



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet11920
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 619:591.463.1

Biotechnological methods for sorting sperm by sex

V. Stefanyk[✉], Ye. Kostyschyn, S. Kava, O. Katsaraba, M. Ivakhiv

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

Article info

Received 25.06.2025
Received in revised form
28.07.2025
Accepted 29.07.2025

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.
Tel.: +38-050-663-52-12
E-mail: stefanyk@bigmir.net

Stefanyk, V., Kostyschyn, Ye., Kava, S., Katsaraba, O., & Ivakhiv, M. (2025). Biotechnological methods for sorting sperm by sex. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 27(119), 138–148. doi: 10.32718/nvlvet11920

The article summarizes the current state and prospects of sperm sex-sorting biotechnologies in the context of the steady increase in global demand for livestock products and the need to intensify reproduction while preserving animal welfare. It is emphasized that controlling the sex ratio of offspring is a key factor of genetic progress, farm profitability, herd biosecurity, and a tool for adapting production to market needs (a preference for heifers in dairy herds, males in beef production; reduction of dystocia risk and savings on castration in swine; targeted conservation of rare breeds of horses, small ruminants, and donkeys). A wide range of approaches for separating X- and Y-bearing spermatozoa is described. Traditional physico-chemical methods (multi-step gradient centrifugation, swim-up) show limited accuracy and poor reproducibility. Flow cytometry remains the only commercially effective technology: labeling DNA with Hoechst 33342 dye and laser detection allows the acquisition of highly pure fractions, which are widely applied in dairy and beef cattle. However, its limitations are highlighted: UV exposure and staining can impair sperm motility and membrane integrity; mechanical and cryo-stresses during sorting/freezing reduce fertilizing capacity; doses contain fewer spermatozoa, resulting in lower conception rates compared with unsorted semen. Future prospects are associated with “gentle”, marker-free platforms such as microfluidics and dielectrophoresis (separation based on differences in zeta potential and polarizability), as well as nanotechnologies (magnetic or gold nanoparticles for selective enrichment of X/Y populations). These solutions are potentially cheaper, simpler to implement, closer to natural selection, and less damaging to spermatozoa, but they require standardization of buffers, voltage/frequency regimes, flow rates, and interspecies validation. Ethical and legal aspects of using these technologies in human reproduction (permissible only for medical reasons) and economic drivers of the market (increasing demand for AI, sperm banking, semen analysis) are also considered. It is concluded that further research should focus on improving the viability and fertility of sex-sorted sperm, optimizing species-specific protocols, and conducting comparative economic evaluations to transform novel micro-/nanofluidic solutions from laboratory demonstrations into a routine, commercially available tool for sustainable livestock production.

Key words: sperm, sex-sorting, animal breeding, nanotechnology, microfluidics.

Біотехнологічні методи сортування спермій за статтю

В. Ю. Стефаник[✉], Є. Є. Костишин, С. Й. Кава, О. А. Кацараба, М. А. Івахів

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

Стаття узагальнює сучасний стан і перспективи біотехнологій сортування спермій за статтю в контексті стійкого зростання попиту на продукцію тваринництва та потреби інтенсифікації відтворення за збереження добробуту тварин. Обґрунтовується, що керування статевим складом приплоду є чинником генетичного прогресу, підвищення прибутковості та біобезпеки стада, а також інструментом адаптації виробництва до ринкових потреб (перевага теличок у молочному скотарстві, самців — у м'ясному напрямку; зниження ризику дисточії й економії на кастрації у свинарстві; цілеспрямоване збереження рідкісних порід коней, дрібної рогатої худоби, ослів). Описано спектр методів поділу X- та Y-несучих спермій. Традиційні фізико-хімічні підходи

(багатоступеневе градієнтне центрифугування, підплив) мають обмежену точність і низьку відтворюваність. Проточна цитометрія наразі є єдиною промислово ефективною технологією: маркування ДНК барвником Hoechst 33342 та лазерна детекція дозволяють отримувати високочисті фракції, що широко застосовуються у ВРХ та яловичному скотарстві. Водночас підкреслено її недоліки: УФ-експозиція та барвник можуть погіршувати рухливість і цілісність мембран; механічні та кріостреси під час сортування/заморожування знижують запліднювальну здатність; дози містять меншу концентрацію спермій, що впливає на показники запліднення порівняно з несортованою спермою. Перспективи пов'язані з "м'якими" безмаркерними платформами: мікрофлюїдика та діелектрофорез (розділення за відмінностями у дзета-потенціалі й поляризованості), а також нанотехнології (магнітні чи золоті наночастинки для селективного збагачення X/Y-популяцій). Ці рішення потенційно дешевші, простіші у впровадженні, ближчі до природного відбору й менш шкідливі для спермій, але потребують стандартизації буферів, режимів напруги/частоти, швидкостей потоку та міжвидової валідації. Окремо розглянуто етичні та правові аспекти застосування технологій у репродукції людини (допустимість виключно з медичною метою), а також економічні драйвери ринку (зростання попиту на ПІЗ, банкінг сперми, аналітику сперми). Зроблено висновок, що подальші дослідження мають фокусуватися на підвищенні життєздатності та фертильності сортованої сперми, оптимізації видоспецифічних протоколів і порівняльних економічних оцінках, аби перетворити нові мікро-/нанофлюїдні рішення з лабораторних демонстрацій на рутинний, комерційно доступний інструмент сталого тваринництва.

Ключові слова: сперма, сортування за статтю, розведення тварин, нанотехнології, мікрофлюїдика

Вступ

Лише в 20 столітті населення світу зросло з 1,65 мільярда до 6 міль ярдів і наразі, за оцінками, зростає приблизно на 1,08% на рік – у середньому на 82 мільйони людей на рік. За даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН, до 2050 року кількість людей становитиме 9,5 мільярда, і це зростання, пов'язане з економічним розвитком у кількох країнах із середнім рівнем доходу, призведе до змін у харчуванні, тому попит на продукти тваринного походження зростає. Проте прогодувати понад 9 мільярдів людей буде непростою завданням, тому тваринницький сектор буде відчувати надзвичайний тиск щодо забезпечення як кількості, так і якості продукції (Ribeiro et al., 2013; Neculai-Valeanu & Arnton, 2021).

Однією з найуспішніших стратегій покращення генетичного прогресу та прибутковості тваринницьких ферм є відбір потомства певної статі. Сортування спермій, один із найцінніших інструментів у допоміжній репродукції, дозволяє відбирати "здорову" сперму, а також визначати специфічні ознаки, такі як стать, процес, у якому спермії розділяються на дві окремі популяції з Х-несучими (жіночими), відповідно Y-несучими (чоловічими) хромосомами (Garner et al., 1983; Cran et al., 1993; Maxwell et al., 1996). Використання сортованої за статтю сперми для штучного запліднення та екстракорпорального запліднення вважається цінним інструментом для підвищення ефективності виробництва та оптимізації репродуктивного менеджменту сільськогосподарських тварин, що згодом забезпечує достатній харчовий ресурс для зростаючої популяції (Holden & Butler, 2018; Cottle et al., 2018; Diers et al., 2020).

У цій статті розглядаються методи сортування спермій за статтю, що використовуються в даний час, а також нові, підкреслюючи їх практичну та економічну застосовність.

Попередній відбір сперми за статтю хромосомою є широко використовуваною біотехнологією у тваринництві для отримання потомства бажаної статі; це важливо для підвищення ефективності розведення тварин і забезпечення сталого виробництва молока та яловичини для населення, що добре враховується Продовольчою та сільськогосподарською організацією (FAO). Використання сортованої за статтю сперми

стає все більш популярним у всьому світі серед фермерів, головним чином завдяки численним перевагам, які вона може принести. Крім збільшення розміру стада швидше та економічніше, можна уникнути потенційних загроз біобезпеці (Obuchi et al., 2019; Bittante et al., 2020; Verma et al., 2020).

Результати та їх обговорення

В усьому світі галузь тваринництва отримала вигоду від використання цієї технології як в інтенсивних, так і в пасовищних системах (McCulloch et al., 2013; Murphy et al., 2016; Ettema et al., 2017; Vishwanath & Moreno, 2018; Osada et al., 2019). Наприклад, у молочних корів телята мають важливе значення для підвищення продуктивності, тоді як телята мають меншу економічну цінність. Вища цінність телят жіночої статі та знижений ризик дистогії є двома іншими потужними економічними факторами для зменшення кількості телят чоловічої статі, вирощених у молочній промисловості. Згідно з дослідженням, проведеним Seidel (2003), дистогія може бути зменшена до 20 %, якщо для штучного запліднення використовується сортована за статтю сперма. Ще одне дослідження, проведене Norman et al. (2010) виявили, що використання сперми з визначенням статі знижує ризик дистогії у телиць на 28 %, відповідно на 64 % у корів. Цей висновок може бути пов'язаний з тим, що телиця в середньому на 2 кг легша за вагою при народженні порівняно з телятами (Seidel, 2003). Співвідношення чоловіків і жінок насправді не є точно 1:1, оскільки багато змінних, у тому числі харчування, можуть змінити його. Garner & Seidel (2008) показали, що звичайне співвідношення статей для штучного запліднення становить близько 51 % самців, при цьому старші корови дають 53 % потомства чоловічої статі. Таким чином, конкретна та ефективна репродуктивна технологія сортування сперми за статтю була б надзвичайно корисною для молочного сектору. На відміну від цього, на фермах, які займаються вирощуванням яловичини, телята чоловічої статі є тими, чия економічна цінність має значення (Hall & Glaze, 2014; Naniwa et al., 2018). Існує також інтерес до інших видів, таких як коні, також для використання сперми за статтю (Squires, 2020). Відсортоване за статтю сперму можна використовувати для

забезпечення виживання рідкісних порід коней або для комерційних цілей, особливо для тих порід, де потрібна певна стать (Cuervo-Arango, 2015).

У кінному поло та Arabian Horse Show самцям віддають перевагу, ніж самцям, оскільки вони вважаються більш спритними та легшими для навчання. У свинарстві, наприклад, можна віддати перевагу поросятам, оскільки таким чином зменшуються витрати, пов'язані з кастрацією самців (Spinaci et al., 2016). Звичайне використання сперми за статтю в програмах штучного інтелекту надасть свинарству абсолютно новий вимір.

Інші галузі тваринництва, такі як виробництво ослиного молока, можуть отримати вигоду від цієї біотехнології, щоб задовольнити зростаючий ринковий попит на молочне молоко. Ослине молоко давно використовується як заміник для дітей і пацієнтів з алергією на білок коров'ячого молока через його схожість з жіночим молоком і низький алергенний потенціал. На відміну від інших видів молока, яке зазвичай використовується для годування людей, осляче молоко має деякі кращі біохімічні та нутрицевтичні якості (Martini et al., 2014; Vincenzetti et al., 2020).

Ця біотехнологія також може дати генетичний та економічний поштовх у галузі вівчарства та козоводства (Bathgate et al., 2013). Крім того, доведено, що сортована за статтю сперма дуже допомагає в програмах, розроблених для видів, що знаходяться під загрозою зникнення, завдяки покращенню якості ресурсів генетичного банку (сперми та ембріонів) (Andrabi & Maxwell, 2007; Hermes et al., 2009; Behr et al., 2009; O'Brien et al., 2015; Cottle et al., 2018).

У випадку з тваринами ця біотехнологія було впроваджено з огляду на економічні та генетичні переваги, які вона може принести, але використання сперми сортування за статтю в репродукції за допомогою людини викликало, як і передбачалося, багато етичних суперечок, тому використання технологій сортування за статтю для сімейного балансу заборонено в багатьох країнах (George, 2006; Kippen et al., 2018; Saunders, 2019). З медичних причин, таких як профілактика генетичних розладів, зчеплених зі статтю, прийнято вибір статі ембріона за допомогою екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) і передімплантаційного генетичного тестування (ПГТ). Однак, якщо спермії не відсортовані за статтю до ЕКЗ, існує ймовірність отримати ембріони, придатні для перенесення, а ті, які не можна перенести, повинні бути виписані. Таким чином, сортування за статтю в поєднанні з ЕКЗ і ПГТ може збільшити шанси отримати здорове потомство і навіть зменшити витрати, пов'язані з ЕКЗ і ПГТ.

Незважаючи на те, що сортування сперми за статтю є однією з найбільш інтенсивно досліджуваних технологій і за останні три десятиліття було досягнуто помітного прогресу в її оптимізації, показники зачаття при використанні сперми за статтю все ще перевищують очікування (Dejarnette et al., 2011; Thomas et al., 2019). Програми допоміжної репродукції можуть отримати користь від використання нових технологій, таких як нанотехнології та мікрофлюїдика.

Протягом багатьох років було описано декілька різних методів розділення спермій, заснованих на різних відмінностях між Y- та X-несучими сперміями, такими як форма та розмір, раціон, модель рухливості та заряд поверхні. Надійність деяких підходів викликає сумніви, насамперед через низьку відтворюваність і точність. Одним із таких прикладів є центрифугування в багаторазовому градієнті, метод, який регулярно використовується в допоміжній репродукції людей і тварин для відбору популяції сперми зі специфічними характеристиками, такими як висока цілісність хроматину та покращена рухливість і життєздатність (Noguchi et al., 2015; Arias et al., 2017), а також отримання спермій з еякулятів сперми (Gloria et al., 2016; Muratori et al., 2019; Dai et al., 2020). Кілька авторів використовували цей метод у поєднанні з технікою підпливу для поділу популяцій спермій, що містять X та Y, у різних видів, але результати були досить суперечливими. Підхід заснований на тому факті, що під час центрифугування в градієнті X-хромосома, що містить спермії, осідає на дні колонки через більшу щільність цих клітин, а Y-хромосома, що містить спермії, залишається у високій частині у верхній частині колонки. У той час як деякі автори вважали центрифугування в багаторазовому градієнті з використанням колоїдів, таких як Percoll, Bovipure або PureSperm, корисним засобом для збагачення сперми сперміями, що містять X (Andersen & Byskov, 1997; Underwood et al., 2009; Lucio et al., 2012; Promthep et al., 2016), інші дійшли висновку, що, хоча цей метод може трохи збагатити спермії, що містять X або Y, відмінності несуттєві та неявно, метод не може бути рутинно використаний для сортування сперми за статтю (Andersen & Byskov, 1997; Lin et al., 1998; Wolf et al., 2008; Esmaeilpour et al., 2012; Javed et al., 2019; Hadi et al., 2020).

На даний момент єдиною ефективною системою сортування сперми є проточна цитометрія, високошвидкісний аналізатор для підрахунку та сортування клітин. Ця технологія зазвичай використовується в галузі медицини та клінічних лабораторіях для виконання великої кількості аналізів (Naniwa et al., 2018; Reinsalu et al., 2019). Для сортування сперми за допомогою проточної цитометрії зразок спочатку потрібно розбавити та позначити спеціальним флуоресцентним барвником під назвою Hoechst 33342, який зв'язується з ДНК кожного спермія (Garner et al., 1983). X- та Y-хромосоми, також відомі як статеві хромосоми, суттєво відрізняються за вмістом ДНК, X-спермії містять у середньому на 3 % більше ДНК у людини та майже на 4 % у інших видів худоби, таких як бики, кабани, барани та кролики відповідно (Garner et al., 1983). Через цю різницю спермії з X-хромосомою поглинають більшу кількість барвника. Згодом клітини змушені текти окремими краплями в зону контакту з лазером, щоб опромінюватися інтенсивними лазерними променями. На підставі виявленої флуоресценції можна розрахувати популяцію клітин і оцінити форму та розмір кожної клітини (Johnson et al., 1987; Cran et al., 1993). Цей базовий підхід уже застосовувався для сортування сперми за статтю, особливо в секторі молочних продуктів і яловичини, де кілька мільйонів

телят народжуються від сортованої за статтю сперми. Проте різні дослідження показали, що вплив на клітини певних довжин хвиль УФ-спектру, а також комбінація флуоресцентного барвника біс-бензimidу (Hoechst 33342), що використовується для мічення клітин (Cran et al., 1993), може впливати як на рухливість спермій, так і на цілісність мембран (Corral-Baqués et al., 2009; Quan et al., 2015; Balao da Silva et al., 2016; Domingues et al., 2017; Khalaji et al., 2018).

Чистота відокремлених спермій після розділення підтверджується гібридизацією *in situ*. Механічні навантаження, викликані сперміями під час сортування та центрифугування, збільшують кількість мертвих або пошкоджених спермій майже на 20 % (Dararatana et al., 2015). Крім того, під час процесу сортування може втрутитися кілька інших стресових факторів, таких як сили зсуву, що діють під час гідродинамічного фокусування та проходження через інжекційне сопло, повторне електричне легування, що відповідає вмісту ДНК спермій, і наступне проходження через поле електростатичного відхилення. Окрім процесу сортування, етапи, які передують або наступні, такі як спільна інкубація з флуоресцентним барвником, охолодження та зберігання при низьких температурах перед осіменінням, відповідно, відповідають за подальший вплив на якість сперми.

Відсортована за статтю сперма зазвичай підлягає процесу заморожування, а потім розморожування; таким чином, її здатність до запліднення значно знижена порівняно з несортованою спермою, і це стало основним внеском в обмеження звичайного використання цього методу в тваринницькій галузі (Carvalho et al., 2010). Під час сортування за статтю спермії повинні бути індивідуально оцінені; отже, концентрація спермій на дозу набагато нижча, тобто приблизно два мільйони спермій на дозу порівняно з несорттованими дозами сперми, які зазвичай мають концентрацію приблизно 20 мільйонів спермій (Macedo et al., 2013). Останні дослідження були зосереджені на збільшенні концентрації спермій у дозах сперми, які сортують за статтю, щоб покращити фертильність, але це, швидше за все, також збільшить ціну за дозу.

Незважаючи на більш ніж 30-річний розвиток, запліднювальна здатність спермій за статтю все ще не відповідає очікуванням фермерів; однак варто зазначити, що швидкість сортування була значно покращена (Seidel, 2014; Thomas et al., 2017; Ferré et al., 2020). Дослідження, проведене Steel et al. (2020) дійшли висновку, що сортування за статтю за допомогою проточної цитометрії змінює морфокінетику спермій таким чином, що продовжується після запліднення, таким чином підтверджуючи той факт, що якість сперми відіграє життєво важливу роль у ранньому розвитку ембріонів. Ці висновки також підтверджуються дослідженням під керівництвом Mostek et al. (2020), згідно з якими ферменти, що беруть участь у гліколізі, окисному фосфорилуванні та збереженні постійного енергетичного заряду, були змінені в сортованій за статтю спермі порівняно з несортованою. Крім того, білки, які беруть участь у капацитації, акросомній реакції та згодом злитті спермія та яйцеклітини, менш поширені в сортованій за статтю спермі, що може

пояснити нижчий потенціал фертильності. У дослідженні, проведеному Magata et al. (2021), кінетика розвитку та життєздатність ембріонів великої рогатої худоби, вироблених *in vitro* за допомогою сортованої за статтю сперми, безперервно контролювали за допомогою покадрової зйомки, і автори показали, що як розвиток ембріонів, так і життєздатність були порушені при використанні сортованої за статтю сперми. Окрім біологічних проблем, досить висока вартість обладнання та потреба у високоспеціалізованому персоналі призвели до розробки інноваційних, менш дорогих підходів до відбору сперми та сортування за статтю; таким чином, нанотехнології та мікрофлюїдика на основі біомаркерів стали темою, що викликає великий інтерес.

Постійне зростання людської популяції є одним із найважливіших факторів, що обумовлюють необхідність підвищення продуктивності тварин. Тим не менш, одним із наших найважливіших пріоритетів у найближчі десятиліття буде не лише нагодувати планету, але й робити це в екологічно чистий спосіб. Для багатьох людей у всьому світі м'ясо та молочні продукти є важливими джерелами харчування. Наприклад, за останні 50 років виробництво м'яса зросло більш ніж утричі; щороку виробляється майже 330 млн. тонн, з яких 30 % становить яловичина. Світовий попит на м'ясо все ще зростає; однак, за оцінками ФАО, це зростання матиме тенденцію до сповільнення (European Commission, 2019). Водночас багато споживачів, ймовірно, розширять свій вибір м'яса, включивши в нього дорожчі м'ясні білки, такі як яловичина та овечина, що призведе до збільшення глобального споживання цих видів м'яса на душу населення до 2030 року (Bayram, 2017).

Очікується, що попит на молочні продукти, особливо сир, також зросте в найближчі роки, що призведе до збільшення виробництва молока в ЄС у наступні роки. Проте виробництво м'яса та молока має значні наслідки для навколишнього середовища, такі як збільшення викидів парникових газів, використання сільськогосподарських угідь та використання прісної води. Виробництво та споживання м'ясних, молочних та інших білкових продуктів екологічно чистим способом є однією з найактуальніших проблем у світі. Щоб досягти цілей сталого розвитку ЄС щодо скорочення викидів парникових газів, виробництво молока помірно зросте майже до 180 мільйонів тонн до 2030 року. Практика ведення сільського господарства, швидше за все, зміниться, з акцентом на управління стадом і харчування (European Commission, 2019).

Репродуктивні біотехнології, такі як штучне запліднення, є одним із ключових компонентів ефективної програми управління фермою. Очікується, що до 2028 року глобальний попит на штучне запліднення у ветеринарії перевищить 6 мільярдів доларів США, що зростає на 5,94 відсотка між 2021 і 2028 роками. Це зростання викликано потребою в генетично кращих породах тварин, що може дозволити фермерам отримувати вищі врожаї від меншої кількості тварин, таким чином зменшуючи вплив на навколишнє середовище. Очікується, що відповідні переваги, такі як ефективне використання репродуктивних самців,

генетичний відбір, зниження витрат на житло та зниження ризику передачі захворювань, сприятимуть упровадженню репродуктивних біотехнологій у найближчі роки (*Veterinary Artificial...*, 2021). Крім того, використання біотехнологій допоміжного відтворення для збереження видів, що перебувають під загрозою зникнення, може просунути цей сектор ще вперед.

У великої рогатої худоби м'ясного або молочного напрямків вибір статі потомства може бути одним із вирішальних факторів підвищення генетичного прогресу та прибутковості фермера, оскільки певні продуктивні ознаки тісно пов'язані зі статтю. Використання сортованої за статтю сперми для штучного запліднення екстракорпорального запліднення дозволяє тваринникам зберегти або збільшити свої стада без необхідності купувати додаткових самок або наражати стадо на потенційні патогени та хвороби (*Maxwell et al.*, 2004; *De Vries et al.*, 2008; *Chebel et al.*, 2010). Крім того, використання сортованої за статтю сперми в поєднанні з іншими репродуктивними біотехнологіями має потенціал для покращення глобального управління худобою, дозволяючи попередньо визначити стать тварини, таким чином максимізуючи прибутковість ферм (*Wheeler et al.*, 2006; *Peippo et al.*, 2009; *Stewart et al.*, 2011; *Pellegrino et al.*, 2016; *Lopes et al.*, 2020).

Незважаючи на вдосконалення, досягнуті за останні роки у сортуванні спермій за статтю за допомогою проточної цитометрії, деякі автори прийшли до висновку, що як у м'ясної, так і у молочної худоби показники запліднення нижчі порівняно з несортованою спермою (*Schenk et al.*, 2006; *DeJarnette et al.*, 2009; *Dawod & Elbaz*, 2020). Наприклад, у польових випробуваннях, проведених *Borchersen & Peacock* (2009) на трьох різних породах (голландська, джерсійська та датська червона), спостерігалася змінне зниження частоти зачаття при використанні сортованої за статтю сперми, коливаючись від 12 відсотків у голландської породи до 5 відсотків у датської червоної. Інше дослідження, проведене *Seidel & Schenk* (2008), показало нижчі показники вагітності при використанні сортованої за статтю сперми порівняно з несортованою. Вищезазначені висновки підтверджені недавніми дослідженнями, проведеними *Mikkola et al.* (2015), *Joezy-Shekalgorabi et al.* (2017), *Dawod & Elbaz* (2020) і *Drake et al.* (2020) щодо репродуктивної ефективності відсортованої за статтю сперми у корів і телиць. Однак, вирішуючи, чи використовувати сортоване за статтю сперму на молочній фермі, слід враховувати кліматичні умови та практику управління стадом у конкретному середовищі.

Незважаючи на різні висновки літератури щодо частоти запліднення у корів, коли використовується сортована за статтю сперма, більшість досліджень з телицями показує, що частота зачаття після штучного осіменіння з сортованою за статтю спермою коливається від 70 % до 90 %, залежно від управління фермами (*Macedo et al.*, 2013). З цих причин було зроблено декілька рекомендацій щодо сортованої за статтю сперми для телиць, щоб досягти кращих результатів.

Очікується, що в секторі штучної репродукції ринок банків сперми значно розшириться в найближчі

роки. У 2018 році світовий ринок банків сперми оцінювався в 4,33 мільярда доларів США, і очікується, що він зростатиме на 3,3 відсотка між 2018 і 2025 роками (*Research and Markets Sperm Bank*, 2019). Існує кілька факторів, що сприяють зростанню цього сектору, наприклад, прогрес у техніці кріоконсервації, підвищення обізнаності та доступу до лікування безпліддя, а також явище репродуктивного туризму. Іншим важливим фактором, який може вплинути на зростання ринку, є поширеність ожиріння в усьому світі, захворювання, яке добре визнано одним із основних факторів ризику чоловічого та жіночого безпліддя. Дедалі більше сприйняття неповних або одностатевих сімей у багатьох країнах також сприятиме потенційним можливостям зростання цієї галузі.

Очікується, що сегмент підготовки та аналізу сперми збільшиться, оскільки поширеність безпліддя серед населення продовжує зростати. Очікується, що в розвинених країнах ринок аналізу сперми розшириться у відповідь на зростання попиту на ефективні методи лікування та державну політику підтримки лікування безпліддя. Зростаюча популярність транскордонної репродуктивної допомоги в таких країнах, як Іспанія, Чеська Республіка чи Україна, завдяки менш обмежувальній правовій базі та нижчій вартості (*Salama et al.*, 2018), підвищила попит на послуги аналізу сперми, оскільки комплексний аналіз сперми є обов'язковим перед будь-яким лікуванням допоміжними репродуктивними технологіями.

Щоб зберегти свою частку ринку, учасники галузі постійно розробляють нові продукти, а також формують альянси та співпрацю, щоб забезпечити звичайну та відсортовану за статтю сперму з покращеною фертильністю та кращими витратами. Таким чином, збільшення попиту на сперму з визначенням статі та поява нових і вдосконалених технологій визначення статі швидше сприятимуть зростанню сегменту сперми з визначенням статі.

Протягом багатьох років було докладено незліченну кількість зусиль для створення методів розділення популяцій спермій, що несуть X та Y, і таким чином отримання потомства бажаної статі у сільськогосподарських тварин, для комерційних цілей або з медичних причин людини (наприклад, генетичні розлади, пов'язані зі статтю). Міжнародна галузь розведення тварин зараз стикається з незадоволеною потребою ринку в недорогому та ефективному інструменті сортування сперми за статтю. Таким чином, розробка альтернативних лабораторних методів сортування сперми за статтю стала важливою метою для вчених, які працюють у цій галузі.

Мікрофлюїдні платформи, що інтегрують технології електроманіпуляції, такі як діелектрофорез (ДЕФ), зараз широко використовуються для аналізу клітин, біомедичних застосувань і моніторингу навколишнього середовища. З незліченною кількістю демонстрацій своєї здатності сортувати клітини за допомогою неоднорідних електричних полів без необхідності хімічного маркування областей діелектрофорезу знову опинилася в центрі уваги завдяки її потенціалу маніпулювання мікрочастинками, наночастинками та клітинами. Відкриваються нові застосу-

вання, оскільки розділення ДЕФ тепер перенесено з лабораторних установок у практичні пристрої на чіпі. Раніше цей метод успішно використовувався на мікрофлюїдних чіпах для діагностичних цілей, таких як розділення циркулюючих ракових клітин (Burinaru et al., 2018; Turcan & Olariu, 2020) і еритроцитів (Zhang & Chen, 2020). У репродуктивній медицині людини та тварин нанотехнології, мікрофлюїдика та діелектрофорез зараз використовуються як корисні інструменти для покращення якості сперми, дозволяючи сортувати популяцію спермій із непошкодженою мембраною сперми, високою цілісністю ДНК та покращеною рухливістю (Knowlton et al., 2015; Lee et al., 2016; Wheeler & Rubessa, 2017; Parrella et al., 2019; Phiphattanaphiphop et al., 2020). Допоміжне відтворення дикої природи також може отримати користь від останніх проривів і нових горизонтів, які відкривають ці нові технології. Руйнівна діяльність людини та зміна клімату призвели до втрати середовища існування; таким чином, нині вимирання видів тварин відбувається набагато швидше, ніж передбачалося (Comizzoli & Holt, 2019). Природоохоронне розведення та АРТ є цінними активами в боротьбі за порятунк видів диких тварин, що знаходяться під загрозою зникнення. У найближчому майбутньому інноваційні підходи, такі як мікрофлюїдна культура *in vitro* або IVF-on-a-chip, можуть бути інтегровані в програми збереження та зробити вирішальний внесок у збереження зникаючих видів (Le Gac et al., 2021).

Окрім сортування спермій на основі певної характеристики, деякі дослідження були зосереджені, наприклад, на якісній ідентифікації статевих відмінностей у спермі за допомогою наночастинок золота (Barchanski et al., 2011; Gamrad et al., 2017). Одне з таких досліджень було проведено Mancini (2015), який запропонував новий підхід для націлювання на гени спермій, заснований на виявленні життєво важливих генетичних послідовностей, використовуючи генеровані лазером біокон'югати наночастинок золота.

За словами автора, проведене дослідження показало, що Y-хромосома великої рогатої худоби має певну кількість триплексних сайтів-мішеней, що робить триплексну гібридизацію дійсним варіантом для ідентифікації сперми, що містить Y-хромосому. Інша група дослідників зосередилася на використанні магнітних наночастинок для сортування сперми осла за статтю. Раніше наночастинки використовувалися для виділення апоптичних спермій із зразка сперми разом із флуоресцентними барвниками, антитілами або магнетизмом, але видається, що ця методика також може бути дуже успішною для ізоляції X-несучих клітин сперми без впливу на фізіологію та морфологію спермій. Метод магнітних наночастинок також заснований на дзета-різниці потенціалів.

Коротше кажучи, сперма поєднується з магнітними мікрокульками нанорозміру (приблизно ~50 нм у діаметрі), які заряджені негативно, інкубуються протягом 10 хвилин, а потім піддаються впливу магнітного поля приблизно на 20 хвилин для селективної ізоляції спермій, що містять X- або Y-образні кольори. За даними Dominguez et al. (2018), Y-несучі спермії

демонстрували дзета-потенціал -16 мВ, тоді як X-несучі спермії демонстрували зета-потенціал -20 мВ; отже, Y-несуча популяція спермій утворюватиме комплекси шляхом легшого зв'язування з MNP. Застосовуючи магнітну силу до пробірки, комплекси будуть прилипати до внутрішньої стінки пробірки, тоді як популяція, що містить X, залишається підвищеною в середовищі та може бути вилучена шляхом повільної аспірації. У спермі осла спермії, що несуть X-хромосому, були виділені на основі їх дзета-потенціалу з ефективністю 90 %, використовуючи магнітне поле, без зміни функціональних біомаркерів сперми, таких як життєздатність, рухливість і структура цілісності хроматину (Dominguez et al., 2018). Попередні експерименти з магнітними наночастинами, проведені на конях, показали, що результат вагітності при використанні магнітно відсортованої за статтю сперми жеребців становив майже 80 %, при цьому 95 % продуктів зачаття були підтверджені як самки за допомогою ультразвуку (Ramírez Castex et al., 2017).

Нещодавно Wongtawan et al. (2020) запропонували новий підхід до сортування сперми за статтю. Різницю в заряді мембрани (дзета-потенціал) між X- і Y-несучими сперміями можна використати для розділення двох популяцій, використовуючи мікрофлюїдний чіп на основі діелектрофорезу для безпечного сортування спермій за статтю без впливу на рухливість і життєздатність. Під час електрофорезу спермії реагували по-різному: популяція, що містить X, проходила вздовж чіпа (негативний ДЕФ), від електрода, тоді як популяція, що несе Y, яка називається позитивним ДЕФ, притягувалася до електрода. Автори дійшли висновку, що певні умови, такі як напруга 4 В і частота 1 МГц, значно зменшили відсоток популяції спермій, що містять Y, до майже 30 %, таким чином збагачуючи популяцію спермій, що містять X. Однак різні параметри, такі як тип буфера, швидкість потоку, напруга та частота, впливають на продуктивність сортування; таким чином, необхідні подальші дослідження для встановлення найбільш прийнятних умов і типу буфера, який необхідно використовувати для підвищення точності сортування за статтю.

Незважаючи на ефективність проточної цитометрії у відборі субпопуляцій клітин з використанням флуоресцентних маркерів, сортування на основі мікрофлюїд є більш придатним підходом до відбору чутливих клітин, таких як рак, сперма, кров та імунні клітини (Nakao et al., 2020). Мікрофлюїдика дозволяє сортувати спермії більш простим, економним і м'яким способом, що більше нагадує процеси природного відбору, уникаючи при цьому деяких більш шкідливих аспектів звичайних методів сортування сперми (Samuel et al., 2018). На відміну від багаторазового градієнтного центрифугування, трудомісткої техніки, яка потребує висококваліфікованого персоналу, або проточної цитометрії, яка вимагає дорогого обладнання та флуорохромів, мікрофлюїдне сортування використовує одноразові чіпи, які можна легко використовувати в будь-якій лабораторії.

Висновки

Метод проточної цитометрії шкодить сперміям, особливо їх життєздатності. Нагальна потреба в пошуку нових і вдосконалених методів сортування за статтю, а також досягнення мікро- та нанофлюїдики призвели до ідеї використання мікрофлюїдних потоків і нанотехнологій для розділення клітин сперми. Програми допоміжної репродукції можуть виграти від використання технологій екстреного визначення статі, які не вимагають дорогого обладнання та вузькоспеціалізованих людських ресурсів. Подальші дослідження повинні зосередитися на особливостях кожного виду, а також на специфічних характеристиках особин того самого виду, щоб підвищити точність цього методу та перетворити його на комерційно доступний продукт.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

- Andersen, C. Y., & Byskov, A. G. (1997). Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 76(2), 131–134. DOI: 10.3109/00016349709050068.
- Andrabi, S. M., & Maxwell, W. M. (2007). A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal reproduction science*, 99(3-4), 223–243. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.07.002.
- Arias, M. E., Andara, K., Briones, E., & Felmer, R. (2017). Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive biology*, 17(2), 126–132. DOI: 10.1016/j.repbio.2017.03.002.
- Balao da Silva, C. M., Ortega-Ferrusola, C., Morrell, J. M., Rodriguez Martínez, H., & Peña, F. J. (2016). Flow Cytometric Chromosomal Sex Sorting of Stallion Spermatozoa Induces Oxidative Stress on Mitochondria and Genomic DNA. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 51(1), 18–25. DOI: 10.1111/rda.12640.
- Barchanski, A., Taylor, U., Klein, S., Petersen, S., Rath, D., & Barcikowski, S. (2011). Golden perspective: application of laser-generated gold nanoparticle conjugates in reproductive biology. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 46 Suppl 3, 42–52. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01844.x.
- Bathgate, R., Mace, N., Heasman, K., Evans, G., Maxwell, W. M., & de Graaf, S. P. (2013). Birth of kids after artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 48(6), 893–898. DOI: 10.1111/rda.12182.
- Bayram, M. (2017). Future of Meat Industry. *MOJ Food Processing & Technology*, 5(1). DOI: 10.15406/mojfpt.2017.05.00117.
- Behr, B., Rath, D., Hildebrandt, T. B., Goeritz, F., Blottner, S., Portas, T. J., Bryant, B. R., Sieg, B., Knieriem, A., de Graaf, S. P., Maxwell, W. M., & Hermes, R. (2009). Germany/Australia index of sperm sex sortability in elephants and rhinoceros. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 44(2), 273–277. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2007.01056.x.
- Bittante, G., Negrini, R., Bergamaschi, M., Cecchinato, A., & Toledo-Alvarado, H. (2020). Pure-breeding with sexed semen and crossbreeding with semen of double-muscled sires to improve beef production from dairy herds: Factors affecting heifer and cow fertility and the sex ratio. *Journal of dairy science*, 103(6), 5246–5257. DOI: 10.3168/jds.2019-17932.
- Borchersen, S., & Peacock, M. (2009). Danish A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology*, 71(1), 59–63. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.026.
- Burinaru, T. A., Avram, M., Avram, A., Mărculescu, C., Țincu, B., Țucureanu, V., Matei, A., & Militaru, M. (2018). Detection of Circulating Tumor Cells Using Microfluidics. *ACS Combinatorial Science*, 20(3), 107–126. DOI: 10.1021/acscombsci.7b00146.
- Carvalho, J. O., Sartori, R., Machado, G. M., Mourão, G. B., & Dode, M. A. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*, 74(9), 1521–1530. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.030.
- Chebel, R. C., Guagnini, F. S., Santos, J. E., Fetrow, J. P., & Lima, J. R. (2010). Sex-sorted semen for dairy heifers: effects on reproductive and lactational performances. *Journal of dairy science*, 93(6), 2496–2507. DOI: 10.3168/jds.2009-2858.
- Comizzoli, P., & Holt, W. V. (2019). Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. *Biology of reproduction*, 101(3), 514–525. DOI: 10.1093/biolre/ioz031.
- Corral-Baqués, M. I., Rivera, M. M., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. E., & Rigau, J. (2009). The effect of low-level laser irradiation on dog spermatozoa motility is dependent on laser output power. *Lasers in medical science*, 24(5), 703–713. DOI: 10.1007/s10103-008-0606-7.
- Cottle, D. J., Wallace, M., Lonergan, P., & Fahey, A. G. (2018). Bioeconomics of sexed semen utilization in a high-producing Holstein-Friesian dairy herd. *Journal of dairy science*, 101(5), 4498–4512. DOI: 10.3168/jds.2017-13172.
- Cran, D. G., Johnson, L. A., Miller, N. G., Cochrane, D., & Polge, C. (1993). Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilisation. *The Veterinary record*, 132(2), 40–41. DOI: 10.1136/vr.132.2.40.
- Cuervo-Arango, J. (2015). Choosing the sex of the offspring in a commercial equine embryo transfer center. *Med. Weter*, 71(4), 195–197. URL: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20153154189>.

- Dai, X., Wang, Y., Cao, F., Yu, C., Gao, T., Xia, X., Wu, J., & Chen, L. (2020). Sperm enrichment from poor semen samples by double density gradient centrifugation in combination with swim-up for IVF cycles. *Scientific reports*, 10(1), 2286. DOI: 10.1038/s41598-020-59347-y.
- Dararatana, N., Tuantranont, A., Wongtawan, T., Oonkhanond, B. (2015). The dielectrophoresis microfluidic chip for cell separation: Case study of separation of floating cell and moving cells; *Proceedings of the 2015 8th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON)*; 25–27 November 2015; Pattaya, Thailand, 1–5.
- Dawod, A., & Elbaz, H. T. (2020). Effect of sexed semen, puberty and breeding ages on fertility of Holstein dairy heifers treated with double Ovsynch protocol. *Tropical animal health and production*, 52(6), 2925–2930. DOI: 10.1007/s11250-020-02306-6.
- De Vries, A., Overton, M., Fetrow, J., Leslie, K., Eicker, S., & Rogers, G. (2008). Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of dairy science*, 91(2), 847–856. DOI: 10.3168/jds.2007-0536.
- Dejarnette, J. M., Leach, M. A., Nebel, R. L., Marshall, C. E., McCleary, C. R., & Moreno, J. F. (2011). Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?. *Journal of dairy science*, 94(7), 3477–3483. DOI: 10.3168/jds.2011-4214.
- DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., & Marshall, C. E. (2009). Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology*, 71(1), 49–58. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.042.
- Diers, S., Heise, J., Krebs, T., Groenewold, J., & Tetens, J. (2020). Effect of sexed semen on different production and functional traits in German Holsteins. *Veterinary and animal science*, 9, 100101. DOI: 10.1016/j.vas.2020.100101.
- Domingues, W. B., da Silveira, T. L. R., Komninou, E. R., Monte, L. G., Remião, M. H., Dellagostin, O. A., Corcini, C. D., Varela Junior, A. S., Seixas, F. K., Collares, T., & Campos, V. F. (2017). Flow cytometric sex sorting affects CD4 membrane distribution and binding of exogenous DNA on bovine sperm cells. *Zygote (Cambridge, England)*, 25(4), 519–528. DOI: 10.1017/S0967199417000375.
- Domínguez, E., Moreno-Irusta, A., Castex, H. R., Bragulat, A. F., Ugaz, C., Clemente, H., Giojalas, L., & Losinno, L. (2018b). Sperm Sexing Mediated by Magnetic Nanoparticles in Donkeys, a Preliminary In Vitro Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 123–127. DOI: 10.1016/j.jevs.2018.04.005.
- Drake, E., Holden, S. A., Aublet, V., Doyle, R. C., Millar, C., Moore, S. G., Maicas, C., Randi, F., Cromie, A. R., Lonergan, P., & Butler, S. T. (2020). Evaluation of delayed timing of artificial insemination with sex-sorted sperm on pregnancy per artificial insemination in seasonal-calving, pasture-based lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 12059–12068. DOI: 10.3168/jds.2020-18847.
- Esmailpour, T., Elyasi, L., Bahmanpour, S., Ghannadi, A., Monabbati, A., Dehghani, F., & Kazerooni, M. (2012). Effect of combined density gradient centrifugation on X- and Y- sperm separation and chromatin integrity. *Iranian journal of reproductive medicine*, 10(5), 435–440. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4169681>.
- Ettema, J. F., Thomasen, J. R., Hjortø, L., Kargo, M., Østergaard, S., & Sørensen, A. C. (2017). Economic opportunities for using sexed semen and semen of beef bulls in dairy herds. *Journal of dairy science*, 100(5), 4161–4171. DOI: 10.3168/jds.2016-11333.
- European Commission (2019). *EU Agricultural Outlook for Markets and Income 2019–2030*. European Commission; Luxembourg.
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. DOI: 10.1017/s1751731119002775.
- Gamrad, L., Mancini, R., Werner, D., Tiedemann, D., Taylor, U., Ziefuß, A., Rehbock, C., Klein, S., Kues, W., Barcikowski, S., & Rath, D. (2017). Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. *The Analyst*, 142(11), 2020–2028. DOI: 10.1039/c6an02461k.
- Garner, D. L., & Seidel, G. E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69(7), 886–895. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.01.006.
- Garner, D. L., Gledhill, B. L., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson, D., Van Dilla, M. A., & Johnson, L. A. (1983). Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of reproduction*, 28(2), 312–321. DOI: 10.1095/biolreprod28.2.312.
- George, S. M. (2006). Millions of missing girls: from fetal sexing to high technology sex selection in India. *Prenatal diagnosis*, 26(7), 604–609. DOI: 10.1002/pd.1475.
- Gloria, A., Carluccio, A., Wegher, L., Robbe, D., Befaccia, G., & Contri, A. (2016). Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. *Journal of animal science and biotechnology*, 7, 30. DOI: 10.1186/s40104-016-0088-6.
- Hadi, I. H., & Mossa, H. L. S. (2020). Gender selection by Percoll® gradients by using intra-peritoneal insemination in mice: As a model of human. *EurAsian J. BioSci.*, 14(1), 2385–2390.
- Hall, J., & Glaze, J. (2014). Review: System application of sexed semen in beef cattle. *Prof. Anim. Sci.*, 30(3), 279–284. DOI: 10.15232/S1080-7446(15)30118-2.
- Hermes, R., Behr, B., Hildebrandt, T. B., Blottner, S., Sieg, B., Frenzel, A., Knieriem, A., Saragusty, J., & Rath, D. (2009). Sperm sex-sorting in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Animal reproduction science*, 112(3–4), 390–396. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.007.
- Holden, S. A., & Butler, S. T. (2018). Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal : an international journal of animal*

- bioscience, 12(s1), s97–s103. DOI: 10.1017/S1751731118000721.
- Javed, M., Laqwer, R., Mahouk, B., Kannachath, A., Najashi, S., & Sufyan, H. (2019). Does gradients or swim up procedure produce baby of desired gender? *Obstet. Gynecol. Int. J.*, 10(1), 56–59. DOI: 10.15406/ogij.2019.10.00414.
- Joezy-Shekalgorabi, S., Maghsoudi, A., & Mansourian, M. R. (2017). Reproductive performance of sexed versus conventional semen in Holstein heifers in various semiarid regions of Iran. *Italian Journal of Animal Science*, 16(4), 666–672. DOI: 10.1080/1828051x.2017.1321473.
- Johnson, L. A., Flook, J. P., & Look, M. V. (1987). Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete research*, 17(3), 203–212. DOI: 10.1002/mrd.1120170303.
- Kanesharatnam, N., Eswaramohan, T., Balasubramaniam, K. A. (2012). Preliminary Study for Sperm Sexing by Using Sucrose Den-sity Gradients in Jersey Bull at Artificial Insemination Centre at Thirunelvely (Northern Province of Sri Lanka); Proceedings of the International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics; 10–11 May 2012; Chennai, India, 37–40.
- Khalaji, N., Namyari, M., Rasmi, Y., Pourjabali, M., & Chodari, L. (2018). Protective effect of curcumin on fertility of rats after exposure to compact fluorescent lamps: An experimental study. *International journal of reproductive biomedicine*, 16(7), 447–454. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30234185>.
- Kippen, R., Gray, E., & Evans, A. (2018). High and growing disapproval of sex-selection technology in Australia. *Reproductive health*, 15(1), 134. DOI: 10.1186/s12978-018-0577-5.
- Knowlton, S. M., Sadasivam, M., & Tasoglu, S. (2015). Microfluidics for sperm research. *Trends in biotechnology*, 33(4), 221–229. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.01.005.
- Le Gac, S., Ferraz, M., Venzac, B., & Comizzoli, P. (2021). Understanding and Assisting Reproduction in Wildlife Species Using Microfluidics. *Trends in biotechnology*, 39(6), 584–597. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.08.012.
- Lee, D., Hwang, B., & Kim, B. (2016). The potential of a dielectrophoresis activated cell sorter (DACS) as a next generation cell sorter. *Micro and Nano Systems Letters*, 4(1). DOI: 10.1186/s40486-016-0028-4.
- Lin, S. P., Lee, R. K., Tsai, Y. J., Hwu, Y. M., & Lin, M. H. (1998). Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 15(9), 565–569. DOI: 10.1023/a:1022590321986.
- Lopes, J. S., Alcázar-Triviño, E., Soriano-Úbeda, C., Hamdi, M., Cánovas, S., Rizos, D., & Coy, P. (2020). Reproductive Outcomes and Endocrine Profile in Artificially Inseminated versus Embryo Transferred Cows. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(8), 1359. DOI: 10.3390/ani10081359.
- Lucio, A., Resende, M., Dernowseck-Meirelles, J., Perini, A., Oliveira, L., Miguel, M., Carmo, A., Tomita, S., Alves, B., Fazano, F., et al. (2012). Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 64, 525–532. DOI: 10.1590/S0102-09352012000300001.
- Macedo, G. G., de Sá Filho, M. F., Vasconcellos Sala, R., Ferreira Mendanha, M., Pires de Campos Filho, M., & Sampaio Baruselli, P. (2013). The Use Of Sex-Sorted Sperm For Reproductive Programs In cattle, Success in Artificial Insemination. In: Lemma A., editor. *Quality of Semen and Diagnostics Employed*. IntechOpen; London, UK, 39–61.
- Magata, F., Urakawa, M., Matsuda, F., & Oono, Y. (2021). Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Theriogenology*, 161, 243–251. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.12.001.
- Mancini, R. (2015). Ph.D. Thesis. Hamburg University; Hamburg, Germany: 2015. [(accessed on 14 February 2021)]. Detection of Y-Chromosome Bearing Bovine Sperm Using Laser-Generated Gold Nanoparticle BIO-Conjugates.
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F., & Caroli, A. M. (2014). Short communication: Monitoring nutritional quality of Amiata donkey milk: effects of lactation and productive season. *Journal of dairy science*, 97(11), 6819–6822. DOI: 10.3168/jds.2014-8544.
- Maxwell, W. M., Evans, G., Hollinshead, F. K., Bathgate, R., De Graaf, S. P., Eriksson, B. M., Gillan, L., Morton, K. M., & O'Brien, J. K. (2004). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal reproduction science*, 82-83, 79–95. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.013.
- Maxwell, W. M., Welch, G. R., & Johnson, L. A. (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, fertility, and development*, 8(8), 1165–1178. DOI: 10.1071/rd9961165.
- McCulloch, K., Hoag, D. L., Parsons, J., Lacy, M., Seidel, G. E., Jr, & Wailes, W. (2013). Factors affecting economics of using sexed semen in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 96(10), 6366–6377. DOI: 10.3168/jds.2013-6672.
- Mikkola, M., Andersson, M., & Taponen, J. (2015). Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. *Theriogenology*, 84(7), 1118–1122. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.012.
- Mostek, A., Janta, A., & Ciereszko, A. (2020). Proteomic comparison of non-sexed and sexed (X-bearing) cryopreserved bull semen. *Animal reproduction science*, 221, 106552. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106552.
- Muratori, M., Tarozzi, N., Carpentiero, F., Danti, S., Perrone, F. M., Cambi, M., Casini, A., Azzari, C., Boni, L., Maggi, M., Borini, A., & Baldi, E. (2019). Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable

- spermatozoa. *Scientific reports*, 9(1), 7492. DOI: 10.1038/s41598-019-43981-2.
- Murphy, C., Shalloo, L., Hutchinson, I. A., & Butler, S. T. (2016). Expanding the dairy herd in pasture-based systems: The role of sexed semen within alternative breeding strategies. *Journal of dairy science*, 99(8), 6680–6692. DOI: 10.3168/jds.2015-10378.
- Nakao, S., Takeo, T., Watanabe, H., Kondoh, G., & Nakagata, N. (2020). Successful selection of mouse sperm with high viability and fertility using microfluidics chip cell sorter. *Scientific Reports*, 10(1). DOI: 10.1038/s41598-020-65931-z.
- Naniwa, Y., Sakamoto, Y., Toda, S., & Uchiyama, K. (2018). Bovine sperm sex-selection technology in Japan. *Reproductive medicine and biology*, 18(1), 17–26. DOI: 10.1002/rmb2.12235.
- Neculai-Valeanu, A. S., & Arton, A. M. (2021). Game-Changing Approaches in Sperm Sex-Sorting: Microfluidics and Nanotechnology. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(4), 1182. DOI: 10.3390/ani11041182.
- Noguchi, M., Yoshioka, K., Hikono, H., Iwagami, G., Suzuki, C., & Kikuchi, K. (2015). Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. *Zygote (Cambridge, England)*, 23(1), 68–75. DOI: 10.1017/S0967199413000208.
- Norman, H. D., Hutchison, J. L., & Miller, R. H. (2010). Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of dairy science*, 93(8), 3880–3890. DOI: 10.3168/jds.2009-2781.
- O'Brien, J. K., Roth, T. L., Stoops, M. A., Ball, R. L., Steinman, K. J., Montano, G. A., Love, C. C., & Robeck, T. R. (2015). Sperm sex-sorting and preservation for managing the sex ratio and genetic diversity of the southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Animal reproduction science*, 152, 137–153. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.11.016.
- Obuchi, T., Osada, M., Ozawa, T., Nakagawa, H., Hayashi, M., Akiyama, K., Sakagami, N., Miura, R., Geshi, M., & Ushijima, H. (2019). Comparative evaluation of the cost and efficiency of four types of sexing methods for the production of dairy female calves. *The Journal of reproduction and development*, 65(4), 345–352. DOI: 10.1262/jrd.2019-028.
- Osada, M., Iwabuchi, H., Aoki, T., Sasaki, K., Ushijima, H., & Ozawa, T. (2019). Economic evaluation of artificial insemination of sex-sorted semen on a Brown Swiss dairy farm-A case study. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 90(4), 597–603. DOI: 10.1111/asj.13156.
- Parrella, A., Keating, D., Cheung, S., Xie, P., Stewart, J. D., Rosenwaks, Z., & Palermo, G. D. (2019). A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(10), 2057–2066. DOI: 10.1007/s10815-019-01543-5.
- Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Rätty, M., Korhonen, K., Hurme, T., Myllymäki, H., Sairanen, A., & Mäki-Tanila, A. (2009). Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal reproduction science*, 111(1), 80–92. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.02.002.
- Pellegrino, C. A., Morotti, F., Untura, R. M., Pontes, J. H., Pellegrino, M. F., Campolina, J. P., Seneda, M. M., Barbosa, F. A., & Henry, M. (2016). Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology*, 86(3), 888–893. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.010.
- Phipattanaphiphop, C., Leksakul, K., Phatthanakun, R., & Khamlor, T. (2020). A novel microfluidic chip-based sperm-sorting device constructed using design of experiment method. *Scientific reports*, 10(1), 17143. DOI: 10.1038/s41598-020-73841-3.
- Promthep, K., Satitmanwiwat, S., Kitiyanant, N., Tantiwattanakul, P., Jirajaroenrat, K., Sitthigripong, R., Singhapo, C. (2016). Practical use of percoll density gradient centrifugation on sperm sexdetermination in commercial dairy farm in Thailand. *Indian J. Anim. Res.*, 50, 310–313.
- Quan, G. B., Ma, Y., Li, J., Wu, G. Q., Li, D. J., Ni, Y. N., Lv, C. R., Zhu, L., & Hong, Q. H. (2015). Effects of Hoechst33342 staining on the viability and flow cytometric sex-sorting of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology*, 70(1), 23–31. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.11.002.
- Ramírez Castex, H., Domínguez, E., Moreno Irusta, A., Ugaz, C., Clemente, H., & Ayarza, E. (2017). Nanopartículas magnéticas para separación de espermatozoides X en semen equino-Resultados preliminares. *Reprod. Asis. Equi.*, 2, 85–100.
- Reinsalu, O., Scheler, O., Mikelsaar, R., Mikelsaar, A.-V., Hallap, T., Jaakma, Ü., Padrik, P., Kavak, A., Salumets, A., Kurg, A. (2019). A dual colour FISH method for routine validation of sexed *Bos taurus* semen. *BMC Vet. Res.*, 15, 104. DOI: 10.1186/s12917-019-1839-3.
- Research and Markets Sperm Bank Market Size Analysis Report by Service Type (Sperm Storage, Semen Analysis, Genetic Consultation), by Do-nor Type (Known, Anonymous), by End Use, and Segment Forecasts, 2019–2025. [(accessed on 6 April 2021)]; 2019 Report ID: 978-1-68038-423-9. URL: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4209726/sperm-bank-market-size-analysis-report-by-service>.
- Ribeiro, S., Sartorius, G., & de Geyter, C. (2013). Sorting of spermatozoa with flow cytometry. *Fertility and sterility*, 100(3), e15. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.06.039.
- Salama, M., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., Mallmann, P., Westphal, L. M., Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2018). Cross border reproductive care (CBRC): a growing global phenomenon with multidimensional implications (a systematic and critical review). *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(7), 1277–1288. DOI: 10.1007/s10815-018-1181-x.
- Samuel, R., Feng, H., Jafek, A., Despain, D., Jenkins, T., & Gale, B. (2018). Microfluidic—based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 7(S3), S336—S347. DOI: 10.21037/tau.2018.05.08.

- Saunders, B. (2019). Upsetting the balance on sex selection. *Bioethics*, 33(9), 1022–1028. DOI: 10.1111/bioe.12620.
- Schenk, J. L., Suh, T. K., & Seidel, G. E., Jr (2006). Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, 65(2), 299–307. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.04.026.
- Seidel, G. E. (2003). Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology*, 59(2), 585–598. DOI: 10.1016/s0093-691x(02)01242-6.
- Seidel, G. E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 8, 160–164. DOI: 10.1017/s1751731114000202.
- Seidel, G. E., Jr, & Schenk, J. L. (2008). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 129–138. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.015.
- Spinaci, M., Perteghella, S., Chlapanidas, T., Galeati, G., Vigo, D., Tamanini, C., & Bucci, D. (2016). Storage of sexed boar spermatozoa: Limits and perspectives. *Theriogenology*, 85(1), 65–73. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.05.018.
- Squires, E. (2020). Current Reproductive Technologies Impacting Equine Embryo Production. *Journal of equine veterinary science*, 89, 102981. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.102981.
- Steele, H., Makri, D., Maalouf, W. E., Reese, S., & Kölle, S. (2020). Bovine Sperm Sexing Alters Sperm Morphokinetics and Subsequent Early Embryonic Development. *Scientific reports*, 10(1), 6255. DOI: 10.1038/s41598-020-63077-6.
- Stewart, B. M., Block, J., Morelli, P., Navarette, A. E., Amstalden, M., Bonilla, L., Hansen, P. J., & Bilby, T. R. (2011). Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Journal of dairy science*, 94(7), 3437–3445. DOI: 10.3168/jds.2010-4008.
- Thomas, J. M., Locke, J. W. C., Bonacker, R. C., Knickmeyer, E. R., Wilson, D. J., Vishwanath, R., Arnett, A. M., Smith, M. F., & Patterson, D. J. (2019). Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex-sorted semen in timed artificial insemination programs for mature beef cows. *Theriogenology*, 123, 100–107. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.039.
- Thomas, J. M., Locke, J. W. C., Vishwanath, R., Hall, J. B., Eilersieck, M. R., Smith, M. F., & Patterson, D. J. (2017). Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*, 98, 88–93. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.03.018.
- Turcan, I., & Olariu, M. A. (2020). Dielectrophoretic Manipulation of Cancer Cells and Their Electrical Characterization. *ACS Combinatorial Science*, 22(11), 554–578. DOI: 10.1021/acscombsci.0c00109.
- Underwood, S. L., Bathgate, R., Maxwell, W. M., & Evans, G. (2009). Development of procedures for sex-sorting frozen-thawed bovine spermatozoa. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 44(3), 460–466. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01127.x.
- Verma, K. V. S., Garai, S., Maiti, S., Meena, B. S., Bhakat, M., & Kadian, K. S. (2020). Indian dairy farmers' willingness to pay for sexed semen. *The Journal of dairy research*, 87(4), 406–409. DOI: 10.1017/S0022029920001065.
- Veterinary Artificial Insemination Market Size, Share & Trends Analysis Report By Animal Type (Cattle, Swine, Sheep, Canine, Equine), By Product (Normal Semen, Sexed Semen), by End Use, and Segment Forecasts, 2021–2028. [(accessed on 1 April 2021)]; 2021 Report ID:GVR-3-68038-570-0. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/veterinary-artificial-insemination-market>.
- Vincenzetti, S., Pucciarelli, S., Santini, G., Klimanova, Y., Polzonetti, V., & Polidori, P. (2020). B-Vitamins Determination in Donkey Milk. *Beverages*, 6(3), 46. DOI: 10.3390/beverages6030046.
- Vishwanath, R., & Moreno, J. F. (2018). Review: Semen sexing - current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 12(s1), s85–s96. DOI: 10.1017/S1751731118000496.
- Wheeler, M. B., & Rubessa, M. (2017). Integration of microfluidics in animal in vitro embryo production. *Molecular human reproduction*, 23(4), 248–256. DOI: 10.1093/molehr/gaw048.
- Wheeler, M. B., Rutledge, J. J., Fischer-Brown, A., VanEtten, T., Malusky, S., & Beebe, D. J. (2006). Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65(1), 219–227. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.032.
- Wolf, C. A., Brass, K. E., Rubin, M. I. B., Pozzobon, S. E., Mozzaquatro, F. D., & De La Corte, F. D. (2008). The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Anim. Reprod*, 5, 110–115. URL: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6076f7783717068b4798>.
- Wongtawan, T., Dararatana, N., Thongkittidilok, C., Kornmatitsuk, S., & Oonkhanond, B. (2020). Enrichment of bovine X-sperm using microfluidic dielectrophoretic chip: A proof-of-concept study. *Heliyon*, 6(11), e05483. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05483.
- Zhang, Y., & Chen, X. (2020). Dielectrophoretic microfluidic device for separation of red blood cells and platelets: a model-based study. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, 42(2). DOI: 10.1007/s40430-020-2169-x.