεσης στον κριό είναι εν πολλοίς όμοια με τα υπόλοιπα θηλαστικά. Οι διαφοροποιήσεις στο σπέρμα του κριού συνίστανται κυρίως στον χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση κάθε φάσης. Κατά τη σπερματογένεση, το σπέρμα του κριού απαιτεί 15- 17 ημέρες έως ότου τα σπερματογόνια τύπου Β να δώσουν σπερματοκύτταρα 1^{ης} τάξεως, στη φάση της μιτωτικής διαίρεσης. Επίσης, 15 περίπου ημέρες διαρκεί και η φάση της μειωτικής διαίρεσης του σπερματοκυττάρου 1^{ης} τάξεως σε σπερματοκύτταρα 2^{ης} τάξεως. Τελικά η σπερματογένεση δηλαδή η διαδικασία μετατροπής των σπερματίδων σε ολοκληρωμένα σπερματοζωάρια διαρκεί 15- 17 ημέρες (Καλογιάννης, 2006).

Το σπερματοζωάριο του κριού έχει συνολικό μήκος γύρω στα 65μm με διαστάσεις κεφαλής 8μm, 4μm πλάτος και 1μm πάχος και μήκος ουράς γύρω στα 55- 59μm (Εικόνα). Η εκσπερμάτιση του κριού έχει το μικρότερο όγκο από τα παραγωγικά θηλαστικά αλλά και το μεγαλύτερο αριθμό σπερματοζωαρίων (2- 3 δισεκατομμύρια/ml). Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι πολύ καλή (60- 80%) όπως και η μορφολογία τους (80- 95% φυσιολογική) (Hafez, 1993). Στον Πίνακα 1, παρατίθενται τα χαρακτηριστικά και η σύσταση του σπέρματος του κριού.

Χαρακτηριστικά και σύσταση	Τιμές
Όγκος εκσπερτίσματος (cm)	0,5-2,0
Ξηρή ουσία (%)	14,8
Αριθμός σπερματοζωαρίων (ανά ml x 10 ⁶)	2000-3000
Κινητικότητα (%)	95
Φυσιολογικά σπερματοζωάρια (%)	95
pH	5,9-7,3
Φρουκτόζη (mg/100ml)	150-600
Σορβιτόλη (mg/100ml)	26-120
Κιτρικό οξύ (mg/100ml)	110-260
Γλυκεροφωσφορολχολίνη (mg/100ml)	1600-2000
Γλουταμινικό οξύ (mg/100ml)	76
Νάτριο (mg/100ml)	120-250
Κάλιο (mg/100ml)	50-140
Ασβέστιο (mg/100ml)	6-15
Μαγνήσιο (mg/100ml)	2-13

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά και σύσταση του σπέρματος του κριού (Καλογιάννης, 2006)

Η εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος έως τώρα βασιζόταν κυρίως στην εκτίμηση των προαναφερθέντων παραγόντων και άλλων τεχνικών χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, σε **εξωτερικούς παράγοντες** (όγκος και χρώμα σπέρματος), στην **κινητικότητα** (κίνηση του κύματος και ατομική κινητικότητα) και στη **συγκέντρωση ή πυκνότητα** του σπέρματος (εκτίμηση με φασματοφωτόμετρο). Αυτές οι εκτιμήσεις δεν είναι εντελώς υποκειμενικές, είναι γρήγορες στην εφαρμογή και δεν απαιτούν ιδιαίτερα πολύπλοκα μηχανήματα. Αυτές οι εκτιμήσεις ήταν αρκετές για την εκτίμηση του νωπού σπέρματος για την κολπική τεχνητή σπερματέγχυση αλλά δεν επαρκούν για την εκτίμηση του κατεψυγμένου σπέρματος. Επιπρόσθετα, σε κάποιες καταστάσεις (προβλήματα υπογονιμότητας, ακριβής εκτίμηση σπέρματος

κ.τ.λ.) αυτές οι τεχνικές είναι ανεπαρκείς λόγω της υποκειμενικότητας τους, της χαμηλής ευαισθησίας τους και της μικρής συσχέτισης με την εκτίμηση της γονιμοποιητικής τους ικανότητας (Anel *et al.*, 2006).

Εξαιτίας της ανεπάρκειας των κλασσικών μεθόδων εκτίμησης της ποιότητας του σπέρματος αναπτύχθηκαν άλλες μέθοδοι οι οποίες όμως είναι αρκετά πολύπλοκες και χρειάζονται εξειδικευμένα μηχανήματα για να εκτιμηθούν οι προσμετρούμενοι παράγοντες.

Η εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων πλέον γίνεται με αυτοματοποιημένο σύστημα. Οι λόγοι είναι ότι αφενός παρατηρήθηκε μεγάλη διαφοροποίηση στην εκτίμηση ακόμη και της ίδιας εκσπερμάτισης από διαφορετικούς ερευνητές, ενώ η ταχύτητα φαίνεται να έχει καλή συσχέτιση με την γονιμότητα και επομένως έχει μεγάλη σημασία ο ακριβής προσδιορισμός της (Verstegen *et al.*, 2002). Αφετέρου, γιατί έτσι είναι δυνατή η **μελέτη υποπληθυσμών σπέρματος** από την ίδια εκσπερμάτιση (Martinez- Pastor *et al.*, 2005b, c) καθώς θεωρείται ότι η υποκειμενικότητα της εκτίμησης της γονιμότητας υπάρχει ακριβώς λόγω της ελλιπούς μελέτης των υποπληθυσμών (Williams and Ford, 2001).

Ένας άλλος παράγοντας που εξετάζεται προκειμένου να προσδιοριστεί η ποιότητα του σπέρματος είναι η **ακεραιότητα της μεμβράνης** του σπερματοζωαρίου και η κατάσταση του ακροσώματος. Το σπέρμα υπόκειται σε διαδικασίες, όπως η κατάψυξη και η απόψυξη, οι οποίες οδηγούν στον θάνατο πολλών σπερματοζωαρίων. Υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την ύπαρξη πληθυσμών σπερματοζωαρίων που να είναι ζωντανά, να κινούνται με ικανοποιητική ταχύτητα και να έχουν άθικτη την ακροσωμιακή τους μεμβράνη μετά την απόψυξη (Kavak *et al.*, 2003). Για την εξέταση των μεμβρανών και του ακροσώματος χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές φθορισμού σε συνδυασμό με το μικροσκόπιο φθορισμού και το κυττόμετρο ροής (Yaniz *et al.*, 2005; Martinez-Pastor *et al.*, 2005a).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η **καταστροφή των μιτοχονδρίων** κατά την διάρκεια της κατάψυξης σχετίζεται με την μειωμένη γονιμοποιητική ικανότητα των αποψυχθέντων σπερματοζωαρίων που χρησιμοποιούνται κατά την κολπική σπερματέγχυση (Windor, 1997). Κατά συνέπεια, έχει πολύ μεγάλη σημασία ο προσδιορισμός της κατάστασης των μιτοχονδρίων λόγω της συσχέτισης τους με την καλή ενεργειακή κατάσταση του σπερματοζωαρίου και την κινητική του κατάσταση (Kasai *et al.*, 2002). Ο προσδιορισμός της κατάστασης των μιτοχονδρίων γίνεται με φθορισμό των σπερματοζωαρίων και εξέταση αυτών σε μικροσκόπιο φθορισμού και σε κυττόμετρο ροής (Grasa *et al.*, 2004; Martinez-Pastor *et al.*, 2004a).

Η **κατάσταση του πυρήνα** θεωρείται ο ισχυρότερος δείκτης ποιότητας του σπερματοζωαρίου και η αξιολόγησή του πρέπει να ενυπάρχει πάντοτε στο σπερματογράφημα ή σπερμοδιάγραμμα. Η δοκιμασία της δομής της

χρωματίνης του σπέρματος (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA) είναι η τεχνική φθορισμού που χρησιμοποιείται πιο συχνά την τελευταία δεκαετία. Αυτή η τεχνική προσδιορίζει την ακεραιότητα του πυρήνα με βάση την ευαισθησία που παρουσιάζει το DNA στην μετουσίωση του λόγω επέμβασης με οξέα. Αυξημένη ευαισθησία στην μετουσίωση αντιστοιχεί σε μεγάλη ετερογένεια της δομής της χρωματίνης η οποία συνδέεται με διαταραχές κατά την σπερματογένεση ή και με επικείμενες ζημιές στην χρωματίνη, που οδηγούν σε μειωμένη γονιμότητα (Evenson *et al.*, 2002). Έχει αναφερθεί η συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων της SCSA με την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, καθώς και η αύξηση των παραμέτρων της SCSA μετά από κατάψυξη και επώαση για 20 ώρες των σπερματοζωαρίων (Peris *et al.*, 2004). Επίσης, υπάρχει αρνητική συσχέτιση στο σπέρμα του κριού μεταξύ του κατακερματισμού του DNA που υπολογίζεται από την SCSA και την διακύμανση στην ποιότητα του σπέρματος ανάμεσα στα εκσπερματίσματα του ίδιου αρσενικού (Martinez-Pastor *et al.*, 2004b). Αρνητική συσχέτιση υπάρχει επίσης με την προοδευτική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και με την μορφολογική τους ακεραιότητα ενώ υπάρχει θετική συσχέτιση με το ποσοστό των πρωτογενών ελαττωμάτων των σπερματοζωαρίων (Kasimanickam *et al.*, 2006).

Η υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ή η μειωμένη παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων επηρεάζουν την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων και προκαλούν ελαττώματα στα σπερματοζωάρια λόγω μιας οξειδωτικής αλυσιδωτής αντίδρασης που καταστρέφει τα πρωτεϊνικά λιπίδια και το DNA (Sikka, 2004). Η **ποσοτικοποίηση των ενζύμων** που προστατεύουν από την δράση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, τόσο στα σπερματοζωάρια όσο και στο πλάσμα του σπέρματος, και η αξιολόγηση των επιδράσεων τους στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA είναι εξαιρετικά σημαντικό σε περιπτώσεις υπογονιμότητας. Στο σπέρμα του κριού οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλούν άμεση οξείδωση των πρωτεϊνών και επιδρούν στην διαπερατότητα των μεμβρανών μέσω της διαταραχής της ρευστότητας των λιπιδίων (Christova *et al.*, 2004). Γενικώς πάντως η κατάστολή της δράσης των οξειδωτικών φαινομένων με χρήση αντιοξειδωτικών στην διαδικασία της *in vitro* γονιμοποίησης δεν βελτιώνει τα ποσοστά γονιμοποίησης (Dimitriadis *et al.*, 2007).

Τέλος, η **ανάλυση της *in vitro* γονιμότητας** σε ομόλογα ωοκύτταρα είναι η τεχνική που δίνει τις περισσότερες πληροφορίες για την αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος. Παρόλα αυτά είναι μια πολύπλοκη τεχνική με υψηλό κόστος που απαιτεί την χρήση στατιστικών τεχνικών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ερευνητική χρήση προς το παρόν (O'meara *et al.*, 2005).

4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

4.1. ΤΕΧΝΗΤΗ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ

Τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.) (Artificial Insemination, A.I.) είναι η λήψη σπέρματος από το αρσενικό ζώο με τεχνητά μέσα και η εναπόθεσή του αυτούσιου ή μετά από οποιαδήποτε μορφή επεξεργασίας, στο γενετικό σωλήνα του θηλυκού.

Η ανακάλυψη μεθόδων αραίωσης και διατήρησης σπέρματος με κυριότερη βέβαια την κατάψυξη, έδωσαν τεράστια ώθηση στην Τ.Σ. γιατί έτσι ξεπεράστηκαν τα εμπόδια του χρόνου και του τόπου αλλά και αυξήθηκε σημαντικά ο αριθμός των θηλυκών ζώων που μπορεί να γονιμοποιηθεί από μία μόνο εκσπερμάτιση ενός αρσενικού.

Τα πλεονεκτήματα της Τ.Σ. έναντι της φυσικής οχείας είναι πολλά. Από κτηνιατρικής απόψεως τα κυριότερα από αυτά είναι:

α) Η εξέταση της γονιμότητας των ζώων πριν την τεχνητή σπερματέγχυση. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η διαπίστωση εκ των προτέρων των ατόμων που δεν έχουν καλή γονιμότητα και είτε θεραπεύονται είτε απομακρύνονται από το κοπάδι με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη οικονομία.

β) Η προφύλαξη των ατόμων που συμμετέχουν στη τεχνητή σπερματέγχυση από σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα καθώς τα άτομα δεν έρχονται σε άμεση επαφή μεταξύ τους και το σπέρμα που χρησιμοποιείται είναι επιλεγμένο ώστε να είναι απαλλαγμένο από νοσήματα.

γ) Η αποφυγή πιθανών τραυματισμών - κακώσεων που είναι δυνατό να συμβούν κατά τη φυσική οχεία.

δ) Η λήψη σπέρματος και από άτομα που φυσιολογικά δεν θα μπορούσαν να δώσουν σπέρμα είτε λόγω κακώσεων στην περιγεννητική περιοχή είτε στα πόδια με αποτέλεσμα για αυτά τα άτομα να είναι τραυματική η φυσική οχεία κάτι που δεν ισχύει στην τεχνητή σπερματοληψία με ηλεκτρική διέγερση.

ε) Η αύξηση του ποσοστού γονιμότητας λόγω της εναποθέσεως του σπέρματος σε πιο κατάλληλη για γονιμοποίηση περιοχή (λαπαροσκοπικά στο κέρασ της μήτρας στο πρόβατο).

ζ) Η συνέχιση της αναπαραγωγής σε περιόδους που τα ζώα πάσχουν από κάποια σεξουαλικά μεταδιδόμενη ασθένεια εφόσον κατά την τεχνητή σπερματέγχυση δεν υπάρχει άμεση επαφή των ατόμων μεταξύ τους.

η) Η χρήση σπέρματος από άτομα που βρίσκονται σε οποιαδήποτε περιοχή ανά τον κόσμο ή ακόμη και από άτομα που δεν βρίσκονται πλέον εν ζωή μέσω της κατάψυξης και της διατήρησης του σπέρματος.

Από ζωοτεχνικής απόψεως τα κυριότερα πλεονεκτήματα είναι τα εξής:

α) Η διατήρηση λιγότερων αρσενικών για αναπαραγωγή και συγκεκριμένα μόνο των καλύτερων από αυτά, με αποτέλεσμα την σημαντική οικονομία σε έξοδα συντηρήσεως και στεγάσεως των ζώων.

β) Η εξακρίβωση της κληρονομικής σύστασης των αρσενικών σε πολύ πιο πρώιμο στάδιο με αποτέλεσμα την αποτελεσματική χρησιμοποίηση γενετικού υλικού υψηλής γενετικής αξίας υπό την προϋπόθεση ότι τα αρσενικά δεν είναι φορείς κληρονομικών ελαττωμάτων (Βλάχος, 1959).

Επιπρόσθετα με την τεχνητή σπερματέγχυση μπορεί να γίνει κατευθυνόμενη χρησιμοποίηση των γενετικώς βελτιωμένων ζώων, γίνεται δυνατή η εξακρίβωση των γενεαλογικών στοιχείων των απογόνων, είναι πλέον δυνατή η επιλογή του φύλου του απογόνου και άλλα. Πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνητής σπερματέγχυσης είναι ότι προσφέρει σημαντικότερη βοήθεια στην γενετική βελτίωση των ζώων δημιουργώντας το γενετικό υλικό για την εκτίμηση των γενετικών παραμέτρων του πληθυσμού, εφαρμόζοντας απογονικό έλεγχο στα αρσενικά για φυλοπεριορισμένες ιδιότητες, μεταβιβάζοντας την επιλεκτική πρόοδο στο παραγωγικό μέρος του πληθυσμού και βοηθώντας αποτελεσματικά στην εφαρμογή των διασταυρώσεων (Ρογδάκης, 2004).

Η τεχνητή σπερματέγχυση εφαρμόζεται ευρύτατα στα βοοειδή. Το 1998 χρησιμοποιήθηκαν παγκοσμίως 232 εκατομμύρια δόσεις κατεψυγμένου σπέρματος και 11 εκατομμύρια δόσεις νωπού σπέρματος για Τ.Σ. βοοειδών. Αντίθετα στα πρόβατα η Τ.Σ. δεν εφαρμόζεται εντατικά. Το 1998 χρησιμοποιήθηκαν 6,6 εκατομμύρια δόσεις νωπού και 435 χιλιάδες δόσεις κατεψυγμένου σπέρματος για τεχνητή σπερματέγχυση προβάτων (Thibier and Wagner, 2000) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Τεχνητή σπερματέγχυση σε προβατίνα (peakhillindustries.com.au)

Η τεχνητή σπερματέγχυση στα πρόβατα δεν είναι τόσο διαδεδομένη όσο στα υπόλοιπα παραγωγικά ζώα. Το βασικότερο εμπόδιο στην ευρεία εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης στα πρόβατα είναι η σεξουαλική συμπεριφορά της προβατίνας, που ουσιαστικά δεν έχει εμφανείς εκδηλώσεις οίστρου. Ως εκ τούτου απαιτούνται αρχικά συγχρονισμοί οίστρου / ωοθυλακιορρηξίας και έπειτα ομαδικές Τ.Σ. έτσι ώστε να υπάρχει ένα σταθερά υψηλό ποσοστό γονιμοποίησης των προβατινών.

Ενώ για τον συγχρονισμό του οίστρου και της ωοθυλακιορρηξίας υπάρχουν πολύ διαδεδομένα πρωτόκολλα εύκολα στη χρήση (η χρησιμοποίηση προγεσταγονούχων σπόγγων, η έγχυση PMSG και η χρήση $PGF_{2\alpha}$). Η τεχνητή σπερματέγχυση στα πρόβατα έχει κάποιες τεχνικές ιδιαιτερότητες. Συγκεκριμένα υπάρχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα όσον αφορά στα ποσοστά εγκυμοσύνης στην εφαρμογή και χρήση της τεχνικής με κολπική ή ενδοτραχηλική σπερματέγχυση, ιδιαίτερα με κατεψυγμένο σπέρμα. Η τεχνική δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται φρέσκο ή σπέρμα διατηρημένο στους 15°C , που έχει όμως το μειονέκτημα ότι δεν διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα και απαιτεί μεγάλο ποσό σπερματοζωαρίων ανά δόση μειώνοντας έτσι την αποδοτικότητα του κάθε εκσπερτίσματος. Οι καθετήρες που χρησιμοποιούνται είναι κεκαμμένοι επειδή η φοινικοειδής προεξοχή στην προβατίνα βρίσκεται επί του εδάφους του κόλπου (Μενεγάτος., 1990). Ομοιάζουν δε, με αυτούς που χρησιμοποιούνται στα βοοειδή αλλά είναι μικρότεροι σε μέγεθος και δεν επιτρέπουν την είσοδο σε μεγάλο βάθος (Anel *et al.*, 2006).

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την επιτυχία της κολπικής τεχνητής σπερματέγχυσης (Anel *et al.*, 2005). Οι πλέον σημαντικοί είναι: η μορφή του χρησιμοποιούμενου σπέρματος (νωπό ή κατεψυγμένο), ο τύπος του οίστρου (φυσικός ή προκαλούμενος) και το βάθος του σημείου σπερματέγχυσης

(Erpleton *et al.*, 1994). Η μειωμένη γονιμότητα στην κολπική σπερματέγχυση που εμφανίζεται όταν χρησιμοποιείται κατεψυγμένο σπέρμα οφείλεται στην επιζήμια δράση της κρυοδιατήρησης στα σπερματοζωάρια, που μειώνει την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων και αυξάνει την θνησιμότητα των εμβρύων (Salamon and Maxwell, 1995). Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί αυξημένα ποσοστά γονιμοποίησης έπειτα από γονιμοποίηση προβατινών με φυσικό οίστρο και χρησιμοποίηση κατεψυγμένου σπέρματος (Olesen, 1993: 58%; Paulenz *et al.*, 2004: 72%). Έρευνες έδειξαν ότι αυξάνοντας το βάθος του σημείου σπερματέγχυσης, όχι πέραν του πρόσθιου τμήματος του κόλπου, βελτιώνονται τα αποτελέσματα της (Windsor *et al.*, 1994).

Η ενδοτραχηλική σπερματέγχυση αυξάνει κάπως τα ποσοστά επιτυχίας σε σχέση με την κολπική σπερματέγχυση (Kerton *et al.*, 1984: 53% vs 31%; Alvarez *et al.*, 1998: 45% vs 22%), που όμως εξακολουθούν να είναι αρκετά χαμηλά. Όμως όσον αφορά τα υπόλοιπα στοιχεία της τεχνικής είναι παρόμοια με αυτά της κολπικής σπερματέγχυσης.

Σημαντικά αυξημένα ποσοστά επιτυγχάνονται με την ενδομήτρια σπερματέγχυση, αλλά λόγω της ανατομίας του γεννητικού συστήματος της προβατίνας γίνεται μόνο λαπαροσκοπικά, κάτι που εμποδίζει ακόμα την ευρύτερη εφαρμογή της στην πράξη (Anel *et al.*, 2005) (Εικόνα 11). Η δυσκολία εφαρμογής αναίμακτης μεθόδου έγκειται στην ιδιαίτερη ανατομική δομή του τραχήλου της μήτρας της προβατίνας η οποία δεν επιτρέπει την διόδο του ευθύ καθετήρα που χρησιμοποιείται ευρέως. Ο τράχηλος της προβατίνας αποτελείται από μια ιδιαίτερα σύνθετη ινώδη δομή, με πολλές πτυχώσεις που σχηματίζουν μια ελικοειδή μορφή (Kershaw *et al.*, 2005). Οι τραχηλικές πτυχώσεις, από 3 έως 7, έχουν κωνικό σχήμα (Kaabi, 2002) και δημιουργούν μια στενή διόδο διαμέτρου 1-3mm (Alvarez, 2000) η οποία δεν είναι εύκολο να διαπεραστεί από τον καθετήρα χωρίς να τραυματιστεί η περιοχή. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται στο ποσοστό γονιμοποίησης διαφορετικών φυλών (Donovan *et al.*, 2004), έπειτα από τεχνητή σπερματέγχυση με παρόμοιες συνθήκες, σχετίζεται στενά με την πολυπλοκότητα των πτυχώσεων του τράχηλου των προβατινών (Kaabi *et al.*, 2006).



Εικόνα 11. Λαπαροσκοπική τεχνητή σπερματέγχυση (Αμοιρίδης).

Τα αποτελέσματα της τεχνητής σπερματέγχυσης μπορούν να επηρεαστούν από ποικίλους παράγοντες (ενδογενείς και εξωγενείς). Αυτοί οι παράγοντες σχετίζονται είτε με τα χαρακτηριστικά του θηλυκού, το οποίο επηρεάζεται από την εποχικότητα (οιστρική και άνοιστη περίοδος), την γενικότερη μορφολογία του (αναφέρθηκαν οι ιδιαιτερότητες της μορφολογίας του τραχήλου), και του τρόπου χειρισμού του (stress, ομαδικότητα) και άλλα. Είτε με τα γεννητικά χαρακτηριστικά του αρσενικού, το οποίο επηρεάζεται επίσης από την εποχή (ανάλογα με την εποχή και την χρήση του αρσενικού διαφέρει η παραγωγή σπέρματος σε ποιότητα και ποσότητα), από την ποιότητα του σπέρματος (ατομικότητα του ζώου), από τις συνθήκες διατήρησης του σπέρματος (συνθήκες περιβάλλοντος ή κατάψυξη του σπέρματος) και άλλα. Είτε με τις συνθήκες στην μονάδα, όπως οι συνθήκες υγιεινής, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, το επίπεδο διατροφής και άλλα. Πολύ σημαντικά για την τεχνητή σπερματέγχυση είναι και όσα κομμάτια άπτονται άμεσα της τεχνικής όπως ο τρόπος εφαρμογής της (ενδομήτρια ή ενδοτραχηλική), τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται (μορφή και μέγεθος του καθετήρα) ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανά δόση, ο χρόνος της εφαρμογής και άλλα (Shackell *et al.*, 1990; Donovan *et al.*, 2004; Paulenz *et al.*, 2004).

Γενικά συνιστάται οι προβατίνες που χρησιμοποιούνται για τεχνητή σπερματέγχυση να μην είναι άνω των 5 ετών, το διάστημα μεταξύ τοκετού και τεχνητής σπερματέγχυσης να μην είναι μικρότερο των 10 εβδομάδων και η γονιμοποίηση να μην γίνεται όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες (Ιούλιο -

Αύγουστο). Επιπλέον καλό είναι να προηγείται συγχρονισμός ωοθυλακιορρηξιών πριν τη τεχνητή σπερματέγχυση (Anel *et al.*, 2006).

Παρά το γεγονός ότι η τεχνητή σπερματέγχυση είναι η πιο παλιά τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, λόγω του πολυπαραγοντικού της χαρακτήρα, υπάρχει ένα ευρύ ερευνητικό πεδίο για την περαιτέρω ανάπτυξη της με σκοπό την βελτίωση των παραγόντων που την επηρεάζουν.

4.2. IN VIVO ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η *in vivo* παραγωγή εμβρύων, στη σύγχρονη εποχή, είναι απαραίτητη στα πλαίσια της προσπάθειας για αθρόα παραγωγή ζώων υψηλότερης γενετικής αξίας. Με τον όρο ζώα υψηλότερης γενετικής αξίας εννοούμε όχι μόνο τα ζώα που παράγουν περισσότερο και αναπαράγονται περισσότερο, αλλά και ζώα τα οποία είναι απαλλαγμένα από διάφορα γενετικά νοσήματα, ζώα που είναι ανθεκτικά σε παρασιτώσεις και νοσήματα και ζώα που ανήκουν σε σπάνιες φυλές και επιβάλλεται η διατήρηση του γενετικού υλικού τους με σκοπό την διάσωση της φυλής, του είδους και της γενετικής ποικιλομορφίας, καθώς και ζώα των οποίων το γενετικό υλικό μας βοηθάει να κατανοήσουμε την εξέλιξη των ειδών στο πέρασμα των αιώνων.

4.2.1. Πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (ΠΠΩ)

Μικρής κλίμακας μελέτες στην εμβρυομεταφορά στα πρόβατα αναφέρθηκαν πριν από 50 χρόνια (Averill *et al.*, 1958a, b), οπότε και εφαρμόστηκαν οι βασικές τεχνικές για τη χειρουργική ανάκτηση των εμβρύων (Moore, 1982). Πειράματα στην Αυστραλία είχαν οδηγήσει στον τεχνητό έλεγχο του οίστρου (Robinson, 1964) και έπειτα ακολούθησαν άλλα για την απομόνωση και τον καθαρισμό των γοναδοτροπινών, που αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη κατάλληλων πρωτοκόλλων για την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα πρόβατα δεν βρίσκονται διαρκώς σε οιστρική περίοδο, είναι υποχρεωτική η χορήγηση προγεστερόνης, πριν την έναρξη της θεραπείας με γοναδοτροπίνες για την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, η οποία είναι απαραίτητη πριν την ωοθυλακιορρηξία. Χορήγηση προγεστερόνης μπορεί να γίνει είτε με την χρήση προγεσταγονούχων σπόγγων ή εμφυτευμάτων, είτε με την ενδομυϊκή έγχυση προγεστερόνης (Cognie, 1999).

4.2.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ΠΠΩ

Από την ανάλυση της τεράστιας βιβλιογραφίας σχετικά με εργασίες σε πρόβατα που έχουν υποστεί πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία είναι προφανές ότι δεν έχει ποτέ επιτευχθεί ακριβής έλεγχος της ωοθυλακιορρηξίας. Η απόδοση σε έμβρυα μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής

1) Παράγοντες που μεταβάλλονται εύκολα και είναι δύσκολο να τυποποιηθούν όπως εγγενείς παράγοντες (φυλή, ηλικία, άτομο) (Sonjaya and Driancourt, 1987; Ptak *et al.*, 1999, 2003). Είναι εύκολο να καταλάβουμε ότι μικρή βελτίωση μπορεί να αναμένεται από παράγοντες όπως η φυλή και, κατά συνέπεια, η διαχείριση του κοπαδιού (Carrai *et al.*, 1984). Σε προβατίνες γαλακτοπαραγωγής φυλής Sarda στη Σαρδηνία επιβάλλεται μια διαφορετική διαχείριση από αυτή που απαιτείται για προβατίνες Merino στη Νέα Ζηλανδία ή Scottish Blackface στη Σκωτία. Εξάλλου, η ανταπόκριση των ωοθηκών στην φυλή Sarda στο ίδιο εμπορικό σκεύασμα γοναδοτροπίνης θα είναι πάντα διαφορετική από ότι εκείνη στην φυλή Merino (Maxwell *et al.*, 1990; Naitana *et al.*, 1992). Ωστόσο, σημαντικές προσπάθειες έχουν καταβληθεί κατά το παρελθόν για να βρεθούν κατάλληλα πρωτόκολλα πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας που να ταιριάζουν σε ένα μεγάλο αριθμό εγχώριων φυλών κάτω από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών (Gordon, 1997).

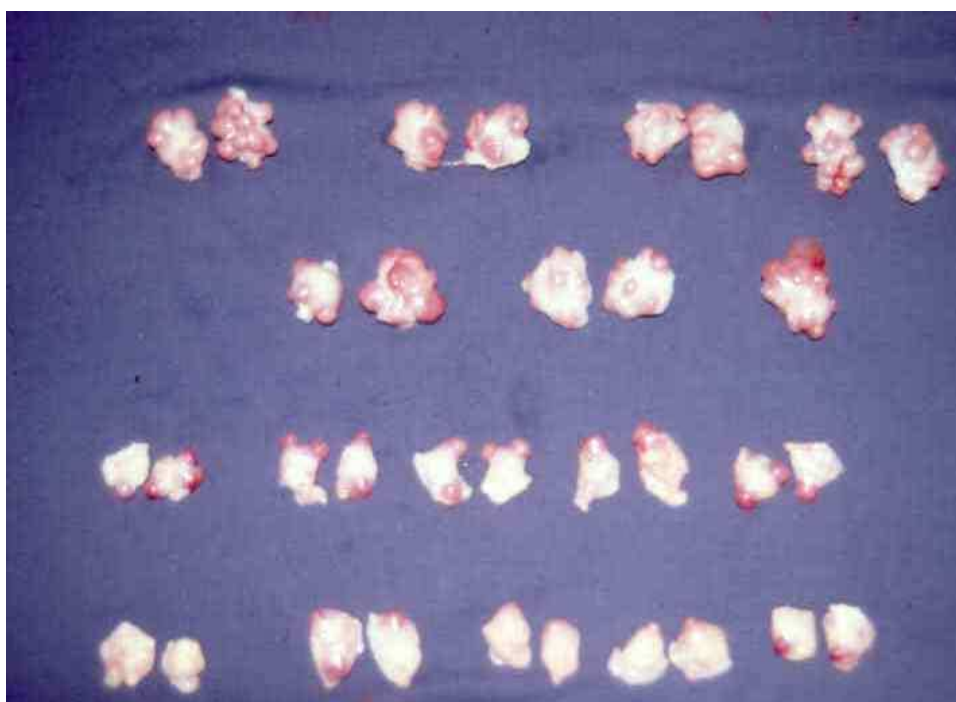
Όπως έχει αποδειχθεί σε αμνάδες (Sonjaya and Driancourt, 1987; Meikle *et al.*, 1998), και προβατίνες (Driancourt, 1987; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000, 2002, 2003), η ανταπόκριση των ωοθηκών στην ορμονική αγωγή έχει συσχετισθεί με τον πληθυσμό και την διάμετρο των ωοθυλακίων των ωοθηκών όπως επίσης και με το στάδιο του οιστρικού κύκλου (Rubianes *et al.*, 1997; Rubianes and Menchaca, 2003).

Επιπρόσθετα, η εποχή γέννησης των αμνάδων φαίνεται ότι επιδρά στο συνολικό αριθμό των αναπτυσσόμενων και των τριτογενών ωοθυλακίων. Σε αμνάδες φυλής Massese που γεννήθηκαν την άνοιξη παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός πρωτογενών και μικρότερος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων σε σχέση με εκείνα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο. Επίσης, η ποιοτική ανάλυση των ωαρίων και των ωοθυλακίων έδειξε ότι στα ζώα που γεννιούνται το φθινόπωρο το μέγεθος των ωοθυλακίων και των ωαρίων όπως και ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων των πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων είναι σημαντικά μικρότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αυτών που γεννιούνται την άνοιξη (Rondina *et al.*, 2005). Εξάλλου, η επίδραση της εποχής της γέννησης στον πληθυσμό των τριτογενών ωοθυλακίων επιβεβαιώθηκε σε πρόσφατη έρευνα που έγινε σε αμνάδες φυλής Suffolk (Bartlewski *et al.*, 2006)

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζει την ανταπόκριση των ωοθηκών είναι η διατροφή (O'Callaghan *et al.*, 2000), της οποίας όμως δεν μπορούμε να αναμένουμε την εν τω βάθει μεταβολή της (McEvoy *et al.*, 1995) και η εποχή του έτους (άνοιστη-οιστρική περίοδος) (Bister *et al.*, 1999).

2) Παράγοντες που έχουν υψηλά περιθώρια για βελτίωση (χρήση γοναδοτροπίνης, γνώση της φυσιολογίας της αναπαραγωγής). Μεγάλη σημασία έχει η δόση της χορηγούμενης ορμόνης (Samartzi *et al.*, 1995a), καθώς και η καθαρότητα του ορμονικού σκευάσματος ιδιαίτερα σε σχέση με την περιεκτικότητα σε LH (Cognie, 1999). Συνήθως για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στα πρόβατα χρησιμοποιούνται η γοναδοτροπίνη του ορού της εγκύου φορβάδος (eCG, equine Chorionic Gonadotropin) (Averill, 1958), η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) που απομονώνεται από υποφύσεις χοίρων και προβάτων και σπανιότερα οι ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες (hMG, human Menopausal Gonadotropins) (Schieve, 1990).

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε ακραία αποτελέσματα που κυμαίνονται από παντελή απουσία ανάπτυξης ωοθυλακίων (Samartzi *et al.*, 1995b; Amiridis *et al.*, 2002), μέχρι και υπερβολική ανάπτυξη αυτών, γεγονός το οποίο τελικά μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των ωαρίων που συλλέγονται (Moor *et al.*, 1985; Foote and Ellington, 1988) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Ωοθήκες μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (Αμοιρίδης)

4.2.1.1. Ορμόνες που χρησιμοποιούνται στην ΠΠΩ

Για την επίτευξη της πολλαπλής πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας χρησιμοποιούνται διάφορες ορμόνες με κυριότερες από αυτές τις γοναδοτροπίνες.

Οι γοναδοτροπίνες είναι ουσίες που παράγονται από την υπόφυση του εγκεφάλου μετά την 60^η με 80^η μέρα της κύησης (Kennedy *et al.*, 1974) και οι οποίες είναι υπεύθυνες, σε συνδυασμό με τοπικούς παράγοντες, για την ανάπτυξη και την ωρίμαση των ωοθυλακίων (Σμοκοβίτης, 2004). Οι βιολογικές ιδιότητες των γοναδοτροπινών που χρησιμοποιούνται για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας έχουν περιγραφεί λεπτομερώς από τους Bindon *et al.* (1986). Η εξωγενώς χορηγούμενη γοναδοτροπίνη αλληλεπιδρά με τα κοκκώδη κύτταρα και με τα κύτταρα θήκης των ωοθυλακίων που αναπτύσσονται, μεγέθους μεγαλύτερου των 2mm (van den Hurk and Zhao, 2005), και κυρίως με αυτά του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο αξιοποιεί τις χαμηλές συγκεντρώσεις της FSH κατά την κατά κύματα έκκριση της, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης υποδοχέων FSH και του αυξημένου αριθμού κοκκωδών κυττάρων (Hillier, 1994). Τα κυρίαρχα ωοθυλάκια (μπορεί να είναι περισσότερα του ενός), αναπτύσσονται, παράγουν και διοχετεύουν στη συστηματική κυκλοφορία οιστραδιόλη και ανασταλίνη, οι οποίες μειώνουν περαιτέρω τη συγκέντρωση της FSH σε βαθμό που η αξιοποίηση της από τα υποτελή να είναι αδύνατη (Clarke *et al.*, 1986; Mann *et al.*, 1992).

Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η δράση της FSH μπορεί να είναι διαφορετικά διαμορφωμένη σε επίπεδο ωοθυλακίων, που συνεπάγεται διαφοροποιημένη απάντηση σε σχέση με την αναμενόμενη. Άλλωστε, η χορήγηση FSH, μπορεί να προκαλέσει συγκεκριμένες παρενέργειες (όπως αδυναμία επανέναρξης της μείωσης ή ολοκλήρωσης της ωρίμασης καταλήγοντας σε ωάρια που δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν) πριν από την ωοθυλακιορρηξία, ως συνέπεια της ανεπαρκούς ωρίμασης του ωαρίου (Moor *et al.*, 1985) ή αργότερα, κατά την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, ως αποτέλεσμα διαταραγμένου ορμονικού προφίλ (διαταραχή της μειωτικής διαίρεσης των ωαρίων τα οποία παρότι γονιμοποιούνται, παρουσιάζουν χρωματοσωμικές ανωμαλίες οι οποίες διαταράσσουν τη βιωσιμότητα του εμβρύου) (Armstrong and Evans, 1983; Jabbour *et al.*, 1991; Armstrong, 2001).

Τα βασικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται είναι η χορήγηση FSH και η χορήγηση της ορμόνης eCG η οποία όμως έχει δράση FSH και LH σε κάποιο βαθμό (Schieve, 1990). Ποικίλες στρατηγικές έχουν προταθεί για να βελτιστοποιηθεί η απόδοση σε μεταφέροσιμα έμβρυα από πρόβατα στα οποία έχει προκληθεί πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία όπως η χορήγηση του αντι-eCG

αντισώματος έτσι ώστε να μην αναπτύσσονται αντισώματα έναντι της ετερόλογης ορμόνης eCG (Bindon and Piper, 1977), η χορήγηση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) αντί της eCG έτσι ώστε να γίνεται χρήση ομόλογων ορμονών (Moog *et al.*, 1984) και γιατί η FSH υπερτερεί της eCG στην παραγωγή βίωσιμων εμβρύων (Cognie, 1999), η χορήγηση μείγματος των δύο αυτών γοναδοτροπινών (Ryan, 1991) με ή χωρίς χορήγηση οιστραδιόλης (Kelly *et al.*, 2005), η χορήγηση μίας μονής δόσης έναντι πολλαπλών εγχύσεων (Meinecke-Tillman *et al.*, 1993; Dattena *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 2005) και η χρησιμοποίηση της GnRH ή της αυξητικής ορμόνης σε αγωγές πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (Walker *et al.*, 1986; Eckery *et al.*, 1994). Η αυξητική ορμόνη σε πρόβατα δείχνει να αυξάνει τον αριθμό των ωοθυλακίων μεγέθους 2-3mm (Gong *et al.*, 1996), χωρίς όμως να υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά στο ποσοστό ωοθυλακιορρηξίας (Eckery *et al.*, 1994). Αξιοσημείωτο είναι ότι η ιδανική δόση των γοναδοτροπινών για την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας δεν έχει ακόμη προσδιορισθεί και ως εκ τούτου διερευνώνται διάφορα ορμονικά πρωτόκολλα.

Η συστηματική μελέτη της ενδοκρινολογίας της αναπαραγωγής έχει συμβάλει στο σχεδιασμό νέων πρωτοκόλλων πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (ΠΠΩ). Τα ορμονικά πρωτόκολλα ανάπτυξης ωοθυλακίων που εφαρμόζονται σε αμνάδες βασίζονται σε αυτά που χρησιμοποιούνται σε ενήλικα ζώα και διαρκούν συνήθως 2 έως 4 ημέρες. Έτσι έχει υιοθετηθεί η χρήση ενός ανταγωνιστή GnRH σε συνδυασμό με τη χρήση προγεσταγόνων, για την καταστολή των ενδογενών γοναδοτροπινών και την αναστολή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων πέραν των 1-2 χιλιοστών, ακολουθούμενη από χορήγηση εξωγενών γοναδοτροπινών για περισσότερες από 4 ημέρες. Επίσης, μία προ-θεραπεία 2 εβδομάδων με έναν αγωνιστή GnRH, στην διάρκεια των οποίων τα μεγάλα ωοθυλάκια είτε ρήγνυνται είτε γίνονται ατρητικά, (Busereline, 40 μg / ημέρα, ReceptalND-Intervet) (McNeilly and Fraser, 1987) ή 10 ημερών με έναν ανταγωνιστή GnRH, ο οποίος μειώνει την έκκριση της LH και αναστέλλει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, (Antarelix, 0,5 mg / ημέρα, TeverelixND-Europeptides) (Brebion *et al.*, 1992) καταστέλλει τα μεγάλα ωοθυλάκια, διπλασιάζει τον αριθμό των μικρών ωοθυλακίων, και βελτιώνει το ποσοστό της ευαισθησίας στην FSH κατά 50% (Cognie, 1999).

Η συνήθης χρήση του σχήματος των πολλαπλών δόσεων με ανταγωνιστή GnRH σε προγράμματα εμβρυομεταφοράς σε πρόβατα της φυλής Lacaune στη Γαλλία είχε ως αποτέλεσμα περισσότερα από 10 έμβρυα μεταβιβάσιμα και επτά αρνιά γεννημένα ανά χειρισμό ανά δωρητή (Cognie, 1999). Η θεραπεία με ανταγωνιστή GnRH έχει ξεπεράσει το πρόβλημα της μη ανταπόκρισης των θηλυκών (<5 ωοθυλακιορρηξίες). Ωστόσο, η διακύμανση των ποσοστών της ωοθυλακιορρηξίας εξακολουθεί να παραμένει σε υψηλά επίπεδα. Εφόσον τα αποτελέσματα για τον ίδιο δότη είναι συγκρίσιμα, με βάση το πρωτόκολλο αυτό (Pearson test: $r = 0,75$), η διακύμανση της ανταπόκρισης των δοτριών θα

μπορούσε να αντανακλά τις διαφορές σε γενετικό επίπεδο στην ανταπόκριση στη θεραπεία για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (Cognie *et al.*, 2000). Όταν η χορήγηση της FSH δεν συνδυάζεται με χορήγηση ανταγωνιστή GnRH προ της θεραπείας, το ποσοστό επαναληψιμότητας του ποσοστού της ωοθυλακιορρηξίας μεταξύ δύο διαδοχικών θεραπειών είναι μικρότερο: $r = 0,55$ (Bari *et al.*, 2001). Αυτό μπορεί να είναι συνέπεια του γεγονότος ότι χωρίς χρήση ανταγωνιστή GnRH έχουμε μια πολύ μεγάλη διακύμανση στο μέγεθος των ωοθυλακίων κατά την εκκίνηση της θεραπείας με FSH, με αποτέλεσμα να μην αξιοποιούν με τον ίδιο τρόπο την ποσότητα της FSH όλα τα ωοθυλάκια και έτσι να μην εξελίσσονται συγχρονισμένα.

Χρόνια θεραπεία με GnRH αγωνιστές αναστέλλει την εξαρτώμενη από την γοναδοτροπίνη ανάπτυξη των ωοθυλακίων μέσω της μείωσης της έκκρισης της LH από την υπόφυση (Campbell *et al.*, 1995). Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η θεραπεία με GnRH αγωνιστές, η οποία ακολουθείται από τη χορήγηση εξωγενούς γοναδοτροπίνης, μπορεί θεωρητικά να παραγάγει ένα ενιαίο στρώμα ωοθυλακίων που διατίθενται για ωοθυλακιορρηξία. Η θεωρία αυτή δεν έχει ακόμη αποδειχθεί στα πρόβατα, αλλά ελήφθησαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ένα μικρής κλίμακας πείραμα, όπου ο αριθμός των εμβρύων που ήταν μεταβιβάσιμα αυξήθηκε σε προβατίνες έπειτα από θεραπεία με GnRH αγωνιστές (Briois *et al.*, 1992).

Η μειωμένη ανάπτυξη των ωοθυλακίων έπειτα από μακροχρόνια θεραπεία με GnRH αγωνιστές ή ανταγωνιστές πριν από τη χορήγηση γοναδοτροπίνης υψηλής καθαρότητας φαίνεται να είναι ένας πολύ υποσχόμενος τομέας έρευνας για τη βελτίωση σε πρωτόκολλα πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας.

Υπό την επίδραση χορήγησης FSH δημιουργείται μια ενιαία σε μέγεθος ομάδα ωοθυλακίων και εμφανίζεται οίστρος 20 με 24 ώρες μετά την απομάκρυνση του προγεσταγονούχου σπόγγου. 32-36 ώρες μετά την απομάκρυνση του προγεσταγονούχου σπόγγου χορηγείται LH ή hCG iv (3 mg rLH), που επιτρέπει το συγχρονισμό της ωοθυλακιορρηξίας 20-28 ώρες αργότερα και αυξάνει τον αριθμό των ρηχθέντων ωοθυλακίων και τον αριθμό των μεταφέσιμων εμβρύων (Cognie *et al.*, 1986; D'Alesandro *et al.*, 1997). Αυτό ακολουθείται από μία γονιμοποίηση 48-50 h μετά το τέλος της θεραπείας με τα προγεσταγόνα.

Ωστόσο, οι αδυναμίες της πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, όπως τα ωοθυλάκια που δεν ρήγνυνται, η μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης και οι χαμηλοί συντελεστές ανάκτησης των εμβρύων (Naitana *et al.*, 1992) παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άλυτες. Αναμφίβολα, η ισορροπία μεταξύ ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) ή η καθαρότητα των γοναδοτροπινών παίζει σημαντικό ρόλο (Churpin *et al.*, 1984). Η FSH σε σχέση με την LH παίζει σημαντικότερο ρόλο στην προεπιλογή των ωοθυλακίων (προεπιλογή των ωοθυλακίων των 2mm για το ποια από αυτά θα

συνεχίσουν να αναπτύσσονται), ενώ η LH είναι απαραίτητη για την ωρίμαση των ωοθυλακίων μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο (Webb *et al.*, 1999).

Η διαθεσιμότητα της ανασυνδυασμένης FSH (Looney *et al.*, 1988), θα καταφέρει να μειώσει τις παρενέργειες που συνδέονται με την καθαρότητα των εμπορικών σκευασμάτων. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να αναμένονται ιδιαίτερες βελτιώσεις ακόμη και μετά από την παραγωγή και χρησιμοποίηση εξαιρετικά καθαρών σκευασμάτων ορμονών μέχρι ότου να είναι διαθέσιμα κατάλληλα συστήματα για τον έλεγχο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων.

Στην πραγματικότητα, λιγότερα ωάρια από ωοθήκες που προήλθαν από σφαγεία γονιμοποιήθηκαν επιτυχώς μετά από IVM / IVF σε σχέση με ωάρια που προήλθαν από προβατίνες που έλαβαν χαμηλές δόσεις FSH πριν από τη σφαγή (Cheng, 1985). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και σε προβατίνες της ιταλικής γαλακτοπαραγωγικής φυλής Sarda: ωάρια που συλλέχθηκαν κατά τη σφαγή σε μη αναπαραγωγική περίοδο και υποβλήθηκαν σε *in vitro* τεχνικές είχαν πολύ χαμηλή ικανότητα ανάπτυξης. Η κατάσταση αυτή αντιστράφηκε μετά από την χορήγηση χαμηλών δόσεων FSH. Το θετικό αποτέλεσμα της πρώιμης χορήγησης FSH, μπορεί να ασκείται με απευθείας διέγερση των ωοκυττάρων και των κυττάρων της θήκης, έμμεσα μέσω της τόνωσης της ανάπτυξης των ωοθυλακίων ή με συνδυασμό και των δύο μεθόδων (Cognie *et al.*, 1998).

Έχει υποστηριχθεί ότι οι εξωγενείς γοναδοτροπίνες εκτός από την αύξηση του μεγέθους των ωοθυλακίων, βελτιώνουν και την ικανότητα ανάπτυξης των συλλεγόμενων ωαρίων (Pugh *et al.*, 1991; Armstrong, 2001) προάγοντας την κυτταροπλασματική τους ωρίμαση και καθιστώντας δυνατό τον έλεγχο του χρόνου ωρίμασης του πυρήνα τους. Κατ' άλλους η ορμονική διέγερση δεν επηρεάζει την ικανότητα ανάπτυξης των ωοκυττάρων (Revel *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 2005) ή ακόμη μπορεί να την επηρεάσει αρνητικά (Moor *et al.*, 1985; Foote and Ellington, 1988).

4.2.3. Συγχρονισμός δοτριών και δεκτριών

Η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας εφαρμόζεται πάντοτε σε περισσότερες της μιας προβατίνες. Εξαιτίας αυτού θα πρέπει οι οιστρικοί κύκλοι των ατόμων που δίδουν τα έμβρυα και των ατόμων που τα λαμβάνουν άμεσα να είναι αυστηρά συγχρονισμένοι καθώς σε περίπτωση ασύγχρονης μεταφοράς δεν μπορεί να εγκατασταθεί το έμβρυο (Walker *et al.*, 1996).

Η φυσιολογική βάση του συγχρονισμού των οίστρων είναι ο έλεγχος και η διατήρηση της ωχρινικής φάσης είτε μέσω της χορήγησης προγεστερόνης είτε μέσω της πρόκλησης ωχρινόλυσης με την πρώιμη παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου και έτσι την απαρχή ενός νέου οιστρικού κύκλου (Wildeus *et al.*,

2000). Ο συγχρονισμός των οίστρων γενικά σε ένα κοπάδι μπορεί να επιτευχθεί είτε με φυσικά μέσα όπως με 'επίδραση του κριού' στις προβατίνες (Schinkel *et al.*, 1954; Yildiz *et al.*, 2003), είτε με ορμονικούς χειρισμούς όπως η χρήση προγεστερόνης, η χρήση προσταγλανδίνης (PGF_{2α}) σε συνδυασμό με την χρήση της εκκριτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) (Boscós *et al.*, 2002). Μάλιστα, ο συνδυασμός της χρήσης PGF_{2α} και GnRH δίνει πολύ καλά ποσοστά γεννημένων αμνών είτε μετά από φυσική είτε μετά από τεχνητή γονιμοποίηση (Schmitt *et al.*, 1996). Παρόλο που με αυτή την τεχνική ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό η ανάπτυξη των ωοθυλακίων και η ωοθυλακιορρηξία στα πρόβατα (Amiridis *et al.*, 2005; Deligiannis *et al.*, 2005) καθώς και σε ένηβες και άνηβες αγελάδες (Taponen *et al.*, 2002) το υψηλό κόστος της περιορίζει την ευρεία εφαρμογή της.

Όταν εφαρμόζουμε πρωτόκολλα πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, συλλογής και μεταφοράς των εμβρύων η πιο κλασική τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η χρήση προγεστερόνης. Η χορήγηση της προγεστερόνης μπορεί να γίνει με χορήγηση φυσικής προγεστερόνης, με την χρήση προγεσταγονούχων σπόγγων, με την χρήση εμφυτευμάτων, με την χορήγηση δια του στόματος οξικής μελεγοιστρόλης (συνθετική προγεστερόνη) και με την χρήση συσκευών ελεγχόμενης απελευθέρωσης προγεστερόνης (controlled internal drug release - CIDR) (Fukui *et al.*, 1999).

Όταν χρησιμοποιείται προγεσταγονούχος σπόγγος η χορήγηση του προγεσταγόνου -προγεστερόνης- γίνεται μέσω της εναπόθεσης ενός σπόγγου εμβαπτισμένου σε φυσική ή συνθετική προγεστερόνη -προγεσταγόνου- (methyl acetoxyprogesterone MAP - flurogestone acetate FGA) στον κόλπο των προβατινών για 10 με 14 ημέρες. Ο τύπος όμως της προγεστερόνης που χρησιμοποιείται επιδρά στην ώρα του επερχόμενου οίστρου και της προωοθυλακιορρηκτικής κορυφής της LH όπως επίσης και στο επίπεδο της προγεστερόνης που περιέχεται στον οργανισμό κατά την διάρκεια του επόμενου οιστρικού κύκλου (Menegatos *et al.*, 2003). Την ημέρα που αφαιρείται ο σπόγγος γίνεται μια ενδομυϊκή έγχυση ίππειας χοριονικής γοναδοτροπίνης (eCG) ή της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Husein *et al.*, 1998) και επέρχεται οίστρος 24 με 48 ώρες μετά την αφαίρεση του σπόγγου (Wildeus *et al.*, 2000). Μάλιστα η χορήγηση της FSH φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική κατά την αρχή της αναπαραγωγικής περιόδου ενώ κατά το μέσο αυτής δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ της χρήσης FSH και eCG ως προς τον αριθμό των γεννημένων αμνών (Boscós *et al.*, 2002).

Οι συσκευές ελεγχόμενης απελευθέρωσης προγεστερόνης περιέχουν ένα ελαστομερές από προγεστερόνη και δημιουργήθηκαν για πρώτη φορά στην Νέα Ζηλανδία. Ο οίστρος επέρχεται 24 ώρες μετά την απομάκρυνση της συσκευής και είναι έτσι πιο εντοπισμένος χρονικά σε σχέση με την χρήση

προγεστερόνης αν και δεν διαφέρουν τα ποσοστά σύλληψης και γεννηθέντων αμνών (Ritar *et al.*, 1990)

Το πρωτόκολλο της χρησιμοποίησης της προσταγλανδίνης βασίζεται στην ικανότητα της $PGF_{2\alpha}$ να προκαλεί παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου. Την ίδια δράση ασκεί και το ανάλογο της $PGF_{2\alpha}$ η κλοπροστενόλη. Επειδή δεν είναι κατάλληλα όλα τα στάδια του οιστρικού κύκλου για δράση της $PGF_{2\alpha}$ καλό είναι να γίνονται δύο εγχύσεις με διάστημα 11 ημερών μεταξύ τους. Τα ποσοστά συγχρονισμού είναι αρκετά καλά αλλά βελτιώνονται ακόμη περισσότερο όταν συνδυάζονται με έγχυση eCG 24 ώρες μετά την δεύτερη δόση της αγωγής (Zamiri and Hosseini, 1998).

4.2.4. Συλλογή εμβρύων

Τα έμβρυα των προβατινών συνηθίζονταν να ανακτώνται χειρουργικά με τη μέθοδο που προτάθηκε αρχικά από τους Hunter *et al.*, 1955. Εν συντομία, η μήτρα και το κέρασ αποκαλύπτονται μετά από λαπαροτομή και τα κέρατα της μήτρας εκπλένονται με καθετήρες τύπου Folley. Το υπόστρωμα έκπλυσης παρασκευάζεται από PBS, γλυκόζη, χλωριούχα και φωσφορικά άλατα και αντιβιοτικές ουσίες. Το pH του διαλύματος είναι 7,2 και μπορεί να συντηρηθεί στους 4°C, έως 30 ημέρες (Βαλάση, 2006). Το υπόστρωμα έκπλυσης χρησιμοποιείται σε κατάλληλη θερμοκρασία, παρόμοια με την θερμοκρασία σώματος των ζώων (37-38°C). Σύμφωνα με τροποποιημένη τεχνική που προτείνεται από τους Tervit *et al.*, 1976 διενεργείται μια πολύ μικρή τομή στη λευκή γραμμή προσθίως της έκφυσης του μαστού για τη μερική έκθεση των κεράτων της μήτρας. Με την εφαρμογή των λαπαροτομικών μεθόδων επιτεύχθηκαν ποσοστά συλλογής μεγαλύτερα του 70% (Tervit *et al.*, 1976; Σαμαρτζή, 1993). Σε πρόβατα της φυλής Χίου έχουν αναφερθεί ποσοστά συλλογής από 30,9% έως και 85,8% ανάλογα με το σχήμα και τη δόση της ορμόνης που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση πολλαπλής ωοθηλακιορρηξίας (Samartzi *et al.*, 1995a,b). Οι λαπαροτομικές μέθοδοι έχουν σχεδόν πάντα ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μετεγχειρητικών συμφύσεων που συνήθως δημιουργούνται στην ωοθήκη, τους ωαγωγούς, τη μήτρα, το μείζον επίπλουν και το κοιλιακό τοίχωμα, και καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη την επαναληπτική συλλογή εμβρύων από το ίδιο ζώο, επηρεάζοντας δυσμενώς τη μελλοντική του γονιμότητα (Tervit *et al.*, 1976).

Λαπαροσκοπικές τεχνικές, που αναπτύχθηκαν αργότερα, για την ανάκτηση του εμβρύου, μείωσαν τις χειρουργικές επιπλοκές (McKelvey *et al.*, 1986). Αν και αυτό επέτρεψε επανειλημμένες συλλογές από τα ίδια ζώα, η μέση απόδοση σε έμβρυα ανά συλλογή είναι συνήθως χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτήν μετά από χειρουργική συλλογή (Scudamore *et al.*, 1991). Η συλλογή των εμβρύων γίνεται την έκτη μέρα μετά τη σπερματέγχυση. Κατά

την λαπαροσκοπική συλλογή ωαρίων οι δότριες ωαρίων παραμένουν χωρίς τροφή και νερό για 24 και 12 ώρες, αντίστοιχα. Πριν την λήψη γίνεται αναισθητοποίηση των δοτριών. Τα ζώα συγκρατούνται σε ύπτια θέση και υπό γωνία περίπου 45°. Στη συνέχεια, γίνονται τρεις τομές (1 cm) του δέρματος σε θέση 7 και 10cm αριστερά της μέσης κοιλιακής γραμμής και 7 cm δεξιά της μέσης γραμμής και σε απόσταση 10 έως 12 cm από την πρόσφυση του μαστού στο κοιλιακό τοίχωμα. Στις αριστερές τομές εισάγονται τα τροκάρ του ενδοσκοπίου και της λαβίδας συγκράτησης. Μετά την εισαγωγή του ενδοσκοπίου και για τη διευκόλυνση των χειρισμών και την αποφυγή τραυματισμών γίνεται έμφυση CO₂ στην κοιλιακή κοιλότητα με συσκευή πνευμοπεριτοναίου, υπό ελεγχόμενη πίεση. Ακολουθεί καταμέτρηση των ωχρών σωματίων και των ωοθυλακίων κάθε ωοθήκης και εισαγωγή του τροκάρ του διόδου καθετήρα έκπλυσης από την τομή της δεξιάς πλευράς. Κατά τη λαπαροσκοπική παρατήρηση των ωοθηκών γίνεται καταγραφή του αριθμού και της διαμέτρου των εμφανών ωοθυλακίων έτσι ώστε τα ωοθυλάκια με διάμετρο >2mm να χαρακτηρίζονται ως μεγάλα ενώ εκείνα με διάμετρο <2mm ως μικρά. Η σταθεροποίηση των κεράτων της μήτρας γίνεται με τοποθέτηση ατραυματικής λαβίδας συγκράτησης σε θέση πλησίον του διχασμού των κεράτων. Αμέσως μετά την εισαγωγή του τροκάρ απομακρύνεται το στέλεχος του και εισάγεται ο καθετήρας έκπλυσης με τρόπο ώστε ο αεροθάλαμος να βρίσκεται τοποθετημένος μεταξύ του μέσου και πρώτου τρίτου του κέρατος. Ανάλογα με τη θέση του αεροθαλάμου, τη διάμετρο του αυλού και τη σύσταση του κέρατος, ο καθετήρας σταθεροποιείται με εμφύσηση αέρα, ώστε να επιτευχθεί πλήρης απόφραξη του αυλού του κέρατος και απελευθερώνεται η λαβίδα συγκράτησης. Εισάγεται ο εύκαμπτος φλεβοκαθετήρας έγχυσης του υποστρώματος έκπλυσης και ακολουθεί η έκπλυση του κέρατος με 60-80 ml υποστρώματος έκπλυσης, το οποίο συλλεγόταν μέσω του διόδου καθετήρα έκπλυσης σε τρυβλία Petri. Η ίδια τεχνική επαναλαμβάνεται για την έκπλυση και του άλλου κέρατος. Μετά την ολοκλήρωση της έκπλυσης το CO₂ απομακρύνεται δια μέσου του τροκάρ του ενδοσκοπίου με άσκηση πίεσης στα κοιλιακά τοιχώματα. Η ανεύρεση και η εκτίμηση της ποιότητας των εμβρύων γίνεται υπό παρατήρηση στα κοιλιακά τοιχώματα. Το υπόστρωμα έκπλυσης περιέχει PBS, γλυκόζη, χλωριούχα και φωσφορικά άλατα και αντιβιοτικά. Το pH του διαλύματος είναι 7,2 και μπορεί να συντηρηθεί στους 4°C, έως 30 ημέρες. (Αμοιρίδης *et al.*, 1998) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Εργαλεία για την συλλογή εμβρύων (Αμοιρίδης)

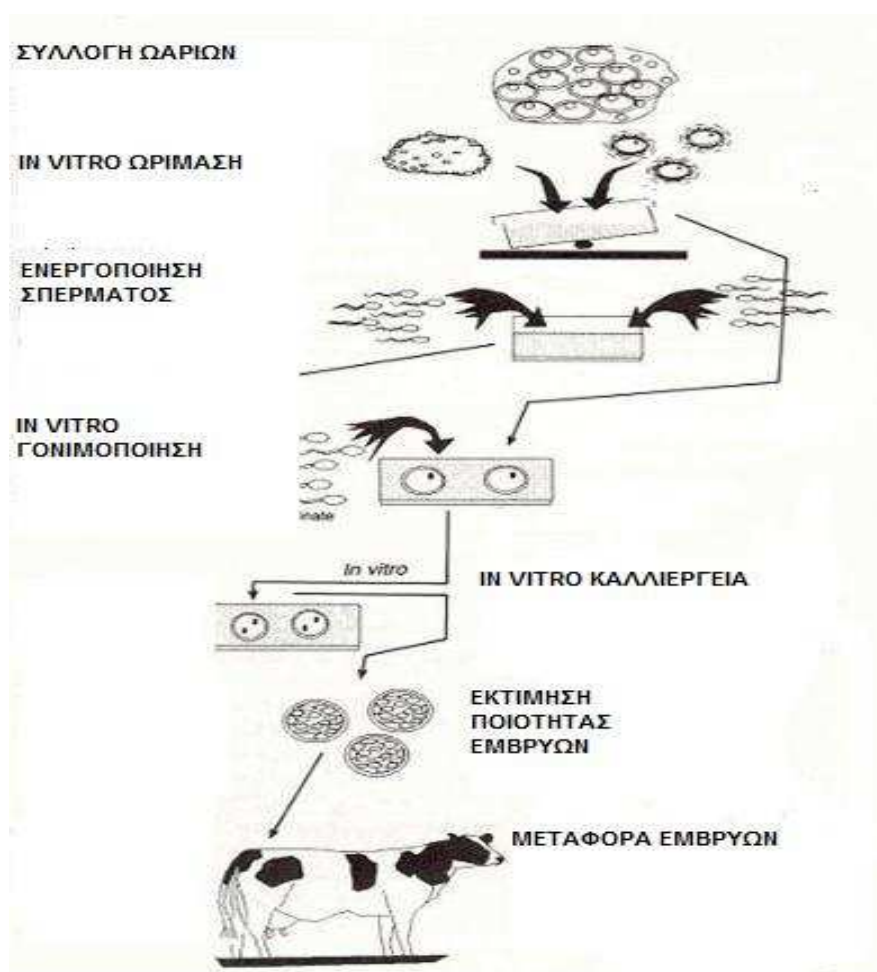
Έγιναν προσπάθειες και για συλλογή εμβρύων μέσω διατραχηλικής έκπλυσης της μήτρας με τη χρησιμοποίηση ενισχυμένου καθετήρα τύπου Folley, βελόνας με αμβλύ άκρο ή βελόνας τύπου Verres. Τα ποσοστά συλλογής που επιτεύχθηκαν κυμάνθηκαν από 62% έως 85% (Coonrod *et al.*, 1986). Ωστόσο, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, μόνο στο 25% έως 53% των περιπτώσεων ήταν δυνατή η δίοδος του μέσου έκπλυσης στη μήτρα και κατά συνέπεια τα πραγματικά ποσοστά συλλογής δεν ξεπέρασαν στην καλύτερη περίπτωση το 21%. Σε πειραματισμό όπου εφαρμόστηκε για τη διαστολή του τραχήλου μέθοδος που περιελάμβανε δύο ενδοτραχηλικές εγχύσεις προσταγλανδίνης E₂ σε διάστημα 9 ωρών και μια ενδομυϊκή χορήγηση οιστρογόνων ταυτόχρονα με την πρώτη έγχυση προσταγλανδίνης, η δίοδος του καθετήρα στη μήτρα ήταν δυνατή μόνο στο 46% των ενήλικων ζώων και στο 5% των αμνάδων. Το ποσοστό συλλογής εμβρύων ήταν 60% (Mylne *et al.*, 1992). Παρότι λοιπόν επιτεύχθηκε επιτυχώς η διατραχηλική συλλογή εμβρύων και από άλλους ερευνητές (Barry *et al.*, 1990), η τεχνική δε θεωρείται αξιόπιστη εξαιτίας της ανατομικής ιδιαιτερότητας του τραχήλου της προβατίνας.

Όταν η συλλογή γίνεται, 6-7 ημέρες μετά την πρόκληση του οίστρου, τα έμβρυα είναι συνήθως στο στάδιο της βλαστοκύστης και μεταφέρονται αμέσως, με λαπαροτομή ή λαπαροσκόπηση (McKelvey *et al.*, 1986), σε κατάλληλα συγχρονισμένους δέκτες ή είναι δυνατό να καταψυχθούν για μεταφορά στο απώτερο μέλλον. Η ανάπτυξη των άμεσα μεταφέσιμων εμβρύων συμβαίνει σε ποσοστό περίπου 70%, με διαφορές ανάλογα με την φυλή (Gordon, 1997).

4.3. *IN VITRO* ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η *in vitro* παραγωγή εμβρύων αναπτύχθηκε με σκοπό την παραγωγή μεγάλου αριθμού εμβρύων που φυσιολογικά δεν θα μπορούσαν να παραχθούν από ένα και μόνο άτομο. Επιπρόσθετα, η *in vitro* παραγωγή εμβρύων μπορεί να αξιοποιήσει το γενετικό υλικό από τα ανήλικα άτομα του πληθυσμού, μειώνοντας έτσι την απόσταση μεταξύ των γενεών, καθώς και από υψηλής γενετικής αξίας άτομα τα οποία οδηγούνται στο σφαγείο έτσι ώστε να μην χάνεται πολύτιμο γενετικό υλικό.

Η *in vitro* παραγωγή εμβρύων μας δίνει την δυνατότητα να μελετήσουμε τις συνθήκες και τους παράγοντες που επενεργούν κατά την δημιουργία των εμβρύων καθώς και την δυνατότητα να επέμβουμε στις συνθήκες αυτές με σκοπό την έρευνα και την παραγωγή επιθυμητών φαινοτύπων (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της *in vitro* παραγωγής εμβρύων (Αμοιρίδης)

4.3.2. Συλλογή ωαρίων

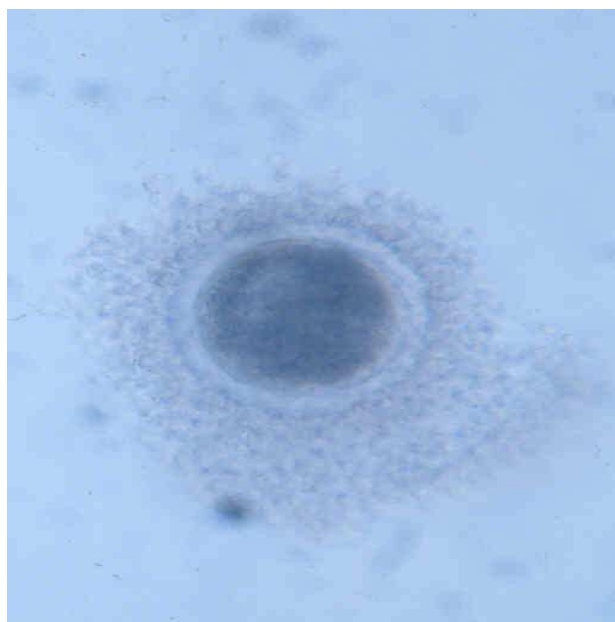
Οι Snyder and Nellor (1975) περιέγραψαν για πρώτη φορά την μέθοδο της λαπαροσκοπικής ανάκτησης ωοκυττάρων προβάτων, πέρασαν όμως αρκετά χρόνια έως ότου βελτιωθεί αυτή η τεχνολογία από πλευράς ποσοστού ανάκτησης και ποιότητας των αναρροφηθέντων ωοκυττάρων (Tervit *et al.*, 1995) (Εικόνα 15).

Η αναρρόφηση ωοθυλακίων και η συλλογή των ωαρίων μπορεί να γίνει είτε λαπαροσκοπικά και λαπαροτομικά από ζώα αναισθητοποιημένα είτε από ωοθήκες που προέρχονται από το σφαγείο.

Κατά την λαπαροσκοπική συλλογή ωαρίων οι δότριες ωαρίων παραμένουν χωρίς τροφή και νερό για 24 και 12 ώρες, αντίστοιχα. Πριν την λήψη γίνεται αναισθητοποίηση των δοτριών. Στη συνέχεια, γίνονται δύο τομές (1 cm) του δέρματος σε θέση 3 έως 4cm δεξιά και αριστερά της μέσης κοιλιακής γραμμής και 4 έως 5cm κεφαλικά της βάσης του μαστού. Στην αριστερή τομή εισάγεται το τροκάρ, διαμέσου του οποίου εισάγεται το λαπαροσκόπιο. Στη δεξιά τομή εισάγεται δεύτερο τροκάρ για την είσοδο της λαβίδας συγκράτησης. Για τη διευκόλυνση των χειρισμών και την αποφυγή τραυματισμών γίνεται έμφυση CO₂ στην κοιλιακή κοιλότητα με συσκευή πνευμοπεριτοναίου, υπό ελεγχόμενη πίεση, που συνδέεται με το τροκάρ ενδοσκοπίου. Η σταθεροποίηση των ωοθηκών γίνεται με τοποθέτηση ατραυματικής λαβίδας συγκράτησης στο σημείο του ίδιου συνδέσμου της ωοθήκης.

Κατά τη λαπαροσκοπική παρατήρηση των ωοθηκών γίνεται καταγραφή του αριθμού και της διαμέτρου των εμφανών ωοθυλακίων έτσι ώστε τα ωοθυλάκια με διάμετρο >2mm χαρακτηρίζονται ως μεγάλα ενώ εκείνα με διάμετρο <2mm ως μικρά. Η αναρρόφηση του περιεχομένου των ωοθυλακίων γίνεται με τη βοήθεια αντλίας υποπίεσης. Η δημιουργία κενού επιτυγχάνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος συνδέεται με την αντλία. Στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα προσαρμόζεται ελαστικός σωλήνας αναρρόφησης, που είναι συνδεδεμένος στο άλλο άκρο του με τη βελόνα αναρρόφησης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες περιέχουν 2ml υποστρώματος έκπλυσης και διατηρούνται σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Το υπόστρωμα έκπλυσης περιέχει PBS, γλυκόζη, χλωριούχα και φωσφορικά άλατα και αντιβιοτικά. Το pH του διαλύματος είναι 7,2 και μπορεί να συντηρηθεί στους 4°C, έως 30 ημέρες. Για την αποφυγή δημιουργίας συμφύσεων, μετά την ολοκλήρωση της αναρρόφησης των ωοθυλακίων, οι ωοθήκες ξεπλένονται με φυσιολογικό ορό. Μετά το πέρας της αναρρόφησης των ωοθυλακίων κάθε ζώου ο σωλήνας αναρρόφησης ξεπλένεται με 2ml υποστρώματος έκπλυσης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το περιεχόμενο ωοθυλακικό υγρό τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι να αρχίσει η

διαδικασία της αναζήτησης και αξιολόγησης των ωαρίων η οποία πρέπει να ξεκινήσει μέσα σε δύο ώρες από την αναρρόφηση των ωοθυλακίων.



Εικόνα 15. Καλής ποιότητας ωοκύτταρο (Αμοιρίδης)

Για την αναρρόφηση των ωαρίων από ωοθήκες που προέρχονται από το σφαγείο είναι καλό να χρησιμοποιούνται ωοθήκες που προέρχονται από σφαγείο κοντινό στο εργαστήριο, έτσι ώστε το διάστημα μεταξύ σφαγής και λήψης των ωαρίων από τις ωοθήκες να είναι σύντομο. Αμέσως μετά την προσκόμιση των γεννητικών συστημάτων των προβατινών, ή συνηθέστερα των αμνάδων, στο εργαστήριο, γίνεται καταμέτρηση του αριθμού και της διαμέτρου των ορατών ωοθυλακίων (μεγάλα ωοθυλάκια >2mm, μικρά ωοθυλάκια <2mm). Πριν από την έναρξη της συλλογής των ωαρίων οι ωοθήκες υπόκεινται σε τρεις διαδοχικές πλύσεις με υπόστρωμα έκπλυσης για τη μείωση του εξωτερικού μικροβιακού φορτιού τους. Το υπόστρωμα έκπλυσης περιέχει PBS, γλυκόζη, χλωριούχα και φωσφορικά άλατα και αντιβιοτικά. Το pH του διαλύματος είναι 7,2 και μπορεί να συντηρηθεί στους 4°C, έως 30 ημέρες. Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων από τις πτωματικές ωοθήκες διενεργείται με βελόνες μικρού διαμετρήματος (Βαλάση., 2006).

4.3.2.1. Χρησιμοποίηση άνηβων και ένηβων δοτριών

Η παραγωγή εμβρύων από αμνάδες αναμένεται να αυξήσει τη γενετική πρόοδο μέσω της μείωσης του διαστήματος μεταξύ των γενεών (Nicholas, 1996; Armstrong *et al.*, 1997). Αυτό μπορεί να γίνει εφαρμόζοντας την *in vitro* παραγωγή και μεταφορά εμβρύων από άνηβες προβατίνες (Juvenile *In vitro* Embryo Transfer, JIVET). Η τεχνική αυτή συνίσταται στην χρησιμοποίηση ωοκυττάρων που προέρχονται από άνηβες προβατίνες και την μεταφορά των εμβρύων που προκύπτουν από *in vitro* παραγωγή, σε ώριμα θηλυκά και εν τέλει την παραγωγή αμνών. Χρησιμοποιώντας πολύ νεαρά ζώα ηλικίας 3-4 εβδομάδων μειώνεται ακόμη περισσότερο το διάστημα μεταξύ των γενεών σε 6 μήνες, ενώ φυσιολογικά θα ήταν τουλάχιστον 12 μήνες, και είναι δυνατόν να υπάρξει ακόμη μεγαλύτερο κέρδος μέσω του συνδυασμού με την τεχνική της πολλαπλής πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας. Επίσης, αυξάνεται και η γενετική αξία των απογόνων αν συνδυαστεί η τεχνική λήψης ωαρίων από άνηβες αμνάδες με την τεχνική της χρήσης σπέρματος καθορισμένου φύλου, κάτι που έχει πολλαπλά συγκριτικά πλεονεκτήματα στην καθημερινή πρακτική (van der Werf, 2005).

Σε μελέτες όπου αναφέρεται η αναπτυξιακή ικανότητα των ωοκυττάρων των αμνάδων διαπιστώνεται ότι αν και η πυρηνική ωρίμαση υπάρχει σε παρόμοιο ποσοστό για ωοκύτταρα τόσο από ενήλικες όσο και από άνηβες προβατίνες, η φυσιολογική γονιμοποίηση και ανάπτυξη δεν ακολουθούν τον ίδιο ρυθμό. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στην ανώμαλη κυτταροπλασματική ωρίμαση (Ledda *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 1997a, b). Στην πραγματικότητα, αναφέρθηκε μειωμένος μεταβολισμός της γλουταμίνης σε ωοκύτταρα αμνάδων, ανεξάρτητα με το αν ωριμάσουν σε *in vivo* ή *in vitro* συνθήκες, καθώς και υψηλότερο ποσοστό πολυσπερμικών γονιμοποιήσεων (O'Brien *et al.*, 1996). Ωστόσο, έπειτα από παρατηρήσεις σε διάφορες ομάδες (Armstrong *et al.*, 1994), ο ρυθμός παραγωγής αμνών *in vitro* από βλαστοκύστες από αμνάδες ήταν παρόμοιος με εκείνο που ισχύει για τα έμβρυα που προέρχονται από ενήλικες δότριες.

Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε αμνάδες μετά από λαπαροτομή (Tervit, 1996; Kelly *et al.*, 2005) ή με λαπαροσκοπικές τεχνικές, οι οποίες γενικώς θεωρούνται περισσότερο ενδεδειγμένες μέθοδοι στα μικρά μηρυκαστικά (McKelvey *et al.*, 1986; Αμοιρίδης *et al.*, 1998), μπορεί να διενεργηθεί από την ηλικία των 4 έως 5 εβδομάδων. Σε αυτή την ηλικία τα συλλεγόμενα ωάρια μπορούν να ωριμάσουν και να γονιμοποιηθούν *in vitro* (Ledda *et al.*, 1997; Ptak *et al.*, 1999). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι από αμνάδες ηλικίας 4 έως 5 εβδομάδων συλλέγονται περισσότερα ωάρια (30 έως 40 ωάρια/ωοθήκη) από ότι από προβατίνες (5 έως 12 ωάρια/ωοθήκη) (Ledda *et al.*, 1997).

Στις αμνάδες η ανάπτυξη των ωοθυλακίων δεν ακολουθεί το κυματοειδές πρότυπο (Bartlewski *et al.*, 2006) το οποίο ακολουθείται σε προβατίνες (Noel *et al.*, 1993; Evans, 2003). Ο πληθυσμός και η διάμετρος των ωοθυλακίων των αμνάδων ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από την ηλικία, τη φυλή, το δείκτη ωοθυλακιορρηξίας και πολυδυμίας (Land, 1970; Bartlewski *et al.*, 2006). Ο αριθμός γρααφιανών ωοθυλακίων στις ωοθήκες αμνάδων ηλικίας 12 εβδομάδων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των προβατινών της ίδιας φυλής (Sonjaya and Driancourt, 1989). Ακολουθώντας το πρότυπο της ωοθυλακιογένεσης των αμνάδων σε διάφορες ηλικίες, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων μετά από ορμονική αγωγή είναι μεγάλη κατά τον 1^ο μήνα της ζωής και στη συνέχεια μειώνεται (Ptak *et al.*, 2003), παρουσιάζοντας μια μικρή αύξηση μετά τον 5^ο μήνα (Ptak *et al.*, 1999). Οι αμνάδες ηλικίας 3 και 4 μηνών παρουσιάζουν φτωχή ανάπτυξη ωοθυλακίων και ωάρια που δεν ωριμάζουν *in vitro* αλλά, μπορούν να βελτιώσουν την ικανότητα ωρίμασης των ωαρίων που συλλέγονται αν έχει διενεργηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων σε νεαρότερη ηλικία (Valasi *et al.*, 2007b). Ωστόσο, ο συνολικός αριθμός των ωαρίων που συλλέγονται από άνηθα ζώα είναι μεγαλύτερος από αυτό των ενηλίκων (Ptak *et al.*, 1999; Baldassarre and Karatzas, 2004). Ενώ, με την πάροδο της ηλικίας μειώνεται η ικανότητα ανταπόκρισης των ωοθηκών και το ποσοστό συλλογής ωαρίων (Ptak *et al.*, 2003), η ικανότητα ανάπτυξης *in vitro* των συλλεγόμενων ωαρίων στις αμνάδες αυξάνεται (Morton *et al.*, 2005). Άλλωστε, η προσαρμογή της δόσης της χορηγούμενης FSH στο σωματικό βάρος των αμνάδων οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των ωαρίων που μπορούν να συλλεχθούν και τα οποία είναι κατάλληλα για *in vitro* ωρίμαση και γονιμοποίηση (Valasi *et al.*, 2007b).

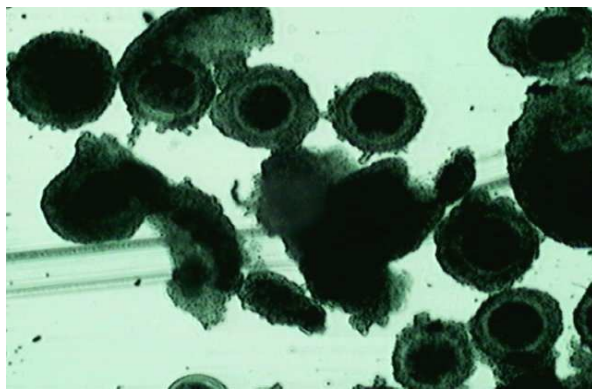
Η ανταπόκριση των ωοθηκών στην ορμονική διέγερση φαίνεται να επηρεάζεται και από τη φυλή σε συνδυασμό με την ηλικία. Αμνάδες φυλών που χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη πολυδυμίας παρουσιάζουν καθυστερημένη ανταπόκριση σε σχέση με αυτές που ανήκουν σε φυλές με χαμηλό δείκτη (Tassell *et al.*, 1983; Sonjaya and Driancourt, 1987). Ανεξάρτητα από την ηλικία της δότριας ωαρίων, η ωρίμαση των ωαρίων αποτελεί τον κύριο περιοριστικό παράγοντα στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων (Mermillod *et al.*, 1999).

Η συχνότητα με την οποία είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων από αμνάδες δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί αναρρόφηση μια φορά σε αμνάδες διαφόρων ηλικιών (Earl *et al.*, 1995), μια φορά σε ηλικία 4 έως 5 εβδομάδων (Ptak *et al.*, 1999), έξι φορές κάθε 14 ημέρες αρχίζοντας από την ηλικία των 8 έως 9 εβδομάδων (Anel *et al.*, 1997) ή 3 έως 5 φορές ξεκινώντας από την ηλικία των 4 εβδομάδων (Ptak *et al.*, 2003). Με βάση τα κατάλληλα πρωτόκολλα διέγερσης ωοθυλακίων αμνάδων 6-8-εβδομάδων, προκύπτουν μέχρι δέκα εγκυμοσύνες ανά δότρια ανά IVF (Earl *et al.*, 1995; Armstrong *et al.*, 1997).

Ως επιτυχημένο πρωτόκολλο συλλογής ωαρίων από άνηβα ζώα, με βάση τις σύγχρονες τάσεις για τη διαχείριση των αγροτικών ζώων, θεωρείται αυτό που αφενός αποδίδει καλά ποσοστά εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων και αφετέρου δεν επηρεάζει τη φυσιολογική αναπαραγωγική ικανότητα και την ευζωία των δοτριών. Μετά από πειράματα βρέθηκε ότι η ορμονική διέγερση των ωοθηκών και η αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε αμνάδες Καραγκούνικης φυλής ανεξαρτήτως ηλικίας δεν επηρεάζει τη σωματική ανάπτυξη, το χρόνο ενήβωσης και την αναπαραγωγική ικανότητα τους ακόμη και στην περίπτωση που η αγωγή διενεργείται κατ' επανάληψη (Valasi *et al.*, 2006; Valasi *et al.*, 2009). Επίσης, μέσα στα πλαίσια της ευζωίας επιβάλλεται κάθε πειραματισμός να χρησιμοποιεί τον ελάχιστο αριθμό ζώων και τα ζώα να υφίστανται την ελάχιστη δυνατή καταπόνηση. Είναι γνωστό ότι κατά την ορμονική αγωγή για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας επενεργούν διάφοροι παράγοντες (γενετικό υπόβαθρο, ορμονική αγωγή) (Ptak *et al.*, 2003) οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν σε ακραία αποτελέσματα που ποικίλουν, από παντελή απουσία ανάπτυξης ωοθυλακίων (Samartzi *et al.*, 1995b; Amiridis *et al.*, 2002) μέχρι και υπερβολική ανάπτυξη αυτών, γεγονός το οποίο μπορεί τελικά να επηρεάσει την ποιότητα των ωαρίων που συλλέγονται (Moor *et al.*, 1985; Foote and Ellington, 1988). Με σκοπό την αναγνώριση του βαθμού ανταπόκρισης των αμνάδων-δοτριών ωαρίων αποδείχθηκε ότι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης-17β, η οποία αποτελεί δείκτη 'υγείας' των ωοθυλακίων (Campbell *et al.*, 1995), στον ορό του αίματος 12 ώρες πριν τη διενέργεια της αναρρόφησης ωοθυλακίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο πρόβλεψης της ανταπόκρισης των αμνάδων στην ορμονική διέγερση, εφόσον έτσι είναι εφικτή η απόλυτη πρόβλεψη των ζώων που θα εμφανίσουν μέτρια ή καμία ανάπτυξη ωοθυλακίων. Άλλωστε, μελετώντας τη διακύμανση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης-17β κατά τη διάρκεια της ορμονικής αγωγής οι αμνάδες που δεν πρόκειται να ανταποκριθούν σε αυτή μπορούν να εντοπισθούν και να απομακρυνθούν από τον πειραματισμό 12 ώρες μετά την πρώτη χορήγηση FSH (Valasi *et al.*, 2007a).

4.3.3. *In vitro* ωρίμαση των ωαρίων

Το σχετικά χαμηλό επίπεδο απόδοσης σε έμβρυα, που επιτεύχθηκε μετά την *in vitro* ωρίμαση ωαρίων (IVM), σε σύγκριση με εκείνα που παράγονται *in vivo*, είναι σχεδόν βέβαιο ότι σχετίζονται με την ποιότητα των ωαρίων κατά την έναρξη της *in vitro* ωρίμασης των ωαρίων. Ωστόσο, δεδομένης της ανομοιογένειας των ανώριμων ωαρίων που χρησιμοποιούνται για την *in vitro* παραγωγή ωαρίων, η ωρίμαση ωαρίων μπορεί να επηρεαστεί από τα συστατικά που περιέχονται στα μέσα καλλιέργειας και από τις συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* ωρίμαση των ωαρίων (Mermillod *et al.*, 1999) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. *In vitro* ωρίμαση-Ωάρια με κοκκώδη στιβάδα (Καλογιάννης)

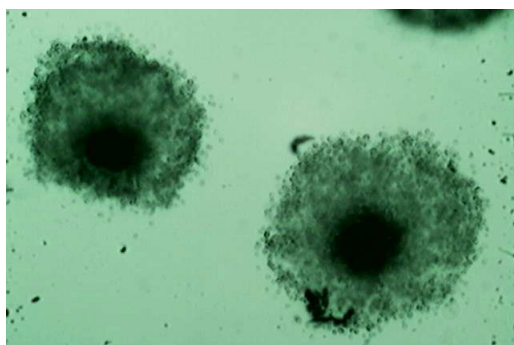
Η *in vitro* ωρίμαση ωαρίων συνήθως αφορά την επιλογή ωαρίων από ωοθυλάκια μεγέθους τουλάχιστον μεγαλύτερου των 2mm και την ωρίμαση των ωαρίων τους σε σταγονίδια σε τρυβλία Petri για περίπου 24 ώρες σε 38,5-39 °C (Crozet, 1991) σε θάλαμο με 5% O₂-5%CO₂. Το μέγεθος των ωοθυλακίων από τα οποία προέρχονται τα ωάρια έχει μεγάλη σημασία καθώς ωάρια από ωοθυλάκια μικρού μεγέθους αποδίδουν μικρότερο ποσοστό βλαστοκύστεων σε σχέση με αυτά που προέρχονται από μεγάλα ωοθυλάκια (Cognie *et al.*, 1986). Η δεύτερη μειωτική διαίρεση προκύπτει αυθόρμητα κατά την διάρκεια της ωρίμασης των ωαρίων (Edwards, 1965). Έχοντας όμως ήδη προσθέσει γοναδοτροπίνες, αυξάνεται ο αριθμός των ωαρίων που μπαίνουν στη μετάφαση II (MII), αν και δεν αυξάνεται το τελικό ποσοστό ώριμων ωαρίων (Galli and Moor, 1991). Άλλωστε, η προωοθυλακιορρηκτική κορυφή της LH κατά το τέλος του οιστρικού κύκλου σχετίζεται άμεσα με την αναπτυξιακή ικανότητα των ωαρίων που υφίστανται *in vitro* ωρίμαση (Oussaid *et al.*, 1997).

Η ωρίμαση συνήθως επιτελείται μέσα σε υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας (Moor *et al.*, 1983). Το μέσο καλλιέργειας συχνά συμπληρώνεται με FSH, LH, οιστραδιόλη, και 10% ορό εμβρύου μόσχου (FCS), συνθήκες προσαρμοσμένες στην ωρίμαση των ωαρίων μέσα στα ωοθυλάκια τους (Moor and Trounson, 1977). Για IVM ωαρίων προβάτων χρησιμοποιείται και ωοθυλακικό υγρό (FF) το οποίο ανακτάται από μεγάλα ωοθυλάκια (> 4 mm) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα σε μέσο ωρίμασης που περιέχει TCM 199 και 100 ng της oFSH. Αυτή η θετική επίδραση ενισχύεται όταν το ωοθυλακικό υγρό ανακτάται από μη-ατρητικά ωοθυλάκια (Cognie *et al.*, 1995) ή ωοθυλάκια που έχουν ενεργοποιηθεί περαιτέρω με την χορήγηση γοναδοτροπινών (Cognie and Poulin, 2000). Επίσης, το ωοθυλακικό υγρό είναι προτιμότερο της χρήσης FSH και EGF γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία σε αυτό διαφόρων ρυθμιστικών μορίων (Guler *et al.*, 2000). Κατά τη διάρκεια της *in vitro* ωρίμασης υπό αυτές τις συνθήκες, η εξώθηση του πρώτου πολικού σωματίου κατά την διάρκεια της

μετάφασης II συμβαίνει στα ωάρια προβάτων μεταξύ 16 και 24 ωρών μετά την έναρξη της ωρίμασης (Cognie *et al.*, 2003).

Ο ορός εμβρύου μόσχου είναι το πιο συνηθισμένο πρόσθετο, αλλά τελευταία, η προσθήκη αυξητικών παραγόντων, και ειδικότερα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), του παρόμοιου με την ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I (IGF-I) και του μετατροπέα του αυξητικού παράγοντα-α (TGF-α), έχει αποδειχθεί ότι προάγει την ωρίμαση του ωαρίου και μειώνει την απαίτηση για γοναδοτροπίνες κατά τη διάρκεια της ωρίμασης (Gandolfi *et al.*, 1996; Harper and Brackett, 1993; Kobayashi *et al.*, 1994). Οι ενδογενείς παράγοντες που διευκολύνουν την θετική επιρροή του ορού εμβρύου μόσχου δεν έχουν ακόμη διεκρινιστεί, δεδομένα όμως που αποκτήθηκαν μετά την ωρίμαση ωαρίων απουσία ορού υποδεικνύουν την συμμετοχή αυξητικών παραγόντων, ορμονών και πεπτιδίων.

Πρόσφατα πειράματα επιδεικνύουν μια σχέση μεταξύ γλουταθειόνης και αναπτυξιακών παραγόντων που εμπλέκονται στην *in vitro* ωρίμαση ωαρίων βοοειδών (De Matos *et al.*, 1995). Η ενδοκυτταρική γλουταθειόνη είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό που σχετίζεται με την μείωση των επιπέδων υπεροξειδίων στο ωοκύτταρο και βελτιώνει έτσι την ανάπτυξη και την ποιότητα των εμβρύων (de Matos *et al.*, 2002). Δύο χρόνια αργότερα η χρήση κυστεαμίνης, η οποία αυξάνει το επίπεδο της γλουταθειόνης στο ωοκύτταρο, είχε ήδη εγκριθεί για την παραγωγή εμβρύων *in vitro* με χρήση ωαρίων είτε προβάτων (Wells *et al.*, 1997) είτε αρνιών (Ptak *et al.*, 1997). Η περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη είναι αντιπροσωπευτικός δείκτης των κυτταροπλασματικών αντιδράσεων και η προσθήκη κυστεαμίνης σε μέσο καλλιέργειας αυξάνει την ικανότητα της *in vitro* παραγωγής ωαρίων σε επίπεδο ανάλογο της ωρίμασης παρουσία ωοθυλακικού υγρού (Cognie *et al.*, 2002). Η σύγκριση με την χρήση ωοθυλακικού υγρού γίνεται λόγω της περιεκτικότητας του ωοθυλακικού υγρού σε αντιοξειδωτικούς και ρυθμιστικούς παράγοντες (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ωάρια μετά από ωρίμαση (Καλογιάννης)

4.3.4. *In vitro* γονιμοποίηση των ωαρίων

Έπειτα από την ωρίμαση των ωαρίων, απομακρύνονται τα ωάρια από το υγρό καλλιέργειας και πλένονται τρεις φορές με υπόστρωμα γονιμοποίησης. Δημιουργούνται ομάδες των 40-50 ωοκυττάρων που τοποθετούνται σε σταγόνες οι οποίες μπορεί να υπερκαλύπτονται από έλαιο.

Συλλέγονται τα σπερματοζωάρια από τον δότη με τεχνητή σπερματοληψία και ενεργοποιούνται με την χρησιμοποίηση των μεθόδων swim-up ή percoll. Η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων στο εργαστήριο υποκαθιστά την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων που φυσιολογικά συμβαίνει μέσα στο γεννητικό σύστημα του θηλυκού κατά την διάρκεια της μετακίνησης του σπέρματος κατά μήκος του γεννητικού σωλήνα. Έπειτα το σπέρμα τοποθετείται σε μέσο καλλιέργειας συμπληρωμένο με αδρανοποιημένο με θέρμανση ορό αγελάδας σε οίστρο (Cheng, 1985; DeSmedt *et al.*, 1992) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για το νωπό 20% (Crozet *et al.*, 1987), και το κατεψυγμένο σπέρμα 2% (O'Brien *et al.*, 1997b). Μαζί τοποθετούνται και τα ωοκύτταρα, έτσι ώστε να γονιμοποιηθούν, για 17 ώρες στους 38,5-39⁰C υπό ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα με μέγιστη υγρασία. Οι ερευνητές προσπαθώντας να μιμηθούν την φύση προσθέτουν ουσίες που υπάρχουν φυσιολογικά στους ωαγωγούς και στη μήτρα. Το μέσο που φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη διάδοση ως τώρα είναι το SOF (Synthetic Oviduct Fluid), δηλαδή συνθετικό υγρό ωαγωγού (Tervit *et al.*, 1972). Για να αυξηθεί η διεισδυτική ικανότητα των σπερματοζωαρίων το σπέρμα συμπληρώνεται με 10% αδρανοποιημένο ορό προβάτου και 0,5μg/ml ηπαρίνης (Walker *et al.*, 1994).

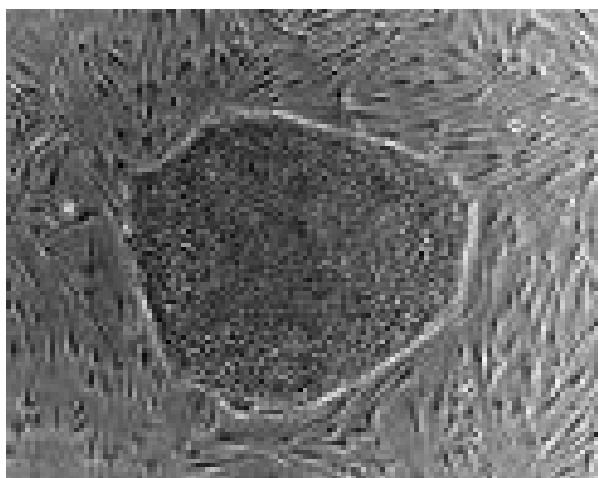
Το χρονικό διάστημα επώασης των 17 ωρών είχε αρχικά θεσπιστεί για πρακτικούς λόγους και αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα έως ότου παρατηρηθούν οι προπυρήνες (Εικόνα 18). Έπειτα όμως από έρευνες το ίδιο ποσοστό βλαστοκύστεων προκύπτει και με 9-10 ώρες επώασης των σπερματοζωαρίων με τα ωοκύτταρα και συγχρόνως βρίσκονται μέσα στο υγρό γονιμοποίησης μικρότερα ποσοστά επιβλαβών ουσιών (Kochhar *et al.*, 1999).



Εικόνα 18. 2 προπυρήνες μετά από επώαση 18 ωρών (www.wikipedia.com)

Το 1985, αναφέρθηκε υψηλό ποσοστό γονιμοποίησης ωαρίων προβάτων ωριμασμένων *in vitro* (80%), σε σχέση με ότι είχε αναφερθεί έως τότε (Cheng, 1985). Στο σύστημα αυτό, το σπέρμα ήταν αραιωμένο σε μέσο που περιέχει ορό οίστρου προβάτων. Αυτός ο ορός συμπληρώματος παραμένει ο πιο αποτελεσματικός παράγοντας στην γονιμοποίηση ωαρίων προβάτων (Crozet *et al.*, 1987).

Το 1991 αναφέρθηκε η γέννηση του πρώτου αμνού μετά από IVM / *in vitro* ωρίμαση, IVF / *in vitro* γονιμοποίηση και IVC / *in vitro* καλλιέργεια των ωαρίων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της άνοιστρης περιόδου μετά από χορήγηση γοναδοτροπινών (Pugh *et al.*, 1991). Η μελέτη αυτή κατέστησε σαφή τη σημασία της χορήγησης γοναδοτροπίνης σε αρχικό στάδιο, πριν από τη συλλογή των ωαρίων, για την μεταγενέστερη δυνατότητα του ωαρίου να αναπτυχθεί ικανοποιητικά. Επίσης, η επιλογή του κριού είναι καθοριστική για το ποσοστό των εμβρύων που θα φθάσουν το στάδιο των 16-κυττάρων σε συνθήκες *in vitro* (Fukui *et al.*, 1988) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. *In vitro* γονιμοποίηση(www.wikipedia.com)

4.3.4.1. Χρήση νωπού ή κατεψυγμένου σπέρματος για τη γονιμοποίηση

Με την έντονη ανάπτυξη της τεχνητής σπερματέγχυσης, καθώς και των άλλων μεθόδων της υποστηριζόμενης αναπαραγωγής τον αιώνα που μας πέρασε, δημιουργήθηκε η ανάγκη της διατήρησης του γενετικού υλικού για μεγάλο χρονικό διάστημα. Με τον όρο διατήρηση του γενετικού υλικού εννοούνται οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για τη διατήρηση επί μακρόν σπερματοζωαρίων, ωαρίων και εμβρύων χωρίς αυτά να χάσουν την βιολογικά αναπτυξιακή τους ικανότητα.

Η διατήρηση του σπέρματος σε μορφή εναιωρήματος μπορεί να επιτευχθεί μέσω μεθόδων που μειώνουν το μεταβολισμό των σπερματοζωαρίων και έχουν ως αποτέλεσμα την διατήρηση της γονιμοποιητικής τους ικανότητας.

Η αραίωση του σπέρματος με ποικίλα αραιωτικά μέσα είναι η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την διατήρηση του σπέρματος αλλά και την αύξηση του όγκου του. Η αύξηση του όγκου και η χρησιμοποίηση μικρού αριθμού σπερματοζωαρίων επιτρέπει τη γονιμοποίηση περισσότερων ωαρίων και με αυτόν τον τρόπο την εξοικονόμηση πολύτιμου γενετικού υλικού. Άλλωστε, με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων αραιωτικών επιμηκύνεται το διάστημα της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων και έτσι γίνεται πιο ευχερής η χρησιμοποίησή του (Καλογιάννης, 2006).

Ένα από τα κύρια αραιωτικά μέσα είναι η πρωτεΐνη αυγού λόγω της ικανότητάς της να σταθεροποιεί και να προστατεύει την μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Λόγω συγκεκριμένων μειονεκτημάτων της πρωτεΐνης του αυγού, όπως η δυσκολία στην χρήση, μεγάλη διαφοροποίηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και ο φόβος της μικροβιακής μόλυνσης του εναιωρήματος (Bousseau *et al.*, 1998), ως εναλλακτική λύση προτάθηκε η χρησιμοποίηση λυοφιλοποιημένης πρωτεΐνης αυγού (Marco-Jimenez *et al.*, 2004). Η λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη αυγού έχει την ικανότητα να διατηρεί σταθερή την συγκέντρωσή της και ο κίνδυνος της μικροβιακής μόλυνσης του εναιωρήματος είναι πολύ μειωμένος λόγω του ότι υπόκειται σε τεχνική επεξεργασία και έτσι μπορεί να πιστοποιηθεί η υγιεινή της κατάσταση.

Το **νωπό σπέρμα** παρότι έχει πολύ καλή γονιμοποιητική ικανότητα, έχει το σημαντικό μειονέκτημα ότι δεν μπορεί να διατηρηθεί επί μακρόν και για αυτό είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί για γονιμοποίηση ζώων τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικό χώρο από το αρσενικό. Συγκεκριμένα, το νωπό σπέρμα μπορεί να διατηρηθεί για 6-8 ώρες σε θερμοκρασία 15°C ενώ θα έπρεπε να έχει διάρκεια ζωής μεταξύ 2 και 4 ημερών για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μακρινές αποστάσεις (Vishwanath and Shannon, 2000) Υπό τέτοιες συνθήκες είναι δύσκολη η γενετική βελτίωση των πληθυσμών.

Υπάρχουν δυο βασικοί λόγοι για τη γρήγορη πτώση της γονιμοποιητικής ικανότητας του νωπού σπέρματος. Πρώτον, οι εξωκυτταρικές συνθήκες του οξειδωτικού στρες και η ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών που οδηγούν σε οξείδωση των μεμβρανών και των κυτταρικών οργανιδίων και δεύτερον, οι αντιδράσεις που συμβαίνουν στο πλάσμα του σπέρματος (Salamon and Maxwell, 2000).

Γενικά, η γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων χειροτερεύει για όσο μεγαλύτερο διάστημα διατηρούνται ανεξάρτητα από το αραιωτικό μέσο ή την θερμοκρασία στην οποία διατηρούνται. Η κινητικότητα και η μορφολογική τους ακεραιότητα επηρεάζονται αρνητικά από το χρόνο διατήρησης και αυτές οι αλλαγές επιδρούν κύρια στη μετακίνηση, στην επιβίωση στο γεννητικό σύστημα του θηλυκού και στη μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης τους (Salamon and Maxwell, 2000).

Στην πραγματικότητα τα σπερματοζωάρια χαρακτηρίζονται από μια ασυνήθιστη ικανότητα να δημιουργούν μεγάλο ποσό ελεύθερων ριζών, κατά την διατήρησή τους σε συνθήκες *in vitro*, οι οποίες προκαλούν την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Υψηλά ποσοστά λιπιδίων υπεροξειδωμένων στη μεμβράνη του σπερματοζωαρίου μπορεί να αλλάξει τόσο πολύ τη σταθερότητα των μεμβρανών που να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Επίσης, η παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να βλάψει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και την ακεραιότητα της χρωματίνης. Σε περίπτωση βλάβης της ακεραιότητας της χρωματίνης μειώνεται η ικανότητα διαβίωσης του εμβρύου. Άλλωστε, έχει διαπιστωθεί ότι η αύξηση της εμβρυϊκής θνησιμότητας συνδέεται άμεσα με το χρόνο διατήρησης του σπέρματος σε διάφορα είδη (Salamon and Maxwell, 2000).

Η χρήση αντιοξειδωτικών (καταλάση, γλουταθειόνη, υπεροξειδάση και κυτόχρωμα C) έχει αυξήσει το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και την ακεραιότητα του ακροσώματος και υπήρξε μια γραμμική σχέση ανάμεσα στη χρησιμοποίησή τους και την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των σπερματοζωαρίων (Maxwell and Stojanov, 1996).

Η **κατάψυξη του σπέρματος** και η απόψυξή του κάποια στιγμή στο μέλλον για χρησιμοποίηση έδωσε μεγάλη ώθηση στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Η τεχνική της κατάψυξης του σπέρματος του κριού, και των άλλων θηλαστικών, έχει το μειονέκτημα της μείωσης του ποσοστού γονιμοποίησης του αποψυχθέντος σπέρματος. Αυτό οφείλεται κυρίως σε δομικές αλλαγές οι οποίες αφορούν στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων επειδή, κατά τη διαδικασία ψύξης-απόψυξης υπάρχει μια ανακατανομή των λιπιδίων που αλλοιώνει τις σχέσεις των λιπιδίων με τις πρωτεΐνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εύρυθμη λειτουργία των μεμβρανών (Park and Graham, 1992). Παρά τις όποιες αντιξοότητες, η κατάψυξη των σπερματοζωαρίων μπορεί να βελτιωθεί και έτσι να υπάρχει μεγαλύτερο

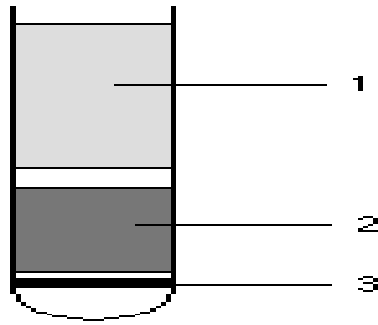
ποσοστό αποψυχθέντων και ικανών για γονιμοποίηση σπερματοζωαρίων (Salamon and Maxwell, 2000).

Η επιτυχής χρησιμοποίηση του νωπού ή του κατεψυγμένου σπέρματος εξαρτάται και από την μέθοδο της τεχνητής σπερματέγχυσης και συγκεκριμένα από τον τρόπο εφαρμογής της. Η ενδομήτρια και η ενδοτραχηλική τεχνητή σπερματέγχυση είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές, με το συνδυασμό της ενδοτραχηλικής τεχνητής σπερματέγχυσης με κατεψυγμένο σπέρμα να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα (Maxwell *et al.*, 1983). Γεγονός είναι ότι η λαπαροσκοπική τεχνητή σπερματέγχυση είναι η μόνη μέθοδος που εμφανίζει σταθερά υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης (50-80%) (Anel *et al.*, 2003). Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κατεψυγμένο σπέρμα στο οποίο περιέχεται μικρότερος αριθμός σπερματοζωαρίων ($20-50 \times 10^6$ σπερματοζωάρια/δόση) σε σχέση με την ενδοτραχηλική τεχνητή σπερματέγχυση. Επίσης κατά την λαπαροσκοπική τεχνητή σπερματέγχυση με κατεψυγμένο σπέρμα λόγω της ακινητοποίησης του ζώου, υπάρχει αρκετός χρόνος για την εφαρμογή της τεχνικής κάτι που δεν ισχύει κατά την εφαρμογή της ενδοτραχηλικής τεχνητής σπερματέγχυσης (Maxwell, 1986). Τέλος, η λαπαροσκοπική τεχνητή σπερματέγχυση δεν εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο η ενδοτραχηλική τεχνητή σπερματέγχυση (Anel *et al.*, 2005).

4.3.4.2. Ενεργοποίηση του σπέρματος για τη γονιμοποίηση

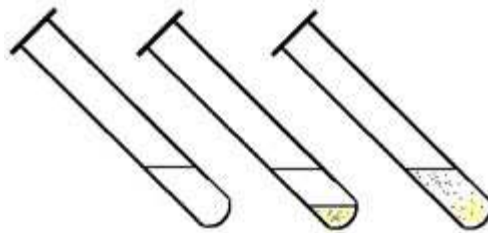
Οι αρχικές προσπάθειες για *in vitro* γονιμοποίηση ωαρίων χρησιμοποιώντας νωπό σπέρμα ήταν αποτυχημένες. Ο λόγος είναι ότι τα σπερματοζωάρια για να γονιμοποιήσουν χρειάζονται 'ενεργοποίηση'. Η ενεργοποίηση φυσιολογικά συμβαίνει στο γεννητικό σύστημα του θηλυκού. Για τη ενεργοποίηση στο εργαστήριο έχουν προταθεί και αναπτυχθεί πολλές τεχνικές, οι σπουδαιότερες όμως και περισσότερο χρησιμοποιούμενες είναι η κλασμάτωση (ή μέθοδος διαχωρισμού Percoll) και η μέθοδος Swim up.

Κατά τη μέθοδο της κλασμάτωσης τα σπερματοζωάρια τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα πάνω από δύο στιβάδες διαφορετικής πυκνότητας του **Percoll** (50% και 80%) που είναι ένας πολυσακχαρίτης μεγάλου ειδικού βάρους. Έπειτα από 10 λεπτά φυγοκέντρησης σε θερμοκρασία δωματίου το σπέρμα έχει καθιζάνει στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Στη συνέχεια το ίζημα εκπλένεται και διαλύεται σε 8ml Percoll, επαναφυγοκεντρείται και η πυκνότητα του νέου ιζήματος προσδιορίζεται σε αιμοκυττόμετρο. Η τελική συγκέντρωση είναι συνήθως της τάξης 1×10^6 σπερματοζωάρια/ml. Με τη μετακίνηση του σπέρματος επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και ταυτόχρονα ο καθαρισμός και ο εμπλουτισμός τους (Καλογιάννης, 2006) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Μέθοδος Percoll, 1) Percoll 50% 2) Percoll 80% 3) ενεργοποιημένο σπέρμα (Καλογιάννης, 2006)

Κατά τη μέθοδο **Swim up** το σπέρμα τοποθετείται κάτω από ειδικό καλλιεργητικό υλικό μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρείται για 10min σε 1000rpm. Το ιζημα διαλύεται σε 1 ml υποστρώματος γονιμοποίησης και τοποθετείται, σε κλίβανο διοξειδίου του άνθρακα για 1 ώρα. Τα κινούμενα σπερματοζώαρια περνούν στην επάνω στιβάδα όπου καταμετρούνται και το διάλυμα σταθεροποιείται σε συγκέντρωση 1×10^6 σπερματοζώαρια/ml (Καλογιάννης, 2006) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Μέθοδος Swim up (Καλογιάννης, 2006)

4.3.5. *In vitro* καλλιέργεια των ζυγωτών

Μετά από τη 17-24ωρη γονιμοποίηση τα υποτιθέμενα ζυγωτά ή έμβρυα 2 κυττάρων οδηγούνται στο τελευταίο στάδιο της IVP στην καλλιέργεια (Εικόνα 22).

Υπάρχουν δύο συστήματα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για την *in vitro* παραγωγή της βλαστοκύστης: η συν-καλλιέργεια (ή μέσο καλλιέργειας που διαμορφώνεται από εκκρίσεις διαφόρων κυττάρων) και η καλλιέργεια με τυποποιημένα μέσα (ή ημι-τυποποιημένα).

Η **συν-καλλιέργεια** εμβρύων προβάτων γενικά επιτελείται με υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας (TCM199), το οποίο συνήθως συμπληρώνεται με αδρανοποιημένο με θέρμανση ορό εμβρύου μόσχου. Τα κύτταρα τα οποία προστίθενται είναι κοκκώδη κύτταρα, κύτταρα θήκης ωοθυλακίου, επιθηλιακά κύτταρα του ωαγωγού ή επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος βούβαλου για εφαρμογή σε επίμυες (Rexroad and Powell, 1986; Gandolfi and Moor, 1987). Το γεγονός ότι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορων ειδών κύτταρα στην καλλιέργεια εμβρύων, υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει εξειδίκευση των κυττάρων επιλογής και αντικατοπτρίζει την ανάγκη για την παραγωγή παραγόντων που τρέφουν τα έμβρυα και που επηρεάζουν το περιβάλλον με παρόμοιο τρόπο απομακρύνοντας τους επιβλαβείς παράγοντες (Watson *et al.*, 1994). Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι οι αυξητικοί παράγοντες (πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες ή/ και κυτοκίνες) είναι υπεύθυνοι για την υποστήριξη της ανάπτυξης των εμβρύων τόσο στην συν-καλλιέργεια όσο και στα τυποποιημένα μέσα καλλιέργειας (Gandolfi, 1994). Υπάρχει και η άποψη ότι αυτές οι μέθοδοι καλλιέργειας προκαλούν απλώς τη μείωση ή την εξάλειψη ανασταλτικών παραγόντων για την ανάπτυξη των ωαρίων, όπως είναι το οξυγόνο (Bavister, 1992; Watson *et al.*, 1994).



Εικόνα 22. Έμβρυα σε *in vitro* καλλιέργεια (Αμοιρίδης)

Στα **τυποποιημένα μέσα** καλλιέργειας, η συγκέντρωση κάθε συστατικού είναι γνωστή πριν την προσθήκη των εμβρύων (εκτός της περίπτωσης που χρησιμοποιείται αδρανοποιημένος με θέρμανση ορός εμβρύου μόσχου). Προς το παρόν, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τυποποιημένο μέσο καλλιέργειας των εμβρύων προβάτων είναι τεχνητά κατασκευασμένο υγρό ωαγωγού (SOF) (Gardner, 2008) εμπλουτισμένο με αμινοξέα και λευκωματίνη ορού βοοειδών (SOFaaBSA) (Gardner *et al.*, 1994; Gordon, 2004).

Η καλλιέργεια των εμβρύων γίνεται σε κλίβανο τριών αερίων 5% O₂, 5% CO₂ και 90% N₂. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο μιμείται τις συνθήκες ανοξίας στο γεννητικό σύστημα και μετριάζει το στρες από την επαφή με τις συνθήκες του ατμοσφαιρικού αέρα στον οποίο γίνονται οι επεμβάσεις και η περιεκτικότητα σε CO₂ εξυπηρετεί την διατήρηση του pH σε ουδέτερα επίπεδα της τάξης του 7,6-7,8. Τα τρυβλία περιέχουν ήδη υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας και το υγρό καλλιέργειας περιέχει νερό, ιόντα, νουκλεϊκά οξέα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, αντιβιοτικά, αυξητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες και ρυθμιστικά διαλύματα. Τα νουκλεϊκά οξέα δεν θεωρούνται απαραίτητα αλλά προάγουν τον σχηματισμό βλαστοκύστεων ενεργώντας ως πηγή ενέργειας (Rieger *et al.*, 1992), ρυθμιστές του ενεργού μεταβολισμού (Lane and Gardner, 2005), αντιοξειδωτικά (Liu and Foote, 1995) και ρυθμιστικά διαλύματα (Edwards *et al.*, 1998) και για αυτό προστίθενται. Η καλλιέργεια γίνεται σε θερμοκρασία 37° C και επειδή σε αυτή τη θερμοκρασία αρχίζει η δημιουργία οξειδωτικών υποπροϊόντων από τα περιεχόμενα του υγρού καλλιέργειας, τα αντιοξειδωτικά είναι απαραίτητα για την αποφυγή του οξειδωτικού στρες. Εξίσου απαραίτητη είναι και η αλλαγή του υγρού καλλιέργειας κάθε 24-48 ώρες έτσι ώστε να απομακρύνονται τα υποπροϊόντα που δημιουργούνται. Τα έμβρυα καλλιεργούνται σε ομάδες των 5-10 εμβρύων περίπου (έως και 50 έμβρυα) και σε όγκο υγρού καλλιέργειας 20-50 μL κάτω από σταγόνα ελαίου (Gardner, 2008).

Έμβρυα προβάτων από καλλιέργεια παρουσία ανθρώπινου ορού σε ποσοστό 20% φθάνουν το στάδιο της βλαστοκύστης περίπου 24 ώρες νωρίτερα από ότι θα έφθαναν *in vivo* (Walker *et al.*, 1992). Αυτή η πρόωρη παραγωγή βλαστοκύστης και άλλες ανωμαλίες, όπως ο κατακερματισμός των εμβρύων, η σκούρα όψη και ο μειωμένος αριθμός κυττάρων αναφέρθηκαν από την ίδια ομάδα της Αυστραλίας (Walker *et al.*, 1996), που επίσης θεωρεί αυξημένη την διάρκεια κύησης και συσχετίζει και ορισμένα νεογνικά προβλήματα, όπως το αυξημένο βάρος κατά την γέννηση το γνωστό ως 'σύνδρομο των μεγάλων απογόνων', σε αρνιά που προέρχονται από έμβρυα που καλλιεργούνται με ανθρώπινο ορό. Τέτοια προβλήματα δεν επιβεβαιώθηκαν για αρνιά που λαμβάνονται μετά την καλλιέργεια σε συνθετικό υγρό ωαγωγού με πρωτεϊνικά οξέα και ορό εμβρύου μόσχου (SOFaaBSA, Synthetic Oviduct Fluid with Bovine Serum Albumin and amino acids) (Thompson *et al.*, 1995).

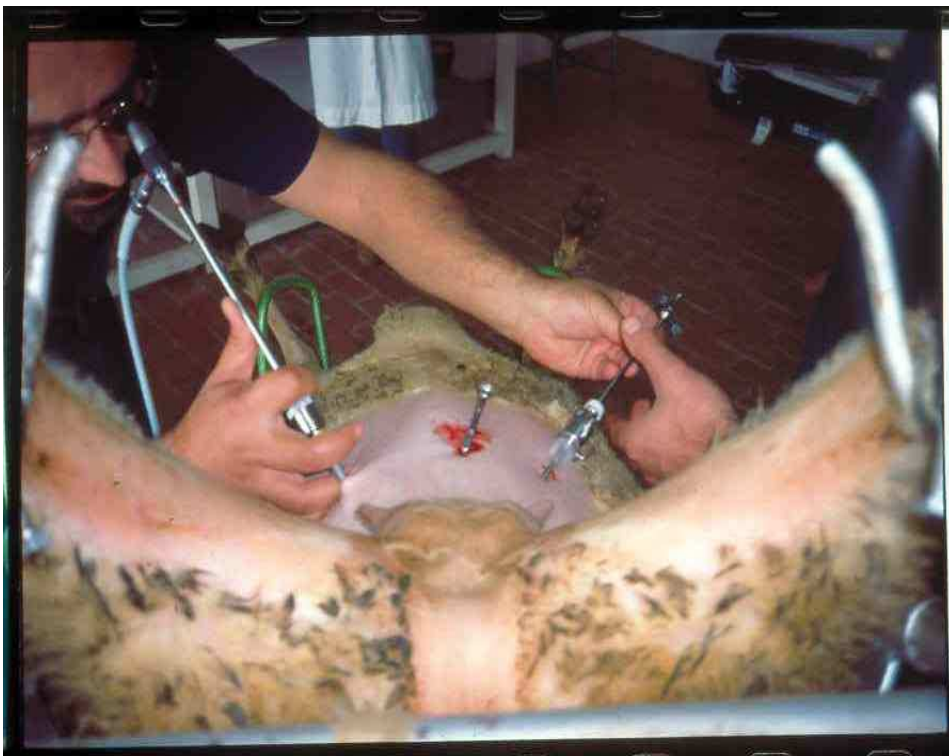
Παρά την πρόοδο στην καλλιέργεια των εμβρύων προβάτων, εξακολουθούν να υπάρχουν αρκετές διαφορές μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* γονιμοποιημένων εμβρύων. Η ανάπτυξη στο τέταρτο κυτταρικό κύκλο, η οποία συνδέεται με την μέγιστη ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος, είναι καθυστερημένη στην *in vitro* καλλιέργεια και ο βαθμός της συμπίεσης στο στάδιο του μοριδίου επίσης διαφέρει, σε σχέση με το αντίστοιχο στάδιο *in vivo* (Thompson, 1997). Σε μελέτη που έγινε σε mRNA αντίγραφα που εκφράζονται διαφορετικά σε βλαστοκύστες βοοειδών που προκύπτουν *in vitro* και *in vivo*, αποδείχτηκε ότι σε ποσοστό 85% τα 384 γονίδια που εξετάστηκαν είχαν μειωμένη έκφραση στις βλαστοκύστες που προέρχονταν από *in vitro* καλλιέργεια. Αρκετά από αυτά τα γονίδια εμπλέκονται στους μηχανισμούς της μεταγραφής και της μετάφρασης υποδεικνύοντας έτσι ότι ο λόγος που τα έμβρυα που προέρχονται από *in vitro* καλλιέργεια είναι χαμηλότερης ποιότητας είναι η ανεπάρκεια των γονιδίων που ελέγχουν την μεταγραφή και την μετάφραση. Είναι γνωστό ότι η μεταγραφή και η μετάφραση κατά τα πρώτα στάδια της κυτταρικής ανάπτυξης είναι ζωτικής σημασίας (Corcoran *et al.*, 2006).

4.4. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η μεταφορά εμβρύων στα πρόβατα, αντίθετα με ότι συμβαίνει στις αγελάδες, εφαρμόζεται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο. Οι μέθοδοι συλλογής και μεταφοράς εμβρύων με λαπαροτομή, που προτάθηκαν από τους Hunter *et al.* το 1955 έχουν ελάχιστα τροποποιηθεί. Οι κλασσικές αυτές τεχνικές είναι αξιόπιστες και αρκετά αποτελεσματικές, αλλά σχεδόν πάντα οδηγούν σε μετεγχειρητικές συμφύσεις, οι οποίες λειτουργούν αποτρεπτικά για την επαναληπτική χρησιμοποίηση του ίδιου ζώου σε προγράμματα μεταφοράς εμβρύων ή επηρεάζουν αρνητικά τη γονιμότητα του (Cutten, 1970). Οι προσπάθειες που έγιναν για την ανάπτυξη μη αιματηρών μεθόδων συλλογής δια μέσου του τραχήλου στα πρόβατα δεν απέδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε ότι αφορά στα συνολικά ποσοστά συλλογής (Coonrod *et al.*, 1984, 1986). Η χρήση λαπαροσκοπικών τεχνικών αποτέλεσε την εναλλακτική λύση για την επίλυση αυτών των προβλημάτων. Αρχικά οι λαπαροσκοπικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά (McKelvey *et al.*, 1985) και αργότερα για τη συλλογή των εμβρύων (McKelvey *et al.*, 1986; Nellenschulte and Niemann, 1992). Με τις τεχνικές αυτές ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες δημιουργίας μετεγχειρητικών συμφύσεων, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η επαναληπτική χρησιμοποίηση του ίδιου ζώου ως δότη ή δέκτη εμβρύων με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Έχει αναφερθεί συλλογή εμβρύων από τον ίδιο δότη μέχρι και τέσσερις φορές σε μηνιαία διαστήματα με ποσοστά συλλογής έως και 75% (Nellenschulte and Niemann, 1992).

Η συγκράτηση, η προετοιμασία του χειρουργικού πεδίου και οι τομές στα ζώα δέκτες γίνονται όπως και στα ζώα δότες των ωαρίων. συγκεκριμένα κατά την λαπαροσκοπική μεταφορά εμβρύων οι δέκτριες παραμένουν χωρίς τροφή και νερό για 24 και 12 ώρες, αντίστοιχα. Πριν την λήψη γίνεται αναισθητοποίηση των δεκτριών. Η αναισθητοποίηση γίνεται συνήθως με έναν α2 αγωνιστή (συνήθως ξυλαζίνη) και στη συνέχεια διατηρείται η αναισθησία με πεντοθάλη, κεταμίνη, ή πρωτοξειδίο του αζώτου, στη συνέχεια χορηγείται α2 ανταγωνιστής ως αντίδοτο στην ξυλαζίνη (συνήθως νοχιμβίνη ή τολαζολίνη). Στη συνέχεια, γίνονται δύο τομές (1 cm) του δέρματος σε θέση 3 έως 4cm δεξιά και αριστερά της μέσης κοιλιακής γραμμής και 4 έως 5 cm κεφαλικά της βάσης του μαστού. Στην αριστερή τομή εισάγεται το τροκάρ, διαμέσου του οποίου εισάγεται το λαπαροσκόπιο. Μετά την εκτίμηση της αντίδρασης των ωοθηκών μεταφέρονται τα έμβρυα στο σύστοιχο κέρα με την ωοθήκη που φέρει τα περισσότερα ωχρά σωμάτια. Για τη μεταφορά των εμβρύων εισάγεται στη δεξιά τομή δεύτερο τροκάρ για την είσοδο του τριχοειδούς σωληναρίου που περιέχει 1 έως 4 κατάλληλα για μεταφορά έμβρυα τοποθετημένα μεταξύ δύο φυσαλίδων αέρα και το οποίο είναι κατάλληλα προσαρμοσμένο σε σύριγγα 1ml. Από την ίδια τομή γίνεται και η

είσοδος της λαβίδας συγκράτησης. Για τη διευκόλυνση των χειρισμών και την αποφυγή τραυματισμών γίνεται εμφύσηση CO₂ στην κοιλιακή κοιλότητα με συσκευή πνευμοπεριτοναίου, υπό ελεγχόμενη πίεση, που συνδέεται με το τροκάρ ενδοσκοπίου. Η σταθεροποίηση των ωοθηκών γίνεται με τοποθέτηση ατραυματικής λαβίδας συγκράτησης σε θέση πλησίον του άκρου του κέρατος και εισάγεται το τροκάρ στον αυλό με κατεύθυνση προς το σώμα της μήτρας. Εναλλακτικά η εισαγωγή του τροκάρ γινόταν στο τελευταίο τρίτο του κέρατος αλλά με κατεύθυνση προς το άκρο του. Στη συνέχεια απομακρύνεται το στέλεχος και εισάγεται το τριχοειδές σωληνάριο. Αμέσως μετά την εναπόθεση των εμβρύων το σωληνάριο απομακρύνεται για να αποφευχθεί προσκόλληση των εμβρύων. Η σύγκλειση των τομών του δέρματος γίνεται με μεταλλικούς αγκήρες χωρίς άλλη φαρμακευτική αγωγή. Η αντιμετώπιση των αιμορραγιών γίνεται με διαθερμία (Amiridis et al, 1999) (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Μεταφορά εμβρύων λαπαροσκοπικά στο πρόβατο (Αμοιρίδης)

Μετά από χρήση λαπαροσκοπικών ή χειρουργικών μεθόδων έπειτα από την μεταφορά δύο εμβρύων ανά προβατίνα έχουν αναφερθεί ποσοστά εγκυμοσύνης 27% και 56% αντίστοιχα (Stefani *et al.*, 1990). Μετά από ανάλογη εργασία μεταφοράς 2 ή 3 εμβρύων στους ωαγωγούς με λαπαροσκοπικές τεχνικές τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν 51,5% και 21,5% αντίστοιχα (Besenfelder *et al.*, 1994). Σε προβατίνες της φυλής Χίου στις οποίες μεταφέρθηκαν από 1 έως 4 έμβρυα ανά προβατίνα αναφέρθηκαν ποσοστά εγκυμοσύνης 55% και ποσοστά εμβρύων που εξελίχθηκαν 39,5% (Amiridis *et al.*, 1999). Υψηλά ποσοστά εγκυμοσύνης 75% μετά από λαπαροσκοπική μεταφορά εμβρύων έχουν αναφερθεί από τους McKelvey *et al.* το 1985. Τα ποσοστά των εμβρύων που εξελίχθηκαν κυμαίνονταν μεταξύ 17% και 54% ανάλογα με το στάδιο εξέλιξης των εμβρύων και το στάδιο του οιστρικού κύκλου των δεκτριών (McKelvey *et al.*, 1985).

4.5. ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Πρωτόκολλα για την κατάψυξη εμβρύων προβάτων ήταν διαθέσιμα από τη δεκαετία του 1970, αφότου γεννήθηκε το πρώτο αρνί μετά από μια επιτυχή μεταφορά ενός κατεψυγμένου εμβρύου (Willadsen *et al.*, 1974).

Παρά το γεγονός ότι η τεχνολογία αυτή εφαρμόζεται περισσότερο από τρεις δεκαετίες, εξακολουθεί να έχει ποικίλα αποτελέσματα. Είναι σαφές ότι η επιτυχία της τεχνικής εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του σταδίου που βρίσκονται τα έμβρυα (αριθμός κυττάρων) (Menezo, 2004) της ποιότητας των εμβρύων (Pollard & Leibo, 1994), του είδους στο οποίο ανήκουν τα έμβρυα (βοοειδή, πρόβατα) (Dobrinisky, 2002) και του τρόπου παραγωγής τους (*in vivo* – *in vitro*) (Leibo, 1986; Hasler *et al.*, 1995; Rizos *et al.*, 2003). Επιπρόσθετα, μεγάλη σημασία έχει η τεχνική ψύξης και η τεχνική θέρμανσης (Moreira da Silva & Metelo, 2005) καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας των εμβρύων (Hochi *et al.*, 1996).

Στα αρχικά πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης με την **τεχνική «βήμα προς βήμα» (step by step)**, τα έμβρυα επωάζονται σε κατάλληλη συγκέντρωση κρυοπροστατευτικού μέσου (10%-11%) για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, ψύχονται στους -5 έως -9°C και προκαλείται σχηματισμός πάγου με την μέθοδο της σποράς κατά την οποία μια λαβίδα η οποία είναι ήδη σε ψύξη αγγίζει το φιαλίδιο στο οποίο περιέχονται τα έμβρυα με αποτέλεσμα η θερμοκρασία να μειωθεί με ρυθμό 0,3-0,06°C/ λεπτό και το νερό που υπάρχει στο διάλυμα να μεταπέσει σε στερεή κατάσταση, μέχρι να φθάσει στους -33°C με -40°C. Τότε το φιαλίδιο βυθίζεται σε υγρό άζωτο και παραμένει εκεί έως ότου χρησιμοποιηθεί (Fair *et al.*, 2001; Mucci *et al.*, 2006) Το κρυοπροστατευτικό μέσο αφαιρείται σταδιακά μετά την απόψυξη και το έμβρυο είναι έτοιμο για μεταφορά.

Αφότου παγιώθηκε η διαδικασία, συνεχίστηκε η έρευνα για την αύξηση της επιβίωσης των εμβρύων μέσω της χρησιμοποίησης κρυοπροστατευτικών μέσων χαμηλής τοξικότητας όπως αιθυλενογλυκόλης (Tervit and Goold, 1984), και ιδίως μετά την ενσωμάτωση στο κρυοπροστατευτικό μέσο, ενός μη ωσμωτικού μέσου, της σουκρόζης (Rall, 1992) που επιτρέπει την άμεση μεταφορά μετά την απόψυξη (Heyman *et al.*, 1987).

Από το 1995, υπήρξε μια σειρά από μελέτες που ανέφεραν επιτυχία στην κρυοσυντήρηση εμβρύων προβάτων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ζώντων απογόνων (Songsasen *et al.*, 1995). Έμβρυα προβάτων που κρυοσυντηρήθηκαν σε αιθυλενογλυκόλη και τα οποία βρίσκονταν στο στάδιο της βλαστοκύστης έδωσαν ζώντες απογόνους σε ποσοστό 36%, μετά την κυοφορία 47 εμβρύων σε 14 δικαιούχους. Μετά τη μεταφορά, 5 από τους δικαιούχους, οι οποίοι

έλαβαν 16 έμβρυα μεταξύ τους, γέννησαν 10 αρνιά (Cocero *et al.*, 1996) και αποδείχτηκε έτσι ότι ζώντα αρνιά παράγονται εξίσου μετά την κατάψυξη, την απόψυξη, και τη μεταφορά των μοριδίων ή των βλαστοκύστεων.

Καινοτομία στην κρυοδιατήρηση των εμβρύων των θηλαστικών προκάλεσε η **τεχνική της υαλοποίησης (vitrification)** που χρησιμοποίησαν πρώτοι σε ποντικό οι Rall and Fahy (1985), η οποία όμως ήταν ήδη γνωστή από το 1948 (Kauzmann, 1948). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, τα έμβρυα ψύχονται με ρυθμό 15-30°C/ λεπτό (Liebermann *et al.*, 2003), σε ένα υψηλής συγκέντρωσης κρυοπροστατευτικό μέσο (40%) που διαμορφώνει μια υαλώδη υφή χωρίς το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου. Η ψύξη γίνεται με την εμβάπτιση σε υγρό άζωτο. Η διαδικασία αυτή, που ονομάζεται υαλοποίηση, έχει υιοθετηθεί για πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένων των προβάτων (Ali and Shelton, 1993). Η υαλοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και για την κρυοδιατήρηση εμβρύων προβάτων μετά από IVP (Ptak *et al.*, 1999; Dattena *et al.*, 2000).

Η κρυοδιατήρηση με την χρήση της τεχνικής της υαλοποίησης υπερτερεί της συμβατικής μεθόδου εξαιτίας της απλότητας της, της χρήσης μη δαπανηρών μηχανημάτων και της ταχύτητάς της καθιστώντας την πιο φιλική προς τον χρήστη ακόμη και για χρήση μέσα στη μονάδα (Moore and Bonilla, 2006). Επιπρόσθετα, η υαλοποίηση θα μπορούσε να αντικαταστήσει τη συμβατική μέθοδο λόγω του ότι προλαμβάνει την καταστροφή των κυττάρων που προκαλείται λόγω της διαδικασίας ψύξης-απόψυξης (Kaidi *et al.*, 2001).

Η επιλογή των κρυοπροστατευτικών μέσων που χρησιμοποιούνται για την κρυοδιατήρηση των εμβρύων είναι πολύ σημαντική γιατί τα κρυοπροστατευτικά μειώνουν το σημείο ψύξης των εμβρύων, δίνοντας έτσι περισσότερο χρόνο για την αφυδάτωση των κυττάρων και επίσης γιατί σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι τοξικά (Moore and Bonilla, 2006). Βέβαια, η τοξικότητα ελαχιστοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες και με σύντομες περιόδους έκθεσης στα κρυοπροστατευτικά (Agca *et al.*, 1998). Η σειρά κατάταξης των κρυοπροστατευτικών μέσων ξεκινώντας από το πιο τοξικό είναι ή εξής: αιθυλενογλυκόλη, προπανοδιόλη, γλυκερόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο και ακεταμίδιο (Moore and Bonilla, 2006). Ωστόσο, αυτή η σειρά είναι εν μέρει αμφιλεγόμενη, λόγω των ποικίλων αποτελεσμάτων που δίνονται στη δημοσιότητα και σχετίζονται με το είδος του ζώου που εφαρμόζεται η τεχνική, το εμβρυϊκό στάδιο στο οποίο γίνεται η εφαρμογή της και τις προηγηθείσες συνθήκες καλλιέργειας των εμβρύων *in vitro*.

Ένα άλλο βασικό συστατικό των πρωτόκολλων κρυοδιατήρησης των εμβρύων είναι η χρήση μη διαπνεόντων σακχάρων. Τα σάκχαρα βοηθούν στην αφυδάτωση των κυττάρων, αυξάνοντας την ώσμωση των διαλυμάτων, και μειώνοντας την ποσότητα των πιο τοξικών κρυοπροστατευτικών μέσων που χρησιμοποιούνται. Επίσης, τα σάκχαρα συμπεριφέρονται σαν ωσμωτικά ρυθμιστικά διαλύματα μειώνοντας την έκταση της καταπόνησης των κυττάρων

(Liebermann *et al.*, 2003). Τα σάκχαρα που χρησιμοποιούνται στην κρυοδιατήρηση κατηγοριοποιούνται σε μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, φρουκτόζη, σορβιτόλη, μαννιτόλη), δισακχαρίτες (σακχαρόζη, τρεχαλόζη), και πολυσακχαρίτες (ραφινόζη) (Kuleshova *et al.*, 1999; Campos-Chillon *et al.*, 2006). Θεωρείται ότι οι μονοσακχαρίτες υπερτερούν στην χρήση από τους δισακχαρίτες λόγω της χαμηλότερης τοξικότητας στα έμβρυα και την ικανότητα υαλοποίησης σε χαμηλότερη συγκέντρωση (Kuleshova *et al.*, 1999).

Άλλες δυνατότητες για την βελτίωση της κρυοδιατήρησης περιλαμβάνουν τη χρήση μακρομορίων, βιολογικών στοιχείων και πρωτεϊνών. Τα μακρομόρια που χρησιμοποιούνται, πολυαιθυλενογλυκόλη 8000 (PEG), πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) 360000, Ficoll 70.000 ή 400.000, πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), αυξάνουν το ιξώδες, βοηθούν στην αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων πάγου, προστατεύουν από ρωγμές στην κυτταρική μεμβράνη των εμβρύων και είναι λιγότερο τοξικά από τα κρυοπροστατευτικά μέσα (Liebermann *et al.*, 2003). Η χρήση βιολογικών στοιχείων περιλαμβάνει τη χρήση αλβουμίνης ορού βοοειδών και ορού κρόκου αυγού που μειώνουν τη βλάβη που προξενείται στα έμβρυα κατά την διάρκεια της κρυοδιατήρησης. Ωστόσο, η χρήση βιολογικών στοιχείων είναι πιθανή πηγή μολυσματικών παραγόντων (Shaw *et al.*, 1997) και μπορεί να εμφανίζει προβλήματα που οφείλονται σε παραλλαγές μεταξύ των παρτίδων. Οι περισσότερες έρευνες εστιάζονται στην ανάπτυξη συστημάτων με σκοπό την άρση των εν λόγω πηγών μεταβλητότητας (Moore and Bonilla, 2006).

4.6. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Μετά την πρώτη δημοσιευμένη εργασία όπου παρήχθησαν αμνοί μέσω της μεταφοράς πυρηνικού υλικού (Willadsen, 1986) τα πρόβατα αντιπροσωπεύουν το βασικό πειραματικό μοντέλο για τη βασική και εφαρμοσμένη έρευνα στον τομέα της **κλωνοποίησης**. Η τεχνική της μεταφοράς πυρηνικού υλικού έχει περιγραφεί από τον Heyman (1998).

Το κλειδί για τη σωστή ερμηνεία της αιτίας της κακής ανάπτυξης των εμβρύων που προέρχονται από μεταφορά πυρηνικού υλικού, βρέθηκε από στοιχεία που αποκτήθηκαν από κλασικά πειράματα υβριδισμού (Johnson and Rao, 1970), όπου αποδείχτηκε ότι η μίτωση ασκεί μία δεσπόζουσα επίδραση επάνω στις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και προβλήματα τα οποία σχετίζονται με αυτή τη φάση συνοδεύουν την περαιτέρω ανάπτυξη του κυττάρου. Η μετάφαση 2 (MII) του ωοκυττάρου ακολουθεί αυτό τον κανόνα και όταν κατά την αποδιοργάνωση του πυρηνικού φάκελου που περιέχει το πυρηνικό υλικό υπάρξει πρόωρη συμπύκνωση της χρωματίνης (πρόωρη συμπύκνωση χρωμοσώματος, PCC), η οποία στον σωστό χρόνο επιβάλλεται προκειμένου να μεταφερθεί ο πυρήνας, μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένες ζημιές της χρωματίνης κατά την διάρκεια της αντιγραφής και φυσικά στην ανάπτυξη εμβρύων κακής ποιότητας που πεθαίνουν πρόωρα (Campbell *et al.*, 1994).

Ο πυρηνικός φάκελος λοιπόν διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση του διπλασιασμού του DNA (Blow and Laskey, 1998), και η αποδιοργάνωση του στο στάδιο της μετάφασης II του ωοκυττάρου ακολουθείται από την αντιγραφή των ήδη αναπαραχθέντων μορίων DNA (Campbell *et al.*, 1996a). Από αυτές τις σημαντικές παρατηρήσεις, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η κανονική ανάπτυξη των εμβρύων από πυρηνική μεταφορά θα μπορούσε να επιτευχθεί μόνο εάν συγχρονιστούν οι κυτταρικές φάσεις των δύο κυττάρων (Campbell *et al.*, 1994). Αν και τα πρωτόκολλα για το συγχρονισμό των βλαστομεριδίων είναι διαθέσιμα στο ποντίκι (Otaegui *et al.*, 1994), η διαδικασία αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα, γιατί απαιτείται χειρισμός δύο επιπέδων για την συγκρότηση του εμβρύου.

Η δημιουργία και η συντήρηση σε καλλιέργεια μόνιμης κυτταρικής σειράς που προέρχεται από έμβρυα προβάτων, θα μπορούσε θεωρητικά να παράσχει απεριόριστο αριθμό γενετικά ταυτόσημων πυρήνων για πυρηνική μεταφορά. Μια τέτοια προσέγγιση, για πρώτη φορά στα πρόβατα, έγινε από τους Galli *et al.*, 1991, όπου μεταφέρθηκαν έμβρυα που προέρχονταν από κύτταρικές σειρές σε ωάρια. Τέσσερα κανονικά έμβρυα μεταφέρθηκαν και μια εγκυμοσύνη διατηρήθηκε μέχρι την 45^η ημέρα. Μεταγενέστερα πειράματα πυρηνικής μεταφοράς που διεξήχθησαν στο Ινστιτούτο Roslin με καλλιέργεια κυττάρων

που προέρχονται από έμβρυα, νεογέννητα και ενήλικα πρόβατα ξεπέρασαν τα καθιερωμένα όρια της αναπαραγωγικής βιολογίας (Campbell *et al.*, 1996b) και παρήχθη το πρώτο κλωνοποιημένο αρνί από μεταφορά πυρηνικού υλικού σωματικών κυττάρων σε ωοκύτταρο που δεν περιείχε πυρήνα (Willmut *et al.*, 1997).

Μετά την γέννηση του πρώτου κλωνοποιημένου αρνιού, της Dolly, πολλά άλλα είδη θηλαστικών έχουν κλωνοποιηθεί χρησιμοποιώντας την **τεχνική της μεταφοράς πυρηνικού υλικού σωματικού κυττάρου (somatic cell nuclear transfer, SCNT)**. Οι αιτίες της χαμηλής επιτυχίας της τεχνικής ως προς την ποιότητα των κλωνοποιημένων εμβρύων και γεννημένων ατόμων, δεν έχει ακόμη κατανοηθεί πλήρως, αλλά φαίνεται ότι εμπλέκονται εξίσου τεχνολογικά προβλήματα και βιολογικοί παράγοντες. Τα προβλήματα αυτά μπορεί να εμφανίζονται κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των κλωνοποιημένων ωοκυττάρων και να επεκτείνονται καθόλη την διάρκεια της ζωής των ενήλικων ατόμων. Η χρησιμότητα των κλωνοποιημένων ατόμων επεκτείνεται σε πολλούς τομείς ανάμεσα στους οποίους είναι και οι εξής:

a. Στην βασική έρευνα η SCNT χρησιμοποιείται για την πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών της διαδικασίας της γονιμοποίησης και της ανάπτυξης του εμβρύου.

b. Η SCNT μπορεί να εφαρμοσθεί σε μοντέλα που χρησιμοποιούν γενετικά τροποποιημένα παραγωγικά ζώα που προέρχονται από διαγονιδιακά σωματικά κύτταρα και περιέχουν γονίδια που θεωρούνται υπεύθυνα για την πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να μελετήσουμε την δράση των γονιδίων αυτών και να την κατανοήσουμε όπως επίσης και να εφαρμόσουμε στα ζώα αυτά πειραματικές θεραπείες και να εξετάσουμε τον βαθμό στον οποίο τα γονίδια αυτά αντιδρούν στα εκάστοτε θεραπευτικά σχήματα.

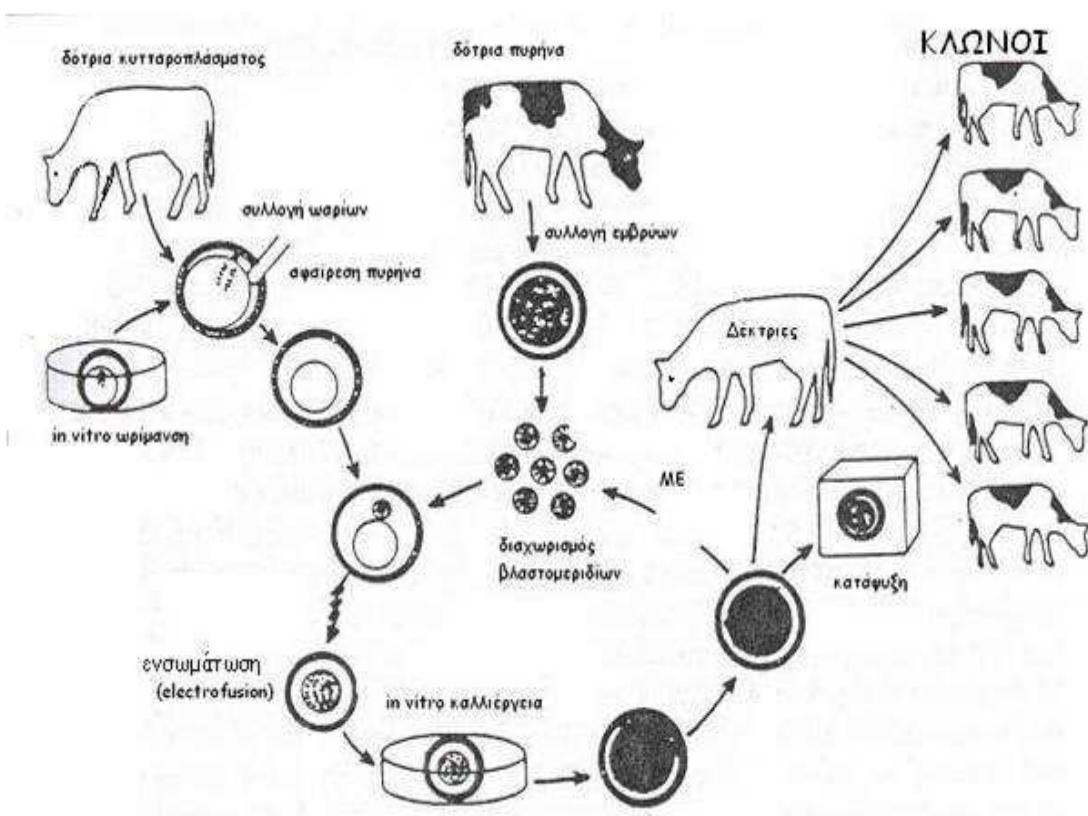
c. Τα γενετικά τροποποιημένα παραγωγικά ζώα που προέρχονται από την SCNT μπορούν να περιέχουν γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών. Έτσι είναι δυνατό να έχουμε μεγάλη παραγωγή δραστικών ουσιών μέσα στο γάλα ή στο κρέας των ατόμων αυτών.

d. Η SCNT μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό ή όχι με την δημιουργία διαγονιδιακών ζώων για την αύξηση της παραγωγικότητας των ζώων, την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ζώων και επομένως την βελτίωση των παραγόμενων προϊόντων (Vaita and Gierris, 2006)..

Πλέον έχουν ανοίξει νέες ευκαιρίες για την αναπαραγωγή των ζώων και έχει γίνει αποδεκτή η μεταβίβαση πυρηνικού υλικού ως πολύτιμο εργαλείο για την εξέλιξη του περίπλοκου μηχανισμού της αναπτυξιακής βιολογίας. Αυτή η φοβερή επιτυχία έκανε τους επιστήμονες να εστιάσουν την προσοχή τους στην μεταφορά πυρηνικού υλικού από εμβρυακές κυτταρικές σειρές (Wells, 1997)

και να αναθεωρήσουν πολλές από τις θεωρίες που σχετίζονται με την αναπτυξιακή βιολογία.

Ωστόσο, πλέον ο επιστημονικός κόσμος έχει πολλά επιστημονικά, κοινωνικά και ηθικά διλήμματα να αντιμετωπίσει καθώς είναι αμφισβητούμενο το κατά πόσο τελικά η τεχνική της κλωνοποίησης θα μπορέσει πραγματικά να εξυπηρετήσει τους σκοπούς που προαναφέρθηκαν καθώς όχι μόνο τα ποσοστά επιτυχίας της κλωνοποίησης είναι μικρά αλλά και τα κλωνοποιημένα ζώα που παράγονται δεν είναι ποτέ απολύτως όμοια. Δύο σχεδόν όμοια γενετικά έμβρυα μπορούν να διαφέρουν εξαιρετικά ως προς τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά. Αυτό επιδρά κυρίως στην παραγωγή κλωνοποιημένων παραγωγικών ζώων όπου τα υψηλά ποσοστά επιτυχίας, η αποδοχή από την κοινή γνώμη και η παραγωγή ατόμων με ιδιαίτερα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά είναι στοιχεία απαραίτητα για την εξοικονόμηση οικονομικών πόρων που υποστηρίζουν αυτές τις τεχνικές (Vaita and Gierris, 2006) (Εικόνα 24).

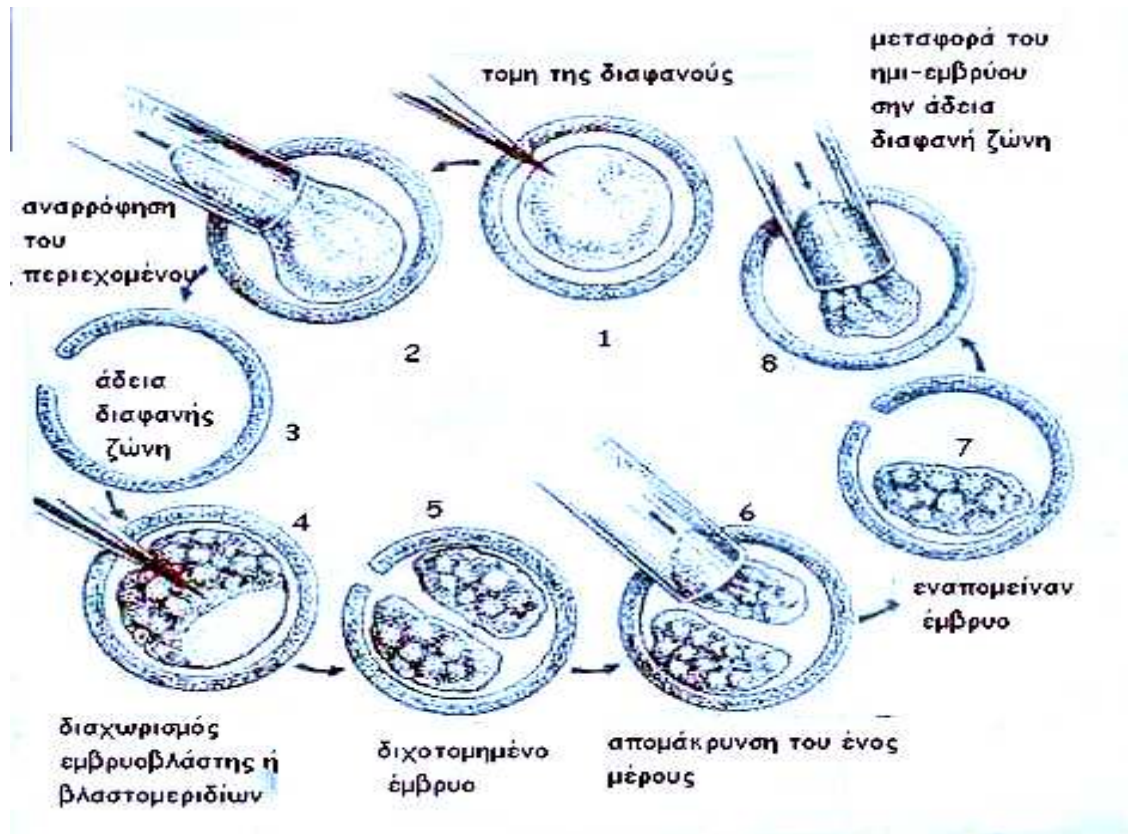


Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της κλωνοποίησης (Αμοιρίδης)

4.7. ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η διαδικασία για τον πολλαπλασιασμό των εμβρύων μέσω της **διχοτόμησης** τους έχει περιγραφεί λεπτομερώς από τον Willadsen (1979). Από το 1891 όμως είχαν ήδη γίνει οι πρώτες προσπάθειες διχοτόμησης από τον Hans Driesch, και το 1902 από τον Hans Spemann έγινε η πρώτη διχοτόμηση αμφιβίου (σαλαμάνδρας) (Driesch, 1891; Spemann, 1902). Ωστόσο, η απώλεια της πυρηνικής ακεραιότητας, ως αποτέλεσμα της διαφοροποίησης των κυττάρων, είναι ο κύριος περιοριστικός παράγοντας στον αέριο διαχωρισμό των βλαστομεριδίων. Στην πραγματικότητα, τα έμβρυα έχουν προγραμματιστεί να συμπυκνωθούν μετά από πέντε - έξι κύκλους διαίρεσης και κατά συνέπεια, ο αριθμός των κυττάρων είναι αναλογικά μειωμένος σε έμβρυα που έχουν υποστεί μικροχειρισμούς. Η διαίρεση των εμβρύων γίνεται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς σε πειράματα στα οποία είναι απαραίτητο να υπάρχουν μονοζυγωτικά δίδυμα

Το ποσοστό επιβίωσης των βλαστοκύστεων από έμβρυα που περιέχουν $1/2$, $1/4$ και $1/8$ του αρχικού βλαστομερούς είναι 80%, 50% και 6%, αντίστοιχα (Willadsen, 1981). Μια απλούστερη διαδικασία, γνωστή ως διαίρεση των εμβρύων, πρότεινε την διαίρεση των εμβρύων στο στάδιο του μοριδίου (Gatica *et al.*, 1984; Willadsen and Godke, 1984), γεγονός που δεν συνεπάγεται επικίνδυνες επιπτώσεις στην βιωσιμότητα του εμβρύου, υπό την προϋπόθεση ότι το μορίδιο διαιρείται συμμετρικά (Chesne *et al.*, 1987). Η διαίρεση των εμβρύων έχει απλοποιηθεί σημαντικά και έχει χρησιμοποιηθεί για την εμπορική εμβρυομεταφορά σε πρόβατα (Vivanco *et al.*, 1991). Ωστόσο, το ανυπέβλητο όριο της διαίρεσης εμβρύων είναι ο περιορισμένος αριθμός των απογόνων ανά έμβρυο που έχει υποστεί μικροχειρισμούς και αυτός ο αριθμός δεν μπορεί να ξεπεράσει τα 8 έμβρυα (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση της διαίρεσης εμβρύων (Αμοιρίδης)

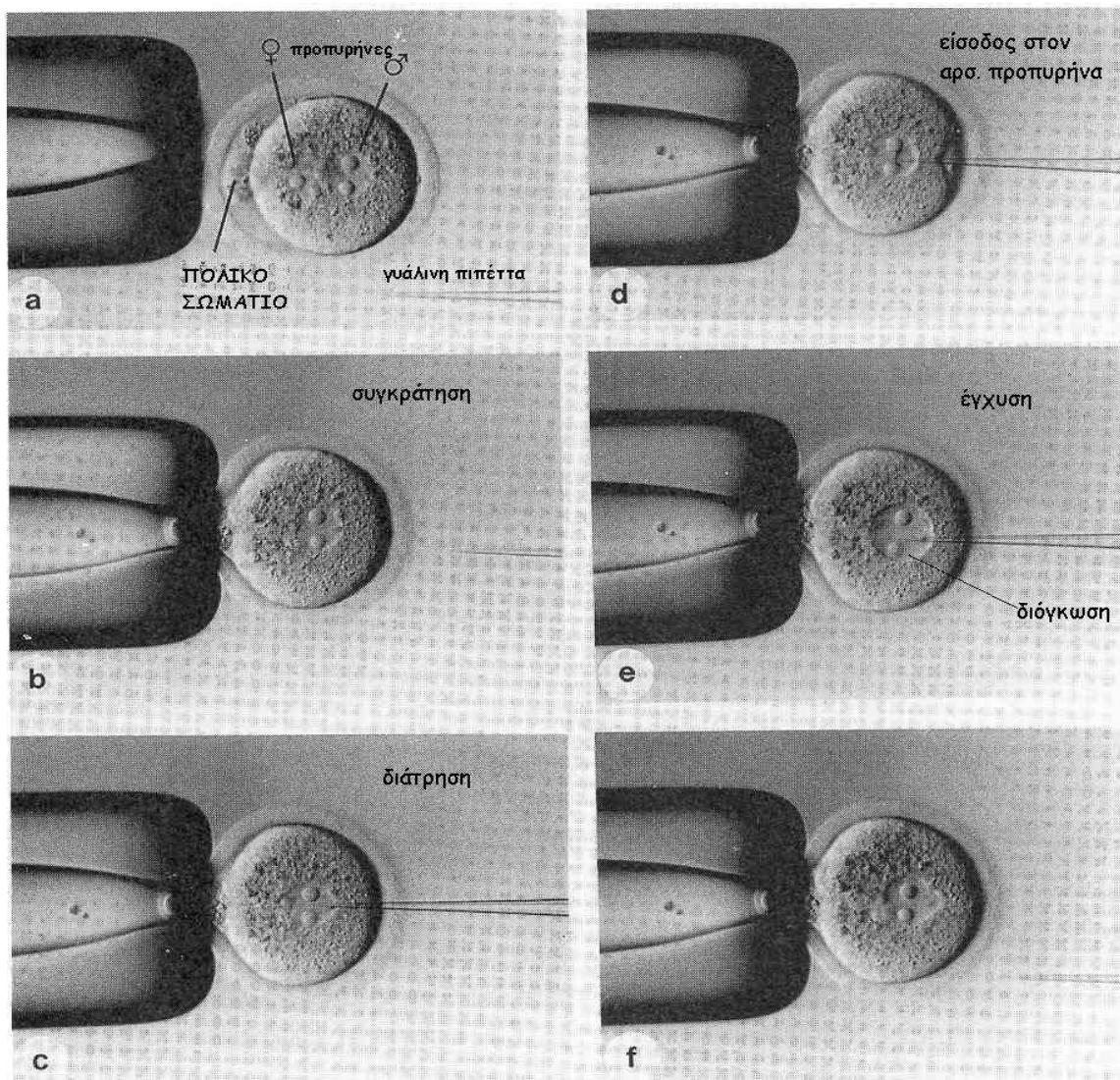
4.8. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΖΩΩΝ

Απευθείας έγχυση του DNA στον ένα από τους δύο προπυρήνες του ζυγωτού, χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση των πρώτων **διαγονιδιακών προβάτων**, τα οποία παράγουν τον ανθρώπινο αντι-αιμοροφυλλικό παράγοντα IX στο έκκριμα του γάλακτος (Clark *et al.*, 1989). Απευθείας έγχυση DNA χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για ποικίλες τεχνικές. Οι κυριότεροι περιοριστικοί παράγοντες σε αυτή την τεχνική είναι το μικρό ποσοστό των εμβρύων που αναπτύσσονται και το γεγονός ότι λιγότερο από το 1% των ατόμων που τελικά παράγονται ενσωματώνουν και εκφράζουν το ξένο γονιδίωμα. Επιπλέον με την μέθοδο αυτή μπορούν να εισαχθούν μόνο μερικά νέα γονίδια στο γονιδίωμα του οργανισμού και αυτό συχνά προκαλεί προβλήματα λόγω του ότι η εισαγωγή των γονιδίων γίνεται σε τυχαία θέση και είναι δυνατό να διακόψει την αλληλουχία των αμινοξέων κάποιου άλλου γονιδίου σημαντικού για την επιβίωση του οργανισμού (Paterson *et al.*, 2003). Αυτή η τυχαία ενσωμάτωση είναι σίγουρα σημαντική για το ευρύ φάσμα των καταστάσεων που προκύπτουν μετά την έγχυση DNA σε έναν από τους δύο προπυρήνες και οι οποίες είναι η με εκτεταμένες ζημιές ανάπτυξη του εμβρύου, η πρόκληση θανατηφόρων μεταλλάξεων που προκαλούνται από τη διακοπή ενός ή περισσοτέρων γονιδίων, η αποσιώπηση της αναμενόμενης διαγονιδιακής αλλαγής και, τέλος η απρόβλεπτη έκφραση της διαγονιδιακής αλλαγής (Wilmut and Clark, 1990).

Παρότι είναι υπαρκτές όλες οι παραπάνω ανεπιθύμητες επιπτώσεις η απευθείας έγχυση DNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία προβάτων που εκφράζουν φαρμακευτικές πρωτεΐνες στο γάλα τους (Wright *et al.*, 1991). Πιο ακριβής είναι η στοχευμένη γενετική τροποποίηση σε καλλιέργειες κυττάρων. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται σε ανασυνδυασμό του γονιδίου που εισήχθη με προσθήκη αλληλουχιών στα άκρα του που είναι συμπληρωματικές με αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται στην θέση του γονιδιώματος που επιδιώκουμε να εισέλθει το εξωγενές DNA. Ο ανασυνδυασμός ομόλογων χρωμοσωμάτων είναι πλέον ρουτίνα στην εργαστηριακή τεχνική και χρησιμοποιείται για τη γενετική τροποποίηση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Η παραγωγή ζώντων αμνών από πυρηνική μεταφορά από καλλιέργεια κυττάρων (Campbell *et al.*, 1996b) έχει δώσει τη δυνατότητα να προκληθούν ακριβείς αλλαγές στη γενετική δομή πολλών ειδών. Στην πραγματικότητα έχουν παραχθεί διαγονιδιακοί αμνοί με τη μεταφορά γενετικά τροποποιημένων πυρήνων σε ωοκύτταρα (Schniecke *et al.*, 1997; Βαϊνάς *et al.*, 1998). Η πυρηνική μεταφορά με τη μεσολάβηση της διαγένεσης προσφέρει ποικίλα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την έγχυση DNA στον ένα από τους δύο προπυρήνες του ζυγωτού όπως ότι δεν σπαταλούνται πολύτιμοι οικονομικοί

πόροι για την χρησιμοποίηση δεκτριών για κυοφορία εμβρύων που αποδεικνύεται εκ των υστέρων ότι δεν έχουν τροποποιηθεί γενετικά. Επίσης η πυρηνική μεταφορά επιτρέπει τον προκαθορισμό του φύλου του ζώου, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα δύο φορές, όταν το φύλο των διαγονιδιακών ζώων είναι κρίσιμης σημασίας, όπως για παράδειγμα, στον τομέα παραγωγής γάλακτος (Paterson *et al.*, 2003) (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων (Αμοιρίδης)

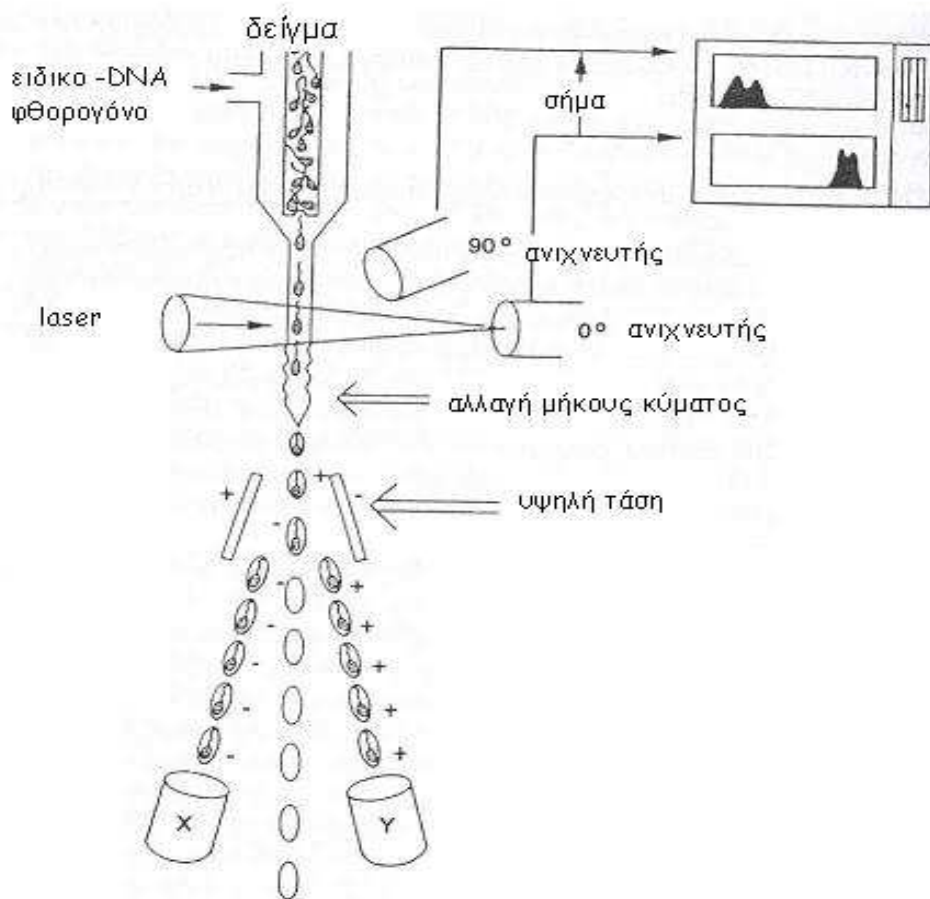
4.9. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Για την επιλογή του φύλου του εμβρύου μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε δυο τρόπους. Είτε να χρησιμοποιήσουμε σπέρμα στο οποίο έχει γίνει διαχωρισμός με βάση το ποιο φυλετικό χρωμόσωμα, X ή Y, περιέχεται σε αυτό και να γονιμοποιηθεί με αυτό το ωάριο, είτε γίνεται προσδιορισμός του φύλου απευθείας στο έμβρυο

4.9.1. Διαχωρισμός του φύλου στο σπέρμα

Τα σπερματοζωάρια διαχωρίζονται σε δύο τύπους. Αυτά που φέρουν το X χρωμόσωμα (θηλεοπροσδιοριστικά) και αυτά που φέρουν το Y χρωμόσωμα (αρρενοπροσδιοριστικά). Τα X και τα Y χρωμοσώματα είναι τα φυλετικά χρωμοσώματα και καθορίζουν το φύλο του εμβρύου (Σμοκοβίτης, 2004). Ο **διαχωρισμός φύλου στο σπέρμα** είναι ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων του σπέρματος ανάλογα με το αν περιέχουν το X ή το Y χρωμόσωμα. Μια ευρεία αναγνωρισμένη διαφορά μεταξύ των X και Y χρωμοσωμάτων των σπερματοζωαρίων είναι η ποσότητα του DNA που περιέχεται στο φυλετικό χρωμόσωμα. Αυτή τη διαφορά εκμεταλλεύεται η μέθοδος της ‘κυτταρομετρίας ροής’ για να διαχωρίσει τα σπερματοζωάρια ανάλογα με το φυλετικό χρωμόσωμα που περιέχουν (Pinkel *et al.*, 1982; Garner *et al.*, 1983). Η μέθοδος έγκειται στη σήμανση των σπερματοζωαρίων με φθορίζουσα ουσία που συνδέεται με το DNA και στην έκθεσή τους σε U.V. ακτινοβολία. Τα σπερματοζωάρια ακολουθούν διαφορετικές κατευθύνσεις ανάλογα με την ένταση του σήματος. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι είναι αργή (περίπου 300.000 σπερματοζωάρια ανά ώρα) και ως εκ τούτου δεν είναι κατάλληλη για τεχνητή σπερματέγχυση. Επιπλέον, η χρήση της μπορεί να προκαλέσει τερατογενέσεις και ως εκ τούτου τα ποσοστά βιωσιμότητας των παραγόμενων εμβρύων μειώνονται (Εικόνα 27).

Η απόδοση σε σπέρμα βοοειδών, ταξινομημένο με βάση το αν φέρει το χρωμόσωμα X ή Y, με την τεχνική του ‘φθορισμού (FACS)’ έχει βελτιωθεί ιδιαίτερα (Johnson *et al.*, 1998) και μικρής κλίμακας δοκιμές τεχνητής σπερματέγχυσης με επιλεγμένο σπέρμα έχουν ήδη πραγματοποιηθεί σε βοοειδή (Cran *et al.*, 1997). Για άλλη μια φορά, αν και θεωρητικά η αποδοτικότητα της FACS σε σπέρμα κριού μπορεί να έχει παρόμοια αποτελέσματα, η χρήση της σε τεχνητή σπερματέγχυση προβάτων είναι περιορισμένη λόγω του υψηλού κόστους της.



Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση της κυτταρομετρίας ροής (Αμοιρίδης)

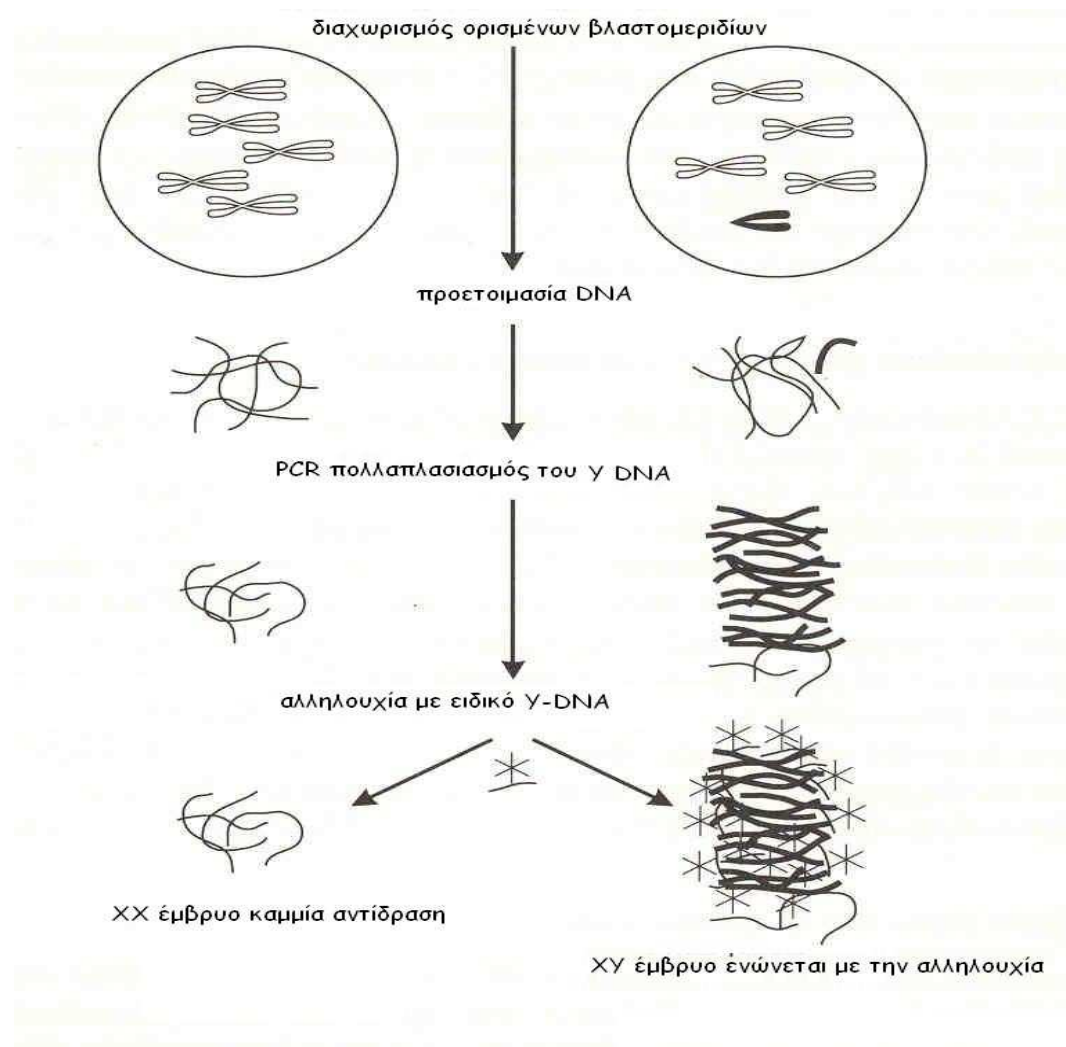
4.9.2. Προσδιορισμός του φύλου στο έμβρυο

Η κατάσταση δεν αλλάζει για την **επιλογή εμβρύων καθορισμένου φύλου**. Ο προσδιορισμός φύλου του εμβρύου είναι η διαδικασία κατά την οποία προσδιορίζεται το ακριβές φύλο του εμβρύου που παράχθηκε από συλλογή-μεταφορά εμβρύων ή κυρίως από την *in vitro* παραγωγή εμβρύων.

Από το αρκετά προχωρημένο έμβρυο (στάδιο μοριδίου ή βλαστοκύστης) με την διαδικασία του μικροχειρισμού απομονώνεται ένα βλαστομερίδιο. Από αυτό το βλαστομερίδιο μπορεί να προσδιοριστεί το φύλο του εμβρύου, προσδιορίζοντας το φυλετικό χρωμόσωμα που περιέχει. Αυτό μπορεί να γίνει με χρωμοσωματική ανάλυση (προσδιορισμός καρύοτυπου), με ανοσολογικό προσδιορισμό του αντιγόνου (X-Y) και τελευταία με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) όπου πολλαπλασιάζεται χαρακτηριστική συμπληρωματική αλληλουχία του Y χρωμοσώματος που δίνει και τα καλύτερα αποτελέσματα.

Εμπορικά πακέτα για επιλογή εμβρύων καθορισμένου φύλου βοοειδών με PCR είναι διαθέσιμα σε λογικές τιμές και πιθανόν, λόγω της υψηλής ομολογίας

μεταξύ των ειδών, τα περισσότερα από αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς και για επιλογή εμβρύων καθορισμένου φύλου προβάτων, όμως οι δημοσιευμένες εργασίες είναι περιορισμένες (Naitana *et al.*, 1997) (Εικόνα 28).

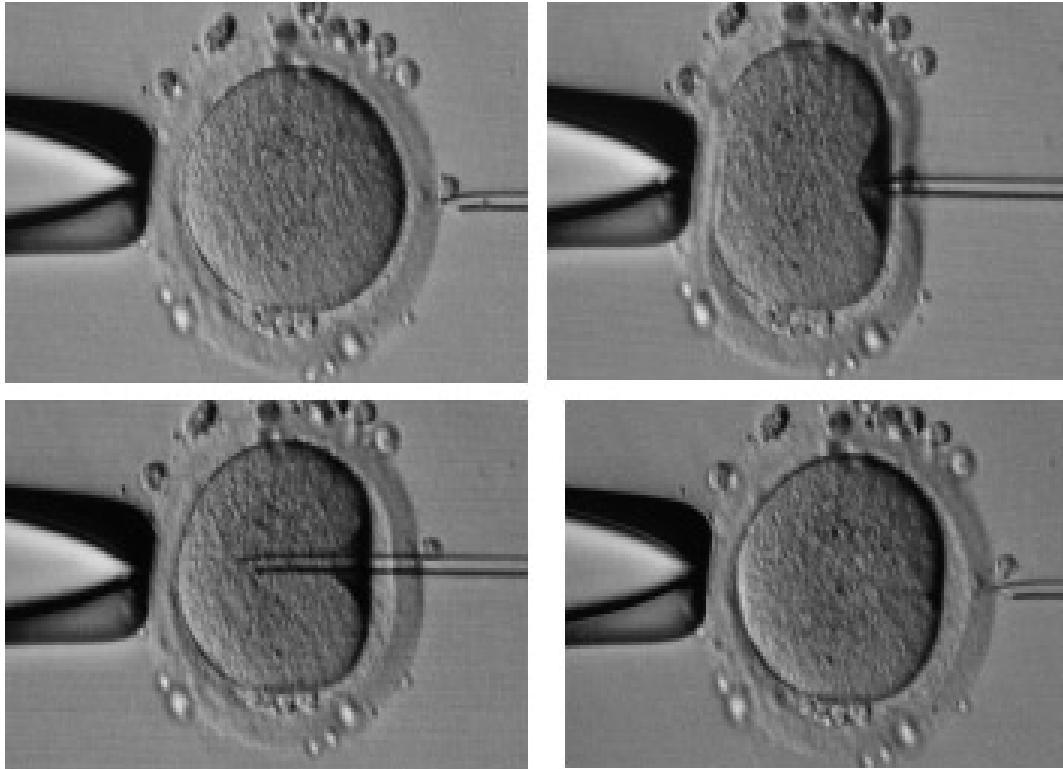


Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση του προσδιορισμού του φύλου εμβρύου (Αμοιρίδης)

4.10. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ (ICSI)

Η ενδοκυτταροπλασματική εναπόθεση σπερματοζωαρίου (ICSI) είναι μια νέα τεχνική στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και παρέχει συναρπαστικές ευκαιρίες για τη μελέτη των βασικών μηχανισμών της γονιμοποίησης και αυτών που διέπουν την αρχική ανάπτυξη του εμβρύου. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή της εμποδίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα χαμηλά ποσοστά επιτυχίας που αναφέρθηκαν σε συνδυασμό με το αυξημένο κόστος. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων και ζώντων γεννημένων αμνών είναι πολύ μειωμένα όταν προέρχονται από ζυγωτά σχηματισμένα από ICSI. Η ICSI έχει ιδιαίτερα χαμηλή απόδοση σε σύγκριση με άλλες εναλλακτικές λύσεις υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως η τεχνητή σπερματέγχυση και η εξωσωματική γονιμοποίηση (Garcia-Rosello *et al.*, 2009). Η ενδοκυτταροπλασματική εναπόθεση σπερματοζωαρίου συνίσταται στην γονιμοποίηση ενός ωαρίου που βρίσκεται στη φάση της μετάφασης II (MII) και την άμεση έγχυση ενός μόνο σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα το οποίο έχει άθικτο τόσο το ακρόσωμα όσο και την σπερματική μεμβράνη (Εικόνα 29). Αυτή η τεχνική αναφέρθηκε με επιτυχία για πρώτη φορά σε κρινητούς (χάμστερ) πριν από 40 χρόνια (Uehara και Yanagimachi 1976) και στη συνέχεια, τελειοποιήθηκε στον άνθρωπο (Palermo *et al.* 1992).

Η ICSI έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την επίλυση της υπογονιμότητας επειδή είναι δυνατή η χρήση σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα και τους όρχεις με παρόμοια αποτελέσματα (Nagy *et al.*, 1995; Shulman *et al.*, 1999; Vernaev *et al.*, 2003). Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διατήρηση της βιοποικιλότητας, την παραγωγή διαγονιδιακών ζώων ή για την επίλυση προβλημάτων στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Παρόλη την πρόσφατη πρόοδο, η παραγωγή εμβρύων *in vitro* από ωθήκες που προέρχονται από σφαγείο έχει περιοριστεί λόγω της υψηλής συχνότητας πολυσπερμίας (Coy and Romar, 2002). Έτσι, η ICSI παρουσιάζεται ως μία εναλλακτική λύση για την *in vitro* παραγωγή εμβρύων.



Εικόνα 29. Τεχνική της ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίου (Αμοιρίδης)

Η ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου σε παραγωγικά ζώα μπορεί να είναι ένα πολύτιμο εργαλείο έρευνας για τη διερεύνηση των θεμελιωδών αρχών σε θέματα σχετικά με την αλληλεπίδραση των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων κατά τη γονιμοποίηση. Ιδίως, σε σχέση με την ενεργοποίηση του ωοκυττάρου και τον προπυρηνικό σχηματισμό του αρσενικού ειδικά στα πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Πειραματικές μελέτες είναι αναγκαίες για την αναγνώριση βαθύτερων προβλημάτων ή περιορισμών σε τεχνικές και μηχανισμούς πριν την ευρεία εφαρμογή στην πράξη.

5. ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

5.1. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΚΤΡΙΩΝ

Ανεξάρτητα από το σχήμα της διέγερσης των ωοθηκών που θα χρησιμοποιηθεί, το ποσοστό γονιμοποίησης μετά από φυσική οχεία σε προβατίνες στις οποίες έχει προκληθεί πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία, ιδίως σε αυτές στις οποίες η ωοθυλακιορρηξία υπερβαίνει τα δέκα ωοθυλάκια, εμφανίζεται μειωμένο (Gordon, 1997). Πιθανή αιτία της αποτυχίας της γονιμοποίησης μετά από προγραμματισμένη γονιμοποίηση σε θηλυκά που έχουν υποστεί θεραπεία με FSH, θεωρείται ο κακός συγχρονισμός της ρήξης των ωοθυλακίων μετά την απόσυρση του προγεσταγονούχου σπόγγου. Στα πρόβατα, θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένα χρονοδιάγραμμα τεχνητής σπερματέγχυσης με βάση την εμφάνιση της κορυφής της LH, ($X \pm SD$, $48,7 \pm 11,1$ h) και η εμφάνιση του οίστρου παρατηρείται $38,5 \pm 9$ h (Μενεγάτος, 1990). Για να συγχρονιστεί η στιγμή της ωοθυλακιορρηξίας συνίσταται η χορήγηση μια ένεσης GnRH 30-36 ώρες μετά την απομάκρυνση του σπόγγου (Walker *et al.*, 1989).

Το χαμηλό ποσοστό που παρατηρείται κατά την γονιμοποίηση θηλυκών τα οποία είχαν μεγάλη ανταπόκριση σε θεραπεία πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, μετά από κολπική σπερματέγχυση ή σπερματέγχυση στον τράχηλο της μήτρας, μπορεί να αποδοθεί τόσο σε διαταραχές κατά την μεταφορά του σπέρματος (Evans and Armstrong, 1984) όσο και στην ποιότητα του ωαρίου (Moore *et al.*, 1985). Το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε από τους Trounson and Moore, 1974 με τη χειρουργική εναπόθεση σπέρματος κατευθείαν στο κέρασ της μήτρας και ακολούθως με την χρησιμοποίηση της λαπαροσκοπικής σπερματέγχυσης επιλύθηκε κάθε δυσκολία (Robinson *et al.*, 1989). Συνήθως, εκτελείται μία σπερματέγχυση περίπου 48-50 ώρες μετά την απομάκρυνση του προγεσταγονούχου σπόγγου η οποία παρέχει ικανοποιητικά ποσοστά γονιμοποίησης των ωαρίων και ανάπτυξης των εμβρύων (Scudamore *et al.*, 1991a, b), αποδεικνύοντας ότι η εγγενής ικανότητα του ωαρίου να γονιμοποιείται δεν πλήττεται μετά από θεραπεία με FSH.

Το υψηλό επίπεδο γονιμοποίησης των ωαρίων προβατίνων, μετά τη θεραπεία πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, σε συνδυασμό με ανταγωνιστή GnRH και FSH επιβεβαιώνεται σε προβατίνες της φυλής Lacaune με λιγότερο από 30 ωοθυλακιορρηξίες. Σε θηλυκά με περισσότερες

από 30 ωοθυλακιορρηξίες, υπάρχει σημαντική πτώση τόσο στην γονιμοποίηση όσο και στο ποσοστό των μεταφέρισμων εμβρύων. Στην εξωσωματική γονιμοποίηση αυτών των προβατίων που ανταποκρίνονται υπερβολικά στην θεραπεία πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, καθορίζεται αναπόφευκτα αν τα εν λόγω ωάρια γονιμοποιούνται κανονικά και μπορούν να αναπτυχθούν έως το στάδιο της βλαστοκύστης. Αν μπορούν, τότε αποδεικνύεται ότι είναι η μειωμένη *in vivo* μεταφορά του σπέρματος στην σάλπιγγα που είναι επακόλουθο αυτών των ακραίων συνθηκών και όχι η γονιμοποιητική ικανότητα των ωαρίων.

5.2. ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ ΩΘΟΥΛΑΚΙΩΝ

Η συχνότητα με την οποία είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί αναρρόφηση ωαρίων από τα ωοθυλάκια αμνάδων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Αρχικά αποδείχθηκε ότι είναι δυνατό να εφαρμοστεί επανειλημμένα πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία σε πρόβατα, σε διάστημα 1 έτους, χωρίς να αντιμετωπίζουν σοβαρή μείωση στην ανταπόκριση των ωοθηκών (Moore and Shelton, 1962; Torres and Sevellec, 1987) και αργότερα επιχειρήθηκε να γίνει αναρρόφηση των ωοθυλακίων. Μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί αναρρόφηση μια φορά σε αμνάδες διαφόρων ηλικιών (Earl *et al.*, 1995), μια φορά σε ηλικία 4 έως 5 εβδομάδων (Ptak *et al.*, 1999), τέσσερις φορές σε μηνιαία διαστήματα ή μία φορά σε διαφορετικό μήνα (Valasi *et al.*, 2006, 2007b), έξι φορές κάθε 14 ημέρες αρχίζοντας από την ηλικία των 8 έως 9 εβδομάδων (Anel *et al.*, 1997) ή 3 έως 5 φορές ξεκινώντας από την ηλικία των 4 εβδομάδων (Ptak *et al.*, 2003). Φαίνεται ότι η ανάπτυξη ωοθυλακίων σε αμνάδες (Ptak *et al.*, 2003) και σε προβατίνες (Morton *et al.*, 2005) επηρεάζεται αρνητικά εάν έχει προηγηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων σε μικρότερη ηλικία. Ωστόσο, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν και κατά πόσο οι προηγούμενες αναρροφήσεις επηρεάζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων μετά από ορμονική αγωγή ή εάν τελικά η ίδια η κατάσταση των ωοθυλακίων (πληθυσμός- διάμετρος) είναι εκείνη που καθορίζει το αποτέλεσμα (Cognie, 1999)

Στην περίπτωση της επανειλημμένης αναρρόφησης των ωοθυλακίων σε μικρά μεσοδιαστήματα, οι συμφύσεις που προκαλούνται από την λαπαροτομική συλλογή ενδέχεται να μειώσουν τον αριθμό λήψεων από τον ίδιο δότη (Nellenschulte *et al.*, 1992). Σύγχρονες μελέτες αποδεικνύουν ότι η επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση ωοθυλακίων δεν επηρεάζει το χρόνο ενήβωσης και τη μελλοντική γονιμότητα των δοτριών νεαρών αμνάδων (Valasi *et al.* 2006, 2009). Ωστόσο, η τεχνική της λαπαροσκοπικής προσέγγισης της ωοθήκης φαίνεται ότι υπερτερεί της λαπαροτομής, διότι μειώνονται οι πιθανότητες δημιουργίας μετεγχειρητικών συμφύσεων (Armstrong *et al.*, 1997; Alberio *et al.*, 2002). Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί δημιουργία συμφύσεων στο 35% των προβατινών που υποβάλλονται σε επανειλημμένη λαπαροσκοπική αναρρόφηση μέσα σε διάστημα 10 εβδομάδων. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η επανειλημμένη διακολπική αναρρόφηση ωοθυλακίων σε άνηβες μοσχίδες προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις στις ωοθήκες, οι οποίες όταν είναι ιδιαίτερα εκτεταμένες είναι πιθανό να επηρεάσουν τη φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών και κατά επέκταση, τη γονιμότητα των ζώων (Snel-Oliveira *et al.*, 2002).

5.3. ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΩΝ ΜΕΓΑΛΩΝ ΑΠΟΓΟΝΩΝ (LARGE OFFSPRING)

Η γέννηση ασυνήθιστα μεγάλων αμνών ή μόσχων, που συνδέεται με μη φυσιολογικές γεννήσεις και υψηλή συχνότητα εμφάνισης θνησιγενών εμβρύων, έχει αναφερθεί μετά από την μεταφορά πυρηνικού υλικού, την μεταφορά εμβρύων σε δέκτριες που δεν έχουν απόλυτα συγχρονισμένο κύκλο με τις δότριες και τη μεταφορά *in vivo* ή *in vitro* παραγόμενων εμβρύων όταν για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιείται ομόλογος ή και ετερόλογος ορός (Willadsen *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1996). Επίσης έχει παρουσιαστεί και κατά την φυσιολογική εγκυμοσύνη όταν διαταράσσεται το επίπεδο της διατροφής (McEnoy *et al.*, 1998). Προφανώς, ένα ακατάλληλο περιβάλλον όπου το έμβρυο επωάζεται για ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα ή μια εκτεταμένη χειραγώγηση, όπως ο επαναπρογραμματισμός του γονιδιώματος, διαταράσσει γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση της ανάπτυξης του εμβρύου. Παρόλο που το σύνδρομο της εμβρυϊκής υπερανάπτυξης έχει αναφερθεί και σε άλλα είδη, αυτό έχει προκύψει από διαφορετικές αιτίες όπως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αυθόρμητες μεταλλάξεις ή γενετικές επεμβάσεις (Hastie, 1997).

Το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό του συνδρόμου είναι το μεγάλο μέγεθος κατά τη γέννηση, αν και η εμβρυϊκή υπερανάπτυξη έχει ανιχνευθεί ήδη από την ημέρα 21 της κύησης στα πρόβατα (Young *et al.*, 1996). Η αύξηση σε βάρος κατά τη γέννηση ποικίλλει ευρέως, δύο φορές το κανονικό βάρος κατά τη γέννηση πάντως, δεν είναι ασυνήθιστο. Έχει αναφερθεί και περίπτωση όπου γεννήθηκε αρνί που είχε βάρος, κατά τη γέννηση, πέντε φορές πάνω από το φυσιολογικό (Walker *et al.*, 1996). Η δυστοκία που συνδέεται με το αυξημένο βάρος κατά τη γέννηση απαιτεί συχνά την χρήση καισαρικής τομής (Kruip and den Daas, 1997). Η διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι συχνά μεγαλύτερη από τη φυσιολογική, αν και αυτό δεν αρκεί για να εξηγήσει την υπερβολική αύξηση του βάρους κατά την γέννηση (Walker *et al.*, 1992). Άλλα χαρακτηριστικά φαινόμενα που σχετίζονται με το σύνδρομο των μεγάλων απογόνων κατά τη γέννηση περιλαμβάνουν δυσκολίες στην αναπνοή, απροθυμία των νεογνών να θηλάσουν και αιφνίδιους θανάτους (Walker *et al.*, 1996; Garry *et al.*, 1996). Αυξημένοι πρώιμοι εμβρυϊκοί θάνατοι, ιδιαίτερα στο πρώτο μισό της εγκυμοσύνης (Ranilla *et al.*, 1998), συνδέονται επίσης με αυτό το σύνδρομο (Walker *et al.*, 1992; Wilmut *et al.*, 1997).

Φαίνεται, πως υπάρχει πολύ μικρή συνεισφορά της μητέρας στην όλη διαδικασία. Παρόλα αυτά η διαφοροποίηση της μητρικής διατροφής έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει το σύνδρομο των μεγάλων απογόνων. Προβατίνες οι οποίες τρέφονταν με υπερβολικά ποσά μη πρωτεϊνικής

προέλευσης αζώτου, υπό μορφή ουρίας, για διάστημα από 21 ημέρες πριν από το ζευγάρι και έως την ημέρα 63 της κυοφορίας, οδήγησε σε μεγάλο μέγεθος αμνούς κατά τη γέννηση (McEnoy *et al.*, 1998). Δεν είναι γνωστό εάν το ωάριο ή το έμβρυο (ή και τα δύο) διαφοροποιήθηκαν λόγω της μακράς περιόδου έκθεσης σε ουρία.

Εμπειρικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι όλοι οι παράγοντες που δημιουργούν την συγκεκριμένη διαταραχή δρουν μέσω ενός και μόνο μηχανισμού κατά την διάρκεια της δημιουργίας του εμβρύου. Παρόλα αυτά η πιθανότητα να υπάρχουν περισσότεροι του ενός φαινότυποι οι οποίοι περικλείονται στον όρο 'σύνδρομο των μεγάλων απογόνων' και επομένως περισσότεροι του ενός μηχανισμοί οι οποίοι επιδρούν στο έμβρυο δεν μπορεί να αποκλειστεί. Ενδιαφέρων παρουσιάζει το γεγονός ότι η εμφάνιση των κάτω σιαγόνων χαμηλότερα σε αρνιά που προέρχονται από *in vitro* παραγωγή και από κλωνοποιημένα έμβρυα (Schnieke *et al.*, 1997) παρουσιάζεται και σε ποντίκια μετά από *in vitro* παραγωγή (Dean *et al.*, 1998). Αυτό υποδεικνύει ότι πιθανόν είναι κοινά τα γονίδια τα οποία επιδρούν κατά την δημιουργία του εμβρύου και διαφοροποίηση της έκφρασης τους προκαλεί την εμφάνιση διαφοροποιημένων ως προς τον φυσιολογικό φαινότυπο (Eggenschwiler *et al.*, 1997). Τέτοια γονίδια είναι το IGF-2, IGF-2r, H19 τα οποία είναι ήδη γνωστό ότι εκφράζονται σε έμβρυα και κυήματα τα οποία πάσχουν από το σύνδρομο των μεγάλων απογόνων (Young *et al.*, 1998).

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εξημέρωση των προβάτων έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πολιτισμών πολλών χωρών κυρίως όμως στις χώρες της Μεσογείου . Σήμερα, η εκτροφή προβάτων έχει σημαντική συμβολή στην αγροτική οικονομία πολλών κρατών όπως είναι η Ιταλία, η Γαλλία, η Ισπανία και η Ελλάδα.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει αλλάξει δραματικά η διαχείριση των προβάτων, κυρίως της γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, μέσω της διατροφής, της γενετικής βελτίωσης, της βελτίωσης της υγιεινής και της εντατικοποίησης των μεθόδων εκτροφής. Ωστόσο, παρά τις βελτιώσεις αυτές, η τεχνητή γονιμοποίηση είναι η μόνη τεχνολογία που καθημερινά εφαρμόζεται σε προγράμματα επιλογής. Παρόλο που οι υπόλοιπες αναπαραγωγικές τεχνολογίες θεωρούνται συστήματα που χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά από γενετιστές, πρέπει να αλλάξει η νοοτροπία αυτή για να επέλθει ακόμη πιο έντονη πρόοδος ως προς την παραγωγή ζώων υψηλής παραγωγικής και αναπαραγωγικής αξίας.

Με τα προγράμματα πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας – μεταφοράς εμβρύων (MOET) μπορεί να αναμένεται γενετική πρόοδος από 15 έως 40% στις μικρές μονάδες και μέχρι 100% σε μεγάλα κοπάδια, σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς (Nicholas, 1996) ή μπορεί και να είναι αμελητέα η πρόοδος βάσει άλλων ερευνητών (Barillet, 1997). Επίσης, από τις τεχνολογίες που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, ορισμένες έχουν περιορισμένες προοπτικές για βελτίωση, ιδίως οι χειρουργικές και λαπαροσκοπικές διαδικασίες. Οι κυριότερες από αυτές πάντως, όπως η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας *in vitro* και οι τεχνολογίες κλωνοποίησης, εξακολουθούν να έχουν μεγάλο περιθώριο για βελτίωση.

Ωστόσο, οι αναπαραγωγικές τεχνολογίες που σχετίζονται με την χρήση φαρμακευτικών ουσιών μάλλον δεν θα τύχουν της αποδοχής των καταναλωτών οι οποίοι ειδικά τα τελευταία χρόνια στρέφονται όλο και περισσότερο προς την χρησιμοποίηση πρακτικών φιλικών προς το φυσικό περιβάλλον και την ευζωία των ζώων. Τεχνολογίες όμως, όπως η κλωνοποίηση ή η δημιουργία διαγονιδιακών ατόμων, παρότι είναι δαπανηρές και πολυσύνθετες από τεχνικής απόψεως, έχουν αναπτυχθεί ιδιαίτερα από βιοτεχνολογικές εταιρείες και η παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών από διαγονιδιακά ζώα έχει πλέον εμπορική εφαρμογή. Αυτό το γεγονός πρέπει να μας κάνει να αντιμετωπίσουμε αυτές τις τεχνικές με ένα τρόπο που να μην θα είναι κριτικός αλλά από την άλλη δεν θα είναι επικριτικός και δεν θα αποτελεί εμπόδιο για όποια εξέλιξη μπορεί να επιτευχθεί.

Σημαντικό είναι βέβαια, να αναγνωρισθούν και να απομακρυνθούν από πριν παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για διαφόρων ειδών ανωμαλίες στην παραγωγή και την ανάπτυξη των εμβρύων όπως και την μετέπειτα παραγωγική και αναπαραγωγική τους ζωή ως ενήλικα άτομα, έτσι ώστε να μην υπάρξει κάποια στιγμή αδιέξοδο. Αυτό σημαίνει συνετή χρήση των τεχνολογιών αναπαραγωγής η οποία θα εναρμονίζεται με τις ανάγκες για εύρεση λύσεων σε πολύπλοκα ζητήματα και συγχρόνως θα ικανοποιεί ηθικά ως προς τον τρόπο που χειρίζονται τα ζώα και τον τρόπο που εκείνα θα το ανταποδώσουν.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αμοιρίδης Γ.Σ., Kuehholzer B., Besenfelder U., Λυμπερόπουλος Α., Βαϊνάς Ε., Λαπαροσκοπική συλλογή και μεταφορά εμβρύων προβάτων της φυλής Χίου, Δελτίον Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας 50 (3) (1998) 244-249.

Βαϊνάς Β., Besenfelder U., Χριστοδούλου Β., Kuehholzer B., Αμοιρίδης Γ.Σ., Μπελιμπασάκη Σ., Brem G., Παραγωγή διαγονιδιακών προβάτων: Μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής P77 (ρα_{s1}-καζείνη - χυμοζίνη) των βοοειδών σε ζυγωτά - έμβρυα προβάτων φυλής Χίου, Δελτίον Ελλ. Κτην. Εταιρείας 50 (1998) 138-143.

Βαλάση Ε., Αναρρόφηση ωοθυλακίων σε νεαρές αμνάδες: μελέτη της ποιότητας των συλλεγόμενων ωαρίων και της αναπαραγωγικής ικανότητάς τους, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2006).

Βλάχος Κ., Η τεχνητή σπερματέγχυσις εις τα κατοικίδια ζώα, Εκδόσεις Ν. Νικολαΐδη, Θεσσαλονίκη, (1959).

Καζλαρής Χ.Ε., Το Χρυσό μου Παιδί, Εκδόσεις Π. Τραυλός Ε. Κωσταράκη Ο.Ε., Αθήνα, (1996).

Καλογιάννης Δ., Αξιολόγηση της *in vitro* γονιμοποίησης ωοκυττάρων από προβατίνες άνοιστης περιόδου μετά από χρήση hFSH και rFSH στο στάδιο της ωρίμασης, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, (2006).

Μενεγάτος Ι., Οι ενδοκρινικές μεταβολές κατά την ορμονική αγωγή του συγχρονισμού του οίστρου με προγεσταγόνο (MAP) και γοναδοτροπίνη ορού εγκύου φορβάδας (PMSG) στις προβατίνες, Διδακτορική Διατριβή, Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (1990).

Ρογδάκης Ε., Αναπαραγωγή του προβάτου, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα, (2004).

Σαμαρτζή Φ., Μελέτη της ανταπόκρισης των προβάτων φυλής Χίου στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας μετά από χορήγηση PMSG και *in vitro* εκτίμηση της βιωσιμότητας των εμβρύων, Διδακτορική Διατριβή, Α.Π.Θ. (1993).

Σμοκοβίτης Α., Φυσιολογία, Εκδόσεις Αφοι Κυριακίδη, Αθήνα, Τέταρτη έκδοση, (2004).

Χαδιώ Σ., Μενεγάτος Ι., Ανταπόκριση της υπόφυσης και των όρχεων στη χορήγηση LHRH και HCG, αντίστοιχα, σε κριούς φυλής Ανατολικής Φριςλανδίας, Εποχικές Διακυμάνσεις, Δελτίον Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 44 (3) (1993) 189-196.

Agca Y., Monson R.L., Northey D.L., Mazni O.A., Schaefer D.M., Rutledge J.J., Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: Normal calving, birth weight and gestation lengths, Theriogenology 50 (1998) 147-162.

Alberio R., Olivera J.; Roche A., Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes, *Small Ruminant Research*, 46 (2002) 81-87.

Ali J., Shelton J.N., Design of vitrification solution for cryopreservation of embryos, *J. Reprod. Fert.* 99 (1993a) 471-477.

Ali J., Shelton J.N., Successful vitrification of day-6 sheep embryos, *J. Reprod. Fert.* 99 (1993b) 65-70.

Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Paz P., Chamorro C., Pena F.J., Dominguez J.C., Celorrio I., Relation between the depth of cervical insemination and prolificacy in sheep, In: *Proceedings of the 50th ICAR: Gametes. Development and Function*. Milan, Italy (1998) 504.

Alvarez M., Estudio del cuello uterino en la oveja Churra como metodo de mejora de la via vaginal en la inseminacion artificial, Thesis Doctoral, Veterinary School, University of Leon, (2000) Spain.

Amiridis G.S., Rekkas C.A., Fthenakis G.C., Vainas E., Lymberopoulos A., Christodoulou V., Belisaki S., Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes, *Theriogenology* 57 (2002) 1143-1150.

Amiridis G.S., Robertson L., Reid S., Boyd J.S., O'Shaughnessy P.J., Jeffcoate I.A., Plasma estradiol, FSH and LH concentration after dominant follicle aspiration in the cow, *Theriogenology*. 52 (1999) 995-1003.

Amiridis G.S., Valasi I., Menegatos I., Rekkas C., Goulas P., Papanikolaou T., Deligiannis C., Luteal stage dependence of pituitary response to GnRH in cyclic dairy ewes subjected to synchronization of ovulation *Reproduction Fertility Development* 17 (2005) 769-774.

Amorim C.A., Lucci C.M., Rodrigues A.P., Carvalho F.C., Figueiredo J.R., Rondina D., Cecchi R., Giorgetti A., Martini A., Goncalves P.B., Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries, *Theriogenology* 53 (2000) 1251-1262.

Anel L., Alvarez M., Martinez-Pastor F., Garcia-Macias V., Anel E., de Paz P., Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination, *Reprod. Dom. Anim.* 41 (2006) 30-42.

Anel L., Kaabi M., Abroug B., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., de la Fuente L.F., Paz P., Factors influencing the fertility of the vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay, *Theriogenology* 63 (2005) 1235-1247.

Anel L., Paz P., Alvarez M., Chamorro C., Boixo J.C., Manso A., Gonzalez M., Kaabi M., Anel E., Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen, *Theriogenology* 60 (2003) 1293-1308.

- Anel L., Sevillano C., Alvarez M., Alegre B., Anel E., Dominguez J.C., Carbajo M.T., De la Fuente J., Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs, *Theriogenology* 47 (1997) 152.
- Armstrong D.T., Effects of maternal age on oocyte development competence, *Theriogenology* 55 (2001) 1303-1322.
- Armstrong D.T., Evans G., Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats, *Theriogenology* 19 (1983) 31-42.
- Armstrong D.T., Irvine B., Earl C.R., In vitro fertilization of follicular oocytes from juvenile lambs and their developmental competence in vitro and in vivo, *Biol. Reprod.* 50 (1) (1994) 189.
- Armstrong D.T., Kotaras P.J., Earl C.R., Advances in the production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb, *Reprod. Fertil. Dev.* 9 (1997) 333-339.
- Averill R.L.W., Rowson L.E.A., Ovum transfer in sheep, *J. Endocrinol.* 16 (1958a) 326-336.
- Averill R.L.W., The production of living sheep eggs, *J. Agric. Sci.* 50 (1958b) 17-33.
- Baldassarre H., Karatzas C.N., Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats, *Anim. Reprod. Sci.* 82-83 (2004) 255-266.
- Balinsky B.I., An introduction to developmental biology, Blackwell Scientific, Oxford – London, 1976.
- Bari F., Khalid M., Wolf B., Haresign W., Murray A., Merrell B., The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep, *Theriogenology* 56 (2001) 147–155.
- Barillet F., Genetic of milk production, in: Piper L., Ruvinsky A. (Eds.), *The Genetics of Sheep*, CAB International Wallingford, UK, (1997) 539-564.
- Barry D.M., van Niekerk C.H., Rust J., Vanderwalt T., Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol, *Theriogenology* 33 (1990) 190.
- Bartlewski P.M., Beard A.P., Cook S.J., Chandolia R.K., Honaramooz A., Rawlings N.C., Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy, *J. Reprod. Fertil.* 115 (1999a) 111-124.
- Bartlewski P.M., Beard A.P., Rawlings N.C., Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season, *Anim. Reprod. Sci.* 57 (1999b) 67-88.
- Bartlewski P.M., Beard A.P., Rawlings N.C., Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrous, *Anim. Reprod. Sci.* 57 (1999c) 51-66.

- Bartlewski P.M., Beard A.P., Rawlings N.C., Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs, *Small Rumin. Res.* 63 (2006) 189-198.
- Bavister B.D., Co-culture for embryo development: is it really necessary, *Hum. Reprod.* 7 (1992) 1339-1341.
- Besenfelder U., Zinovieva N., Dietrich E., Sohnrey B., Holtz W., Brem G., Tubal transfer of goat embryos using endoscopy, *Vet. Rec.* 135 (20) (1994) 480-481.
- Biggers J.D., Whitten W.K., Whittingham D.G., The culture of mouse embryos in vitro, In: *Methods of Mammalian Embryology*, Ed. J. C. Daniel, Jr. Freeman San Francisco (1971) 86.
- Bindon B.M., Piper L.R., Cahill L.P., Driancourt M.A., O'Shea T., Genetic and hormonal factors affecting superovulation, *Theriogenology* 25 (1986) 53-70.
- Bindon B.M., Piper L.R., Induction of superovulation in sheep and cattle by injections of PMSG and ovine anti-PMSG immune serum, *Theriogenology* 8 (1977) 1711..
- Bister J-L., Noel B., Perrad B., Mandiki S.N.M., Mbayahaga J., Paguay R., Control of ovarian follicles activity in the ewe, *Dom. Anim. Endocrin.* 17 (1999) 315-328.
- Blow J.J., Laskey R.A., A role for nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle, *Nature* 332 (1988) 546-548.
- Boscos C.M., Samartzi F.C., Dellis S., Rogge A., Stefanakis A., Krambovitis E., Use of progestogen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep, *Theriogenology* 58 (2002) 1261-1272.
- Bousseau S., Brillard J.P., Marguant-Le G.B., Guerin B., Camus A., Lechat M., Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents, *Theriogenology* 50 (1998) 699-706.
- Brand A., de Jong W.H., Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrus cycle in sheep, *J. Reprod. Fertil.* 33 (1973) 431-439.
- Brebion P., Baril G., Cognié Y., Vallet J.C., Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins, *Ann. Zootech.* 41 (1992) 331-339.
- Briggs R., King T.J., Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs, *National Academy of Sciences, U.S.* 41 (1955) 321-325.
- Brinster R.L., A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst, *Exp Cell Res.* 32 (1963) 205-208.
- Briois M., Belloc J.P., Brebion P., Guerin Y., Cognie Y., Increased embryo production in superovulated elite Lacaune ewes pretreated with a GnRH agonist, in *Proc. 8 th Meet. Eur. Embryo Trans. Assoc.*, (1992) 132.

Byskov A.G., Hoyer P.E., Embryology of mammalian gonads and ducts, In: Knobil E. and Neil J.D. The Physiology of Reproduction. Raven Press; New York, USA, (1994) 487-540.

Cahill L.P., Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 30 (1981) 135-142.

Cahill L.P., Mauleon P., A study of the population of primordial and small follicles in the sheep, *J. Reprod. Fertil.* 61 (1981) 201-206.

Campbell B.K., Scaramuzzi R.J., Webb R., Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49 (1995) 335-350.

Campbell K.H.S., Loi P., Cappai P., Wilmut I., Improved development of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated pre-activated oocytes, *Biol. Reprod.* 49 (1994) 933-942.

Campbell K.H.S., Loi P., Otaegui P.J., Wilmut I., Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer, *Rev. Reprod.* I (1996a) 406.

Campbell K.H.S., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I., Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line, *Nature* 380 (1996b) 64- 66.

Campos-Chillon L.F., Walker D.J., de la Torre-Sanchez J.F., Seidel G.E., Jr., In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos, *Theriogenology* 65 (2006) 1200-1214.

Cappai P., Cognie Y., Branca A., Use of the ram effect to induce sexual activity in Sarda: Ewes, *The Male in Farm Animal Reproduction*, pp 316–323, Ed M Courot, The Hague: Martinus Nijhoff Publishers.

Chargaff E., Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation, *Cellular and molecular life sciences*, 6 (1950) 201.

Cheng W.T.K., In vitro fertilization of farm animal oocytes, Ph.D. Thesis University of Cambridge (1985).

Chesné F., Colas G., Cognie Y., Guérin Y., Sevellec C., Lamp production using superovulation, embryo collection and transfer, *Theriogenology* 25 (1987) 751-757.

Christova Y., James P.S., Jones R., Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidate injury from oxygen free radicals, *Mol. Reprod. Dev.* 68 (2004) 365-372.

Chupin D., Combarrous Y., Procureur R., Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle, *Theriogenology* 211 (1984) 219.

Clark L.A., Watson D., Leeka J., Diurnal variation in the positive affects, *Motivation and Emotion* 13 (1989) 205-234.

Clarke I.J., Findlay J.K., Cummins J.T., Evans W.J., Effects of ovine follicular fluid on plasma LH and FSH secretion in ovariectomized ewes to indicate the site of action of inhibin, *J. Reprod. Fertil.* 77 (1986) 575-585.

Cocero M.J., Lopez Sebastian A., Barragan M.L., Picazo R.A., Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol, *Cryobiology* 33 (1996) 502-507.

Cognié Y., Baril G., Poulin N., Beckers J.F., The ovulation rate obtained after a superovulatory treatment associating GnRH antagonist and pFSH is highly repeatable, *Proc. 16th Mtg. Assoc. Eur. Trans. Emb. (AETE)* (2000) 130.

Cognie Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P., Current status of embryo technologies in sheep and goat, *Theriogenology* 59 (2003) 171-188.

Cognie Y., Benoit F., Poulin N., Khatir H., Driancourt M.A., Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep, *J. Reprod. Fertil.* 112 (1998) 379-386.

Cognie Y., Chupin D., Saumande J., The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes, *Theriogenology* (1986) 25.

Cognié Y., Poulin N., Developmental competence of goat oocytes is increased after in vitro maturation with follicular fluid from goats stimulated by gonadotropins, *Proc. 14th Int. Cong. Anim. Reprod.* 18 (2000) 39.

Cognie Y., Poulin N., Mermillod P., Cysteamine improves in vitro goat oocyte maturation in defined medium, *Proc. 18th Mtg. Assoc. Eur. Trans. Emb. (AETE)* (2002) 154.

Cognié Y., Poulin N., Pisselet C., Monniaux D., Effect of atresia on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of sheep oocytes in vitro, *Theriogenology* 43 (1995), 188.

Cognié Y., State of the art in sheep-goat embryo transfer, *Theriogenology* 51 (1999) 105-116.

Cohen J., Simons R.F., Edwards R.G., Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts, *J. In vitro Fertile. Embryo Transfer* 2 (1985) 59-64.

Cohen M.A., Lindheim S.R., Sauer M.V., Donor age is paramount to success in oocyte donation, *Human Reproduction* 14 (11) (1999) 2755-2758.

Coonrod S.A., Bowen J., Kraemer D.C., Non surgical collection of ovine embryos, *Proc of the 5th Ann. Con. of the Amer. Embryo Transfer Assoc.* (1984) 83-87.

Coonrod S.A., Coren B.R., McBride B.L., Bowen M.L., Kraemer D.C., Successful non-surgical collection of ovine embryos, *Theriogenology* 25 (1986) 149.

Corcoran D., Fair T., Park S., Rizos D., Patel V., Smith G.W., Coussens P.M., Ireland J., Boland M.P., Evans A.C., Lonergan P., Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos, *Reproduction* 131 (2006) 651–660.

Coy P., Romar R., In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reproduction Fertility Development* 14 (2002) 275–286.

Cran D.G., McKelvey W.A.C., King M.E., Dolman D.F., McEvoy T.G., Broadbent P.J., Robinson J.J., Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted semen, *Theriogenology* 47 (1997) 266.

Crozet N., Huneau D., DeSmedt V., Theron M.C., Torrès S., Sevellec C., In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res.* 16 (1987) 159–170.

Crozet N., Manipulation of oocytes and in vitro fertilization, *J. Reprod. Fertil.* 43 (1991) 235-243.

Cutten I. N., Immediate and long-term effects of post-mating laparotomy on the lambing performance of Merino ewes, *Proc. Austr. Soc. Anim. Prod.* 8 (1970) 388.

D'Alessandro A., Martemucci G., Colonna M.A., Cafueri C., Toteda F., Some effects of adding pLH in defined amounts to purified pFSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrus ewes, *Anita. Reprod. Sci.* 47 (1997) 91-98.

Darwin C., *On the Origin of Species*, New York: D. Appleton (1859).

Darwin C., Wallace A.R., On the tendency of species to form varieties, *Journal of the Linnean Society of London* (1858).

Dattena M., Ptak G., Loi P., Cappai P., Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts, *Theriogenology* 53 (2000) 1511-1519.

Dattena M., Vespignani S., Branca A., Gallus M., Ledda S., Naitana S., Cappai P., Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone, *Theriogenology* 42 (1994) 235-239.

De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F., Baldassarre H., Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42 (1995) 432-436.

De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F., Baldassarre H., Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro, *Mol. Reprod. Dev.* 42 (1995) 432-436.

De Matos D.G., Gasparrini B., Pasqualini S.R., Thomson J.G., Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content, *57* (2002) 1443-1451.

- Dean W., Bowden L., Aitchinson A., Klose J., Moore T., Mesenes J.J., Reik W., Feil R., Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes, *Development* 125 (1998) 2273-2282.
- Deligiannis C., Valasi I., Rekkas C.A., Goulas P., Theodosiadou E., Lainas T., Amiridis G.S., Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine insemination in ewes, *Reprod. in Dom. Animals* 40 (2005) 6-10.
- DeSmedt V., Crozet N., Ahmed-Ali M., Martino A., Cognié Y., In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* 37 (1992) 1049-1060.
- Dimitriadis I., Rekkas E.A., Vainas E., Amiridis G.S., Rekkas C.A., Effects of guaiazulene on in vitro embryo production, *Reprod. Fert. Dev.* 1 (2007) 262.
- Dobrinsky J.R., Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 57 (2002) 285-302.
- Donovan A., Hanrahan J.P., Kummen E., Duffy P., Boland M.P., Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrus, *Anim. Reprod. Sci.* 84 (2004) 359-368.
- Driancourt M.A., Cahill L.P., Bindon B.M., Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes, *J. Reprod. Fertil.* 73 (1985a) 93-107.
- Driancourt M.A., Follicular dynamics in sheep and cattle, *Theriogenology* 35 (1991) 55-78.
- Driancourt M.A., Gibson W.R., Cahill L.P., Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep, A review, *Reprod. Nutr. Dev.* 25 (1985b) 1-15.
- Driancourt M.A., Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep, *J. Reprod. Fertil.* 80 (1987) 207-212.
- Driancourt M.A., Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction, *Theriogenology* 55 (2001) 1211-1239.
- Duggavathi R., Bartlewski P.M., Barret D.M.W., Rawlings N.C., Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes, *Theriogenology* 60 (2003) 495-510.
- Earl C.R., Irvine B.J., Kelly J.M., Rowe J.P., Armstrong D.T., Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs, *Theriogenology* 43 (1995) 203.
- Eckery D.C., Moelker C.L., Nett T.M., Sawyer H.R., Recombinant bovine somatotropin does not improve superovulatory response in sheep, *J. Anita. Sci.* 72 (1994) 2425-2430.

- Edwards L.J., Williams D.A., Gardner D.K., Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum. Reprod.* 13 (1998) 3441–3448.
- Edwards R.G., Bavister B.D., Steptoe P.C., Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 221 (1969) 632–635.
- Edwards RF, Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes, *Nature* 208 (1965) 249-251.
- Eggenschwiler J., Ludwig T., Fisher P., Leighton P.A., Tilghman S.M., Efstratiadis A., Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes, *Genes Development* 11 (1997) 3128–3142.
- Eppleton J., Salamon S., Moore N.W., Evans G., The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen, *Anim. Reprod. Sci.* 36 (1994) 211-225.
- Evans A.C., Duffy P., Hynes N., Boland M.P., Waves of follicle development during the oestrous cycle in sheep, *Theriogenology* 53 (2000) 699-715.
- Evans A.C., Flynn J.D., Duffy P., Knight P.G., Boland M.P., Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep, *Reproduction* 123 (2002) 699-715.
- Evans A.C., Flynn J.D., Quinn K.M., Daffy P., Quinn P., Madgwick S., Crosby T.F., Bolan M.P., Beard A.P., Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes, *Theriogenology* 51 (2001) 923-936.
- Evans A.C., Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep, *Anim. Reprod. Sci.* 78 (2003) 289-306.
- Evans G., Armstrong D.T., Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments, *J. Reprod. Fertil.* 70 (1984) 47–53.
- Evans M.J., Kaufman M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* 292 (1981) 154-156.
- Evenson D.P., Jost L.K., Corzett M., Balhorn R., Effect of elevated body temperature on human sperm chromatin structure, *J. Androl.* 21 (2000) 739–746.
- Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cottell D.C., Hyttel P., Ward F.A., Boland M.P., Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production, *Mol. Reprod. Dev.* 58 (2001) 186-195.
- Findlay J.K., Peripheral and local regulators of folliculogenesis, *Reprod. Fertil. Dev.* 6 (1984) 127-139.
- Fishel S., Green S., Bishop M., Pregnancy after intracytoplasmic injection of Spermatid, *Lancet* 245 (1995) 1641-1642.

Flynn J.D., Duffy P., Boland M.P., Evans A.C., Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 285-296.

Foote R.E., Ellington J.E., Is a superovulated oocyte normal?, *Theriogenology* 29 (1988) 111-123.

Fortune J.E., Ovarian follicular growth and development in mammals, *Biol. Reprod.* 50 (1994) 225-232.

Fukui Y., Glew A.M., Gandolfi F., Moor R.M., Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro, *J. Reprod. Fert.* 82 (1988) 337-340.

Galli C., Laurie S., Lazzari G., Moor R.M., Nuclear transplantation (by electrofusion) of cultured embryonic cells with MII cytoplasts in the sheep, *Atti. SiSVet. XLV* (1991) 299-303.

Galli C., Moor R.M., Gonadotrophin requirements for the in vitro maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development, *Theriogenology* 35 (1991) 1083-1093.

Gandolfi F., Autocrine, paracrine, and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst, *Theriogenology* 41 (1994) 95-100.

Gandolfi F., Moor R.M., Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells, *J. Reprod. Fert.* 81 (1987) 23-28.

Gandolfi F., Pocar P., Luciano A.M., Rieger D., Effect of EGF and IGF- during in vitro maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism, *Theriogenology* 45 (1996) 277.

García-Rosello E., García-Mengual E., Coy P., Alfonso J., Silvestre M.A., Intracytoplasmic Sperm Injection in Livestock Species: An Update, *Reprod. Dom. Anim.* 44 (2009) 143–151.

Gardner D.K., Lane M., Spitzer A., Batt A., Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development, *Biol. Reprod.* 50 (1994) 390-400.

Gardner K.D., Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics, *Reprod. Fertil. Devel.* 20 (2008) 9-18.

Garner D.L., Gledhill B.L., Pinkel D., Lake S., Stephenson D., Van Dilla M.A., Johnson L.A., Quantification of the X- and Y- chromosome-bearing sperm of domestic animals by flow cytometry, *Biol. Reprod.* 28 (1983) 312-321.

Garry F.B., Adams R., McCann J.P., Odde K.G., Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning, *Theriogenology* 45 (1996) 141–152.

Gatica R., Boland M.P., Crosby T.F., Gordon I., Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins, *Theriogenology* 21 (1984) 550-560.

Ginther O.J., Kot K., Wiltbank M.C., Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes, *Theriogenology* 43 (1995) 689-703.

Gong J.G., Campbell B.K., Bramley T.A., Webb R., Treatment with rbovine somatotrophin enhances ovarian follicle development and increases the secretion of insulin like growth factor I by ovarian follicles in ewes, *Anim. Reprod. Sci.* 41 (1996) 13-26.

Gonzalez-Bulnes A., Garcia R.M., Castellanos V., Santiago-Moreno J., Ariznavarreta C., Dominguez V., Lopez-Sebastian A., Tresguerres J.A., Cocero M.J., Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes, *Reprod. Nutr. Dev.* 43 (2003) 17-28.

Gonzalez-Bulnes A., Garcia R.M., Souza C.J.H., Santiago-Moreno J., Lopez-Sebastian A., Santiago-Moreno J., Baird D.T., Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response, *Reprod Dom. Anim.* 37 (2002) 357-361.

Gonzalez-Bulnes A., Santiago-Moreno J., Santiago-Moreno J., Lopez-Sebastian A., Effects of FSH commercial preparations and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes, *Theriogenology* 54 (2000) 1055-1064.

Gordon I., *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*, CAB International, Wallingford, (1997).

Gordon I.R., *Reproductive technologies in farm animals*, CABI Publishing, (2004).

Grasa J.K., Perez-Pe R., Baguana O., Forcada F., Abecia A., Cebrian-Perez J.A., Muino-Blanco T., Ram sperm selection by a dextran/swim up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes, *J. Androl.* 25 (2004) 982-990.

Guler A., Poulin N., Mermillod P., Terqui M., Cognie Y., Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes, *Theriogenology* 54 (2000) 209-218.

Hafez E.S.E., *Reproduction in farm animals*, Lea and Febiger, (1993) 6th Edition.

Handyside A.H., Pattinson J.K., Penketh R.J., Delthanty J.D., Winston R.M., Tuddenham E.G., Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification, *Lancet*.1 (1989) 347-349.

Harper K.M., Brackett B.G., Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotrophins, *Biol. Reprod.* 48 (1993) 409-416.

Harvey E.B., A study of the male germ cells in Notonecta, *Journal of experimental zoology*, (1913).

Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.Q., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E., Trimmer S.A., Production, freezing and transfer of bovine ivf embryos and subsequent calving results, *Theriogenology* 43 (1995) 141-152.

Hastie N., Disomy and disease resolved?, *Nature* 389 (1997) 785–786.

Heyman Y., Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer, 14th AETE Scientific Meeting, Venise, (1998).

Heyman Y., Cloning of domestic species, *Anim. Reprod. Sci.* 42 (1996) 427-426.

Heyman Y., Vincent C., Garnier V., Cogni6 Y., Transfer of frozen-thawed embryos in sheep, *Vet. Rec.* 120 (1987) 83-85.

Hillier S.G., Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis, *Human Reprod* 9 (1994) 188-191.

Hochi S., Semple E., Leibo S.P., Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos, *Theriogenology* 46 (1996) 837-847.

Howles C.M., Webster G.M., Haynes N.B., The effect of rearing under a long or short photoperiod on testis growth, plasma testosterone and prolactin concentrations and the development of sexual behavior in rams, *J. Reproduction Fertility* 60 (1980) 437-448.

Huchkowsky S.L., Bartlewski P.M., Rawlings N.C., Ovarian follicular development and endocrine function in non-prolific Western White Face ewes with early or late onset of seasonal anestrus, *Small Rumin. Res.* 46 (2002) 191-199.

Hunter G.L., Adams C.E., Rowson L.E.A., Interbreed ovum transfer in sheep, *J. Agric. Sci.* 46 (1955) 143-149.

Husein M.Q., Bailey M.T., Ababneh M.M., Romano J.E., Grabo B.G., Wheaton J.E., Effect of eCG on the pregnancy rate if ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season, *Theriogenology* 49 (1998) 997-1005.

Islam A.B.M.M., Land R.B., Seasonal variation in testis diameter and sperm output of rams of breeds of different prolificacy, *Animal Production* 25 (1977) 311-317.

Jabbour H.N., Ryan J.P., Evans G., Maxwell W.M.C., Effects of season, GnRH administration and lupine supplementation on the ovarian and endocrine responses of Merino ewes treated with PMSG and p-FSH to induce superovulation, *Reprod. Nutr. Dev.* 3 (1991) 699-707.

Johnson L.A., Welch G.R., Rens W., Dobrinsky J.R., Enhanced flow cytometric sorting of mammalian X and Y sperm: high speed sorting and orienting nozzle for artificial insemination, *Theriogenology* 48 (1998) 3611.

Johnson R.T., Rao P.N., Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis, *Nature* 225 (1970) 159-164.

Juengel J.L., Sawyer H.R., Smith P.R., Quirke L.D., Heath D.A., Lun S., Wakefield S.J., McNatty K.P., Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries, *Mol. Cell Endocrinol* 191 (2002) 1-10.

Kaabi M., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Chamorro C., Olmedo J.A., Martinez S., Anel L., Mechanical aspects of cervical penetration in sheep depending on pipette type, *Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and AI*, Stockholm, Sweden vol15 (2006) 16.

Kaabi M., Analisis de factores morfoestructurales, instrumentales y metodologicos de la inseminacion transcervical en la oveja, Thesis Doctoral, Veterinary School, University of Leon (2002) Spain.

Kaidi S., Bernard S., Lambert P., Massip A., Dessy F., Donnay I., Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*, *Biology of Reproduction* 65 (2001) 1127-1134.

Kasai T., Ogawa K., Mizuno K., Nagai S., Uchida Y., Ohta S., Fujie M., Suzuki K., Hirata S., Hoshi K., Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential, *Asian J. Androl.* 4 (2002) 97-103.

Kasimanickam R., Peltzer K.D., Kasimanickam Y., Swecker W.S., Thatcher C.D., Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs, *Theriogenology* 65 (2006) 1407-1421.

Katongole C.P., Naftolin F., Short R.V., Seasonal variations in blood LH and testosterone levels in rams, *J. Endocrinology* 60 (1974) 101-106.

Kauzmann W., The nature of glassy state and the behaviour of liquids at low temperatures, *Chemical. Reviews* 43 (1948) 219-256.

Kavak A., Johannisson A., Lundeheim N., Rodriguez-Martinez H., Aidnik M., Einarsson S., Evaluation of cryopreserd stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry, *Anim. Reprod. Sci.* 76 (2003) 205-216.

Kelly J.M., Kleemann D.O., Walker S.K., Enhanced efficiency in the production of offspring from 4 to 8 week old lambs, *Theriogenology* 63 (2005) 1876-1890.

Kennedy J.P., Worthington C.A., Cole E.R., The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb, *J. Reprod. Fertil.* 36 (1974) 275-282.

Kershaw C.M., Khalid M., McGowan M.R., Ingram K., Leethongdee S., Wax G., Scaramuzzi R.J., The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an insemination pipette into the uterine lumen, *Theriogenology* 64 (2005) 1225-1235.

Kerton D.J., McPhee S.R., Davis I.F., White M.B., Banfield J.C., Cahill L.P., A comparison of insemination techniques in Corridale ewes, *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 15 (1984) 701.

Kobayashi K., Yamashita S., Hoshi H., Influence of epidermal growth factor- on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium, *J. Reprod. Fert.* 100 (1994) 439-446.

Kochhar H.P.C., Buckrell B.C., Pollard J.W., King W.A., Cleavage, sex and cell number of ovine embryos developed after different sperm-oocyte co-incubation intervals. *Theriogenology* 51 (1999) 322.

Kratochwil A., Eisenhut L., The earliest detection of fetal heart activity by ultrasound, *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 27 (2) (1967) 176-80

Kruip T.A.M., den Daas J.H.G., In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring, *Theriogenology* 47 (1997) 43–52.

Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O., Shaw J.M., Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes, *Cryobiology* 38 (1999) 119-130.

Lahlou-Kassi A., Mariana J.C., Ovarian follicular growth during the oestrous cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate, the D'Man and the Timahdite, *J. Reprod. Fertil.* 72 (1984) 301-310.

Land R.B., Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finish Landrace cross Blackface and Welsh sheep, *J. Reprod. Fertil.* 21 (1970) 517-521.

Lane M., Gardner D.K., Mitochondrial malate–aspartate shuttle regulates mouse embryo nutrient consumption. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 18361–18367.

Lasalle B., Testart J., Renard, J., Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol, *Fertil. Steril.* 44 (1985) 645-651.

Ledda S., Bogliolo L., Calvia P., Leoni G., Naitana S., Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes, *J. Reprod. Fert.* 109 (1997) 73-78.

Ledda S., Loi P., Fulka Jr., Moor R.M., The effect of 6-dimethylaminopurine on DNA synthesis in activated mammalian oocytes, *Zygote* 4 (1996) 7-9.

Leibo S.P., *Cryobiology: Preservation of Mammalian Embryos*, New York: Plenum Publishing Corp. (1986).

Leyva V., Buckrell B.C., Walton J.S., Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen, *Theriogenology* 50 (1998) 395-416.

Liebermann J., Dietl J., Vanderzwalmen P., Tucker M.J., Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? *Reprod. Biomed. Online* 7 (2003) 623-633.

Lincoln G.A., Davidson W., The relationship between sexual and aggressive behavior and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams and the influence of photoperiod, *J. Reproduction Fertility* 49 (1977) 267-276.

Liu Z., Foote R. H., Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.* 53 (1995) 786–790.

Loi P., Ptak G., Dattena M., Ledda S., Naitana S., Cappai P., Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction, *Reprod. Nutr. Dev.* 38 (1998) 615-628.

Looney C.R., Bondioli K.R., Hill K.C., Massey J.M., Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology, *Theriogenology* 29 (1988) 2711.

Mann G.E., Campbell B.K., McNeilly A.S., Baird D.T., The role of inhibin and estradiol in the control of FSH secretion in the sheep, *J. Endocrin.* 133 (1992) 381-391.

Marco-Jimenez F., Puchades S., Moce E., Vitudes-de-Castro M.P., Vicente J.S., Rodriguez M., Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen, *Reprod. Domest. Anim.* 39 (2004) 438-441.

Mariana J.C. Monniaux D., Caraty A., Pisselet C., Fontaine J., Solari A., Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on gonadotropins, follicular growth and responsiveness of granulosa cells to FSH and IGF-I in two breeds of sheep with different prolificacy (Romanov and Ile-de-France), *Dom. Anim. Endocrinol.* 15 (1998) 195-207.

Martinez-Pastor F., Castro D., Bernardo J., Inglesias M., Herraiez P., Paz P., Anel L., Comparison of several acrosomal probes on ram spermatozoa, *Reprod. Domest. Anim.* 40 (2005a) 392-393.

Martinez-Pastor F., Diaz-Corujo A.R., Anel E., Herraiez P., Anel L., Paz P., Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm, *Theriogenology* 64 (2005b) 958-974

Martinez-Pastor F., Garcia-Macias V., Alvarez M., Herraiez P., Anel L., Paz P., Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process, *Biol. Reprod.* 72 (2005c) 316-327.

Martinez-Pastor F., Johannisson A., Gil J., Kaabi M., Anel L., Paz P., Rodriguez-Marinez H., Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1 and fluorometric assessment of plasmamembrane to evaluate frozen-thawed ram semen, *Anim. Reprod. Sci.* 84 (2004) 121-133.

Mattner P.E., Braden A.W., Secretion of oestradiol-17 α by the ovine ovary during the luteal phase of the oestrous cycle in relation to ovulation, *J. Reprod. Fertil.* 28 (1972) 136-137.

- Maxwell W.M.C., Artificial insemination of ewes frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility, *Anim. Reprod. Sci.* 10 (1986) 301-308.
- Maxwell W.M.C., Rita K.G., Adiyod G., Spermatogenesis and sperm function, *Mollusca Wiley N.Y.* (1983) 275-319.
- Maxwell W.M.C., Stojanov T., Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants, *Reprod. Fertil. Dev.* 8 (1996) 1013-1020.
- Maxwell W.M.C., Szell A., Hunton J.R., Ryan J.P., Artificial breeding: embryo transfer and cloning, in: Oldham C.M., Martin C.B., Purvis I.W. (Eds.), *Reproductive Physiology of Merino Sheep: Concept and Consequences*, (1990) 217-237.
- Maxwell W.M.C., Wilson H.R., Butter L.G., Fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen semen. In: proceedings of the Department of Agriculture Conference. South Perth. Western Australia (1983).
- McEvoy T.G., Robinson J.J., Aitken R.P., Findlay P.A., Robertson L.S., Relationship between pre-ovulatory feed intake, progesterone priming and the subsequent *in vitro* development of ova collected from superovulated ewes, *Theriogenology* 43 (1995) 276.
- McEvoy T.G., Sinclair K.D., Goodhand K.L., Broadbent P.J., Robinson J.J., Post-natal development of simmental calves derived from *in vivo* or *in vitro* embryos, *Reprod. Fertil. Devel.* 10 (1998) 459-464.
- McKelvey W.A.C., Robinson J.J., Aitken R.P., A simplified technique for the transfer of ovine embryos by laparoscopy, *Vet. Rec.* 117 (1985) 492-494.
- McKelvey W.A.C., Robinson J.J., Aitken R.P., Robertson I.S., Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy, *Theriogenology* 25 (1986) 855-865.
- McKenzie J., *An introduction to developmental Biology*, Blackwell Scientific Publication, Oxford – London, 1976.
- McNatty K.P., Smith P., Hudson N.L., Heath D.A., Tisdall D.J., O W.S., Braw-Tal R., Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49 (1995) 123-135.
- McNeilly A.S., Crow W., Brooks J., Evans G., LH pulses, FSH and control of follicle selection in sheep, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 45 (1992) 5-19
- McNeilly A.S., Fraser H.M., Effect of GnRH agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe, *J. Endocrinol.* 115 (1987) 273-282.
- Meikle A., Tasende C., Garofalo E.G., Forsberg M., Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs, *Anim. Reprod. Sci.* 54 (1998) 75-85.

- Meinecke-Tillman S., Lewalski H., Meinecke B., Induction of superovulation in Merinolandschaf ewes after single or multiple FSH injections, *Reprod. Domest. Anim.* 28 (1993) 433-440.
- Mendel G., Versuche uber Pflanzenhybriden, *Proceedings of the Natural History Society of Brünn* (1866).
- Menegatos J., Chadio S., Kalogiannis T., Kouskoura T., Kouimtzis S., Endocrine events during the periestrus period and the subsequent estrous cycle in ewes after estrus synchronization, *Theriogenology* 59 (2003) 1533-1543.
- Menegatos J., Karakatsiotis D., The scrotal circumferences of rams in relation to ewe's breeding season of three different breeds (Karagouniko, Chios, E. Friesian) in Greece, *Proc. 35th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Kallithea, Chalkidiki, Greece, 2 (1986) 2-5.
- Menezo Y., Cryopreservation of ivf embryos: Which stage? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113 (2004) 28-32.
- Mermillod P., Oussaid B., Cognié Y., Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos, *J. Reprod. Fertil.* 54 (1999) 449-60.
- Moor R.M., Kruip Th..A.M., Green D., Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation?, *Theriogenology* 21 (1984) 103-116.
- Moor R.M., Osborn J.C., Crosby I.M., Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation, *J. Reprod. Fertil.* 74 (1985) 167-172.
- Moor R.M., Osborn J.C., Somatic control of protein synthesis in mammalian oocytes during maturation, in: Whelan I. (Ed.), *Molecular Biology of Egg Maturation*, Pitman Books, London, (1983) 179-196.
- Moor R.M., Trounson A.O., Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent development capacity, *J. Reprod. Fertil.* 49 (1977) 101-109.
- Moore K., Bonilla Q.A., Cryopreservation of mammalian embryos: The state of the art, *Annual review of Biomedical Sciences* 8 (2006) 19-32.
- Moore N.W., Egg transfer in sheep and goat, in: Adams C.E. (Ed.), *Mammalian Egg Transfer*, CRC Press, Boca Raton, FL, (1982) 119- 133.
- Moore N.W., Shelton J.N., The application of the technique of embryo transfer to sheep breeding, *Aust. J. Agric. Res.* 13 (1962) 718-724.
- Moreira da Silva F., Metelo R., Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification, *Reprod. Domest. Anim.* 20 (2005) 205-209.
- Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B., *The Mechanism of Mendelian Heredity* New York: Henry Holt and Company, (1915).

Morton K.M., de Graaf S.P., Campbell ., Tomkins L.M., Chis Maxwell W.M., Evans G., Repeat ovum pick-up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment, *Reprod. Dom. Anim.* 40 (2005) 422-428.

Mucci N., Aller J., Kaiser G.G., Hozbor F., Cabodevila J., Alberio R.H., Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification, *Theriogenology* 65 (2006) 1551-1562.

Mylne M.J.A., McKelvey W.A.C., Fernie K., Matthews K., Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep, *Vet. Rec.* 130 (1992) 450-451.

Nagy Z., Liu J., Cecile J., Silber S., Devroey P., Van Steirteghem A., Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection, *Fertil. Steril.* 63 (1995) 808-815.

Naitana S., Ledda S., Loi P., Leoni G., Bogliolo L., Dattena M., Cappai P., Polyvinyl alcohol as a definite substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development, *Anim. Reprod. Sci.* 48 (1997) 247-256.

Naitana S., Loi P., Ledda S., Cappai P., Embryo transfer and new technology in sheep reproduction, in: Lauria A., Gandolfi F. (Eds.), *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production: Trends in Research and Applications*, Portland Press, London, (1992) 183-194.

Nellenschulte E., Niemann H., Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy, *Anim. Reprod. Sci.* 27 (1992) 293-304.

Nicholas F.W., Genetic improvement through reproductive technology, *Anim. Reprod. Sci.* 42 (1996) 205-214.

Noel B., Bister J.L., Paquay R., Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year, *J. Reprod. Fertil.* 99 (1993) 695-700.

O'Brien J.K., Beck N.F.G., Maxwell W.M.C., Evans G., Effect of hormone pre-treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of oocytes in vitro and in vivo, *Reprod. Fert. Dev.* 9 (1997a) 625-6311..

O'Brien J.K., Catt S.L., Ireland K.A., Maxwell W.M.C., Evans G., In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep, *Theriogenology* 47 (1997b) 1433-1443.

O'Brien J.K., Dwartie D., Ryan J.P., Maxwell W.M.C., Evans G., Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep, *Reprod. Fert. Dev.* 8 (1996) 1029-1037.

O'Callaghan D., Yaakub H., Hyttel P., Spicer L.J., Boland M.P., Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes, *J. Reprod. Fertil.* 118 (2000) 303-313.

O'meara C.M., Hanrahan J.P., Donovan A., Fair S., Rizos D., Wade M., Boland M.P., Evans A.C., Lonergan P., Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen, *Theriogenology* 64 (2005) 1797-1808.

O'Rahilly R., Muller F., Εμβρυολογία και τερατολογία του Ανθρώπου, Μετάφραση-Επιμέλεια Καραμανλίδης Α., Σιατίστας Γ., Γ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Αθήνα (2000) 19-36.

Olesen I., Effects of cervical insemination with frozen semen on fertility and litter size of Norwegian sheep. *Livest. Prod. Sci.* 37 (1993) 169-184.

Otaegui P.J., O'Neil J.T., Campbell K.H.S., Wilmut I., Transfer of nuclei from 8 cell stage mouse embryos following use of nocodazole to control the cell cycle, *Mol. Reprod. Dev.* 39 (1994) 147-152.

Oussaid B., Mariana J.C., Poulin N., Beckers J.F., Cognie Y., Effect of LH pulses during the follicular phase on developmental competence of sheep oocytes, In: *Proc. 13th Mtg. Ass. Eur. Trans. Emb. (AETE)*. (1997) 190.

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C., Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, *Lancet* 340 (1992) 17-18.

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C., Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, *Lancet*. 340 (1992) 17-18.

Palmiter R.D., Norstedt G., Gelinas R.E., Hammer R.E., Brinster R.L., Metallothionein – Human GH fusion genes stimulate growth of mice, *Science* 222 (1983) 809-814.

Park J.E., Graham J.K., Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes, *Theriogenology* 38 (1992) 209-222.

Patten B.M., Carlson B.M., *Foundations of embryology*, McGraw – Hill Book co, New York, 1974.

Paterson L., DeSousa P., Ritchie W., King T., Wilmut I., Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Applications of reproductive cloning, Anim. Reprod. Sci.* 79 (2003) 137-143.

Paulenz H., Soderquist L., Adnoy T., Nordstoga A.B., Andersen M., Berg K., Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws, *Theriogenology* 61 (2004) 1719-1727.

Peris S.I., Morrier A., Dufour M., Bailey J.L., Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay, *J. Androl.* 25 (2004) 224-233.

Peters H., Byskov A.G., Follicular growth: the basis event in the mouse and human ovary, *J. Reprod. Fertil.* 45 (1975) 559-566.

- Peters H., Byskov A.G., Lintern-Moore S., Faber M., Andersen M., The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary, *J. Reprod. Fertil.* 35 (1973) 139-141.
- Pinkel D., Gledhill G.L., Van Dilla M.A., Stephenson D., Watchmaker G., High resolution DNA content measurements of mammalian sperm, *Cytometry* 3 (1982) 1-9.
- Pollard J.W., Leibo S.P., Chilling sensitivity of mammalian embryos, *Theriogenology* 41 (1994) 101-106.
- Ptak G., Loi P., Dattena M., Cappai P., Tischner M., IVM/IVF techniques in prepubertal lamb oocytes, *Proc 13th AETE Scientific Meeting, Lyon, (1997)* 192.
- Ptak G., Loi P., Dattena M., Tischner M., Cappai P., Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes, *Biol. Reprod.* 61 (1999) 1568-1574.
- Ptak G., Tischer M., Bernabo N., Loi P., Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation, *Biol. Reprod.* 69 (2003) 278-285.
- Pugh P.A., Fukui Y., Tervit H.R., Thomson J.G., Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the non-reeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen, *Theriogenology* 36 (1991) 771-775.
- Rall W., Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications, *Anim. Reprod. Sci.* 28 (1992) 237-245.
- Rall W.F., Fahy G.M., Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification, *Nature.* 313 (1985) 573-575.
- Ranilla M.J., Gebbie F.E., King M.E., Carolan C., Sinclair K.D., Watt R.G., Dolman D.F., Beckers J.F., Robinson J.J., The incidence of embryo and fetal loss following the transfer of in vitro-cultured sheep embryos, *Theriogenology* 49 (1998) 248.
- Ravidra J.P., Rawlings N.C., Evans A.C., Adams G.P., Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in the ewe lamb, *J. Reprod. Fertil.* 101 (1994) 501-509.
- Rawlings N.C., Evans A.C., Honaramooz A., Bartlewski P.M., Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats, *Anim. Reprod. Sci.* 78 (2003) 259-270.
- Revel F., Mermillod P., Peynot N., Renard J.P., Heyman Y., Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows, *J. Reprod. Fertil.* 103 (1995) 115-120.
- Rexroad C.E.J., Powel A.M., Co-culture of sheep ova and cells from sheep oviduct, *Theriogenology* 25 (1986) 187.
- Reynaud K., Driancourt M.A., Oocyte attrition, *Mol. Cell. Endocrin.* 163 (2000) 101-108.

Rieger D., Loskutoff N.M., Betteridge K.J., Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*, *Reprod. Fertil. Dev.* 4 (1992) 547–557.

Ritar, A. J., Ball P.D., O'May P.J., Artificial insemination of cashmere goats: Effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females, *Reprod. Fertil. Dev.* 2 (1990) 377–384.

Rizos D., Gutierrez-Adan A., Perez-Garnelo S., De La Fuente J., Boland M.P., Lonergan P., Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression, *Biol. Reprod.* 68 (2003) 236-243.

Robinson J.J., Wallace J.M., Aitken R.P., Fertilization and ovum recovery rates following cervical insemination or laparoscopic intrauterine insemination at different times after progestagen withdrawal and in one or both uterine horns, *J. Reprod. Fert.* 87 (1989) 771-782.

Robinson T.J., Synchronization of oestrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges, *Proc. Australian Society Animal Production* 8 (1964) 47-49.

Rondina D., Freitas V.J.F., Amorim C.A., MafucciA., Conti S., Cecchi R., Paula N.R.O., Martini A., Preantral follicular development in Massese lambs born during two seasons of the year, *Small Rumin. Res.* 57 (2005) 277-280.

Rubianes E., Menchaca A., The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats, *Anim. Reprod. Sci.* 78 (2003) 271-287.

Rubianes E., Ungerfeld R., Violes C., Rivero A., Adams G.P., Ovarian response to gonadotrophin treatment initiated relative to wave emergences in ultrasonography monitored ewes, *Theriogenology* 47 (1997) 1479-1488.

Ryan J.P., Hunton J.R., Maxwell W.M.C., Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone, *Reprod. Fertil. Dev.* 3 (1991) 551–560.

Ryan J.P., Hunton J.R., Maxwell W.M.C., Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewe with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone, *Reprod. Fert. Dev.* 3 (1991) 551-560.

Salamon S., Maxwell W.M.C., Frozen storage of ram semen, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 77-111.

Salamon S., Maxwell W.M.C., Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37 (1995) 185-249.

Samartzi F., Belibasaki S., Vainas E., Boscós C., Plasma progesterone concentration in relation to ovulation rate and embryo yield in Chios ewes superovulated with PMSG, *Anim. Repro. Sci.* 39 (1995a) 11-21.

Samartzi F., Boscós C., Vainas E., Tsakalof P., Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during spring and autumn, *Anim. Repro. Sci.* 39 (1995b) 215-222.

Sawyer H.R., Smith P., Heath D.A., Juengel J.L., Wakefield S.J., McNatty K.P., Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep, *Biol. Reprod.* 66 (2002) 1134-1150.

Scaramuzzi R.J., Adams N.R., Baird D.T., Campbell B.K., Downing J.A., Findlay J.K., Henderson K.M., Martin G.B., McNatty K.P., McNeilly A.S., A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe, *Reprod. Fertil. Dev.* 5 (1993) 459-478.

Schanbacher B.D., Downing J.A., The in vivo effects of fibroblast growth factor and epidermal growth factor on the secretion of oestradiol in the ram, *Endocrinology* 99 (1976) 752-757.

Schieve M.C., Howard J.G., Goodrove K., Wildt D.E., Human menopausal gonadotrophin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F_{2a} synchronization is compromised by premature luteal regression, *Theriogenology* 34 (1990) 469-486.

Schinkel P.G., The effect of the response of ram on the ovarian activity the ewes, *Aust. J. Agric. Res.* 5 (1954) 465-469.

Schmitt E.J., Diaz T., Drost M., Thatcher W.W., Use of a gonadotrophin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle, *J. Anim. Sci.* 74 (1996) 1084-1091.

Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut L, Colman A., Campbell K.H.S., Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts, *Science* 278 (1997) 2130-2133.

Schoysman R., Vanderzwalm P., Nijs M., Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa, *Lancet* 342 (1993) 1237.

Scudamore C.L., Robinson J.J., Aitken R.P., Kennedy D.J., Ireland S., Robertson I.S., Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in a commercial embryo transfer unit, *Theriogenology* 35 (1991a) 329-337.

Scudamore C.L., Robinson J.J., Aitken R.P., The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, with or without sedation, on the recovery of embryos, their stage of development and subsequent viability, *Theriogenology* 35 (1991b) 907-914.

Senger P.L., Reproductive Cyclicity- The follicular Phase/Reproductive Cyclicity – The luteal Phase/ Puberty , In: Senger PL (ed) Pathways to pregnancy and parturition, Current Conceptions, Inc, WA USA, (2003) 164-187/ 188-213 /128-143.

- Shackell G.H., Kyle B., Littlejohn R.P., Factors influencing the success of a large scale artificial insemination programme in sheep, *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.* 50 (1990) 427-430.
- Shaw J.M., Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O., Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran, *Cryobiology* 35 (1997) 219-229.
- Shulman A., Feldman B., Madgar I., Levron J., Mashiach S., Dor J., In-vitro fertilization treatment for severe male factor: the fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction, *Hum. Reprod.* 14 (1999) 749-752.
- Sikka S.C., Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology, *J. Androl.* 25 (2004) 5-18.
- Silber S.J., Asch R.H., Epididymal surgery. In Templeton, A.A. and Drife, J.O. (eds), *Infertility* Springer Verlag. London (1992) 133-153.
- Smeaton T.C., Robertson H.A., Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep, *J. Reprod. Fertil.* 25 (1971) 243-252.
- Snel-Oliveira M.V., Tury E., Pereira D.C., Malagoli J.D., Nascimento N.V., Santos E.S., Rumpf R., Histopathological lesions in the ovaries after ultrasound guided transvaginal ovum pick-up in Nelore prepubertal calves, *Theriogenology* 43 (2002) 687.
- Snyder D.A., Nellor J.E., Development of the laparoscopic technique for in vivo collection of follicular oocytes in sheep, *Fed. Proc.* 34 (1975) 338.
- Songsasen N., Buckrell B.C., Plante C., Leibo S.P., In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos, *Cryobiology* 32 (1995) 78-79.
- Sonjaya H., Driancourt M.A., Ovarian follicles during infancy in Romanov and Ile-de-France ewe lambs, *J. Reprod. Fertil.* 81 (1987) 241-248.
- Sonjaya H., Driancourt M.A., Ovarian morphology and function in 12-week-old lambs from breeds with different ovulation rates as adults, *Reprod. Fertil. Dev.* 1 (1989) 265-272.
- Spemann H., Mangold H., Uber Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren, *Arch. mikr. Anat. und Entw.* 100 (1924) 599-638)
- Stefani J.S., Pahla M.D.C., Christmann L., Rosa J.M., Silveira M.C., Rodrigues J.L., Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos, *Theriogenology* 33 (1990) 330.
- Taponen J., Kulcsr M., Ktila T., Katai L., Hszenicza G., Rodriguez-Martinez H., Short estrus cycle and estrus signs after premature ovulations induced with cloprostenol and gonadotropin-releasing hormone in cyclic dairy cows, *Theriogenology* 58 (2002) 1291-1302.

Tassell R., Chamley W.A., Kennedy J.P., Gonadotrophins levels and ovarian development in the neonatal ewe lamb, *Aust. J. Biol. Sci.* 33 (1978) 267-273.

Tassell R., Kennedy J.P., Bindon B.M., Piper L.R., Ovarian follicles of new-born Merino lambs from genetic lines which differ in fecundity, *Aust. J. Biol. Sci.* 36 (1983) 351-355.

Tassell R., Kennedy J.P., Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb-fine structure and histochemistry, *Aust. J. Biol. Sci.* 33 (1980) 675-687.

Tervit H.R., Goold P.G., Deep-freezing of sheep embryos, *Theriogenology* 21 (1984) 268.

Tervit H.R., Havik P.G., A modified technique for flushing ova from the sheep uterus, *New Zeal. Vet. J.* 24 (1976) 138-140.

Tervit H.R., Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding, *Anim. Reprod. Sci.* 42 (1996) 227-238.

Tervit H.R., Smith J.F., McGowan L.T., Pugh P.A., Birth of lambs from embryos produced in vitro following laparoscopic recovery of follicular oocytes, *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 27 (1995) 68.

Tervit H.R., Whittingam D.G., Rowson L.E.A., Successful culture in vitro of sheep and cattle ova, *Reprod. Fertil.* 30 (1972) 493-497.

Tervit H.R.; Harvik P.G., A modified technique for flushing ova from the sheep uterus, *New Zealand Veterinary Journal*, 24(7) (1976) 138-140.

Tesarik, J., Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection, *Lancet* 346 (1995) 1096.

Thibier M., Wagner H.G., World statistics for artificial insemination in cattle, *Proc. 14th Int. Congr. Anim. Reprod.* 22 (2000) 76.

Thompson J.G., Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants, *Reprod. Fert. Develop.* 9 (1997) 341-354.

Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H., Tervit H.R., Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos, *Biol Reprod* 53 (1995) 1385-1391.

Torres S., Sevellec C., Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe, *Reprod. Nutr. Dev.* 27 (1987) 859-863.

Trounson A., Mohr L., Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo, *Nature* 305 (1983) 707-709.

Trounson A.O., Moore N.W., Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination, *Aust. J. Biol. Sci.* 27 (1974) 505-510.

- Turnbull K.E., Braden A.W.H., Mattner P.E., The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary, *Aust. J. Biol. Sci.* 30 (1977) 229-241.
- Uehara T., Yanagimachi R., Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei, *Biol. Reprod.* 15 (1976) 467–470.
- Vaita G., Gierris M., Science and technology of farm animal cloning: state of the art, *Anim. Reprod. Sci.* 92 (2006) 211-230.
- Valasi I., Fthenakis G.C., Prassinis N., Menegatos I., Grigoropoulou V., Deligiannis C., Vainas E., Amiridis G.C., The effect of repeated follicular aspiration on the onset of puberty and growth rate of winter- or autumn-born lambs, *Small Ruminant Research* 84 (2009) 35-40
- Valasi I., Leontides L., Menegatos I., Amiridis G.S., Oestradiol concentration as a predictor of ovarian response in FSH stimulated ewe-lambs, *Anim. Reprod. Sci.* 102 (2007a) 145-151.
- Valasi I., Leontides L., Papanikolaou T., Amiridis G.S., Age, FSH dose and follicular aspiration frequency affect oocyte yield from juvenile donor lambs, *Reprod. Domest. Anim.* 42 (2007b) 230-237.
- Valasi I., Menegatos I., Papanikolaou T., Goulas P., Amiridis G.S., Oocyte pick-up in juvenile lambs affects neither onset of puberty nor their future fertility. *Theriogenology* 66 (2006:) 2144-51.
- Van den Hurk R., Zhao J., Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles, *Theriogenology* 63 (2005) 1717-1751.
- Van Der Werf J., Applying new technologies in sheep breeding programs, *Merinotech Best Practice Sheep Breeding Forum Kojonup, Western Australia* (2005) 17-23.
- Vernaev V., Bonduelle M., Tournaye H., Camus M., Van Steirteghem A., Devroey P., Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia, *Hum. Reprod.* 18 (2003) 2093–2097.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K., Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice, *Theriogenology* 57 (2002) 149-179.
- Vishwanath R., Shannon P., Storage of bovine semen in liquid and frozen state, *Anim. Reprod. Sci.* 62 (2000) 23-53.
- Vivanco H.W., Rangel D.H., Lynch P., Rodhes A., Large scale commercial application of bisection of sheep embryos, *Theriogenology* 35 (1991) 292.
- von Baer K.E., *Über die Entwicklungsgeschichte der Thiere, Beobachtung und Reflexion*, (1837).

- Walker S.K., Hartwich K.M., Seamark R.F., The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges, *Theriogenology* 45 (1996) 111-120.
- Walker S.K., Heard T.M., Seamark R.F., In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives, *Theriogenology* 37 (1992) 111-126.
- Walker S.K., Hill J.L., Bee C.A., Warnes D.M., Improving the rate of production of sheep embryos using in vitro maturation and fertilization, *Theriogenology* 41 (1994) 330.
- Walker S.K., Smith D.H., Frensham A., Ashman R.J., Seamark R.F., The use of synthetic GnRH treatment in the collection of sheep embryos, *Theriogenology* 31 (1989) 741-752.
- Walker S.K., Smith D.H., Seamark R.F., Timing of multiple ovulation in the ewe after treatment with FSH or PMSG with or without GnRH, *J. Reprod. Fert.* 77 (1986) 135-142.
- Watson A.J., Watson P.H., Warnes D., Walker S.K., Armstrong D.T., Seamark R.F., Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmospheres, *Biol. Reprod.* 50 (1994) 715-724.
- Watson J.D., Crick F.H.C., Molecular Structure of Nucleic Acids, *Nature* 171 (1953) 737-738.
- Webb R., Campbell B.K., Garverick H.A., Gong J.G., Gutierrez C.G., Armstrong D.G., Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection, *J. Reprod. Fertil.* 54s (1999) 33-48.
- Wells D.N., Misica P.M., Day A.M., Tervit H.R., Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo and in vitro matured cytoplasts, *Biol. Reprod.* 57 (1997) 385-393.
- Wikland M., Nilsson L., Hansson R., Collection of human oocytes by the use of sonography, *Fertil. Steril.* 39 (1983) 603-606.
- Wildeus S., Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats, *J. Anim. Sci.* 77 (2000) 1-14.
- Willadsen S.M., A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins, *Nature* 277 (1979) 298-300.
- Willadsen S.M., Cloning of sheep and cow embryos, *Genome* 31 (1989) 956-962.
- Willadsen S.M., Godke R.A., A simple procedure for the production of identical sheep twins, *Vet. Rec.* 114 (1984) 240-243.
- Willadsen S.M., Janzen R.E., McAlister R.J., Shea B.F., Hamilton G., McDermand D., The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle, *Theriogenology* 35 (1991) 161-170.

- Willadsen S.M., Nuclear transplantation in sheep embryos, *Nature* 320 (1986) 63-65.
- Willadsen S.M., Polge C., Rowson L.E.A., Moor R.M., Deep freezing of sheep embryos, *J. Reprod. Fert.* 46 (1974) 151-154.
- Willadsen S.M., The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos, *J. Embryol. Exp. Morph.* 65 (1981) 165-172.
- Williams A.C., Ford W.C., The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa, *J. Androl.* 22 (2001) 680-695.
- Wilmot I., Clark A.J., Basic techniques for transgenesis, *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43 (1990) 265- 275.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* 385 (1997) 810-813.
- Windsor D.P., Mitochondrial function and ram sperm fertility, *Reprod. Fert. Dev.* 9 (1997) 279-284.
- Windsor D.P., Szell A.Z., Buschbeck C., Edward A.Y., Milton J.T.B., Buckrell B.C., Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen, *Theriogenology* 42 (1994) 147-157.
- Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmot L, Garner L, Colman A., High-level expression of active human alpha-I-antitrypsin in the milk of transgenic sheep, *Biol. Technol.* 9 (1991) 83.
- Yaniz J., Marti J.I., Silvestre M.A., Folch J., Santolaria P., Alabart J.L., Lopez- Gatus F., Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 degrees on their survival and penetrating capacity, *Theriogenology* 64 (2005) 1844-1851.
- Yildiz S., Saatci M., Uznn M., Guven B., Effect of ram introduction after the second PGF_{2a} injection on day 11 in the LH surge characteristics in Fat-Tailed ewes, *Reprod. Dom. Anim.* 38 (2003) 54-57.
- Young L.E., Butterwith S.C., Wilmot I., Increased ovine fetal weight following transient asynchronous embryo transfer is not associated with increased placental weight at day 21 of gestation, *Theriogenology* 45 (1996) 231.
- Young L.E., Sinclair K.D., Wilmot I., Large offspring syndrome in cattle and sheep, *J. Reprod. Fert.* 3 (1998) 155-163.
- Zamiri M.J., Hosseini M., Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and phenobarbital on the reproductive performance of fat-tailed Ghezel ewes, 30 (1) (1998) 157-161.