بررسی مقدماتی دریافت اووسیت از مادیانهای دره‌شوری به روش غیرجراحی در دو مرحله فحلی و بین فحلی‌ها

دکتر محمدرحیم احمدی[1] دکتر علی جاویدپور[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۴، ۱۶-۱۳، (۱۳۷۹)

تاکنون بلوغ و باروری آزمایشگاهی اووسیتهای انسان، گاو، خوک، میمون و چندین حیوان آزمایشگاهی با موفقیت انجام شده است. بلوغ اووسیت در محیط آزمایشگاه، باروری در محیط آزمایشگاه و کشت جنین تکنیکهایی هستند که می‌توان در بعضی از موارد ناباروری در مادیانها و همچنین برای حفظ و نگهداری گونه‌های در حال انقراض اسب به کار برد. البته پیشرفت این تکنیک وابسته به سهولت دریافت اووسیت می‌باشد. هدف این مطالعه جمع‌آوری اووسیت مادیان از طریق رکتوواژینال می‌باشد. فولیکولها به‌وسیله سرسوزن شماره ۱۸ با مکش سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری آسپیره شدند. برروی ۳ رأس مادیان ۳۶ بار آسپیراسیون انجام شد و نتایج حاصله به روشهای آماری تی‌تست و آزمون مربع کای تجزیه و تحلیل شد. نتایج این بررسی نشان داد که تعداد تقریبی فولیکولها (بزرگتر از ۱۰ میلیمتر) در مرحله فحلی (۲/۱±۰/۸) نسبت به مرحله بین فحلی‌ها (۲/۵±۱/۳) اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) نداشتند. میزان مایع فولیکولی آسپیره‌شده در مرحله فحلی (۱۰/۲±۳۴/۸ میلی‌لیتر) نسبت به مرحله بین فحلی‌ها (۱۰/۵±۲۰/۱) به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر بوده است. تعداد اووسیت به‌دست آمده در مرحله فحلی نیز از تعداد اووسیت به‌دست آمده از مرحله بین فحلی‌ها بیشتر بود. فاصله دو آسپیراسیون در مرحله فحلی ۱۴ یا ۱۵ روز و در بین فحلی‌ها ۷ تا ۱۰ روز به‌دست آمد. به‌طور کلی، با بهبود انجام این روش، کسب تجربه و تکرار آن می‌توان در طی فصل تولیدمثلی چندین بار از مادیان اووسیت دریافت کرد.

واژه‌های کلیدی : اووسیت، مادیان، فولیکول، فحلی.

ایران، مهد پرورش اسب و منشأ نژادهای اسبهای امروزی جهان است و از جمله معدود کشورهایی است که دارای نژادهای متنوع و اصیل اسب نظیر عرب، ترکمن و اسبچه خزر می‌باشد و اغلب این نژادها از طرف علاقمندان اسب در سایر کشورها مورد توجه خاص قرار گرفته است.

به‌کارگیری تکنولوژی تولیدمثل مانند انتقال جنین، بلوغ اووسیت در محیط آزمایشگاه (In vitro maturation) باروری در محیط آزمایشگاه (In vitro fertilization) و کشت جنین تکنیکهایی هستند که برای انتقال پتانسیل ژنتیکی مادیانهای باارزش به تعداد بیشتری فرزندان به‌کار گرفته می‌شوند (۱۵ و ۱۲) و می‌توان از آنها در مادیانهایی که به دلایل مختلف دچار کاهش باروری شده‌اند همچنین برای حفظ و نگهداری و تکثیر و اصلاح نژاد گونه‌های در حال انقراض اسب استفاده نمود (۱۱). یکی از دلایل عمده انتقال جنین در اسب، درمان ناباروری است. مادیانهای با تاریخچه ناباروری چند ساله معمولاً برای دریافت جنین انتخاب می‌شوند. متأسفانه دریافت جنین با شستشوی رحم در ۷ روز پس از تخمک‌گذاری تأثیر کمی برای دریافت کره از مادیان نابارور داشته است (۲۴ و ۲۳). در مادیان تاکنون هورمونهای به‌کار گرفته شده تأثیر بارزی در تخمک‌گذاری چندتایی نداشته‌اند (۲ و ۱)، لذا در یک فصل تولیدمثلی می‌توان از یک مادیان، بین ۶ تا ۸ جنین انتظار داشت (۱۷).

با استفاده از امکان جمع‌آوری اووسیت (Oocyte) از مادیان و تکنیک IVF می‌توان از مادیانهای پیر با سابقه تولیدمثلی ضعیف کره به‌دست آورد (۲۲). بیشترین مطالعات انجام‌شده در ارتباط با رشد اووسیت در محیط آزمایشگاه (IVM) برروی اووسیتهای به‌دست آمده از تخمدانهای کشتارگاهی بوده است (۲۲، ۲۱، ۱۱، ۳). اولین تلاش برای دریافت اووسیت از حیوان زنده در مادیان و از طریق ناحیه تهیگاه صورت گرفته و ناموفق گزارش شد (۱۰). اولین اووسیتهای مادیان از تخمدانهای کشتارگاهی توسط Zhang et al (1989)، Choi et al (1993) و Brinsko et al (1995) به‌دست آمد. آسپیراسیون اووسیتها از مادیان در مراحل مختلف رشد فولیکولی می‌تواند یک روش بسیار خوب برای مطالعه رشد اووسیت قبل از اوولاسیون باشد. برای انجام این کار لازم است به‌طریقی اووسیت را از فولیکولهای پیش تخمک‌گذاری در مراحل مختلف رشد فولیکولی، به‌دست آورد (۱۴). در مادیان یک موج رشد فولیکولی در اواسط مرحله لوتئال (حدود روز ۱۰-۶ بعد از تخمک‌گذاری) شروع می‌شود و تا روز ۷-۳ قبل از تخمک‌گذاری تعداد فولیکولها روبه افزایش می‌گذارد. در روز ۱۶-۱۵ همراه با انتخاب فولیکول تخمک‌گذار تعداد فولیکولهای بزرگ کاهش می‌یابد (۱۸ و ۱۳). پیشرفت تکنیک باروری اووسیت در محیط آزمایشگاه وابسته به سهولت به‌دست‌آوردن اووسیتها از مادیان می‌باشد (۲۲). اولین کوشش برای دریافت اووسیت از مادیان زنده از طریق سوراخ‌کردن پوست در ناحیه تهیگاه انجام (۲۲ و ۱۴) و در زمان بروز فحلی صورت می‌گرفت (۱۶ و ۱۴). در گزارشات بعدی روش غیرجراحی و مکش مایع فولیکولی استفاده شد و میزان موفقیت با سوزن و مکش ۱۰ درصد (۴ از ۳۷) (۲۵)، با مکش به‌علاوه شستشوی فولیکول ۳۸ درصد (۸ از ۱۸) (۸)، با سونوگرافی و مکش ۲۷/۴ درصد (۵۴ از ۱۹۷) (۲۲) بوده است. علی‌رغم مطالعات وسیعی که در ارتباط با دریافت اووسیت و بررسی بلوغ آنها در محیط آزمایشگاه به‌عنوان مقدمه‌ای برای انجام باروری در محیط آزمایشگاه در دیگر کشورها صورت گرفت تاکنون مطالعه‌ای برروی اسبهای ایرانی و حداقل در شرایط و امکانات موجود انجام نگرفته. یا گزارشی در دسترس نیست. لازم بود چنین بررسی در مورد اسبهای ایرانی و در شرایط و امکانات موجود صورت گیرد تا مقدمات تکنیکهای نوین تولیدمثلی اسب در کشور ما نیز پایه‌ریزی شود. در این مطالعه آسپیره‌نمودن فولیکولها از طریق رکتوواژینال برای دریافت اووسیت از مادیان در دو مرحله فحلی (Oestrus) و بین فحلی‌ها (Inter oestrus) یا لوتئال (Luteal) در یک گروه مادیان آمیخته دره‌شوری طراحی گردید.

مواد و روش کار

تعداد ۳ رأس مادیان از نژاد عرب دره‌شوری دارای سن ۶ تا ۱۱/۵ سال و با وزن تقریبی ۳۰۰ تا ۴۰۰ کیلوگرم و دو نریان دارای اشتیاق جنسی خوب انتخاب شدند. پس از برقراری چرخه فحلی مادیانها، عملیات از اردیبهشت ماه شروع و تا مهر ماه ادامه یافت. برای انجام عملیات اصلی ابتدا برروی تمام مادیانها آزمایش لمس راست‌روده‌ای انجام و رشد فولیکولی هر کدام تعقیب گردید و وضعیت تخمدان، تعداد فولیکولهای موجود، اندازه فولیکولها و همچنین فاز تولیدمثلی تعیین و برای تأیید تشخیص فاز تولیدمثلی مادیانها تیزینگ نیز داده شدند.

مادیانها یک روز در میان لمس راست‌روده‌ای می‌شدند و کلیه مشخصات تخمدانی از لحاظ تعداد فولیکولها و اندازه آنها و همچنین قوام رحم و گردن

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

رحم ثبت می‌شد و با توجه به شرایط موجود، آسپیراسیون فولیکولها صورت می‌گرفت. در این بررسی برای دریافت اووسیت در مرحله فحلی، براساس مشاهده فحلی آسپیراسیون انجام می‌شد، ولی برای دریافت در مرحله بین فحلی‌ها پس از هر دریافت رشد فولیکولها تعقیب و با حضور فولیکول حدود ۲۰-۱۰ میلیمتر آسپیراسیون انجام می‌شد. برای انجام آسپیراسیون فولیکولها، پس از حصول اطمینان از موجودبودن فولیکول قابل آسپیره‌کردن (بزرگتر از ۱۰ میلیمتر)، از طریق لمس راست‌روده‌ای به طریقه زیر اقدام می‌شد.

ابتدا دم حیوان جهت حفظ شرایط استریل بسته می‌شد و سپس ناحیه پرینه با آب و بعد از آن با بتادین اسکراب ضدعفونی می‌گردید و سپس اقدام به عمل آسپیراسیون از طریق رکتوواژینال می‌شد. بعد از انجام این مقدمات لوله پلاستیکی به قطر ۱/۵ سانتیمتر کاملاً تمیز را به ژل استریل آغشته و از واژن عبور داده می‌شد. سپس از طریق رکتوم تخمدان لمس و انتهای لوله پلاستیکی در محل فولیکول قابل آسپیره ثابت می‌شد. سپس پیپت رحمی که قبلاً استریل شده بود، و در یک نوک آن سوزن شماره ۱۸ و در نوک دیگر آن تیوب متصل‌کننده به سرنگ ۲۰ سی‌سی و یا ۵۰ سی‌سی وجود داشت، از طریق لوله پلاستیکی به سمت فولیکول قابل آسپیره هدایت می‌شد (تصویر ۱). پس از ورود سوزن به دیواره فولیکول مکش ایجاد می‌شد تا آسپیراسیون مایع فولیکولی به‌صورت کامل صورت گیرد. برای اطمینان از دریافت کامل مایع فولیکولی، از طریق لمس راست روده‌ای فولیکول آسپیره‌شده و آمدن خون در سرنگ مشخص می‌شد، و میزان مایع آسپیره‌شده یادداشت می‌گردید.

مایع فولیکولی به آزمایشگاه انتقال یافته و در پتری‌دیش، زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰×، با دقت به‌دنبال اووسیت گشته و در صورت یافتن اووسیت کیفیت آن مشخص می‌شد.

لازم به ذکر است که در این بررسی، در مرحله انجام آسپیراسیون از داروهای آرامبخش تزریقی و همچنین هپارین استفاده نشده و برای رفع زورهای راست‌روده‌ای از لیدوکائین ۲ درصد به‌صورت موضعی در راست‌روده استفاده و سعی می‌شد خون با مایع فولیکولی به‌دست آمده مخلوط نشود.

نتایج حاصل از این بررسی به‌وسیله روشهای آماری تی‌تست و آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در این تحقیق کاربرد روش رکتوواژینال و تکرار آن جهت آسپیراسیون فولیکولها هیچ‌گونه اثر سویی از قبیل پریتونیت، دل‌درد، چسبندگی و خونریزی تخمدان و شوک دیده نشد. مادیانها پس از پایان عملیات آبستن شده و بدون اختلال دوره آبستنی را طی کرده و زایمان نمودند.

متوسط و انحراف معیار تعداد فولیکول قابل لمس و آسپیره در مرحله فحلی ۰/۸±۲/۱ بوده است که در مقایسه با تعداد فولیکول در مرحله بین فحلی‌ها ۱/۳±۲/۵ اختلاف معنی‌داری ($P>0/05$) نداشته‌اند. در کل ۵۰ فولیکول لمس شد و از ۳۶ تای آنها مایع فولیکولی دریافت شد. متوسط و انحراف معیار حجم مایع آسپیره‌شده در مرحله فحلی ۱۰/۲±۳۴/۸ سانتیمتر مکعب نسبت به حجم مایع در مرحله بین فحلی‌ها ۱۰/۵±۲۰/۱ به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) بیشتر بوده است.

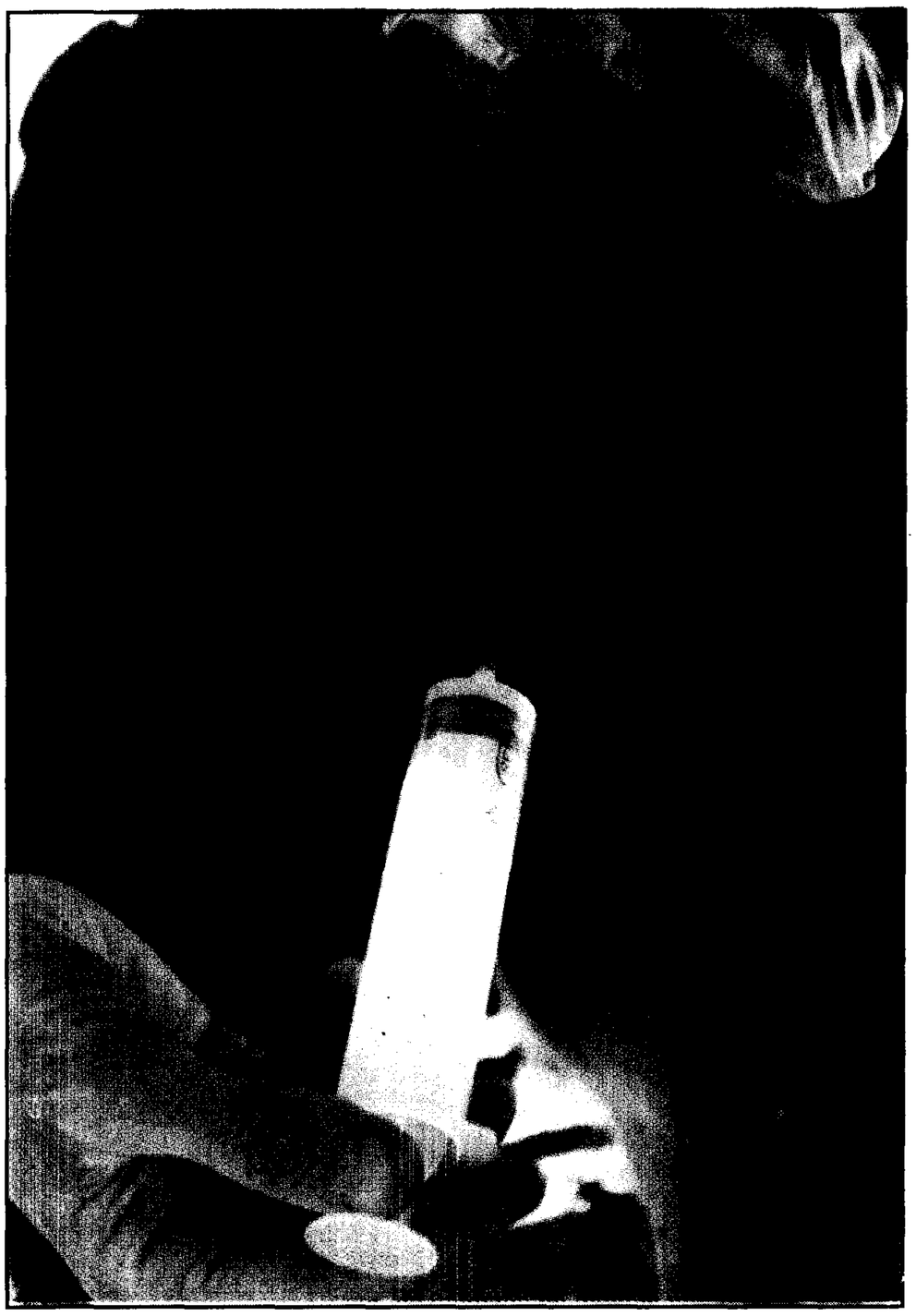
تعداد آسپیراسیون و تعداد اووسیتهای دریافت‌شده و درصد موفقیت را در دو مرحله فحلی و بین فحلی‌ها در جدول ۱ نشان می‌دهد، که درصد موفقیت دریافت اووسیت در مرحله فحلی به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) بیش از مرحله بین فحلی‌ها می‌باشد (۲۲/۷ درصد در مقابل ۷/۱ درصد).

جدول ۱ – تعداد آسپیراسیون، تعداد اووسیتهای دریافت‌شده و درصد موفقیت در دو مرحله فحلی و بین فحلی‌ها

	مرحله فحلی*	مرحله بین فحلی‌ها*
تعداد آسپیراسیون	۲۲	۱۴
تعداد اووسیتهای دریافت‌شده	۵	۱
درصد موفقیت	٪۲۲/۷	٪۷/۱

*) اختلاف معنی‌داری در درصد موفقیت در دو مرحله وجوددارد ($P<0/05$)

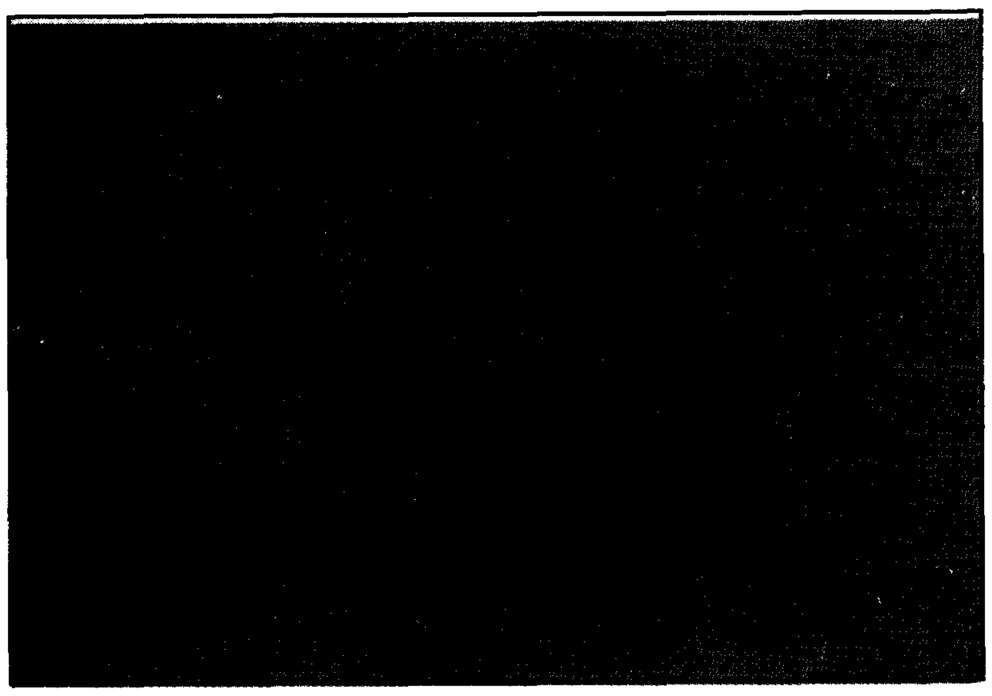
آسپیراسیون فولیکولها در ابتدای مرحله فحلی سبب شد که علایم فحلی خاتمه یافته، مشابه وقوع تخمک‌گذاری طبیعی، مادیان وارد مرحله بین فحلی‌ها شده و موج رشد فولیکولی جدیدی آغاز شود. مادیان پس از طی مرحله بین فحلی‌ها وارد مرحله فحلی می‌گردید و فاصله دو آسپیراسیون حدود ۱۴ تا ۱۵ روز بود. اووسیت به‌دست آمده از این مرحله در تصاویر ۲ و ۳ آمده است. اووسیت به‌دست آمده از مرحله فحلی بلوغ را شروع کرده و دارای انبساط فولیکولی بود، ولی اووسیت به‌دست آمده از مرحله بین فحلی‌ها چنین علامتی نداشت. دریافت اووسیت در مرحله بین فحلی‌ها سبب می‌شد که این مرحله ادامه یافته و مادیان وارد مرحله فحلی نشود. با شروع موج رشد فولیکولی جدید، در حدود ۷ تا ۱۰ روز بعد فولیکول در حال رشد با قطر بیشتر از ۱۰ میلیمتر قطر، قابل آسپیره می‌باشد.



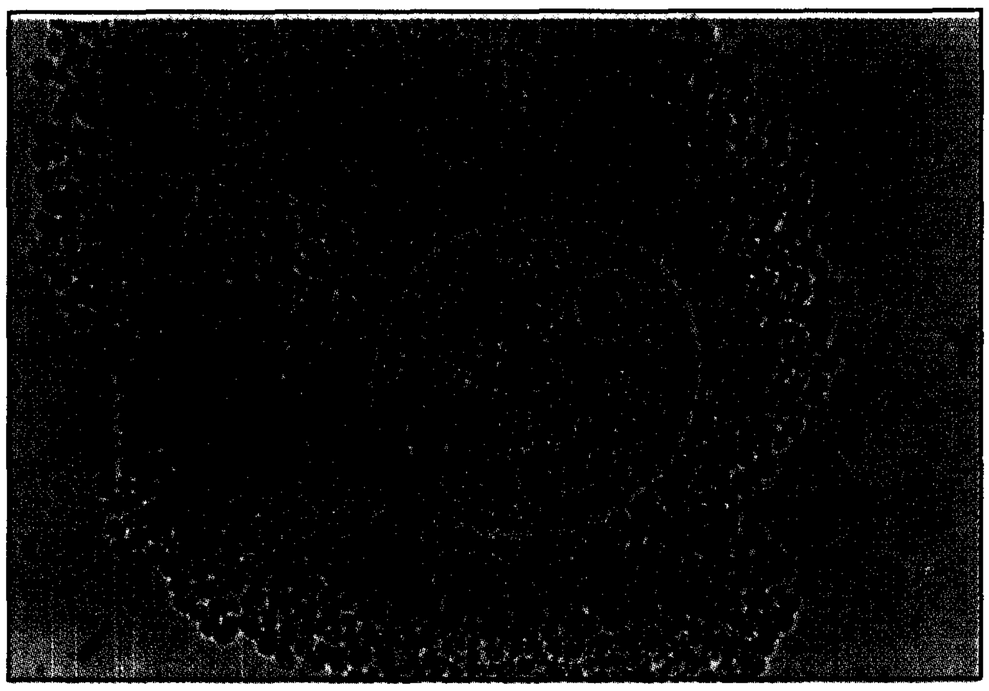
تصویر ۱ – نحوه قرارگرفتن لوله پلاستیکی و انجام عمل آسپیراسیون فولیکول

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تکرار استفاده از روش رکتوواژینال برای آسپیراسیون فولیکولها سبب بروز هیچ‌گونه علایمی از قبیل دل‌درد، پریتونیت، چسبندگی و خونریزی تخمدان، شوک و عوارضی مانند نازایی در مادیانهای مورد آزمایش مشاهده نشد. در این ارتباط Bracher et al (1993) آسپیراسیون فولیکولها را



تصویر ۲ - اووسیت دریافت‌شده در مرحله فحلی با انبساط سلولهای کومولوسی (بزرگنمایی ۷۵) و خروج مقداری از اوپلاسم در اثر صدمه فیزیکی به زوناپلوسیدا.



تصویر ۳ - اووسیت دریافت شده در مرحله فحلی با انبساط سلولهای کومولوسی (بزرگنمایی ۱۸۰).

از طریق ترانس واژینال در ۵ مادیان خونگرم در طی مدت ۳ ماه انجام دادند. آنها نتیجه گرفتند که آسپیراسیون فولیکولها از طریق ترانس واژینال می‌تواند بدون ایجاد پریتونیت و چسبندگی مکرراً به‌کار رود. Cook (1995) نیز آسپیراسیون فولیکولها را از طریق ترانس واژینال انجام داده و مادیانها علامتی از تب، دل‌درد و شوک را بعد از تکرار آسپیراسیون فولیکولها از طریق ترانس واژینال نشان ندادند و چسبندگی محسوسی بین تخمدان و ناحیه شکمی ایجاد نگردید و فقط کمی فیبرین در نوک تخمدان و ناحیه اطراف آن دیده شد. به‌طور کلی، نتایج حاصل از روش مطالعه حاضر با نتایج حاصل از تحقیقات Bracher et al (1993) و Cook (1993) همخوانی دارد و این روش به‌عنوان یک روش کم‌خطر و قابل اعتماد برای دریافت اووسیت در حیوان زنده می‌باشد. بنابراین استفاده از این روش جهت دریافت اووسیت از مادیان توصیه می‌شود.

میزان موفقیت دریافت اووسیت در این تحقیق در مرحله فحلی ۲۲/۷ درصد و در مرحله بین فحلی‌ها ۷/۱ درصد بود که با نتایج Vogelsang et al (1988) و نیز Choi et al (1993) مطابقت دارد. Alm & Tomer (1994) میزان موفقیت دریافت اووسیت را از طریق بریدن فولیکول و آسپیراسیون فولیکولی در تخمدانهای کشتارگاهی به‌ترتیب ۶۱/۵ و ۳۲/۳ درصد گزارش نموده‌اند.

Bracher et al (1993) زمانی که به‌وسیله سونوگرافی چهار فولیکول دیده می‌شد عمل آسپیراسیون را انجام دادند. در ۲۴ آسپیراسیون (۴ تا ۷ بار برای هر مادیان) ۲۰۰ فولیکول را آسپیره نمودند و ۳۴ اووسیت به‌دست آوردند. آنها با استفاده از سرسوزن دارای یک سوراخ، ۱۲/۳ درصد و با سوزن دارای دو سوراخ، ۲۴/۴ درصد موفقیت به‌دست آوردند.

در این ارتباط Hinrichs et al (1990) افزایش دریافت اووسیت را در حیوان زنده با آسپیراسیون و شستشوی فولیکول گزارش کرده‌اند. همچنین McKinon et al (1988) افزایش در میزان دریافت اووسیت، وقتی که فولیکولها در طی مدت آسپیراسیون از طریق لاپاراتومی ناحیه تهیگاه شستشو داده شدند، را مشاهده کردند. در مقابل این تحقیقات Palmer et al (1987) ابراز داشتند که شستشوی فولیکول در زمانی که تخمدان از طریق رکتوم ملامسه می‌شود تأثیری در نتایج میزان دریافت اووسیت از فولیکولهایی که توسط LH تحریک نشده‌اند را ندارد. Hinrichs et al (1990) عنوان کردند که در روش برش مهبلی (Colpotomy) فولیکولهای جمع‌شده را می‌توان کاملاً ماساژ داد و احتمال افزایش بیرون‌راندن اووسیت از فولیکول و تکرار شستشوی فولیکول در این روش وجود دارد. همچنین در این روش بدون وجود مانع دیواره رکتوم آسپیراسیون فولیکولها انجام می‌شود.

در بررسی حاضر موفقیت در دریافت اووسیت از فولیکولهای بزرگتری که در مرحله فحلی حضور داشتند بیشتر بود. در این ارتباط Callson et al (1987) در مطالعه‌ای که در گاو انجام دادند آسپیراسیون فولیکولها را در چهار گروه ۵-۳، ۱۰-۵ و ۱۵-۱۰ و بیش از ۱۵ میلیمتر انجام دادند و گزارش کردند که دریافت اووسیت در فولیکولهای ۱۵ میلیمتر به بالا نسبت به گروههای دیگر بیشتر بود. در مقابل Pieterse et al (1991) کاهش موفقیت دریافت اووسیت را از فولیکولهای بزرگتر از ۱۰ میلیمتر نسبت به فولیکولهای با قطر ۵-۳ میلیمتر و ۱۰-۶ میلیمتر را در گاو گزارش کردند. همچنین Cook et al (1993) دریافت اووسیت را بیشتر در فولیکولهای کوچکتر از ۱۵ میلیمتر (۳۱ درصد) نسبت به فولیکولهای بزرگتر از ۲۰ میلیمتر (۸ درصد) در مادیان گزارش نموده‌اند. Shabpareh et al (1993) با به‌کاربردن روش برش مهبلی در مادیان وجود اختلاف بین فولیکولهای کوچک و بزرگ را در میزان دریافت گزارش کردند. Vogelsong et al (1988) و Hinrichs et al (1990) افزایش دریافت اووسیت در مادیان را با افزایش اندازه فولیکول (با قطر ۴۰ تا ۴۰ میلیمتر) نشان دادند.

در بررسی حاضر، تکرار عمل آسپیراسیون فولیکولها باعث طولانی‌شدن مرحله بین فحلی‌ها شده و سبب پایان مرحله فحلی گردید. Cook et al (1993) اثرات تکرار آسپیراسیون را در مدت فحلی و بین فحلی (Dioestrus) بررسی کردند و نشان دادند که میزان دریافت اووسیت در زمان فحلی نسبت به بین فحلی بیشتر است و تکرار آسپیراسیون فولیکولها کمترین اثر را برروی چرخه فحلی مادیانها دارد. به‌طور کلی در ارتباط با اثر تکرار آسپیراسیون فولیکولها برروی میزان دریافت اووسیت و چرخه فحلی مادیانها ارزیابی زیادی نشده است (۲۲). Bruck et al (1997)، فاصله بین دو آسپیراسیون را در میزان دریافت اووسیت مؤثر دانسته و توصیه کردند حداقل ۶ روز فاصله باشد. البته در دریافت اووسیت از طریق واژینال، عواملی مانند درمان هورمونی (مخصوصاً HCG)، اندازه فولیکول، تعداد آسپیراسیون، نژاد، مرحله تولیدمثلی، اندازه سوزن برای آسپیراسیون و شستشوی فولیکول آسپیره‌شده نیز مؤثرند (۲۲). به هرحال در این بررسی میزان دریافت اووسیت از فولیکولهای بزرگتر در فاز فولیکولار نسبت به فاز لوتئال موفقیت بیشتری را داشت و اووسیتهای در مرحله بلوغ به‌دست آمد. با توجه به فاصله دو آسپیراسیون در هر دو مرحله و استفاده از گونادوتروپین‌ها امکان دریافت تعداد قابل توجهی اووسیت با کسب تجربه و بهبود این روش می‌توان انتظار داشت.

References

1. Allen, W.R. and Rowson, L.E. Surgical and non surgical embryo transfer in horses. J. Reprod. Fert. Suppl. 23: 525-530, (1975).
2. Allen, W.R. and Pashen, R.L. Production of monozygotic (Identificcal twins) by embryonicromanipulation. J. Reprod. Fert. 71: 607, (1984).
3. Alm, H. and Torner, H. In vitro maturation of horse oocytes. Theriogenoloigy. 42: 345-349, (1994).
4. Bracher, V., Parlevliet, J. and Fazeli, A.R. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. Equine Vet. J. 15 (Suppl): 75, (1993).
5. Brinsko, S.P., Ball, B.A. and Ellington, J.E. In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. Theriogenology. 44: 461-469, (1995).
6. Bruck, I., Synnestvedt, B. and Grebe, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstmulated and FSH treated mares. Theriogenology. 47: 1157-1167, (1997).
7. Calleson, H., Greve, T. and Christenson, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. Theriogenology. 27: 217, (1987).
8. Choi, Y.H., Hochi, S., Braun, J. and Oguri, N. In vitro maturation of equine oocytes collected by aspiration and additional slicing of ovaries. Theriogenology. 39: 200, (1993).
9. Cook, N.L. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes: Aspects of technique and effect. Thesis. Fort collins. Co. Colorado State University, (1995).
10. Cook, N.L., Squires, E.L. and Jasko, D.J. Repeated transvaginal follicular aspiration in cyclic mares. Theriogenology. 39: 204, (1993).
11. Delcampo, M.R., Donoso, X., Parrish, J.J. and Ginther, O.J. Selection of follicles preculture oocytes evaluation and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. Theriogenology. 43: 1147-1153, (1995).
12. Douglas, R.H. Equine embryo transfer. In : "Curent thrapy in thriogenology" by D.A. Morrow. W.B. Saunders. London, pp: 70-73, (1986).
13. Gordon, I. Controlled reproduction in horses, deer and camelids. Oxford: Cambridge Press. pp: 139-160, (1997).
14. Hinrichs, K., Kenney, D.F. and Kenney, R.M. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. Theriogenology. 34: 107-112, (1990).
15. Invine, G.H.G., Sutton, P., Turner, J.E. and Mennik, P.E. Changes in mares maintaining or loosing their pregnancy. Eq. Vet. J. 23: 104., (1990)
16. McKinnon, A.O., squires, E.L., carnevale, E.M., Voss, J.L. and Seidel, G.E. Jr. Heterogenous and xenogenous fertilization of equine oocytes. Theriogenology. 29: 278, (1988).
17. McKinnon, A.O., Squires, E.L., Voss, J.L. and Cook, V.M. Equine embryo transfer compendium. Equine, 10: 343-355, (1988).
18. McKinnon, A.O. and Voss, J.L. Folliclogeneses and ovulation. Equine reproduction. Philadelphia: Lea and Febiger, pp: 161-171, (1993).
19. Palmer, E., Duchamp, G., Bezard, J., Magistrini, M., King, W.A., Bousquet, D. and Betteridge, K.J. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. J. Reprod. Fertil. Suppl. 35: 689-690, (1987).
20. Pieterse, M.C., Voc plam and Kruip Tham. Characteristics of bovine oesterous cycles during repeated transvaginal ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. Theriogenology, 35: 401, (1991).
21. Shabpareh, V., Squires, E.L. and Seidel, G.E. Method for collecting and maturing equine oocytes in vitro. Theriogenology. 40: 1167-1175, (1993).
22. Squires, E.L. and Cook, N.L. Transvaginal Aspiration. The Vet. Clin. of North American: Equine Practice. 12: 13-29, (1996).
23. Squires, E.L. and Seidel Jr.G.E. Collection and transfer of equine embryo. Anim. Reprod. Biotechnol. Lab. Bull. 8:48-53, (1997).
24. Vogelsang, M.M., Bondioli, K.R. and Massey, J.M. Commercial application of equine embryo transfer. Equine Vet. J. 3 (Suppl): 89, (1985).
25. Vogelsang, M.M., Kreider, J.L. and Bowen, M.J. Methods for collecting follicular oocytes from mares. Theriogenology. 29: 1007-1018, (1988).
26. Zhang, J.J., Boyle, M.S., Allen, W.R. and Gall, C. Recent studies on in vitro fertilization of in vitro matured horse oocytes. Equine Veterinary Journal Suppl. 8: 101-104, (1989).

Non surgical follicle aspiration at follicular and luteal phases in the mare

Ahmadi, M.R.[1], Javidpour, A.[1]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.*

The ability to collect oocytes directly from follicles of mares would allow either in vitro fertilization or in vivo fertilization in the recipient mare to be used as a technique for obtaining foals from older mares with poor reproductive histories. In this study, three mares were used to obtain oocyte using recto vaginal method follicles were obtained using 18 gauge needle and aspiration of 50ml syringe. Aspiration was repeated 36 times in two phases, follicular and luteal. There was no significant difference ($P>0.05$) between the number of follicles (10mm) in follicular phase (2.1 ± 0.8) compared to the luteal phase (2.5 ± 1.3). The aspirated vacum of fluid in the follicular phase (34.8 ± 10.2) was significantly different in comparison with the luteal phase (20.1 ± 10.5) ($P<0.05$). Number of oocytes obtained during follicular phase was more than these obtained in the luteal phase. Aspiration interval in the follicular phase was 14 or 15 days, but in the luteal phase it was 7 to 10 days. Generally, this study showed that the rectovaginal method is a safe and repeatable method for oocyte collection in mares.

Key words : Oocyte, Mare, Follicle, Oestrus.