ePublishing

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 49, No 3 (1998)

In vivo ultrasound guided transvaginal oocyte collection in the cow

G. S. AMIRIDIS (Γ.Σ. ΑΜΟΙΡΙΔΗΣ), M. SALAHEDDINE, I. A. JEFFCOATE, E. VAINAS (E. ΒΑΪΝΑΣ), L. ROBERTSON

doi: 10.12681/jhvms.15773

Copyright © 2018, GS AMIRIDIS, M SALAHEDDINE, IA JEFFCOATE, E VAINAS, L ROBERTSON

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

AMIRIDIS (Γ.Σ. ΑΜΟΙΡΙΔΗΣ) G. S., SALAHEDDINE, M., JEFFCOATE, I. A., VAINAS (E. ΒΑΪΝΑΣ) E., & ROBERTSON, L. (2018). In vivo ultrasound guided transvaginal oocyte collection in the cow. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *49*(3), 195–203. https://doi.org/10.12681/jhvms.15773

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 11/07/2025 22:50:15

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1998, 49(3): 195-203

In vivo διακολπική συλλογή ωαρίων αγελάδας με υπερηχογραφία

Γ.Σ. Αμοιρίδης[1], M. Salaheddine[2], I.A. Jeffcoate[3] E. Βαϊνάς[1], και L. Robertson[4]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Στην εργασία αυτή περιγράφονται οι τεχνικές και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της in vivo διακολπικής συλλογής ωαρίων από 8 αγελάδες, κατά τη διάρκεια τριών διαδοχικών οιστρικών κύκλων με συσκευή μικροαναρρόφησης υπό την καθοδήγηση υπερηχογράφου. Σε τέσσερις αγελάδες μάρτυρες γινόταν μόνο διακολπική επισκόπηση των ωοθηκών με υπερηχογραφία. Τα ζώα ήταν ηλικίας 4-6 ετών και βρίσκονταν σε κατάσταση μη εγκυμοσύνης και παρατεταμένη ξηρά περίοδο. Η συλλογή των ωαρίων γινόταν τρεις φορές κατά τη διάρκεια κάθε φυσιολογικού οιστρικού κύκλου (ημέρες 3-4, 9-11 και 14-17). Αναρροφήθηκε το περιεχόμενο 326 ωοθυλακίων διαμέτρου 4 - 15 mm και συλλέχθηκαν 104 ώάρια (31,9%) ή 1.55 ώάρια ανά αγελαδα σε κάθε αγωγή. Το ποσοστό συλλογής αυξήθηκε μετά τους τρεις πρώτους πειραματισμούς (από 13,04% σε 35,0%). Σε τέσσερις πειραματισμούς το ποσοστό συλλογής κρίνεται πολύ ικανοποιητικό (41,6% έως 52,6%). Περισσότερα ωοθυλάκια (133 ή 40,8%) αναρροφήθηκαν στις ημέρες 9-11 έναντι 111 (34%) στις ημέρες 14-17 και 82 (25%) στις ημέρες 3-4 (P<0.05). Από τα 104 ώάρια που συλλέχθηκαν τα 60 (57,7%) κρίθηκαν κατάλληλα για περαιτέρω χειρισμούς. Το ποσοστό συλλογής και η ποιότητα των ωαρίων δεν επηρεάσθηκαν σημαντικά από το στάδιο του οιστρικού κύκλου και τη θέση (αριστερά - δεξιά) της ωοθήκης. Η διάρκεια του οιστρικού κύκλου των πειραματοζώων (21,6±.1,4 ημέρες) και των μαρτύρων (22,37±1,0), όπως επίσης και οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης σε δείγματα αίματος που συλλέγονταν καθημερινά δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ των ζώων των δύο ομάδων. Τα αποτελέσματα της εργασίας συγκρίνονται με τα αποτελέσματα εφαρμογής λαπαροσκοπικών μεθόδων και γίνεται αναφορά στη σκοπιμότητα και στις δυνατότητες εφαρμογής της μεθόδου σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης των αγελάδων.

[1]*ΕΘΙΑΓΕ Ινστιτούτο Αναπαραγωγής και ΤΣ, Ιωνία Θεσ/νίκη.*
[2]*Pharming, Polsbroek, The Netherlands.*
[3]*Dept. of Vet. Physiology, Glasgow University Vet. School, Scotland, UK*
[4]*Dept. of Vet Anatomy, Glasgow University Vet. School, Scotland, UK.*

[1]*National Agricultural Research Foundation (N.AG.RE.F.), Institute of Reproduction and Artificial Insemination, Ionia, 57008 Thessaloniki, Greece.*

Ημερομηνία υποβολής: 02.10.97
Ημερομηνία εγκρίσεως: 09.06.98

ABSTRACT. G.S Amiridis, M. Salaheddine, I.A. Jeffcoate, E. Vainas and L. Robertson. In vivo ultrasound guided transvaginal oocyte collection in the cow. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 49(3): 195-203.* **This paper describes the results of the in vivo ultrasound guided follicular aspiration for ovum pick up (OPU) in the cow. Twelve non pregnant dry cows aged 4-6 years were used in this experiment. Eight cows underwent OPU during three successive oestrous cycles and another four cows were used as controls having only transvaginal ultrasound scanning of their ovaries. Oocyte collection took place three times during the luteal phase of each natural oestrous cycle (days 3-4, 9-11 and 14-17). The content of 326 follicles with a diameter of 4-15mm was aspirated and 104 oocytes were collected (recovery rate 31.9% or 1.55 oocytes per cow and session). The oocyte recovery rate increased after the first three sessions (from 13.04% to 35.0%) and reached levels of up to 52.6%. More follicles were aspirated on days 9-11 (133 follicles 40.8%) compared to 111 (34%) follicles on days 14-17 and 82 (25%) on days 3-4) (P<0.05). The evaluation of the collected oocytes revealed that 60 oocytes (57.7%) were suitable for further in vitro manipulation. Neither the origin of the oocyte (left or right ovary) nor the stage of the oestrous cycle affected the recovery rate or the quality of the collected oocytes. There was no significant difference either in the length of the oestrous cycle between the experimental animals and the controls (21.6±1.4 vs. 22.37±1.0 respectively), or in plasma progesterone concentration in daily collected blood samples from the animals of the two groups. The results of this study are compared to those from the international literature and to the results from endoscopical methods for oocyte recovery. The feasibility of application of this technique to projects designed to improve the genetic merit of cows is discussed.**

Λέξεις ευρετηρίασης: συλλογή ωαρίων, υπερηχογραφία, αγελάδα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (ΠΩ), η διατραχηλική συλλογή και μεταφορά εμβρύων αποτέλεσαν κατά την τελευταία εικοσαετία τις μεθόδους επιλογής για την εντατική ζωοτεχνική αξιοποίηση αγελάδων υψηλής γενετικής αξίας. Το σχήμα όμως αυτό, παρά την ευρεία και μακροχρόνια εφαρμογή του, εξακολουθεί να παρουσιάζει μειονεκτήματα οπως το υψηλό κόστος, η αδυ-

ναμία πρόβλεψης της ανταπόκρισης των ωοθηκών στην πρόκληση ΠΩ (περίπου το ένα τρίτο των ζώων δεν αντιδρούν), καθώς επίσης και η επιμήκυνση του μεσοδιαστήματος τοκετών των αγελάδων δοτών[1]. Τα μειονεκτήματα αυτά καθώς και η ανάπτυξη αποτελεσματικών σχημάτων *in vitro* ωρίμανσης και γονιμοποίησης του ωαρίου, κλωνοποίησης του εμβρύου και παραγωγής διαγονιδιακών εμβρύων, δημιούργησαν την αναγκαιότητα ανεύρεσης μιας σταθερής πηγής ωαρίων αγελάδων υψηλής γενετικής αξίας. Οι ωοθήκες αγελάδων μετά την αξιοποίησή τους είναι βέβαια μια μεγάλη πηγή ωαρίων, τα ωάρια όμως που συλλέγονται χρησιμοποιούνται συνήθως μόνο για πειραματικούς σκοπούς.

Με την ανάπτυξη τεχνικών in vivo συλλογής ωαρίων επιλύονται σε μεγάλο βαθμό τα προβλήματα που αναφέρθηκαν, ενώ παράλληλα παρέχεται η δυνατότητα εφαρμογής των μεθόδων της σύγχρονης βιοτεχνολογίας σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Αρχικά αναπτύχθηκαν τεχνικές αναρρόφησης ωοθυλακίων μέσω ενδοσκόπησης από τον κενεώνα[2] ή διακολπικά[3]. Η βελτίωση των συστημάτων υπερηχογραφίας έδωσε τη δυνατότητα διακολπικής συλλογής ωαρίων απο γυναίκες[4] και διαμέσου του κενεώνα[5] και διακολπικά[6] απο αγελάδες με ελαχιστα τραυματικές μεθόδους.

Αρχικά η διακολπική αναρρόφηση ωαρίων (ΔΑΩ) χρησιμοποιήθηκε στις αγελάδες σε συνδυασμό με πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας[6,7], αλλά σύντομα οι ορμονικές παρεμβάσεις εγκαταλείφθηκαν, γιατί αποδείχθηκε ότι δεν συμβάλλουν στην αύξηση του αριθμού των συλλεγόμενων ωαρίων [8,9,10]

Η ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου της αγελάδας πραγματοποιείται με κυματοειδή μορφή. Σε κάθε οιστρικό κύκλο παρατηρούνται δύο ή τρία κύματα ανάπτυξης - ωρίμανσης ωοθυλακίων. Σε κάθε κύμα ένα ωοθυλάκιο -το κυρίαρχο- αναπτύσσεται με ταχύτερους ρυθμούς από τα υπόλοιπα -υποτελή-, η ανάπτυξη των οποίων αναστέλλεται. Στη συνέχεια, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, αφού φθάσει στο μέγιστο βαθμό ανάπτυξής του, καθίσταται ατρητικό. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο του τελευταίου κύματος του οιστρικού κύκλου συνεχίζει την ανάπτυξή του έως την ωοθυλακιορρηξία[11-15].

Τα περισσότερα ερευνητικά πρωτόκολλα περιλαμβάνουν μία ΔΑΩ σε εβδομαδιαία διαστήματα. Τα ωοθυλάκια με διάμετρο 1-4 mm διπλασιάζουν το μέγεθός τους σε χρονικό διάστημα 2-4 ημερών[16]. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα εφαρμογής της ΔΑΩ κάθε 3-4 ημέρες[17,18].

Η εφαρμογή της ΔΑΩ με συχνότητα μια αναρρόφηση ανά εβδομάδα δεν επηρεάζει τον αριθμό των συλλεγομένων ωαρίων τουλάχιστον για τρεις συνεχόμενους μήνες[8] και με συχνότητα μια ΔΑΩ ανά τρεις ή τέσσερις ημέρες για τουλάχιστον 42 ημέρες[10].

Στην Ολλανδία και Γερμανία η ΔΑΩ αντικαθιστά σταδιακά τα κλασικά σχήματα εξωσωματικής ωρίμανσης - γονιμοποίησης ωαρίων (IVM-IVF *in vitro* maturation - *in vitro* fertilization), και μεταφοράς εμβρύων (ΜΕ) στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης και εφαρμογών της μηχανικής και μοριακής γενετικής (G. Brem προσωπική επικοινωνία). Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της *in vivo* συλλογής και *in vitro* γονιμοποίησης των ωαρίων αποτέλεσαν το ερέθισμα για τη διερεύνηση των δυνατοτήτων εφαρμογής της μεθόδου σε νεαρούς μόσχους ηλικίας 4-6 μηνών και έγκυες αγελάδες για τη μείωση του μεσοδιαστήματος γενεών, όπως επίσης για τη ζωοτεχνική αξιοποίηση αγελάδων με προβλήματα του γεννητικού συστήματος[19-21].

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν:

- Να αναπτυχθούν τεχνικές βελτιώσεις της *in vivo* διακολπικής αναρρόφησης ωοθυλακίων με υπερηχογραφία, που θα επέτρεπαν την επαναλαμβανόμενη επέμβαση στο ίδιο ζώο, με την ελάχιστη δυνατή διαταραχή της αναπαραγωγικής του ικανότητας

- Να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα εφαρμογής της μεθόδου ανάλογα με το στάδιο του οιστρικού κύκλου και τη θέση της ωοθήκης (δεξιά - αριστερή).

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν 12 αγελάδες της φυλής Χόλσταϊν-Φρίζιαν ηλικίας 4-6 ετών. Οκτώ αγελάδες χρησιμοποιήθηκαν ως δότες ωαρίων και 4 ως μάρτυρες (ομάδα Α και Β αντίστοιχα). Η επιλογή των ζώων έγινε με κριτήρια την υγιεινή και θρεπτική τους κατάσταση, την παρουσία ενεργού ωχρού σωματίου και την απουσία παθολογικών καταστάσεων στο γεννητικό τους σύστημα. Ολα τα ζώα διατηρούνταν σε σύστημα ελεύθερου σταβλισμού και διατρέφονταν με ενσίρωμα χόρτου λειμώνων και μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών.

Ο συγχρονισμός του οίστρου ολων των ζώων έγινε με ενδομυϊκή έγχυση 50 mg προσταγλανδίνης (Cloprostenol, Estrumate Coopers Animal Health, Crewe Hall Cheshire, UK), η οποία επαναλήφθηκε μετά από 11 ημέρες. Στη συνέχεια δεν έγινε καμία ορμονική παρέμβαση.

Ο προσδιορισμός του χρόνου ωοθυλακιορρηξίας (ημέρα 0) γινόταν με παρατήρηση δύο φορές την ημέρα για την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων του οίστρου και επιβεβαιωνόταν με υπερηχογραφία μέσω του απευθυσμένου. Κατά τη διάρκεια τριών διαδοχικών οιστρικών κύκλων έγιναν στα πειραματόζωα 67 ΔΑΩ σε 18 πειραματισμούς. Στους μάρτυρες γινόταν μόνο εκτίμηση της ωοθηκικής δραστηριότητας με διακολπική υπερηχογραφία.

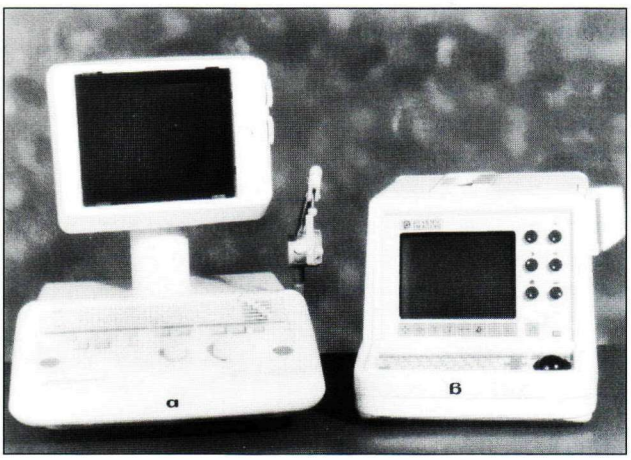
Οι επεμβάσεις γίνονταν σε όλα τα ζώα κατά το αρχικό (ημέρα 3-4), μέσο (ημέρα 9-11) και τελικό (ημέρα 14-17) στάδιο της ωχρινικής φάσης κάθε οιστρικού κύκλου. Μία

μέρα μετά την επέμβαση γινόταν έλεγχος των ωοθηκών με υπερηχογραφία μέσω του απευθυσμένου. Ο ρυθμός ανάπτυξης των ωοθυλακίων μετά την επέμβαση ελεγχόταν με υπερηχογραφία μέσω του απευθυσμένου σε 48ωρα διαστήματα σε όλη τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου. Παράλληλα ελεγχόταν και η εξέλιξη του ωχρού σωματίου, η εκκριτική λειτουργία του οποίου επιβεβαιωνόταν με τον προσδιορισμό της προγεστερόνης σε δείγματα αίματος που συλλέγονταν ανά 24ωρα διαστήματα. Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης γινόταν με τη ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA), όπως αυτή περιγράφεται από τους Corrie και συν.[22] και Jeffcoate[23]. Σε 12 προσδιορισμούς ο συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν 8.5 και 13% για δείγματα με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση ορμόνης αντίστοιχα, ενώ ο εσωτερικός συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν 6 και 5%. Η ευαισθησία της RIA ήταν 0,2± 0,1 ng/ml.

Υπερηχογράφοι

Για την επισκόπηση των ωοθηκών με υπερηχογραφία μέσω του απευθυσμένου χρησιμοποιήθηκε ο πραγματικού χρόνου φορητός B-mode υπερηχογράφος Concept MC (Dynamic Imaging, Livingston, Scotland UK), ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με κεφαλή 7.5 MHz και παρείχε τη δυνατότητα σταθεροποίησης και μεγέθυνσης της εικόνας, μέτρησης διαστάσεων των σχηματισμών και διαχωρισμού της οθόνης, ώστε μετά από σταθεροποίηση της εικόνας να επιτρέπει τη σύγκριση του ίδιου σχηματισμού από διαφορετική οπτική γωνία (εικόνα 1).

Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων γινόταν με υπερηχογράφο Capasee Toshiba (model SSA-220A, Toshiba Medical Systems, Manor Royal, Crawley), ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με κεφαλή 6 MHz μήκους 31 εκ., εξοπλισμένης με οδηγό βελόνας που χρησιμοποιείται στον άνθρωπο και παρέχει τη δυνατότητα πρόβλεψης της πορείας της βελόνας αναρρόφησης.



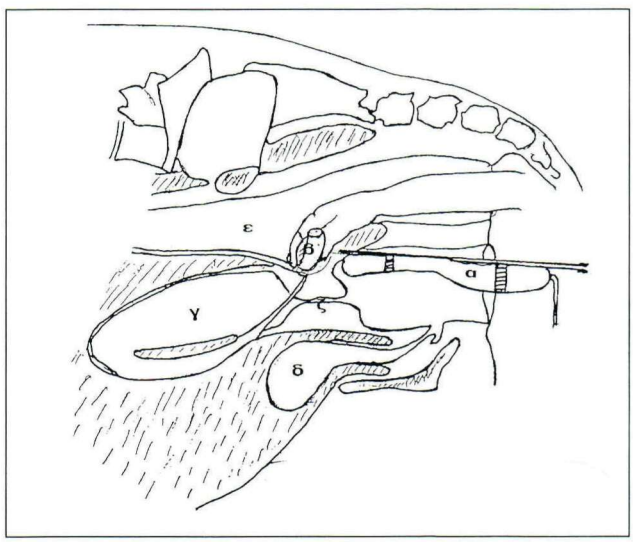
Εικόνα 1. Υπερηχογράφοι που χρησιμοποιήθηκαν: α. Capasee Toshiba, b. Concept MC

Διακολπική Αναρρόφηση Ωαρίων

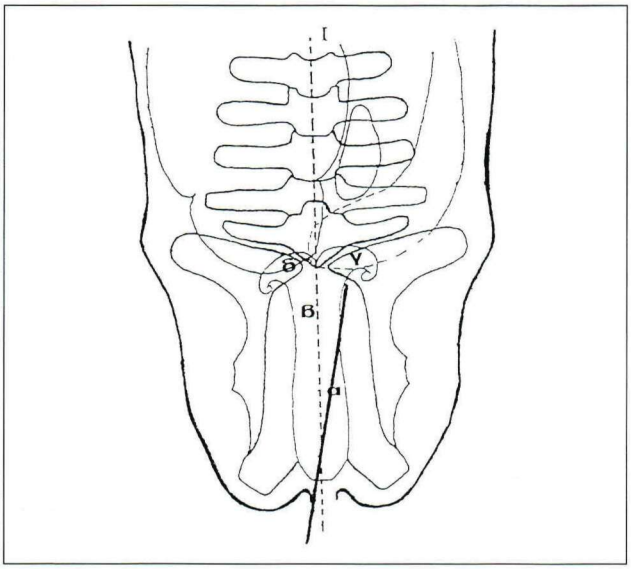
Για τη ΔΑΩ η αγελάδα συγκρατιόταν σε κοινό κλωβό συγκράτησης. Πριν από κάθε επέμβαση γινόταν ενδοφλέβια έγχυση 0,3 mg υδροχλωρικής κλεμβουτερόλης (Planipart, Boeringer Ingelheim, Berkshire, UK) για τη μείωση της συσπαστικότητας του εντέρου και της μήτρας. Δέκα λεπτά αργότερα γινόταν ενδοφλέβια έγχυση 0,7 mg/100 Kg ZB του ημεμιστικού υδροχλωρικής ντετομιδίνης (Domosedan, Smith Kleine, Beecham Animal Health Surrey UK) και επισκληρίδια αναισθησία με 5 ml διαλύματος 2% υδροχλωρικής ξυλοκαΐνης.

Η κεφαλή του υπερηχογράφου εισαγόταν στον κόλπο και συγκρατιόταν σταθερά στη δεξιά πλευρά του έξω στομίου του τραχήλου. Οι ωοθήκες φέρονταν με χειρισμούς δια μέσου του απευθυσμένου σε επαφή με το τοίχωμα του κόλπου μπροστά από την κεφαλή του υπερηχογράφου, με σκοπό την επισκόπηση και των δύο ωοθηκών, την καταγραφή και τη μέτρηση των ωοθυλακίων και του ωχρού σωματίου (εικόνα 2,3).

Για την ΔΑΩ χρησιμοποιούνταν δύο διαφορετικοί τύποι βελονών, το τοίχωμα του κόλπου διαπερνιόταν με βελόνα-εισαγωγέα 15 g, μήκους 29 cm που έφερε κεντρικό οδηγό. Η αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού γινόταν με βελόνα ,18 g μήκους 32 ή 45 cm (Casmed, Cheam, Surrey, UK), η οποία περνούσε δια μέσου του εισαγωγέα. Η βελόνα αναρρόφησης ήταν συνδεδεμένη με πλαστικό σωλήνα στη φιάλη συλλογής, η οποία με τη σειρά της ήταν συνδεδεμένη με την αντλία κενού μέσω σωλήνα σιλικόνης μήκους 1.5 μέτρων. Η αντλία κενού (Karri-Vac 2, Rocket, London, UK) ενεργοποιούνταν με ποδοδιακόπτη, λειτουργούσε με υποπίεση 75-85 mm υδραργύρου και ήταν



Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση της ΔΑΩ. Απεικονίζονται α) η κεφαλή του υπερηχογράφου, β) η ωοθήκη, γ) η μήτρα, δ) η ουροδόχος κύστη, ζ) ο τράχηλος και ε) το απευθυσμένο.



Εικόνα 3. Σχηματική παράσταση της θέσης εισόδου της κεφαλής του υπερηχογράφου στον κόλπο της αγελάδας. Διακρίνονται α) ο άξονας της κεφαλής και της βελόνας, β) ο κόλπος, γ) και δ) το δεξί και το αριστερό κέρας της μήτρας αντίστοιχα.

ρυθμισμένη να αναρροφά 25 ml νερού / λεπτό.

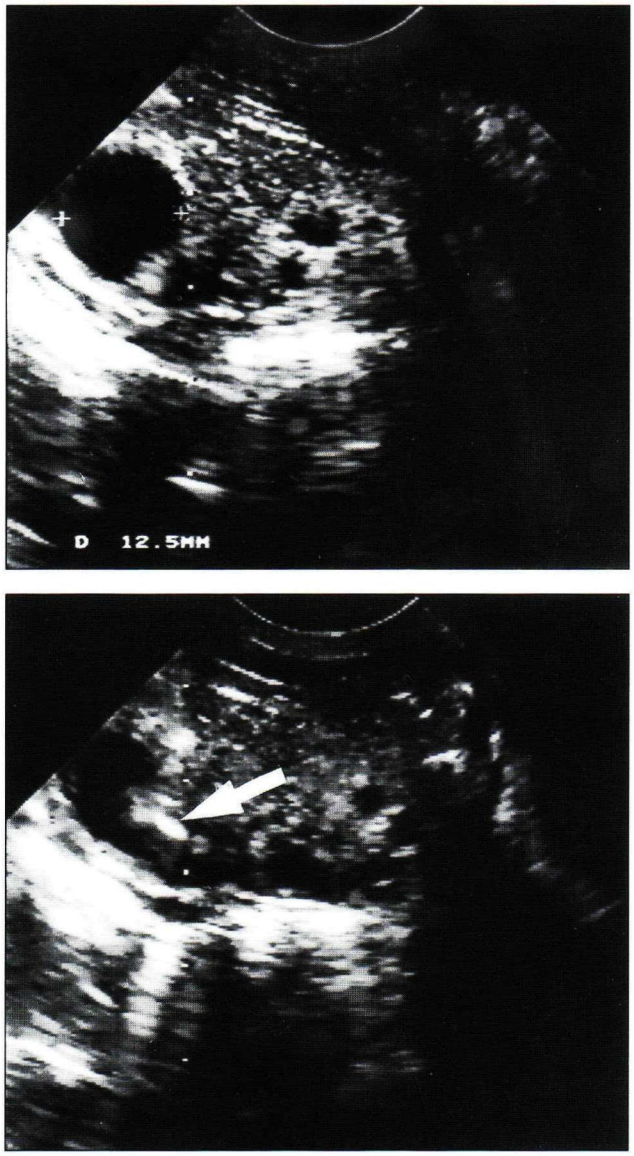
Μετά την επισκόπηση των ωοθηκών, ένας βοηθός περνούσε τον εισαγωγέα στον οδηγό της κεφαλής, τον προωθούσε διαμέσου του τοιχώματος του κόλπου και τοποθετούσε τη βελόνα αναρρόφησης στον εισαγωγέα. Με ήπιους χειρισμούς της ωοθήκης, το ωοθυλάκιο που είχε επιλεγεί για αναρρόφηση φερόταν σε θέση τέτοια ώστε να τέμνεται από τη γραμμή διόδου της βελόνας που εμφανιζόταν στην οθόνη (εικόνα 4).

Μόλις το άκρο της βελόνας εμφανιζόταν σε απόσταση λίγων χιλιοστών από το ωοθυλάκιο ενεργοποιούνταν η αντλία. Η αναρρόφηση διαρκούσε μέχρις ότου το ωοθυλάκιο δεν ήταν πλέον ορατό στην οθόνη. Σ' όλη τη διάρκεια της αναρρόφησης η βελόνα περιστρεφόταν ελαφρά για να προληφθεί έμφραξή της από το συρρικνούμενο ωοθυλακικό τοίχωμα (εικόνα 4). Μια τελική επισκόπηση επιβεβαίωνε την επιτυχή αναρρόφηση των επιλεγέντων ωοθυλακίων, και η αναρρόφηση συνεχιζόταν στην άλλη ωοθήκη.

Η εκτίμηση της ποιότητας των ωαρίων γινόταν υπό στερεοσκοπική παρατήρηση (μεγέθυνση 20X - 100X), με βάση τα κριτήρια που τέθηκαν από τον de Loos και συν[24].

Στατιστική επεξεργασία.

Οι διαφορές στα ποσοστά αναληψιμότητας και ο αριθμός των ωαρίων που συλλέγονταν κατά τις τρεις περιόδους του οιστρικού κύκλου μελετήθηκαν με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Οι μέσοι όροι δύο δειγμάτων συγκρίθηκαν με τη μέθοδο Student's t-test (two tailed). Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα MINITAB.



Εικόνα 4. Επάνω: Διακρίνεται ωοθυλάκιο 12.5 mm και η διακεκομμένη γραμμή πρόβλεψης της πορείας της βελόνας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συλλογή ωαρίων

Στα ζώα της ομάδας Α έγιναν συνολικά 67 επεμβάσεις, έναντι των 72 που αρχικά είχαν προγραμματισθεί. Σε 5 περιπτώσεις δεν έγινε επέμβαση λόγω δημιουργίας παραμένοντος ωχρού σωματίου (1 ζώο) και μικρής διάρκειας διοίστρου (1 ζώο).

Κατά τη διάρκεια των τριών σταδίων της ωχρινικής φάσης (ημέρες 3-4, 9-11 και 14-17) έγιναν συνολικά 334 προσπάθειες αναρροφήσεων από τις οποίες οι 326 ήταν επιτυχείς (97,6%) ή 4,87 ανά ζώο ανά αγωγή και συλλέχθηκαν 104 ωάρια (31,9%, ή 1.55 ωάρια ανά ζώο ανά αγωγή). Κατά τη διάρκεια 3 οιστρικών κύκλων συλλέχθηκαν κατά

Πίνακας 1. Αριθμός αναρροφηθέντων ωοθυλακίων και συλλεγέντων ωαρίων ανά πειραματισμό

Οιστρικός κύκλος	Α/Α πειραματισμού	Ημέρα του κύκλου	Αριθμός ζώων	Αριθμός αναρροφηθέντων ωοθυλακίων	Αριθμός συλλεγέντων ωαρίων	% Ποσοστά συλλογής
1ος	1	3-4	4	11	1	9,1
	2		4	12	1	8,3
	3	9-11	4	23	4	17,4
	4		4	12	5	41,6
	5	14-17	4	26	9	34, 6
	6		4	25	8	32
2ος	7	3-4	4	1 1	5	45, 5
	8		4	16	6	37,5
	9	9-11	4	20	4	20
	10		4	18	6	33,3
	11	14-17	4	23	7	30,4
	12		3	14	6	42, 8
3ος	13	3-4	3	20	6	30
	14		3	13	5	38,4
	15	9-11	4	19	7	36,8
	16		3	20	6	30
	17	14-17	4	24	8	33, 3
	18		3	19	10	52,6
	Σύνολο			**326**	**104**	**31,9%**

μέσον όρο 12.88 ωάρια ανά ζώο δότη (πίνακας 1).

Ο αριθμός των ωαρίων που συλλέχθηκαν ανά ζώο και πειραματισμό κυμαινόταν από 0 έως 7. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά συλλογής και στον αριθμό των ωαρίων που συλλέχθηκαν μεταξύ των ζώων.

Δεν παρατηρήθηκε καμία διαταραχή του γεννητικού συστήματος (συμφύσεις, φλεγμονές κλπ) τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά την ολοκλήρωση των πειραματισμών. Η κατανομή των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν σύμφωνα με το μέγεθός τους και το στάδιο της ωχρινικής φάσης δίνεται στον πίνακα 2.

Σημαντικά περισσότερα ωοθυλάκια (43,25%,$P<0.05$) κατάλληλα για αναρρόφηση ήταν εκείνα με διάμετρο 4-6 mm σε όλα τα στάδια της ωχρινικής φάσης. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων κατηγοριών. Η πρώτη κατηγορία (≤ 4 mm) δεν ελέγχθηκε-

Πίνακας 2. Κατανομή αναρροφηθέντων ωοθυλακίων κατά τη διάρκεια των τριών σταδίων της ωχρινικής φάσης ανάλογα με τη διάμετρό τους.

	Διάμετρος Ωοθυλακίου (mm)						
Στάδιο κύκλου	**≤4**	**4-6**	**7-9**	**10-12**	**≥13**	**Σύνολο ωοθυλακίων**	**% συλλογή**
Αρχικό (3-4)	3	29	18	15	17	82	25
Μέσο (9-11)	2	60	28	23	20	133	40,8
Τελικό(14-17)	1	52	19	18	21	111	34
Σύνολο	**6**	**141**	**65**	**56**	**58**	**326**	**31,9**

Πίνακας 3. Κατανομή αναρροφηθέντων ωοθυλακίων και συλλεγέντων ωαρίων από τη δεξιά και την αριστερή ωοθήκη.

	Δεξιά Ωοθήκη		Αριστερή Ωοθήκη		
Στάδιο του κύκλου	αναρροφηθέντα ωοθυλάκια	Αριθμός ωαρίων	αναρροφηθέντα ωοθυλάκια	Αριθμός ωαρίων	Σύνολο ωαρίων
Αρχικά (3-4)	40	20	44	7	27
Μέσα (9-1 1)	71	22	61	21	43
Τελικά(14-17)	64	16	46	18	34
Σύνολο	175	58	151	46	104

Πίνακας 4. Μέσος όρος συγκέντρωσης προγεστερόνης (ng/ml) στις δύο ομάδες ζώων, κατά τη διάρκεια των τριών σταδίων της ωχρινικής φάσης.

	Στάδιο του οιστρικού κύκλου		
	Αρχικά (ημ. 3-4)	**Μέσα (ημ. 9-1 1)**	**Τελικά (ημ (14-17)**
Ομάδα Α	0, 71 ± 0, 56	7,1 5±2,26	5,88± 3, 04
Ομάδα Β	0,54± 0,17	9,36± 3,42	4,10±2,8
Σημαντικότητα	P>0,05	P>0,05	P>0,05

στατιστικά, γιατί είναι δυνατό να περιλαμβάνει και ωοθυλάκια που δεν είναι ορατά με τον υπερηχογράφο.

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν από τη δεξιά και την αριστερή ωοθήκη. Περισσότερα ωάρια συλλέχθηκαν από τη δεξιά ωοθήκη (ποσοστά συλλογής 33,1 και 30,4% αντίστοιχα) χωρίς όμως να υπάρχει σημαντική διαφορά (πίνακας 3).

Ποιότητα των ωαρίων.

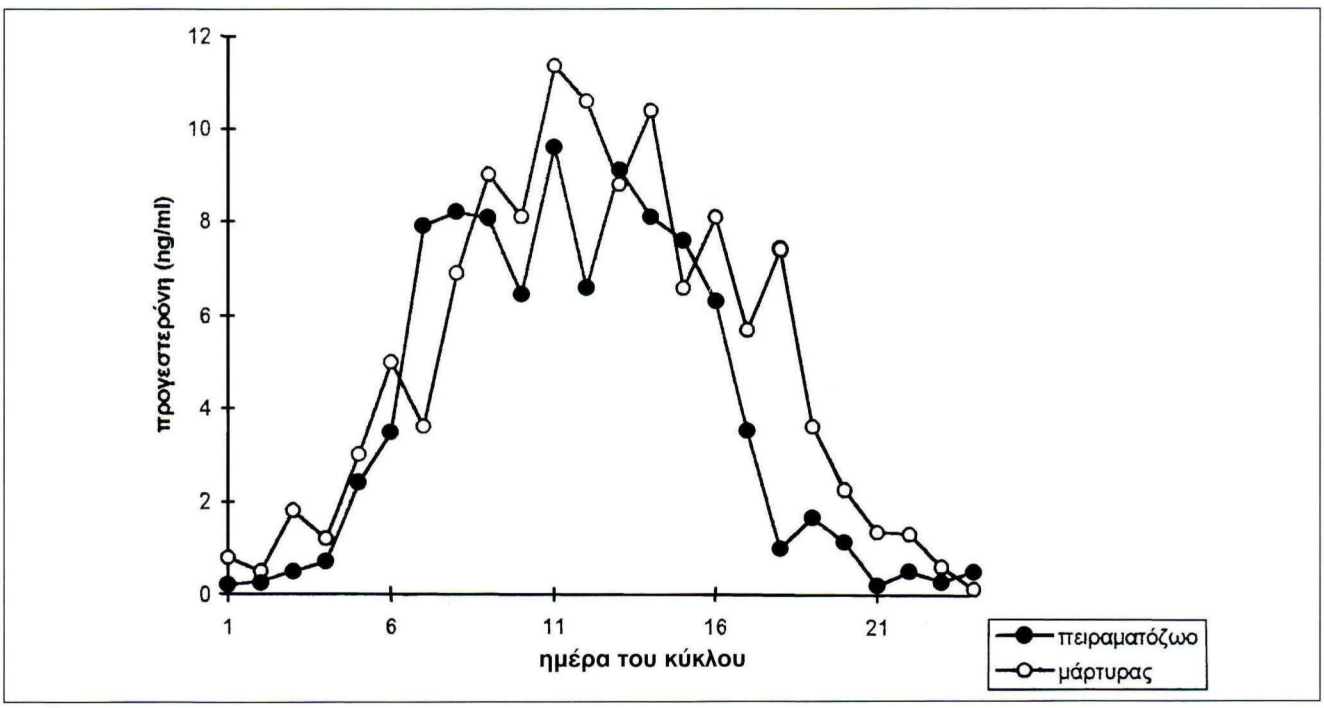
Από τα 104 ωάρια που συλλέχθηκαν, τα 60 (57.7%) κρίθηκαν κατάλληλα για περαιτέρω χειρισμούς. Από αυτά τα 16 ωάρια (15.3%) αξιολογήθηκαν ως ωάρια πρώτης κατηγορίας, τα 13 (12.5%) δεύτερης και τα 44 (42.3%) τρίτης. Τα υπόλοιπα 31 ωάρια (29.8%) παρουσίασαν κυτταροπλασματικές εκφυλίσεις, ή ήταν απογυμνωμένα από την κοκκώδη στιβάδα τους και κατατάχθηκαν στην τέταρτη κατηγορία.

Διάρκεια του οιστρικού κύκλου.

Η διάρκεια 22 από τους 24 οιστρικούς κύκλους των ζώων της ομάδας Α κυμάνθηκε από 18 - 24 ημέρες (Μ.Ο. 21,6±1,4). Σε ένα ζώο διαγνώσθηκε παραμένον ωχρό σωμάτιο και δε χρησιμοποιήθηκε σε έναν οιστρικό κύκλο. Ενα άλλο ζώο αποκλείσθηκε από δυο πειραματισμούς λόγω σύντομου οιστρικού κύκλου (17 ημέρες). Στα ζώα της ομάδας Β η μέση διάρκεια 12 οιστρικών κύκλων ήταν 22,37± 1,0 ημέρες με διακύμανση 21-26 ημέρες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της διάρκειας των οιστρικών κύκλων των ζώων των δυο ομάδων (P>0.05).

Συγκέντρωση προγεστερόνης στο πλάσμα

Η συγκέντρωση της προγεστερόνης σε όλα τα ζώα αυξανόταν από την ημέρα 4 του κύκλου και έφθανε στα μέγιστα επίπεδα περίπου την ημέρα 12 όπου και παρέμενε μέχρι τις ημέρες 16 έως 18. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις και



Εικόνα 5. Ενδεικτική συγκέντρωση προγεστερόνης σε δείγματα αίματος που συλλέγονταν σε ημερήσια βάση από ένα πειραματόζωο και ένα μάρτυρα. Ο οιστρικός κύκλος των δύο ζώων ήταν ίσης διάρκειας.

στις δύο ομάδες κυμαίνονταν μεταξύ 12 και 14 ng/ml. Σε κανένα στάδιο του κύκλου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση προγεστερόνης μεταξύ των δύο ομάδων (πίνακας 4, εικόνα 5).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 67 ΔΑΩ (93,1 %) έναντι των 72 που θεωρητικά θα μπορούσαν να είχαν γίνει. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι για διάστημα τουλάχιστον τριών οιστρικών κύκλων μπορούν να γίνουν κατά μέσον όρον 2,8 ΔΑΩ ανά ζώο ανά οιστρικό κύκλο. Τόσο η περίπτωση του σύντομου οιστρικού κύκλου (17 ημέρες) όσο και αυτή του παραμένοντος ωχρού σωματίου θα μπορούσαν να θεωρηθούν φυσιολογικές. Η παρουσία παραμένοντος ωχρού σωματίου συνδέεται συνήθως με φλεγμονώδεις εξεργασίες του γεννητικού συστήματος[38], κάτι ανάλογο όμως δεν διαγνώσθηκε παρά την επισταμένη εξέταση του ζώου. Το συγκεκριμένο ζώο ανταποκρίθηκε φυσιολογικά στην πρώτη έγχυση προσταγλανδίνης μετά το πέρας του πειραματισμού.

Από τις 334 προσπάθειες αναρρόφησης οι 326 (97,6%) ήταν επιτυχείς. Σε τρεις περιπτώσεις η αποτυχία αναρρόφησης οφειλόταν σε έμφραξη της βελόνας από το ωοθυλακικό τοίχωμα, ενώ στις υπόλοιπες 5 εγκαταλείφθηκε η προσπάθεια γιατί το ωοθυλάκιο ήταν προσπελάσιμο μόνο διαμέσου του ωχρού σωματίου.

Η γονιμότητα των ζώων δεν διαταράχθηκε από τις επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις. Μετά την ολοκλήρωση του πειραματισμού έγινε ΤΣ μετά από νέο συγχρονισμό. Τρία από τα οκτώ πειραματόζωα συνέλαβαν με την πρώτη, τέσσερα με τη δεύτερη και ένα με την τρίτη ΤΣ. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να εξακριβωθεί ο μέγιστος χρόνος που θα μπορούσε να εφαρμοσθεί η τεχνική χωρίς να επηρεάζεται η γονιμότητα του ζώου.

Περισσότερα ωοθυλάκια ($P<0.05$) ήταν διαθέσιμα για αναρρόφηση κατά τη διάρκεια των μέσων σταδίων της ωχρινικής φάσης. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα των Stubbings & Walton[25] και Bergfelt et al[26]. Οι τελευταίοι μάλιστα απέδειξαν, ότι αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε οποιοδήποτε στάδιο του κύκλου, έχει ως συνέπεια την εμφάνιση αυξημένου αριθμού ωοθυλακίων στο επόμενο κύμα. Έχει αποδειχθεί ότι μία αύξηση της συγκέντρωσης της FSH στο πλάσμα προηγείται της εμφάνισης του νέου κύματος ωοθυλακίων, ενώ η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου συνδέεται με πτώση της συγκέντρωσης της FSH[27]. Αναρρόφηση μόνο του κυρίαρχου ωοθυλακίου έχει ως αποτέλεσμα τη ραγδαία μείωση της συγκέντρωσης οιστραδιόλης στο πλάσμα και τη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της FSH[28]. Πιστεύεται ότι αυτή η αύξηση της FSH ενεργοποιεί τους μηχανισμούς ανάπτυξης νέας ομάδας ωοθυλακίων, με τρόπο ανάλογο με αυτόν που η εξωγενής FSH προκαλεί πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία. Ένας άλλος παράγοντας που ενδεχομένως συνδέεται άμεσα ή έμμεσα με τη ρύθμιση του πληθυσμού των ωοθυλακίων, είναι η ανασταλτίνη. Ανοσοποίηση μοσχίδων έναντι της ανασταλτίνης είχε ως συνέπεια την αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων[29]. Πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον αριθμό ωοθυλακίων μεταξύ αγελάδων που υποβλήθηκαν σε αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και αγελάδων στις οποίες δεν εφαρμόσθηκε ορμονική αγωγή[25,26].

Τα αρχικά ποσοστά αναληψιμότητας ήταν αποθαρρυντικά (περίπου 9%) αλλά αυτό οφειλόταν κυρίως στην έλλειψη εμπειρίας του επεμβαίνοντος και σε ορισμένες ατέλειες στον εξοπλισμό. Σύντομα όμως το ποσοστό ανέβηκε στο 17% και παρέμεινε (μετά τον τέταρτο πειραματισμό) πάνω από το 30%, ενώ σε 4 πειραματισμούς επιτεύχθηκαν πολύ ικανοποιητικά ποσοστά (41,6 - 52.6%). Τα ποσοστά αυτά είναι συγκρίσιμα με τα ποσοστά αναληψιμότητας από ωοθήκες σφαγέντων ζώων[30]. Ο καθοριστικός ρόλος της εξοικείωσης στην αποτελεσματικότητα της τεχνικής αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα της ομάδας της Ουτρέχτης που αύξησε το ποσοστό αναληψιμότητας από 18% το 1988 σε 55% το 1994[6,18]. Η χρησιμοποίηση του εισαγωγέα διευκόλυνε σημαντικά τη διαδικασία, γιατί η βελόνα αναρρόφησης δεν βρισκόταν σε επαφή με τα τοιχώματα του κόλπου και παρεχόταν έτσι άνεση λεπτών χειρισμών. Επιπλέον, η χρήση του εισαγωγέα έκανε τη διαδικασία λιγότερο τραυματική καθόσον διαπερνώντας μια και μόνη φορά τον κόλπο γινόταν αναρρόφηση όλων των ωοθυλακίων της ωοθήκης. Ιδανικό μήκος βελόνας κρίθηκε αυτό των 32 εκ. γιατί οι βελόνες αυτές περνούσαν πιο εύκολα από τον εισαγωγέα και κάμπτονταν πολύ πιο δύσκολα από τις βελόνες μεγαλύτερου μήκους.

Δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στον αριθμό ωαρίων που συλλέχθηκαν από τη δεξιά ή την αριστερή ωοθήκη. Περισσότερα ωοθυλάκια (175) αναπτύχθηκαν στη δεξιά ωοθήκη (έναντι 151 στην αριστερή), χωρίς ωστόσο η διαφορά αυτή να είναι σημαντική. Η αυξημένη δραστηριότητα που διαπιστώθηκε στη δεξιά ωοθήκη, βρίσκεται σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι περίπου 60% των ωοθυλακιορρηξιών στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγικών φυλών συμβαίνουν στην ωοθήκη αυτή[31].

Το μέγεθος του ωοθυλακίου από το οποίο προερχόταν κάθε ωάριο δεν καταγράφηκε στη μελέτη αυτή, γιατί κάτι τέτοιο θα απαιτούσε απομάκρυνση και έκπλυση της βελόνας μετά από κάθε αναρρόφηση και αλλαγή του δοχείου συλλογής, γεγονός που θα καθυστερούσε σημαντικά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, με αποτέλεσμα την υπερβολική καταπόνηση του ζώου. Η πλειονότητα των αναρροφηθέντων ωοθυλακίων είχαν διάμετρο 4-6 mm, οπότε θα μπορούσε να υποτεθεί ότι αναλογικά η κατηγορία αυτή απέδωσε τα περισσότερα ωάρια. Προβλήματα αντιμετωπίζονταν με την αναρρόφηση μεγάλων ωοθυλακίων (>12 mm) όταν η αναρρόφηση ξαφνικά

διακοπτόταν, πιθανόν μετά από έμφραξη της βελόνας από κάποια πτυχή του συρρικνούμενου ωοθυλακίου. Η τάση αυτή των μεγάλων ωοθυλακίων να συρρικνώνονται γύρω από τη βελόνα σε συνδυασμό με την πιθανότητα το ωάριο να παραμένει παγιδευμένο ανάμεσα σε δύο πτυχές του τοιχώματος, ίσως είναι ο λόγος της χαμηλής αναληψιμότητας από την κατηγορία αυτή[32].

Η αποτελεσματικότητα της ΔΑΩ φαίνεται να υστερεί σε σχέση με την τεχνική της διακολπικής λαπαροσκοπίας[36,37]. Με την τελευταία μπορούν να επιτευχθούν ποσοστά συλλογής μέχρι 70%, γεγονός που θεωρητικά επιτρέπει την παραγωγή 50 μόσχων το χρόνο από κάθε αγελάδα δότη σε προγράμματα IVM-IVF. Αντίστοιχα, με τη ΔΑΩ θα ήταν δυνατόν να παραχθούν περίπου 30 μόσχοι[8]. Η διακολπική λαπαροσκοπία όμως μειονεκτεί έναντι της ΔΑΩ γιατί με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν να αναρροφηθούν μόνο ωοθυλάκια που βρίσκονται στην επιφάνεια της ωοθήκης και είναι περισσότερο τραυματική για το ζώο λόγω της μεγάλης διαμέτρου του λαπαροσκοπίου. Στο γεγονός αυτό ίσως οφείλεται και επιμήκυνση της διάρκειας του οιστρικού κύκλου των πειραματοζώων[36,37] Με τη βελτίωση της διακριτικής ικανότητας και της ευκρίνειας των υπερηχογράφων πιστεύεται ότι ο αριθμός των συλλεγομένων ωαρίων με τη ΔΑΩ θα μπορέσει να φθάσει στα επίπεδα της λαπαροσκοπικής συλλογής.

Η πλειονότητα των ωαρίων ταξινομήθηκε στις κατηγορίες τρία και τέσσερα, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων ερευνητών[9,21,33] Αντίθετα, άλλες ερευνητικές ομάδες παρουσιάζουν αναληψιμότητα μεγάλου αριθμού ωαρίων άριστης ποιότητας[7,17]. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποιοτική αξιολόγηση των ωαρίων. Πιστεύεται ότι η διάβαση του ωαρίου δια μέσω της βελόνας με μεγάλη σχετικά ταχύτητα προκαλεί μηχανική αποκόλληση στιβάδων ή και ολόκληρου του ωοφόρου δίσκου, γεγονός που δυσχεραίνει την εκτίμηση της ποιότητας των ωαρίων[34]. Παρ' όλα αυτά, ωάρια προερχόμενα από ΔΑΩ παρουσιάζουν συνολικά παρόμοια[10] ή ακόμα και μεγαλύτερα[33] ποσοστά εξέλιξης σε μορίδια και βλαστοκύστεις από τα ωάρια που συλλέγονται από ωοθήκες σφαγίου. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη σημαντική μείωση του χρόνου συλλογής - καλλιέργειας, καθώς και στις συνθήκες συλλογής (στείρο περιβάλλον, σταθερή θερμοκρασία, άμεση μεταφορά των ωαρίων σε υπόστρωμα καλλιέργειας)

Οι επαναλαμβανόμενες ΔΑΩ με υπερηχογραφία δεν φαίνεται να επιμηκύνουν τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση της καμπύλης προγεστερόνης μεταξύ των πειραματοζώων και των μαρτύρων. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με ορισμένους ερευνητές[8,10,18] αλλά σε αντίθεση με τα ευρήματα των Stubbings & Walton, οι οποίοι ανέφεραν ότι μια και μόνη αναρρόφηση κατά τη διάρκεια του διοίστρου είναι αρκετή για να προκαλέσει παράταση της διάρκειας του οιστρικού κύκλου. Παρατεταμένη άνοιστρη περίοδος παρατηρείται για όσο χρονικό διάστημα εκτελούνται δύο αναρροφήσεις σε εβδομαδιαία βάση. Στην περίπτωση αυτή δε δίδεται αρκετός χρόνος για την επιλογή και την ανάπτυξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου και αποκλείεται η ωοθυλακιορρηξία[10,18]. Έχει βρεθεί ότι διάστημα πέντε ημερών μεταξύ των αναρροφήσεων είναι αρκετό για την επιλογή και την ανάπτυξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου[18]. Η καταστροφή όλων των ωοθυλακίων με μέγεθος μεγαλύτερο των 5 mm την ημέρα 18 του κύκλου δεν παρεμποδίζει την εμφάνιση του οίστρου στον αναμενόμενο χρόνο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επιλογή και ανάπτυξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου είναι μία διαδικασία που γίνεται σε σύντομο χρόνο[35]. Έχει επιπλέον αποδειχθεί ότι καθυστέρηση εκδήλωσης οίστρου κατά 3-4 ημέρες παρατηρείται μόνο μετά από αναρρόφηση όλων των ωοθυλακίων κατά την ωοθυλακική φάση[28].

Συμπερασματικά θα μπορούσε να αναφερθεί, ότι η ΔΑΩ είναι μια σχετικά απλή, μη τραυματική, γρήγορη και πολύ αποτελεσματική τεχνική, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρέως για δημιουργία μιας σταθερής πηγής για τη συλλογή ωαρίων αγελάδων υψηλής γενετικής αξίας, χωρίς να επηρεάζει τη γονιμότητα των ζώων δοτών. Το μόνο ίσως μειονέκτημά της είναι το ψηλό κόστος του απαιτούμενου εξοπλισμού. Το κόστος όμως της συλλογής είναι συγκριτικά με τις κλασικές μεθόδους πολύ χαμηλό, γιατί δεν απαιτούνται ορμονικές αγωγές ή χειρουργικές επεμβάσεις. Τεχνικές βελτιώσεις πιθανόν να συμβάλουν στην αύξηση των ποσοστών συλλογής και στη βελτίωση της ποιότητας των συλλεγόμενων ωαρίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, Oxon 1994.
2. Lambert RD, Bernard C, Rioux JE, Eeland R, D'Amours D and Montreuil A. Endoscopy in cattle by paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. Theriogenology 1983, 20, 149-161 .
3. Reichenbach HD, Wiebke NH, Besenfelder UH, Modl J and Brem G. Transvaginal laparoscopy-guided aspiration of bovine follicular oocytes: preliminary results. Theriogenology 1993, 39, 295.
4. Dellenbach P, Nisand I, Morreau L, Feger B, Plumere C and Gerlinger P. Transvaginal sonographically controlled follicle puncture for oocyte retrieval. Fertility and Sterility 1985, 44, 656-662.
5. Callesen H, Greve T and Cristensen F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. Theriogenology 1987 27, 217
6. Pieterse M.C, Kappen K.A, Kruip TAM and Taverrie MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology 1988, 30, 751-762.
7. van der Schams A, van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eystone WE and de Boer HA. Ultrasound guided

transvaginal collection of oosytes in the cow. Theriogenology 1991 35, 288.

8. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TAM, Wurth YA. Tranvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine. Theriogenology 1991; 35, 857-862.

9. Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C, Boyd JS. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiratiori in cows. Veterinary Record 1994, 134, 440-443.

10. Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D Niemann. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotrophin pretreatment and in different reproductive stages. Theriogenology 1995, 43, 667-675.

11. Rajakoski E. The ovarian fiollicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. Acta Endocrinologica 1960, 52, 7-68.

12. Ireland JJ and Roche JF. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in fo1licular fluid and receptors for gonadotropins. Endocrinology 1983, 112, 150-156.

13. Fortune JE, Sirois J, Quirk SM. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine oestrus cycle Theriogenology 1988, 29, 95-109.

14. Ireland JJ and Roche JF. Hypothesis regarding development of dominant follicles during a bovine estrus cycle. In: Follicular growth and ovulation rate in farm animals. J.F.Roche, D. O'Challagan (eds) Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht 1987, 1-18.

15. Fortune JE, Sirois J, Turzillo AM, Lavour. M. Follicle selection in domestic ruminants. Journal of Reproduction and Fertility suppl 1991, 43, 187-198.

16. Duffour JJ, Roy GL. Distribution of ovarian follicular population in the dairy cow vvithin 35 days after postparturition. Journal of Reproduction arid Fertility 1985, 73:229-235.

17. Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE and Gwazdauskas FC. Efifects of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. Theriogenology 1994, 42, 405-419.

18. Kruip TAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM. and Pieterse MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and, breeding in cattle Theriogenology 1994, 42 675-684.

19. Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA and Robl JM. Prebuberal calves as oocyte donors: Promises and Problems. Theriogenology 1996, 45 121-130.

20. Ryan DB, Blakewood EG, Swanson WS, Rodriguez H and Godke RA. Using hormone treated pregnant cows as a potential source of oocytes for iri vitro fertilization. Theriogenology 1993, 40: 1039-1055.

21. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocytes retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology 1994, 41 , 67-72.

22. Corrie JET, Hunter WM, Macpherson JS. A strategy for radioimmunoassay of plasma progesterone with use of homologous-site 125I-labelled radioligand. Clinical Chemistry 1981, 27, 594-599.

23. Jeffcoate IA. Concentrations of luteinizing hormone and oestradiol in plasma, and response to injection of gonadotrophin-releasing hormone analogue at selected stages of anoestrus in domestic bitches. Journal of Reproduction and Fertility 1992, 94, 423-429.

24. de Loos F, Van Viet C, Van Mauric P and Kruip Th AM. Morphology if immature bovine oocytes. Gamete Research 1989, 24, 197-204.

25. Stubbings RB and Walton JS. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrus cycle and follicu(ar dynamics in Holstein cows. Theriogenology 1995, 43, 705-712.

26. Bergfelt DR, Lightfoot KC. and Adams GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers. Theriogenology 1994, 41 , 161 .

27. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH. and Ginther OJ. Association between surges of follicle stimulating hormone and emergence of follicular waves in heifers. Journal of Reproduction and Fertility 1992, 94, 177-188. "

28. Amiridis GS. Effects of follicular aspiration on the bovine oestrus cycle. Ph.D. Thesis Glasgow University Veterinary School, 1996.

29. Glencross RG, Bleach EC, McLeod BJ, Beard AJ and Knight PG. Increased ovulation rate in heifers immunized against a synthetic peptide sequence of bovine inhibin. Journal of Reproduction and Fertility 20, 1990 abstract series No 5.

30. Βαϊνάς Ε, Βαφειάδης Δ, Μπόσκος Κ, Τσακάλωφ Π. In vitro ωρίμανση και γονιμοποίηση ωαρίων αγελάδας και καλλιέργεια του ζυγωτού. Δελτίο Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας 1994, 45, 31-36.

31 Τσακάλωφ Π.Μαιευτική των κατοικιδίων ζώων. Θεσαλονίκη, 1983

32. Vos PLAM, de Loos FAM, Pieterse MC, Bevers MM, Taverne MAM, and Dieleman. SJ. Evaluation of transvaginal ultrasound guided follicle puncture , to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. Theriogenology, 1994, 41, 829-840.

33. Kruip TAM, Pieterce MC, van Beneden TH, Vos PLAM, Wurth YA and Taverne MAM. Increased success rate of IVM and IVF in the bovine after sonographic guided transvaginal collections of the oocytes. Theriogenology 1990, 33, 269

34. Chian RC, Niwa K and Sirard MA. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro Theriogenology 1994, 41 , 1499-1508.

35. Matton P, Acelakoun V, Couture Y and Dufour JJ. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrus cycle. Journal of Animal Science 1981 , 52, 813-820.

36. Wiebke N. Ex vivo gewinnung boviner Cumulus-Oozyten Komplexe durch transvaginale, laparoskopisch gefuhrte follikepuntion. Ph.D. Thesis. Munchen1993.

37. Wenigerkind H. Untersuchungen zur ex vivo gewinnung boviner CumulusOozyten Komplexe mittels endoskopish gefuhrte follikepuntion. Ph.D. Thesis. Munchen 1995.

38. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. (eds). Veterinary reproduction and obstetrics, Bailliere Tindail, London 1989.