مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۳، ۲۳۲ - ۲۲۷

تاثیر زمان جمع آوری تخمک از مجرای تخم بر تعداد، کیفیت و میزان لقاح آزمایشگاهی در خرگوش

محمد حسن‌متدین [۱*] فاطمه توده دهقان [۲] پرویز تاجیک [۳] زهرا زندیه [۳]

۱)بخش تحقیق و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج - ایران.
۲)بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج - ایران.
۳) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۵ اسفند ماه ۱۳۸۷)

چکیده

ارتقاء کیفیت و تولید تخمک جهت استفاده در تکنیک لقاح آزمایشگاهی از اهمیت بسیار زیادی برخوردارند. در این مطالعه تاثیر زمان تخمک‌گیری و فاصله تزریق HCG تا برداشت تخمک از مجاری تخم، بر روی تعداد، کیفیت و لقاح پذیری تخمک خرگوش بررسی گردید. بر این اساس ۶۲ سر خرگوش ماده بالغ، به طور تصادفی انتخاب و به هفت گروه تقسیم شدند. سو پراوولاسیون در آنها با تزریق PMSG (۵۰ iu/head) و HCG (۴۵iu/head) انجام گرفت. و اسپرم مورد نیاز برای لقاح آزمایشگاهی، از دو سر نر بالغ بوسیله مهبل مصنوعی تهیه شد. در مجموع ۴۱۲ تخمک از خرگوش‌ها بدست آمد (متوسط ۶/۶ تخمک / حیوان). میانگین تعداد تخمک در ۷ گروه به ترتیب ۱/۷±۷/۸ (۱)، ۲/۸±۵/۳ (۲)، ۲/۷±۵/۲ (۳)، ۲/۸±۷/۶ (۴)، ۲±۴/۳ (۵)، ۴±۷/۳ (۶) و ۷/۷±۱۸/۳ (۷) تخمک / حیوان محاسبه گردید. بیشترین و کمترین تعداد تخمک مربوط به گروه‌های ۷ و ۵ بود که جمع آوری تخمک در آن‌ها به ترتیب در ساعت‌های ۲۴-۱۹ و ۱۴-۹ که به فاصله ۳۰-۲۳ ساعت پس از تزریق HCG انجام شده بود ($p<0/01$). تعداد تخمک‌های گرید ۱ در ۷ گروه به ترتیب ۱۲/۹، ۸/۱، ۴۹/۳، ۲۶/۲، ۶۰، ۱۸/۲ و ۵۴/۸ درصد تعیین گردید و بیشترین اختلاف مربوط به گروه‌های اول، دوم و ششم نسبت به گروه‌های سوم، پنجم و هفتم و همچنین گروه چهارم با گروه هفتم ($p<0/001$) بود. در ۲۷ مورد لقاح آزمایشگاهی که انجام گردید، از ۲۲۳ تخمک تلقیح شده با اسپرم، ۳۱ درصد (۶۹ تخمک) لقاح یافتند که به ترتیب ۳۸/۵، ۱۵/۶، ۳۷/۶، ۱۱/۰، ۳۲/۰، ۴۲/۰ و ۱۰۰ درصد در بین هفت گروه مشاهده گردید. بیشترین اختلاف بین گروه هفتم با گروه‌های دوم و چهارم بود ($p<0/001$). نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌کنند، بهترین زمان تخمک‌گیری در خرگوش آزمایشگاهی نژاد دوچ، بین ساعت ۲۴-۱۹ و با فاصله زمانی ۳۰-۲۳ ساعت پس از تزریق HCG است که تخمک‌هایی با تعداد و لقاح پذیری بیشتری را در پی دارد.

واژه‌های کلیدی: خرگوش آزمایشگاهی، سو پراوولاسیون، لقاح آزمایشگاهی.

مقدمه

به کارگیری روش‌های ازدیاد تخمک گذاری، القاء تخمک گذاری، استحصال تخمک و اسپرم، ظرفیت دار کردن اسپرم، لقاح آزمایشگاهی و انتقال جنین از ابزارهای مهم تولید مثلی می‌باشند و با استفاده از آنها می‌توان کارهای بسیاری برای تولید آزمایشگاهی جنین از تخمک و اسپرم استحصال شده، یا از بلاستومرهای جدا شده از جنین (۳۴، ۱۵) و یا بواسطه تکنیک ریز تزریقی اسپرم در داخل سیتوپلاسم تخمک (۲۰) انجام داد. همچنین از این راهکارها می‌توان برای جایگزینی حیوانات مولد حذف شده، ایجاد بانک جنین، درمان ناباروری‌های انسانی و دامی، حفظ حیوانات در معرض انقراض (۴) تولید حیوانات ترانس ژنیک و حیواناتی با ویژگی‌های یکنواخت برای اهداف تحقیقاتی، استفاده کرد. فاصله تزریق هورمون HCG تا برداشت تخمک از مجرای تخم توسط محققین از ۱۲ تا ۱۹ ساعت ذکر شده (۳۵، ۲۹، ۲۶، ۲۵، ۱۴، ۱۰، ۲) ولی اشاره‌ای به موقع انجام کار که در چه ساعتی از روز عمل تخمک‌گیری انجام شده، نگردیده است این موضوعی است که ممکن است علاوه بر مدت فاصله تزریق هورمون تا برداشت تخمک، در نتیجه کار موثر باشد و تعداد متفاوتی تخمک با کارآیی و کیفیت مختلفی را باعث گردد. با توجه به اینکه در حال حاضر در بسیاری از مراکز تحقیقاتی و درمانی در سراسر دنیا از این تکنیک‌ها استفاده می‌شود لذا یافتن مواد یا روش‌هایی که تولید تخمک و یا کیفیت آنها را بهبود دهد و در صورت استفاده در تکنیک لقاح آزمایشگاهی، نتیجه بهتری را بدنبال داشته باشد، کار ارزشمندی محسوب می‌گردد. تعیین فاصله زمانی مناسب، بین تزریق هورمون HCG و شستشوی داخل مجاری تخم و همچنین مشخص کردن ساعت شستشوی داخل این مجاری که رویهمرفته بتوانند بیشترین تعداد تخمک با درجه خوب و با بیشترین درصد لقاح پذیری را به دنبال داشته باشند، اهداف مورد نظر این تحقیق را تشکیل می‌دادند.

مواد وروش کار

۱- گروه بندی حیوانات: تعداد ۶۲ سر خرگوش ماده بالغ آزمایشگاهی ۸-۶ ماهه نژاد دوچ از موسسه رازی و انستیتو پاستور تهیه و به طور تصادفی به هفت گروه به شرح جدول ۱ تقسیم شدند. حیوانات در دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد و نسبت نور به تاریکی ۱۰به ۱۴ ساعت نگهداری شدند و با غذای فشرده (pellet) ساخت موسسه رازی و آب تازه همواره در اختیار، تغذیه شدند.

۲- مواد و محیط‌های مورد استفاده: تمامی موادی که برای تهیه

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۴۶-۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶۱، نمابر: ۰۲۶۱-۴۵۵۴۶۵۸. Email: m.motedayen@rvsri.ir

محیط‌ها استفاده شد با گرید جنین (Embryo tested) بود و از شرکت‌های معتبر نظیر سیگما خریداری گردید. از محیط‌های T6، M2، DPBS و M16 برای فلاش، جمع آوری سلول‌ها، شستشو و رقیق کردن اسپرم و لقاح استفاده گردید. معمولا محیط‌های مورد استفاده از روز قبل تهیه وپس از تنظیم PH (در محدوده ۷/۴-۷/۲)، در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵درصد CO_2 قرار داده می‌شد و یکساعت قبل از شروع کار، به آنها سرم (FCS) به میزان ۱۰-۲درصد اضافه کرده و سپس قطره‌های ۱۰-۵میکرولیتری از این محیط‌ها درداخل پتری دیش گذاشته و برروی آن روغن شسته شده مینرال ریخته و در انکوباتور ۳۷درجه سانتیگراد و ۵درصد CO_2 قرار داده می‌شد.

۳- ازدیادتخمک گذاری و القاء تخمک گذاری: تعداد ۶۲ سر خرگوش ماده بالغ نژاد دوچ با هورمون‌های PMSG (۵۰IU/head) یک نوبت بصورت داخل عضلانی (im) و۷۳-۷۱ ساعت بعد HCG (۴۵IU/head) یک نوبت بصورت داخل وریدی (iv) تزریق شدند.

۴- اخذ اسپرم: در زمان اخذ اسپرم ابتدا نیم سی سی محیط M16 را با ۱۰درصد سرم جنین گاو غنی کرده و سپس بر روی صفحه گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شد. سپس با استفاده از مهبل مصنوعی، ۳۴ نوبت در روزهای مختلف از خرگوش‌های نر بالغ دوچ، اسپرم گرفته شد. فاصله دو نمونه گیری از خرگوش نر معمولا یک هفته بود و دو خرگوش نر که برای اسپرم‌گیری استفاده شد، اختلاف چندانی از نظر کیفیت اسپرم با یکدیگر نداشتند. نمونه‌ها پس از ارزیابی کلی، تعیین میزان تحرک و درصد زنده‌ها (با رنگ ائوزین-نگروزین) و شمارش (بالام نئوبار)، به داخل محیط M16 آماده ریخته شدند (در ده نوبت). سپس اسپرم‌ها با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵-۳ دقیقه سانتریفیوژ و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵درصد انکوبه تا زمان استفاده شدند.

۵- استحصال تخمک: هفت تا بیست و نه ساعت پس از تزریق HCG، خرگوش‌های ماده پس از تزریق مخلوط کتامین و زایلازین بیهوش و سپس با تزریق هوا به سیاهرگ کناری گوش معدوم شدند سپس محوطه شکمی باز و لوله‌های رحمی آنها از اتصالات اطراف آزاد و سپس از محل اتصال به شاخ رحم قیچی گردید و در داخل محیط شستشو (DPBS یا PBS) ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از شستشو با استفاده از سوزن‌های آماده شده، داخل مجرای لوله‌های رحمی با DPBS شستشو گردید. پس از انجام شستشو، تخمک‌ها در زیر میکروسکوپ شناسایی و با کمک پیپت پاستور کشیده شده متصل به لوله رابط دهانی (mouth piece) از داخل محیط جمع آوری و به قطره‌های جمع آوری تخمک که از قبل با محیط M16 آماده شده بود منتقل و درجه بندی شدند و سپس پتری دیش حاوی قطره‌های محتوی تخمک‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵درصد CO_2 تا موقع استفاده برای لقاح منتقل گردید.

۶- لقاح آزمایشگاهی (IVF): در بیست و هفت مورد ۲۲۳ اووسیت گرید A و B برای انجام لقاح آزمایشگاهی به داخل ۶۱ قطره لقاح محیط M16 و BO، بطور متوسط ۳/۷ تخمک / قطره (دامنه ۱۲-۱ تخمک) منتقل گردید. محیط‌های لقاح از نظر pH در محدوده ۷/۴-۷/۲ تنظیم شده و با ۱۰ درصد FCS غنی شده بود. اسپرم از نمونه تهیه شده که انکوبه شده بود استفاده گردید و در هر قطره ۱۰-۵ میکرولیتر که حاوی $10^6 \times 3-1$ اسپرم بود به هر قطره لقاح اضافه گردید. صبح روز بعد تخمک‌ها در زیر میکروسکوپ رویت و به قطره‌های جدید منتقل گردید. تخمک‌ها تا ۴۸ ساعت پس از مجاورت با اسپرم در زیر میکروسکوپ مشاهده و نتایج بدست آمده ثبت گردید.

جدول۱- گروه‌بندی حیوانات بر اساس ساعت برداشت تخمک و فاصله تزریق HCG تا زمان برداشت تخمک از مجاری تخم.

گروه	تعداد حیوان (سر)	فاصله تزریق HCG تا زمان جمع آوری تخمک (ساعت)	ساعت جمع آوری تخمک
۱	۴	۹-۱۵/۵۹	۹-۱۳/۵۹
۲	۷	۹-۱۵/۵۹	۱۹-۲۴
۳	۲۶	۱۶-۲۲/۵۹	۹-۱۳/۵۹
۴	۸	۱۶-۲۲/۵۹	۱۴-۱۸/۵۹
۵	۷	۲۳-۳۰	۹-۱۳/۵۹
۶	۶	۲۳-۳۰	۱۴-۱۸/۵۹
۷	۴	۲۳-۳۰	۱۹-۲۴

تجزیه تحلیل آماری: برای مقایسه میانگین تخمک‌های بدست آمده در هرگروه و همچنین مقایسه نسبت درجه تخمکها و میزان لقاح تخمک در بین گروه‌ها با همدیگر از آزمون تی استیودنت استفاده گردید.

نتایج

ازدیاد و استحصال تخمک: تعداد ۴۱۲ تخمک از ۶۲ حیوان بدست آمد که بطور متوسط ۶/۶ تخمک/ سر حیوان (دامنه ۲۸-۲ تخمک) محاسبه گردید که بترتیب ۳۷/۹، ۴۰، ۱۹/۴ و ۲/۷ درصد به عنوان گرید A، B، C و D تقسیم‌بندی شدند (۱۷، ۱۱). تخمک‌های بدست آمده از مجرای تخم خرگوش‌ها در هفت گروه آزمایش به ترتیب ۷/۸±۱/۷، ۵/۳±۲/۸، ۵/۲±۲/۷، ۷/۶±۲/۸، ۴/۳±۲، ۷/۳±۴ و ۱۸/۳±۷/۷ تخمک/ حیوان می‌باشد. بنابراین گروه هفتم که شستشوی داخل لوله‌های رحمی در ساعات شب و با بیشترین فاصله از تزریق HCG انجام گرفت بیشترین تعداد تخمک به ازاء هر سر حیوان، ۱۸/۳، و زمانی که شستشو در نیمه‌های اول روز و با بیشترین فاصله از تزریق HCG انجام گرفت (گروه پنجم) کمترین تعداد تخمک/ سر حیوان، ۴/۳ بدست آمد. به طور کلی تعداد ۱۸/۳ تخمک بدست آمده نسبت به میانگین بقیه گروه‌ها، ۵/۸۴ تخمک/ سر حیوان، اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p<0/01$). تعداد تخمک‌های گرید A در ۷ گروه ذکر شده به ترتیب ۱۲/۹، ۸/۱، ۴۹/۳، ۲۶/۲، ۶۰، ۱۸/۲ و ۵۴/۸ درصد تعیین شد (جدول ۲). گروه‌های اول، دوم و ششم نسبت به گروه‌های سوم، پنجم و هفتم و همچنین گروه چهارم با گروه هفتم ($p<0/001$) و گروه چهارم با گروه‌های دوم، سوم و پنجم اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($p<0/05$).

اخذ اسپرم: درمجموع ۱۰/۹cc از دو سر خرگوش نر بالغ در ۳۴ نوبت (به طور متوسط ۰/۳۲cc/ نوبت) اسپرم بدست آمد. این اسپرم‌ها به طور متوسط

جدول ۲: تعداد و درجه تخمک‌های بدست آمده از هفت گروه حیوانات تحت آزمایش. توضیح: تعداد تخمک: گروه هفتم با گروه سوم ($p<۰/۰۰۱$)، با گروه‌های دوم، چهارم، پنجم و ششم ($p<۰/۰۱$)، و گروه اول ($p<۰/۰۵$) و همچنین گروه پنجم با گروه‌های اول و چهارم ($p<۰/۰۵$) اختلاف معنی دار دارند. درجه تخمک: گروه‌های اول، دوم و ششم نسبت به گروه‌های سوم، پنجم و هفتم و همچنین گروه چهارم با گروه هفتم ($p<۰/۰۰۱$) و گروه چهارم با گروه‌های دوم، سوم و پنجم ($p<۰/۰۵$) اختلاف معنی دار نشان دادند.

گروه حیوانات	تعداد تخمک بدست آمده	تعداد حیوان (سر)	میانگین تعداد تخمک/حیوان	درجه‌بندی تخمک‌ها							
				B		A		C		D	
				تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	۳۱	۴	۷/۸±۱/۷	۴	۱۲/۹	۹	۲۹/۰	۱۸	۵۸/۱	-	-
۲	۳۷	۷	۵/۳±۲/۸	۳	۸/۱	۳۴	۹۱/۹	-	-	-	-
۳	۱۳۶	۲۶	۵/۲±۲/۷	۶۷	۴۹/۳	۳۹	۲۸/۷	۲۴	۱۷/۶	۶	۴/۴
۴	۶۱	۸	۷/۶±۲/۸	۱۶	۲۶/۲	۳۸	۶۲/۳	۷	۱۱/۵	-	-
۵	۳۰	۷	۴/۳±۲	۱۸	۶۰/۰	۵	۱۶/۷	۲	۶/۶	۵	۱۶/۷
۶	۴۴	۶	۷/۳±۴	۸	۱۸/۲	۲۰	۴۵/۵	۱۶	۳۶/۳	-	-
۷	۷۳	۴	۱۸/۳±۷/۷	۴۰	۵۴/۸	۲۷	۳۷/۰	۶	۸/۲	-	-
جمع	۴۱۲	۶۲	-	۱۵۶	۳۷/۹	۱۷۲	۴۱/۷	۷۳	۱۷/۷	۱۱	۲/۷

جدول ۳- نتایج حاصل از لقاح آزمایشگاهی. توضیح: گروه هفتم با گروه‌های دوم و چهارم ($p<۰/۰۰۱$)، پنجم ($p<۰/۰۱$)، اول و ششم ($p<۰/۰۵$) اختلاف معنی دار دارد. گروه ششم با گروه‌های دوم و چهارم، گروه اول با چهارم، و گروه دوم با سوم اختلاف معنی دار دارند ($p<۰/۰۵$).

گروه حیوانات	تعداد تخمک	تخمک‌های لقاح یافته		رشد سلول‌های لقاح یافته (تا ۴۸ ساعت بعد)							
		تعداد	درصد	2PN		تک سلولی		دو سلولی		۳-۴ سلولی		۶-۸ سلولی	
				تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	۱۳	۵	۳۸/۵	۳	۶۰/۰	-	-	۱	۲۰/۰	۱	۲۰/۰	-	-
۲	۳۲	۵	۱۵/۶	۲	۴۰/۰	-	-	-	-	۱	۲۰/۰	۲	۴۰/۰
۳	۹۳	۳۵	۳۷/۶	۹	۲۵/۷	۱۱	۳۱/۴	۵	۱۴/۳	۲	۵/۷	۸	۲۲/۹
۴	۴۵	۵	۱۱/۰	۳	۶۰/۰	-	-	۱	۲۰/۰	۱	۲۰/۰	-	-
۵	۱۵	۵	۳۲/۰	۴	۸۰/۰	-	-	۱	۲۰/۰	-	-	-	-
۶	۱۹	۸	۴۲/۱	۸	۱۰۰/۰	-	-	-	-	-	-	-	-
۷	۶	۶	۱۰۰/۰	-	-	-	-	۴	۶۶/۶	۱	۱۶/۷	۱	۱۶/۷
جمع	۲۲۳	۶۹	۳۱/۰	۲۹	۴۱/۹	۱۱	۱۶/۰	۱۲	۱۷/۴	۶	۸/۷	۱۱	۱۶/۰

۹۴/۲ درصد (۷۰ - ۹۷ درصد) زنده و ۸۷ درصد (۶۵-۹۴ درصد) تحرک داشتند و غلظت آنها ۵۲۰ میلیون/ سی سی شمارش گردید.

لقاح آزمایشگاهی: در بیست و هفت مورد لقاح آزمایشگاهی که انجام گردید، از تعداد ۲۲۳ تخمک تلقیح شده با اسپرم، ۳۱ درصد (۶۹ عدد) آنها لقاح یافتند که به ترتیب ۳۸/۵، ۱۵/۶، ۳۷/۶، ۱۱/۰، ۳۲/۰، ۴۲/۰ و ۱۰۰ درصد در بین گروه‌های یک تا هفت محاسبه گردید که بیشترین اختلاف بین گروه هفتم با گروه‌های دوم و چهارم بود ($p<۰/۰۰۱$) (جدول ۳).

بحث

به طور کلی از ۶۲ سر خرگوش بالغ نژاد دوچ با استفاده از PMSG و HCG تعداد ۴۱۲ تخمک بدست آمد که بطور متوسط ۶/۶ تخمک / حیوان (دامنه ۲۸-۲ تخمک) محاسبه گردید که بترتیب ۳۷/۹، ۴۱/۷، ۱۷/۷ و ۲/۷ درصد به عنوان گرید A، B، C و D درجه بندی شدند (۱۱،۱۷) این تعداد با متوسط تعداد تخمک بدست آمده با استفاده از PMSG که توسط دیگر محققان (۲۳، ۲۲، ۲۰) به طور میانگین، ۱۷/۱ تخمک/ حیوان (۱۹/۲-۱۴/۵ تخمک) گزارش شده اختلاف دارد. دلائل این اختلاف را چنانچه ذکر کرده‌اند عموما می‌توان به محیط، سیستم مدیریتی، نوع گونادوتروپین، تعداد تزریقات، روش تحریک تخمک گذاری، سن حیوان، مقدار دارو (۱۷) تاثیر نور، دما و سایر شرایط محیطی و تغذیه‌ای (۱۹) مربوط دانست. با این حال با در نظر گرفتن افزایش زمان بین تزریق HCG و جمع آوری تخمک در ساعتهای ۱۹ تا ۲۳ شب که برای گروه هفتم انجام گردید، میانگین تخمک‌های بدست آمده به ازاء هرسر حیوان به رقم ۱۸/۳ بالغ گردید که با میانگین تعداد تخمکهای بدست آمده در دیگر گروه‌ها که ۵/۸۴ تخمک/ سر حیوان می باشد، اختلاف معنی دار نشان داد ($p<۰/۰۱$). این اختلاف ممکن است بدلیل زمان بیشتر برای رشد فولیکول‌های تخمدانی و همچنین وضعیت هورمونی مناسب تر حیوان و کاهش استرس باشد. فاصله تزریق HCG تا برداشت تخمک توسط محققین از ۱۲ تا ۱۹ ساعت ذکر شده (۳۶، ۲۹، ۲۶، ۲۵، ۱۴، ۱۰، ۲) و برای بدست آوردن تخمک‌های بدون سلول‌های کومولوس این فاصله نباید کمتر از ۱۵-۱۴ ساعت باشد (۹)، با این حال در این تحقیق تخمک‌های همراه سلول‌های کومولوس تا ۱۸ ساعت پس از تزریق HCG نیز مشاهده گردید. افزایش مقدار هورمون باعث افزایش پرخونی دستگاه تناسلی و تعداد فولیکول‌های هموراژیک و همچنین افزایش سرعت انتقال اووسیت از لوله رحمی و به دام افتادن

اووسیت در حفره فولیکول میگردد و در نتیجه باعث کاهش تعداد اووسیت قابل برداشت می‌شود که نتیجه بدست آمده با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد (۳۰، ۱۷، ۱۵). از دو سر خرگوش نر بالغ در ۳۴ نوبت با استفاده از مهبل مصنوعی اسپرم گرفته شد که به طور متوسط ۹۴/۲ درصد (۷۰ - ۹۷ درصد) از اسپرم‌ها زنده و ۸۷ درصد (۶۵-۹۴درصد) تحرک داشتند. درمجموع ۱۰/۹cc اسپرم بدست آمدکه به طور متوسط ۰/۳۲cc/ نوبت(۰/۲- ۰/۵cc) محاسبه شد. این مقدار با مقادیر ۰/۲-۰/۶cc که منابع علمی برای حجم انزال خرگوش ذکر کرده‌اند همخوانی دارد (۲۴، ۱۹). همچنین تعداد اسپرم شمارش شده ۵۲×۱۰^{۷} در هر میلی لیتر بود که با مقادیر ذکرشده درمنابع، $۱۰^{۸}\times$ ۵-۱/۵ (۱۹)، مطابقت نزدیک دارد. برای انجام لقاح آزمایشگاهی تعداد ۲۲۳ تخمک گرید A و B به داخل ۶۱ قطره، بطور متوسط ۳/۷ تخمک / قطره (دامنه ۱۲-۱ تخمک) منتقل گردید که ۳۱ درصد آنها لقاح پیدا کردند و تا ۴۸ ساعت بعد، تخمک‌های لقاح یافته ۱۷/۴ درصد به مرحله دو سلولی، ۸/۷ درصد به مرحله ۴-۳ سلولی، ۱۶درصد به مرحله ۸-۶ سلولی رسیدند و ۴۱/۹ درصد درمرحله 2PN و ۱۶درصد نیز درمرحله تک سلولی باقی ماندند. منابع مختلف میزان لقاح آزمایشگاهی را از صفر تا ۱۰۰ درصد ذکرکرده اند و در بیست مورد از کارهای تحقیقاتی انجام شده در مورد لقاح آزمایشگاهی به طور متوسط کارآئی لقاح ۶۰ درصد بوده که با نرخ بدست آمده در این کار اختلاف معنی‌داری دارند ($p<۰/۰۵$) (۳۵، ۳۲، ۲۶، ۸، ۶، ۵، ۱). این اختلاف را می توان به میزان ظرفیت پذیربودن اسپرم‌های استفاده شده(۷)، تاثیر دما و نور اضافی درموقع انجام کار(۳۱، ۱۳، ۱۲، ۳) زیاد شدن فاصله زمانی بین معدوم کردن حیوان و فلاش اویداکت‌ها (۲)، ترکیبات محیط کشت(۲۵، ۲۱)، میزان لقاح پذیربودن تخمک‌ها(۴)، تراکم تخمک در قطره‌های لقاح (۳۳، ۲۸، ۲۷، ۱۸، ۱۶) تجربه کاری و تجهیزات آزمایشگاهی ارتباط داد. براساس نتایج بدست آمده چنین به نظر می‌رسد بهترین زمان تخمک گیری در خرگوش آزمایشگاهی نژاد دوچ بین ساعت ۲۴-۱۹ و با فاصله زمانی ۳۰-۲۳ ساعت پس از تزریق HCG است که می‌توان تخمک‌هایی با تعداد و درجه مطلوب و همچنین با بیشترین توانایی لقاح بدست آورد.

References

1. Akruk, S. R., Farooqui, W. L., Srivastava, P. N. (2005) Release of acrosomal enzymes following in vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. Gamete Res. 2: 1-13.
2. Akruk, S. R., Humphreys, W. J., Williams, W. L. (1979) In vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. Differentiation. 13: 125-31.
3. Barlow, P., Puissant, F., Van der Zwalmen, P., Vandromme, J., Trigaux, P., Leroy F. (1992) In vitro fertilization, development and implantation after exposure of mature mouse oocyte to visible light. Mol. Reprod. Dev. 33: 297-302.
4. Bavister, B. D. (2002) Early history of in vitro fertilization. Reproduction. 124: 181-196.
5. Benjamin, G., Brackett, Oliphant, G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12: 260-274.
6. Brackett, B. C., Bousquet, D., Dressel, M. A. (1982) In vitro sperm capacitation and in vitro fertilization with normal development in the rabbit. J. Androl. 3: 402-411.
7. Brackett, B. G., Hall, J. L., Oh, Y. K. (1978) In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal and ejaculated rabbit spermatozoa. Fertil. Steril. 29: 571-582.
8. Chang, M. C. (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature. 184: 466-467.
9. Chen, D. Y., Wen, D. C., Zhang, Y. P., Sun, Q. Y., Han, Z. M., Liu, Z. H., Shi, P., Li, J. S., Xiangyu, J. G., Lian, L., Kou, Z. H., Wu, Y. Q., Chen, Y. C., Wang, P. Y., Zhang, H. M. (2002) Interspecies implantation and mitochondria fate of Panda-Rabbit cloned embryos. Biol. Reprod. 6: 637-642.
10. Dinnyés, A., Dai, Y., Barber, M., Liu, L., Xu, J., Zhou, P., Yang, X. (2001) Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: Effect of activation treatment and donor cell preparation. Biol. Reprod. 64: 257-263.
11. Gardner, D. A., Weissman, A., Howles, C. M., Shoham, Z. (2001) Text book of assisted reproductive techniques- Laboratory and clinical perspectives. (1st ed.) Martin Dunitz Ltd. pp. 99-106, 223-232.

12. Hegele-Hartung, C., Schumacher, A., Fischer, B. (1988) Ultra structure of preimplantation rabbit embryos exposed to visible light and room temperature. Anat. Embryol. (Berl). 178: 229-241.
13. Hegele-Hartung, C., Schumacher, A., Fischer, B. (1991) Effects of visible light and room temperature on the ultra structure of preimplantation rabbit embryos: a time course study. Anat. Embryol (Berl). 183: 559-571.
14. Jin, D. I., Kim, D. K., Im, K. S., Choi, W. S. (2000) Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown in vitro from single-cell zygotes. Theriogenology. 54: 1109-1116.
15. Ju, J. C., Chang, Y. C., Huang, W. T., Tang, P. C., Cheng, S. P. (2001) Superovulation and transplantation of Demi-and aggregated embryos in rabbits. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 14: 455-461.
16. Khurana, N. K., Niemann, H. (2000) Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. Theriogenology. 54: 741-56.
17. Krusche, C. A., Herrler, A., Classen-Linke, I., Hegele-Hartung, C., Rango, U. V., Beier, H. M. (2000) Modulation of endometrial transformation in gonadotrophin-stimulated and unstimulated pseudo pregnant rabbits: studies with the progesterone receptor antagonist, onapristone. Mol. Hum. Reprod. 6: 726-734.
18. Lane, M., Gardner, D. K. (1992) Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. Hum. Reprod. 7 : 558-562.
19. Lebas, F., Coudert, P., Derochambeau, H., Thébault, R. G. (1997) The Rabbit - Husbandry, Health and Production, FAO (Food and Agriculture Organization of the united nations), Chapter 3. Reproduction.
20. Liu, J. L., Kusakabe, H., Chang, C. C., Suzuki, H., Schmidt, D. W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C. L., Tian, X. C., Yanagimachi, R., Yang, X. (2004) Freeze-Dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. Biol. Reprod. 70:1776-1781.
21. Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Sofikitis, N., Kallipolitis, G., Milingos, S., Makris, N., Michalas, S. (2000) Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development, and implantation. Annals New York Academy of Sci. 900:325-335.
22. Mehaisen, G. M., Vicente, J. S., Lavara, R., Viudes-de-Castro, M. P. (2005) Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post - vitrification in two selected lines of rabbit does. Anim. Reprod. Sci. 90: 175-184.
23. Mehaisen, G. M., Viudes-de-Castro, M. P., Vicente, J. S., Lavara, R. (2006) In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. Theriogenology. 65: 1279-1291.
24. Motedayen, M. H., Todehdehghan, F., Tajik, P. (2007) Comparative evaluation of pregnancy rates in Dutch laboratory rabbit after insemination and natural breeding. J. Vet. Res. 62: 63-65.
25. Ogawa, S., Satoh, K., Hashimoto, H. (1971) In vitro culture of rabbit ova from the single cell to the blastocysts stage. Nature. 233:8: 422-423.
26. Ogawa, S., Satoh, K., Hamada, M., Hashimoto, H. (1972) In vitro culture of rabbit ova fertilized by epididymal sperms in chemically defined media. Nature. 238: 270-271.
27. O'Neill, C. (1998) Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. Biol. Reprod. 58: 1303-1309.
28. Paria, B. C., Dey, S. K. (1990) Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proceedings National Academy of Sci. 87: 4756-4760.
29. Piotrowska, K., Modlinski, J. A., Kossakowski-Korvin, M., Karasiewicz, J. (2000) Effects of preactivation of ooplasts or synchronization of blastomere nuclei in G1 on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos. Biol. Reprod. 63: 677-682.
30. Schmidt, P. M., Holifield, V. M., Lin, X., Wildt, D. E.

(1992) Induced ovulation and adequate embryo recoveries in new Zealand white rabbits treated with a low PMSG/HCG dose or single, daily injections of FSH-P. Theriogenology. 37: 293.

31. Schumacher, A., Fischer, B. (1988) Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. J Reprod. Fertil. 84: 197-204.
32. Soupart, P. (1966) Effects of human chorionic gonadotrophin on capacitation of rabbit spermatozoa. Nature. 212: 408-410.
33. Stojanov, T., Alechna, S., O'Neill, C. (1999) In-vitro fertilization and culture of mouse embryos in vitro significantly retards the onset of insulin-like growth factor-II expression from the zygotic genome. Mole. Hum. Reprod. 5: 116-124.
34. Tao, T., Niemann, H. (2000) Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4, 8 and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. Hum. Reprod. 15: 881-889.
35. Yamamoto, Y., shimamoto, K., Sofikitis, N., Miagava, I. (1999) Effects of hypercholesterolaemia on leydig and sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. Hum. Reprod. 14:1516-1521.
36. Zeng, S. M., Zhu, S. E., Wang, Y. S., Chen, X. J., Zhang, Z. C., Chen, Y. F. (1999) An efficient method for in vitro fertilization in rabbits. Anim. Biotech. 10: 15-23.

J. Vet. Res. 64, 3:227-232, 2009

TIME EFFECT OF OOCYTE COLLECTION FROM OVIDUCT ON NUMBER AND QUALITY OF OOCYTE AND ITS EFFECT ON IN VITRO FERTILIZATION IN RABBIT

Motedayen, M.H.[1]*, Toodehdejghan, F.[2], Tajik, P.[3], Zandieh, Z.[3]

[1]*Department of Bacterial Vaccine, Razi Vaccine and Research Institute, Karaj-Iran.*

[2]*Department of Venomous Animals and Antivenom Production, Razi Vaccine and Research Institute, Karaj-Iran.*

[3]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 2 May 2008 , Accepted 6 March 2009)

Abstract:

Quality and quantity of ovum are major determinants in invitro fertilization. The aim of the present study was to determine effect of the time of oocyte collection and also distance of HCG injection to oviduct flushing on the quantity, quality and fertilizing ability of rabbit oocyte. Accordingly, sixty two adult female rabbit selected and randomly allocated to seven groups. The rabbits were superovulated with PMSG (50 IU/head) followed by HCG (45 IU/head). Semen specimens were collected from two adult fertile male bucks using artificial vagina. Results showed, superovulation of 62 does yielded 412 oocytes (average 6. 6 oocyte/rabbit) and mean 7. 8±1. 7, 5. 3±2. 8, 5. 2±2. 7, 7. 6±2. 8, 4. 3±2, 7. 3±4 and 18. 3±7. 7 oocyte/animal for seven groups respectively. So, when flushing done after 23-30 hours of HCG injection and between hours of 19-24 of day, maximum oocyte were collected and in contrast the oocytes were minimum when flushing performed between hours of 9-14 of day at the same period, mean 18. 3 in contrast 4. 3 oocyte/rabbit respectively, this difference was significant ($p<0. 01$). In 7 groups value of grade A oocyte were 12. 9, 8. 1, 49. 3, 26. 2, 60. 0, 18. 2 and 54. 8 percent respectively, so the difference of the first, second and sixth groups with the third, fifth and seventh groups and also forth with seventh group were high significant ($p<0. 001$). From 223 oocytes were used for 27 times IVF experiments, %31 (n=69) of them were fertilized, so this value for 7 groups were 38. 5, 15. 6, 37. 6, 11. 0, 32. 0, 42. 0 and 100. 0 percent, respectively, and maximum significant difference was between seventh group with second and forth groups ($p<0. 001$). Results of this study proposed that the best time for oocyte collection is hours between 19-24 of day, together with 23-30 hours after HCG injection, which produce maximum number, and fertilizable oocyte in Dutch laboratory rabbit.

Key words: rabbit, superovulation, in vitro fertilization.

***Corresponding author's email: m. motedayen@rvsri. ir, Tel: 0261-4570038-46, Fax: 0261-4554658**
09123618289