

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 49, No 2 (1998)



### Rabbit semen fertility after heterospermic insemination with spermatozoa of different capacitation time

P. YPSILANTIS (Π. ΥΨΗΛΑΝΤΗΣ), Ph. SARATSIS (Φ. ΣΑΡΑΤΣΗΣ), S. SAMOUILIDIS (Σ. ΣΑΜΟΥΗΛΙΔΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15766](https://doi.org/10.12681/jhvms.15766)

Copyright © 2018, P YPSILANTIS, PH SARATSIS, S SAMOUILIDIS



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

#### To cite this article:

YPSILANTIS (Π. ΥΨΗΛΑΝΤΗΣ) P., SARATSIS (Φ. ΣΑΡΑΤΣΗΣ) P., & SAMOUILIDIS (Σ. ΣΑΜΟΥΗΛΙΔΗΣ) S. (2018). Rabbit semen fertility after heterospermic insemination with spermatozoa of different capacitation time. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 49(2), 143–147. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15766>

## Γονιμότητα σπέρματος κουνελιού μετά από διενέργεια ετεροσπερμικής σπερματέγχυσης με σπερματοζωάρια διαφορετικών χρόνων ενεργοποίησης

Π. Υψηλάντης, Φ. Σαράτσης, Σ. Σαμουηλίδης

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Μελετήθηκε η επίδραση της ανάμιξης ετερογενών πληθυσμών σπερματοζωαρίων στη γονιμότητα του σπέρματος κουνελιού. Χρησιμοποιήθηκαν 80 θηλυκά κουνέλια, που χωρίστηκαν σε 4 ομάδες (1, 2, 3 και 4) ( $n=20$ ), καθώς και 3 αρσενικά ( $A_1$ ,  $A_2$  και  $A_3$ ) αποδεδειγμένης γονιμότητας. Στα ζώα των ομάδων 1, 2 και 3 έγινε σπερματέγχυση με σπέρμα από τα αρσενικά  $A_1$ ,  $A_2$  και  $A_3$ , αντίστοιχα, ενώ εκείνα της ομάδας 4 με μίγμα που περιείχε ισάριθμα σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση από καθένα από τα παραπάνω αρσενικά ( $A_{1+2+3}$ ) (ετεροσπερμική σπερματέγχυση). Τα ζώα κάθε ομάδας διαιρέθηκαν σε 4 υποομάδες ανάλογα με το χρόνο σπερματέγχυσης (15, 10, 5 και 0 ώρες πριν από την αναμενόμενη ωοθυλακιορρηξία). Σε κάθε ομάδα παρατηρήθηκαν διαφορές ( $P<0,05$ ) μεταξύ των υποομάδων ως προς το ποσοστό τοκετών, υποδηλώνοντας διαφορές μεταξύ των αρσενικών ως προς το χρόνο έναρξης και τη διάρκεια ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων *in vivo*. Με βάση το ποσοστό τοκετών και το μέσο μέγεθος τοκετοομάδας, η γονιμότητα του σπέρματος βελτιώθηκε μετά από την εφαρμογή ετεροσπερμικής σπερματέγχυσης, οποιονδήποτε χρόνο κι αν διενεργήθηκε. Η βελτίωση αυτή αποδόθηκε στην αύξηση του χρόνου κατά τον οποίο υπήρχαν ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια στη γεννητική οδό του θηλυκού, λόγω της ανάμιξης ετερογενών πληθυσμών σπερματοζωαρίων με διαφορετικούς χρόνους ενεργοποίησης.

**ABSTRACT.** Ypsilantis P, Saratsis Ph, Samouilidis S. Rabbit semen fertility after heterospermic insemination with spermatozoa of different capacitation time. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society* 1998, 49(2):143-147. **The influence of mixing heterogeneous sperm populations in rabbit semen fertility was studied. Eighty female rabbits which were divided in 4 groups (1, 2, 3 and 4) ( $n=20$ ) and 3 males of proven fertility were employed. The animals of group 1, 2 and 3 were inseminated with semen from male  $A_1$ ,  $A_2$  and  $A_3$ , respectively, while those of group 4 were**

inseminated with a mixture containing equal number of progressively motile spermatozoa from each of the above mentioned males ( $A_{1+2+3}$ ) (heterospermic insemination). Animals of each group were divided into 4 subgroups according to the insemination time (15, 10, 5 and 0 hours prior the expected ovulation). In each group, differences were observed ( $P<0.05$ ) between subgroups at the percentage of animals that delivered, indicating differences between males at the time and the duration of sperm capacitation *in vivo*. Based on the percentage of the animals that delivered and the litter size, semen fertility was improved after the application of heterospermic insemination, at all insemination times. This improvement was attributed to the extension of the time during which capacitated spermatozoa were present in the female genital tract due to the mixture of heterogeneous sperm populations of different capacitation time.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** ετεροσπερμική σπερματέγχυση, ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων, κουνέλι.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Συχνά, κατά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης (ΤΣ) στο κουνέλι, διαπιστώνονται σημαντικές διαφορές στη γονιμότητα αρσενικών που παράγουν σπέρμα καλής ποιότητας (ικανοποιητικού όγκου, υψηλής πυκνότητας, με υψηλή κινητικότητα σπερματοζωαρίων και με μικρό ποσοστό σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες). Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση και άλλων παραμέτρων του σπέρματος, πέρα από τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά, που προσδιορίζουν τη γονιμότητά του. Μια από αυτές είναι η "ενεργοποίηση" (capacitation) των σπερματοζωαρίων, διαδικασία στην οποία υπόκεινται στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού προκειμένου να αποκτήσουν γονιμοποιητική ικανότητα.

Η "ενεργοποίηση" χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή απομάκρυνση ή/και διαφοροποίηση ουσιών που έχουν προσροφηθεί ή ενσωματωθεί στην κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων, κατά την πορεία τους μέσα στο γεννητικό σωλήνα του αρσενικού<sup>1,2</sup>. Οι μεταβολές αυτές ε-

Κλινική Μαιευτικής και Τ.Σ.

Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.

Σταύρου Βουτυρά 11, 546 27 Θεσσαλονίκη

Ημερομηνία υποβολής: 19.09.97

Ημερομηνία εγκρίσεως: 29.12.97

πιτρέπουν την ενδοκυττάρια εισροή ιόντων ασβεστίου, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της αντίδρασης του ακροσώματος, και παράλληλα ευθύνονται για την τροποποίηση της κίνησης της ουράς τους, που είναι γνωστή ως "υπερενεργοποίηση"<sup>13-5</sup>. Τελικά, η παραπάνω αλληλουχία γεγονότων οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της κυτταρικής τους μεμβράνης και σε κυτταρικό θάνατο<sup>6</sup>.

Έχει διαπιστωθεί ότι ο απαραίτητος χρόνος παραμονής των σπερματοζωαρίων στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού πριν από την έναρξη της ενεργοποίησής τους, καθώς και η διάρκεια αυτής, αν και γενικά θεωρούνταν χαρακτηριστικά του κάθε είδους ζώου, μπορεί να διαφέρουν από άτομο σε άτομο<sup>7-9</sup>. Ενδεικτική των παραπάνω χρονικών χαρακτηριστικών της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων ενός αρσενικού είναι η γονιμότητα ομάδων θηλυκών στις οποίες διενεργείται σπερματέγχυση σε διαφορετικούς χρόνους πριν από την αναμενόμενη ωοθυλακιορρηξία<sup>7,8,10</sup>.

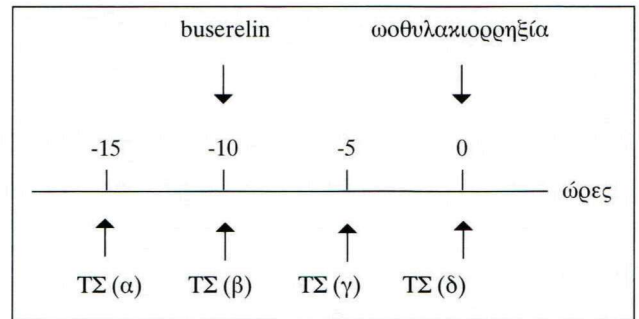
Στη μελέτη αυτή συγκρίθηκε η γονιμότητα θηλυκών κουνελιών μετά από σπερματέγχυση με σπέρμα αρσενικών με διαφορετικό χρόνο ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων τους με εκείνη κουνελιών μετά από σπερματέγχυση με μίγμα ισάριθμων σπερματοζωαρίων από καθένα από τα παραπάνω αρσενικά (ετεροσπερμική σπερματέγχυση). Σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης της ανάμιξης ετερογενών πληθυσμών σπερματοζωαρίων με διαφορετικά χρονικά χαρακτηριστικά ενεργοποίησης στη γονιμότητα του σπέρματος.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν 3 αρσενικά ( $A_1, A_2, A_3$ ) και 80 θηλυκά κουνέλια φυλής Νέας Ζηλανδίας, αποδεδειγμένης γονιμότητας, ηλικίας 8-15 και 6-10 μηνών, αντίστοιχα, και σωματικού βάρους 3,5-5 Kg. Ο σταβλισμός τους γινόταν σε ατομικά υπερυψωμένα συρμάτινα κλουβιά. Η διατροφή τους περιλάμβανε καθημερινή κατ' άτομο χορήγηση 200g ισορροπημένου σιτηρεσίου, σε μορφή συμπιπτων (pellets) και με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 16%, ενώ η λήψη νερού γινόταν κατά βούληση από αυτόματες ποτίστρες. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε στις 16 ώρες<sup>11</sup> με τη βοήθεια τεχνητού φωτισμού, ενώ η θερμοκρασία περιβάλλοντος κυμαινόταν από 16 έως 18 °C.

Το ιστορικό της αναπαραγωγικής δραστηριότητας περιλάμβανε έναν τουλάχιστον τοκετό στα θηλυκά και γόνιμες οχείες στα αρσενικά. Επιπλέον, το σπέρμα των αρσενικών, που επιλέχθηκαν από ομάδα 15 ζώων - σπερματοδοτών, είχε όγκο >0,8 ml, πυκνότητα >200x10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια / ml, ποσοστό σπερματοζωαρίων με προοδευτική κίνηση >80% και ποσοστό σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες <30%. Η πυκνότητα του σπέρματος υπολογιζόταν με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου, ενώ



**Εικόνα 1.** Σχηματική παράσταση των χρόνων σπερματέγχυσης στις υποομάδες α, β, γ και δ (n=5) σε σχέση με τη χορήγηση buserelin και την ωοθυλακιορρηξία.

ο προσδιορισμός της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων γινόταν με εξέταση μιας σταγόνας σπέρματος, αμέσως μετά τη συλλογή του με τεχνητό κόλπο, σε μικροσκόπιο με θερμαινόμενη πλάκα (37 °C). Ο υπολογισμός του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες γινόταν μετά από εξέταση επιχρίσματος σπέρματος, που είχε προηγουμένως χρωσθεί με χρώση Eosin - Nigrosin. Από κάθε αρσενικό εξετάστηκαν 4 εκσπερματίσματα (2 σπερματοληψίες / εβδομάδα).

### Πειραματικό πρωτόκολλο

Διενεργήθηκαν σπερματεγχύσεις με σπέρμα από κάθε αρσενικό χωριστά ( $A_1, A_2, A_3$ ) και τα αποτελέσματα (ποσοστό τοκετών, μέγεθος τοκετοομάδας) συγκρίθηκαν με εκείνα ετεροσπερμικής σπερματέγχυσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε μίγμα ίσου αριθμού σπερματοζωαρίων με προοδευτική κίνηση από τα παραπάνω αρσενικά ( $A_{1+2+3}$ ). Για το σκοπό αυτό, τα θηλυκά κουνέλια χωρίστηκαν σε 4 ισάριθμες ομάδες (1, 2, 3 και 4) (n=20). Στις ομάδες 1, 2 και 3 χρησιμοποιήθηκε σπέρμα από τα αρσενικά  $A_1, A_2$  και  $A_3$ , αντίστοιχα, ενώ στην ομάδα 4 εφαρμόστηκε ετεροσπερμική σπερματέγχυση (εικόνα 1).

Σε κάθε ομάδα προσδιοριζόταν ο χρόνος έναρξης και η διάρκεια ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων με βάση τα αποτελέσματα των σπερματεγχύσεων που διενεργούνταν 15, 10 και 5 ώρες πριν ή ταυτόχρονα με την ωοθυλακιορρηξία (σε 4 αντίστοιχες υποομάδες, α, β, γ και δ) (εικόνα 1).

### Αραίωση και δόση σπέρματος

Το σπέρμα, αμέσως μετά τη συλλογή και εκτίμησή του, αραιωνόταν με Tris buffer<sup>12</sup> μέχρι πυκνότητας 20x10<sup>6</sup> σπερματοζωαρίων με προοδευτική κίνηση / ml. Κάθε δόση σπέρματος περιείχε 8,6x10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια με προοδευτική κίνηση<sup>13</sup> στις ομάδες 1, 2 και 3, και 3x8,6x10<sup>6</sup> στην ομάδα 4.

### Προετοιμασία των θηλυκών

Η προετοιμασία των θηλυκών για τη σπερματέγχυση περιλάμβανε υποδόρια χορήγηση 15 I.U. PMSG / ζώο

**Πίνακας 1.** Ποσοστά τοκετών (%) μετά από διενέργεια ΤΣ σε διάφορους χρόνους πριν από την ωοθυλακιορρηξία.

Ομάδα (προέλευση σπέρματος)	Χρονικό διάστημα ΤΣ - ωοθυλακιορρηξίας (υποομάδα)			
	15 h (α)	10 h (β)	5 h (γ)	0 h (δ)
1 (A <sub>1</sub> )	100 <sup>a,x</sup>	100 <sup>a,x</sup>	80 <sup>a,x</sup>	0 <sup>a,y</sup>
2 (A <sub>2</sub> )	20 <sup>b,x</sup>	20 <sup>b,x</sup>	80 <sup>a,y</sup>	60 <sup>b,xy</sup>
3 (A <sub>3</sub> )	80 <sup>a,x</sup>	100 <sup>a,x</sup>	40 <sup>a,y</sup>	60 <sup>b,xy</sup>
Μέσος όρος	67 <sup>ab,x</sup>	73 <sup>a,x</sup>	67 <sup>a,x</sup>	40 <sup>ab,x</sup>
4 (A <sub>1+2+3</sub> )	100 <sup>a,x</sup>	100 <sup>a,x</sup>	80 <sup>a,x</sup>	60 <sup>b,x</sup>

<sup>a,b</sup> Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες, στην ίδια στήλη, διαφέρουν σημαντικά ( $P < 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες, στην ίδια σειρά, διαφέρουν σημαντικά ( $P < 0,05$ ).

(Intergonan - Intervet), 96 ώρες πριν από την ΤΣ, για την εξασφάλιση επαρκούς και συγχρονισμένης ανάπτυξης των ωοθυλακίων, καθώς και ενδομυϊκή χορήγηση 0,8 μg buserelin / ζώο (Receptal - Hoechst) με αποτέλεσμα την ωοθυλακιορρηξία, 10 ώρες αργότερα (πίνακας 1).

#### Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των ποσοστών τοκετών έγινε με τη βοήθεια του  $\chi^2$  - test. Για τη διαπίστωση διαφορών σε ό,τι αφορά την παράμετρο "μέγεθος τοκετοομάδας" χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης (One Way Anova), ενώ η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με τη βοήθεια του Duncan test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι διαφορές όπου  $P < 0,05$ .

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το ποσοστό τοκετών και το μέσο μέγεθος τοκετοομάδας, σε κάθε πειραματική ομάδα, παρουσιάζονται στους πίνακες 1 και 2, αντίστοιχα.

Τα ποσοστά τοκετών διέφεραν σημαντικά ( $P < 0,05$ ) μεταξύ των υποομάδων, στις ομάδες 1, 2 και 3, καθώς και μεταξύ των ομάδων ανάλογα με το χρόνο σπερματέγχυσης (εκτός από την υποομάδα (γ) στην οποία η ΤΣ έγινε 5 h πριν από την ωοθυλακιορρηξία) (πίνακας 1).

Τα μέσα μεγέθη τοκετοομάδων διέφεραν σημαντικά ( $P < 0,05$ ) μεταξύ των υποομάδων, στις ομάδες 1, 3 και 4, καθώς και μεταξύ των ομάδων στην υποομάδα (δ) στην οποία η ΤΣ έγινε ταυτόχρονα με την ωοθυλακιορρηξία (πίνακας 2).

#### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γονιμότητα θηλυκών κουνελιών στα οποία διενεργήθηκε ΤΣ σε διάφορους χρόνους πριν από την ωοθυλακιορρηξία με σπέρμα ενός αρσενικού αποδεδειγμένης γο-

νιμότητας είναι ενδεικτική του χρόνου έναρξης, καθώς και της διάρκειας ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων του *in vivo*<sup>7,8,10</sup>. Με βάση την παραπάνω παρατήρηση, από την έρευνα αυτή προέκυψε ότι:

*Αρσενικό A<sub>1</sub>*: η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων δεν ξεκίνησε νωρίς μετά την εναπόθεσή τους στον κόλπο, δεδομένου ότι το ποσοστό τοκετών της υποομάδας στην οποία η ΤΣ έγινε ταυτόχρονα με την ωοθυλακιορρηξία ήταν μηδενικό. Ωστόσο, η ενεργοποίηση διήρκησε αρκετά (τουλάχιστον 10 ώρες) αφού παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό τοκετών (80-100%) όταν η ΤΣ έγινε 5, 10 ή 15 ώρες πριν από την ωοθυλακιορρηξία.

*Αρσενικό A<sub>2</sub>*: η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων ξεκίνησε αμέσως μετά την εναπόθεσή τους στον κόλπο, όπως προκύπτει από το ικανοποιητικό ποσοστό τοκετών (60%) της υποομάδας στην οποία η ΤΣ έγινε ταυτόχρονα με την ωοθυλακιορρηξία. Ωστόσο, η διάρκεια της ενεργοποίησης δεν ήταν μεγάλη, δεδομένου ότι το υψηλό ποσοστό τοκετών (80%), που παρατηρήθηκε στην περίπτωση που τα σπερματοζωάρια παρέμειναν για 5 ώρες στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού πριν από την ωοθυλακιορρηξία, μειώθηκε σημαντικά (σε 20%), όταν η παραμονή τους παρατάθηκε για άλλες 5-10 ώρες.

*Αρσενικό A<sub>3</sub>*: η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων ξεκίνησε αμέσως μετά την εναπόθεσή τους στον κόλπο, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε ικανοποιητικό ποσοστό τοκετών (60%), όταν η ΤΣ έγινε ταυτόχρονα με την ωοθυλακιορρηξία. Επίσης, η διάρκεια της ενεργοποίησης ήταν μεγάλη, αφού το ποσοστό τοκετών διατηρήθηκε υψηλό (80%), ακόμη και όταν τα σπερματοζωάρια παρέμειναν για 15 ώρες στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού πριν από την ωοθυλακιορρηξία.

Από τα παραπάνω προέκυψε ότι τόσο ο χρόνος έναρξης όσο και η διάρκεια της ενεργοποίησης των σπερματο-

**Πίνακας 2.** Μέσο μέγεθος τοκετοομάδας (+SD), σε κάθε πειραματική ομάδα, μετά από διενέργεια ΤΣ σε διάφορους χρόνους πριν από την ωοθυλακιορρηξία (οι μέσοι όροι αφορούν τα ζώα που γέννησαν).

Ομάδα (προέλευση σπέρματος)	Χρονικό διάστημα ΤΣ - ωοθυλακιορρηξία (υποομάδα)			
	15 h (α)	10 h (β)	5 h (γ)	0 h (δ)
1 (A <sub>1</sub> )	7,0±1,2 <sup>ax</sup>	7,4±2,1 <sup>ax</sup>	6,0±2,2 <sup>ax</sup>	0,0 <sup>xy</sup>
2 (A <sub>2</sub> )	4,0±0,0 <sup>ax</sup>	5,0±0,0 <sup>ax</sup>	5,8±1,7 <sup>ax</sup>	4,3±2,3 <sup>bx</sup>
3 (A <sub>3</sub> )	7,3±1,7 <sup>ax</sup>	7,6±2,1 <sup>ax</sup>	4,5±0,7 <sup>xy</sup>	3,3±0,6 <sup>by</sup>
Μέσος όρος	6,1±1,8 <sup>ax</sup>	6,7±1,4 <sup>ax</sup>	5,4±0,8 <sup>xy</sup>	2,6±2,3 <sup>by</sup>
4 (A <sub>1+2+3</sub> )	7,4±1,1 <sup>ax</sup>	7,4±1,3 <sup>ax</sup>	5,8±1,3 <sup>xy</sup>	4,0±1,2 <sup>by</sup>

<sup>a,b</sup> Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες, στην ίδια στήλη, διαφέρουν σημαντικά ( $P < 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες, στην ίδια σειρά, διαφέρουν σημαντικά ( $P < 0,05$ ).

ζωαρίων, στο σύνολό τους, διέφεραν μεταξύ των αρσενικών κουνελιών. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με εκείνες και άλλων ερευνητών<sup>7-9,14,15</sup>.

Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι ο χρόνος έναρξης της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων δε διαφέρει μόνο μεταξύ διαφορετικών ατόμων, αλλά και μεταξύ υποπληθυσμών σπερματοζωαρίων του ίδιου εκσπερματίσματος, δεδομένου ότι η αντίδραση του ακροσώματος έχει παρατηρηθεί ότι εκδηλώνεται κλιμακωτά σε *in vitro*<sup>16-18</sup>, καθώς και *in vivo* συνθήκες<sup>19-21</sup>. Ακόμη, ο χρόνος γόνιμης ζωής του σπερματοζωαρίου, ο οποίος περιορίζεται σημαντικά αφότου αυτό ενεργοποιηθεί<sup>22</sup>, έχει υπολογιστεί ότι δεν ξεπερνά τις 2 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης του ακροσώματος<sup>4</sup>. Επομένως, τα χρονικά χαρακτηριστικά της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων των ζώων της μελέτης αυτής αφορούσαν, στην ουσία, τα χρονικά όρια έναρξης της ενεργοποίησης των διαφόρων υποπληθυσμών σπερματοζωαρίων σε κάθε εκσπερμάτισμα, παρά τη διάρκειά της. Οι διαφορετικοί αυτοί χρόνοι έναρξης της διαδικασίας ενεργοποίησης *in vivo* αποδίδονται κυρίως σε κληρονομικής φύσης διαφορές των σπερματοζωαρίων, παρά σε διαφορές του βαθμού ωριμότητάς τους κατά την έξοδο από την επιδιδυμίδα<sup>5</sup>.

Στην ομάδα 4 εφαρμόστηκε ετεροσπερμική σπερματέγχυση με σπέρμα και των τριών αρσενικών κουνελιών (A<sub>1+2+3</sub>). Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που χρησιμοποιούνταν από κάθε ζώο ήταν ίσος με εκείνον της δόσης σπέρματος που χρησιμοποιούνταν στις αντίστοιχες ομοιοσπερμικές σπερματεγχύσεις τους ( $8,6 \times 10^6$ ). Έτσι, οι πιθανότητες γονιμοποίησης των ωαρίων από τα σπερματοζωάρια κάθε αρσενικού ήταν ίσες όχι μόνο με εκείνες των υπολοίπων αρσενικών που συμμετείχαν στην ετεροσπερμική σπερματέγχυση, αλλά και με αυτές του ίδιου αρσενικού κατά τις ομοιοσπερμικές σπερματεγχύσεις.

Για κάθε χρόνο σπερματέγχυσης, το ποσοστό τοκετών της ομάδας 4 (ετεροσπερμική σπερματέγχυση) ήταν ίσο με το υψηλότερο ποσοστό των υπολοίπων ομάδων (ομοιοσπερμική σπερματέγχυση) και μεγαλύτερο από το μέσο όρο αυτών. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα μέσα μεγέθη τοκετοομάδων της ομάδας 4, τα οποία ήταν ίσα ή ελαφρώς μικρότερα από τα υψηλότερα μέσα μεγέθη των υπολοίπων ομάδων και μεγαλύτερο από το μέσο όρο αυτών, για κάθε χρόνο σπερματέγχυσης. Από τα παραπάνω προέκυψε ότι η ανάμιξη ετερογενών πληθυσμών σπερματοζωαρίων με διαφορετικούς χρόνους ενεργοποίησης βελτίωσε τη γονιμότητα του σπέρματος, οποιονδήποτε χρόνο κι αν διενεργήθηκε η σπερματέγχυση.

Με βάση τα ποσοστά τοκετών της ομάδας της ετεροσπερμικής σπερματέγχυσης, τα οποία κυμάνθηκαν από μέτρια (60%) έως υψηλά επίπεδα (80-100%), για όλους τους χρόνους σπερματέγχυσης, εκτιμάται ότι στο μίγμα των ετερογενών πληθυσμών σπερματοζωαρίων, η έναρξη της ενεργοποίησης ξεκίνησε αμέσως μετά την εναπόθεσή τους στο γεννητικό σωλήνα του θηλυκού και συνεχίστηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 15 ώρες). Επομένως, αυξήθηκε ο συνολικός χρόνος παρουσίας ενεργοποιημένων σπερματοζωαρίων στη γεννητική οδό του θηλυκού, πιθανώς λόγω αύξησης των χρονικών ορίων έναρξης της ενεργοποίησης. Με αυτό το δεδομένο είναι πιθανό να συμμετείχαν, σε όσες σπερματεγχύσεις πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα με την ωοθυλακιορρηξία, τα σπερματοζωάρια που ενεργοποιήθηκαν ταυτόχρονα με την ωοθυλακιορρηξία, τα σπερματοζωάρια που ενεργοποιήθηκαν αμέσως μετά την εναπόθεσή τους στον κόλπο, ενώ στις σπερματεγχύσεις που έγιναν 5, 10 ή 15 ώρες πριν από την ωοθυλακιορρηξία, εκείνα των οποίων η ενεργοποίηση ξεκίνησε μετά από ανάλογα χρονικά διαστήματα.

Θα ήταν χρήσιμο, για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, να εξακριβωνόταν η πατρότητα των νεογέννη-

των της ομάδας της ετεροσπερμικής σπερματέγχυσης. Σε παρόμοιες μελέτες, ο έλεγχος της πατρότητας των νεογνών έχει γίνει με βάση το χρώμα του τριχώματος<sup>23,24</sup> ή την ομάδα αίματος<sup>25</sup>, καθώς και με τη χρήση χημικών ή ραδιενεργών μεταλλαξιόγόνων ουσιών<sup>26,27</sup>, ενώ εκείνη των γονιμοποιημένων ωαρίων με τη χρήση σπερματοζωαρίων που είχαν προηγουμένως σημανθεί με φθορίζουσες ουσίες<sup>7</sup>.

Η αντιμετώπιση του προβλήματος της μειωμένης γονιμότητας του σπέρματος κουνελιού λόγω πρώιμης ή καθυστερημένης έναρξης ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων του, αποτελεί το αντικείμενο πρόσφατων ερευνών που έχουν ως στόχο την ανεύρεση *in vitro* μεθόδων αναστολής ή επιτάχυνσης της παραπάνω διαδικασίας<sup>15</sup>. Η ετεροσπερμική σπερματέγχυση με σπερματοζωάρια ποικίλων χρόνων ενεργοποίησης δίνει τη δυνατότητα μιας πιο πρακτικής λύσης, δεδομένου ότι βελτιώνει τη γονιμότητα του σπέρματος, ιδιαίτερα μάλιστα στις περιπτώσεις όπου η σπερματέγχυση σε συγκεκριμένο χρόνο πριν από την ωοθλακιορρηξία δεν είναι δυνατή.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Eddy EM. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill I et al (Eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1988:27-68.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill I et al (Eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1988:135-185.
- Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L and Biggers JB (Eds). *Fertilization and Embryonic Development in vitro*. Plenum Press, New York, 1981:81-182.
- Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 1983, 28:108-120.
- Cuasnicu PS, Bedford JM. The effect of moderate epididymal aging on the kinetics of the acrosome reaction and fertilizing ability of hamster spermatozoa. *Biol Reprod* 1989, 40:1067-1073.
- Harrison RA. Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996, 8(4):581-594.
- Parrish JJ, Foote RH. Fertility differences among male rabbits determined by heterospermic insemination of fluorochrome-labeled spermatozoa. *Biol Reprod* 1985, 33:940-949.
- Chen Y, Li M, Simkin E, Yang X, Foote RH. Fertility of fresh and frozen rabbit semen inseminated at different times is indicative of male differences in capacitation time. *Biol Reprod* 1989, 41:848-853.
- Berger T. Proportion of males with lower fertility spermatozoa estimated from heterospermic insemination. *Theriogenology* 1995, 43:769-775.
- Chen Y, Yang X, Foote RH. Timed breeding of rabbits with fresh and frozen - thawed semen and evidence of acrosome alteration following freezing and thawing. *Anim Reprod Sci* 1989, 18:35-41.
- Σφαιροπούλος Α. Κονικλοτροφία. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, 1991:55-73.
- Castellini C. Σύγχρονες τεχνικές στην αναπαραγωγή των κουνελιών και δυνατότητες εφαρμογής τους. *Πρακτικά 1ης Ελληνοϊταλικής Επιστημονικής Διημερίδας*. 3-4 Φεβρουαρίου, Θεσσαλονίκη, 1995:19-28.
- Hanada A, Nagase H. Cryopreservative effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1980; 60:247-252.
- Kim CK, Im KS, Zheng X, Foote RH. In vitro capacitation and fertilizing ability of ejaculated rabbit sperm treated with lysophosphatidylcholine. *Gam Res* 1989, 22:131-141.
- Young RJ, Bodt BA, Heitkamp DH. Action of metallic ions on the precocious development by rabbit sperm of motion patterns that are characteristic of hyperactivated motility. *Mol Reprod Dev* 1995, 41(2):239-248.
- Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 1974, 89:161-171.
- Talbot P, Franklin LE. Morphology and kinetics of the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 1976, 198:163-176.
- Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlorotetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984, 104:287-196.
- Overstreet JW, Cooper GW. The time and location of the acrosome reaction during sperm transport in the female rabbit. *J Exp Zool* 1979, 209:97-104.
- Cummins JM. Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from oviducts of mated ewes. *Gamete Res* 1982, 6:53-63.
- Cummins JM, Yamagimachi R. Sperm/egg ratios and the state of the acrosome reaction during *in vivo* fertilization in the hamster. *Gamete Res* 1982, 5:239-256.
- Bedford JM. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 1970 (Suppl 2):128-158.
- Beatty RA, Bennet GH, Hall JG, Hancock JL, Stewart DL. An experiment with heterospermic insemination in cattle. *J Reprod Fertil* 1969, 19:491-502.
- O'Reilly PJ, Graves CN, Dziuk PJ. Heterospermic insemination of rabbit semen as a means of evaluating techniques of semen handling. *J Reprod Fertil* 1972, 29:49-56.
- Stewart DL, Spooner RL, Bennet GH, Beatty RA, Hancock JL. A second experiment with heterospermic insemination in cattle. *J Reprod Fertil* 1974, 36:107-116.
- Overstreet JW, Adams CR. Mechanisms of selective fertilization in the rabbit: sperm transport and viability. *J Reprod Fertil* 1971, 26:219-231.
- Ficher B, Adams CE. Fertilization following mixed insemination with "cervix selected" and "unselected" spermatozoa in the rabbit. *J Reprod Fertil* 1981, 62:337-343.