

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Αναρρόφηση ωοθυλακίων σε νεαρές αμνάδες:
μελέτη της ποιότητας των συλλεγόμενων ωαρίων
και της αναπαραγωγικής ικανότητάς τους**

ΕΙΡΗΝΗ ΒΑΛΑΣΗ

Κτηνίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής
του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρδίτσα 2006

αρ 5100/1



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5100/1
Ημερ. Εισ.: 06-11-2006
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
636.308 981 1
ΒΑΛ



*Στον αδερφό μου
Γιώργο*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βελτίωση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, οι οποίες εφαρμόζονται συστηματικά στα παραγωγικά ζώα τα τελευταία τριάντα περίπου χρόνια, αποτελεί ακόμη αντικείμενο συστηματικής έρευνας. Οι παράμετροι που συντηρούν αμείωτο το διεθνές ερευνητικό ενδιαφέρον είναι η παραλλακτικότητα της ανταπόκρισης των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων, η επίδραση της ηλικίας της δότριας ωαρίων στην ικανότητα ανάπτυξης των συλλεγόμενων ωαρίων και η ελλιπής κατανόηση του μηχανισμού ωρίμανσης του ωαρίου. Οι σύγχρονες αντιλήψεις για τη διαχείριση των αγροτικών ζώων επιβάλλουν οι εφαρμοζόμενες μέθοδοι να αποδίδουν υψηλά ποσοστά παραγωγής εμβρύων δίχως όμως να επηρεάζουν τη φυσιολογική αναπαραγωγική ικανότητα και την ευζωία της δότριας.

Χρησιμοποιώντας ως μοντέλο αμνάδες Καραγκούνικης φυλής, η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε με στόχο τη μελέτη:

- (1) της φυσιολογικής ανάπτυξης των ωοθυλακίων σε διάφορες ηλικίες (Κεφάλαιο II),
- (2) της ανταπόκρισης των ωοθηκών μετά από μία ή επανειλημμένες ορμονικές αγωγές και του ποσοστού συλλογής ωαρίων μετά από λαπαροσκοπική αναρρόφηση ωοθυλακίων σε διάφορες ηλικίες (Κεφάλαιο II),
- (3) της συνεισφοράς της δόσης της γοναδοτροπίνης στην ανταπόκριση των ωοθηκών (Κεφάλαιο II),
- (4) της ικανότητας ωρίμανσης *in vitro* των συλλεγόμενων ωαρίων από μία ή επανειλημμένες αναρροφήσεις ωοθυλακίων (Κεφάλαιο II),
- (5) της πιθανής διαφοροποίησης των επιδράσεων της ορμονικής αγωγής και της αναρρόφησης των ωοθυλακίων στην ενήβωση, στη μυοσκελετική ανάπτυξη και στη μελλοντική αναπαραγωγική ικανότητα των δοτριών ωαρίων που γεννήθηκαν χειμώνα ή φθινόπωρο (Κεφάλαιο III) και
- (6) της πιθανότητας πρόβλεψης των αμνάδων που ανταποκρίνονται καλά στην ορμονική αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων με βάση τη συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β στον ορό του αίματος σε διάφορα στάδια της αγωγής (Κεφάλαιο IV).

Τα αποτελέσματα της μελέτης των παραπάνω παραγόντων καταδεικνύουν ότι:

- (1) η φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων αμνάδων Καραγκούνικης φυλής δε διαφέρει από την αντίστοιχη άλλων φυλών,
- (2) η ανταπόκριση των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων εφαρμόζοντας την ίδια αγωγή με γοναδοτροπίνες μειώνεται με την πάροδο

της ηλικίας των αμνάδων. Όμως, όταν η ορμονική αγωγή προσαρμόζεται στο σωματικό βάρος της κάθε αμνάδας η ανταπόκριση αυτή παραμένει σχετικά σταθερή ανεξάρτητα από την ηλικία,

(3) ο αριθμός και η ποιότητα των συλλεγόμενων ωαρίων παρουσιάζει σαφή βελτίωση εάν η δόση της γοναδοτροπίνης που χορηγείται προσαρμοστεί στο σωματικό βάρος της κάθε αμνάδας,

(4) τα ωάρια που συλλέγονται από αμνάδες ηλικίας 3 και 4 μηνών δεν παρουσιάζουν ικανότητα *in vitro* ωρίμανσης. Στις περιπτώσεις όμως που σε αμνάδες έχει προηγηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων σε νεαρότερη ηλικία, τα ωάρια που συλλέγονται από αυτές παρουσιάζουν ικανότητα *in vitro* ωρίμανσης και στις προαναφερθείσες ηλικίες. Οι επανειλημμένες ανά μήνα αναρροφήσεις ωοθυλακίων στο ίδιο ζώο δεν επηρεάζουν την ικανότητα ωρίμανσης των ωαρίων,

(5) η αναρρόφηση των ωοθυλακίων δεν επηρεάζει την ενήβωση, τη μυοσκελετική ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα των αμνάδων που έχουν γεννηθεί σε διαφορετικές εποχές και

(6) ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης-17β στον ορό του αίματος 12 ώρες πριν τη διενέργεια της αναρρόφησης των ωοθυλακίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη των αμνάδων που δεν ανταποκρίνονται καλά στην ορμονική αγωγή. Ο πρώιμος εντοπισμός των αμνάδων που δεν ανταποκρίνονται καθόλου σε αυτή μπορεί να επιτευχθεί μετά από προσδιορισμό της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης-17β σε δείγμα που συλλέγεται τουλάχιστον 12 ώρες μετά την έναρξη της ορμονικής αγωγής.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ.Σ. Αμοιρίδης, Επίκουρος Καθηγητής	Επιβλέπων
Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	
Γ.Χ. Φθενάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	
Ε. Βαϊνάς, Τακτικός Ερευνητής	Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης	

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φ. Σαράτσης, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Κ. Μπόσκος, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Η. Κυριαζάκης, Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ι. Μενεγάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Λ. Λεοντίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Γ.Χ. Φθενάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Γ.Σ. Αμοιρίδης, Επίκουρος Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**Follicular aspiration in ewe-lambs:
quality assessment of collected oocytes and
evaluation of the reproductive performance
of the donors**

IRENE VALASI

DVM

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**

Work carried out at the Department of Obstetrics and Reproduction
of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Thessaly

Karditsa, Greece 2006

ABSTRACT

In recent years the accelerated genetic gain in farm animals triggered a considerable interest in using juvenile animals as oocyte donors for embryo production. To date, the variability of ovarian response to stimulatory regimes, the effect of maternal age on oocyte developmental competence and the incomplete understanding of the meiotic control mechanisms maintain an international research interest. Current concepts for the manipulations of farm animals suggest that beyond the fulfillment of the primary scope – which in this case is the collection of oocytes of good quality from ewe lambs – the welfare and the future reproductive performance of the donors should remain unaffected.

Using as a model lambs of Karagouniko breed, the present thesis was mainly focused on the study of:

- (1) the normal follicular development at particular ages in Karagouniko ewe-lambs (Chapter II),
- (2) the ovarian response and oocyte recovery rate after single or repeated laparoscopic follicular aspiration (OPU) at different ages (Chapter II),
- (3) the modification of the ovarian stimulatory protocols (Chapter II)
- (4) the meiotic competence of oocytes collected after single or repeated OPU (Chapter II),
- (5) any possible dissociation of the effects of follicular aspiration and ovarian stimulation in winter- or autumn-born lambs on their onset of puberty, body growth and future reproductive performance (Chapter III) and
- (6) the feasibility to predict the follicular development based on oestradiol-17 β concentration (Chapter IV).

The results indicate that:

- (1) normal follicular development of Karagouniko lambs does not substantially differ from that of other breeds,
- (2) follicular development after ovarian stimulation using fixed FSH dose decreases with the age of donor-lamb. However, ovarian response is relatively stable when the FSH dose is adjusted to the body weight of lambs, irrespectively to the lambs' age,
- (3) adjusting the administered gonadotrophin dose to lamb's body weight, the number and the quality of collected oocytes can be much improved,
- (4) at the 3rd and 4th month of age the collected oocytes appear to be incapable for in vitro maturation. This did not stand true when an additional OPU preceded the one

performed at the aforementioned ages. The repeatedly performed OPU do not affect the meiotic competence of collected oocytes,

(5) both the hormonal treatments and the OPU technique – applied even consecutively- do not affect the onset of puberty, the body growth and the reproductive activity irrespectively of the season of birth and that

(6) assessment of oestradiol-17 β concentration 12 hours before OPU is a safe criterion to predict good oocyte donor-lambs, although poor donors can be precluded as early as 12 hours after the start of the stimulatory treatment.

ADVISORY COMMITTEE

Assistant professor G.S. Amiridis	Supervisor
Department of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly	
Associate professor G.C. Fthenakis	Member of the advisory committee
Department of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly	
Researcher E. Vainas	Member of the advisory committee
Veterinary Research Institute, Thessaloniki	

EXAMINATION BOARD

Professor Ph. Saratsis	School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Professor C. Boscós	School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Professor I. Kyriazakis	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Associate professor I. Menegatos	Agricultural University of Athens
Associate professor L. Leontides	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Associate professor G.C. Fthenakis	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Assistant professor G.S. Amiridis	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ – ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ADVISORY COMMITTEE – EXAMINATION BOARD	8
Κατάλογος συντομογραφιών.....	12
Κατάλογος πινάκων - διαγραμμάτων - εικόνων.....	14
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Εισαγωγή.....	19
1.1 Ιστορική αναδρομή	20
1.2 Ωογένεση-Ωοθυλακιογένεση.....	22
1.2.1 Ωογένεση	22
1.2.2 Ωοθυλακιογένεση	23
1.2.2.1 Αρχέγονα ωοθυλάκια.....	24
1.2.2.2 Πρωτογενή ωοθυλάκια	25
1.2.2.3 Δευτερογενή ωοθυλάκια	25
1.2.2.4 Τριτογενή ή κυστικά ωοθυλάκια	26
1.2.3 Ανάπτυξη ωοθυλακίων από τη γέννηση μέχρι την ενήβωση	29
1.2.4 Δυναμική ανάπτυξης ωοθυλακίων στις προβατίνες	32
1.2.5 Απόπτωση- Ατρησία.....	36
1.2.6 Ωχροί σωματίο και ωχρινικοί σχηματισμοί σε αμνάδες.....	37
1.3 Συλλογή ωαρίων	38
1.3.1 Αναρρόφηση ωοθυλακίων από αμνάδες.....	39
1.3.1.1 Ορμονική αγωγή	39
1.3.1.2 Επιλογή δοτριών ωαρίων: φυλή, ηλικία και συχνότητα αναρρόφησης ωοθυλακίων	42
1.4 Ικανότητα ανάπτυξης ωαρίων.....	43
1.4.1 Ωρίμανση ωαρίου	45
1.5 Ενδοκρινολογία γεννητικού συστήματος	48
1.5.1 Ενδοκρινολογία από τη γέννηση μέχρι και την ενήβωση.....	48
1.5.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενήβωση	52
1.6 Σκοπός διατριβής	56

1.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57
------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Επίδραση της ηλικίας, της δόσης της χορηγούμενης FSH και της συχνότητας αναρρόφησης των ωοθυλακίων στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στην ικανότητα ωρίμανσης των συλλεγόμενων ωαρίων <i>in vitro</i>	75
2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	76
2.2 ABSTRACT.....	77
2.3 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	78
2.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	80
2.4.1 Πειραματόζωα και ορμονική αγωγή	80
2.4.2 Αναρρόφηση ωοθυλακίων (OPU)	84
2.4.3 Εκτίμηση ποιότητας ωαρίων.....	88
2.4.4 <i>In vitro</i> ωρίμανση ωαρίων (IVM)	89
2.4.5 Εκτίμηση της <i>in vitro</i> ωρίμανσης των ωαρίων με βάση την ωρίμανση του πυρήνα τους	90
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	91
2.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	93
2.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
2.8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

Η ορμονική διέγερση των ωοθηκών και η αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε αμνάδες Καραγκούνικης φυλής δεν επηρεάζει τη σωματική ανάπτυξη, την ενήβωση και την αναπαραγωγική ικανότητά τους	115
3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	116
3.2 ABSTRACT.....	117
3.3 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	118
3.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	121
3.4.1 Πειραματόζωα-αναρροφήσεις ωοθυλακίων	121
3.4.2 Ενήβωση και αναπαραγωγική ικανότητα	121
3.4.3 Εκτίμηση σωματικού βάρους και ανάπτυξης οστών	123
3.4.4 Μικροσκοπική εξέταση ωοθηκών	123
3.4.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ορμονών.....	124
3.5 Στατιστική ανάλυση.....	127

3.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	128
3.8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	148

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ωοθήκων στην πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων με βάση τη συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β	155
4.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	156
4.2 ABSTRACT.....	156
4.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	159
4.4.1 Πειραματόζωα και ορμονική αγωγή	159
4.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης οιστραδιόλης-17β	159
4.5 Στατιστική ανάλυση.....	160
4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	161
4.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	164
4.8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	167

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

Συμπεράσματα και προοπτικές	172
-----------------------------------	-----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	176
-----------------	-----

Άρθρα στην αγγλική γλώσσα.

1. Age, FSH Dose and Follicular Aspiration Frequency Affect Oocyte Yield from Juvenile Donor Lambs, 2006: I Valasi, L Leontides, Th Papanikolaou and GS Amiridis. Reproduction in Domestic Animals, in press.
2. Oocyte pick-up in juvenile lambs affects neither onset of puberty nor their future fertility, 2006: I Valasi, I Menegatos, Th Papanikolaou, P Goulas, GS Amiridis. Theriogenology, in press.
3. Oestradiol concentration as a predictor of ovarian response in FSH stimulated ewe-lambs, 2006: I Valasi, L Leontides, I Menegatos and GS Amiridis. Έχει υποβληθεί για κρίση σε διεθνές περιοδικό.

Κατάλογος συντομογραφιών

ΑΓΝ:	αρχέγονα γεννητικά κύτταρα
ΠΠΑΩ:	πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων
ΣΒ:	σωματικό βάρος
AMH*:	<i>anti-Mullerian hormone</i>
ANOVA:	<i>analysis of variance</i> / ανάλυση διακύμανσης
BMP (-2/-4/-7/-8b/-15)*:	<i>bone morphogenetic proteins</i> / μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών
cAMP:	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> / κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
COCs:	<i>cumulus-oocyte complexes</i> / συμπλέγματα ωαρίων –ωοφόρων δίσκων
E2:	<i>oestradiol-17β ή oestradiol</i> / οιστραδιόλη-17β ή οιστραδιόλη
eCG:	<i>equine chorionic gonadotrophin</i> / ίππεια χοριακή γοναδοτρόπος ορμόνη
EGF:	<i>epidermal growth factor</i> / επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FGFs*:	<i>fibroblast growth factors</i> / αυξητικοί παράγοντες ινοβλαστών
FSH:	<i>follicle-stimulating hormone</i> / ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη
GH:	<i>growth hormone</i> / αυξητική ορμόνη
GV:	<i>germinal vesicle</i> / βλαστικό κυστίδιο
GVBD:	<i>germinal vesicle breakdown</i> / έναρξη ενεργοποίησης του θηλυκού προπυρήνα
Fig-α (ή Figla)*:	<i>oocyte-specific transcription factor</i> / ειδικός για το ωάριο παράγοντας μεταγραφής
GnRH:	<i>gonadotrophin releasing hormone</i> / απελευθερωτική ορμόνη των γοναδοτρόπων ορμονών
hCG:	<i>human chorionic gonadotrophin</i> / χοριακή γοναδοτρόπος ορμόνη του ανθρώπου
IGF-I:	<i>insulin-like growth factor-I</i> / αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης- I
IGFBP-2*:	<i>insulin like growth factor binding protein 2</i>
IL-4:	<i>interleukine-4</i> / ιντερλευκίνη-4
IVC:	<i>in vitro culture</i> / <i>in vitro</i> καλλιέργεια
IVF:	<i>in vitro fertilization</i> / <i>in vitro</i> γονιμοποίηση
IVM:	<i>in vitro maturation</i> / <i>in vitro</i> ωρίμανση
IVEP:	<i>in vitro embryo production</i> / <i>in vitro</i> παραγωγή εμβρύων
KL*:	<i>kit ligand ή Steel factor ή Stem cell factor</i>
LH:	<i>luteinizing hormone</i> / ωχρινοποιητική ορμόνη
LIF*:	<i>leukemia inhibiting factor</i> / ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας
MAPKs*:	<i>mitogen-activated protein kinases</i>

MAS*: *mitogenic activating sterol*

MOET: *multiple ovulation and embryo transfer* / πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία και μεταφορά εμβρύων

MPF*: *maturation promoting factor* / ενισχυτικός παράγοντας ωρίμανσης

MPM: *modified Parker's medium* / τροποποιημένο κατά Parker υπόστρωμα

NT-4*: *neurotrophin-4* / νευροτροπίνη-4

OCS: *oestrus cow serum* / ορός αγελάδας σε οίστρο

OPU: *ovum pick-up* / συλλογή ωαρίων μετά από αναρρόφηση ωοθυλακίων

P4: *progesterone* / προγεστερόνη

PMSG: *placental mare serum gonadotrophin* / πλακούντιος γοναδοτρόπος ορμόνη της φοράδας

RIA: *radioimmunoassay* / ραδιοανοσολογική μέθοδος

TGFβ*: *transforming growth factor β family members* / μέλη της οικογένειας του αυξητικού μεταμορφωτικού παράγοντα β

VEGF*: *vascular endothelial growth factor*

* δεν έχει ακόμη καθιερωθεί έγκυρος ελληνικός όρος

Κατάλογος πινάκων - διαγραμμάτων - εικόνων

Κεφάλαιο I

Διάγραμμα 1.1	Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης, ενεργοποίησης και ωρίμανσης του ωοκυττάρου κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης.....	28
---------------	---	----

Διάγραμμα 1.2	Τα στάδια της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων και χρόνος που απαιτείται για το κάθε στάδιο σε προβατίνες και αμνάδες.....	47
---------------	---	----

Κεφάλαιο II

Πίνακας 2.1	Ορμονική αγωγή των δοτριών ωαρίων.....	83
-------------	--	----

Πίνακας 2.2	Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων κατά Dulbecco (PBS) και υποστρώματος έκπλυσης.....	88
-------------	---	----

Διάγραμμα 2.1	Χρονοδιάγραμμα του πρωτοκόλλου ορμονικής αγωγής και OPU στις ομάδες ΘΟ, ΕΣ, ΜΣ και ΕΔ.....	82
---------------	--	----

Διάγραμμα 2.2	Κατανομή του συνολικού αριθμού, των μεγάλων (≥ 2 mm) και των μικρών (< 2 mm) ωοθυλακίων μεταξύ των αμνάδων που δεν υποβλήθηκαν σε ορμονική αγωγή (1 ^ο πείραμα) και θανατώθηκαν σε ηλικία 30 ημερών, 45 ημερών, 60 ημερών και 5 έως 6 μηνών.....	94
---------------	---	----

Διάγραμμα 2.3	Κατανομή του συνολικού αριθμού, των μεγάλων (≥ 2 mm), των μικρών (< 2 mm) ωοθυλακίων και των συλλεχθέντων ωαρίων (COCs) στις ομάδες (α) ΕΣ1=ΜΣ1, ΜΣ2, ΜΣ3, ΜΣ4, (β) ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4 και (γ) ΕΔ1, ΕΔ2, ΕΔ3, ΕΔ4.....	97
---------------	---	----

Διάγραμμα 2.4	Ποσοστό ώριμων ωαρίων μετά την IVM μεταξύ των ομάδων (α) ΕΣ1-ΜΣ2-ΜΣ3-ΜΣ4, ΕΣ1-ΕΣ2-ΕΣ3-ΕΣ4 και ΕΔ1-ΕΔ2-ΕΔ3-ΕΔ4 και (β) ΕΣ2-ΜΣ2, ΕΣ3-ΜΣ3, ΕΣ4-ΜΣ4, ΕΣ1-ΕΔ1, ΕΣ2-ΕΔ2, ΕΣ3-ΕΔ3 και ΕΣ4-ΕΔ4.....	100
---------------	---	-----

Εικόνα 2.1	Απαραίτητος εξοπλισμός για τη διενέργεια λαπαροσκοπικής αναρρόφησης ωοθυλακίων.....	86
Εικόνα 2.2	Εικόνες ωοθηκών μετά την πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων.....	87
Εικόνα 2.3	Ωάρια ποιότητας A, B, C και D	89

Κεφάλαιο III

Πίνακας 3.1	Διασταυρούμενη αντίδραση αντιορού προγεστερόνης και οιστραδιόλης με άλλα στεροειδή σύμφωνα με τον κατασκευαστή.....	126
Πίνακας 3.2	Κατανομή του σωματικού βάρους μεταξύ των ομάδων X1, X2, X3, X4 και X5 από τη γέννηση έως τον 8 ^ο μήνα της ηλικίας.....	134
Πίνακας 3.3	Κατανομή του σωματικού βάρους των ζώων που γεννήθηκαν το χειμώνα και ενηβώθηκαν και εκείνων που δεν ενηβώθηκαν στην περίοδο που μελετήθηκε.....	134
Πίνακας 3.4	Κατανομή του σωματικού βάρους μεταξύ των ομάδων Φ1 και Φ2 από τη γέννηση έως το 12 ^ο μήνα της ηλικίας.....	135
Πίνακας 3.5	Κατανομή της διαφοράς της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας μεταξύ διαδοχικών ακτινογραφημάτων ληφθέντων στην ομάδα Φ1 και Φ2.....	137
Διάγραμμα 3.1	Κατανομή της συγκέντρωσης της P4 και της E2 κατά τη διάρκεια της ορμονικής αγωγής.....	130
Διάγραμμα 3.2	Ηλικία ενήβωσης (ημέρες) στις ομάδες (α) X1, X2, X3, X4 και X5 και (β) τις Φ1 και Φ2.....	132
Διάγραμμα 3.3	Ποσοστό εγκυμοσύνης στις ομάδες X1, X2, X3, X4 και X5 κατά πρώτη την αναπαραγωγική περίοδο.....	133

Διάγραμμα 3.4	Κατανομή του μήκους της κερκίδας μεταξύ των ομάδων (α) X1, X2 και X5 και (β) Φ1 και Φ2	136
Διάγραμμα 3.5	Κατανομή της διαφοράς στην κατά μήκος αύξηση της κερκίδας μεταξύ διαδοχικών ακτινογραφημάτων μεταξύ των ομάδων X1, X2, X5 και Φ1, Φ2.....	137
Εικόνα 3.1	Ακτινογραφική απεικόνιση της περιφερικής επιφυσιακής γραμμής της δεξιάς κερκίδας θηλυκού προβάτου.....	138
Εικόνα 3.2	Μικροσκοπική εικόνα ωοθήκης (α) μάρτυρα και (β) μετά από επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων.....	139
Κεφάλαιο IV		
Διάγραμμα 4.1	Κατανομή της συγκέντρωσης της E2 πριν από την κάθε χορήγηση FSH και πριν από την OPU μεταξύ των ομάδων A1, A2 και A3.....	163

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή αποτελεί προϊόν συνεργασίας της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, στο πλαίσιο του Προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2001 (Κωδικός έργου 01ΕΔ8.3/1803).

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στον επίκουρο καθηγητή της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Γ.Σ. Αμοιρίδη για την υπόδειξη του θέματος της διατριβής, την καθοδήγησή του στο χώρο της έρευνας και τη συμπαράστασή του στην τριετή και πλέον διαδρομή αυτή, αλλά κυρίως για την τιμή που μου έκανε να μου εμπιστευθεί τις ερευνητικές του ανησυχίες.

Τον αναπληρωτή καθηγητή και Διευθυντή της Κλινικής Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Γ.Χ. Φθενάκη ευχαριστώ θερμά τόσο για την αρχική επίβλεψη, όσο και για την πολυσήμαντη βοήθειά του, την κριτική ανάγνωση και διόρθωση των κειμένων του πονήματος αυτού.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον τακτικό ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Ε. Βαϊνά για την εκπαίδευση που μου προσέφερε σε τεχνικές εργαστηρίου και για την κριτική ανάγνωση και διόρθωση της διατριβής, όπως και στον αναπληρωτή ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Κ.Ρέκκα για τη βοήθειά του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τους ανωτέρω ερευνητές ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή τους σε όλες τις φάσεις αυτής της προσπάθειας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω στον αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ι. Μενεγάτο για τη υποστήριξη και τη φιλοξενία που μου παρείχε στο Εργαστήριο Ραδιοανοσολογικών Δοκιμών που διευθύνει. Επίσης, ευχαριστώ τον ΕΕΔΠ κ. Δ. Καλογιάννη και την υποψήφια διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Β. Κοτσάμπαση για τη βοήθειά τους στην εκτέλεση των ραδιοανοσολογικών αναλύσεων.

Στην τακτική ερευνήτρια και Διευθύντρια του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης κ. Σ. Κουρλετάκη-Μπελιμπασάκη εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την προκαταρκτική εκπαίδευση στις ραδιοανοσολογικές αναλύσεις στο Εργαστήριο Ραδιοανοσολογικών Δοκιμών, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη συμβολή της λέκτορος Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Α. Θεοδοσιάδου, την οποία επίσης ευχαριστώ.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον τέως επίκουρο καθηγητή της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. και νυν επίκουρο καθηγητή της Χειρουργικής Κλινικής της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. κ. Ν. Πράσινο για τη βοήθειά του στην ακτινολογική εξέταση και αναισθησία των ζώων. Ακόμη, ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή και Διευθυντή της Χειρουργικής Κλινικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Α. Γαλάτο για τις συμβουλές του στην αναισθησία των πειραματοζώων και για τη χρήση του Ακτινολογικού Μηχανήματος. Επίσης, ευχαριστώ τη συνάδελφο και υποψήφια διδάκτορα του Π.Θ. κ. Β. Γρηγοροπούλου για τη βοήθειά της στη λήψη των ακτινογραφημάτων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στον αναπληρωτή καθηγητή του Εργαστηρίου Βιοστατιστικής, Επιδημιολογίας και Οικονομίας Ζωικής Παραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Α. Λεοντίδη για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του στο στάδιο της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων.

Τον αναπληρωτή ερευνητή του Σταθμού Γεωργικής Έρευνας Παλαμά Καρδίτσας κ. Κ. Δεληγιάννη και τον καθηγητή του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Λάρισας κ. Π. Γούλα ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία τους.

Τον αναπληρωτή καθηγητή του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Δ. Τόντη και το συνάδελφο και υποψήφιο διδάκτορα του Π.Θ. Δ. Δούκα ευχαριστώ για τη μικροσκοπική εξέταση των ωοθηκών.

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στους συναδέλφους υποψήφιους διδάκτορες του Π.Θ. και φίλους κ. Θ. Παπανικολάου και κ. Ι. Δημητριάδη, για την άριστη συνεργασία και την ανεκτίμητη βοήθειά τους σε όλες τις φάσεις του παρόντος εγχειρήματος. Επίσης, ευχαριστώ θερμά το συνάδελφο Θ. Καρατζίνο για την αμέριστη βοήθειά του κατά τη διάρκεια των πειραματισμών. Ακόμη, ευχαριστώ τους ζωοκόμους των Κλινικών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Α. Τρούκη και κ. Ρ. Τρούκη για τη φροντίδα των πειραματοζώων και τη βοήθειά τους στη διενέργεια των πειραματισμών.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και την εταιρεία ΦΑΓΕ για την οικονομική στήριξη που παρείχαν στην προσπάθεια αυτή.

Ευχαριστώ το σύζυγό μου Γιώργο και τους γονείς μου Δημήτρη και Δήμητρα για την υποστήριξη και την αγάπη τους καθ' όλη τη διάρκεια της διαδρομής αυτής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η δεκαετία του 1960 αποτέλεσε το ορόσημο της ευρείας αποδοχής των νέων βιοτεχνολογικών μεθόδων της αναπαραγωγής, τόσο αυτών που αφορούν στον άνθρωπο όσο και στα αγροτικά ζώα. Στο χρονικό διάστημα που μεσολάβησε οι εξελίξεις των μεθόδων αυτών γνώρισαν αλματώδη ανάπτυξη με κάθε δεκαετία να χαρακτηρίζεται από την ευρεία εφαρμογή συγκεκριμένων βιοτεχνολογικών μεθόδων. Στη δεκαετία του '60 κυριάρχησε η διάδοση της τεχνητής σπερματέγχυσης (ΤΣ), στη δεκαετία του '70 ακολούθησε η μεταφορά των *in vivo* παραγομένων εμβρύων (*embryo collection and transfer*), στη δεκαετία του '80 διαδόθηκε η *in vitro* παραγωγή εμβρύων (*in vitro embryo production*, IVEP) και η κλωνοποίηση (*cloning*) και τέλος στη δεκαετία του '90 ακολούθησε η παραγωγή διαγονιδιακών ζώων (*transgenesis*). Τα τελευταία όμως χρόνια η εφαρμογή των μεθόδων αυτών σε πολλές - ευρωπαϊκές κυρίως - κοινωνίες αντιμετωπίζεται με ιδιαίτερο σκεπτικισμό. Οι επιφυλάξεις που αναδεικνύονται σχετίζονται με την ύπαρξη κινδύνων διασποράς νόσων, με ζητήματα που υπονομεύουν τη βιοηθική και την ευζωία, με την επίδραση της εντατικοποίησης της εκτροφής στο περιβάλλον, με τη διατήρηση ή μη των γενοτύπων, έως και με τον κίνδυνο εμφάνισης 'βιο-τρομοκρατίας' (Wrathall 1995, Evans 1999).

Η πρώτη αναφορά μεταφοράς εμβρύου σε πρόβατα και αίγες έγινε το 1934 ενώ η πρώτη γέννηση μοσχარიού μετά από μεταφορά εμβρύου πραγματοποιήθηκε μόλις το 1951 (Ishwar και Memon 1996, Betteridge 2000). Λίγα χρόνια αργότερα (1955) γεννήθηκαν 8 αρνιά από μεταφορά 19 εμβρύων σε 18 προβατίνες (Ishwar και Memon 1996). Από τις αρχές της δεκαετίας του 1970 αναπτύχθηκε η τεχνική της πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και μεταφοράς εμβρύων (*multiple ovulation and embryo transfer*, MOET).

Η συλλογή των εμβρύων συνήθως γίνεται μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και τεχνητή σπερματέγχυση ή φυσική οχεία. Η συλλογή και η μεταφορά των εμβρύων μπορεί να γίνει είτε χειρουργικά είτε αναίμακτα (λαπαροσκοπικά σε προβατίνες, διατραχηλικά σε αγελάδες) (Ishwar και Memon 1996).

Η τεχνική της *in vitro* γονιμοποίησης άρχισε να αναπτύσσεται στα μέσα της δεκαετίας του 1970. Το πρώτο βρέφος μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση γεννήθηκε το 1978 (Steptoe και Edwards 1978). Ακολούθησε η εφαρμογή της εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων σε ενήλικα μηρυκαστικά με τη γέννηση του πρώτου μοσχარიού το 1981 (Brackett και συν. 1982) και του πρώτου αρνιού το 1991 (Pugh και συν. 1991). Αρχικά η συλλογή ωαρίων γινόταν χειρουργικά μετά από λαπαροτομή ή από

πτωματικές ωοθήκες. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε πρώτα στον άνθρωπο και ακολούθως το έτος 1987 στα βοοειδή η διακολπική αναρρόφηση ωαρίων με τη βοήθεια υπερηχογράφου (ovum pick-up, OPU) (van Wagtendonk-de Leeuw 2006). Στην περίπτωση των μικρών μηρυκαστικών η συλλογή ωαρίων μπορεί να διενεργηθεί μετά από λαπαροτομή ή με λαπαροσκοπική τεχνική. Σε αίγες έχει αναφερθεί και η διακολπική αναρρόφηση ωοθυλακίων με τη βοήθεια υπερηχογράφου (Galli και συν. 2001). Η αναρρόφηση ωοθυλακίων με λαπαροσκοπική τεχνική εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στα πρόβατα το 1975 από τους Snyder και Nellor (1975) οι οποίοι συνέλλεξαν έξι ωάρια μετά από αναρρόφηση 21 ωοθυλακίων. Από τότε η λαπαροσκοπική τεχνική έχει βελτιωθεί σημαντικά σε ό,τι αφορά στο ποσοστό συλλογής και την ποιότητα των συλλεγόμενων ωαρίων.

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρησιμοποίηση άνηβων ζώων ως πηγή ωαρίων για την *in vitro* παραγωγή εμβρύων με σκοπό την επιτάχυνση του ρυθμού γενετικής βελτίωσης μέσω της μείωσης του μεσοδιαστήματος των γενεών. Υπολογίζεται ότι μπορούν να παραχθούν περισσότερα έμβρυα κατάλληλα για μεταφορά ανά συλλογή ωαρίων από άνηβα παρά από ενήλικα πρόβατα (Earl και συν. 1995, Tervit 1996, Ledda και συν. 1997). Μέχρι σήμερα, έπειτα από μεταφορά εμβρύων που παρήχθησαν από ωάρια άνηβων ζώων έχουν γεννηθεί αμνοί (Quirke και Hanrahan 1977, Trounson και συν. 1977, O' Brien και συν. 1997b, Ptak και συν. 1999, 2003, Morton και συν. 2005a), ερίφια (Baldassarre και Karatzas 2004) και μόσχοι (Kajihara και συν. 1991, Armstrong και συν. 1992, Revel και συν. 1995, Yang και συν. 1997, Khatir και συν. 1998).

Μολονότι οι περισσότερες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, από την ορμονική διαχείριση του οιστρικού κύκλου μέχρι την παραγωγή του πρώτου κλωνοποιημένου θηλαστικού, της Dolly, έχουν αναπτυχθεί στα πρόβατα, εφαρμόζονται κυρίως στα βοοειδή (Loi και συν. 1998). Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμια κλίμακα γίνεται ετησίως *in vivo* και *in vitro* παραγωγή περισσότερων από 1.000.000 εμβρύων βοοειδών και 85.000 εμβρύων προβάτων περίπου (Thibier 2005). Οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι στην αναπαραγωγή των προβάτων δεν έχουν τύχει της αναμενόμενης αποδοχής, επειδή πιθανώς εκτιμάται ότι τα προσδοκώμενα οφέλη είναι περιορισμένα σε σχέση με το κόστος εφαρμογής (Cognié και συν. 2003). Παρόλα αυτά η εφαρμογή των προγραμμάτων μεταφοράς εμβρύων είναι η μέθοδος εκλογής σε περιπτώσεις εξυγίανσης ποιμνίων προβάτων και σε προγράμματα διατήρησης γενοτύπων.

1.2 Ωογένεση-Ωοθυλακιογένεση

1.2.1 Ωογένεση

Ως ωογένεση περιγράφεται η παραγωγή και η ωρίμανση των ωοκυττάρων (ωαρίων), τα οποία προέρχονται από τα ωογόνια. Στα θηλαστικά η ωογένεση αρχίζει κατά την εμβρυϊκή ζωή, ολοκληρώνεται μετά την ενήβωση και συνεχίζεται απρόσκοπτα καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του ενηλίκου θηλυκού ζώου. Ο σχηματισμός και η ανάπτυξη των ωοκυττάρων περιλαμβάνει επτά στάδια: (1) τη δημιουργία των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (ΑΓΚ), (2) τη μετανάστευση των ΑΓΚ στις γονάδες, (3) την αποίκιση των γονάδων από τα ΑΓΚ, (4) τη διαφοροποίηση των ΑΓΚ σε ωογόνια (αρχέγονα ωοκύτταρα), (5) τον πολλαπλασιασμό των ωογονίων, (6) την έναρξη της μείωσης και (7) την παραμονή των ωοκυττάρων στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης Ι.

Η διαδικασία της ωογένεσης στο πρόβατο αρχίζει μετά την εγκατάσταση του εμβρύου στη μήτρα (16^η-18^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση), όταν τα αδέσμευτα κύτταρα της επιβλάστης, κατά το σχηματισμό του γαστριδίου, μετακινούνται μέσω του οπισθίου τμήματος της αρχικής γραμμής του κνήματος και μετατρέπονται σε αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Ρυθμιστικοί παράγοντες της δημιουργίας των ΑΓΚ είναι οι TGFβ, BMP-4, BMP-8b και BMP-2. Μεταξύ της 18^{ης} και 28^{ης} ημέρας της κύησης, τα ΑΓΚ πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν μέσω του λεκιθικού ασκού και του ενδοδέρματος του οπίσθιου εντέρου του εμβρύου στις γεννητικές ταινίες που βρίσκονται κοιλιακά των μεσόνεφρων. Οι αδιαφοροποίητες γονάδες (γεννητικές ταινίες) για πρώτη φορά παρατηρούνται μεταξύ της 23^{ης} και της 24^{ης} ημέρας της εμβρυϊκής ζωής ως παχύνσεις του σπλαχνικού επιθηλίου του μεσόνεφρου (McNatty και συν. 1995, Juengel και συν. 2002, van den Hurk και Zhao 2005).

Μόλις τα ΑΓΚ εισέλθουν στη γεννητική ταινία (23^η ημέρα κύησης) διαφοροποιούνται, μετά από πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις, σε ωογόνια ή σπερματογόνια ανάλογα με τα υπάρχοντα φυλετικά χρωματοσώματα. Από την 38^η ημέρα της κύησης τα ωογόνια συνδέονται μεταξύ τους με μεσοκυττάριας κυτταροπλασματικές γέφυρες και περιβάλλονται από σωματικά κύτταρα μεσонеφρικής προέλευσης (pregranulosa cells, πρόδρομα κοκκώδη κύτταρα). Την 45^η ημέρα της κύησης, το σύμπλεγμα ωογόνια – πρόδρομα κοκκώδη κύτταρα καλύπτεται από το βασικό πέταλο και διαχωρίζεται από το διάμεσο ιστό της ωοθήκης σχηματίζοντας την ωοφόρο χορδή (ovigerous cord ή cortical cord). Η ωοφόρος χορδή διατηρείται μέχρι την

75^η ημέρα της κύησης (McNatty και συν. 1995, Juengel και συν. 2002, van den Hurk και Zhao 2005).

Οι πληροφορίες αναφορικά με τους παράγοντες που ρυθμίζουν το σχηματισμό της ωοφόρου χορδής, τον πολλαπλασιασμό των ωογονίων και την έναρξη της μείωσης είναι σχετικά περιορισμένες. Στο πρόβατο έχει βρεθεί ότι ο σχηματισμός της ωοφόρου χορδής σχετίζεται με τις στεροειδείς ορμόνες (Juengel και συν. 2002). Πολλοί άλλοι παράγοντες που συμβάλουν στην εγκατάσταση των ΑΓΚ έχουν ανιχνευθεί στα τρωκτικά, όπως είναι οι BMP-2/-4/-8b, KL, LIF, IL-4, TGFβ, IGF-I, NT-4 κ.α. (van den Hurk και Zhao 2005).

Στο έμβryo του προβάτου οι μειωτικές διαιρέσεις αρχίζουν γύρω στην 55^η ημέρα και επαναλαμβάνονται με μεγάλη συχνότητα μέχρι την 120^η ημέρα της κύησης. Τα ωογόνια υφίστανται περαιτέρω μιτωτικές διαιρέσεις και έπειτα αφού εισέλθουν στην 1^η μειωτική διαίρεση μετατρέπονται σε ωοκύτταρα (ωάρια). Τα ωοκύτταρα διέρχονται τα στάδια της πρόφασης της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης και παραμένουν χωρίς περαιτέρω εξέλιξη στο στάδιο της διπλοταινίας, οπότε και ονομάζονται πρωτοταγή ωοκύτταρα (ωοκύτταρα 1^{ης} τάξης, διπλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων). Το πρωτοταγές ωοκύτταρο περιέχει γενετικά ανασυνδυασμένο DNA μητρικής και πατρικής προέλευσης, είναι μεγαλύτερο από το ωογόνιο και περιέχει περισσότερα κυτταροπλασματικά οργανίδια. Σ' αυτό το στάδιο μπορεί να παραμείνει μέχρι το ωοθυλάκιο στο οποίο περιέχεται να εκφυλιστεί (ατρησία) ή μέχρι να επιλεγεί για να ολοκληρώσει την 1^η και τη 2^η μειωτική διαίρεση. Η 1^η μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται *in vivo* μετά την προωοθυλακιορρηκτική έκκριση της LH ή σε *in vitro* συνθήκες μετά από προσθήκη ορμονών στο υπόστρωμα καλλιέργειας, οπότε σχηματίζεται το δευτεροταγές ωοκύτταρο (ωοκύτταρο 2^{ης} τάξης, απλοειδής αριθμός χρωμοσωμάτων). Τότε σχηματίζεται και το πρώτο πολικό σωμάτιο, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ωοκύτταρο με ελαττωμένη ποσότητα κυτταροπλάσματος. Το δευτεροταγές ωοκύτταρο είναι θηλυκός γαμέτης στον οποίο έχει ολοκληρωθεί η 1^η μειωτική διαίρεση και έχει αρχίσει η δεύτερη. Η 2^η μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται μόνο μετά τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου (O'Rahilly και Muller 2000, Juengel και συν. 2002, McNatty και συν. 1995, van den Hurk και Zhao 2005) (Διάγραμμα 1.1).

1.2.2 Ωοθυλακιογένεση

Η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης ξεκινά με το σχηματισμό ενός κυστιδίου (κρύπτης) που εγκλείει το πρωτοταγές ωοκύτταρο. Η ωοθυλακιογένεση είναι μια

συνεχής διαδικασία που ξεκινά κατά το μέσο περίπου της εμβρυϊκής ζωής, συνεχίζεται κατά την προηβική και την αναπαραγωγική ζωή αλλά μπορεί να ολοκληρωθεί μόνο μετά την ενήβωση με το σχηματισμό των προωοθυλακιορρηκτικών γρααφιανών ωοθυλακίων. Στα έμβρυα των προβάτων ο σχηματισμός των ωοθυλακίων λαμβάνει χώρα αποκλειστικά εντός της ωοφόρου χορδής με τα πρώτα ωοθυλάκια να σχηματίζονται στην επιφάνεια σύνδεσης της φλοιώδους με τη μυελώδη ουσία της ωοθήκης. Τα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων κλιμακώνονται προς τα έξω, εντός της φλοιώδους ουσίας, με κατεύθυνση προς το επιπολής επιθήλιο της ωοθήκης (Sawyer και συν. 2002)(Διάγραμμα 1.1).

1.2.2.1 Αρχέγονα ωοθυλάκια (primordial follicles)

Μόλις το ωοκύτταρο μετατραπεί σε πρωτοταγές περιβάλλεται από ένα στίχο αποπλατυσμένων κοκκωδών κυττάρων σχηματίζοντας το αρχέγονο ωοθυλάκιο (Tassell και Kennedy 1980, Amorim και συν. 2000, Juengel και συν. 2002, van den Hurk και Zhao 2005). Μέχρι την 38^η ημέρα της κύησης τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα προέρχονται από το μεσόνεφρο ενώ στη συνέχεια από το επιθήλιο της επιφάνειας της ωοθήκης (Sawyer και συν. 2002). Τα ωοκύτταρα που εγκλείονται στα αρχέγονα ωοθυλάκια έχουν διάμετρο από 23 έως 53 μm , ενώ τα ελεύθερα πρωτοταγή ωοκύτταρα και τα ωογόνια έχουν διάμετρο από 17 έως 22 μm και 13 έως 17 μm , αντίστοιχα (van den Hurk και Zhao 2005).

Τα πρώτα αρχέγονα ωοθυλάκια στο κυοφορούμενο έμβρυο σχηματίζονται την 75^η ημέρα της κύησης, όταν η ωοθήκη περιέχει το μέγιστο αριθμό γεννητικών κυττάρων (900.000 περίπου). Από την 75^η έως την 90^η ημέρα της εμβρυϊκής ζωής παρατηρείται μαζική απώλεια (80% περίπου) των ΓΚ (McNatty και συν. 1995), πιθανότατα με τη διαδικασία της απόπτωσης (Reynaud και Driancourt 2000). Ταυτόχρονα με το σχηματισμό την αρχέγονων ωοθυλακίων η ωοφόρος χορδή υποπλάσσεται και παλινδρομεί (Sawyer και συν. 2002).

Οι παράγοντες που εμπλέκονται στο σχηματισμό των αρχέγονων ωοθυλακίων πιστεύεται ότι προέρχονται από τα ωοκύτταρα και τα κοκκώδη κύτταρα. Στα ποντίκια κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό των αρχέγονων ωοθυλακίων έχουν ο Fig-a (Eppig 2001, van den Hurk και Zhao 2005) και οι νευροτροπίνες (neurotropins) (van den Hurk και Zhao 2005). Επίσης, φαίνεται να εμπλέκονται μέλη της οικογένειας του TGF β (Eppig 2001, Fair 2003).

1.2.2.2 Πρωτογενή ωοθυλάκια (primary follicles)

Η μετατροπή των αρχέγονων ωοθυλακίων σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια είναι μια συνεχής διαδικασία που ξεκινά την 100^η ημέρα της εμβρυϊκής ζωής και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του προβάτου. Τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας γίνονται πιο στρογγυλά-κυβοειδή ή σχηματίζονται πολλές στιβάδες κυττάρων (Tassell και Kennedy 1980). Η πρώτη μορφή αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων είναι τα πρωτογενή ωοθυλάκια. Στα πρωτογενή ωοθυλάκια τα αποπλατυσμένα κοκκώδη κύτταρα του στίχου που περιβάλλει το ωοκύτταρο έχουν μετατραπεί σε κυβοειδή ή κυλινδρικά κύτταρα (McNatty και συν. 1995). Η μετατροπή των αρχέγονων σε πρωτογενή ωοθυλάκια είναι κατά κάποιο τρόπο μια διαδικασία ωρίμανσης παρά ανάπτυξης, δεδομένου ότι η διάμετρος του ωοκυττάρου δε μεταβάλλεται (van den Hurk και Zhao 2005).

Μεταξύ της 75^{ης} και 100^{ης} ημέρας της κύησης ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων σε ωοθήκη εμβρύου προβάτου μειώνεται κατά 700.000 περίπου. Μερικά από τα γεννητικά κύτταρα βρίσκονται με τη μορφή ωογονίων (9%), κάποια άλλα εγκλείονται σε πρωτογενή (1%) και σε αρχέγονα ωοθυλάκια (28%), αλλά η πλειονότητά τους απαντάται με τη μορφή ελεύθερων ωοκυττάρων (61%). Αξιοσημείωτο είναι ότι μεταξύ της 90^{ης} και της 100^{ης} ημέρας της κύησης εντοπίζεται ο μέγιστος αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων που μπορεί να παρατηρηθεί σε ωοθήκη προβάτου, τόσο στην εμβρυϊκή όσο και στη μετεμβρυϊκή ζωή. Ο αριθμός αυτός είναι 100.000 περίπου (McNatty και συν. 1995).

Πιθανόν, η μετατροπή των αρχέγονων ωοθυλακίων σε πρωτογενή ρυθμίζεται από διεγερτικούς και ανασταλτικούς παράγοντες συστηματικής ή και τοπικής προέλευσης. Ορισμένοι παράγοντες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των πρωτογενών ωοθυλακίων προέρχονται από το ωοκύτταρο, από τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα και από το στρώμα συνδετικού ιστού της φλοιώδους ουσίας (LIF, KL, BMP-2/-4/-7/-15, φολιστατίνη, ακτιβίνη, ινσουλίνη, IGF-I, EGF, AMH κ.α.) (McNatty και συν. 1995, Fair 2003).

1.2.2.3 Δευτερογενή ωοθυλάκια (secondary follicles)

Μετά την 120^η ημέρα της κύησης τα ωοκύτταρα περιβάλλονται από δύο ή τρεις στίχους κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων σχηματίζοντας τα δευτερογενή ωοθυλάκια (Amorim και συν. 2000, Senger 2003). Σ' αυτό το στάδιο ο πολλαπλασιασμός των

κοκκωδών κυττάρων εντείνεται, ενώ εξωτερικά αυτών σχηματίζεται η θήκη του ωοθυλακίου από κύτταρα του στρώματος συνδετικού ιστού της φλοιώδους ουσίας της ωοθήκης. Επίσης, σχηματίζεται η διαφανής ζώνη [zona pellucida (ZP)] γύρω από το ωοκύτταρο η οποία αποτελεί προστατευτικό κάλυμμα και συμμετέχει - με διαφορετικό τρόπο για κάθε είδος ζώου - στη διαδικασία της γονιμοποίησης.

Σε αυτό το στάδιο ιδιαίτερη σημασία έχει ο σχηματισμός ενός δικτύου κυτταρικών συνδέσεων (junctional complexes) μεταξύ γειτονικών κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου. Αυτές οι συνδέσεις ονομάζονται χασματοσυνδέσεις (gap junctions) και αποτελούν περιοριστικό-προστατευτικό φραγμό στη διάχυση ουσιών απαραίτητων για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου. Παράλληλα, αυξάνεται η διάμετρος του ωοθυλακίου όπως και του ωοκυττάρου που περικλείεται σε αυτό (O'Rahilly και Muller 2000, Senger 2003, van den Hurk και Zhao 2005).

Την 120^η ημέρα τα γεννητικά κύτταρα είναι 205.000 περίπου, από τα οποία το 1% βρίσκεται υπό μορφή δευτερογενών ωοθυλακίων, το 51% ως αρχέγονα ωοθυλάκια και το υπόλοιπο 48% με τη μορφή ελεύθερων ωοκυττάρων (McNatty και συν. 1995).

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν το σχηματισμό των δευτερογενών ωοθυλακίων είναι κυρίως ορμονικοί. Παρόλο που και τα δευτερογενή ωοθυλάκια ανταποκρίνονται στην επίδραση των γοναδοτροπινών, φαίνεται ότι η LH παίζει σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξή τους από ότι η FSH. Η LH και η ινσουλίνη διεγείρουν τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων από τη θήκη του ωοθυλακίου, τα οποία προάγουν το σχηματισμό των υποδοχέων της FSH στα κοκκώδη κύτταρα, ενισχύοντας έτσι τη δράση της FSH στα δευτερογενή ωοθυλάκια. Η FSH, η GH και τα οιστρογόνα ενισχύουν περαιτέρω την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ωοθυλακίων. Άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των δευτερογενών ωοθυλακίων είναι τοπικής και ενδο-ωοθυλακικής προέλευσης (BMP-2/-4/-8b, AMH, EGF, KL, LIF, FGF-2, TGFβ, IGF-I, NT-4 κ.α.) (van den Hurk και Zhao 2005).

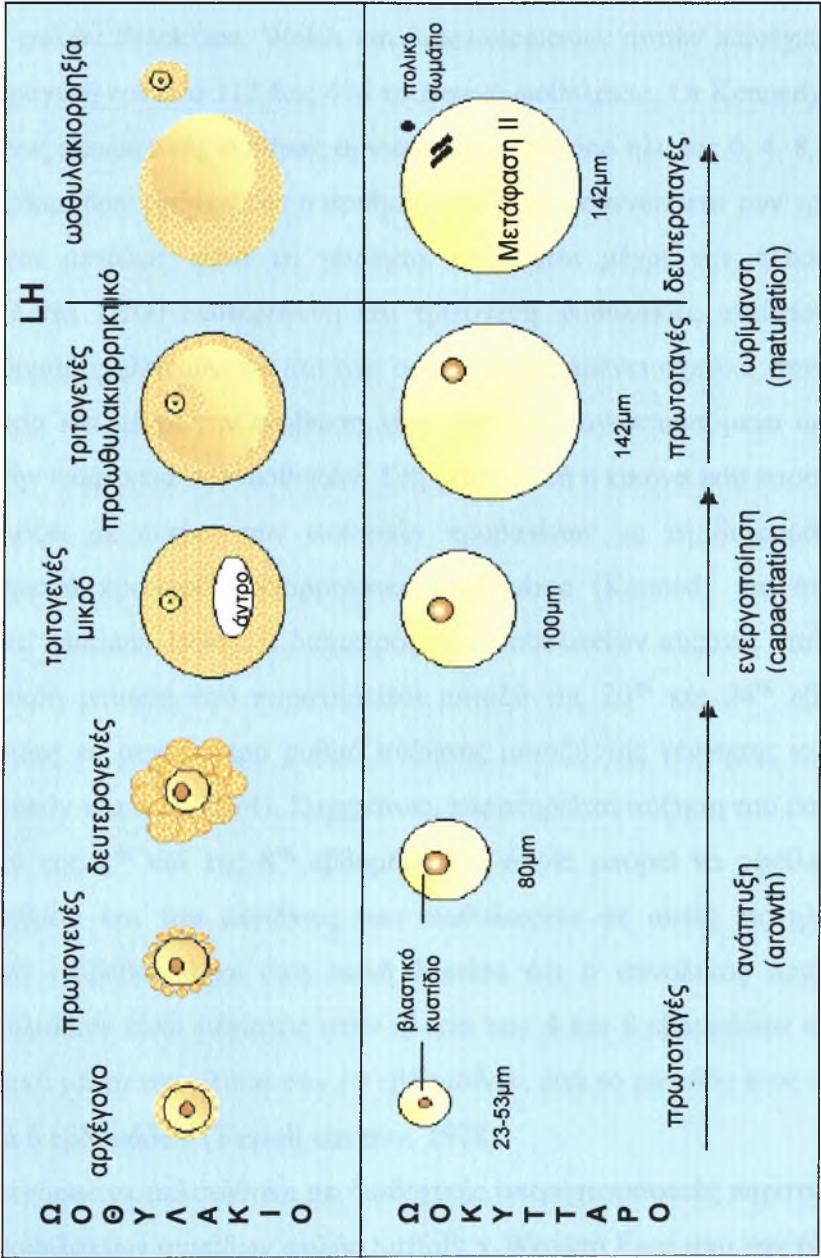
1.2.2.4 Τριτογενή ή κυστικά ωοθυλάκια (tertiary or antral follicles)

Από την 135^η ημέρα της εμβρυϊκής ζωής τα δευτερογενή ωοθυλάκια μεταπίπτουν σε τριτογενή. Η εξέλιξη των δευτερογενών ωοθυλακίων σε τριτογενή χαρακτηρίζεται από το συνεχή πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της έσω και της έξω θήκης, του βασικού υμένα και των στιβάδων των κοκκωδών κυττάρων, όπως επίσης και

του άντρου του ωοθυλακίου (Driancourt 1991). Το ωοθυλακικό υγρό - το οποίο πληροί το άντρο - εκκρίνεται από τα κύτταρα του κοκκώδους υμένα και της έσω θήκης και αποτελείται από ουσίες που παράγονται τοπικά καθώς και από ουσίες που μεταφέρονται με το πλάσμα του αίματος. Τέτοιες ουσίες είναι οι γοναδοτροπίνες, τα στεροειδή, αυξητικοί παράγοντες, ένζυμα, πρωτεογλυκάνες και λιποπρωτεΐνες. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ο μηχανισμός σχηματισμού του άντρου. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι ορμόνες (LH & FSH) και τρεις ενδο-ωοθυλακικοί παράγοντες (KL, EGF & ακτιβίνη) διεγείρουν το σχηματισμό του (van den Hurk και Zhao 2005).

Ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων την 135^η ημέρα της εμβρυϊκής ζωής υπολογίζεται σε 82.000 περίπου, αρκετά μειωμένος σε σχέση με τις 205.000 που παρατηρούνται την 120^η ημέρα. Τα γεννητικά κύτταρα περιέχονται σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια σε ποσοστό 4% (μέχρι το στάδιο του πρώιμου τριτογενούς ωοθυλακίου), σε αρχέγονα ωοθυλάκια σε ποσοστό 91%, ενώ το υπόλοιπο 5% βρίσκεται με τη μορφή ελεύθερων ωοκυττάρων. Κατά τον τοκετό, που πραγματοποιείται μεταξύ της 143^{ης} και 150^{ης} ημέρας της κύησης, οι ωοθήκες των αρνιών, ανάλογα με τη φυλή, περιέχουν μόλις 52.000 έως 98.000 αρχέγονα ωοθυλάκια περίπου (Land 1970). Τα ωοθυλάκια αυτά αποτελούν την αποθήκη γεννητικών κυττάρων για όλη την αναπαραγωγική ζωή του προβάτου. Από τη γέννηση μέχρι την ενήβωση ο αριθμός των ωοκυττάρων και των ωοθυλακίων συνεχίζει να μειώνεται. Τελικά, ένας μικρός αριθμός από τα 30.000 έως 50.000 εναπομείναντα θα εξελιχθούν μέχρι το στάδιο του γρααφιανού ωοθυλακίου και θα ρηχθούν κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής (McNatty και συν. 1995).

Η ανάπτυξη των τριτογενών ωοθυλακίων συντελείται σε τέσσερα διαδοχικά στάδια: τη βασική ανάπτυξη (basal growth), την προεπιλογή (recruitment), την επιλογή (selection) και την κυριαρχία (dominance) του(ων) ωοθυλακίου(ων), κατά την οποία το(α) κυρίαρχο(α) (dominant) ωοθυλάκιο(α) έχει(ουν) τη δυνατότητα να αναπτυχθεί(ούν) μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο. Η βασική ανάπτυξη που οδηγεί στο σχηματισμό πρώιμων-μικρών τριτογενών ωοθυλακίων συμβαίνει κατά το τέλος της εμβρυϊκής ζωής και κατά τη διάρκεια της προηβικής ζωής, αλλά και κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής. Τα πρώιμα τριτογενή ωοθυλάκια, παρότι περιέχουν υποδοχείς της FSH στα κοκκώδη κύτταρά τους, αναπτύσσονται ανεξάρτητα από την επίδραση της LH και της FSH και παράγουν προγεστερόνη και ανδρογόνα αλλά όχι οιστρογόνα (van den Hurk και Zhao 2005). Όμως, η προεπιλογή, η επιλογή και η κυριαρχία των τριτογενών ωοθυλακίων συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της προβατίνας.



Διάγραμμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης, ενεργοποίησης και ωρίμανσης του ωοκυττάρου κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης. Η ανάπτυξη του ωοκυττάρου αρχίζει συγχρόνως με την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και σχεδόν ολοκληρώνεται κατά το σχηματισμό του άντρου (Mermillod και συν. 1999 τροποποίηση σύμφωνα με τους Ledda και συν. 1999a και τους van den Hurk και Zhao 2005).

1.2.3 Ανάπτυξη ωοθυλακίων από τη γέννηση μέχρι την ενήβωση

Η ανάπτυξη και ο αριθμός των ωοθυλακίων στις αμνάδες ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία, τη φυλή, το δείκτη πολυδυμίας και την εποχή γέννησης (Land 1970, Trounson και συν. 1974b, Tassell και συν. 1983, Sonjaya και Driancourt 1987, Jorio και συν. 1991, Bartlewski και συν. 2002, Rondina και συν. 2005).

Σύμφωνα με την έρευνα του Land (1970), τις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση η ωοθήκη αρνιών φυλών Blackface, Welsh και διασταυρώσεων αυτών περιέχει από 857 έως 1.363 δευτερογενή και από 113 έως 494 τριτογενή ωοθυλάκια. Οι Kennedy και συν. (1974) εξετάζοντας πτωματικές ωοθήκες αρνιών φυλής Merino ηλικίας 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 και 33 εβδομάδων βρήκαν ότι ο αριθμός των δευτερογενών και των τριτογενών ωοθυλακίων είναι μεγάλος κατά τη γέννηση, αυξάνεται μέχρι την ηλικία των 4 εβδομάδων (683 και 1.100 δευτερογενή και τριτογενή ωοθυλάκια, αντίστοιχα), ενώ μετά τις 12 εβδομάδες ελαττώνεται και στη συνέχεια παραμένει σχετικά σταθερός. Σε μεγαλύτερη ηλικία και μέχρι την ενήβωση λίγα τριτογενή αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια εμφανίζονται στην επιφάνεια των ωοθηκών. Στη φάση αυτή η εικόνα που παρουσιάζουν οι ωοθήκες μοιάζει με εκείνη των ωοθηκών προβατίνων με τη διαφορά ότι δεν υπάρχουν γρααφιανά προ-ωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια (Kennedy και συν. 1974, Lahlou-Kassi και Mariana 1984). Η διάμετρος των ωοθυλακίων αυξάνει σταδιακά, με εξαίρεση μια μικρή μείωση που παρατηρείται μεταξύ της 20^{ης} και 24^{ης} εβδομάδας, σημειώνοντας όμως το μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης μεταξύ της γέννησης και της 4^{ης} εβδομάδας (Kennedy και συν. 1974). Συγχρόνως, παρατηρείται αύξηση του βάρους των ωοθηκών μεταξύ της 2^{ης} και της 8^{ης} εβδομάδας, η οποία μπορεί να οφείλεται στην αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των ωοθυλακίων σε αυτές τις ηλικίες. Σε μετέπειτα έρευνα επιβεβαιώθηκε στη φυλή Merino ότι ο συνολικός αριθμός των τριτογενών ωοθυλακίων είναι μέγιστος στην ηλικία των 4 και 8 εβδομάδων και έπειτα μειώνεται σταδιακά μέχρι την ηλικία των 10 εβδομάδων, ενώ το μέγεθός τους αυξάνεται μεταξύ των 2 και 6 εβδομάδων (Tassell και συν. 1978).

Σχετικά πρόσφατα μελετήθηκε με διαδοχικές υπερηχογραφικές παρατηρήσεις η ανάπτυξη των ωοθυλακίων αμνάδων φυλής Suffolk x Western Face από την ηλικία των 4 έως των 26 εβδομάδων (Bartlewski και συν. 2002). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τη 14^η έως τη 16^η και από την 22^η έως την 24^η εβδομάδα μετά τη γέννηση ο συνολικός αριθμός και η διάμετρος των τριτογενών ωοθυλακίων διαμέτρου ≥ 3 mm αυξάνονται. Αντίθετα, μεταξύ της 16^{ης} και 18^{ης} εβδομάδας η διάμετρος και ο αριθμός μειώνονται. Η μεγαλύτερη διάμετρος παρατηρείται στην ηλικία των 16 και των 24 εβδομάδων. Τα

ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τους Bartlewski και συν. (2006), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι σε αμνάδες φυλής Suffolk από την ηλικία των 2 έως των 36 εβδομάδων παρατηρούνται δύο φάσεις αυξημένης ανάπτυξης ωοθυλακίων. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα ο αριθμός των τριτογενών ωοθυλακίων διαμέτρου ≥ 2 mm αυξάνεται στις 14 εβδομάδες, μειώνεται στις 28 εβδομάδες και αυξάνεται εκ νέου στις 32 εβδομάδες, ενώ η μεγαλύτερη διάμετρός τους παρατηρείται στις 14 και στις 24 εβδομάδες της ζωής των αμνάδων. Η διαφορά που παρατηρήθηκε ως προς το χρόνο αύξησης του πληθυσμού των ωοθυλακίων μεταξύ της πρώτης (Bartlewski και συν. 2002) και της δεύτερης μελέτης (Bartlewski και συν. 2006) αποδόθηκε στο διαφορετικό χρόνο γέννησης των αμνάδων (Απρίλιος και Μάρτιος, αντίστοιχα).

Προκύπτει, λοιπόν, ότι ο γενότυπος αποτελεί τον κύριο παράγοντα που καθορίζει τον πληθυσμό των ωοθυλακίων στη γέννηση. Μερικές φυλές με υψηλό δείκτη πολυδυμίας (prolific breeds) όπως η Booroola (Tassell και συν. 1983), η Romanov (Sonjaya και Driancourt 1987) και η D'man (Jorio και συν. 1991) παρουσιάζουν στη γέννηση μειωμένο πληθυσμό τριτογενών ωοθυλακίων σε σχέση με φυλές με χαμηλότερο δείκτη πολυδυμίας. Εντούτοις, στην ηλικία των 4 εβδομάδων ο αριθμός των αναπτυσσόμενων, δευτερογενών και τριτογενών ωοθυλακίων δε διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων φυλών παρότι μπορεί να διαφέρει το μέγεθός τους (Sonjaya και Driancourt 1987).

Η επίδραση της εποχής γέννησης στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων άνηβων προβάτων είναι αμφιλεγόμενη. Αρχικά υποστηρίχτηκε ότι η εποχή της γέννησης σε αμνάδες φυλής Ile-de-France και Romanov δεν επιδρά στο συνολικό αριθμό των αναπτυσσόμενων και των τριτογενών ωοθυλακίων (Sonjaya και Driancourt 1987). Αργότερα, οι Rondina και συν. (2005) βρήκαν ότι η γέννηση αμνάδων φυλής Massese το φθινόπωρο επιδρά αρνητικά στον πληθυσμό των τριτογενών ωοθυλακίων. Υποστήριζαν, λοιπόν, ότι η εποχή της γέννησης (φθινόπωρο σε σχέση με άνοιξη) επιδρά στην ωοθυλακιογένεση και στην έκφραση του αναπαραγωγικού δυναμικού, επειδή στα ζώα που γεννήθηκαν την άνοιξη παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός πρωτογενών και μικρότερος αρχέγονων ωοθυλακίων σε σχέση με εκείνα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο. Επίσης, η ποιοτική ανάλυση των ωαρίων και των ωοθυλακίων έδειξε ότι στα ζώα που γεννιούνται το φθινόπωρο το μέγεθος των ωοθυλακίων και των ωαρίων όπως και ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων των πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων είναι σημαντικά μικρότερα συγκρινόμενα με εκείνα που γεννιούνται την άνοιξη. Εξάλλου, η επίδραση της εποχής της γέννησης στον πληθυσμό των τριτογενών ωοθυλακίων

επιβεβαιώθηκε σε πρόσφατη έρευνα που έγινε σε αμνάδες φυλής Suffolk (Bartlewski και συν. 2006).

Το μορφολογικό πρότυπο της ανάπτυξης ωοθυλακίων σε αμνάδες φαίνεται να είναι μια συνεχής γραμμική διαδικασία (Rawlings και συν. 2003, Bartlewski και συν. 2006) που δεν ακολουθεί το ‘κατά κύματα’ πρότυπο. Η ‘κατά κύματα’ ανάπτυξη των ωοθυλακίων παρατηρείται στις μοσχίδες από την ηλικία των 2 μηνών και μετά (Evans και συν. 1994) και στις προβατίνες, τόσο κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής όσο και της άνοιστρης περιόδου (Noel και συν. 1993, Ginther και συν. 1995, Bartlewski και συν. 2000, Evans και συν. 2000). Στις μοσχίδες όπως και στις προβατίνες πριν από την ανάδυση του κύματος προηγείται μια παροδική αύξηση της συγκέντρωσης της FSH. Παρότι σε αμνάδες παρατηρήθηκαν ρυθμικές αυξήσεις της συγκέντρωσης της FSH με συχνότητα και εύρος ανάλογο εκείνων που παρατηρούνται σε προβατίνες, κάθε αύξηση της FSH δεν οδηγεί σε ανάδυση ωοθυλακίου προωθυλακιορρηκτικού μεγέθους (Bartlewski και συν. 2006). Αυτός ο διαχωρισμός της ανάδυσης του κύματος και της αύξησης της συγκέντρωσης της FSH έχει παρατηρηθεί σε προβατίνες κατά τη μετάβαση από την ένοιστη στην άνοιστρη περίοδο (Bartlewski και συν. 1999c). Αν και σε αμνάδες που πλησιάζουν την ηλικία ενήβωσης έχουν ανιχνευθεί ωοθυλάκια προωθυλακιορρηκτικού μεγέθους, δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη ωοθυλακίων ‘κατά κύματα’ πριν και κατά την ενήβωση.

Από τα όσα αναπτύχθηκαν παραπάνω προκύπτει ότι το πρότυπο ανάπτυξης και ο αριθμός των ωοθυλακίων των άνηβων προβάτων διαφοροποιούνται από αυτά των ενηλίκων. Αυτό ενισχύεται από την έρευνα των Sonjaya και Driancourt (1989) σύμφωνα με την οποία σε αμνάδες φυλής Romanon κάθε ημέρα, από τη γέννηση μέχρι την ηλικία των 4 εβδομάδων, 5 αρχέγονα ωοθυλάκια περίπου αρχίζουν να αναπτύσσονται και να μεταπίπτουν σταδιακά σε δευτερογενή. Ωστόσο, καθημερινά μόνο 0,5 δευτερογενή ωοθυλάκια κατά μέσο όρο μετατρέπονται σε τριτογενή, υποδηλώνοντας ότι η πλειονότητα αυτών εκφυλίζεται. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα άνηβα ζώα εξελίσσονται περισσότερα αρχέγονα ωοθυλάκια σε σχέση με τα ενήλικα. Αυτό αποδεικνύεται από το ότι σε αμνάδες ηλικίας 12 εβδομάδων παρατηρείται μεγαλύτερος πληθυσμός τριτογενών ωοθυλακίων από ότι σε προβατίνες (Sonjaya και Driancourt 1989).

Ο λόγος ύπαρξης του μεγάλου αριθμού ωοθυλακίων σε άνηβα ζώα παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος (Sonjaya και Driancourt 1989). Επιπλέον, η συγκέντρωση των γοναδοτροπινών δε συσχετίζεται με την αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων (Tassell και συν. 1978), γεγονός που συνηγορεί στο ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων κατά τον 1^ο μήνα της ζωής των αμνάδων δεν εξαρτάται από τις

γοναδοτροπίνες (Peters και συν. 1973). Εξάλλου, η χορήγηση PMSG σε αμνάδες φυλής Merino ηλικίας 30 ημερών περίπου δεν επηρεάζει τη μορφολογία των ωοθυλακίων, όμως αυξάνει τον αριθμό των τριτογενών ωοθυλακίων, ίσως προφυλάσσοντάς τα από την ατρησία (Tassell και Kennedy 1980). Κατ' άλλους (Meikle και συν. 1998), η ανάπτυξη των ωοθυλακίων αμνάδων ηλικίας 3 μηνών παρουσία ή απουσία γοναδοτροπινών εξαρτάται από τη διάμετρό τους, όπως ακριβώς ισχύει και στις προβατίνες (Scaramuzzi και συν. 1993, van den Hurk και Zhao 2005). Αυτό σημαίνει ότι ωοθυλάκια με διάμετρο <2 mm μπορούν να αναπτυχθούν παρά την απουσία FSH και LH (gonadotrophin-responsive follicles), ενώ η ανάπτυξη των ωοθυλακίων μεγαλύτερης διαμέτρου (>2 mm) εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία γοναδοτροπινών (gonadotrophin-dependent follicles).

Οι Peters και συν. (1975) πρότειναν ότι, ανεξάρτητα από την επίδραση των γοναδοτροπινών, ενδο-ωοθηκικοί μηχανισμοί ίσως να συνδέονται με τη μεγάλη αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων στη συγκεκριμένη περίοδο. Επίσης, προτάθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ παραγόντων ανάπτυξης και ωοθυλακιογένεσης κατά την εμβρυική ζωή (Byskov και Hoyer 1994). Στις αμνάδες ο IGF-1 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Ο παράγοντας αυτός διεγείρει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων διαμέτρου από 1 έως 2 mm μέσω της αύξησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων, ακόμη και όταν οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών είναι χαμηλές (Mariana και συν. 1998).

1.2.4 Δυναμική ανάπτυξης ωοθυλακίων στις προβατίνες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ωοθυλακιογένεση είναι μια συνεχής διαδικασία. Ωοθυλάκια από την αποθήκη των αρχέγονων ωοθυλακίων αρχίζουν να αναπτύσσονται και να μεταπίπτουν σε επόμενα στάδια ανάπτυξης ανεξάρτητα από την ηλικία του ζώου (άνηβο, ενήλικο), το στάδιο της αναπαραγωγικής ζωής (ένοιστρη – άνοιστρη περίοδος, κυοφορία, γαλουχία) και την τελική κατάληξή τους που μπορεί να είναι η ωοθυλακιόρρηξη ή η ατρησία (Peters και συν. 1975, Amorim και συν. 2000). Η έναρξη της ανάπτυξης των αρχέγονων ωοθυλακίων συμβαίνει ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση των γοναδοτροπινών (Cahill και Mauleon 1981, Findlay 1994). Καθημερινά στις προβατίνες εισέρχονται στη φάση ανάπτυξης 2 έως 5 αρχέγονα ωοθυλάκια διαμέτρου 100 μ m. Η μέγιστη διάμετρος που φθάνουν τα ωοθυλάκια απουσία της προωοθυλακιόρρηκτης έκκρισης της LH είναι 4,5 έως 5 mm (Turnbull και συν. 1977, Cahill και Mauleon 1981, Driancourt και συν. 1985a). Ο μέσος χρόνος που χρειάζεται

ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο για να αναπτυχθεί έως το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο είναι περίπου 6 μήνες (Cahill και Mauleon 1980, Cahill 1981). Στα τελικά στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου χρειάζονται μόνο 124 ώρες για να αυξηθεί η διάμετρός του από τα 0,5 στα 2,2 mm και επιπλέον 103 ώρες για να αποκτήσει διάμετρο 4,5 mm (Turnbull και συν. 1977).

Η ανάπτυξη των τριτογενών ωοθυλακίων δεν αποτελεί συνεχή διαδικασία, αλλά ακολουθεί ένα κυματοειδές πρότυπο. Αρχικά διατυπώθηκε από τον Rajakoski (1960) η υπόθεση ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου της αγελάδας γίνεται 'κατά κύματα', κάτι που αργότερα αποδείχθηκε ότι ισχύει και στα πρόβατα (Smeaton και Robertson 1971, Mattner και Braden 1972, Brand και de Jong 1973). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές υποστήριξαν ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων γίνεται τυχαία (Driancourt και συν. 1985b), είναι ασύγχρονη (Turnbull και συν. 1977), διαρκής και ανεξάρτητη του σταδίου του οιστρικού κύκλου (Lahlou-Kassi και Mariana 1984, Yenikoye και συν. 1989). Στα πρόβατα το κύμα ανάπτυξης ωοθυλακίων (follicular wave) απαρτίζεται από μια ομάδα μικρών τριτογενών ωοθυλακίων που αναδύονται (emerge) και αναπτύσσονται ταυτόχρονα από τη διάμετρο των 1-3 mm έως εκείνη των 4-12 mm (Noël και συν. 1993, Ravindra και συν. 1994, Ginther και συν. 1995, Souza και συν. 1997, Bartlewski και συν. 1999a, Evans και συν. 2000, Vinales και συν. 2001, Duggavathi και συν. 2003).

Ο αριθμός των κυμάτων ανάπτυξης στη διάρκεια ενός οιστρικού κύκλου δεν είναι σταθερός. Παρατηρήσεις με υπερηχογραφία ή λαπαροσκόπηση έδειξαν ότι ο αριθμός των κυμάτων μπορεί να παραλλάσσει από 2 έως 6 και με περιοδικότητα από 3 έως 6 ημέρες [2 ή 3 κύματα (Noël και συν. 1993, Ginther και συν. 1995, Bister και συν. 1999, Evans και συν. 2000), 4 κύματα (Ginther και συν. 1995, Souza και συν. 1998, Bartlewski και συν. 1999a, Evans και συν. 2000), 5 κύματα (Ginther και συν. 1995), 6 κύματα (Ginther και συν. 1995)]. Η διακύμανση του αριθμού των κυμάτων αποδίδεται σε γενετικούς (φυλή), περιβαλλοντικούς και διαχειριστικούς παράγοντες. Τα κύματα ανάπτυξης εμφανίζονται τόσο κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (συνήθως 2 ή 3 κύματα) όσο και κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του οιστρικού κύκλου (1 κύμα). Όλα τα ωοθυλάκια των κυμάτων της ωχρινικής φάσης μετατρέπονται σε ατρητικά, ενώ ένα ή περισσότερα από τα ωοθυλάκια της ωοθυλακικής φάσης θα ρηχθούν (Bister και συν. 1999). Τα ωοθυλάκια αναπτύσσονται κατά κύματα στην άνοιστρη περίοδο όπως και κατά τη διάρκεια της ένοιστρης περιόδου (Noël και συν. 1993, Souza και συν. 1996, Bister και συν. 1999, Bartlewski και συν. 1998, 2000, Huchkowsky και συν. 2002). Το ίδιο συμβαίνει και κατά τη μετάβαση από την άνοιστρη

στην ένοιστρο η περίοδο (Bartlewski και συν. 1999b), αλλά όχι και κατά τη μετάβαση από την ένοιστρο στην άνοιστρο η περίοδο (Bartlewski και συν. 1999c).

Η εμφάνιση των κυμάτων προκαλείται από και συμπίπτει με παροδικές και αιφνίδιες αυξήσεις της συγκέντρωσης της FSH και της οιστραδιόλης τόσο κατά την ένοιστρο (Ginther και συν. 1995, Souza και συν. 1998, Bartlewski και συν. 1999a, Evans και συν. 2002), όσο και κατά την άνοιστρο η περίοδο (Bister και συν. 1999, Bartlewski και συν. 1998, 2000, Evans και συν. 2001).

Στις προβατίνες η ανάπτυξη των μικρών τριτογενών ωοθυλακίων περιλαμβάνει τρία στάδια: την προεπιλογή, την επιλογή και την κυριαρχία (van den Hurk και Zhao 2005). Μόλις τα μικρά τριτογενή ωοθυλάκια φτάσουν στο μέγεθος των 2 mm (βασική ανάπτυξη) (Driancourt και συν. 1985b, van den Hurk και Zhao 2005) μπορούν να ανταποκριθούν στις αλλαγές της συγκέντρωσης των γοναδοτροπινών και μετά από μια παροδική αύξηση της FSH (για 2 έως 3 ημέρες) προεπιλέγονται για περαιτέρω ανάπτυξη (ανάδυση κύματος) (McNeilly και συν. 1992, Ginther και συν. 1995, Bartlewski και συν. 1999a, Webb και συν. 1999). Ο αριθμός των ωοθυλακίων που προεπιλέγονται ποικίλλει μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους. Η FSH σε σχέση με την LH παίζει σημαντικότερο ρόλο στην προεπιλογή των ωοθυλακίων, ενώ η LH είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των ωοθυλακίων μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο (Webb και συν. 1999). Για την προεπιλογή των ωοθυλακίων, πέρα από την αυξημένη συγκέντρωση FSH, είναι απαραίτητη και η αυξημένη συγκέντρωση ακτιβίνης, ανασταλτίνης και του IGF-I. Η FSH διεγείρει την παραγωγή της οιστραδιόλης και της ανασταλτίνης όπως και, μέσω της εξασθένισης της παραγωγής του IGFBP-2, την παραγωγή του IGF-I. Ο IGF-I, η ακτιβίνη, ο BMPs και ο EGF συντονίζουν την παραγωγή οιστραδιόλης που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ωοθυλακίων (Bister και συν. 1999). Η LH και η ανασταλτίνη διεγείρουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου των οποίων η σύνθεση ελέγχεται επιπλέον από τη δράση των IGF-I, ακτιβίνης, BMPs και EGF (van den Hurk και Zhao 2005)

Τα ωοθυλάκια που προεπιλέχθηκαν αναπτύσσονται για 2 έως 3 ημέρες μέχρι ένα (ή περισσότερα από αυτά) να επιλεγεί(ούν) και να ωριμάσει(ουν) περαιτέρω αποτελώντας το(α) κυρίαρχο(α) (dominant) ωοθυλάκιο(α) (Fortune 1994, Driancourt 2001), ενώ τα υπόλοιπα (υποτελή-subordinates) παλινδρομούν και εκφυλίζονται. Ο μηχανισμός επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος, αλλά φαίνεται ότι καθοριστικός παράγοντας είναι η ευαισθησία του ωοθυλακίου στις αλλαγές της συγκέντρωσης της FSH. Η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου λαμβάνει χώρα όταν η συγκέντρωση της FSH μειωθεί κάτω από ένα

συγκεκριμένο όριο. Η ωρίμανση του ωοθυλακίου χαρακτηρίζεται από μείωση της εξάρτησής του από την FSH και αύξηση της εξάρτησής του από την LH. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως αποτελεί μέρος του μηχανισμού μέσω του οποίου επιλέγονται τα ωοθυλάκια που συνεχίζουν να αναπτύσσονται (Campbell και συν. 1995, 1999, Webb και συν. 1999). Επιπλέον, αυτή η στροφή της εξάρτησης των ωοθυλακίων από την FSH στην LH μπορεί να αποτελεί μέρος του μηχανισμού αντοχής στη χαμηλή συγκέντρωση FSH κατά την ωοθυλακική φάση (Campbell και συν. 1995). Η κυριαρχία είναι αποτέλεσμα της αυξημένης συγκέντρωσης υποδοχέων FSH και αυξημένου αριθμού κοκκωδών κυττάρων που επιτρέπουν στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο να αξιοποιεί ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις FSH (Hillier 1994). Εκτός της συγκέντρωσης της FSH, τα ίδια τα κυρίαρχα ωοθυλάκια συμμετέχουν στη διαδικασία της επιλογής, μειώνοντας περαιτέρω την ευαισθησία των υποτελών στις γοναδοτροπίνες. Τα κυρίαρχα ωοθυλάκια αναπτύσσονται, παράγουν και διοχετεύουν στη συστηματική κυκλοφορία οιστραδιόλη και ανασταλτίνη, οι οποίες μειώνουν περαιτέρω τη συγκέντρωση της FSH σε βαθμό που η αξιοποίησή της από τα υποτελή να είναι αδύνατη (Clarke και συν. 1986, Campbell και συν. 1991, 1995, Mann και συν. 1992). Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του IGF-I, ο οποίος προκαλεί το σχηματισμό υποδοχέων για την FSH στα κοκκώδη κύτταρα και για την LH στα κύτταρα της έσω θήκης του κυρίαρχου ωοθυλακίου, γεγονός που το καθιστά περισσότερο ευαίσθητο στη χαμηλή συγκέντρωση της FSH και ικανό να ανταποκριθεί στην LH (Webb και συν. 1999, Garcia 2002, van den Hurk και Zhao 2005). Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο υπό την επίδραση της LH αναπτύσσεται ταχέως και γίνεται μεγαλύτερο από τα υποτελή, αποτελώντας το ώριμο ωοθυλάκιο (van den Hurk και Zhao, 2005). Κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου, το ώριμο και το μεγαλύτερο υποτελές ωοθυλάκιο μπορούν να αποκτήσουν διάμετρο 5 έως 7 και 3 έως 5 mm, αντίστοιχα (Ginther και συν. 1995, Bartlewski και συν. 1999a, Evans και συν. 2000).

Οι διαδικασίες που διέπουν την ωρίμανση / κυριαρχία των ωοθυλακίων στα πρόβατα δεν έχουν διευκρινιστεί στο βαθμό που έχει γίνει στις αγελάδες. Πιθανότατα αυτό σχετίζεται με παράγοντες όπως είναι το στάδιο της αναπαραγωγικής περιόδου, η φυλή και η εποχή του έτους (Evans 2003). Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα κυρίαρχα ωοθυλάκια των προβατίνων ωριμάζουν (Ravindra και συν. 1994, Ginther και συν. 1995, Rubianes και συν. 1997, Evans και συν. 2000, 2002, Gonzalez-Bulnes και συν. 2001, Evans 2003), ενώ άλλοι υποστηρίζουν το αντίθετο (Leyva και συν. 1998, Bartlewski και συν. 1999a, Flynn και συν. 2000). Η ωρίμανση του κυρίαρχου ωοθυλακίου ενισχύεται τουλάχιστον από δυο τοπικούς παράγοντες που είναι ο IGF-I, ο

ο οποίος διεγείρει το σχηματισμό υποδοχέων για την LH, και ένας παράγοντας (VEGF), που προάγει την αγγειογένεση. Η αυξημένη αγγείωση συμβάλλει στο να τροφοδοτηθεί το ωοθυλάκιο με περισσότερη FSH, LH, θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και αυξητικούς παράγοντες ώστε να αναπτυχθεί μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο.

1.2.5 Απόπτωση- Ατρησία

Η νέκρωση και η απόπτωση αποτελούν δύο ξεχωριστούς τύπους κυτταρικού θανάτου. Τυπικά χαρακτηριστικά της νέκρωσης αποτελούν η διάσπαση των μεμβρανών, η υποξία και η εξάντληση του ATP, η μεταβολική κατάρρευση, η διόγκωση και η ρήξη του κυττάρου (Hurwitz και Adashi 1993). Η απόπτωση είναι ένας τύπος προδιαγεγραμμένου κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης και ανακατασκευής των ιστών. Χαρακτηρίζεται από σύνθεση μακρομοριακών πρωτεϊνών, κατακερματισμό ολιγονουκλεοτιδίων, πυρηνική συμύκνωση, κυτταροπλασματική συρρίκνωση και διαχωρισμό των διακυτταρικών συνδέσεων (Murdoch 1995).

Κατά τη διάρκεια της ωογένεσης με την έναρξη των μειωτικών διαιρέσεων ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων μειώνεται απότομα, μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης (Reynaud και Driancourt 2000). Από τη στιγμή του σχηματισμού της ‘δεξαμενής’ των αρχέγονων ωοθυλακίων και έπειτα, η πλειονότητα των ωοθυλακίων (>90%) υπόκειται σε μια αμετάκλητη διαδικασία εκφύλισης που ονομάζεται ατρησία ωοθυλακίων (Senger 2003). Η ατρησία αναφέρεται στη σύγκλειση ή την εξαφάνιση του άντρου, η οποία τελικά οδηγεί στην εκφύλιση του ωοθυλακίου. Η ατρησία μπορεί να παρατηρηθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της ωοθυλακιογένεσης και είναι κυρίως το αποτέλεσμα της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων στα αρχέγονα και αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Murdoch 1995, Reynaud και Driancourt 2000, Rosales-Torres και συν. 2000). Επιπλέον, η ατρησία των μεγάλων τριτογενών και προωοθυλακιορρηκτικών είναι επακόλουθο και της νέκρωσης (Rosales-Torres και συν. 2000). Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται διάφοροι τρόποι κατάταξης των υγιών και ατρητικών ωοθυλακίων σύμφωνα με τη μικροσκοπική ή και τη μακροσκοπική εικόνα τους (Hay και συν. 1976, Moor και συν. 1978, Jorio και συν. 1991, Blondin και συν. 1996, Rosales-Torres και συν. 2000).

Η ατρησία των ωοθυλακίων παρατηρείται για πρώτη φορά σε έμβρυα προβάτων ηλικίας 3 μηνών, με εκφύλιση του ωοκυττάρου (Jorio και συν. 1991). Κατά τη γέννηση συνήθως δεν παρατηρούνται σαφή στοιχεία ατρησίας, παρότι έχει αναφερθεί ατρησία σε

αναπτυσσόμενα και σε τριτογενή ωοθυλάκια στη ζώνη μεταξύ της φλοιώδους και της μυελώδους ουσίας της ωοθήκης (Takeva και συν. 1997). Τα πρώτα στάδια ατρησίας παρατηρούνται εκ νέου σε αρνιά ηλικίας 4 εβδομάδων (Kennedy και συν. 1974, Tassell και συν. 1978, Sonjaya και Driancourt 1987) και πιθανότατα οφείλονται στην ανεπαρκή συγκέντρωση των γοναδοτροπινών που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων πέραν του μεγέθους του 1 mm. Αργότερα, σε ηλικία 8 έως 16 εβδομάδων αυξάνεται ο αριθμός των ωοθυλακίων που βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια ατρησίας (Tassell και συν. 1978, Jorio και συν. 1991, Takeva, και συν. 1997). Σε αρνιά ηλικίας 1-2 μηνών ο αυξημένος αριθμός ατρητικών ωοθυλακίων δε σχετίζεται με το συνολικό αριθμό των φυσιολογικών ωοθυλακίων, υποδηλώνοντας ότι σε αυτήν την ηλικία η ατρησία προκαλείται από κάποιους παράγοντες που σχετίζονται με την ηλικία και το γενότυπο (Jorio και συν. 1991). Η εμφάνιση της ατρησίας σε αμνάδες συμπίπτει με την εμφάνιση ωοθυλακίων διαμέτρου $>1,5$ mm (Sonjaya και Driancourt 1987) όπως και στις προβατίνες (Turnbull και συν. 1977).

Ωστόσο, η διαδικασία της ατρησίας, σύμφωνα με κάποιες έρευνες, μπορεί υπό ορισμένες συνθήκες να ανασταλεί. Η χορήγηση γοναδοτροπινών σε αμνάδες (Worthington και Kennedy, 1979, Tassell και Kennedy, 1980) και άνηβες μοσχίδες (Monniaux και συν., 1984) αυξάνει το μέγεθος ή τον αριθμό των ωοθυλακίων είτε προλαμβάνοντας την ατρησία και επιτρέποντας στα ωοθυλάκια να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους, είτε απλά προάγοντας την ανάπτυξη των ωοθυλακίων.

1.2.6 Ωχρο σωματίο και ωχρινικοί σχηματισμοί σε αμνάδες

Το ωχρο σωματίο αναπτύσσεται από το τοίχωμα του ρηχθέντος ωοθυλακίου με τη μετατροπή των κυττάρων της έσω θήκης και των κοκκωδών κυττάρων σε μεγάλα και μικρά ωχρινικά κύτταρα, αντίστοιχα (Senger 2003).

Σε αγελάδες και μοσχίδες έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός ωχρινικού ιστού μετά από τεχνητή ρήξη του τοιχώματος του ωοθυλακίου, που επιτυγχάνεται με αναρρόφηση του περιεχομένου του (CL-like structures). Αυτός ο σχηματισμός μπορεί να συνυπάρχει με το φυσιολογικό ωχρο σωματίο και παρουσιάζει μέγεθος, παραγωγή προγεστερόνης και διάρκεια ζωής μικρότερη ή ίση με τη φυσιολογική (Amiridis και συν. 2000, Petyim και συν. 2000, 2001, 2003).

Σε αμνάδες δεν έχουν βρεθεί πλήρως αναπτυγμένοι ωχρινικοί σχηματισμοί (ωχρο σωματίο) πριν την εμφάνιση της πρώτης ωοθυλακιορρηξίας. Ωστόσο, έχει ανιχνευθεί ωχρινικός ιστός εμπεδωμένος στο στρώμα συνδετικού ιστού της φλοιώδους

ουσίας της ωοθήκης, ο οποίος δεν είναι ορατός μακροσκοπικά (Berardinelli και συν. 1980). Αυτός ο ωχρινικός ιστός είναι μεμονωμένος, δε συνοδεύεται από στίγμα και εντοπίζεται στην ωοθήκη τη 2^η ημέρα μετά από μια παροδική άνοδο της συγκέντρωσης της προγεστερόνης. Σύμφωνα όμως με τους Keisler και συν. (1983) την 1^η ημέρα της παροδικής αύξησης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης ανιχνεύονται στην ωοθήκη περισσότεροι (2 ή 3) ωχρινικοί σχηματισμοί. Επίσης, συμπληρωματικά (accessory) ωχρά σωμάτια παρατηρούνται συχνά σε ωοθήκες αμνάδων ηλικίας 5 έως 6 μηνών και θεωρούνται άρρηκτα, μερικώς ωχρινοποιημένα ωοθυλάκια. Η εμφάνιση των σχηματισμών αυτών συμπίπτει με αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης στον ορό του αίματος σε επίπεδα >1 ng/ml (Takeva και συν. 1997, Bartlewski και συν. 2002).

Σε αμνάδες ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων ή και σχηματισμός ωχρών σωμάτων μπορεί να προκληθεί μετά από χορήγηση γοναδοτροπινών. Για παράδειγμα, η χορήγηση PMSG σε αμνάδες ηλικίας 5 έως 6 εβδομάδων διεγείρει την ανάπτυξη και την ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων (Worthington και Kennedy 1979). Επίσης, η μεμονωμένη ή συνδυασμένη χορήγηση γοναδοτροπινών (PMSG, hCG) προκαλεί ωοθυλακιορρηξία και σχηματισμό ωχρού σωμάτιου σε αρνιά ηλικίας 5 έως 16 εβδομάδων (Goerke και Dutt 1975, Troupson και συν. 1977, Worthington και Kennedy 1979, Sonjaya και Driancourt 1989). Το ωχρό σωματίο που σχηματίζεται σε αμνάδες μετά την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας είναι πλήρως ενεργό για 60 ημέρες τουλάχιστον, πιθανότατα λόγω μειωμένης παραγωγής ή και έκκρισης προσταγλανδίνης $F_{2\alpha}$ από τη μήτρα. (Troupson και συν. 1977).

1.3 Συλλογή ωαρίων

Τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η χρησιμοποίηση άνηβων ζώων ως δότες ωαρίων για την *in vitro* παραγωγή εμβρύων, με σκοπό την επιτάχυνση του ρυθμού γενετικής βελτίωσης μέσω της μείωσης του μεσοδιαστήματος των γενεών (Duby και συν. 1996). Αρχικά οι προσπάθειες αυτές βασίστηκαν στο γεγονός ότι σε κάποιες ηλικίες οι ωοθήκες αμνάδων, εριφίων και άνηβων μοσχίδων περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων από ότι των ενήλικων ζώων, αποδίδοντας συνολικά μεγαλύτερο αριθμό συλλεγόμενων ωαρίων (Sonjaya και Driancourt 1987, 1989, Ledda και συν. 1997, Gandolfi και συν. 1998, Koeman και συν. 2003, Baldassarre και Karatzas 2004).

Ωάρια μπορούν να συλλεχθούν από πτωματικές ωοθήκες ή από ωοθήκες που αφαιρέθηκαν χειρουργικά ή με αναρρόφηση ωοθυλακίων μετά από λαπαροτομή ή με

λαπαροσκοπική τεχνική. Οι τρεις πρώτες τεχνικές θεωρείται ότι αποδίδουν περισσότερα και καλύτερης ποιότητας ωάρια σε σχέση με την τελευταία (Shirazi και συν. 2005).

Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων μετά από λαπαροτομή είναι απλή και οδηγεί σε συλλογή μεγάλου αριθμού ωαρίων ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που η ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι μεγάλη, όπως συμβαίνει μετά από ορμονική διέγερση των ωοθηκών. Έχει υποστηριχθεί ότι η λαπαροσκοπική τεχνική είναι περισσότερο κατάλληλη στις περιπτώσεις που δεν έχει αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός ωοθυλακίων στις ωοθήκες (Armstrong και συν. 1997). Η λαπαροσκοπική τεχνική έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοστεί κατ' επανάληψη, επειδή ελαχιστοποιείται η πιθανότητα δημιουργίας συμφύσεων που είναι συχνές μετά τη διενέργεια λαπαροτομής (McKelvey και συν. 1986, Baldassarre και συν. 1996, Anel και συν. 1997, Stangl και συν. 1999). Εντούτοις, στην πλειονότητα των ερευνητικών εργασιών έχει εφαρμοστεί η τεχνική της λαπαροτομής και ως δότριες ωαρίων έχουν χρησιμοποιηθεί αμνάδες πολύ μικρής ηλικίας (30 ημερών) (Tervit 1996, Armstrong και συν. 1997, Ptak και συν. 1999, 2003, Kelly και συν. 2005).

1.3.1 Αναρρόφηση ωοθυλακίων από αμνάδες

1.3.1.1 Ορμονική αγωγή

Κατά τη συλλογή ωαρίων *in vivo* μπορούν να αναρροφηθούν μόνο τα τριτογενή ωοθυλάκια, που είναι τα μόνα ορατά στην επιφάνεια της ωοθήκης. Συνήθως πριν από την αναρρόφηση των ωοθυλακίων άνηβων ζώων προηγείται ορμονική αγωγή με στόχο: (α) την αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των διαθέσιμων για αναρρόφηση ωοθυλακίων, (β) τη συλλογή ωαρίων που θα βρίσκονται σε σύγχρονο στάδιο ανάπτυξης και (γ) τη βελτίωση του ποσοστού *in vitro* παραγωγής εμβρύων (Armstrong 2001).

Γενικά, τα άνηβα ζώα χρειάζονται μικρότερες δόσεις ορμονών για την πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων σε σχέση με τα ενήλικα (Armstrong και συν. 1997, Armstrong 2001). Αυτό σχετίζεται καταρχήν με το μικρότερο σωματικό βάρος τους, αλλά ίσως και με το ότι η ανταπόκριση των ωοθηκών άνηβων ζώων στη χορήγηση γοναδοτροπινών είναι εντονότερη πριν από την εγκατάσταση των ενδοωοθηκικών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο του δείκτη ωοθυλακιορρηξιών. Ωστόσο, τα τριτογενή ωοθυλάκια των αμνάδων δεν ανταποκρίνονται στην εξωγενή χορήγηση γοναδοτροπινών πριν από την ηλικία των 2 έως 4 εβδομάδων (Mansour



1959), δηλαδή πριν αναπτυχθούν επαρκώς τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου (Kennedy και συν. 1974).

Τα ορμονικά πρωτόκολλα πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων (ΠΠΑΩ) που εφαρμόζονται πριν την αναρρόφηση, τόσο σε αμνάδες όσο και σε άνηβες μοσχίδες, βασίζονται σε αυτά που χρησιμοποιούνται στα ενήλικα ζώα και διαρκούν συνήθως 2 έως 4 ημέρες. Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα, η ΠΠΑΩ σε αμνάδες μπορεί να γίνει α) με μία χορήγηση γοναδοτροπίνης (eCG ή FSH) (Anel και συν. 1997, Kelly και συν. 2005), β) με περισσότερες χορηγήσεις ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης σε τακτά χρονικά διαστήματα (FSH) (Ptak και συν. 1999, Kelly και συν. 2005) και γ) με συνδυασμό των δύο γοναδοτροπινών με ή χωρίς χορήγηση οιστραδιόλης (Armstrong και συν. 1994, Ledda, και συν. 1999b, Ptak και συν. 1999, Salamone και συν. 2001, Morton και συν. 2004, 2005a, Kelly και συν. 2005). Αξιοσημείωτο είναι ότι η ιδανική δόση των γοναδοτροπινών για την ΠΠΑΩ δεν έχει ακόμη προσδιορισθεί και ως εκ τούτου διερευνώνται διάφορα ορμονικά πρωτόκολλα. Ο χρόνος συλλογής των ωαρίων ποικίλλει από 24 έως 96 ώρες μετά την έναρξη της ορμονικής αγωγής (O'Brien και συν. 1997b, Ledda και συν. 1999b, Ptak και συν. 1999). Σε πειραματισμούς έχει βρεθεί ότι το ποσοστό των παραγόμενων βλαστοκύστεων (IVEP) είναι μεγαλύτερο όταν η συλλογή των ωαρίων γίνεται 48 ώρες μετά την έναρξη της ορμονικής αγωγής (12 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση FSH) (Kelly και συν. 2005).

Η ανταπόκριση των ωοθηκών των αμνάδων στην εξωγενή χορήγηση γοναδοτροπινών θεωρείται δεδομένη εδώ και πολλά χρόνια (Mansour 1959, Worthington και Kennedy 1979). Όμως η ανταπόκριση ποικίλλει και φαίνεται ότι εξαρτάται από τη φυλή, την ηλικία, το άτομο, την ορμονική αγωγή και τη διατροφή (Sonjaya και Driancourt 1987, Ptak και συν. 1999, 2003, O'Callaghan και συν. 2000, Taneja και συν. 2000). Όπως έχει αποδειχθεί σε αμνάδες (Sonjaya και Driancourt 1987, Armstrong και συν. 1997, Meikle και συν. 1998) και άνηβες μοσχίδες (Revel και συν. 1995, Armstrong και συν. 1997, Taneja και συν. 2000), ο πληθυσμός και το στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων (follicular status) τη στιγμή της έναρξης της ορμονικής αγωγής παίζει σημαντικό ρόλο στο αποτέλεσμα της ορμονικής διέγερσης των ωοθηκών.

Έχει υποστηριχθεί ότι οι εξωγενείς γοναδοτροπίνες εκτός από την αύξηση του μεγέθους των ωοθυλακίων, βελτιώνουν και την ικανότητα ανάπτυξης των συλλεγόμενων ωαρίων (Pugh και συν. 1991, Martino και συν. 1995, Armstrong και συν. 1997, Armstrong 2001) προάγοντας την κυτταροπλασματική ωρίμανσή τους και καθιστώντας δυνατό τον έλεγχο του χρόνου της ωρίμανσης του πυρήνα τους. Κατ'

άλλους η ορμονική διέγερση δεν επηρεάζει την ικανότητα ανάπτυξης των ωοκυττάρων (Revel και συν. 1995, Mogas και συν. 1997, O' Brien και συν. 1997b, Ledda και συν. 1999b, Morton και συν. 2005b) ή ακόμη μπορεί και να την επηρεάσει αρνητικά (Moor και συν. 1985, Foote και Ellington 1988).

Στην ορμονική αγωγή που εφαρμόζεται πριν από τη συλλογή ωαρίων συνήθως συμπεριλαμβάνεται και η χορήγηση προγεστερόνης ή προγεσταγόνων με τη μορφή σπόγγων ή εμφυτευμάτων (Earl και συν. 1995, Looney και συν. 1995, O'Brien και συν. 1996, 1997a, Armstrong και συν. 1997, Kühholzer και Brem 1999, Ledda και συν. 1999b, Ptak και συν. 1999, 2003, Morton και συν. 2004, 2005a, Kelly και συν. 2005). Η χρήση τους αποσκοπεί στην ευαισθητοποίηση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών και στην παρεμπόδιση της ωρίμανσης των ωαρίων και της ωοθυλακιορρηξίας υπό την επίδραση των γοναδοτροπινών. Έχει παρατηρηθεί ότι ο αριθμός των ωοθυλακίων είναι μικρός υπό την επίδραση των προγεσταγόνων, ενώ αυξάνεται αμέσως μετά την αφαίρεση των σπόγγων. Αυτό υποδηλώνει ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων που προκαλείται από τη χορήγηση γοναδοτροπινών εξασθενεί από την ταυτόχρονη δράση των προγεσταγόνων (Armstrong και συν. 1997). Σύμφωνα όμως με τους Kelly και συν. (2005), ο ρόλος των προγεσταγόνων στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι σύνθετος και πιθανότατα σχετίζεται με τη συχνότητα χορήγησης της FSH.

Στην επιλογή της ορμονικής αγωγής που θα εφαρμοστεί στις δότριες ωαρίων πρωτεύοντα ρόλο παίζει το εάν τα ωάρια θα ωριμάσουν *in vivo* πριν από τη συλλογή τους ή *in vitro*. Τα πρωτόκολλα ορμονικής αγωγής που στοχεύουν στην *in vivo* ωρίμανση περιλαμβάνουν μια χορήγηση GnRH ή hCG ή συνδυασμό FSH και LH. Έχει αποδειχθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η *in vivo* ωρίμανση οδηγεί στη συλλογή ωαρίων σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης, τα οποία κυμαίνονται από το βλαστικό κυστίδιο μέχρι τη Μετάφαση II. Η δυσκολία προσδιορισμού του σταδίου ωρίμανσης του πυρήνα στα συλλεγόμενα ωάρια έχει ως συνέπεια την αδυναμία καθορισμού του καταλληλότερου χρόνου για την IVF (Earl και συν. 1995, Ptak και συν. 1999, Armstrong και συν. 1997). Έρευνες έδειξαν ότι ένα μικρό ποσοστό ωαρίων που προέρχονται από αμνάδες και άνηβες μοσχίδες ωριμάζουν *in vivo*, αποδίδοντας τελικά μικρό αριθμό βλαστοκύστεων σε σχέση με τα ωάρια που ωριμάζουν *in vitro* (Duby και συν. 1995, Ptak και συν. 1999). Παρότι τα ωάρια που ωριμάζουν *in vivo* ωριμάζουν σε φυσιολογικό ενδο-ωοθυλακικό μικροπεριβάλλον, φαίνεται ότι ειδικά στα ωοθυλάκια των άνηβων ζώων η ανάπτυξη των υποδοχέων των γοναδοτροπινών δεν είναι αρκετή για να υποστηρίξει την ωρίμανσή τους σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει μετά την ενήβωση (Revel και συν. 1995, Khatir και συν. 1996). Ο προηγούμενος ισχυρισμός ενισχύεται

κατόπιν παρατήρησης χρωματοσωμικών ανωμαλιών σε ωάρια άνηβων μοσχίδων που ωρίμασαν *in vivo* (Duby και συν. 1995).

1.3.1.2 Επιλογή δοτριών ωαρίων: φυλή, ηλικία και συχνότητα αναρρόφησης ωοθυλακίων

Η επιλογή των δοτριών ωαρίων γίνεται με βάση το γενετικό δυναμικό τους, την ηλικία και τη φυλή (Sonjaya και Driancourt 1987, Ptak και συν. 2003). Αναφορικά με το γενότυπο του ζώου, έχει βρεθεί ότι αμνάδες που προέρχονται από τους ίδιους γονείς παρουσιάζουν σχεδόν τις ίδιες αποδόσεις στην ανάπτυξη ωοθυλακίων μετά από ορμονική διέγερση των ωοθηκών. Επίσης, τα ωάρια που συλλέγονται από αυτές παρουσιάζουν την ίδια ικανότητα ανάπτυξης *in vitro*. Αυτή η ομοιογένεια των αδερφών αμνάδων ενισχύει την άποψη ότι τα κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά είναι εκείνα που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα και την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων (Ptak και συν. 2003).

Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε αμνάδες μετά από λαπαροτομή μπορεί να διενεργηθεί από την ηλικία των 30 έως 40 ημερών. Σε αυτή την ηλικία τα συλλεγόμενα ωάρια μπορούν να ωριμάσουν και να γονιμοποιηθούν *in vitro* (Ledda και συν. 1997, Ptak και συν. 1999). Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το εύρημα ότι από αμνάδες ηλικίας 30 έως 40 ημερών συλλέγονται περισσότερα ωάρια (30 έως 40 ωάρια/ ωοθήκη) από ότι από προβατίνες (5 έως 12 ωάρια/ ωοθήκη) (Ledda και συν. 1997). Ακολουθώντας το πρότυπο της ωοθυλακιογένεσης των αμνάδων σε διάφορες ηλικίες, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων μετά από ορμονική αγωγή είναι μεγάλη κατά τον 1^ο μήνα της ζωής και στη συνέχεια μειώνεται, παρουσιάζοντας μια μικρή αύξηση μετά τον 5^ο μήνα (Ptak και συν. 1999). Ενώ με την πάροδο της ηλικίας μειώνεται η ικανότητα ανταπόκρισης των ωοθηκών και το ποσοστό συλλογής ωαρίων, η ικανότητα ανάπτυξης *in vitro* των συλλεγόμενων ωαρίων αυξάνεται τόσο στις αμνάδες (Morton και συν. 2005a), όσο και στις άνηβες μοσχίδες (Presicce και συν. 1997) και τα ερίφια (Baldassarre και Karatzas 2004, Baldassarre και συν. 2004). Η ανταπόκριση των ωοθηκών στην ορμονική διέγερση φαίνεται να επηρεάζεται και από τη φυλή σε συνδυασμό με την ηλικία. Αμνάδες φυλών που χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη πολυδυμίας παρουσιάζουν καθυστερημένη ανταπόκριση σε σχέση με αυτές που ανήκουν σε φυλές με χαμηλό δείκτη (Tassell και συν. 1983, Sonjaya και Driancourt 1987).

Η συχνότητα με την οποία είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων από αμνάδες δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί

αναρρόφηση μια φορά σε αμνάδες διαφόρων ηλικιών (Earl και συν. 1995), μια φορά σε ηλικία 4 έως 5 εβδομάδων (Ptak και συν. 1999), έξι φορές κάθε 14 ημέρες αρχίζοντας από την ηλικία των 8 έως 9 εβδομάδων (Anel και συν. 1997) ή 3 έως 5 φορές ξεκινώντας από την ηλικία των 4 εβδομάδων (Ptak και συν. 2003). Φαίνεται ότι η ανάπτυξη ωοθυλακίων σε αμνάδες (Ptak και συν. 2003) και σε προβατίνες (Morton και συν. 2005b) επηρεάζεται αρνητικά εάν έχει προηγηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων σε μικρότερη ηλικία. Ωστόσο, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν και κατά πόσο οι προηγούμενες αναρροφήσεις επηρεάζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων μετά από ορμονική αγωγή ή εάν τελικά η ίδια η κατάσταση των ωοθυλακίων (πληθυσμός-διάμετρος) είναι εκείνη που καθορίζει το αποτέλεσμα.

1.4 Ικανότητα ανάπτυξης ωαρίων (oocyte developmental competence)

Η απόκτηση της ικανότητας ανάπτυξης των ωαρίων είναι μια συνεχής διαδικασία που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης και μπορεί να διαχωρισθεί σε τρία στάδια: (1) την ανάπτυξη του ωαρίου (oocyte growth), η οποία γίνεται κυρίως κατά την έναρξη της ωοθυλακιογένεσης (πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια), (2) την ενεργοποίηση του ωαρίου (oocyte capacitation), που περιλαμβάνει τις δομικές αλλαγές που υφίσταται το ωάριο κατά την ωρίμανση των ωοθυλακίων και ιδιαίτερα μετά την ωχρινόλυση και (3) την ωρίμανση του ωαρίου (oocyte maturation), η οποία αρχίζει μετά την προωθυλακιόρρηκτη έκκριση της LH στα προωθυλακιόρρηκτα ωοθυλάκια ή μετά την αφαίρεση του ωαρίου από το περιβάλλον του ωοθυλακίου που αναστέλλει την επανέναρξη της μείωσης (Mermillod και συν. 1999) (Διάγραμμα 1.1).

Τα ωάρια που συλλέγονται από μικρού ή μεσαίου μεγέθους ωοθυλάκια μηρυκαστικών έχουν, κατά κανόνα, περιορισμένη ικανότητα ανάπτυξης. Παρότι το 90% των ωαρίων συνήθως φτάνει στη Μετάφαση II μετά από *in vitro* ωρίμανση και το 70% αυτών γονιμοποιείται επιτυχώς *in vitro*, μόλις το 30 έως 40% του αρχικού αριθμού αναπτύσσεται τελικά μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης μετά από *in vitro* καλλιέργεια (Baldassarre και συν. 1996, Mermillod και συν. 1999, Lonergan και συν. 2003).

Η ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων άνηβων ζώων έχει ερευνηθεί εκτεταμένα. Από κάποιους έχει παρατηρηθεί μικρότερη ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων άνηβων μηρυκαστικών σε σχέση με των ενηλίκων (Revel και συν. 1995, Khatir και συν. 1996, O' Brien και συν. 1996, 1997b, Ledda και συν. 1997, Presicce και συν. 1997, Ptak και συν. 1999, Kochhar και συν. 2002), ενώ από άλλους έχει υποστηριχθεί ότι τα ωάρια

αναπτύσσονται το ίδιο ανεξάρτητα από την ηλικία της δότριας ωαρίων (Armstrong και συν. 1992, 1994, 1997, Irvine και συν. 1993, Mogas και συν. 1997, Izquierdo και συν. 2002, Koeman και συν. 2003). Επίσης, έχει υποστηριχθεί ότι τα έμβρυα που προέρχονται από ωάρια άνηβων μοσχίδων (Presicce και συν. 1997) και αμνάδων (O' Brien και συν. 1997b) αναπτύσσονται *in vitro* με αργότερο ρυθμό από τα έμβρυα που προέρχονται από ενήλικες δότριες. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι τα ωάρια αμνάδων που τελικά εξελίσσονται σε βλαστοκύστες μετά από IVF και IVC οδηγούν στο ίδιο ποσοστό γεννήσεων μετά από μεταφορά τους σε σχέση με τις βλαστοκύστες που παράγονται *in vitro* από ωάρια προβατίνων (O' Brien και συν. 1997b, Morton και συν. 2005a). Σε αντίθεση, έχει βρεθεί ότι το προαναφερθέν ποσοστό είναι μικρότερο μετά από μεταφορά εμβρύων που παρήχθησαν από ωάρια άνηβων ζώων (Armstrong και συν. 1992, Revel και συν. 1995, Ptak και συν. 1999). Στις έρευνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν αμνάδες διαφόρων ηλικιών γεγονός που ενισχύει ότι η ικανότητα παραγωγής εμβρύων και η επιβίωσή τους αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας των αμνάδων. Η άμεση σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων δεν είναι ασφαλής διότι έχουν χρησιμοποιηθεί ζώα που έχουν ή δεν έχουν υποβληθεί σε ορμονική αγωγή, όπως και διαφορετικά πρωτόκολλα *in vitro* καλλιέργειας. Είναι, επομένως, δύσκολο να προσδιοριστεί εάν η μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων αμνάδων οφείλεται στην αποτελεσματικότητα του συστήματος της *in vitro* καλλιέργειας ή στην ορμονική διέγερση των ωοθηκών ή τελικά στην ενδεχόμενη μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης αυτών των ωαρίων.

Η ικανότητα ωρίμανσης και ανάπτυξης σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος του ωαρίου, το οποίο με τη σειρά του σχετίζεται με το μέγεθος του ωοθυλακίου (Armstrong, 2001). Παρότι τα ωάρια των αμνάδων είναι μικρότερα από αυτά των προβατίνων, έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την επανέναρξη της μείωσης και να φτάνουν σε μεγάλο ποσοστό στο στάδιο της Μετάφασης II (Ledda και συν. 1997). Όμως, η ικανότητα αυτή συνδέεται στενά με τη διάμετρο του ωαρίου. Έχει διαπιστωθεί ότι ωάρια αμνάδων διαμέτρου 142 μm εμφανίζουν ωρίμανση του πυρήνα τους στο ίδιο ποσοστό σε σχέση με ωάρια προβατίνων της ίδιας διαμέτρου (Ledda και συν. 1999a). Η ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων αυξάνει με την αύξηση του μεγέθους του ωοθυλακίου σε προβατίνες και αμνάδες (Moog και Trounson 1977, Cognié και συν. 1998, Ledda και συν. 1999a, Mermillod και συν. 1999, van den Hurk και Zhao 2005) και μάλιστα φαίνεται να σχετίζεται με το γενότυπο του ζώου (Cognié και συν. 1998). Άλλοι παράγοντες που συμβάλουν στη μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων άνηβων ζώων σε σχέση με τα ενήλικα, εκτός της διαφοράς του μεγέθους των ωαρίων (Gandolfi

και συν. 1998, Ledda και συν. 1999a), είναι ο διαφορετικός τύπος πρωτεϊνικής σύνθεσης και ενεργειακού μεταβολισμού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης καθώς και η αυξημένη συχνότητα πολυσπερμίας μετά την IVF (O'Brien και συν. 1996, Kochhar και συν. 2002).

Εν τέλει, η ποιότητα του ωαρίου εκτιμάται από την ικανότητα να εξελίσσεται σε βλαστοκύστη καθώς και από την επιτυχή μεταφορά και επιβίωση αυτής μέχρι τη γέννηση υγιούς απογόνου. Ομοίως, η ποιότητα της βλαστοκύστης εκτιμάται από την ικανότητα επιβιώσής της μέχρι τέλους και τη γέννηση υγιούς απογόνου (Lonegan και συν. 2003).

1.4.1 Ωρίμανση ωαρίου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα ωάρια των αναπτυσσόμενων και ώριμων ωοθυλακίων παραμένουν στο στάδιο της διπλοταινίας της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, αποτελώντας τα πρωτοταγή ωοκύτταρα. Η επανέναρξη της μείωσης *in vivo* συμβαίνει μόνο μετά την προωθυλακιορρηκτική έκκριση της LH και μόνο σε πλήρως ανεπτυγμένα ωάρια που προέρχονται από ώριμα προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια. Κατά τη διάρκεια του διαστήματος που μεσολαβεί από την προωθυλακιορρηκτική έκκριση της LH μέχρι την ωοθυλακιορρηξία, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της ωρίμανσης του ωαρίου. Η διαδικασία αυτή είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο που περιλαμβάνει αλλαγές στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα και προετοιμάζει το ωάριο να υποστηρίξει τη γονιμοποίηση και τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Το ερέθισμα για την έναρξη της ωρίμανσης φαίνεται να προέρχεται από τα ωοθυλακικά κύτταρα, εφόσον υποδοχείς της LH δεν έχουν ανιχνευθεί στο ωάριο. Στην επανέναρξη της μείωσης συμμετέχουν, εκτός της προωθυλακιορρηκτικής έκκρισης της LH, διάφοροι παράγοντες όπως είναι οι MPF, MAPKs, MAS, το επίπεδο του cAMP κ.α. (Thibault και συν. 1987, van den Hurk και Zhao 2005).

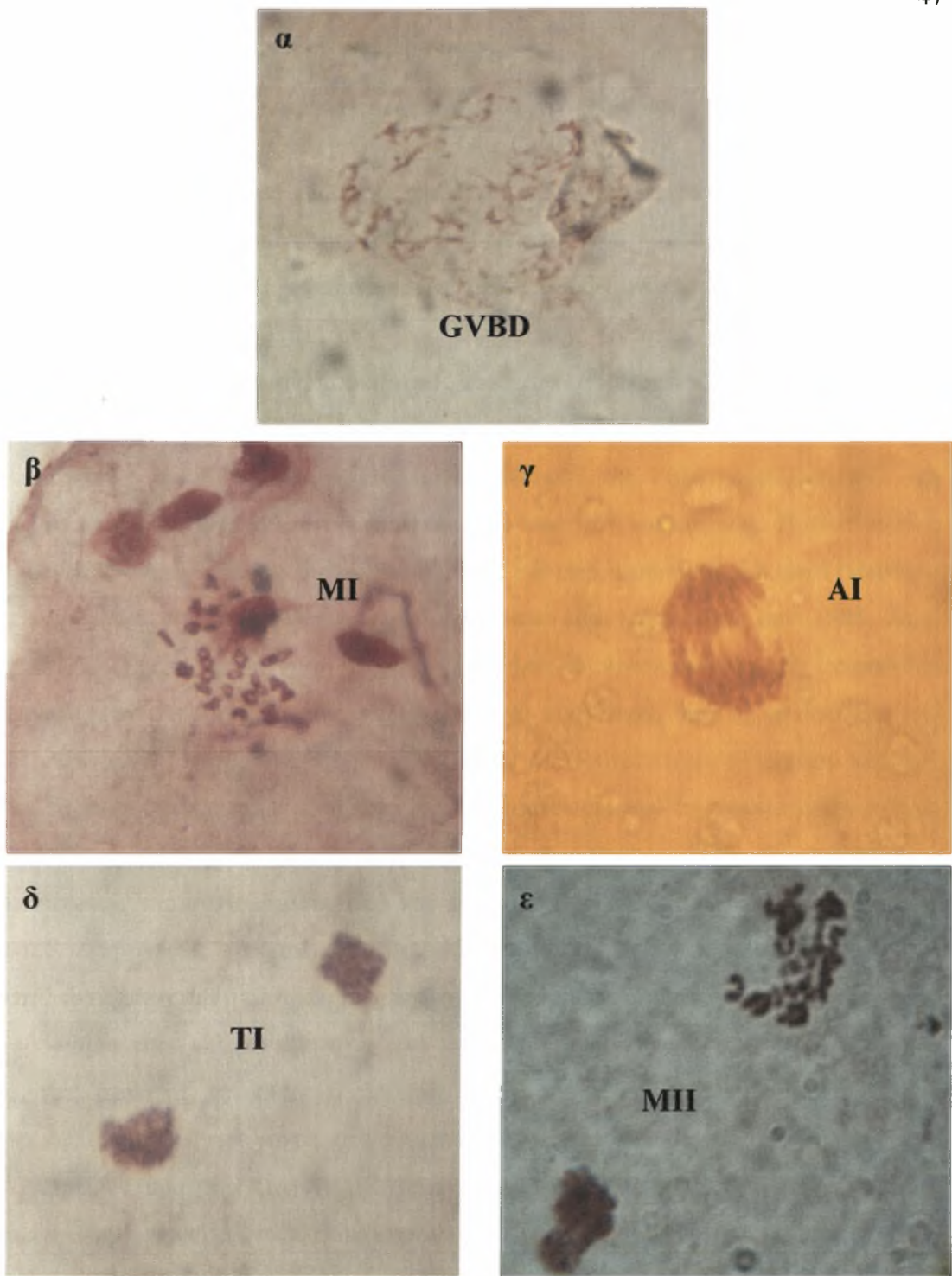
Η ωρίμανση του πυρήνα του ωαρίου περιλαμβάνει δύο κυτταρικές διαιρέσεις δίχως αντιγραφή του DNA, κατά τη μετάβασή του από το στάδιο του βλαστικού κυστίδιου (germinal vesicle, GV) σε αυτό της Μετάφασης II της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Το στάδιο GVBD αποτελεί την πρώτη ένδειξη επανέναρξης της μείωσης. Τα δευτεροταγή ωοκύτταρα παραμένουν στο στάδιο της Μετάφασης II μέχρι τη γονιμοποίηση, κατά την οποία το ερέθισμα της εισόδου του σπερματοζωαρίου διεγείρει την ολοκλήρωση της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης και την έναρξη της ανάπτυξης του εμβρύου (Thibault και συν. 1987, van den Hurk και Zhao 2005). *In vitro* η διάρκεια της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων προβατίνων είναι 24 ώρες περίπου ενώ των ωαρίων

αμνάδων 24 έως 26 ώρες (O'Brien και συν. 1996, Ledda και συν. 1997, Kochhar και συν. 2002) (Διάγραμμα 1.2).

Η κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωαρίου περιλαμβάνει όλες εκείνες τις δομικές και λειτουργικές αλλαγές, οι οποίες λαμβάνουν χώρα παράλληλα με την ωρίμανση του πυρήνα και οδηγούν στην ολοκλήρωση της δυνατότητας γονιμοποίησης και ανάπτυξης του εμβρύου που προκύπτει από αυτό (Thibault και συν. 1987, van den Hurk και Zhao 2005). Η εκτίμηση της προόδου της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης γίνεται έμμεσα με εκτίμηση παραμέτρων, όπως είναι η διόγκωση της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων που περιβάλλει το ωάριο, η αύξηση των διαστάσεων του περιλεκιθικού χώρου και - σε συνδυασμό με την ωρίμανση του πυρήνα - η έξοδος του πολικού σωματίου από το ωάριο (Kguir και συν. 1983).

Τα ωάρια τόσο των άνηβων όσο και των ενήλικων θηλαστικών αμέσως μετά την αφαίρεσή τους από τα ωοθυλάκια παρουσιάζουν αυτόματα επανέναρξη της ωρίμανσης του πυρήνα τους (Edwards 1965). Στην πλειονότητά τους μπορούν να φτάσουν στη Μετάφαση II μετά από 24ωρη *in vitro* ωρίμανση (Lonergan και συν. 2003). Η ωρίμανση του πυρήνα φαίνεται ότι γίνεται με τον ίδιο τρόπο *in vivo* και *in vitro* (Hytel και συν. 1986). Σε ό,τι αφορά στην *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων άνηβων ζώων, μπορεί να υπάρξει διαχωρισμός της ωρίμανσης του πυρήνα από την κυτταροπλασματική ωρίμανση. Πιο συγκεκριμένα, η ωρίμανση του πυρήνα μπορεί να ολοκληρωθεί με επιτυχία ενώ συγχρόνως η κυτταροπλασματική ωρίμανση να μην είναι φυσιολογική, διαταράσσοντας την όλη διαδικασία. (O'Brien και συν. 1996, Kochhar και συν. 2002). Ωστόσο, αυτός ο διαχωρισμός παρατηρείται και σε ωάρια ενήλικων ζώων που ωριμάζουν *in vitro* οδηγώντας σε μειωμένο ποσοστό παραγωγής εμβρύων (παραγωγή διπλάσιου ποσοστού βλαστοκύστεων από ωάρια που ωριμάζουν *in vivo*) (Lonergan και συν. 2003).

Η μη φυσιολογική ωρίμανση των ωαρίων, που σχετίζεται με την ηλικία της δότριας ωαρίων, περιλαμβάνει: (1) αδυναμία επανέναρξης της μείωσης ή ολοκλήρωσης της ωρίμανσης καταλήγοντας σε ωάρια που δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν και (2) διαταραχή της μειωτικής διαίρεσης των ωαρίων τα οποία, παρότι γονιμοποιούνται, παρουσιάζουν χρωματοσωμικές ανωμαλίες, οι οποίες διαταράσσουν τη βιωσιμότητα του εμβρύου (Armstrong 2001).



Διάγραμμα 1.2: Τα στάδια της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων και χρόνος που απαιτείται για το κάθε στάδιο σε προβατίνες και αμνάδες. Το μηδέν αποτελεί την έναρξη της IVM (Kochhar και συν. 2002).

ΕΙΚΟΝΑ	ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ	ΧΡΟΝΟΣ (ΩΡΕΣ)	
		Προβατίνες	Αμνάδες
	Βλαστικό κυστίδιο (GV)	0-4	0-6
α	GVBD	4-6	6-8
β	Μετάφαση I (MI)	6-12	8-12
γ	Ανάφαση I (AI)	12-16	12-16
δ	Τελόφαση I (TI)	16-20	16-22
ε	Μετάφαση II (MII)	20-24	22-26

1.5 Ενδοκρινολογία γεννητικού συστήματος

1.5.1 Ενδοκρινολογία από τη γέννηση μέχρι και την ενήβωση

Οι αναπτυσσόμενες ωοθήκες εμβρύου προβάτου αποκτούν τη δυνατότητα σύνθεσης στεροειδών ορμονών από την 30^η έως την 70^η ημέρα της εμβρυικής ζωής (Quirke και συν. 2001). Οι γοναδοτροπίνες (LH & FSH) συνθέτονται από την υπόφυση του εμβρύου μετά την 60^η με 80^η μέρα της κύησης (Kennedy και συν. 1974) και ανιχνεύονται στην κυκλοφορία του αίματος τόσο του εμβρύου όσο και του νεογέννητου αρνιού (Foster και συν. 1972, Padmanabhan και συν. 1992b, Phillips και συν. 1992).

Είναι γνωστό ότι στις προβατίνες η έκκριση της FSH ρυθμίζεται από την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση της οιστραδιόλης και της ανασταλτίνης. Η ανασταλτίνη ρυθμίζει μακροπρόθεσμα τη συγκέντρωση της FSH ενώ η οιστραδιόλη είναι υπεύθυνη για τις ρυθμίσεις της σε πολύ περιορισμένα χρονικά όρια (Martin και συν. 1988, Baird και συν. 1991). Από τη γέννηση μέχρι την ενήβωση οι συγκεντρώσεις των στεροειδών ορμονών (προγεστερόνης και οιστραδιόλης) είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες που παρατηρούνται σε προβατίνες που υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομή (Troupson και συν. 1974a, b), παρουσιάζοντας διακυμάνσεις που εξαρτώνται από τη φυλή και την ηλικία. Για παράδειγμα, στις αμνάδες φυλής Suffolk παρατηρείται βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης από την ηλικία των 6 εβδομάδων έως την ενήβωση ($3,2 \pm 0,6$ έως $6,8 \pm 1,1$ pg/ml) (Bartlewski και συν. 2006). Η συγκέντρωση της ανασταλτίνης αποκτά τη μέγιστη τιμή της τη 2^η εβδομάδα και έπειτα μειώνεται μέχρι τη 15^η εβδομάδα της ζωής ανεξάρτητα από τη φυλή (Braw-Tal και συν. 1993). Παρόλα αυτά στις αμνάδες το κλασικό πρότυπο ρύθμισης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στεροειδών και FSH, που ισχύει στα ενήλικα ζώα, δε φαίνεται να είναι ξεκάθαρο. Έτσι, ενώ μπορεί να ερμηνευθεί η χαμηλή συγκέντρωση FSH στα νεογέννητα αρνιά, δεν μπορεί να ερμηνευθεί με το κλασικό πρότυπο αλληλεπιδράσεων η κορύφωση της FSH στις 4 έως 8 εβδομάδες (υψηλή ακόμη ανασταλτίνη και αυξανόμενη οιστραδιόλη) (Rawlings και Churchill 1990, Takeva και συν. 1997, Bartlewski και συν. 2006), που συμπίπτει με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη ωοθυλακίων (Kennedy και συν. 1974).

Στις αμνάδες όπως και στις ενήλικες προβατίνες, ο υποθάλαμος περιέχει το κέντρο προωθυλακιορρηκτικής κορύφωσης (surge center) και το τονικό κέντρο (tonic center) έκκρισης της GnRH (Senger 2003). Στις αμνάδες το κέντρο προωθυλακιορρηκτικής κορύφωσης της έκκρισης της GnRH είναι αρκετά ευαίσθητο στη θετική δράση της οιστραδιόλης, αλλά ο υποθάλαμος δεν μπορεί να απελευθερώσει GnRH σε υψηλές συγκεντρώσεις ώστε να προκληθεί από την υπόφυση κορύφωση της

έκκρισης της LH, διότι η συγκέντρωση της οιστραδιόλης είναι χαμηλή (Foster και Karsch 1975, Senger 2003). Πιστεύεται ότι η έλλειψη παρατεταμένης έκκρισης οιστραδιόλης σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 2 έως 4 pg/ml για 24 έως 48 ώρες, είναι αυτή που εμποδίζει την εμφάνιση της κορύφωσης της έκκρισης της LH (Foster 1984). Κατά την ενήβωση η συγκέντρωση της οιστραδιόλης είναι περίπου η μισή της αντίστοιχης που παρατηρείται σε προβατίνες (Karsch και συν. 1979). Όμως, φαίνεται ότι το κέντρο προωθλακιορρηκτικής έκκρισης μπορεί να ενεργοποιηθεί από σχετικά χαμηλή, αλλά με παρατεταμένη δράση, συγκέντρωση οιστραδιόλης (Ryan και συν. 1991). Η αδυναμία αύξησης της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης, σύμφωνα με τους Foster και συν. (1984), πιθανότατα οφείλεται στην ανεπάρκεια της τονικής έκκρισης της LH λόγω ελλιπούς έκλυσης GnRH. Αυτό συμβαίνει διότι τα ωοθυλάκια νεαρών αμνάδων παρουσιάζουν στεροειδογενετική δραστηριότητα, όπως και υποδοχείς της LH στα κύτταρα της θήκης τους, και ανταποκρίνονται στη χορήγηση εξωγενούς LH ή hCG ή PMSG παράγοντας στεροειδή (Trounson και συν. 1977, McNatty και συν. 1987, Sonjaya και Driancourt 1989). Είναι γνωστό ότι σε αμνάδες η χαμηλή συγκέντρωση της οιστραδιόλης ασκεί αυξημένη αρνητική επίδραση στην τονική έκκριση της GnRH με αποτέλεσμα να μην προκαλείται αυξημένη συχνότητα έκκρισης της LH (Foster και Ryan 1979, Foster 1981, Foster και συν. 1985, Senger 2003). Πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, μέσω του οποίου η οιστραδιόλη σε επαρκή ποσότητα διεγείρει και η προγεστερόνη αναστέλλει την προωθλακιορρηκτική έκκριση της LH (preovulatory surge, peak LH), είναι ενεργός πολύ πριν από την ενήβωση (Foster και Karsch 1975, Tran και συν. 1979, Meikle και συν. 1998). Η χορήγηση υψηλών δόσεων οιστραδιόλης σε ζώα ηλικίας μεγαλύτερης των 7 εβδομάδων προκαλεί προωθλακιορρηκτική έκκριση της LH μέσα σε 18 ώρες περίπου, που ακολουθείται από αντίστοιχη κορύφωση της FSH (Foster και Karsch 1975, Tran και συν. 1979, Meikle και συν. 1998). Ανάλογα με την ηλικία της αμνάδας, με την ίδια αγωγή το εύρος της κορύφωσης της LH αυξάνει σταδιακά (Foster και Karsch 1975) και εξαρτάται από τη δόση της χορηγούμενης οιστραδιόλης (dose-responsive) (Tran και συν. 1979). Αντίστοιχα, από την ηλικία των 12 εβδομάδων η κορύφωση της έκκρισης της LH που προκαλείται από τα οιστρογόνα μπορεί να ανασταλεί μετά από χορήγηση προγεστερόνης (Foster και Karsch 1975).

Η συγκέντρωση των γοναδοτροπινών στον ορό του αίματος αμνάδων ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία και το γενότυπο (Isaacs και συν. 1995, Takeva και συν. 1997, Jorio και συν. 1999, Bartlewski και συν. 2006), παρουσιάζοντας συγκέντρωση ανάλογη με εκείνη που παρατηρείται κατά τη διάρκεια του ανοίστρου και της ωχρινικής φάσης

του οιστρικού κύκλου των προβατίνων (Liefer και συν. 1972, Tassell και συν. 1976, 1978, Takeva και συν. 1997, Bartlewski και συν. 2006). Η επίδραση του γενοτύπου στη ρύθμιση της FSH φαίνεται από το ότι οι αμνάδες της φυλής Χίου παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση FSH σε σχέση με αυτές των φυλών Καραγκούνικη, Φλώρινας και Κύμης (Driancourt και Avdi 1993, Pappa-Michailidou και συν. 1999). Αυτή η υψηλή συγκέντρωση FSH σχετίζεται με το δείκτη πολυδυμίας, αλλά δεν το ρυθμίζει. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή αμνάδων φυλής Χίου που θα εμφανίσουν υψηλό δείκτη ωοθυλακιορρηξιών και πολυδυμίας κατά την ενήλικη ζωή τους (Pappa-Michailidou και συν. 1999).

Στις αμνάδες η συγκέντρωση και η συχνότητα έκκρισης της LH κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου μέρους της άνηβης ζωής τους (Foster και Karsch 1975, Tassell και συν. 1978, Huffman και συν. 1987, Rawlings και Churchill 1990, Padmanabhan και συν. 1992a, Takeva και συν. 1997, Meikle και συν. 1998). Σε αντιστοιχία με την FSH, σε αμνάδες φυλών με υψηλό δείκτη πολυδυμίας η συγκέντρωση της LH είναι υψηλότερη σε σχέση με φυλές με χαμηλότερο δείκτη πολυδυμίας (Tounson και συν. 1974a, b). Γενικά όμως φαίνεται ότι στις αμνάδες, σε αντίθεση με τις προβατίνες, ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις γοναδοτροπινών επαρκούν για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα φαίνεται ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων είναι ανεξάρτητη από τη διακύμανση των γοναδοτροπινών (Tassell και συν. 1978).

Στις αμνάδες κατά τη διάρκεια του μήνα που προηγείται της ενήβωσης, το εύρος της LH μειώνεται γραμμικά και δεν αυξάνεται πριν από την πρώτη ωοθυλακιορρηξία (Huffman και συν. 1987). Η συχνότητα έκκρισης της LH αυξάνεται 1 έως 3 εβδομάδες πριν από την πρώτη προωθυλακιορρηκτική έκκρισή της (Foster και Ryan 1979, Keisler και συν. 1983, Huffman και συν. 1987, Ryan και συν. 1991). Έτσι διεγείρεται η ανάπτυξη των ωοθυλακίων που ακολουθείται από αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης-17β, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την προωθυλακιορρηκτική έκκριση της LH (Foster και Ryan 1981). Στις προβατίνες η αύξηση της τονικής έκκρισης της LH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του οιστρικού κύκλου διαρκεί μόνο 2 έως 3 ημέρες (Foster και συν. 1975). Αυτή η διαφορά δεν οφείλεται σε μειωμένη ευαισθησία της ωοθήκης, διότι η ωριαία χορήγηση LH σε αμνάδες προκαλεί ωοθυλακιορρηξία μέσα σε 1 έως 2 ημέρες, ενώ αυτό δεν επιτυγχάνεται εάν η χορήγηση γίνεται ανά 2 έως 3 ώρες (Foster και συν. 1984, Keisler και συν. 1985). Τα παραπάνω δείχνουν ότι από πλευράς ενδοκρινολογίας η ενήβωση των αμνάδων ρυθμίζεται κυρίως

από την ευαισθησία του τονικού κέντρου παρά του κέντρου προωθυλακιορρηκτικής έκκρισης της GnRH στη δράση της οιστραδιόλης.

Η ενήβωση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το ζώο αποκτά – αναπτύσσει την αναπαραγωγική ικανότητά του σε ό,τι αφορά στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά. Η αυξημένη έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του άξονα υπόφυση-ωοθήκες κατά την ενήβωση. Η ανάπτυξη του συστήματος-δικτύου έκκρισης της GnRH ξεκινά, ανάλογα με το είδος, πριν από τη γέννηση, συνεχίζει πριν από και κατά την ενήβωση και ολοκληρώνεται σύντομα μετά από αυτή (Kinder και συν. 1995, Ebling 2005). Ο απαραίτητος ρόλος της GnRH στην ενήβωση των θηλαστικών αποδείχθηκε μετά από ανοσοποίηση κατά της GnRH ή χορήγηση ανταγωνιστή της GnRH που είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης και της έκκρισης των γοναδοτροπινών, την καθυστέρηση της γενετήσιας ωρίμανσης και την απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας (Ebling 2005). Εκτός των παραπάνω, η ενήβωση είναι το αποτέλεσμα της μείωσης της ευαισθησίας του υποθαλάμου και της υπόφυσης στην αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση της οιστραδιόλης που παρατηρείται κατά την προηβική ζωή (Foster και Ryan 1979, 1981, Foster και συν. 1985, Huffman και συν. 1987). Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι η χορήγηση οιστραδιόλης σε αμνάδες πριν από την ενήβωση μειώνει τη συχνότητα έκκρισης της LH (Foster και συν. 1986) αλλά όχι μετά την ενήβωση (Foster και Olster 1985). Επομένως, η μείωση της αρνητικής επίδρασης της οιστραδιόλης στην LH οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας έκκρισης της LH, η οποία με τη σειρά της διεγείρει την ανάπτυξη-ωρίμανση των ωοθυλακίων, τα οποία τελικά παράγουν οιστραδιόλη σε συγκέντρωση ικανή να προκαλέσει αφενός την προωθυλακιορρηκτική έκκριση των γοναδοτροπινών και αφετέρου εκδηλώσεις οίστρου (Ryan και συν. 1991, Kinder και συν. 1995).

Πλησιάζοντας στο χρόνο ενήβωσης, η πρώτη κορύφωση της έκκρισης των γοναδοτροπινών προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης για χρονικό διάστημα ανάλογο με εκείνο της ωχρινικής φάσης του οιστρικού κύκλου των προβατίνων (12 έως 14 ημερών). Όμως, συχνά προκαλείται μία ή περισσότερες φορές αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης που είναι μικρής διάρκειας (2 έως 4 ημέρες) και μικρού εύρους (1 έως 2 ng/ml) (Berardinelli και συν. 1980, Fitzgerald και Butler 1982, Keisler και συν. 1983, Huffman και συν. 1987, Ryan και συν. 1991, Santiago-Moreno και συν. 2000, Bartlewski και συν. 2006). Οι παροδικές αυτές αυξήσεις της συγκέντρωσης της προγεστερόνης φαίνεται ότι είναι συνέπεια και όχι αιτία της αρχικής κορύφωσης της συγκέντρωσης των γοναδοτροπινών (Ryan και συν. 1991) και συνήθως δε συνοδεύονται από συμπτώματα οίστρου (behavioural oestrus) (Kinder

και συν. 1995). Ο πρώτος οίστρος μπορεί να είναι ‘σιωπηλός’, δηλαδή να μη συνοδεύεται από τυπικά συμπτώματα οίστρου και παρατηρείται στο τέλος της πρώτης φυσιολογικής διάρκειας ωχρινικής φάσης, παρότι έχει αναφερθεί και στο τέλος μικρής διάρκειας ωχρινικής φάσης (Ryan και συν. 1991). Το τέλος, επομένως, της πρώτης φυσιολογικής διάρκειας ωχρινικής φάσης, ανεξαρτήτως του εάν έχει προηγηθεί ή όχι μικρής διάρκειας ωχρινική φάση, χαρακτηρίζεται από απότομη πτώση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης. Αυτή η πτώση ακολουθείται από αξιοσημείωτη αύξηση της συγκέντρωσης της LH και της FSH, ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης και σύγχρονη κορύφωση της συγκέντρωσης της LH και της FSH οδηγώντας στον πρώτο οίστρο και την ωοθυλακιορρηξία (Ryan και συν. 1991).

1.5.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενήβωση

Ο χρόνος ενήβωσης εξαρτάται από ενδοκρινικούς και γενετικούς παράγοντες που επηρεάζονται από πολλούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι η φωτοπερίοδος, η εποχή της γέννησης, ο ρυθμός σωματικής ανάπτυξης (σωματικό μέγεθος), ο μεταβολισμός, η διατροφή, η καταπόνηση (stress) και ο συγχρωτισμός με αρσενικά και θηλυκά ζώα (Foster και συν., 1985, Kinder και συν., 1995, Ebling, 2005).

Στο πρόβατο, ως εποχιακά πολιοιστρικό ζώο, η φωτοπερίοδος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο χρόνο της ενήβωσης. Συγκεκριμένα, οι αμνάδες για να ενηβωθούν πρέπει αρχικά να διαβιούν σε εποχή αυξανόμενης φωτοπεριόδου και ακολούθως μειούμενης φωτοπεριόδου (Foster και Ryan 1981, Foster και συν. 1985, 1988, Yellon και Foster 1985). Ο μηχανισμός με τον οποίο η φωτοπερίοδος επιδρά στην ενήβωση και στη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου είναι βασικά ο ίδιος. Όμως, στις προβατίνες η μετάβαση από την άνοιστρη στην ένοιστρη περίοδο μπορεί να γίνει ανεξάρτητα από τη φωτοπερίοδο, αποδεικνύοντας ότι η έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου στα ενήλικα ζώα βασίζεται σε ενδογενείς ρυθμίσεις και σε προηγούμενη έκθεση σε εναλλασσόμενη φωτοπερίοδο (Ebling και Foster 1988). Εάν η μείωση της διάρκειας του φωτός συμβεί πριν από την ηλικία των 10 εβδομάδων η ενήβωση των αμνάδων καθυστερεί (Foster 1983, Yellon και Foster 1985). Αυτό δεν οφείλεται σε αδυναμία μετάφρασης των πληροφοριών της φωτοπεριόδου, διότι ο νυχτερινός ρυθμός έκκρισης της μελατονίνης αναπτύσσεται από τις πρώτες εβδομάδες της ζωής (Claypool και συν. 1989), αλλά πιθανότατα επηρεάζεται κάποια άλλη νευροενδοκρινολογική λειτουργία που ελέγχει την αναπαραγωγή. Παρότι το εύρος της

μελατονίνης που εκκρίνεται σε αμνάδες είναι μικρότερο από το αντίστοιχο των προβατίνων (Malpaux και συν. 1987, Claypool και συν. 1989), είναι αρκετό για να προκαλέσει αλλαγές στη συγκέντρωση της προλακτίνης που σχετίζονται με την φωτοπερίοδο (Ebling και συν. 1988). Επιπλέον, η χορήγηση μελατονίνης με σκοπό την αύξηση του εύρους της δεν επηρεάζει το χρόνο ενήβωσης (Foster και συν. 1989).

Η επίδραση της φωτοπεριόδου στις αμνάδες ξεκινά κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής και επηρεάζει μετά τη γέννηση την ανταπόκρισή τους στις αλλαγές της ημερήσιας διάρκειας του φωτός (Ebling και συν. 1988, Helliwell και συν. 1997). Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι είναι απαραίτητο οι αμνάδες να διαβιούν για 10 τουλάχιστον έως 15 το μέγιστο εβδομάδες σε μεγάλης διάρκειας ημερήσιο φως, είτε κατά την ενδομήτρια ζωή είτε μετά τη γέννηση, έτσι ώστε να ενηβωθούν στον φυσιολογικό-αναμενόμενο χρόνο ανάλογα με τη φυλή (Foster 1983, Yellon και Foster 1985, Helliwell και συν. 1997). Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, η επίδραση της φωτοπεριόδου κατά την ενδομήτρια ζωή φαίνεται να μη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γεννητική ωρίμανση (Herbosa και συν. 1994).

Στο πρόβατο η διάρκεια της άνηβης ζωής εξαρτάται από τη διάρκεια της άνοιστρης περιόδου της κάθε φυλής και επομένως η ημερομηνία γέννησης επηρεάζει το χρόνο ενήβωσης, εφόσον δε μεταβληθεί η φυσιολογική φωτοπερίοδος (Fitzgerald και Butler 1982). Αμνάδες που γεννιούνται το χειμώνα ή την άνοιξη ενηβώνονται κατά τη διάρκεια του επόμενου φθινοπώρου, ενώ εκείνες που γεννιούνται το φθινόπωρο δεν ενηβώνονται πριν από την ηλικία των 10 έως 12 μηνών. Η καθυστέρηση του χρόνου ενήβωσης στα ζώα που γεννιούνται το φθινόπωρο, σε σχέση με εκείνα που γεννιούνται το χειμώνα ή την άνοιξη, αποδίδεται στην ελεγχόμενη από τη φωτοπερίοδο καθυστέρηση της μείωσης της αρνητικής επίδρασης της οιστραδιόλης στην τονική έκκριση της LH (Foster 1981). Συνδυάζοντας την ενδοκρινολογία της ενήβωσης με την εποχική αναπαραγωγή των ενηλίκων ζώων που ρυθμίζεται από τη φωτοπερίοδο, ο Foster (1981) πρότεινε δύο εξηγήσεις για την καθυστερημένη ενήβωση των ζώων που γεννιούνται το φθινόπωρο: (1) η καθυστερημένη έναρξη των οίστρων αντικατοπτρίζει την καθυστερημένη γεννητική ωρίμανση των ζώων, (2) η γεννητική ωρίμανση δεν καθυστερεί, αλλά αντιθέτως οι αμνάδες μεταβαίνουν απευθείας στην άνοιστρη περίοδο.

Η απόκτηση ενός ελάχιστου σωματικού βάρους - το οποίο παραλλάσσει μεταξύ των φυλών - θεωρείται καθοριστικός παράγοντας για την ενήβωση (Foster και Ryan 1981, Bizelis και συν. 1990, Santiago-Moreno και συν. 2000). Έχει αποδειχθεί ότι η διατροφή μπορεί να προκαλέσει καθυστέρηση ή επιτάχυνση του χρόνου ενήβωσης (Quirke 1979, Adam και συν. 1998). Επίσης, προηγούμενη έρευνα έδειξε ότι οι αμνάδες

με μεγαλύτερο μέγεθος και ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης είναι περισσότερο πιθανό να ενηθωθούν νωρίτερα από τις υπόλοιπες (Foster και Ryan 1979). Η καθυστέρηση του χρόνου ενήθωσης σε υποσιτιζόμενα ζώα οφείλεται στη μειωμένη συχνότητα έκκρισης της GnRH και κατ' επέκταση στη μειωμένη παραγωγή και απελευθέρωση LH από την υπόφυση (Foster και Olster 1985, Foster και συν. 1985, I'anson και συν. 1997, Polkowska και συν. 2003). Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα να καθυστερεί η ανάπτυξη των ωοθυλακίων μέχρι το προωθυλακιωρρηκτικό μέγεθος, να μην αυξάνεται η συγκέντρωση της οιστραδιόλης που οδηγεί στην προωθυλακιωρρηκτική έκκριση των γοναδοτροπινών και επομένως να καθυστερεί η έναρξη των οίστρων. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, άλλοι υποστηρίζουν (Adam και συν. 1998) ότι το σωματικό βάρος και η πρόσληψη τροφής δεν επιδρούν στο χρόνο ενήθωσης.

Η συσχέτιση του κρίσιμου - ελάχιστου σωματικού βάρους με τη διαδικασία της ενήθωσης έχει μελετηθεί σε πολλά είδη ζώων. Η υπόθεση ότι η απόκτηση ελάχιστου σωματικού βάρους είναι απαραίτητη για την ενήθωση έχει προσφάτα αναθεωρηθεί. Θεωρείται ότι ο χρόνος ενήθωσης επηρεάζεται όχι από το σωματικό βάρος αλλά από τη σωματική σύνθεση και ειδικότερα από το ποσοστό του σωματικού λίπους (Senger 2003, Ebling 2005). Έχει αποδειχθεί ότι οι υψηλής συχνότητας ώσεις της GnRH επηρεάζονται από την περιεκτικότητα του αίματος σε γλυκόζη και λιπαρά οξέα (Senger 2003). Αυτό συνδέεται με τη λεπτίνη η οποία είναι μια κυτοκίνη που παράγεται στα λιποκύτταρα (Zhang και συν. 1994). Η λεπτίνη μέσω της ρύθμισης της ενεργειακής ομοιοστασίας παρέχει στον υποθάλαμο την πληροφορία για το εάν η μεταβολική κατάσταση του ζώου είναι ικανή για την υποστήριξη και τη διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας (Schneider και συν. 2000, Senger 2003, Ebling 2005). Παρότι είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση του συστήματος έκκρισης της GnRH οδηγεί στην ενήθωση, δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί το πώς το επίπεδο σωματικής ανάπτυξης και μεταβολισμού αποκωδικοποιείται και μετατρέπεται σε νευρική δραστηριότητα (Recabarren και συν. 1996). Ένας μεγάλος αριθμός νευροδιαβιβαστών και νευροπεπτιδίων εμπλέκονται στη διαδικασία της ενήθωσης στέλνοντας σήματα σε νευρώνες της GnRH (Ebling 2005). Φαίνεται ότι στην παραπάνω λειτουργία εμπλέκονται τρεις τύποι προσυναπτικών νευρώνων διεγείροντας τους νευρώνες της GnRH: (1) νευρώνες ευαίσθητοι στη λεπτίνη, (2) νευρώνες ευαίσθητοι στη γλυκόζη και (3) νευρώνες ευαίσθητοι στα λιπαρά οξέα (Senger 2003).

Η επίδραση της κοινωνικότητας και της παρουσίας αρσενικών ζώων στην ηλικία ενήθωσης έχει περιγραφεί στον ποντικό, στην αγελάδα, στην προβατίνα και στη συ, εφόσον βεβαίως το θηλυκό ζώο έχει αποκτήσει ικανό σωματικό μέγεθος και θετικό

ενεργειακό ισοζύγιο (Nalbandov 1976, Senger 2003). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της οσφρητικής αναγνώρισης των φερομονών. Για παράδειγμα, σύες οι οποίες σταβλίζονται σε ομάδες πολλών ατόμων (≥ 10) ενηβώνονται νωρίτερα από εκείνες που σταβλίζονται σε ομάδες λίγων ατόμων (2 έως 3). Επίσης, σύες, ανεξαρτήτως αριθμού ατόμων, που έρχονται σε επαφή με αρσενικά ζώα ενηβώνονται νωρίτερα από εκείνες που δεν έρχονται σε επαφή με κάπρους. Αντίστοιχα, έχει αποδειχθεί σε μοσχίδες που είχαν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και συγχρωτίζονταν με ταύρους ότι ενηβώνονταν 74 ημέρες νωρίτερα από εκείνες που είχαν μέτριο ρυθμό ανάπτυξης και δεν συγχρωτίζονταν με αυτούς (Senger 2003). Σε ό,τι αφορά στην ενήβωση των αμνάδων, έχει περιγραφεί συγχρονισμός της πρώτης οχείας (Dyrmondsson και Lees 1972) και επιτάχυνση της εμφάνισης του πρώτου οίστρου κατά 2 εβδομάδες μετά από είσοδο κριών σε κοπάδι αμνάδων πριν την ενήβωση (O'Riordan και Hanrahan 1989).

1.6 Σκοπός διατριβής

Με δεδομένο τον πειστικό διεθνή οικονομικό ανταγωνισμό, ο ταχύς ρυθμός γενετικής βελτίωσης των παραγωγικών ζώων δεν είναι πλέον πολυτέλεια αλλά επιτακτική ανάγκη για τη σύγχρονη κτηνοτροφία. Η βιοτεχνολογία με την πληθώρα των εφαρμογών που προσφέρει στην αναπαραγωγή των ζώων αποτελεί σήμερα την αιχμή του δόρατος στην προσπάθεια γενετικής αναβάθμισης των ζώων. Βασική παράμετρος που καθορίζει το ρυθμό της γενετικής προόδου ενός πληθυσμού είναι το μεσοδιάστημα των γενεών. Είναι εμφανές ότι η μείωση του μεσοδιαστήματος των γενεών επιτυγχάνεται με τη μείωση του μεσοδιαστήματος των τοκετών, με τη μείωση της ηλικίας του πρώτου τοκετού και με τη δημιουργία απογόνων από άνηβα θηλυκά ζώα.

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στον έλεγχο της δυνατότητας εφαρμογής προγραμμάτων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σε αμνάδες. Χρησιμοποιώντας ως μοντέλο αμνάδες Καραγκούνικης φυλής εξετάστηκαν διάφορες παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα εφαρμογής τέτοιων προγραμμάτων.

Με δεδομένο ότι στις αμνάδες η ανάπτυξη των ωοθυλακίων παρουσιάζει διακύμανση ανάλογα με τη φυλή και την ηλικία, μελετήθηκε η φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων (αριθμός και διάμετρος) αμνάδων Καραγκούνικης φυλής σε διάφορες ηλικίες με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης του πληθυσμού και του μεγέθους των ωοθυλακίων με την ανταπόκριση των ωοθηκών στην ορμονική διέγερση.

Στις αμνάδες η ανταπόκριση των ωοθηκών στην εξωγενή χορήγηση γοναδοτροπινών ποικίλλει και εξαρτάται από τη φυλή, το άτομο, την ορμονική αγωγή και την κατάσταση των ωοθυλακίων τη στιγμή της έναρξης της αγωγής. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η ορμονική διέγερση των ωοθηκών εφαρμόζεται μία φορά ή επανειλημμένως στα ίδια ζώα. Με βάση τα παραπάνω μελετήθηκε η ανάπτυξη των ωοθυλακίων μετά από πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης και αναρρόφησής τους σε αμνάδες που υποβλήθηκαν μία ή περισσότερες φορές στην αγωγή, σε διάφορες ηλικίες. Ο σκοπός ήταν ο διαχωρισμός της επίδρασης της ηλικίας και της ορμονικής αγωγής στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στην ικανότητα ανάπτυξης των συλλεγόμενων ωαρίων *in vitro*. Επίσης, μελετήθηκαν οι ορμονικές αλληλεπιδράσεις που προκύπτουν από την ορμονική διέγερση των ωοθηκών και την αναρρόφηση των ωοθυλακίων.

Με δεδομένη την έλλειψη πληροφοριών για τις πιθανές επιπτώσεις των χειρισμών στο γεννητικό σύστημα στην εν γένει ευζωία των δοτριών, μελετήθηκε εάν είναι δυνατό να επηρεαστεί η σωματική ανάπτυξη, ο χρόνος ενήβωσης και η μετέπειτα

αναπαραγωγική ικανότητα των αμνάδων που υποβάλλονται σε ορμονική αγωγή και αναρροφήσεις ωοθυλακίων σε νεαρή ηλικία.

Επιπλέον, πληθώρα μελετών έχει αποδείξει ότι ένας σημαντικός αριθμός άνηβων και ένηβων δοτριών ωαρίων ή και εμβρύων δεν ανταποκρίνεται ή ανταποκρίνεται οριακά στην αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια τους άσκοπους χειρισμούς σε ένα σημαντικό αριθμό ζώων και τη διόγκωση του συνολικού οικονομικού κόστους λόγω αυξημένων εργατοωρών και αναλωσίμων. Έτσι, μελετήθηκε το κατά πόσο είναι δυνατό να προβλεφθούν τα ζώα με την καλύτερη απόδοση σε ωάρια.

1.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adam CL, Findlay PA, Kyle CE, Young P, 1998: Effect of restricted nutrition on timing of puberty in female Soay sheep. *J Reprod Fertil* 112 31-37.

Amiridis GS, Robertson L, Jeffcoate IA, Belibasaki S, Boyd JS, O'Shaughnessy PJ, 2000: Formation of a secondary corpus luteum after ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Acta Vet Hung* 48 193-198.

Amorim CA, Lucci CM, Rodrigues AP, Carvalho FC, Figueiredo JR, Rondina D, Cecchi R, Giorgetti A, Martini A, Goncalves PB, 2000: Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology* 53 1251-1262.

Anel L, Sevillano C, Alvarez M, Alegre B, Anel E, Dominguez JC, Carbajo MT, De La Fuente J, 1997: Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. *Theriogenology* 47 152.

Armstrong DT, 2001: Effects of maternal age on oocyte development competence. *Theriogenology* 55 1303-1322.

Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens G, Seamark RF, 1992: Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 38 667-678.

Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D, Seamark RF, 1994: Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 42 1227-1236.

Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR, 1997: Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9 333-339.

- Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS, 1991: Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil* 43(Suppl) 125-138.
- Baldassarre H, Furnus CC, de Matos DG, Pessi H, 1996: *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 45 707-717.
- Baldassarre H, Karatzas CN, 2004: Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 82-83 255-266.
- Baldassarre H, Wang B, Pierson J, Neveu N, Sneek L, Lapointe J, Cote F, Kafidi N, Keefer CL, Lazaris A, Karatzas CN, 2004: Prepubertal propagation of transgenic cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production. *Cloning Stem Cells* 6 25-29.
- Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC, 1999a: Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil* 115 111-124.
- Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC, 1998: Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 113 275-285.
- Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC, 2002: Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. *Small Rumin Res* 43 37-44.
- Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC, 1999b: Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. *Anim Reprod Sci* 57 67-88.
- Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC, 1999c: Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrous. *Anim Reprod Sci* 57 51-66.
- Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC, 2006: Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs. *Small Rumin Res* 63 189-198.
- Bartlewski PM, Vanderpol J, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC, 2000: Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim Reprod Sci* 58 273-291.
- Berardinelli JG, Dailey RA, Butcher RL, Inskeep EK, 1980: Source of circulating progesterone in prepubertal ewes. *Biol Reprod* 22 233-236.
- Betteridge KJ, 2000: Reflections on the golden anniversary of the first embryo transfer to produce calf. *Theriogenology* 53 3-10.

- Bister J-L, Noël B, Perrad B, Mandiki SNM, Mbayahaga J, Paquay R, 1999: Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Dom Anim Endocrinol* 17 315-328.
- Bizelis JA, Deligeorgis SG, Rogdakis E, 1990: Puberty attainment and reproductive characteristics in ewe lambs of Chios and Karagouniki breeds raised on two planes of nutrition. *Anim Reprod Sci* 23 197-212.
- Blondin D, Dufour M, Sirard MA, 1996: Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol Reprod* 54 631-637.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA, 1982: Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27 147-158.
- Brand A, de Jong WH, 1973: Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tetrinary follicle population during the oestrus cycle in sheep. *J Reprod Fertil* 33 431-439.
- Braw-Tal R, Bor A, Gootwine E, 1993: Plasma immunoreactive inhibin and FSH in prepubertal Assaf and Booroola-Assaf ewe lambs. *Dom Anim Endocrinol* 10 87-94.
- Byskov AG, Hoyer PE, 1994: Embryology of mammalian gonads and ducts. In: Knobil E and Neil JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press: New York, USA, pp 487-540.
- Cahill LP, 1981: Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *J Reprod Fertil Suppl* 30 135-142.
- Cahill LP, Mauleon P, 1980: Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J Reprod Fertil* 58 321-328.
- Cahill LP, Mauleon P, 1981: A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J Reprod Fertil* 61 201-206.
- Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ, 1999: Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil* 117 355-367.
- Campbell BK, Picton HM, Mann GM, McNeilly AS, Baird DT, 1991: The effect of steroid- and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicle populations and ovarian hormone secretion. *J Reprod Fertil* 93 81-96.
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R, 1995: Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 49 335-350.
- Clarke IJ, Findlay JK, Cummins JT, Evans WJ, 1986: Effects of ovine follicular fluid on plasma LH and FSH secretion in ovariectomized ewes to indicate the site of action of inhibin. *J Reprod Fertil* 77 575-585.

- Claypool LE, Wood RI, Yellon SM, Foster DL, 1989: The ontogeny of melatonin secretion in the lamb. *Endocrinology* 124 2135-2143.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P, 2003: Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59 171-188.
- Cognié Y, Benoit F, Poulin N, Khatir H, Driancourt MA, 1998: Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *J Reprod Fertil* 112 379-386.
- Driancourt MA, 1991: Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35 55-79.
- Driancourt MA, 2001: Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55 1211-1239.
- Driancourt MA, Avdi M, 1993: Effect of the physiological stage of the ewe on the number of follicles ovulating following hCG injection. *Anim Reprod Sci* 32 227-236.
- Driancourt MA, Cahill LP, Bindon BM, 1985a: Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. *J Reprod Fertil* 73 93-107.
- Driancourt MA, Gibson WR, Cahill LP, 1985b: Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reprod Nutr Dev* 25 1-15.
- Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM, 1996: Prepubertal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology* 45 121-130.
- Duby RT, Damiani P, Looney CR, Long CR, Balise JJ, Robl JM, 1995: Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology* 43 202.
- Duggavathi R, Bartlewski PM, Barret DMW, Rawlings NC, 2003: Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. *Theriogenology* 60 495-510.
- Dyrmondsson OR, Lees JL, 1972: Attainment of puberty and reproductive performance in Clun Forest ewe lambs. *J agric Sci Camb* 78 39-45.
- Earl CR, Irvine BJ, Kelly JM, Rowe JP, Armstrong DT, 1995: Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and *in vitro* embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology* 43 203.
- Ebling JFP, 2005: The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129 675-683.



- Ebling FJP, Claypool LE, Foster DL, 1988: Neuroendocrine responsiveness to light during the neonatal period in the sheep. *J Endocrinol* 119 211-218.
- Ebling FJ, Foster DL, 1988: Photoperiod requirements for puberty differ from those for the onset of the adult breeding season in female sheep. *J Reprod Fertil* 84 283-293.
- Edwards RG, 1965: Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208 349-351.
- Eppig JJ, 2001: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122 829-838.
- Evans ACO., 2003: Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci* 78 289-306.
- Evans AC, Adams GP, Rawlings NC, 1994: Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil* 102 463-470.
- Evans ACO, Duffy P, Hynes N, Boland MP, 2000: Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53 699-715.
- Evans ACO, Flynn JD, Duffy P, Knight PG, Boland MP, 2002: Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123 59-66.
- Evans AC, Flynn JD, Quinn KM, Daffy P, Quinn P, Madgwick S, Crosby TF, Bolan MP, Beard AP, 2001: Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology* 56 923-936.
- Evans BR, 1999: The prospect for international regulatory interventions in embryo transfer and reproductive technologies in the next century. *Theriogenology* 51 71-80.
- Fair T, 2003: Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78 203-216.
- Findlay JK, 1994: Peripheral and local regulators of folliculogenesis. *Reprod Fertil Dev* 6 127-139.
- Fitzgerald J, Butler WR, 1982: Seasonal effects and hormonal patterns related to puberty in ewe lambs. *Biol Reprod* 27 853-863.
- Flynn JD, Duffy P, Boland MP, Evans ACO, 2000: Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 62

285-296.

Foote RE, Ellington JE, 1988: Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology* 29 111-123.

Fortune JE, 1994: Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50 225-232.

Foster DL, 1981: Mechanism for delay of first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). *Biol Reprod* 25 85-92.

Foster DL, 1983: Photoperiod and sexual maturation of the female lamb: early exposure to short days perturbs estradiol feedback inhibition of luteinizing hormone secretion and produces abnormal ovarian cycles. *Endocrinology* 112 11-17.

Foster DL, 1984: Preovulatory gonadotropin surge system of prepubertal female sheep is exquisitely sensitive to the stimulatory feedback action of estradiol. *Endocrinology* 115 1186-1189.

Foster DL, Ebling FJ, Claypool LE, Wood RI, Adel TE, Schramm W, 1989: Amplitude modulation of the nightly melatonin rise in the neonatal lamb and the subsequent timing of puberty. *Biol Reprod* 40 920-928.

Foster DL, Ebling FJ, Claypool LE, Woodfill CJ, 1988: Cessation of long day melatonin rhythms time puberty in a short day breeder. *Endocrinology* 123 1636-1641.

Foster DL, Karsch FJ, 1975: Development of the mechanism regulating the preovulatory surge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 97 1205-1209.

Foster DL, Lemons JA, Jaffe RB, Niswender GD, 1975: Sequential patterns of circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in female sheep from early postnatal life through the first estrous cycles. *Endocrinology* 97 985-994.

Foster DL, Olster DH, 1985: Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology* 116 375-381.

Foster DL, Roach JF, Karsch FJ, Norton HW, Cook B, Nalbandov AV, 1972: Regulation of luteinizing hormone in the fetal and neonatal lamb. I. LH concentrations in blood and pituitary. *Endocrinology* 90 102-111.

Foster DL, Ryan KD, 1979: Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. *Endocrinology* 105 896-904.

Foster DL, Ryan KD, 1981: Endocrine mechanisms governing transition into adulthood in female sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 30 75-90.

- Foster DL, Ryan KD, Goodman RL, Legan SJ, Karsch FJ, Yellon SM, 1986: Delayed puberty in lambs chronically treated with oestradiol. *J Reprod Fertil* 78 111-117.
- Foster DL, Ryan KD, Papkoff H, 1984: Hourly administration of luteinizing hormone induces ovulation in prepubertal female sheep. *Endocrinology* 115 1179-1185.
- Foster DL, Yellon SM, Olster DH, 1985: Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *J Reprod Fertil* 75 327-344.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G, 2001: Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55 1341-1357.
- Gandolfi F, Milanese E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TA, Acocella F, Lauria A, Armstrong DT, 1998: Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 49 168-175.
- Garcia A, 2002: Monitoring follicular development in cattle by real- time ultrasonography: a review. *Embryo Transfer Newsletter (IETS)* 20 7-25.
- Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC, 1995: Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43 689-703.
- Goerke TP, Dutt RH, 1975: Induction of ovulation and fertilization in the 90-day-old ewe lamb. *Theriogenology* 4 195-201.
- Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Garcia-Garcia RM, del Campo A, Gomez-Brunet A, Lopez-Sebastian A, 2001: Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 65 265-272.
- Hay MR, Cran DG, Moor RM, 1976: Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tissue Res* 169 515-529.
- Helliwell RJA, Wallace JM, Aitken RP, Racey PA, Robinson JJ, 1997: The effect of prenatal photoperiodic history on the postnatal endocrine status of female lambs. *Anim Reprod Sci* 47 303-314.
- Herbosa CG, Wood RI, I'Anson H, Foster DL, 1994: Prenatal photoperiod and the timing of puberty in the female lamb. *Biol Reprod* 50 1367-1376.
- Hillier SG, 1994: Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reprod* 9 188-191.
- Huchkowsky SL, Bartlewski PM, Rawlings NC, 2002: Ovarian follicular development and endocrine

function in non-prolific Western White Face ewes with early or late onset of seasonal anestrus. *Small Rumin Res* 46 191-199.

Huffman LJ, Inskeep EK, Goodman RL, 1987: Changes in episodic luteinizing hormone secretion leading to puberty in the lamb. *Biol Reprod* 37 755-761.

Hurwitz A, Adashi EY, 1993: Ovarian Follicular Atresia as an Apoptotic Process. In: Adashi EY, Leung PCK (eds). *The Ovary*. Raven Press, Ltd. New York, USA, pp. 473-483.

Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T, 1986: Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 78 615-625.

I'anson H, Terry SK, Lehman MN, Foster DL, 1997: Regional differences in the distribution of gonadotropin-releasing hormone cells between rapidly growing and growth-restricted prepubertal female sheep. *Endocrinology* 138 230-236.

Irvine BJ, Armstrong DT, Earl C, McLean D, Seamark RF, 1993: Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39 237.

Isaacs KL, McNatty KP, Condell L, Shaw L, Heath DA, Hudson NL, Littlejohn RP, McLeod BJ, 1995: Plasma FSH, LH and immunoreactive inhibin concentrations in FecBB/FecBB and FecB+/FecB+ Booroola ewes and rams from birth to 12 months of age. *J Reprod Fertil* 103 89-97.

Ishwar AK, Memon MA, 1996: Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rumin Res* 19 35-43.

Izquierdo D, Villamediana P, López-Bejar M, Paramio MT, 2002: Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57 1431-1441.

Jorio A, Mariana JC, Lahlou-Kassi A, 1991: Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. *Anim Reprod Sci* 26 239-250.

Jorio A, Mariana JC, Lahlou-Kassi A, Hilali M, 1999: Pattern of FSH secretion from birth to 4 months of age in two Moroccan ewe breeds varying in prolificacy. *Small Rumin Res* 31 135-140.

Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ, McNatty KP, 2002: Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 191 1-10.

Kajihara Y, Blakewood EG, Myers MW, Kometani N, Goto K, Godke RA, 1991: *In vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology* 35 220.

Karsch FJ, Foster DL, Legan SJ, Ryan KD, Peter GK, 1979: Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone and luteinizing hormone. *Endocrinology* 105 421-426.

Keisler DH, Inskeep EK, Dailey RA, 1983: First luteal tissue in ewe lambs: influence on subsequent ovarian activity and response to hysterectomy. *J Anim Sci* 57 150-156.

Keisler DH, Inskeep EK, Dailey RA, 1985: Roles of pattern of secretion of luteinizing hormone and the ovary in attainment of puberty in ewes lambs. *Dom Anim Endocrinol* 2 123-132.

Kelly JM, Kleemann DO, Walker SK, 2005: Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology* 63 1876-1890.

Kennedy JP, Worthington CA, Cole ER, 1974: The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J Reprod Fertil* 36 275-282.

Khatir H, Lonergan P, Carolan C, Mermillod P, 1996: Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol Reprod Dev* 45 231-239.

Khatir H, Lonergan P, Touze JL, Mermillod P, 1998: The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50 1201-1210.

Kinder JE, Bergfeld EG, Wehrman ME, Peters KE, Kojima FN, 1995: Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 49 393-407.

Kochhar HP, Wu B, Morris LH, Buckrell BC, Pollard JW, Basrur PK, King WA, 2002: Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod Dom Anim* 37 19-25.

Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H, Downey BR, 2003: Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60 879-889.

Kruip T, Cran D, Van Beneden T, Dieleman S, 1983: Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vitro*. *Gamete Res* 8 29-47.

Kühholzer B, Brem G, 1999: In vivo development of microinjected embryos from superovulated prepuberal slaughter lambs. *Theriogenology* 51 1297-1302.

Lahlou-Kassi A, Mariana JC, 1984: Ovarian follicular growth during the oestrous cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate, the D'Man and the Timahdite. *J Reprod Fertil* 72 301-310.

- Land RB, 1970: Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross blackface and Welsh sheep. *J Reprod Fertil* 21 517-521.
- Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S, 1997: Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J Reprod Fertil* 109 73-78.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S, 1999a: Follicular size affects the meiotic competence of *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev* 39 503-508.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S, 1999b: Production and lambing rate of blastocysts derived from *in vitro* matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes. *J Anim Sci* 77 2234-2239.
- Leyva V, Buckrell BC, Walton JS, 1998: Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50 395-416.
- Liefer RW, Foster DL, Dziuk PJ, 1972: Levels of LH in the sera and pituitaries of female lambs following ovariectomy and administration of estrogen. *Endocrinology* 90 981-985.
- Loi P, Ptak G, Dattena M, Ledda S, Naitana S, Cappai P, 1998: Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. *Reprod Nutr Dev* 38 615-628.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP, 2003: Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim* 38 259-267.
- Looney CR, Damiani P, Lindsey BR, Long CR, 1995: Use of prepubertal heifers as oocyte donors for IVF: effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology* 43 269.
- McKelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS, 1986: Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 26 855-865.
- McNatty KP, Lun S, Heath DA, O'Keeffe LE, 1987: Ovarian follicular activity in Booroola lambs with and without a fecundity gene. *J Reprod Fertil* 79 57-66.
- McNatty KP, Smith P, Hudson NL, Heath DA, Tisdall DJ, O WS, Braw-Tal R, 1995: Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *J Reprod Fertil Suppl* 49 123-135.
- McNeilly AS, Crow W, Brooks J, Evans G, 1992: LH pulses, FSH and control of follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 45 5-19.
- Malpaux B, Robinson JE, Brown MB, Karsch FJ, 1987: Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin. *Biol Reprod* 36 1333-1341.

- Mann GE, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT, 1992: The role of inhibin and estradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Endocrinol* 133 381-391.
- Mansour AM, 1959: The hormonal control of ovulation in the immature lamb. *J Agric Sci* 52 87-94.
- Mariana JC, Monniaux D, Caraty A, Pisselet C, Fontaine J, Solari A, 1998: Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on gonadotropins, follicular growth and responsiveness of granulosa cells to FSH and IGF-I in two breeds of sheep with different prolificacy (Romanov and Ile-de-France). *Dom Anim Endocrinol* 15 195-207.
- Martin GB, Price CA, Thierry JC, Webb R, 1988: Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J Reprod Fertil* 82 319-328.
- Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT, 1995: *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43 473-485.
- Mattner PE, Braden AW, 1972: Secretion of oestradiol-17 α by the ovine ovary during the luteal phase of the oestrous cycle in relation to ovulation. *J Reprod Fertil* 28 136-137.
- Meikle A, Tasende C, Garofalo EG, Forsberg M, 1998: Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. *Anim Reprod Sci* 54 75-85.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y, 1999: Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 54 449-460.
- Mogas T, Palomo MJ, Izquierdo MD, Paramio MT, 1997: Developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology* 47 1189-1203.
- Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR, 1984: Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J Reprod Fertil* 70 243-253.
- Moor RM, Hay MF, Dott HM, Cran DG, 1978: Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J Endocrinol* 77 309-318.
- Moor RM, Osborn JC, Crosby IM, 1985: Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fertil* 74 167-172.
- Moor RM, Trounson AO, 1977: Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 49 101-109.
- Morton KM, Catt SL, Hollinshead FK, Maxwell WM, Evans G, 2004: Production of lambs after the transfer of fresh and cryopreserved *in vitro* produced embryos from prepubertal lamb oocytes and unsorted

and sex-sorted frozen-thawed spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 39 454-461.

Morton KM, Catt SL, Maxwell WM, Evans G, 2005a: *In vitro* and *in vivo* developmental capabilities and kinetics of *in vitro* development of *in vitro* matured oocytes from adult, unstimulated and hormone-stimulated prepubertal ewes. *Theriogenology* 64 1320-1332.

Morton KM, de Graaf SP, Campbell A, Tomkins LM, Chis Maxwell WM, Evans G, 2005b: Repeat ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod Dom Anim* 40 422-428.

Murdoch WJ, 1995: Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod* 53 8-12.

Nalbandov AV, 1976: Reproductive Physiology of Mammals and Birds. In: Nalbandov AV (ed). W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, pp. 134-139.

Nöel B, Bister JL, Paquay R, 1993: Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J Reprod Fertil* 99 695-700.

O'Brien JK, Beck NF, Maxwell WM, Evans G, 1997a: Effect of hormone pre-treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of oocytes *in vitro* and *in vivo*. *Reprod Fertil Dev* 9 625-631.

O' Brien JK, Catt SL, Ireland A, Maxwell WMC, Evans G., 1997b: *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* 47 1433-1443.

O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G, 1996: Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev* 8 1029-1037.

O'Callaghan D., Yaakub H., Hyttel P., Spicer L.J., Boland M.P., 2000: Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 118 303-313.

O'Rahilly R, Muller F, 2000: Εμβρυολογία και Τερατολογία του Ανθρώπου. Μετάφραση- Επιμέλεια: Καραμανλίδης Α, Σιατίτσας Γ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Αθήνα. σελ. 19-36.

O'Riordan EG, Hanrahan JP, 1989: Advancing first estrus in ewe lambs. *Farm Food Res* 20 25-27.

Padmanabhan V, Mieher CD, Borondy M, I'Anson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL, Beitins IZ, 1992a: Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 131 213-220.

Padmanabhan V, Reno KM, Borondy M, Landefeld TD, Ebling FJ, Foster DL, Beitins IZ, 1992b: Effect of nutritional repletion on pituitary and serum follicle-stimulating hormone isoform distribution in growth-retarded lambs. *Biol Reprod* 46 964-971.

Pappa-Michailidou V, Avdi M, Zafrakas A, Alifakiotis T, 1999: Prepubertal plasma FSH concentrations and their relationship with reproductive performance in three Greek breeds of sheep. *Small Rumin Res* 33 37-41.

Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M, 1975: Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil* 45 559-566.

Peters H, Byskov AG, Lintern-Moore S, Faber M, Andersen M, 1973: The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J Reprod Fertil* 35 139-141.

Petyim S, Bage R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B, 2000: The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47 627-640.

Petyim S, Bage R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B, 2001: Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48 449-63.

Petyim S, Bage R, Hallap T, Bergqvist AS, Rodriguez-Martinez H, Larsson B, 2003: Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology* 60 175-188.

Phillips DJ, Smith PR, Heath DA, Condell LA, McNatty KP, 1992: Bioactive and immunoreactive FSH and immunoreactive inhibin concentrations in the ovine fetus. *J Endocrinol* 134 287-295.

Polkowska J, Lerrant Y, Wankowska M, Wojcik-Gladysz A, Starzec A, Counis R, 2003: The effect of dietary protein restriction on the secretion of LH and FSH in pre-pubertal female lambs. *Anim Reprod Sci* 76 53-66.

Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X, 1997: Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* 56 386-392.

Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P, 1999: Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod* 61 1568-1574.

Ptak G, Tischer M, Bernabo N, and Loi P, 2003. Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biol Reprod* 69, 278-285.

Pugh PA, Fukui Y, Tervit HR, Thompson KI, 1991: Developmental ability of *in vitro* matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized *in vitro* with frozen ram semen. *Theriogenology* 36 771-778.

Quirke JF, 1979: Effect of body weight on the attainment of puberty and reproductive performance of Galway and Fin-galway female lambs. *Animal Prod* 28 297-307.

Quirke JF, Hanrahan JP, 1977: Comparison of the survival in the uteri of adult ewes of cleaved ova from adult ewes and ewe lambs. *J Reprud Fertil* 51 487-489.

Quirke LD, Juengel JL, Tisdall DJ, Lun S, Heath DA, McNatty KP, 2001: Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprud* 65 216-228.

Rajakoski E 1960: The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol (Copenh)* 34(Suppl 52) 1-68.

Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP, 1994: Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J Reprud Fertil* 101 501-509.

Rawlings NC, Churchill IJ, 1990: Effect of naloxone on gonadotrophin secretion at various stages of development in the ewe lamb. *J Reprud Fertil* 89 503-509.

Rawlings NC, Evans ACO., Honaramooz A, Bartlewski PM, 2003: Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprud Sci* 78 259-270.

Recabarren SE, Jofre A, Lobos A, Orellana P, Parilo J, 1996: Effect of arginine and ornithine infusions on luteinizing hormone secretion in prepubertal ewes. *J Anim Sci* 74 162-166.

Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y, 1995: Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprud Fertil* 103 115-120.

Reynaud K, Driancourt MA, 2000: Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol* 163 101-108.

Rondina D, Freitas VJF, Amorim CA, Mafucci A, Conti S, Cecchi R, Paula NRO, Martini A, 2005: Preantral follicular development in Massese lambs born during two seasons of the year. *Small Rumin Res* 57 277-280.

Rosales-Torres AM, Avalos-Rodriguez A, Vergara-Onofre M, Hernandez-Perez O, Ballesteros LM, Garcia-Macedo R, Ortiz-Navarrete V, Rosado A, 2000: Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprud Dev* 55 270-281.

Rubianes E, Ungerfeld R, Viiioles C, Rivero A, Adams GP, 1997: Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47 1479-1488.

Ryan KD, Goodman RL, Karsch FJ, Legan SJ, Foster DL, 1991: Patterns of circulating gonadotropins and ovarian steroids during the first periovulatory period in the developing sheep. *Biol Reprod* 45 471-477.

Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, Duby RT, 2001: Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod* 64 1761-1768.

Santiago-Moreno J, Gomez-Brunet A, Gonzalez de Bulnes A, Villar D, Lopez-Sebastian A, 2000: Attainment of puberty in the European Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and the domestic manchega ewe (*Ovis aries*). *Reprod Dom Anim* 35 49-52.

Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP, 2002: Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* 66 1134-1150.

Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, 1993: A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5 459-478.

Schneider JE, Zhou D, Blum RM, 2000: Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm Behav* 37 306-326.

Senger PL, 2003: Reproductive Cyclicity - The Follicular Phase/ Reproductive Cyclicity - The Luteal Phase/ Puberty. In: Senger PL (ed). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions, Inc. WA, USA, pp. 164-187/ 188-213/ 128-143.

Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM, 2005: A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for *in vitro* maturation. *Small Rumin Res* 58 283-286.

Smeaton TC, Robertson HA, 1971: Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep. *J Reprod Fertil* 25 243-252.

Snyder DA, Nellor JE, 1975: Development of the laparoscopic technique for *in vivo* collection of follicular oocytes in sheep. *Fed Proc* 34 338.

Sonjaya H, Driancourt MA, 1987: Ovarian follicles during infancy in Romanov and Ile-de-France ewe lambs. *J Reprod Fertil* 87 241-248.

Sonjaya H, Driancourt MA, 1989: Ovarian morphology and function in 12-week-old lambs from breeds

with different ovulation rates as adults. *Reprod Fertil Dev* 1 265-272.

Souza CJH, Campbell BK, Baird DT, 1996: Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anestrus. *J Reprod Fertil* 108 101-106.

Souza CJ, Campbell BK, Baird DT, 1997: Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol Reprod* 56 483-489.

Souza CJH, Campbell BK, Baird DT, 1998: Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endocrinol* 156 563-572.

Stangl M, Kühholzer B, Besenfelder U, Brem G, 1999: Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* 52 709-716.

Stephens PC, Edwards RG, 1978: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2 366.

Takeva Z, Georgieva R, Bulahbel S, Georgiev H, 1997: The interstitial gland of ovary of ewes from birth to sexual maturity. *Anim Reprod Sci* 48 235-246.

Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X, 2000: Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 62 206-213.

Tassell R, Chamley WA, Kennedy JP, 1976: Proceedings: Gonadotrophins in the neonatal female lamb. *J Reprod Fertil* 46 515.

Tassell R, Chamley WA, Kennedy JP, 1978: Gonadotrophin levels and ovarian development in the neonatal ewe lamb. *Aust J Biol Sci* 31 267-273.

Tassell R, Kennedy JP, 1980: Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb--fine structure and histochemistry. *Aust J Biol Sci* 33 675-687.

Tassell RJ, Kennedy JP, Bindon BM, Piper LR, 1983: Ovarian follicles of new-born Merino lambs from genetic lines which differ in fecundity. *Aust J Biol Sci* 36 351-355.

Tervit HR, 1996: Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Sci* 42 227-238.

Thibault C, Szollosi D, Gerard M, 1987: Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 27 865-896.

- Thibier M, 2005: Significant increases in transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle and contrasted trends in other species in 2004. Embryo Transfer Newsletter (IETS) 23 11-17.
- Tran CT, Edey TN, Findlay JK, 1979: Pituitary response of prepuberal lambs to oestradiol-17 beta. Aust J Biol Sci 32 463-467.
- Trounson AO, Chamley WA, Kennedy JP, Tassell R, 1974a: Proceedings: Ovarian follicles and hormonal characteristics of ewe lambs selected for and against multiple births. J Reprod Fertil 36 458-459.
- Trounson AO, Chamley WA, Kennedy JP, Tassell R, 1974b: Primordial follicle numbers in ovaries and levels of LH and FSH in pituitaries and plasma of lambs selected for and against multiple births. Aust J Biol Sci 27 293-299.
- Trounson AO, Willadsen SM, Moor RM, 1977: Reproductive function in prepubertal lambs: ovulation, embryo development and ovarian steroidogenesis. J Reprod Fertil 49 69-75.
- Turnbull KE, Braden AWH, Mattner PE, 1977: The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. Aust J Biol Sci. 30 229-241.
- van den Hurk R, Zhao J, 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology 63 1717-1751.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, 2006: Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. Theriogenology 65 914-925.
- Vinoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E, 2001: Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. Theriogenology 55 993-1004.
- Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG, 1999: Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. J Reprod Fertil 54 (Suppl) 33-48.
- Worthington CA, Kennedy JP, 1979: Ovarian response to exogenous hormones in six-week-old lambs. Aust J Biol Sci 32 91-95.
- Wrathall AE, 1995: Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. Theriogenology 43 81-88.
- Yang X, Presicce GA, Du F, Jiang S, 1997: Pregnancies and calves derived from pre-pubertal calf oocytes. Theriogenology 47 163.
- Yellon SM, Foster DL, 1985: Alternate photoperiods time puberty in the female lamb. Endocrinology 116 2090-2097.

Yenikoye A, Mariana JC, Celeux G, 1989: Follicular growth during the oestrous cycle in Peul sheep. *Anim Reprod Sci* 21 201-211.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 425-432.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Επίδραση της ηλικίας, της δόσης της χορηγούμενης FSH και της συχνότητας αναρρόφησης των ωοθυλακίων στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στην ικανότητα ωρίμανσης των συλλεγόμενων ωαρίων *in vitro*.

Το μεγαλύτερο μέρος του πειραματισμού αυτού έχει δημοσιευθεί στο περιοδικό

Reproduction in Domestic Animals.

*Age, FSH dose, and follicular aspiration frequency affect oocyte yield
from juvenile donor lambs.*

Irene Valasi, L Leontides, Th Papanikolaou, GS Amiridis

2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πειραματισμοί διενεργήθηκαν με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της ηλικίας των αμνάδων, της συχνότητας αναρρόφησης των ωοθυλακίων και της χρησιμοποίησης σταθερής ή μεταβλητής δόσης FSH στον αριθμό των συλλεχθέντων ωαρίων και την ικανότητα ωρίμανσης αυτών *in vitro*. Στο 1^ο πείραμα μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης των ωοθυλακίων (αριθμός και διάμετρος) σε 40 αμνάδες Καραγκούνικης φυλής οι οποίες θανατώθηκαν σε ηλικία 30 (ΘX1), 45 (ΘX2), 60 ημερών (ΘX3) και 5 έως 6 μηνών (ΘX4) (κάθε ομάδα n=10). Στο 2^ο πείραμα 17 αμνάδες ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων υποβλήθηκαν σε ορμονική αγωγή πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων και θανατώθηκαν 12 ώρες μετά το πέρας της αγωγής (ΘO). Στο 3^ο πείραμα 27 αμνάδες χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες. Οι αμνάδες της ομάδας ΕΣ (n=9) υποβλήθηκαν τέσσερις φορές σε αναρρόφηση ωοθυλακίων (OPU) σε μηνιαία μεσοδιαστήματα ξεκινώντας στην ηλικία των 8 έως 9 εβδομάδων (συνεδρίες ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3 και ΕΣ4). Στις αμνάδες των ομάδων ΜΣ2, ΜΣ3 και ΜΣ4 (κάθε μία n=6) η OPU έγινε μία φορά σε ηλικία 12 έως 13, 16 έως 17 και 20 έως 21 εβδομάδων, αντίστοιχα. Για τη διέγερση των ωοθηκών χρησιμοποιήθηκε σταθερή δόση FSH (3,52 mg/ζώο). Στο 4^ο πείραμα 10 αμνάδες (ομάδα ΕΔ) υποβλήθηκαν σε OPU όπως οι αμνάδες της ομάδας ΕΣ με τη διαφορά ότι η δόση της FSH που χορηγήθηκε προσαρμόστηκε στο βάρος του κάθε ζώου (0,27 mg/kg Σ.Β.). Ο αριθμός και το μέγεθος των ωοθυλακίων, ο αριθμός και η ποιότητα των συλλεχθέντων ωαρίων όπως και ικανότητα ωρίμανσης των ωαρίων *in vitro* συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων σε διάφορους συνδυασμούς.

Στο 1^ο πείραμα ο συνολικός αριθμός και ο αριθμός των μικρών ωοθυλακίων ήταν μεγαλύτερος (μέγιστο p=0,01) στις ομάδες ΘX1 και ΘX2 σε σχέση με τις ΘX3 και ΘX4. Ομοίως, ο πληθυσμός των ωοθυλακίων ήταν μεγαλύτερος (μέγιστο p=0,01) στην ομάδα ΕΣ1 σε σχέση με την ΜΣ3. Στη συνεδρία ΕΣ2 συλλέχθηκαν περισσότερα ωάρια σε σχέση με τα ζώα της ίδιας ηλικίας που αναρροφήθηκαν μία φορά (ΜΣ2). Συνολικά περισσότερα (p=0,02) ωάρια ανά δότρια συλλέχθηκαν από την ομάδα ΕΔ (15,2±5,5) σε σχέση με την ΕΣ (9,0±3,2). Κανένα από τα ωάρια που συλλέχθηκαν από τις ομάδες ΜΣ2 και ΜΣ3 δεν ωρίμασε *in vitro*. Η ικανότητα ωρίμανσης κυμαινόταν (p=0,04) από 16,7 έως 58,3% μεταξύ των συνεδριών της ομάδας ΕΣ, αλλά φάνηκε να είναι πιο ομοιογενής (p>0,05) στις αντίστοιχες της ομάδας ΕΔ (από 12,5 έως 42,9%). Δεν ανιχνεύθηκε διαφορά μεταξύ της ομάδας ΘO και των αμνάδων άλλων ομάδων της ίδιας ηλικίας εκτός του μεγαλύτερου (p<0,0001) ποσοστού συλλογής των ωαρίων στην ομάδα ΘO (81,3 vs 43,3%, αντίστοιχα). Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι (α) η

ανάπτυξη των ωοθυλακίων όπως και ο αριθμός και η ποιότητα των συλλεχθέντων ωαρίων νεαρών αμνάδων μπορούν να βελτιωθούν μετά από προσαρμογή της δόσης της χορηγούμενης FSH στο βάρος του κάθε ζώου και ότι (β) οι αμνάδες ηλικίας 3 και 4 μηνών παρουσιάζουν φτωχή ανάπτυξη ωοθυλακίων και ωάρια που δεν ωριμάζουν *in vitro*, αλλά η ικανότητα ωρίμανσης των ωαρίων που συλλέγονται από αμνάδες αυτών των ηλικιών μπορεί να βελτιωθεί αν έχει διενεργηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων και σε νεαρότερη ηλικία.

2.2 ABSTRACT

Experiments were conducted to determine the effects of lamb age, frequency of follicular aspirations, and hormone stimulation by fixed or variable FSH dose, on the number of collected oocytes and their maturational competence. In trial one the characteristics of follicular population (number and diameter of follicles) were studied in 40 lambs which were slaughtered at the age of 30 days (ΘX1), 45 days (ΘX2), 60 days (ΘX3) and 5 to 6 months (ΘX4), each n=10. In trial two 17 stimulated lambs were slaughtered at the age of 8-12 weeks (ΘO). In trial three 27 lambs were divided into four groups. Group ΕΣ lambs (n=9) had follicular aspiration (OPU) in four monthly intervals commencing from the age of 8 to 9 weeks (sessions ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3 and ΕΣ4). In groups ΜΣ2, ΜΣ3 and ΜΣ4 (each n=6) OPU was conducted once during the 12 to 13, 16 to 17 and 20 to 21 week of age, respectively. Ovarian stimulation was conducted with fixed FSH dose (3.52 mg/animal). In trial four, ten lambs (group ΕΔ) were treated as those of group ΕΣ apart from the FSH dose, which was administered according to the body weight in a dose of 0.27 mg/kg. The number and the size of follicles, the number and the quality of collected oocytes and the maturational competence of the oocytes were compared between and within groups.

In trial 1 the total number and the number of small follicles were greater (maximum p=0.01) in groups ΘX1 and ΘX2 compared with those of ΘX3 and ΘX4. Similarly the follicular population was greater (maximum p=0.01) in group ΕΣ1 than in group ΜΣ3. In session ΕΣ2 more oocytes were collected in comparison to that from the respective once-aspirated age mates (group ΜΣ2). In total more (p=0.02) oocytes per donor were collected from group ΕΔ (15.2±5.5) than from group ΕΣ (9.0±3.2). An absolute maturational failure was observed in oocytes collected from groups ΜΣ2 and ΜΣ3. Maturational competence varied (p=0.04) between 16.7 and 58.3% among sessions of group ΕΣ, but it was more uniform (p>0.05) among sessions of group ΕΔ

(range 12.5 to 42.9). Apart from the greater ($p<0.0001$) recovery rate of oocytes collected from the slaughtered lambs no other difference was detected between group ΘΟ and the respective lambs of the same age. Our results indicate that (a) the follicular development, the number and the quality of harvested oocytes from juvenile lambs can be much improved if follicular stimulation regime is adjusted to the body weight and (b) in terms of follicular population and oocyte quality, 3- and 4-month-old lambs are naturally bad oocyte donors, but this characteristic can be reversed by a previously conducted follicular ablation.

2.3 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *in vivo* συλλογή ωαρίων από αμνάδες γίνεται συνήθως με αποκάλυψη των ωοθηκών μετά από λαπαροτομή (Tervit 1996, Armstrong και συν. 1997, Ptak και συν. 1999, 2003, Kelly και συν. 2005) ή με λαπαροσκοπικές τεχνικές, οι οποίες γενικώς θεωρούνται περισσότερο ενδεδειγμένες μέθοδοι στα μικρά μηρυκαστικά (McKelvey και συν. 1986, Baldassarre και συν. 1996, Anel και συν. 1997, Αμοιρίδης και συν. 1998, Stangl και συν. 1999).

Η *in vivo* αναρρόφηση των ωοθυλακίων στις αμνάδες διενεργείται κατά κανόνα μετά από ορμονική διέγερση των ωοθηκών. Τα πρωτόκολλα πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων συνήθως συνδυάζουν τη χορήγηση γοναδοτροπινών και προγεστερόνης ή προγεσταγόνων (Armstrong και συν. 1994, Earl και συν. 1995, Anel και συν. 1997, Armstrong και συν. 1997, Ledda και συν. 1999b, Ptak και συν. 1999, 2003, Morton και συν. 2004, 2005a, Kelly και συν. 2005). Ενώ η αναγκαιότητα της χορήγησης γοναδοτροπινών φαίνεται να είναι αδιαμφισβήτητη, ορισμένοι ερευνητές έχουν εκφράσει την επιφύλαξή τους για τη χρησιμοποίηση προγεσταγόνων συγχρόνως με την αγωγή με γοναδοτροπίνες (Kelly και συν. 2005).

Ο πληθυσμός και η διάμετρος των ωοθυλακίων των αμνάδων ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από την ηλικία, τη φυλή, το δείκτη ωοθυλακιορρηξιών και πολυδυμίας (Land 1970, Trounson και συν. 1974, Tassell και συν. 1983, Sonjaya και Driancourt 1987, Jorio και συν. 1991, Bartlewski και συν. 2002, 2006). Ο αριθμός γρααφιανών ωοθυλακίων στις ωοθήκες αμνάδων ηλικίας 12 εβδομάδων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των προβατίνων της ίδιας φυλής (Sonjaya και Driancourt 1989). Στις αμνάδες η ανάπτυξη των ωοθυλακίων δεν ακολουθεί το κυματοειδές πρότυπο (Rawlings και συν. 2003, Bartlewski και συν. 2006) το οποίο

παρατηρείται σε άνηβες μοσχίδες (Evans και συν. 1994) και προβατίνες (Noël και συν. 1993, Ginther και συν. 1995, Bartlewski και συν. 2000, Evans 2003).

Η ανταπόκριση των ωοθηκών στην ορμονική αγωγή ποικίλλει και εξαρτάται από την ηλικία, το άτομο, το είδος της αγωγής και την κατάσταση (πληθυσμός-μέγεθος) των ωοθυλακίων κατά την έναρξη της αγωγής (Sonjaya και Driancourt 1987, Meikle και συν. 1998, Ptak και συν. 2003). Ως γενικός κανόνας, η δόση των γοναδοτροπινών που χορηγείται σε αμνάδες που υποβάλλονται μία ή περισσότερες φορές σε αναρρόφηση ωοθυλακίων καθορίζεται ανεξάρτητα από την ηλικία και το σωματικό βάρος τους (Anel και συν. 1997, Ptak και συν. 1999, 2003). Σύμφωνα, όμως, με τα αποτελέσματα προκαταρκτικών ερευνών μας, οι αμνάδες που είχαν μικρότερο σωματικό βάρος εμφάνιζαν συνήθως καλύτερη ανάπτυξη ωοθυλακίων μετά από ορμονική αγωγή σταθερής δόσης γοναδοτροπινών σε σχέση με τις βαρύτερες αμνάδες της ίδιας ηλικίας.

Ο αριθμός των ωοθυλακίων και το ποσοστό συλλογής ωαρίων μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας σε αμνάδες (Ptak και συν. 2003), άνηβες μοσχίδες (Taneja και συν. 2000) και ερίφια (Baldassarre και συν. 2004, Baldassarre και Karatzas 2004). Ωστόσο, ο συνολικός αριθμός των ωαρίων που συλλέγονται από άνηβα ζώα είναι μεγαλύτερος από αυτόν των ενηλίκων (Ptak και συν. 1999, Koeman και συν. 2003, Baldassarre και Karatzas 2004). Τα ευρήματα αυτά καθιστούν τα άνηβα ζώα πολύτιμη πηγή εξεύρεσης ωαρίων, η βελτίωση του αριθμού και της ποιότητας των οποίων αποτελεί αντικείμενο διαρκούς έρευνας.

Η ικανότητα ανάπτυξης *in vitro* των ωαρίων που συλλέγονται από άνηβα μηρυκαστικά αποτελεί βασικό παράγοντα της τελικής απόδοσης σε παραγόμενα έμβρυα. Έχει υποστηριχθεί ότι η ικανότητα ανάπτυξης *in vitro* των ωαρίων που προέρχονται από άνηβα ζώα είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή των ενηλίκων (Revel και συν. 1995, O'Brien και συν. 1996, Ledda και συν. 1997, O'Brien και συν. 1997b, Presicce και συν. 1997, Ptak και συν. 1999, Kochhar και συν. 2002) ή δε διαφέρει (Armstrong και συν. 1992, Irvine και συν. 1993, Armstrong και συν. 1994, 1997, Mogas και συν. 1997, Izquierdo και συν. 2002, Koeman και συν. 2003). Ανεξάρτητα από την ηλικία της δότριας ωαρίων, η ωρίμανση των ωαρίων αποτελεί τον κύριο περιοριστικό παράγοντα στην *in vitro* παραγωγή εμβρύων (Mermillod και συν. 1999). Άλλοι περιοριστικοί παράγοντες είναι η ηλικία της δότριας ωαρίων και η διατήρηση της εγκυμοσύνης μετά από μεταφορά σε δέκτριες των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων (Armstrong και συν. 1992, Revel και συν. 1995, Ledda και συν. 1997, O'Brien και συν. 1997b, Brown και Radziewicz 1998, Ptak και συν. 1999, 2003, Morton και συν. 2005a, Kelly και συν. 2005).

Με βάση τα παραπάνω, η παρούσα έρευνα σχεδιάστηκε με σκοπό την αύξηση του αριθμού των ωαρίων που μπορούν να συλλεχθούν από αμνάδες Καραγκούνικης φυλής. Αρχικά, μελετήθηκε η φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων αμνάδων σε διάφορες ηλικίες. Ακολούθως, σε αμνάδες που υποβλήθηκαν σε ορμονική αγωγή μελετήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι: (1) η ανταπόκριση των ωοθηκών στην ορμονική αγωγή και το ποσοστό συλλογής ωαρίων μετά από λαπαροσκοπική αναρρόφηση ωοθυλακίων σε διάφορες ηλικίες, (2) η επίδραση της επανειλημμένης εφαρμογής της αγωγής και αναρρόφησης των ωοθυλακίων στην ανταπόκριση των ωοθηκών, (3) εάν η προσαρμογή της δόσης των γοναδοτροπινών στο σωματικό βάρος επηρεάζει την ανταπόκριση της ωοθήκης και (4) η ικανότητα ωρίμανσης *in vitro* των ωαρίων που συλλέγονται από μία ή από επανειλημμένες αναρροφήσεις ωοθυλακίων.

2.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4.1 Πειραματόζωα και ορμονική αγωγή

Οι αμνάδες γεννήθηκαν το χειμώνα του 2003-2004 και παρέμειναν σταβλισμένες σε όλη τη διάρκεια των πειραματισμών. Αμέσως μετά τον απογαλακτισμό τους, που έγινε σε ηλικία 6 εβδομάδων, διατρέφονταν με ισορροπημένο σιτηρέσιο ανάπτυξης ενώ το σωματικό βάρος τους προσδιορίστηκε στη γέννηση, στον απογαλακτισμό, σε ηλικία 2 μηνών και στη συνέχεια κάθε μήνα μέχρι την ηλικία των 5 μηνών. Όλοι οι πειραματισμοί της παρούσας διατριβής διενεργήθηκαν μετά από σχετική έγκριση της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Ν.Α. Καρδίτσας (αριθμός άδειας 1520/14-4-2003).

1^ο πείραμα

Για τις ανάγκες του πειραματισμού χρησιμοποιήθηκαν σαράντα (40) αμνάδες ηλικίας 30 ημερών οι οποίες χωρίστηκαν σε τέσσερις ισάριθμες ομάδες σύμφωνα με την ηλικία στην οποία θανατώθηκαν: την ΘΧ1 σε ηλικία 30 ημερών, την ΘΧ2 σε ηλικία 45 ημερών, την ΘΧ3 σε ηλικία 60 ημερών και την ΘΧ4 σε ηλικία 5 έως 6 μηνών. Οι αμνάδες δεν υποβλήθηκαν σε ορμονική αγωγή ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Αμέσως μετά τη θανάτωση αφαιρέθηκε το γεννητικό σύστημα των ζώων, τοποθετήθηκε σε ισοθερμικό δοχείο και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο. Ακολούθησε καταγραφή του αριθμού και της διαμέτρου των εμφανών στην επιφάνεια της ωοθήκης ωοθυλακίων. Ως μικρά ορίστηκαν τα ωοθυλάκια διαμέτρου <2 mm (gonadotrophin-responsive,

ανταποκρινόμενα στις γοναδοτροπίνες) και ως μεγάλα τα διαμέτρου ≥ 2 mm (gonadotrophin-dependent, εξαρτημένα στις γοναδοτροπίνες) (van den Hurk και Zhao, 2005).

2^ο πείραμα

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 17 αμνάδες (ομάδα ΘΟ) ηλικίας 7 έως 11 εβδομάδων στις οποίες εφαρμόστηκε ορμονική αγωγή διέγερσης των ωοθηκών. Αρχικά χορηγήθηκαν προγεσταγόνα για την αποφυγή της ωρίμανσης των ωοθυλακίων και της ωοθυλακιόρρηξίας που θα μπορούσε να συμβεί υπό την επίδραση των εξωγενών γοναδοτροπινών. Στη συνέχεια χορηγήθηκε πρόβεια FSH για την πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων. Το πρωτόκολλο ορμονικής αγωγής που εφαρμόστηκε περιγράφεται στο Διάγραμμα 2.1 και τον Πίνακα 2.1. Οι αμνάδες θανατώθηκαν 12 έως 14 ώρες μετά το πέρας της αγωγής σε ηλικία 8 έως 12 εβδομάδων. Οι ωοθήκες συλλέχθηκαν με κάθε δυνατό μέτρο ασηψίας και τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικό δοχείο που περιείχε υπόστρωμα έκπλυσης (Πίνακας 2.2), σε θερμοκρασία 25 έως 30°C, με οσμωτική πίεση 285-295 mOsm και pH 7,2. Η μεταφορά των ωοθηκών στο εργαστήριο έγινε σε χρονικό διάστημα δύο ωρών από τη θανάτωση του πρώτου ζώου. Ακολούθησε αναρρόφηση των ωοθυλακίων όπως περιγράφεται παρακάτω (2.4.2). Ο πειραματισμός του τμήματος αυτού διενεργήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ. και στο Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Παλαμά Καρδίτσας.

3^ο πείραμα

Χρησιμοποιήθηκαν 27 αμνάδες ηλικίας 7 έως 8 εβδομάδων, οι οποίες χωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερις ομάδες: στην ΕΣ (n=9), την ΜΣ2 (n=6), την ΜΣ3 (n=6) και την ΜΣ4 (n=6). Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων (OPU) διενεργήθηκε μία φορά σε αμνάδες ηλικίας 12 έως 13 (ΜΣ2), 16 έως 17 (ΜΣ3) και 20 έως 21 εβδομάδων (ΜΣ4). Στις αμνάδες της ομάδας ΕΣ η αναρρόφηση των ωοθυλακίων έγινε 4 φορές σε μηνιαία μεσοδιαστήματα αρχίζοντας στην ηλικία των 8 έως 9 εβδομάδων (συνεδρίες: ΕΣ1=ΜΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4). Πριν από τη διενέργεια της κάθε OPU οι αμνάδες υποβάλλονταν σε ορμονική αγωγή όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2.1 και το Διάγραμμα 2.1. Οι πειραματισμοί του τμήματος αυτού διενεργήθηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ. και στο Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Παλαμά Καρδίτσας.

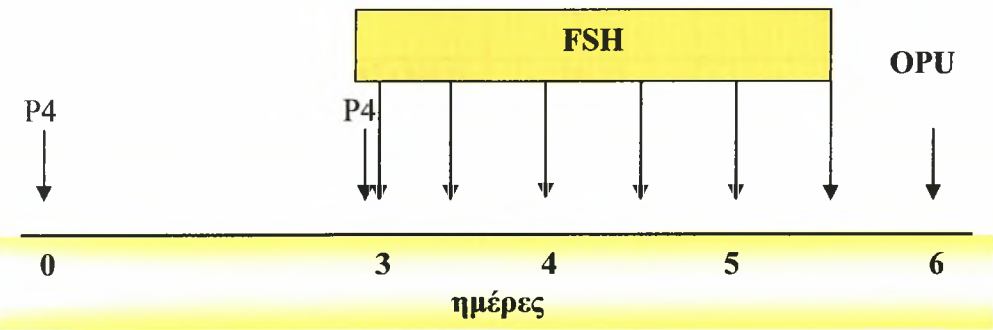
4^ο πείραμα

Χρησιμοποιήθηκαν 10 αμνάδες (ομάδα ΕΔ) ηλικίας 7 έως 8 εβδομάδων, οι οποίες υποβλήθηκαν τέσσερις φορές σε OPU όπως ακριβώς και οι αμνάδες της ομάδας ΕΣ. Στις αμνάδες αυτής της ομάδας η δόση της FSH που χορηγήθηκε προσαρμόστηκε στο σωματικό βάρος (ΣΒ) του κάθε ζώου (Πίνακας 2.1). Ωστόσο, στην πρώτη OPU (συνεδρία ΕΔ1) η αγωγή με FSH που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με της ομάδας ΕΣ1 (3,52 mg/αμνάδα), διότι το σωματικό βάρος δε διέφερε μεταξύ των ζώων των δύο ομάδων (14,9±2,98 και 16,5±3,63 kg για την ομάδα ΕΣ1 και ΕΔ1, αντίστοιχα). Στις επόμενες συνεδρίες της ομάδας ΕΔ (ΕΔ2, ΕΔ3, ΕΔ4) η αγωγή με FSH ρυθμίστηκε στα 0,27 mg/kg σωματικού βάρους. Οι πειραματισμοί του τμήματος αυτού διενεργήθηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ. και στο Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Παλαμά Καρδίτσας.

Υποσημείωση: οι συντομογραφίες των ομάδων συμβολίζουν:

- ΘΧ:** Θανάτωση - Χωρίς ορμονική αγωγή
- ΘΟ:** Θανάτωση - με Ορμονική αγωγή
- ΕΣ:** Επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων - Σταθερή δόση FSH ανεξαρτήτως ΣΒ
- ΜΣ:** Μία αναρρόφηση ωοθυλακίων - Σταθερή δόση FSH ανεξαρτήτως ΣΒ
- ΕΔ:** Επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων - Δόση FSH προσαρμοσμένη στο ΣΒ

Διάγραμμα 2.1: Χρονοδιάγραμμα του πρωτοκόλλου ορμονικής αγωγής και αναρρόφησης ωοθυλακίων (OPU) στις ομάδες ΘΟ, ΕΣ, ΜΣ και ΕΔ.



P4: Proluton Depot, Schering AG, Γερμανία
FSH: Ovagen, Bodinco B.V., Ολλανδία

Πίνακας 2.1: Ορμονική αγωγή των δοτριών ωαρίων

	ΟΜΑΔΑ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΟΤΡΙΩΝ (εβδομάδες)	ΑΓΩΓΗ
2 ^ο ΠΕΙΡΑΜΑ	Ομάδα ΘΟ n=17	8-12	25 mg P4 ^α i.m., δις
			3,52 mg FSH ^β i.m. σε έξι ισόποσες δόσεις ανά 12 ώρες
			θανάτωση και OPU
3 ^ο ΠΕΙΡΑΜΑ	Ομάδα ΕΣ1 (1 ^η OPU) n=9	8-9	25 mg P4 ^α i.m., δις
			3,52 mg FSH ^β i.m. σε έξι ισόποσες δόσεις ανά 12 ώρες
			OPU <i>in vivo</i>
	Ομάδα ΕΣ2 (2 ^η OPU) n=9	12-13	όπως στην ΕΣ1
	Ομάδα ΕΣ3 (3 ^η OPU) n=9	16-17	>>
	Ομάδα ΕΣ4 (4 ^η OPU) n=9	20-21	>>
	Ομάδα ΜΣ2 n=6	12-13	>>
	Ομάδα ΜΣ3 n=6	16-17	>>
4 ^ο ΠΕΙΡΑΜΑ	Ομάδα ΕΔ1 (1 ^η OPU) n=10	8-9	25 mg P4 ^α i.m., δις
			3,52 mg FSH ^β i.m., σε έξι ισόποσες δόσεις ανά 12 ώρες
			OPU <i>in vivo</i>
	Ομάδα ΕΔ2 (2 ^η OPU) n=10	12-13	25 mg P4 ^α i.m., δις
			0,27 mg/kg FSH ^β i.m. σε έξι ισόποσες δόσεις ανά 12 ώρες
			OPU <i>in vivo</i>
	Ομάδα ΕΔ3 (3 ^η OPU) n=10	16-17	όπως στην ΕΔ2
4 ^ο ΠΕΙΡΑΜΑ	Ομάδα ΕΔ4 (4 ^η OPU) n=10	20-21	>>

^αProluton Depot, Schering AG, Γερμανία

^βOvagen, Bodinco B.V., Ολλανδία

ΘΟ: Θανάτωση - με Ορμονική αγωγή
ΕΣ: Επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων - Σταθερή δόση FSH ανεξαρτήτως ΣΒ
ΜΣ: Μία αναρρόφηση ωοθυλακίων – Σταθερή δόση FSH ανεξαρτήτως ΣΒ
ΕΔ: Επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων - Δόση FSH προσαρμοσμένη στο ΣΒ

2.4.2 Αναρρόφηση ωοθυλακίων (OPU)

α) Λαπαροσκοπικά

Πριν από την OPU οι αμνάδες παρέμεναν χωρίς τροφή και νερό για 24 και 12 ώρες, αντίστοιχα. Στις αμνάδες λίγο πριν από την OPU γινόταν προνάρκωση με υδροχλωρική ξυλαζίνη (0,1 mg/kg i.m., Rompun, Bayer, Γερμανία) και μετά από 15 λεπτά εγκατάσταση και διατήρηση γενικής αναισθησίας με θειοπεντόνη (10 mg/kg i.v., 2,5%, Thiopental, Nycomed, Γερμανία). Η χορήγηση της θειοπεντόνης γινόταν από τη σφαγίτιδα φλέβα. Αμέσως μετά την αναισθητοποίηση η κάθε αμνάδα τοποθετούνταν σε ειδικό κινητό χειρουργικό τραπέζι σε ύπτια κατάκλιση και με υπερυψωμένο το οπίσθιο τμήμα του σώματος (κλίση 45° περίπου). Ακολουθούσε προετοιμασία του χειρουργικού πεδίου (κοιλιακή περιοχή από τον ομφαλό μέχρι το πρόσθιο όριο του μαστού).

Στη συνέχεια, γινόταν δυο τομές (1 cm) του δέρματος σε θέση 3 έως 4 cm δεξιά και αριστερά της μέσης κοιλιακής γραμμής και 4 έως 5 cm κεφαλικά της βάσης του μαστού. Στην αριστερή τομή εισαγόταν τροκάρ, διαμέσου του οποίου εισαγόταν το λαπαροσκόπιο. Στη δεξιά τομή εισαγόταν δεύτερο τροκάρ για την είσοδο της λαβίδας συγκράτησης. Για τη διευκόλυνση των χειρισμών και την αποφυγή τραυματισμών γινόταν εμφύσηση CO₂ στην κοιλιακή κοιλότητα με συσκευή πνευμοπεριτοναίου, υπό ελεγχόμενη πίεση, που συνδεόταν με το τροκάρ του ενδοσκοπίου.

Η σταθεροποίηση των ωοθηκών επιτυγχανόταν με τοποθέτηση ατραυματικής λαβίδας συγκράτησης στο σημείο του ιδίου συνδέσμου της ωοθήκης. Κατά τη λαπαροσκοπική παρατήρηση των ωοθηκών γινόταν καταγραφή του αριθμού και της διαμέτρου των εμφανών ωοθυλακίων έτσι ώστε τα ωοθυλάκια με διάμετρο ≥ 2 mm να χαρακτηρίζονται ως μεγάλα ενώ εκείνα με διάμετρο < 2 mm ως μικρά. Η εκτίμηση της διαμέτρου των ωοθυλακίων γινόταν χρησιμοποιώντας ως κλίμακα το μέγεθος της κόπτουσας επιφάνειας της βελόνας αναρρόφησης (μήκος 2 mm, διάμετρος 1 mm). Η αναρρόφηση του περιεχομένου των ωοθυλακίων γινόταν με τη βοήθεια αντλίας υποπίεσης ρυθμισμένης να αναρροφά 13 έως 16 ml νερού ανά λεπτό. Η δημιουργία κενού επιτυγχανόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με την αντλία. Στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα προσαρμοζόταν ελαστικός σωλήνας αναρρόφησης, που ήταν συνδεδεμένος στο άλλο άκρο του με τη βελόνα αναρρόφησης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες περιείχαν 2 ml υποστρώματος έκπλυσης (Πίνακας 2.2) και διατηρούνταν σε υδατόλουτρο (37°C) μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Για την αποφυγή δημιουργίας συμφύσεων, με την ολοκλήρωση της αναρρόφησης των ωοθυλακίων, οι ωοθήκες ξεπλένονταν με φυσιολογικό ορό (Sodium Chloride 0,9%, ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε.,

Ελλάδα). Μετά το πέρας της αναρρόφησης των ωοθυλακίων του κάθε ζώου ο σωλήνας αναρρόφησης ξεπλενόταν με 2 ml υποστρώματος έκπλυσης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το περιεχόμενο ωοθυλακικό υγρό τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο στους 37°C μέχρι να αρχίσει η διαδικασία της αναζήτησης και αξιολόγησης των ωαρίων (το αργότερο μέσα σε δύο ώρες).

Τέλος, η σύγκλειση των τομών γινόταν με μεταλλικούς αγκήρες Mitchel, ενώ τα τραύματα ψεκάζονταν με αερόλυμα που περιείχε αντιβιοτικό (Terramycin Aerosol Spray, Pfizer Hellas A.E., Ελλάδα).

Εξοπλισμός (Εικόνα 2.1)

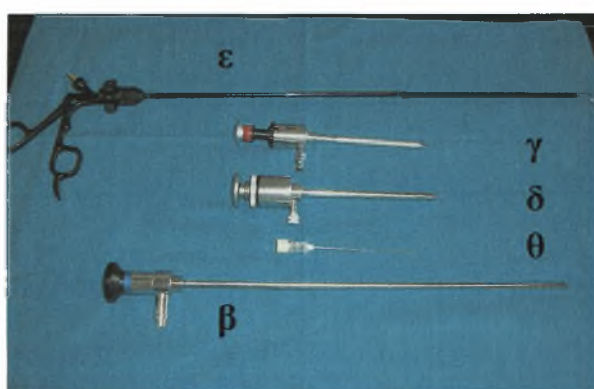
- (α) Φωτεινή πηγή ψυχρού φωτισμού (250.2H, Schöolly FIBEROPTIC GMBH, Γερμανία)
- (β) Ενδοσκόπιο εξωτερικής διαμέτρου 4,5 mm, μήκους 31 cm και οπτικής γωνίας 30° (Schöolly FIBEROPTIC GMBH, Γερμανία)
- (γ) Τροκάρ ενδοσκοπίου εσωτερικής διαμέτρου 5 mm (Schöolly FIBEROPTIC GMBH, Γερμανία)
- (δ) Τροκάρ λαβίδας συγκράτησης εσωτερικής διαμέτρου 5,5 mm (Schöolly FIBEROPTIC GMBH, Γερμανία)
- (ε) Ατραυματική λαβίδα χαλαρής συγκράτησης τύπου φτερού διαμέτρου 5 mm και μήκους στελεχών συγκράτησης 31 mm (Schöolly FIBEROPTIC GMBH, Γερμανία)
- (στ) Συσκευή πνευμοπεριτοναίου (VERESS[®], Karl Storz GmbH και Co., Γερμανία)
- (ζ) Αντλία αναρρόφησης ωοθυλακίων (Medela-Vario, 6002601, Ελβετία)
- (η) Ελαστικός σωλήνας αναρρόφησης μήκους 80 mm, εσωτερικής διαμέτρου 1,5 mm και εξωτερικής 3 mm
- (θ) Βελόνες αναρρόφησης ωοθυλακίων (Spinocan[®], 20G, 75 mm, Braun Medi-cal, M.Enzersdorf, Αυστρία)
- (ι) Δοκιμαστικοί γυάλινοι σωλήνες αποστειρωμένοι όγκου 10 ml



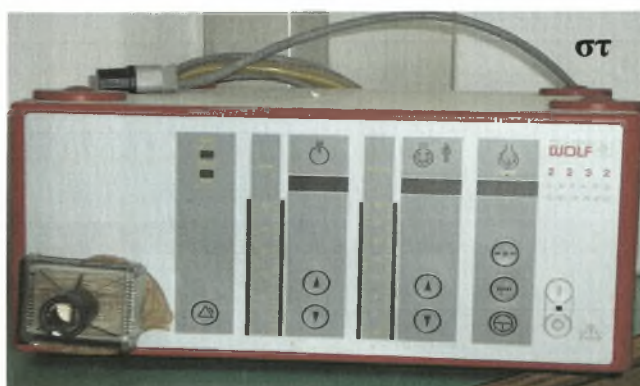
α: Φωτεινή πηγή ψυχρού φωτισμού
β: Ενδοσκόπιο



ζ: Αντλία αναρρόφησης ωοθυλακίων
η: Ελαστικός σωλήνας αναρρόφησης



γ: Τροκάρ ενδοσκοπίου
δ: Τροκάρ λαβίδας συγκράτησης
ε: Ατραυματική λαβίδα τύπου φτερού
θ: Βελόνα αναρρόφησης

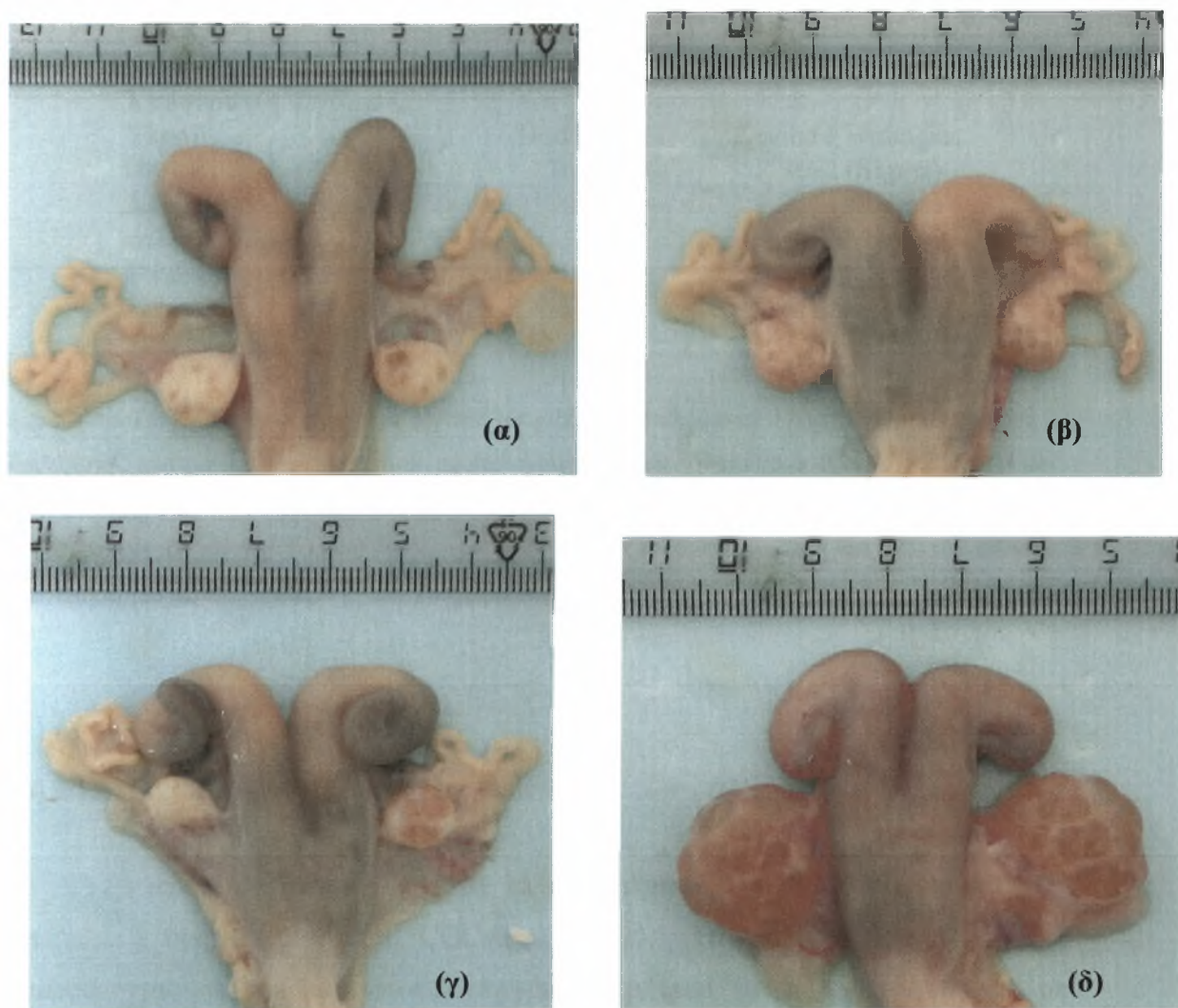


στ: Συσκευή πνευμοπεριτοναίου

Εικόνα 2.1: Απαραίτητος εξοπλισμός για τη διενέργεια λαπαροσκοπικής αναρρόφησης ωοθυλακίων.

β) Αναρρόφηση ωοθυλακίων από πτωματικές ωοθήκες

Αμέσως μετά την προσκόμιση των γεννητικών συστημάτων των αμνάδων στο εργαστήριο, έγινε η καταμέτρηση του αριθμού και της διαμέτρου των ορατών ωοθυλακίων (μεγάλα ωοθυλάκια ≥ 2 mm, μικρά ωοθυλάκια < 2 mm). Πριν από την έναρξη της συλλογής των ωαρίων έγιναν τρεις διαδοχικές πλύσεις των ωοθηκών με υπόστρωμα έκπλυσης (Πίνακας 2.2), για τη μείωση του εξωτερικού μικροβιακού φορτίου τους. Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων από πτωματικές ωοθήκες διενεργήθηκε όπως ακριβώς και η *in vivo* αναρρόφηση με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε βελόνα μικρότερου μήκους (20G, 1¹/₂, BD Drogheda, Ιρλανδία).



Εικόνα 2.2: Εικόνες ωοθηκών μετά την πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων (α) και (β) καμία αντίδραση των ωοθηκών, (γ) καλή αντίδραση της δεξιάς ωοθήκης και (δ) υπερβολική αντίδραση (εικόνα ‘μούρου’) και στις δύο ωοθήκες.

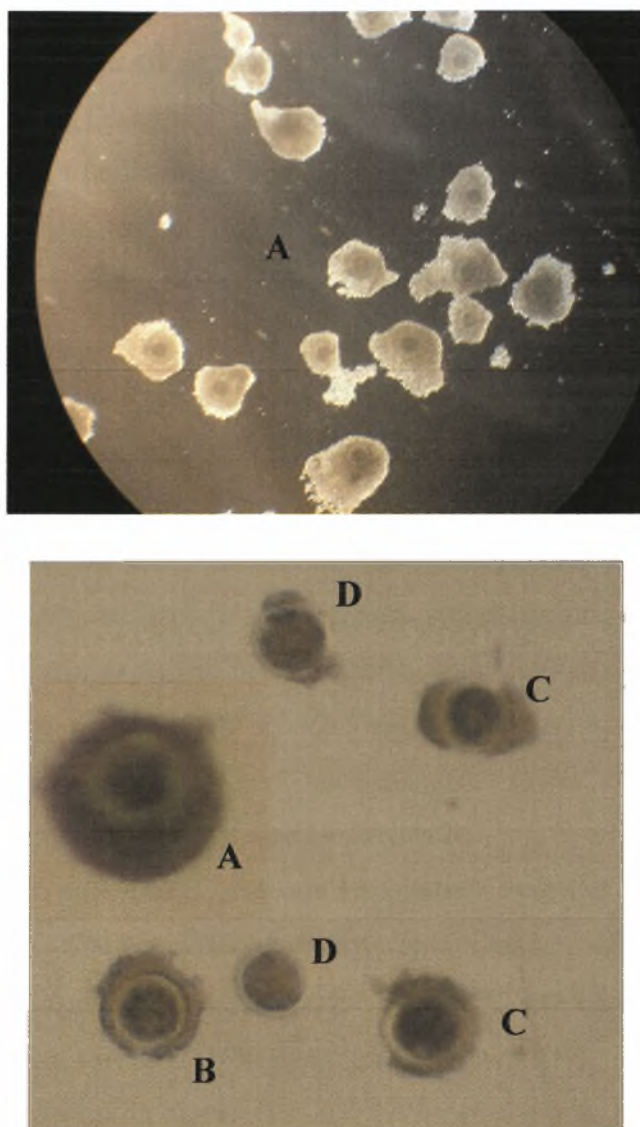
Πίνακας 2.2: Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων κατά Dulbecco (PBS) και υποστρώματος έκπλυσης

Διάλυμα I		
Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
NaCl	8,0 g	S 5886 (Sigma, ΗΠΑ)
KCl	0,2 g	P 5405 (Sigma)
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g	M 2393 (Sigma)
CaCl ₂	0,1 g	C 2661 (Sigma)
H ₂ O	qs 500 ml	
Διάλυμα II		
Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
Na ₂ HPO ₄	1,00 g	S 5136 (Sigma)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,15 g	S 9638 (Sigma)
KH ₂ PO ₄	0,20 g	7566 (Merck,Γερμανία)
H ₂ O	qs 500 ml	
Υπόστρωμα έκπλυσης		
Υλικό	Ποσότητα	Κωδικός Εταιρείας
Πυροσταφυλικό νάτριο	36 mg	P 3662 (Sigma)
Άλας πενικιλίνης με κάλιο	20 mg	P 7794 (Sigma)
Θειική στρεπτομυκίνη	40 mg	S 9137 (Sigma)
Γλυκόζη	1000 mg	G 6152 (Sigma)
PBS	qs 1000 ml	

Σημείωση: Το PBS παρασκευαζόταν με την ανάμιξη των διαλυμάτων I και II. Η αποστείρωση του διαλύματος γινόταν με διήθηση μέσω μικροβιοκρατών ηθμών (διαμέτρου 0,2μm, Millipore) με τη χρησιμοποίηση ειδικής συσκευής στην οποία η εφαρμογή της απαραίτητης υποπίεσης επιτυγχανόταν με αντλία κενού. Το pH του τελικού διαλύματος ήταν 7,2 και η οσμωτική πίεσή του 285-295 mOsm. Η συντήρησή του γινόταν στους 4°C, έως 30 ημέρες.

2.4.3 Εκτίμηση ποιότητας ωαρίων

Το ωοθυλακικό υγρό μαζί με τα συμπλέγματα ωαρίων - ωοφόρων δίσκων (cumulus - oocyte complexes, COCs), που συλλέγονταν σε δοκιμαστικό σωλήνα, μεταφέρονταν σε τρυβλίο ιστοκαλλιέργειας διαμέτρου 10 cm. Ακολουθούσε, υπό στερεοσκοπική παρατήρηση, η εντόπιση (μεγέθυνση x40) και η εκτίμηση (μεγέθυνση x100) της ποιότητας των συλλεχθέντων COCs. Τα COCs κατατάσσονταν ως προς την ποιότητα τους σε 4 κατηγορίες: τις A, B (καλής ποιότητας) και τις C, D (κατώτερης ποιότητας) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Ωάρια ποιότητας A, B, C και D .

2.4.4 *In vitro* ωρίμανση ωαρίων (IVM)

Όλα τα ωάρια που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε *in vitro* ωρίμανση εκτός από εκείνα που είχαν σκοτεινό ή εκφυλισμένο κυτταρόπλασμα (κατηγορία D).

Αρχικά τα ωάρια υποβάλλονταν σε διαδοχική δίοδο από 2 τρυβλία διαμέτρου 3 cm που περιείχαν 3 ml υποστρώματος ωρίμανσης. Το υπόστρωμα ωρίμανσης

παρασκευαζόταν την ημέρα της χρήσης του και αποτελούνταν από (Lutterbach και συν. 1987, Vergos 1990, Βαϊνάς και συν. 1994):

- Τροποποιημένο κατά Parker υπόστρωμα
[Modified Parker's Medium, MPM: TCM 199 (ICN Biomedicals, 12-202, Ohio, ΗΠΑ), 1,77 mM Ca-lactate (Merck, 2103, Γερμανία), 0,62 mM L-glutamine (Sigma, G8540, St.Louis, MO, ΗΠΑ), 8,66 mM NaHCO₃ (Sigma, S5761), 5,34 mM Hepes (sodium salt, Sigma, H6147), 2,07 mM Na-pyruvate (Sigma, P3662), 0,05 mM penicilline K-salt (Sigma 7794) και 0,025 mM streptomycin sulfate (Sigma, 9137)]
- Ορό αγελάδας σε οίστρο (OCS) 10% (v/v)
- Ωοθυλακιότροπο ορμόνη (FSH, Ovagen, Ολλανδία) σε συγκέντρωση 21 µg/ml υποστρώματος

Στη συνέχεια, τα COCs τοποθετούνταν κατά ομάδες σε χωριστά βοηθία των ειδικών τρυβλίων ιστοκαλλιέργειας (4 βοηθίων χωρητικότητας 1 ml/βοθρίο, Nunclon, Rockslide, Δανία), που περιείχαν 360 µl MPM, 40µl OCS και 10µl FSH. Η οσμωτική πίεση ήταν 280-300 mOsm, ενώ το pH (7,4) ρυθμιζόταν, πριν από την έναρξη της ωρίμανσης, με την παραμονή του υποστρώματος στον επωαστικό κλίβανο σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα για 1 ώρα τουλάχιστον.

Η ωρίμανση των COCs γίνονταν με στατικό σύστημα σε επωαστικό κλίβανο CO₂ (SHEL LAB, Sheldon Manufacturing Inc., Oregon, ΗΠΑ) για 24 ώρες, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ σε αέρα, θερμοκρασία 39±0,1 °C και υγρασία >95% (Lutterbach και συν. 1987, Βαϊνάς και συν. 1994, Lonergan και συν. 1999).

2.4.5 Εκτίμηση της in vitro ωρίμανσης των ωαρίων με βάση την ωρίμανση του πυρήνα τους

Μετά την 24ωρη IVM γινόταν εκτίμηση της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων. Η διαδικασία αυτή περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια (Gradl 1988, Kinis και συν. 1989, Βαϊνάς και συν. 1994):

- Μετά το τέλος της IVM, τα ωάρια απογυμνώνονταν από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (κοκκώδη κύτταρα) που τα περιέβαλαν, με μεταφορά τους σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 3 ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 2,96% (w/v) και με ισχυρή ανακίνησή τους σε κυκλομείκτη για 4 λεπτά περίπου.

- Αμέσως μετά τα ωάρια μεταφέρονταν σε τρυβλίο που περιείχε 3 ml υπότονου διαλύματος KCL (0,075 M), στο οποίο παρέμεναν για 5 έως 7 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C, προκειμένου να διευρυνθεί η απόσταση μεταξύ των χρωματοσωμάτων τους.
- Στη συνέχεια, τα ωάρια μεταφέρονταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και μονιμοποιούνταν με στάγδην εναπόθεση, και υπό στερεοσκοπική παρατήρηση, ψυχρού μονιμοποιητικού διαλύματος (οξικό οξύ / μεθανόλη σε αναλογία 1:3 v/v). Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχανόταν η διάλυση της διαφανούς ζώνης και η σταθεροποίηση των ωαρίων στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Τα παρασκευάσματα αφήνονταν 24 ώρες για ξήρανση σε συνθήκες περιβάλλοντος και ακολουθούσε η χρώση τους με διάλυμα ορκεΐνης 2% (5 gr Orcein, 150 ml CH₃COOH, 100 ml H₂O, Merck, Γερμανία) για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, γινόταν πλύση των παρασκευασμάτων με διαδοχική εμβάπτισή τους στην ακόλουθη σειρά διαλυμάτων: α) οξικό οξύ 45%, β) αιθυλική αλκοόλη 70%, γ) αιθυλική αλκοόλη 96%, δ) αιθυλική αλκοόλη 100%, ε) αιθυλική αλκοόλη 100%, στ) ξυλόλη 100%, ζ) ξυλόλη 100%.

Η εκτίμηση της εξέλιξης της ωρίμανσης του πυρήνα των ωαρίων γινόταν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου κοινού φωτισμού (μεγέθυνση x1000). Κατά την παρατήρηση των παρασκευασμάτων ο πυρήνας των ωαρίων βρισκόταν σε ένα από τα παρακάτω στάδια:

- Πρόφαση I (PI)
- Μετάφαση I (MI)
- Ανάφαση I (AI)
- Τελόφαση I (TI)
- Μετάφαση II (MII) (Διάγραμμα 1.2, σελ. 47)

Ως ώριμα θεωρούνταν τα ωάρια που βρίσκονταν στο στάδιο της μετάφασης II (Leibfried-Rutledge και συν. 1986, Chian και συν. 1992, Dominko και First 1997). Τα εξεταζόμενα ωάρια που δεν ήταν δυνατόν να εκτιμηθούν ως προς το στάδιο ωρίμανσης του πυρήνα τους χαρακτηρίζονταν ως αδιευκρίνιστα.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα SAS έκδοση 8 (Statistical Analysis System, Cary, North Carolina, ΗΠΑ). Η εκτίμηση της σημαντικότητας διενεργήθηκε στο επίπεδο 5%.

1^ο πείραμα

Οι μέσοι όροι του αριθμού των συνολικών και των μικρών ωοθυλακίων συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων ΘΧ1, ΘΧ2, ΘΧ3 και ΘΧ4 με τη δοκιμή ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA). Οι πολλαπλές συγκρίσεις έγιναν με τη δοκιμή Tukey. Οι διάμεσες τιμές του αριθμού των μεγάλων ωοθυλακίων μεταξύ των προαναφερθέντων ομάδων συγκρίθηκαν με τη δοκιμή Kruskal-Wallis.

2^ο, 3^ο και 4^ο πείραμα

Οι διάμεσες τιμές του αριθμού των ωοθυλακίων της κάθε κατηγορίας (συνολικά, μεγάλα, μικρά) και του αριθμού των συλλεχθέντων ωαρίων της ομάδας ΘΟ (2^ο πείραμα, ζώα που θανατώθηκαν σε ηλικία 8 έως 12 εβδομάδων) συγκρίθηκαν με το άθροισμα των αντίστοιχων των ομάδων ΕΣ1, ΜΣ2 και ΕΔ1 (ηλικίας 8 και 12 εβδομάδων) με τη δοκιμή Mann-Whitney U. Επίσης, έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων που συμμετείχαν στο 3^ο ή στο 4^ο πείραμα καθώς και μεταξύ των ομάδων του 3^{ου} και του 4^{ου} πειράματος με τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Οι μέσοι όροι του συνολικού πληθυσμού και του αριθμού των μικρών ωοθυλακίων συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων των ζώων που αναρροφήθηκαν μία φορά σε διαφορετικές ηλικίες χρησιμοποιώντας την ίδια σταθερή δόση FSH, δηλαδή των ΕΣ1 (συνώνυμο του ΜΣ1, 2 μηνών), ΜΣ2 (3 μηνών), ΜΣ3 (4 μηνών) και ΜΣ4 (5 μηνών), με τη δοκιμή ANOVA. Οι πολλαπλές συγκρίσεις έγιναν με τη δοκιμή Tukey. Οι διάμεσες τιμές του αριθμού των μεγάλων ωοθυλακίων και των συλλεχθέντων ωαρίων μεταξύ των προαναφερθέντων ομάδων συγκρίθηκαν με τη δοκιμή Kruskal-Wallis. Οι πολλαπλές συγκρίσεις έγιναν με τη δοκιμή Mann-Whitney U με προσαρμογή της κρίσιμης τιμής p με τη μέθοδο Bonferroni.

Για τις ομάδες ζώων που υποβλήθηκαν σε επανειλημμένες αναρροφήσεις (ΕΣ1 έως 4 και ΕΔ1 έως 4) οι συγκρίσεις μεταξύ του συνολικού αριθμού, του αριθμού των μεγάλων, των μικρών ωοθυλακίων και των συλλεχθέντων ωαρίων έγιναν μεταξύ των τεσσάρων συνεδριών της κάθε ομάδας και μεταξύ των δύο ομάδων με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης για επανειλημμένες μετρήσεις στο λογισμικό PROC MIXED. Στις συγκρίσεις αυτές η ομάδα (ΕΣ και ΕΔ) ήταν ο παράγοντας μεταξύ (between-subjects factor) των καταμετρήσεων των ωοθυλακίων ή των ωαρίων στα ζώα ενώ ο χρόνος (1 έως 4) ήταν ο παράγοντας εντός (within-subjects factor) των καταμετρήσεων των ωοθυλακίων ή των ωαρίων στα ίδια ζώα. Σε αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό, παραγοντικός με επανειλημμένες μετρήσεις, το αναλυτικό ενδιαφέρον εστιάζεται στο

κατά πόσο οι μέσοι όροι του αριθμού των ωοθυλακίων και ωαρίων μεταβάλλονταν με τον χρόνο και στο κατά πόσο οι μεταξύ των ομάδων διαφορές των μέσων όρων του αριθμού των ωοθυλακίων και ωαρίων μεταβάλλονταν με τον χρόνο. Αρχικά, αναλύθηκαν μοντέλα με διαφορετικές μορφές συγκρότησης της συνδιακύμανσης. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η μορφή της σύνθετης συμμετρίας, του πρώτου βαθμού αυτο-συσχετισμού και η ασυγκρότητη μορφή. Η απόφαση ως προς το ποια μορφή συγκρότησης είχε την καλύτερη προσαρμογή στα δεδομένα βασίστηκε στη μεγαλύτερη τιμή του κριτηρίου του Akaike. Ακολούθως, οι πολλαπλές ανά δύο συγκρίσεις έγιναν με τις κατάλληλες εντολές CONTRAST. Οι μέσοι όροι του συνολικού αριθμού των συλλεχθέντων ωαρίων (και των 4 OPU) συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων ΕΣ και ΕΔ με τη δοκιμή t .

Με την ίδια δοκιμή συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι του πληθυσμού των ωοθυλακίων και των συλλεχθέντων ωαρίων ανά ζεύγη μεταξύ των ομάδων των αμνάδων του 3^{ου} πειράματος που υποβλήθηκαν σε OPU στην ίδια ηλικία (ΕΣ2 με ΜΣ2, ΕΣ3 με ΜΣ3, ΕΣ4 με ΜΣ4).

Τα ποσοστά συλλογής ωαρίων (αριθμός συλλεχθέντων ωαρίων / αριθμός αναρροφηθέντων ωοθυλακίων %), της ποιότητας των συλλεχθέντων ωαρίων και τα ποσοστά των ώριμων μετά την IVM ωαρίων συγκρίθηκαν μεταξύ των διαφόρων ομάδων με τη δοκιμή χ^2 του Pearson ή το ακριβές test του Fisher. Όταν οι ομάδες σύγκρισης ήταν παραπάνω από δύο οι πολλαπλές συγκρίσεις έγιναν με τη δοκιμή χ^2 του Pearson ή το ακριβές test του Fisher με προσαρμογή της κρίσιμης τιμής p με τη μέθοδο Bonferroni. Ως καλύτερης ποιότητας ωάρια θεωρήθηκαν όσα ανήκαν στις κατηγορίες Α και Β ενώ ως ώριμα ωάρια θεωρήθηκαν εκείνα που βρίσκονταν στη Μετάφαση ΙΙ (MII).

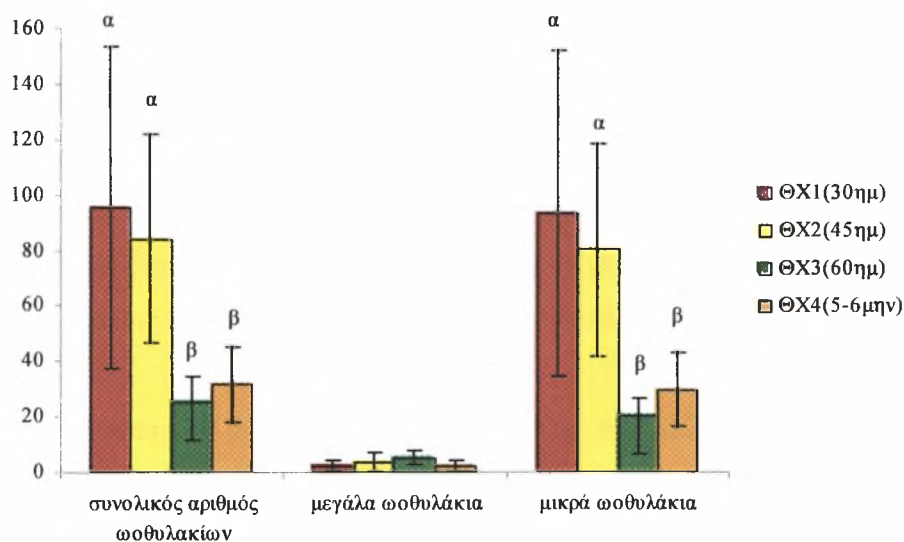
2.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανάλογα με τη στατιστική δοκιμή που εφαρμόστηκε τα αποτελέσματα θα έπρεπε να παρουσιάζονται ως μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις ή ως διάμεσες τιμές και εύρος (παραμετρική ή μη-παραμετρική δοκιμή, αντίστοιχα). Για την ομοιογένεια όμως της εικόνας στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις παρουσιάζονται μόνο ως μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις.

1^ο πείραμα

Ο συνολικός πληθυσμός και ο αριθμός των μικρών ωοθυλακίων ήταν μεγαλύτερος (το μέγιστο p ήταν 0,01) στην ομάδα ΘΧ1 (30 ημερών) και στην ΘΧ2 (45 ημερών) συγκρινόμενες η κάθε μία με την ομάδα ΘΧ3 (60 ημερών) και την ΘΧ4 (5 έως 6 μηνών). Ο αριθμός των μεγάλων ωοθυλακίων δε διέφερε ($p=0,15$) μεταξύ των προαναφερθέντων ομάδων (Διάγραμμα 2.2). Η μέγιστη διάμετρος ωοθυλακίου που καταγράφηκε ήταν 5 mm από τον 1^ο στο 2^ο μήνα και 4 mm στον 6^ο μήνα της ηλικίας των αμνάδων.

Διάγραμμα 2.2: Κατανομή (μέσος όρος±τυπική απόκλιση) του συνολικού αριθμού, των μεγάλων (≥ 2 mm) και των μικρών (< 2 mm) ωοθυλακίων μεταξύ των αμνάδων που δεν υποβλήθηκαν σε ορμονική αγωγή (1^ο πείραμα) και θανατώθηκαν σε ηλικία 30 ημερών, 45 ημερών, 60 ημερών και 5 έως 6 μηνών.



Υποσημείωση: Οι στήλες που είναι σημειωμένες με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν ($p<0,05$)

2^ο, 3^ο και 4^ο πείραμα

α) Ανάπτυξη ωοθυλακίων μετά την ορμονική αγωγή

Κατά τη μακροσκοπική παρατήρηση των ωοθηκών των αμνάδων την καλύτερη ανάπτυξη ωοθυλακίων μετά την ορμονική αγωγή παρουσίασαν οι αμνάδες των ομάδων ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΔ1, ΕΔ2, ΕΔ4 και ΘΟ. Σε ό,τι αφορά στην ανταπόκριση των ωοθηκών της κάθε ομάδας, στην ομάδα ΘΟ στο 53,3% των ζώων υπήρξε ελάχιστη αντίδραση (μόνο 0 έως 2 μεγάλα ωοθυλάκια). Στην ομάδα ΕΣ1 δύο αμνάδες δεν αντέδρασαν σε καμία από τις τέσσερις ορμονικές αγωγές (22,2%) παρουσιάζοντας μόνο μικρά ωοθυλάκια διαμέτρου <2 mm. Φτωχή ανάπτυξη ωοθυλακίων (μόνον 1 έως 2 μεγάλα ωοθυλάκια) καταγράφηκε σε ακόμη 3 αμνάδες της ομάδας ΕΣ στην 3^η και την 4^η ΟΡΥ. Επομένως, στην ομάδα ΕΣ το ποσοστό των αμνάδων που δεν αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή αυξήθηκε στην 3^η και στη 4^η συνεδρία (από 22,2% στην 1^η και 2^η ΟΡΥ μέχρι 55,5% στην 3^η και 4^η ΟΡΥ). Επίσης, φτωχή αντίδραση στην ορμονική αγωγή παρουσίασαν το 66,6% των αμνάδων της ομάδας ΜΣ2, το 33,3% της ΜΣ3 και το 16,6% της ΜΣ4. Στην ομάδα ΕΔ παρατηρήθηκε καλή αντίδραση των ωοθηκών σε όλες τις αμνάδες.

Ο πληθυσμός των ωοθυλακίων (συνολικά, μεγάλα, μικρά) δε διέφερε μεταξύ της ομάδας ΘΟ και του αντίστοιχου αθροίσματος των ομάδων ΕΣ1, ΜΣ2, ΕΔ1 που μελετήθηκαν στην ίδια ηλικία [Συνολικός αριθμός ωοθυλακίων (διάμεσος και εύρος): 9 και 0-29, 14 και 0-25, αντίστοιχα. Μεγάλα ωοθυλάκια: 2 και 0-29, 5 και 0-24, αντίστοιχα. Μικρά ωοθυλάκια: 2 και 0-12, 6,5 και 0-20, αντίστοιχα. COCs: 6 και 0-27, 4 και 0-13, αντίστοιχα).

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2.3, συγκρίνοντας τις ομάδες ΕΣ1, ΜΣ2, ΜΣ3 και ΜΣ4 η μόνη διαφορά ($p=0,01$) εντοπίστηκε στο συνολικό αριθμό των ωοθυλακίων μεταξύ των ομάδων ΕΣ1 και ΜΣ3 (μέσος όρος±τυπική απόκλιση: 16,9±6,3 και 8,0±4,9, αντίστοιχα).

Συγκρίνοντας τις ομάδες ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4 με τις ΜΣ2, ΜΣ3, ΜΣ4, αντίστοιχα, βρέθηκε διαφορά στο συνολικό αριθμό των ωοθυλακίων ($p=0,033$) μεταξύ των ομάδων ΕΣ4 και ΜΣ4 (6,44±3,32 και 10,83±3,76, αντίστοιχα) και στον αριθμό των συλλεγόμενων ωαρίων ($p=0,016$) μεταξύ των ομάδων ΕΣ2 και ΜΣ2 (5,22±2,73 και 1,83±1,47, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 2.3).

Ο συνολικός αριθμός των ωοθυλακίων μεταξύ των τεσσάρων ΟΡΥ της ομάδας ΕΣ ήταν μεγαλύτερος στην 1^η (το μέγιστο p ήταν 0,0002) σε σχέση με τη 2^η, την 3^η και την 4^η ΟΡΥ όπως επίσης στη 2^η ($p=0,04$) σε σχέση με την 4^η ΟΡΥ (16,89±6,25, 9,89±3,72, 7,0±3,24, 6,44±3,32 για τις ομάδες ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4, αντίστοιχα).

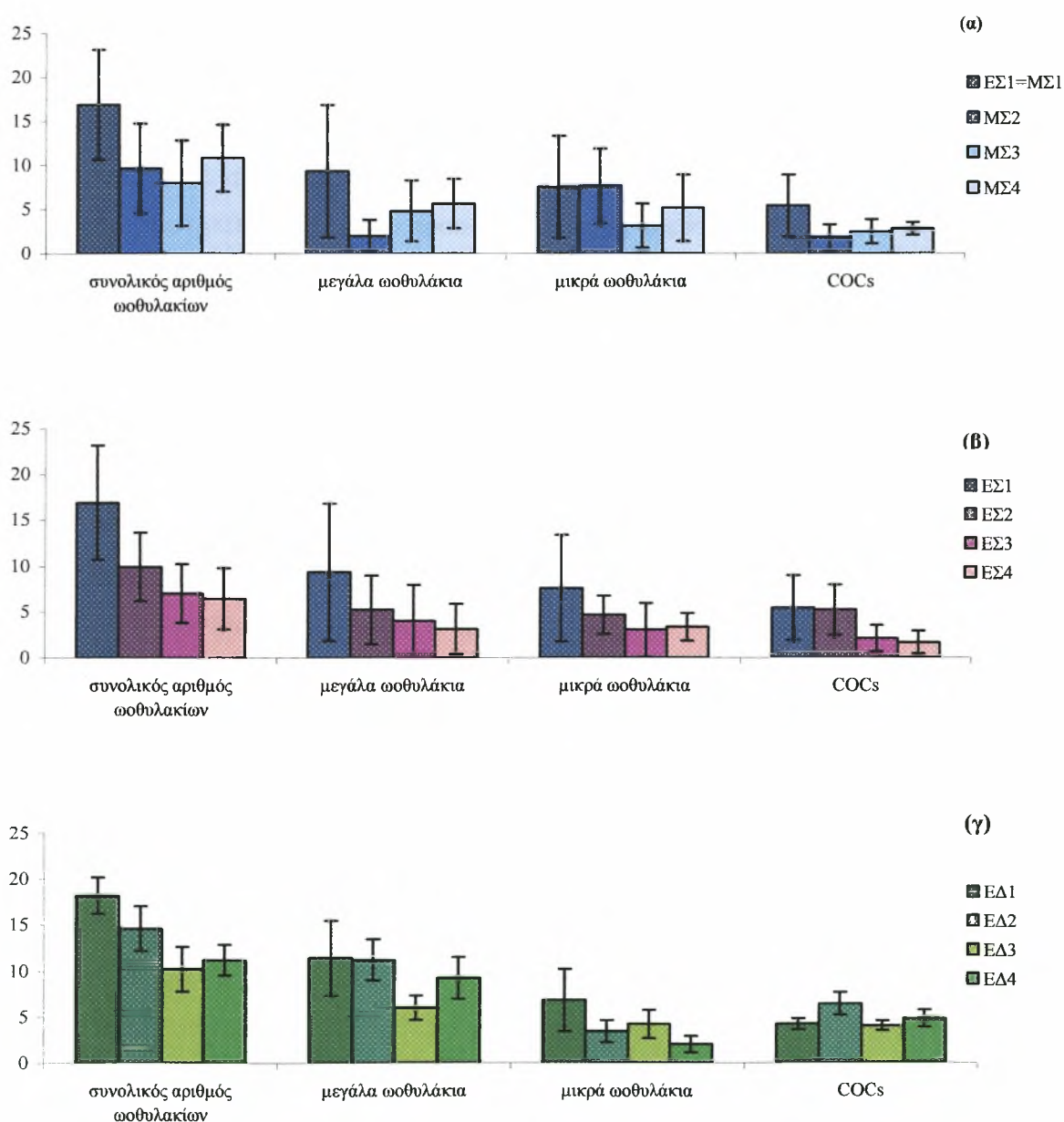
Επίσης, ο αριθμός των μεγάλων ωοθυλακίων ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα ΕΣ1 (το μέγιστο p ήταν 0,03) σε σχέση με την ΕΣ3 και την ΕΣ4, καθώς και στην ΕΣ2 ($p=0,02$) σε σχέση με την ΕΣ4 ($9,33\pm 7,48$, $5,22\pm 3,77$, $4,00\pm 3,97$, $3,11\pm 2,76$ για τις ομάδες ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4, αντίστοιχα). Επιπλέον, ο αριθμός των συλλεχθέντων ωαρίων ήταν μεγαλύτερος στην 1^η (το μέγιστο p ήταν 0,002) σε σχέση με την 3^η και την 4^η ΟΡΥ, όπως και στη 2^η ($p=0,002$) σε σχέση με την 3^η και την 4^η ΟΡΥ ($5,44\pm 3,54$, $5,22\pm 2,73$, $2,1\pm 1,45$, $1,67\pm 1,22$ για τις ομάδες ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 2.3).

Κατά αναλογία, ο συνολικός αριθμός των ωοθυλακίων μεταξύ των τεσσάρων ΟΡΥ της ομάδας ΕΔ ήταν μεγαλύτερος στην 1^η ($p=0,03$) σε σχέση με τη 2^η ΟΡΥ ($18,2\pm 4,44$, $14,6\pm 5,41$, $10,2\pm 5,45$, $11,2\pm 3,7$ για τις ομάδες ΕΔ1, ΕΔ2, ΕΔ3, ΕΔ4, αντίστοιχα). Παρότι ο αριθμός των μεγάλων και των μικρών ωοθυλακίων δε διέφερε, ο αριθμός των συλλεχθέντων ωαρίων ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα ΕΔ2 ($p=0,03$) σε σχέση με την ΕΔ3 ($4,2\pm 1,3$, $6,4\pm 2,79$, $4\pm 1,22$, $4,8\pm 2,17$ για τις ομάδες ΕΔ1, ΕΔ2, ΕΔ3, ΕΔ4, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 2.3).

Συγκρίνοντας τις ομάδες ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4 με τις ΕΔ1, ΕΔ2, ΕΔ3, ΕΔ4, ανά ζεύγη στην ίδια ηλικία, καταγράφηκε μεγαλύτερος συνολικός αριθμός ωοθυλακίων στην ομάδα ΕΔ4 ($p=0,03$) σε σχέση με την ΕΣ4 ($11,2\pm 3,7$ και $6,4\pm 3,3$, αντίστοιχα) και περισσότερα μεγάλα ωοθυλάκια στην ομάδα ΕΔ2 ($p=0,026$) και ΕΔ4 ($p=0,012$) σε σχέση με την ΕΣ2 και ΕΣ4, αντίστοιχα ($11,2\pm 4,9$ και $5,2\pm 3,8$, $9,2\pm 5,1$ και $3,1\pm 2,8$ για τις ομάδες ΕΔ2 και ΕΣ2, ΕΔ4 και ΕΣ4, αντίστοιχα). Επίσης, συλλέχθηκε μεγαλύτερος αριθμός ωαρίων στην ομάδα ΕΔ3 ($p=0,03$) και ΕΔ4 ($p=0,004$) σε σχέση με την ΕΣ3 και ΕΣ4, αντίστοιχα ($2,11\pm 1,45$ και $4,00\pm 1,22$, για την ΕΣ3 και ΕΔ3 - $1,67\pm 1,22$ και $4,8\pm 2,17$ για την ΕΣ4 και ΕΔ4). Δε βρέθηκε αλληλεπίδραση (το μέγιστο p ήταν 0,084) μεταξύ των ομάδων (ΕΣ και ΕΔ) και του αριθμού των ωοθυλακίων ή των συλλεχθέντων ωαρίων.

Ο συνολικός αριθμός συλλεχθέντων ωαρίων και από τις τέσσερις συνεδρίες μεταξύ των ομάδων ΕΣ και ΕΔ δε διέφερε ($p=0,1$) και ήταν $14,4\pm 5,7$ και $19,4\pm 4,4$, αντίστοιχα. Ωστόσο, ο μέσος όρος των συλλεχθέντων ωαρίων της 2^{ης}, 3^{ης} και 4^{ης} συνεδρίας ήταν μεγαλύτερος ($p=0,02$) στην ομάδα ΕΔ (όταν η χορήγηση της FSH έγινε με βάση το Σ.Β. των ζώων) σε σχέση με την ΕΣ ($15,2\pm 5,5$ και $9,0\pm 3,2$, αντίστοιχα).

Διάγραμμα 2.3: Κατανομή (μέσος όρος±τυπική απόκλιση) του συνολικού αριθμού, του αριθμού των μεγάλων (≥ 2 mm) και των μικρών (<2 mm) ωοθυλακίων καθώς και των συλλεχθέντων ωαρίων (COCs) στις ομάδες (α) ΕΣ1=ΜΣ1, ΜΣ2, ΜΣ3, ΜΣ4 (μια αναρρόφηση ωοθυλακίων - σταθερή δόση FSH ανεξαρτήτως ΣΒ - πρώτο διάγραμμα), (β) ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4 (επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων - σταθερή δόση FSH ανεξαρτήτως ΣΒ - δεύτερο διάγραμμα) και (γ) ΕΔ1, ΕΔ2, ΕΔ3, ΕΔ4 (επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων - δόση FSH προσαρμοσμένη στο ΣΒ - τρίτο διάγραμμα) μετά από ορμονική διέγερση των ωοθηκών σε ηλικία 8, 12, 16 και 20 εβδομάδων περίπου, αντίστοιχα.



Υποσημείωση: Διαφορές υπάρχουν ($p<0,05$) μεταξύ των ομάδων του κάθε διαγράμματος και μεταξύ των ομάδων του (β) και του (α) ή του (γ) διαγράμματος, αντίστοιχα:

Συνολικός αριθμός ωοθυλακίων: ΜΣ1>ΜΣ3
 ΜΣ4>ΕΣ4
 ΕΣ1>ΕΣ2 και ΕΣ3 και ΕΣ4
 ΕΣ2>ΕΣ4
 ΕΔ1>ΕΔ2
 ΕΔ4>ΕΙ4
 Αριθμός μεγάλων ωοθυλακίων: ΕΣ1>ΕΣ3 και ΕΣ4
 ΕΣ2>ΕΣ4
 ΕΔ2>ΕΣ2
 ΕΔ4>ΕΣ4
 Αριθμός COCs: ΜΣ1>ΜΣ2
 ΕΣ2>ΜΣ2
 ΕΣ1>ΕΣ3 και ΕΣ4
 ΕΣ2>ΕΣ3 και ΕΣ4
 ΕΔ2>ΕΔ3, ΕΔ3>ΕΣ3, ΕΔ4>ΕΣ4

β) Ποσοστό συλλογής ωαρίων

Το ποσοστό συλλογής ωαρίων από πτωματικές ωοθήκες (81,3%, ομάδα ΘΟ) ήταν μεγαλύτερο ($p<0,0001$) από το ποσοστό συλλογής ωαρίων *in vivo* από αμνάδες της ίδιας ηλικίας που υποβλήθηκαν στην ίδια ορμονική αγωγή (43,3%, ομάδες ΕΣ1, ΜΣ2, ΕΔ1). Το ποσοστό συλλογής ωαρίων *in vivo* κυμαινόταν από 32,8 μέχρι 88,7% (συνολικό ποσοστό 50,1%) με το μεγαλύτερο ποσοστό να σημειώνεται στην ομάδα ΕΣ2 (88,7%) και την ΕΔ2 (61,3%) και το μικρότερο στην ΕΔ1 (32,8%). Κατά τη σύγκριση των ποσοστών συλλογής ωαρίων *in vivo* βρέθηκε ότι το ποσοστό ήταν μεγαλύτερο ($p<0,0001$) στην ομάδα ΕΣ2 σε σχέση με την ΕΣ1 (47,6%), ΕΣ3 (41,3%) και ΕΣ4 (42,9%) καθώς και στην ΕΔ2 ($p=0,003$) σε σχέση με την ΕΔ1. Επίσης, το ποσοστό συλλογής ωαρίων ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα ΕΣ2 σε σχέση με την ΜΣ2 (55%, $p=0,003$) και την ΕΔ2 ($p=0,002$).

γ) Ποιότητα ωαρίων και ικανότητα ωρίμανσης *in vitro*

Τα ποσοστά των ωαρίων καλής ποιότητας (αριθμός ωαρίων καλής ποιότητας / συνολικός αριθμός ωαρίων %) ανά ομάδα ή συνεδρία ήταν: ΕΣ1 (15/37=40,5%), ΕΣ2 (11/43=25,6%), ΕΣ3 (4/18=22,2%), ΕΣ4 (0/15=0,0%), ΜΣ2 (4/11=36,4%), ΜΣ3 (4/14=28,6%), ΜΣ4 (6/17=35,3%), ΕΔ1 (14/42=33,3%), ΕΔ2 (24/64=37,5%), ΕΔ3 (10/40=25,0%) και ΕΔ4 (8/48=16,7%). Το ποσοστό αυτό ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα ΕΣ1 ($p=0,002$) σε σχέση με την ΕΣ4 και στην ομάδα ΜΣ4 ($p=0,02$) σε σχέση με την ΕΣ4. Επίσης, το ποσοστό των ωαρίων καλής ποιότητας που συλλέχθηκαν από πτωματικές ωοθήκες (36,3%, ομάδα ΘΟ) δε διέφερε ($p=0,9$) από το ποσοστό εκείνων

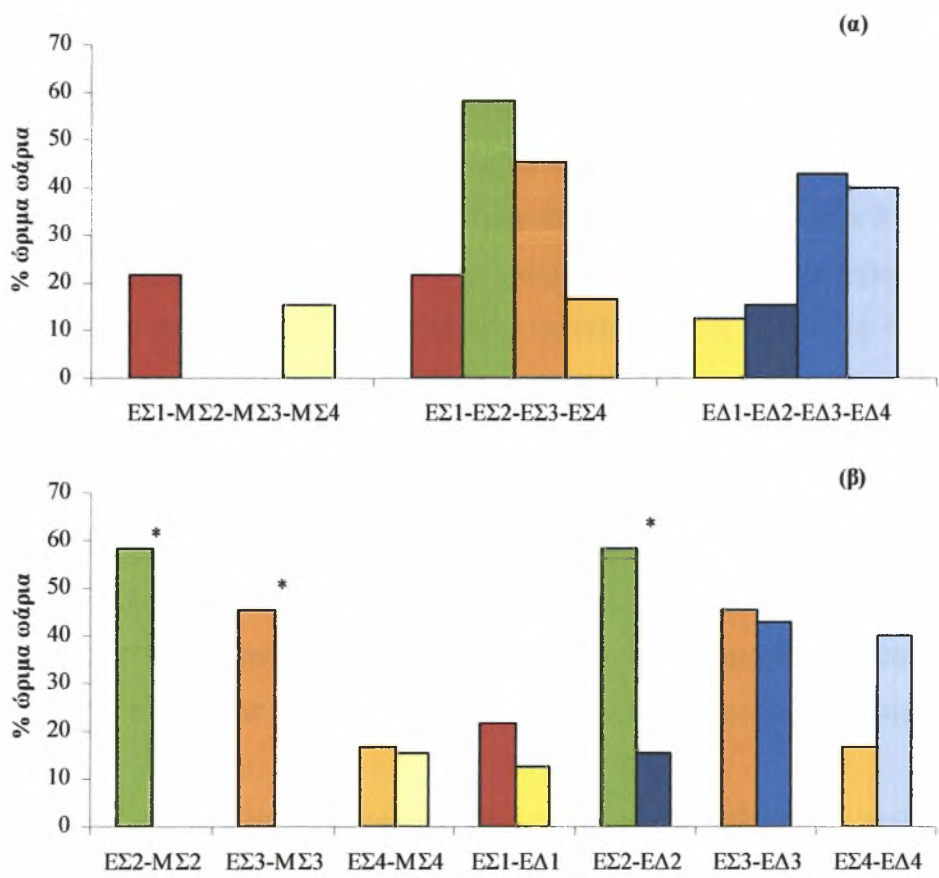
που συλλέχθηκαν *in vivo* από αμνάδες της ίδιας ηλικίας (37,7%, ομάδες ΕΣ1, ΜΣ2, ΕΔ1).

Το ποσοστό των ώριμων ωαρίων της ομάδας ΘΟ (35,7%) δε differed ($p=0,439$) από το ποσοστό των ώριμων ωαρίων που συλλέχθηκαν *in vivo* από αμνάδες της ίδιας ηλικίας (28,2%, ομάδες ΕΣ1, ΜΣ2, ΕΔ1). Παρότι το ποσοστό των ώριμων ωαρίων, κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφορετικών ομάδων σε διαφορετικές ηλικίες που υποβλήθηκαν στην ίδια ορμονική αγωγή (ΕΣ1, ΜΣ2, ΜΣ3, ΜΣ4), ήταν μηδενικό στην ομάδα ΜΣ2 (0,0%) και την ΜΣ3 (0,0%) και 21,7% στην ΕΣ1 και 15,4% στην ΜΣ4, δε βρέθηκε διαφορά ($p=0,2$). Το ποσοστό των ώριμων ωαρίων ήταν μεγαλύτερο στην ΕΣ2 ($p=0,02$) και την ΕΣ3 ($p=0,03$) σε σχέση με την ΜΣ2 και την ΜΣ3, αντίστοιχα, ενώ δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των ομάδων ΕΣ4 και ΜΣ4 [ώριμα/συνολικός αριθμός ωαρίων: 5/23 (21,7%), 14/24 (58,3%), 5/11 (45,5%), 1/6 (16,7%), 0/8 (0,0%), 0/11 (0,0%) και 2/13 (15,4%) για τις ομάδες ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4, ΜΣ2, ΜΣ3 και ΜΣ4, αντίστοιχα] (Διάγραμμα 2.4).

Το ποσοστό των ώριμων ωαρίων differed ($p=0,04$) μεταξύ των ομάδων ΕΣ1, ΕΣ2, ΕΣ3, ΕΣ4. Ωστόσο, η ανά ζεύγος σύγκριση των ποσοστών με προσαρμογή της κρίσιμης τιμής p με τη μέθοδο Bonferroni (κρίσιμο επίπεδο $p=0,008$) έδωσε μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, με τη μικρότερη διαφορά να υπάρχει μεταξύ των ομάδων ΕΣ1 και ΕΣ2 ($p=0,017$). Το ποσοστό των ώριμων ωαρίων δε differed μεταξύ των ομάδων ΕΔ1, ΕΔ2, ΕΔ3 και ΕΔ4 [ώριμα/συνολικός αριθμός ωαρίων : 2/16 (12,5%), 4/26 (15,4%), 6/14 (42,9%) και 12/30 (40,0%), αντίστοιχα] (Διάγραμμα 2.4).

Μεταξύ των ομάδων που υποβλήθηκαν σε επανειλημμένες αναρροφήσεις χρησιμοποιώντας διαφορετική δόση FSH το ποσοστό των ώριμων ωαρίων ήταν μεγαλύτερο ($p=0,003$) στην ομάδα ΕΣ2 από ότι στην ΕΔ2, ενώ δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των υπολοίπων ανά ζεύγη συγκρίσεων (Διάγραμμα 2.4).

Διάγραμμα 2.4: Ποσοστό ώριμων ωαρίων μετά την IVΜ μεταξύ των ομάδων (α) ΕΣ1-ΜΣ2-ΜΣ3-ΜΣ4, ΕΣ1-ΕΣ2-ΕΣ3-ΕΣ4 και ΕΔ1-ΕΔ2-ΕΔ3-ΕΔ4 σε ηλικία 2-3-4-5 μηνών, αντίστοιχα και (β) ΕΣ2-ΜΣ2 (3 μηνών), ΕΣ3-ΜΣ3 (4 μηνών), ΕΣ4-ΜΣ4 (5 μηνών), ΕΣ1-ΕΔ1 (2 μηνών), ΕΣ2-ΕΔ2 (3 μηνών), ΕΣ3-ΕΔ3 (4 μηνών) και ΕΣ4-ΕΔ4 (5 μηνών). Σημειώνεται ότι κανένα ωάριο (0,0%) δεν ωρίμασε στις ομάδες ΜΣ2 και ΜΣ3.



Υποσημείωση: στήλες στις ανά ζεύγη συγκρίσεις που σημειώνονται με αστερίσκο (*) διαφέρουν ($p < 0,05$)

2.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επιβεβαιώνουν προηγούμενα ευρήματα σε ερίφια και αμνάδες, σύμφωνα με τα οποία η ανάπτυξη των ωοθυλακίων, μετά από ορμονική αγωγή χρησιμοποιώντας την ίδια δόση FSH, μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας της δότριας ωαρίων (Ptak και συν. 2003, Baldassarre και συν. 2004, Baldassarre και Karatzas 2004). Στην ηλικία των 3 και 4 μηνών παρατηρήθηκε ότι η ανταπόκριση των ωοθηκών των αμνάδων στην ορμονική αγωγή είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Όμως η ανταπόκριση των ωοθηκών αμνάδων αυτών των ηλικιών μπορεί να βελτιωθεί αν έχει διενεργηθεί αναρρόφηση ωοθυλακίων στα ίδια ζώα και σε νεαρότερη ηλικία. Το πιο

ενδιαφέρον εύρημα είναι η βελτίωση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και της απόδοσης σε ωάρια όταν η αγωγή με FSH προσαρμόζεται στο βάρος των αμνάδων. Παρόλο που η μεγαλύτερη δόση FSH δε βελτιώνει την ικανότητα *in vitro* ανάπτυξης των συλλεχθέντων ωαρίων, εκτιμάται ότι μπορεί να υπάρξει αύξηση της τελικής απόδοσης σε βλαστοκύστες, εξαιτίας της συλλογής μεγαλύτερου αριθμού ωαρίων.

Η χορήγηση προγεσταγόνων σε αμνάδες με τη μορφή σπόγγων ή εμφυτευμάτων, πριν από την ορμονική διέγερση των ωοθηκών με γοναδοτροπίνες, αποτελεί κοινή πρακτική (Earl και συν. 1995, O'Brien και συν. 1996, Armstrong και συν. 1997, Ledda και συν. 1999b, Kelly και συν. 2005). Σε προκαταρκτικό πειραματισμό διαπιστώθηκε ότι η εισαγωγή ενδοκολπικών σπόγγων (μέγεθος: 1 cm διάμετρος και 3 cm μήκος) σε αμνάδες ηλικίας 2 μηνών προκάλεσε οξεία αιμορραγική αιδοιοκολπίτιδα στο 30% των ζώων σε διάστημα 24 ωρών. Για λόγους ευζωίας και με σκοπό τη διαφύλαξη της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, η αγωγή με σπόγγους αντικαταστάθηκε από χορήγηση προγεστερόνης ενδομυϊκά.

Τα αποτελέσματα του 1^{ου} πειράματος δείχνουν ότι σε αμνάδες Καραγκούνικης φυλής η ανάπτυξη των ωοθυλακίων σε διάφορες ηλικίες ακολουθεί το πρότυπο ανάπτυξης άλλων φυλών (Kennedy και συν. 1974, Tassell και συν. 1978). Ο αριθμός των μεγάλων ωοθυλακίων, παρότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά, αυξανόταν σταδιακά από τον 1^ο στο 2^ο μήνα και ακολούθως μειωνόταν κατά τον 6^ο μήνα της ηλικίας των αμνάδων.

Στο 3^ο πείραμα οι παρατηρήσεις σε ό,τι αφορά στον πληθυσμό των ωοθυλακίων των αμνάδων ήταν ανάλογες με εκείνες του 1^{ου} πειράματος. Συγκεκριμένα, μετά την εφαρμογή της αγωγής διέγερσης των ωοθηκών ο μεγαλύτερος πληθυσμός ωοθυλακίων εντοπίστηκε στις αμνάδες ηλικίας 2 μηνών (ομάδα ΕΣ1). Ακολούθησε σταδιακή μείωση του πληθυσμού των ωοθυλακίων στις αμνάδες 3 μηνών (ομάδα ΜΣ2), που κορυφώθηκε κατά τον 4^ο μήνα (ομάδα ΜΣ3), ενώ καταγράφηκε μικρή αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων στις αμνάδες ηλικίας 5 μηνών (ομάδα ΜΣ4). Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε έρευνα που έγινε σε αμνάδες που δεν είχαν υποβληθεί σε ορμονική αγωγή, ο πληθυσμός των ωοθυλακίων μειώθηκε από τη 16 στη 18 εβδομάδα της ηλικίας των ζώων (Bartlewski και συν. 2002). Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ερίφια (Baldassarre και συν. 2004, Baldassarre και Karatzas 2004) βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένης ηλικίας και της ευαισθησίας των ωοθηκών στις εξωγενείς γοναδοτροπίνες. Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί σε μελέτες που έγιναν σε αμνάδες, άνηβες μοσχίδες (Sonjaya και Driancourt, 1987, Revel και συν., 1995, Armstrong και συν., 1997, Meikle και συν.,

1998, Taneja και συν., 2000), προβατίνες (Driancourt, 1987, Lopez Sebastian και συν., 1999, Cognié, 1999, Gonzalez-Bulnes. και συν., 2000, 2002a,b, 2003) και αίγες (Gonzalez-Bulnes και συν., 2004) ότι ο αριθμός και η διάμετρος των ωοθυλακίων κατά την έναρξη της χορήγησης των γοναδοτροπινών καθορίζει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων μετά το πέρας της αγωγής. Συνεπώς, είναι πιθανόν οι δύο διαπιστώσεις που προαναφέρθηκαν να ισχύουν είτε από μόνες τους είτε σε συνδυασμό.

Στην ομάδα ΕΣ (αμνάδες που υποβλήθηκαν σε OPU τετράκις χρησιμοποιώντας σταθερή δόση FSH) παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του συνολικού αριθμού και του αριθμού των μεγάλων ωοθυλακίων από την πρώτη στις επόμενες OPU. Η διακύμανση της ανταπόκρισης των ωοθηκών αμνάδων στην ορμονική αγωγή διέγερσης έχει αποδοθεί στην ηλικία, στο άτομο και στην ορμονική αγωγή (Ptak και συν. 1999, 2003). Στις αμνάδες της ομάδας ΕΣ της ίδιας ηλικίας διαπιστώθηκε ότι η ανταπόκριση των ωοθηκών εξαρτιόταν από το άτομο. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες που έγιναν σε αμνάδες (Ptak και συν. 2003) και άνηβες μοσχίδες (Taneja και συν. 2000). Στην έρευνα των Ptak και συν. (2003) βρέθηκε ότι τη φτωχότερη αντίδραση στις επανειλημμένες ορμονικές αγωγές παρουσίασαν οι αμνάδες ηλικίας 3 μηνών. Σε αντίθεση, στην παρούσα έρευνα οι αμνάδες αυτής της ηλικίας παρουσίασαν καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων μετά την ορμονική αγωγή, τόσο στην ομάδα ΕΣ όσο και στην ΕΔ. Η ασυμφωνία μεταξύ των δύο ερευνών μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές φυλές που μελετήθηκαν. Ενδιαφέρον, όμως, είναι το γεγονός ότι και στις δύο μελέτες τη φτωχότερη αντίδραση των ωοθηκών μετά από επανειλημμένες ορμονικές αγωγές και αναρροφήσεις ωοθυλακίων παρουσίασαν οι αμνάδες κατά την 3^η OPU. Από την παρατήρηση αυτή φαίνεται ότι, εκτός από την επίδραση της ηλικίας και της φυλής, οι προηγούμενες δύο αναρροφήσεις ωοθυλακίων προκάλεσαν μείωση του αριθμού των διαθέσιμων ωοθυλακίων και επακολούθως των ωαρίων που συλλέχθηκαν κατά την 3^η και την 4^η OPU. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν από πρόσφατη έρευνα που έγινε σε προβατίνες (Morton και συν. 2005b). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η χορήγηση ετερόλογης FSH ή PMSG σε αίγες ή προβατίνες, αντίστοιχα (Remy και συν. 1991, Bodin και συν. 1997) προκαλεί παραγωγή αντισωμάτων κατά των παραπάνω ορμονών, γεγονός που μειώνει την ανταπόκριση των ωοθηκών σε αυτές. Αυτό δεν μπορεί να συμβαίνει στην παρούσα έρευνα, αφενός γιατί η FSH που χρησιμοποιήθηκε ήταν πρόβειας προέλευσης (ομόλογη) και αφετέρου γιατί η ανταπόκριση των ωοθηκών στη χορήγηση μεγαλύτερης δόσης FSH (ομάδα ΕΔ) βελτιωνόταν.

Στις αμνάδες δεν έχει πλήρως διερευνηθεί η επίδραση της ορμονικής αγωγής στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων τους. Η φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων

αμνάδων δεν ακολουθεί το κυματοειδές πρότυπο, όπως συμβαίνει στις μοσχίδες και στις προβατίνες, αλλά κυρίως επηρεάζεται από την εποχή της γέννησης, την ηλικία και τη φυλή (Bartlewski και συν. 2006). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η ανταπόκριση των ωοθηκών των αμνάδων εξαρτάται κυρίως από την κατάσταση των ωοθυλακίων πριν από την ορμονική αγωγή, που συνδέεται με την ηλικία του ζώου. Η παραπάνω άποψη ενισχύεται και από ότι περισσότερα ωοθυλάκια αναπτύχθηκαν στις αμνάδες της ομάδας ΕΣ1 (2 μηνών) σε σχέση με της ΜΣ3 (4 μηνών), οι οποίες υποβλήθηκαν μόνο μία φορά σε ορμονική αγωγή και αναρρόφηση ωοθυλακίων. Εξάλλου, οι Sonjaya και Driancourt (1987) μελετώντας την ανταπόκριση αμνάδων φυλής Romanov και Ile-de-France στη χορήγηση PMSG και hCG διαπίστωσαν ότι τα ωοθυλάκια που ήταν ευαίσθητα στις γοναδοτροπίνες είχαν διάμετρο 1,8 mm ενώ εκείνα που είχαν διάμετρο 0,9 mm δεν ήταν ευαίσθητα σε αυτές. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαίωσαν εκείνα προηγούμενης έρευνας στην οποία βρέθηκε ότι τα ωοθυλάκια που ανταποκρίνονται στη χορήγηση PMSG έχουν διάμετρο >1 mm (Driancourt 1987).

Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων ήταν καλή σε όλες τις συνεδρίες της ομάδας ΕΔ, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη χορήγηση μεγαλύτερης δόσης FSH. Σε προηγούμενες έρευνες έχει υποστηριχθεί ότι τα άνηθα ζώα χρειάζονται μικρότερη δόση γοναδοτροπινών σε σχέση με τα ενήλικα (Armstrong και συν. 1997) με αποτέλεσμα να χορηγείται συνήθως η ίδια δόση ανεξαρτήτως του βάρους τους. Στις αμνάδες της ομάδας ΕΔ η ανάπτυξη των ωοθυλακίων σε κάποιες ηλικίες φάνηκε ότι ήταν εξαρτημένη από τη δόση της χορηγούμενης FSH και όχι από την ηλικία. Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι διαπιστώθηκε μεγαλύτερος πληθυσμός ωοθυλακίων στον 5^ο μήνα και μεγαλύτερος αριθμός μεγάλων ωοθυλακίων στον 3^ο και στον 5^ο μήνα σε σχέση με τις αντίστοιχες συνεδρίες της ομάδας ΕΣ (επανειλημμένες αναρροφήσεις - σταθερή δόση FSH). Εξάλλου, αν παραλειφθούν τα αποτελέσματα της πρώτης OPU, όπου τα ζώα και των δύο ομάδων (ΕΣ και ΕΔ) έλαβαν την ίδια δόση FSH, το άθροισμα των ωαρίων που συλλέχθηκαν από τις επόμενες τρεις OPU (όπου στις αμνάδες της ΕΔ η δόση προσαρμόστηκε στο σωματικό βάρος τους) ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα ΕΔ σε σχέση με την ΕΣ.

Έχει υποστηριχθεί ότι η ικανότητα παραγωγής εμβρύων από ωάρια αμνάδων (Morton και συν. 2005a), μοσχίδων (Presicce και συν. 1997) και εριφίων (Baldassarre και συν. 2004, Baldassarre και Karatzas 2004) αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας. Ωστόσο, οι O'Brien και συν. (1997a) διαπίστωσαν ότι παρόλο που τα ωάρια που συλλέχθηκαν μετά από ορμονική αγωγή από αμνάδες ηλικίας 3 έως 6 εβδομάδων παρουσίασαν την ίδια ικανότητα *in vitro* ωρίμανσης με εκείνα που είχαν συλλεχθεί από

αμνάδες ηλικίας 16 έως 24 εβδομάδων χωρίς να έχει προηγηθεί ορμονική αγωγή, το ποσοστό παραγωγής βλαστοκύστεων ήταν μεγαλύτερο στα ωάρια που προέρχονταν από τις νεαρότερες αμνάδες. Σε αντίθεση, οι Earl και συν. (1995) παρατήρησαν ότι η ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων που συλλέχθηκαν από αμνάδες ηλικίας 8 έως 9 εβδομάδων που είχαν υποβληθεί σε ορμονική αγωγή δε διέφερε από εκείνη των ωαρίων που συλλέχθηκαν από αμνάδες ηλικίας 4 μηνών, οι οποίες δεν είχαν υποβληθεί σε ορμονική αγωγή. Στην παρούσα έρευνα, το ποσοστό των ώριμων ωαρίων δε διέφερε μεταξύ των αμνάδων-δοτριών ωαρίων ηλικίας 2 και 5 μηνών (ομάδα ΕΣ1 και ΜΣ4, αντίστοιχα), αλλά κανένα από τα ωάρια που συλλέχθηκαν από αμνάδες ηλικίας 3 και 4 μηνών (ομάδα ΜΣ2 και ΜΣ3, αντίστοιχα) δεν ωρίμασε *in vitro*.

Εκτός από την πιθανή ύπαρξη διαφορών μεταξύ των φυλών τόσο στην ανταπόκριση στην ορμονική αγωγή όσο και στο χρόνο ανάπτυξης των ωοθυλακίων, η παραπάνω διαφορά μπορεί, επίσης, να αποδοθεί στην κατάσταση 'υγείας' (health status) των ωοθυλακίων που αναρροφήθηκαν. Είναι γνωστό ότι τα μεγάλα ωοθυλάκια περιέχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό ωάρια ικανά να αναπτύσσονται *in vitro* σε αντίθεση με τα μικρά ωοθυλάκια (Cognié και συν. 1998, Ledda και συν. 1999a). Επίσης, η ατρησία των ωοθυλακίων επηρεάζει αρνητικά σε μεγαλύτερο βαθμό την ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων που περιέχονται στα μικρά από ότι στα μεγάλα ωοθυλάκια (Mermillod και συν. 1999). Όμως, από τη στιγμή που ένα ωάριο αποκτήσει την ικανότητα ανάπτυξής του επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από την κατάσταση 'υγείας' του ωοθυλακίου στο οποίο περιέχεται. Επομένως, η αποτυχία *in vitro* ωρίμανσης των ωαρίων στις ομάδες ΜΣ2 και ΜΣ3 μπορεί να υποδηλώνει ότι τα ωοθυλάκια που αναρροφήθηκαν ήταν στην πλειονότητά τους ατρητικά. Στην πραγματικότητα, σε αμνάδες παρατηρούνται πρώιμα στάδια ατρησίας ωοθυλακίων από την ηλικία των 4 εβδομάδων, ενώ όλα τα ωοθυλάκια διαμέτρου ≥ 1 mm παρουσιάζουν κάποια στοιχεία ατρησίας (Kennedy και συν. 1974, Tassell και συν. 1978, Sonjaya και Driancourt 1987). Εντούτοις, η ατρησία σε πρώιμα στάδια μπορεί να προληφθεί μετά από χορήγηση γοναδοτροπινών. Οι γοναδοτροπίνες αυξάνουν το μέγεθος ή τον αριθμό των ωοθυλακίων είτε προλαμβάνοντας την ατρησία και επιτρέποντας την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, είτε προάγοντας την ανάπτυξή τους όπως έχει αποδειχθεί σε αμνάδες (Worthington και Kennedy 1979, Tassell και Kennedy 1980), μοσχίδες (Monniaux και συν. 1984) και ποντίκια (Peters και συν. 1975). Γι' αυτό το λόγο η εξήγηση του μεγαλύτερου ποσοστού ώριμων ωαρίων στις ομάδες ΕΣ2 (3 μηνών) και ΕΣ3 (4 μηνών) σε σχέση με τις ΜΣ2 (3 μηνών) και ΜΣ3 (4 μηνών), αντίστοιχα, θα πρέπει να αναζητηθεί στην κατάσταση 'υγείας' των ωοθυλακίων, διότι πιθανότατα οι

προηγούμενες αναρροφήσεις ωοθυλακίων στις αμνάδες της ομάδας ΕΣ προκάλεσαν μείωση στον αριθμό των ατρητικών ωοθυλακίων τους.

Σύμφωνα με τους Morton και συν. (2005a) δεν μπορεί να διαχωριστεί η επίδραση της ηλικίας και της ορμονικής αγωγής στην ικανότητα *in vitro* ανάπτυξης των συλλεχθέντων ωαρίων. Στην παρούσα έρευνα χορηγώντας μεγαλύτερη δόση FSH επιτεύχθηκε καλύτερη ανάπτυξη ωοθυλακίων σε αμνάδες ηλικίας 3 και 5 μηνών και συλλέχθηκαν περισσότερα ωάρια από αμνάδες ηλικίας 4 και 5 μηνών σε σχέση με τις αμνάδες της ίδιας ηλικίας στις οποίες χορηγήθηκε σταθερή δόση FSH. Η ικανότητα ωρίμανσης των συλλεχθέντων ωαρίων μεταξύ των ομάδων ΕΣ και ΕΔ σε ηλικία 2, 4 και 5 μηνών δε διέφερε. Παραδόξως όμως, περισσότερα ώριμα ωάρια προήλθαν από την ομάδα ΕΣ2 σε σχέση με την ΕΔ2 (ηλικία 3 μηνών), υποδηλώνοντας - σε πρώτη ανάγνωση - αντίστροφη επίδραση της δόσης της FSH στην ποιότητα των ωαρίων. Το τελευταίο εύρημα, μολονότι είναι στατιστικώς ορθό, είναι πιθανότατα από βιολογικής άποψης παραπλανητικό και θα πρέπει να συνδυαστεί με το μικρότερο ποσοστό συλλογής ωαρίων στην ομάδα ΕΔ2 σε σχέση με την ΕΣ2. Παρότι περισσότερα μεγάλα ωοθυλάκια αναπτύχθηκαν στην ομάδα ΕΔ2, έχει βρεθεί ότι τα μεγάλα ωοθυλάκια έχουν αρκετά πυκνό περιεχόμενο καθιστώντας δυσκολότερη την αναρρόφησή του (Baldassarre και συν. 1994). Επίσης η τεχνητή ρήξη και η σύμπτωση των τοιχωμάτων των μεγάλων ωοθυλακίων μπορεί να παγιδεύσει το περιεχόμενο ωάριο (Presicce και συν. 2002). Επιπρόσθετα, λόγω της αυξημένης αγγείωσης του τοιχώματός των μεγάλων ωοθυλακίων, συχνά κατά την αναρρόφησή τους το ωοθυλακικό υγρό που συλλέγεται αναμιγνύεται με αίμα, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανεύρεση των ωαρίων. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η χορήγηση μεγαλύτερης δόσης FSH δε βελτιώνει την ικανότητα ωρίμανσης των ωαρίων που συλλέγονται από αμνάδες επιβεβαιώνοντας προηγούμενη έρευνα που έγινε σε μοσχίδες (Revel και συν. 1995). Οι Revel και συν. (1995) βρήκαν ότι η ορμονική αγωγή αυξάνει τον αριθμό των ωαρίων που συλλέγονται, δίχως όμως να επηρεάζει την ικανότητα *in vitro* ανάπτυξης αυτών. Ομοίως, η ικανότητα ανάπτυξης των ωαρίων που συλλέγονται μετά από ή δίχως ορμονική διέγερση των ωοθηκών δε διαφέρει σε αμνάδες (O' Brien και συν. 1997b, Ledda και συν. 1999b), προβατίνες (Galli και Moor 1991, Morton και συν. 2005b) και άνηβες ή ενήλικες αίγες (Mogas και συν. 1997), ενώ κατ' άλλους η ορμονική διέγερση των ωοθηκών έχει βλαπτικές συνέπειες στην ποιότητα των ωαρίων (Moor και συν. 1985, Foote και Ellington 1988).

Η ικανότητα ωρίμανσης των ωαρίων που συλλέχθηκαν από πτωματικές ωοθήκες αμνάδων ηλικίας 2-3 μηνών (2^ο πείραμα) δε διέφερε από την αντίστοιχη των ωαρίων

που συλλέχθηκαν *in vivo* στην ίδια ηλικία (ομάδες ΕΣ1, ΜΣ2, ΕΔ1, 3^ο- 4^ο πείραμα). Επίσης, παρότι χρησιμοποιήθηκε βελόνα μικρού μήκους κατά την αναρρόφηση των ωοθυλακίων των πτωματικών ωοθηκών η ποιότητα των ωαρίων που συλλέχθηκαν δε διέφερε από την ποιότητα εκείνων που συλλέχθηκαν *in vivo* χρησιμοποιώντας βελόνα μεγαλύτερου μήκους. Το παραπάνω εύρημα έρχεται σε αντίθεση με αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας όπου υποστηρίχθηκε ότι το μήκος της βελόνας αναρρόφησης επιδρά αρνητικά στην ποιότητα των ωαρίων που συλλέγονται (Rodríguez και συν. 2006). Στην παρούσα έρευνα η μόνη διαφορά που παρουσιάστηκε μεταξύ των αποτελεσμάτων της *in vitro* και της *in vivo* ΟΡΥ ήταν το μεγαλύτερο ποσοστό συλλογής ωαρίων από τις πτωματικές ωοθήκες (81,3%) σε σχέση με το ποσοστό συλλογής μετά από λαπαροσκοπική αναρρόφηση ωοθυλακίων (43,3%). Αν και το ίδιο υψηλό ποσοστό συλλογής καταγράφηκε και στην ομάδα ΕΣ2 (88,7%), η μεγάλη αυτή διαφορά αποδίδεται στον πιο εύκολο χειρισμό των πτωματικών ωοθηκών και στην απουσία αίματος στο ωοθυλακικό υγρό που αναρροφάται, καθιστώντας ευκολότερη την ανεύρεση των ωαρίων.

Στην παρούσα έρευνα το ποσοστό των ωαρίων που τελικά ωρίμασαν *in vitro* ήταν γενικά χαμηλό, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη διάρκεια της ωρίμανσης. Από ορισμένους ερευνητές έχει αναφερθεί ότι μετά από 26 ώρες *in vitro* ωρίμανσης περισσότερα ωάρια αμνάδων φτάνουν στο στάδιο της Μετάφασης ΙΙ σε σχέση με εκείνα που ωριμάζουν για 24 ώρες (Kochhar και συν. 2002), ενώ αντιθέτως από άλλους δεν εντοπίστηκε κάποια διαφορά (O'Brien και συν. 1996, Ledda και συν. 1997). Επίσης, για την εκτίμηση του αποτελέσματος της *in vitro* ωρίμανσης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η επίδραση των συνθηκών και της σύνθεσης των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται (Mogas και συν. 1997). Άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ικανότητα ωρίμανσης είναι η ποιότητα των ωαρίων που συλλέγονται, η οποία σχετίζεται με την προέλευση τους (από μεγάλα ή μικρά, υγιή ή ατρητικά ωοθυλάκια) (Rubianes και συν. 1997, Cognié και συν. 1998, 1999, Ledda και συν. 1999a, Mermillod και συν. 1999, Gonzalez-Bulnes και συν. 2002b, Lonergan και συν. 2003, Rodríguez και συν. 2006). Επιπλέον, η ποιότητα των ωαρίων που αναρροφούνται σχετίζεται, εκτός από τον εκτελούντα την αναρρόφηση, με την εφαρμοζόμενη υποπίεση αναρρόφησης, με τη διάμετρο του σωληναρίου που ενώνει τη βελόνα με την αντλία αναρρόφησης και με το μήκος της βελόνας αναρρόφησης (Alberio και συν. 2002, Rodríguez και συν. 2006). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι υπήρχε διαφορά στην ποιότητα των ωαρίων που συλλέχθηκαν μόνο μεταξύ των ομάδων ΕΣ1 και ΕΣ2 όπως και μεταξύ των ΕΣ4 και ΜΣ4, δίχως όμως να επηρεάζεται η ικανότητα ωρίμανσης αυτών. Αναμφίβολα

η μεταφορά των ωαρίων που αναρροφούνται υπό πίεση διαμέσου του σωληναρίου αναρρόφησης προκαλεί απογύμνωση των ωαρίων από τα κοκκώδη κύτταρά τους (Baldassarre και συν. 1994, Shirazi και συν. 2005). Η διατήρηση του συμπλέγματος ωαρίου - ωοφόρου δίσκου είναι ιδιαίτερα σημαντική επειδή ο βαθμός επένδυσης με κοκκώδη κύτταρα επηρεάζει θετικά την ικανότητα των ωαρίων να παράγουν έμβρυα *in vitro* (Lonergan και συν. 1992). Όμως, παρά την μηχανική απογύμνωση των ωαρίων το κυτταρόπλασμά τους παρέμεινε αμετάβλητο αφού δεν παρατηρήθηκαν στοιχεία εκφύλισης ή σκοτεινών περιοχών.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών καταδεικνύουν ότι (1) η προσαρμογή της δόσης της χορηγούμενης FSH στο σωματικό βάρος των αμνάδων οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των ωαρίων που μπορούν να συλλεχθούν, τα οποία είναι κατάλληλα για *in vitro* γονιμοποίηση και (2) η χαμηλή ανταπόκριση των ωοθηκών στην ορμονική αγωγή όπως και η μειωμένη ικανότητα ωρίμανσης των ωαρίων που συλλέγονται από αμνάδες συγκεκριμένων ηλικιών μπορεί να βελτιωθεί αν έχει διενεργηθεί αναρρόφηση των ωοθυλακίων ένα μήνα νωρίτερα.

2.8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αμοιρίδης ΓΣ, Kuehholzer B, Besenfelder U, Λυμπερόπουλος Α, Βαϊνάς Ε, 1998: Λαπαροσκοπική συλλογή και μεταφορά εμβρύων προβάτων της φυλής Χίου. ΔΕΚΕ 50 244-249.

Βαϊνάς Ε, Βαφειάδης Δ, Μπόσκος Κ, Τσακάλωφ Π, 1994: *In vitro* ωρίμανση και γονιμοποίηση ωαρίων αγελάδας και καλλιέργεια του ζυγωτού. ΔΕΚΕ 45 31-36.

Alberio R, Olivera J, Roche A, Alabart J, Folch J, 2002: Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. Small Rumin Res 46 81-87.

Anel L, Sevillano C, Alvarez M, Alegre B, Anel E, Dominguez JC, Carbajo MT, De La Fuente J, 1997: Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. Theriogenology 47 152.

Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens G, Seamark RF, 1992: Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. Theriogenology 38 667-678.

Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D, Seamark RF, 1994: Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. Theriogenology 42 1227-1236.

Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR, 1997: Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and

prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9 333-339.

Baldassarre H, de Matos DG, Furnus CC, Castro TE, Cabrere Fischer EI, 1994: Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim Reprod Sci* 35 145-150.

Baldassarre H, Furnus CC, de Matos DG, Pessi H, 1996: In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 45 707-717.

Baldassarre H, Karatzas CN, 2004: Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 82-83 255-266.

Baldassarre H, Wang B, Pierson J, Neveu N, Sneek L, Lapointe J, Cote F, Kafidi N, Keefer CL, Lazaris A, Karatzas CN, 2004: Prepubertal propagation of transgenic cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production. *Cloning Stem Cells* 6 25-9.

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC, 2002: Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. *Small Rumin Res* 43 37-44.

Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC, 2006: Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs. *Small Rumin Res* 63 189-198.

Bartlewski PM, Vanderpol J, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC, 2000: Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim Reprod Sci* 58 273-291.

Bodin L, Drion PV, Remy B, Brice G, Cognie Y, Beckers JF, 1997: Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reprod Nutr Dev* 37 651-660.

Brown BW, Radziewicz T, 1998: Production of sheep embryos *in vitro* and development of progeny following single and twin embryo transfers. *Theriogenology* 49 1525-1536.

Chian RC, Niwa K, Nakahara H, 1992: Effect of sperm penetration *in vitro* on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 96 73-78.

Cognié Y, 1999: State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51 105-116.

Cognié Y, Benoit F, Poulin N, Khatir H, Driancourt MA, 1998: Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *J Reprod Fertil* 112 379-386.

de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TA, 1989: Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24 197-204.

- Dominko T, First NL, 1997: Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 47 456-467.
- Driancourt MA, 1987: Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J Reprod Fertil* 80 207-212.
- Earl CR, Irvine BJ, Kelly JM, Rowe JP, Armstrong DT, 1995: Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and *in vitro* embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology* 43 203.
- Evans ACO, 2003: Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Dom Anim* 38 240-246.
- Evans AC, Adams GP, Rawlings NC, 1994: Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil* 102 463-70.
- Foote RE, Ellington JE, 1988: Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology* 29 111-123.
- Galli C, Moor RM, 1991: Gonadotrophin requirements for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology* 35 1083-1093.
- Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC, 1995: Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43 689-703.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Carrizosa JA, Urrutia B, Souza CJ, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A, McNeilly AS, 2004: Plasma inhibin A determination at start superovulatory FSH treatments is predictive for embryo outcome in goats. *Dom Anim Endocrinol* 26 259-266.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Castellanos V, Santiago-Moreno J, Ariznavarreta C, Dominguez V, Lopez-Sebastian A, Tresguerres JA, Cocero MJ, 2003: Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod Nutr Dev* 43 17-28.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Souza CJH, Santiago-Moreno J, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ, Baird DT, 2002a: Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod Dom Anim* 37 357-361.
- Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A, 2000: Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54 1055-1064.
- Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Souza CJH, Groome NP, Garcia-Garcia RM, Lopez-Sebastian A, Baird DT, 2002b: Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of

ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology* 57 1263-1272.

Gradl E, 1988: *In vitro* Produktion von Rinderembryonen. Munchen, Diss Med Vet.

Irvine BJ, Armstrong DT, Earl C, McLean D, Seamark RF, 1993: Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39 237.

Izquierdo D, Villamediana P, López-Bejar M, Paramio MT, 2002: Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57 1431-1441.

Jorio A, Mariana JC, Lahlou-Kassi A, 1991: Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. *Anim Reprod Sci* 26 239-250.

Kelly JM, Kleemann DO, Walker SK, 2005: Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology* 63 1876-1890.

Kennedy JP, Worthington CA, Cole ER, 1974: The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J Reprod Fertil* 36 275-282.

Kinis A, Vergos V, Gallagher M, Gordon AC, 1989: Use of sodium citrate in the denudation of bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization. Proceedings of the Fifth International Conference of the European Embryo Transfer Association (Lyon) 162.

Kochhar HP, Wu B, Morris LH, Buckrell BC, Pollard JW, Basrur PK, King WA, 2002: Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod Dom Anim* 37 19-25.

Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H, Downey BR, 2003: Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60 879-889.

Land RB, 1970: Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross blackface and Welsh sheep. *J Reprod Fertil* 21 517-521.

Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S, 1997: Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J Reprod Fertil* 109 73-78.

Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S, 1999a: Follicular size affects the meiotic competence of *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev* 39 503-508.

Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S, 1999b: Production and lambing rate of blastocysts derived from

in vitro matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes. J Anim Sci 77 2234-2239.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish LL, First NL, 1986: Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol Reprod 35 850-857.

Lonergan P, O'Kearney-Flynn M, Boland MP, 1999: Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. Theriogenology 51 1565-1576.

Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP, 2003: Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reprod Domest Anim 38 259-267.

Lonergan P, Sharif H, Monaghan P, Wahid H, Gallagher M, Gordon I, 1992: Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture *in vitro*. Theriogenology 37 248.

Lopez Sebastian A, Gonzalez de Bulnes A, Santiago Moreno J, Gomez Brunet A, Townsend EC, Inskip EK, 1999: Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish merino ewes. Theriogenology 52 505-514.

Lutterbach A, Koll RA, Brem G, 1987: *In vitro* maturation of bovine oocytes in co-culture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development. Zuchthyg 22 145-150.

McKelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS, 1986: Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. Theriogenology 26 855-865.

Meikle A, Tasende C, Garofalo EG, Forsberg M, 1998: Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. Anim Reprod Sci 54 75-85.

Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y, 1999: Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. J Reprod Fertil Suppl 54 449-460.

Mogas T, Palomo MJ, Izquierdo MD, Paramio MT, 1997: Developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. Theriogenology 47 1189-1203.

Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR, 1984: Action of PMSG on follicular populations in the heifer. J Reprod Fertil 70 243-253.

Moor RM, Osborn JC, Crosby IM, 1985: Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. J Reprod Fertil 74 167-172.

Morton KM, Catt SL, Hollinshead FK, Maxwell WM, Evans G, 2004: Production of lambs after the transfer of fresh and cryopreserved *in vitro* produced embryos from prepubertal lamb oocytes and unsorted and sex-sorted frozen-thawed spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 39 454-461.

Morton KM, Catt SL, Maxwell WM, Evans G, 2005a: *In vitro* and *in vivo* developmental capabilities and kinetics of *in vitro* development of *in vitro* matured oocytes from adult, unstimulated and hormone-stimulated prepubertal ewes. *Theriogenology* 64 1320-1332.

Morton KM, de Graaf SP, Campbell A, Tomkins LM, Chis Maxwell WM, Evans G, 2005b: Repeat ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod Dom Anim* 40 422-428.

Noël B, Bister JL, Paquay R, 1993: Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J Reprod Fertil* 99 695-700.

O'Brien JK, Beck NF, Maxwell WM, Evans G, 1997a: Effect of hormone pre-treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of oocytes *in vitro* and *in vivo*. *Reprod Fertil Dev* 9 625-631.

O' Brien JK, Catt SL, Ireland A, Maxwell WMC, Evans G, 1997b: *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* 47 1433-1443.

O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G, 1996: Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev* 8 1029-1037.

Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M, 1975: Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil* 45 559-566.

Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X, 1997: Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* 56 386-392.

Presicce GA, Senatore EM, De Santis G, Stecco R, Terzano GM, Borghese A, De Mauro GJ, 2002: Hormonal stimulation and oocyte maturational competence in prepubertal Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 57 1877-1884.

Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P, 1999: Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod* 61 1568-1574.

Ptak G, Tischer M, Bernabo N, and Loi P, 2003: Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biol Reprod* 69, 278-285.

- Rawlings NC, Evans ACO., Honaramooz A, Bartlewski PM, 2003: Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 78 259-270.
- Remy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumande J, Chupin D, Beckers JF, 1991: Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone? *Theriogenology* 36 389-399.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y, 1995: Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilize oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil* 103 115-120.
- Rodríguez C, Anel L, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Chamorro CA, de Paz P, 2006: Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reprod Dom Anim* 41 106-113.
- Rubianes E, Ungerfeld R, Viiholes C, Rivero A, Adams GP, 1997: Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47 1479-1488.
- Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM, 2005: A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for *in vitro* maturation. *Small Rumin Res* 58 283-286.
- Sonjaya H, Driancourt MA, 1987: Ovarian follicles during infancy in Romanov and Ile-de-France ewe lambs. *J Reprod Fertil* 81 241-248.
- Sonjaya H, Driancourt MA, 1989: Ovarian morphology and function in 12-week-old lambs from breeds with different ovulation rates as adults. *Reprod Fertil Dev* 1 265-272.
- Stangl M, Kühholzer B, Besenfelder U, Brem G, 1999: Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* 52 709-716.
- Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X, 2000: Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 62 206-213.
- Tassell R, Chamley WA, Kennedy JP, 1978: Gonadotrophin levels and ovarian development in the neonatal ewe lamb. *Aust J Biol Sci* 31 267-273.
- Tassell R, Kennedy J P, 1980: Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb--fine structure and histochemistry. *Aust J Biol Sci* 33 675-687.
- Tassell RJ, Kennedy JP, Bindon BM, Piper LR, 1983: Ovarian follicles of new-born Merino lambs from genetic lines which differ in fecundity. *Aust J Biol Sci* 36 351-355.

Tervit HR, 1996: Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Sci* 42 227-238.

Trounson AO, Chamley WA, Kennedy JP, Tassell R, 1974: Primordial follicle numbers in ovaries and levels of LH and FSH in pituitaries and plasma of lambs selected for and against multiple births. *Aust J Biol Sci* 27 293-299.

van den Hurk R, Zhao J, 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63 1717-1751.

Vergos E, 1990: In vitro fertilization and embryo culture in cattle. Phd Thesis, National University of Ireland, Dublin.

Worthington CA, Kennedy JP, 1979: Ovarian response to exogenous hormones in six-week-old lambs. *Aust J Biol Sci* 32 91-95.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

Η ορμονική διέγερση των ωοθηκών και η αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε αμνάδες Καραγκούνικης φυλής δεν επηρεάζει τη σωματική ανάπτυξη, την ενήβωση και την αναπαραγωγική ικανότητά τους

Τμήμα του πειραματισμού αυτού έχει δημοσιευθεί στο περιοδικό
Theriogenology.

*Oocyte pick – up in juvenile lambs affects neither onset of puberty
nor their future fertility.*

Valasi I, Menegatos I, Papanikolaou Th, Goulas P and Amiridis GS

3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα έρευνα σχεδιάστηκε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης μίας ή επανειλημμένων αναρροφήσεων των ωοθυλακίων αμνάδων που γεννιούνται το χειμώνα ή το φθινόπωρο στη σωματική ανάπτυξη, στην ενήβωση και στη γονιμότητά τους. Εξήντα αμνάδες Καραγκούνικης φυλής που γεννήθηκαν το χειμώνα χωρίστηκαν σε 5 ομάδες (X1, X2, X3, X4 & X5, η κάθε μία $n=12$) και 10 αμνάδες που γεννήθηκαν το φθινόπωρο χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Φ1 & Φ2, η κάθε μία $n=5$). Οι ομάδες X1 και Φ1 αποτελούσαν τους μάρτυρες. Αναρρόφηση των ωοθυλακίων (OPU) έγινε λαπαροσκοπικά μία φορά στην ηλικία των 3, 4 και 5 μηνών στις ομάδες X3, X4 και X5, αντίστοιχα. Μεταξύ του 2^{ου} και 5^{ου} μήνα της ζωής τους οι αμνάδες των ομάδων X2 και Φ2 υποβλήθηκαν σε αναρρόφηση των ωοθυλακίων τους 4 φορές (μία φορά ανά μήνα). Πριν την κάθε OPU εφαρμόζοταν ορμονική αγωγή που περιελάμβανε χορήγηση προγεστερόνης και FSH (έξι ισόποσες δόσεις). Όλες οι αμνάδες ζυγίζονταν στη γέννηση, στον απογαλακτισμό, στο 2^ο μήνα και στη συνέχεια κάθε μήνα μέχρι τον 8^ο ή το 12^ο μήνα της ζωής τους για τις αμνάδες που γεννήθηκαν το χειμώνα ή το φθινόπωρο, αντίστοιχα. Ακτινογραφήματα του δεξιού αντιβραχίου λήφθηκαν από τις αμνάδες των ομάδων X1, X2 και X5 στον 4^ο, 6^ο και 8^ο μήνα, ενώ από τις αμνάδες των ομάδων Φ1 και Φ2 λήφθηκαν 9 ακτινογραφήματα από τον 5^ο έως και το 18^ο μήνα της ζωής τους. Ο προσδιορισμός του χρόνου ενήβωσης έγινε μετά από μέτρηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης σε δείγματα αίματος που λαμβάνονταν αρχικά κάθε εβδομάδα μέχρι τον 7^ο μήνα και στη συνέχεια δύο φορές την εβδομάδα μέχρι το 10^ο ή το 13^ο μήνα της ηλικίας τους για τις ομάδες X1, X3, X4 και X5 ή X2, Φ1 και Φ2, αντίστοιχα. Από τον 7^ο μήνα της ηλικίας τα ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα συγχρωτίζονταν για διάστημα τριών μηνών με κριούς, με σκοπό την ανίχνευση των οίστρων και τη φυσική οχεία. Η διάγνωση της εγκυμοσύνης διενεργήθηκε με υπερηχογράφημα 55 ημέρες μετά την απομάκρυνση των κριών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αμνάδες της ομάδας X1 ήταν βαρύτερες σε σχέση με εκείνες τις ομάδες X2 ($p<0,05$) στην ηλικία των 4 και 5 μηνών αλλά αυτή η διαφορά εξομαλυνόταν με την πρόοδο της ηλικίας. Το μήκος της κερκίδας ήταν μεγαλύτερο σ' όλες τις περιπτώσεις στην ομάδα X1 σε σχέση με την X2 ($p<0,05$), αλλά δε διέφερε μεταξύ των ομάδων Φ1 και Φ2. Η σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών δεν είχε ολοκληρωθεί σε ηλικία 18 μηνών με εξαίρεση δύο αμνάδες που παρουσίασαν σχεδόν πλήρως κλειστές επιφυσιακές γραμμές. Ο χρόνος ενήβωσης δε διέφερε μεταξύ των ομάδων των αμνάδων που γεννήθηκαν το χειμώνα και κυμάνθηκε μεταξύ των 224 και 270 ημερών της ζωής τους, όπως και μεταξύ αυτών που γεννήθηκαν

το φθινόπωρο και κυμάνθηκε μεταξύ των 340 και 381 ημερών. Όλες οι αμνάδες που γεννήθηκαν το φθινόπωρο και 15 (32%) από εκείνες που γεννήθηκαν το χειμώνα εμφάνισαν κατά την ενήβωση φυσιολογικής διάρκειας ωχρινική φάση με συγκέντρωση προγεστερόνης >1 ng/ml. Σε 32 (68%) αμνάδες η πρώτη φυσιολογικής διάρκειας ωχρινική φάση ακολούθησε μία ή δύο περιορισμένης διάρκειας ωχρινικές φάσεις. Κατά τη διάρκεια της πρώτης αναπαραγωγικής περιόδου 41 (87%) αμνάδες γονιμοποιήθηκαν και γέννησαν υγιή αρνιά, σε ποσοστό που δε διέφερε μεταξύ των ομάδων ($p=0,555$). Κατά τη διάρκεια της 2^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου όλες οι αμνάδες που είχαν γεννηθεί το χειμώνα γονιμοποιήθηκαν με φυσική οχεία και γέννησαν φυσιολογικά. Συμπερασματικά, η OPU σε αμνάδες Καραγκούνικης φυλής ανεξαρτήτως ηλικίας δεν επηρεάζει τη σωματική ανάπτυξη, το χρόνο ενήβωσης και την αναπαραγωγική ικανότητά τους ακόμη και στην περίπτωση που η αγωγή διενεργείται κατ' επανάληψη.

3.2 ABSTRACT

A study was designed to evaluate whether the growth rate, the time of onset of puberty and fertility of young winter- or autumn- born lambs would be affected by oocyte pick-up conducted in single or repeated sessions during the first months of lambs' live. Five groups of winter-born lambs (X1, X2, X3, X4 & X5 each $n=12$) and two groups of autumn-born lambs ($\Phi 1$ & $\Phi 2$ each $n=5$) from the Karagouniko breed were used. In group X1 and $\Phi 1$ no treatments were applied (control groups) while, laparoscopic follicular aspiration (OPU) was performed once early in the 3rd, 4th and 5th month of lambs age (groups X3, X4 and X5 respectively). From the 2nd to 5th month of their age, group X2 and $\Phi 2$ lambs were aspirated four times in monthly intervals. Progesterone priming and ovarian stimulation by serial FSH administrations proceeded each OPU session. All lambs were weighed at birth, weaning, at second month and monthly thereafter until the 8th or the 12th month of age for winter- or autumn-born lambs, respectively. Radiographs of the right antebrachium were taken in groups X1, X2 and X5 at 4th, 6th and 8th month of age. In $\Phi 1$ and $\Phi 2$ radiographs were taken 9 times from the 5th to the 18th month. To determine the onset of puberty blood progesterone concentration was assayed in samples collected initially every week and after the 7th month of age twice weekly until the 10th or the 13th month of age for groups X1, X3, X4 and X5 or X2, $\Phi 1$ and $\Phi 2$, respectively. From the 7th month a fertile ram was introduced in each group of winter-born lambs and estrous behavior / mating was daily monitored and recorded for three months. Pregnancy diagnosis was carried out by transabdominal

ultrasound scanning 55 days after rams' removal. At the fourth and fifth month of age group X2 lambs were lighter ($p<0.05$) than controls, but this difference was later equalized. Radial length in all cases was greater in group X1 than in X2 ($p<0.05$), but not in $\Phi 1$ compared with $\Phi 2$. Distal radial growth plate did not completely ossify until the 18th month of age apart from two lambs that had almost ossified growth plates. The time of onset of puberty did not differ between groups of winter-born or autumn-born lambs and ranged between 224 and 270 or 340 and 381 days, respectively. All the autumn-born and 15 (32%) winter-born animals entered puberty with a full length luteal phase having progesterone concentration greater than 1ng/ml, while others ($n=32$, 68%) exhibited one or two short luteal phases before luteal length restoration. During the first breeding season 41 (87%) animals were fertilized and maintained pregnancy to term, without noticeable differences between groups ($p=0.555$). During the second breeding season, all winter-born lambs were naturally served and lambled at the expected time.

It is concluded that OPU in young Karagouniko lambs, irrespectively of the season of birth, does not affect the growth, the time of onset of puberty, the endocrine profile of the lambs and it does not compromise their future fertility even if it is applied at four successive months.

3.3 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο υποστηρίχθηκε ότι ανεξαρτήτως ηλικίας οι αμνάδες καλές δότριες ωαρίων μπορούν να υποβάλλονται κατ' επανάληψη σε ορμονική διέγερση των ωοθηκών και αναρρόφηση των ωοθυλακίων τους. Στην περίπτωση της επανειλημμένης αναρρόφησης των ωοθυλακίων σε μικρά μεσοδιαστήματα, η τεχνική της λαπαροσκοπικής προσέγγισης της ωοθήκης φαίνεται ότι υπερτερεί της λαπαροτομής, διότι μειώνονται οι πιθανότητες δημιουργίας μετεγχειρητικών συμφύσεων (Armstrong και συν. 1997, Anel και συν. 1997, Alberio και συν. 2002). Ωστόσο, έχει αναφερθεί δημιουργία συμφύσεων στο 35% των προβατίνων που υποβάλλονται σε επανειλημμένη αναρρόφηση μέσα σε διάστημα 10 εβδομάδων. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η επανειλημμένη διακολπική αναρρόφηση ωοθυλακίων σε άνηβες μοσχίδες προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις στις ωοθήκες αυτών, οι οποίες όταν είναι ιδιαίτερα εκτεταμένες είναι πιθανό να επηρεάσουν τη φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών και, κατά επέκταση, τη γονιμότητα των ζώων (Snel-Oliveira και συν. 2002).

Το ερώτημα που ανακύπτει από τα παραπάνω είναι εάν η ορμονική διέγερση των ωοθηκών και η επακόλουθη αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε αμνάδες, μπορούν να επηρεάσουν το χρόνο ενήβωσής τους. Όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο I (1.5.2 σελ. 52) εκτός των ενδοκρινικών και των γενετικών παραγόντων, που είναι οι περισσότεροι καθοριστικοί για τη ρύθμιση της ενήβωσης, άλλοι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι το σωματικό μέγεθος (βάρος), ο μεταβολισμός, η διατροφή, η επαφή με αρσενικά, η φωτοπερίοδος διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διαδικασία αυτή (Foster και συν. 1985, Kinder και συν. 1995, Ebling 2005). Στο πρόβατο η ηλικία γέννησης επηρεάζει την ηλικία ενήβωσης διαμέσου της φωτοπεριόδου (Foster και Ryan 1981a, Foster και συν. 1985, Yellon και Foster 1985, Foster και συν. 1988b).

Εντούτοις, η ενήβωση μπορεί να επισπευσθεί ή να καθυστερήσει μετά από πρόωμη έκθεση των αμνάδων σε ημέρες μικρής διάρκειας ημερήσιου φωτός (Quirke 1979, Foster 1983, Yellon και Foster 1985, Adam και συν. 1998). Επίσης, η ενήβωση μπορεί να καθυστερήσει σε αμνάδες που υποσιτίζονται (Quirke 1979, Foster 1983, Adam και συν. 1998). Η καθυστέρηση του χρόνου ενήβωσης σε υποσιτιζόμενα ζώα οφείλεται στην ανεπάρκεια της τονικής έκκρισης της GnRH και ακολούθως της LH (Foster και συν. 1985, Ganson και συν. 1997). Η ηλικία ενήβωσης μπορεί να μεταβληθεί μετά από ορμονική αγωγή των ζώων. Για παράδειγμα, πρόωμη ενήβωση και οίστρος μπορεί να προκληθούν σε μοσχίδες μετά από χορήγηση προγεσταγόνων (Smith και συν. 1979). Έχει, επίσης, βρεθεί ότι η χορήγηση οιστραδιόλης σε αμνάδες από την 20^η εβδομάδα της ηλικίας τους καθυστερεί το χρόνο ενήβωσης (Foster και συν. 1986), ενώ η συστηματική χορήγηση FSH σε αρσενικά μοσχάρια, από την 4^η μέχρι την 8^η εβδομάδα της ζωής τους, τον επιταχύνει (Bagu και συν. 2004). Ο χρόνος ενήβωσης μπορεί να συγχρονιστεί σε αμνάδες που πλησιάζουν την ηλικία ενήβωσης μετά από επανειλημμένη χορήγηση GnRH, προσομοιώνοντας την τονική έκκριση της ορμόνης που παρατηρείται φυσιολογικά λίγο πριν την ενήβωση (Padmanabhan και συν. 1992).

Η ενήβωση συνδέεται με τη σκελετική ωρίμανση, επειδή οι παραγόμενες από την ωοθήκη ορμόνες επηρεάζουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση του σκελετού (Salmeri και συν. 1991b). Η ανάπτυξη και η οστεοποίηση των συζευκτικών χόνδρων ρυθμίζεται από διάφορες ορμόνες, όπως είναι η αυξητική ορμόνη, η θυροξίνη, η οιστραδιόλη και η τεστοστερόνη και από διάφορους αυξητικούς παράγοντες. Η τεστοστερόνη διευκολύνει την ανάπτυξη και ωρίμανση των συζευκτικών χόνδρων, ενώ τα οιστρογόνα φαίνεται ότι προάγουν την κατά μήκος αύξηση των οστών. Τα οιστρογόνα φαίνεται, επίσης, ότι υποβοηθούν την εναπόθεση αλάτων και επιταχύνουν την οστεοποίηση των συζευκτικών χόνδρων (Lloyd και συν. 1971, Van Sickle 1985) με

δοσοεξαρτώμενο μηχανισμό (Lloyd και συν. 1971). Στον άνθρωπο έχει αποδειχθεί ότι τα οιστρογόνα έχουν διφασική δράση: σε χαμηλές δόσεις διεγείρουν, ενώ σε υψηλές αναστέλλουν την ανάπτυξη των οστών (Salmeri και συν. 1991b). Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση οιστραδιόλης σε έγκυες σκύλες ή σε κουτάβια για 5 φορές τις πρώτες 6 εβδομάδες της ζωής τους έχει ως αποτέλεσμα την πρόωμη σύγκλειση των επιφυσιικών γραμμών και την ανάπτυξη των κέντρων οστεοποίησης (ossification centers) (Gustafsson και Beling 1969). Η χορήγηση διαιθυλοστιλβεστρόλης σε αρνιά επισπεύδει την οστεοποίηση των συζευκτικών χόνδρων προάγοντας την αποτιτάνωση αυτών (ασβεστοποίηση, calcification) (Garrigus 1965). Σε αντίθεση, η πρόωμη ωοθυκεκτομή ή ορχεκτομή σε θηλυκά ή αρσενικά σκυλιά, αντίστοιχα, προκαλεί καθυστέρηση στη σύγκλειση των επιφυσιικών γραμμών και παρατεταμένη κατά μήκος αύξηση των οστών του αντιβραχίου σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Η χαμηλή συγκέντρωση τεστοστερόνης ευνουχισμένων ταύρων, κριών και κάπρων οδηγεί σε αυξημένο ύψος σε σχέση με τα μη ευνουχισμένα ζώα (Salmeri και συν. 1991a). Αυτή η καθυστερημένη σύγκλειση των επιφυσιικών γραμμών μπορεί να αποδοθεί στην έλλειψη των στεροειδών ορμονών που φυσιολογικά εκκρίνονται από τις γονάδες και επισπεύδουν την ωρίμανση και οστεοποίηση των συζευκτικών χόνδρων στα αναπτυσσόμενα ζώα (Salmeri και συν. 1991a).

Οι αμνάδες Καραγκούνικης φυλής που γεννιούνται το χειμώνα ενηλώνονται σε ηλικία 238 ημερών περίπου (Pappa-Michailidou και συν. 1999). Η διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου της φυλής, στην περιοχή καταγωγής της (Καρδίτσα, γεωγραφικό πλάτος 39° 26' Βόρειο), είναι περίπου 190 ημέρες, διαρκώντας από αρχές Αυγούστου μέχρι τα μέσα Φεβρουαρίου (Μενεγάτος και συν. 1995). Έχοντας μεγάλης διάρκειας άνοιστρη περίοδο οι Καραγκούνικες προβατίνες γεννούν συνήθως έως τον Απρίλιο και το αργότερο έως τον Ιούνιο παρουσιάζοντας δείκτη πολυδυμίας 1,3 αρνιά/προβατίνα/περίοδο.

Ως επιτυχημένο πρωτόκολλο συλλογής ωάριων από άνηβα ζώα, με βάση τις σύγχρονες τάσεις για τη διαχείριση των αγροτικών ζώων, θεωρείται αυτό που αφενός αποδίδει καλά ποσοστά εξωσωματικής παραγωγής εμβρύων και αφετέρου δεν επηρεάζει τη φυσιολογική αναπαραγωγική ικανότητα και την ευζωία των δοτριών. Συνεπώς, ο σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης της μίας ή των επανειλημμένων αναρροφήσεων των ωοθυλακίων αμνάδων Καραγκούνικης φυλής, που γεννήθηκαν χειμώνα και φθινόπωρο (1) στο χρόνο ενήβωσής τους, (2) στη μυοσκελετική ανάπτυξή τους και (3) στη μελλοντική αναπαραγωγική ικανότητά τους.

3.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.4.1 Πειραματόζωα-αναρροφήσεις ωοθυλακίων

Εξήντα αμνάδες Καραγκούνικης φυλής που γεννήθηκαν τον χειμώνα του 2003-2004 (Δεκέμβριος 2003 και Φεβρουάριος 2004) και δέκα αμνάδες που γεννήθηκαν το φθινόπωρο του 2004 (Σεπτέμβριος 2004) στην Καρδίτσα, παρέμειναν σταβλισμένες από τη γέννησή τους μέχρι την ηλικία των 18 μηνών. Οι αμνάδες μετά τον απογαλακτισμό τους διατρέφονταν με ισόρροπο σιτηρέσιο που αποτελούνταν από συμπυκνωμένη ζωοτροφή ανάπτυξης του εμπορίου (0,3-0,5 kg/ζώο/ημέρα) και χονδροειδή ζωοτροφή (σανός μηδικής 1 kg/ζώο/ημέρα). Στην ηλικία των 7 εβδομάδων τα ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα χωρίστηκαν τυχαία σε 5 ομάδες, την X1, X2, X3, X4 και X5 (κάθε μία n=12), και τα ζώα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο σε 2 ομάδες, την Φ1 και την Φ2 (κάθε μία n=5). Οι αμνάδες των ομάδων X1 και Φ1 αποτελούσαν τους μάρτυρες. Από την ηλικία των 8 εβδομάδων έγινε λαπαροσκοπικά αναρρόφηση των ωοθυλακίων στις αμνάδες των ομάδων X2 και Φ2 τέσσερις φορές σε μηνιαία διαστήματα, ενώ στις αμνάδες των ομάδων X3, X4 και X5 μόνο μία φορά στην ηλικία των 12, 16 και 20 εβδομάδων, αντίστοιχα. Πριν την κάθε αναρρόφηση τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε ορμονική αγωγή που περιελάμβανε, την ημέρα 0 και 3, χορήγηση καπροϊκής υδροξυπρογεστερόνης (25 mg/ζώο, i.m., Proluton Depot, Schering AG, Γερμανία). Ταυτόχρονα με τη δεύτερη δόση Proluton ξεκινούσε η αγωγή της πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων που περιελάμβανε έξι ισόποσες δόσεις πρόβειας FSH (συνολικά 3,52 mg, i.m., Ovagen, Bodinco B.V., Ολλανδία), χορηγούμενες ανά 12ωρο. Πριν την κάθε προγραμματισμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων όλα τα ζώα, πλην εκείνων της ομάδας X1, υποβάλλονταν σε στέρηση τροφής και νερού για 24 και 12 ώρες, αντίστοιχα. Την ημέρα 6 ακολουθούσε λαπαροσκοπικά αναρρόφηση όλων των εμφανών ωοθυλακίων υπό γενική αναισθησία με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο II (2.4.2). Οι πειραματισμοί του τμήματος αυτού διενεργήθηκαν στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ. και στο Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Παλαμά Καρδίτσας.

3.4.2 Ενήβωση και αναπαραγωγική ικανότητα

Με σκοπό τον προσδιορισμό του χρόνου ενήβωσης, μελετήθηκε η συγκέντρωση της προγεστερόνης σε σειρά δειγμάτων αίματος. Οι αιμοληψίες γίνονταν εβδομαδιαία από το 2^ο μέχρι τον 7^ο μήνα της ηλικίας των αμνάδων και στη συνέχεια δύο φορές την

εβδομάδα μέχρι το 10^ο μήνα για τις ομάδες X1, X3, X4, X5 και μέχρι το 13^ο μήνα για τις ομάδες X2, Φ1 και Φ2.

Η επίδραση της χορηγούμενης προγεστερόνης στη συγκέντρωση της ενδογενούς προγεστερόνης (P4) μελετήθηκε σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν πριν από την 1^η (ημέρα 0) και 2^η (ημέρα 3) χορήγηση Proluton, πριν από την αναρρόφηση των ωοθυλακίων (ημέρα 6) και σε εβδομαδιαία δείγματα που λήφθηκαν στο διάστημα μεταξύ των αναρροφήσεων. Οι ορμονικές μελέτες διενεργήθηκαν σε 6 ζώα από κάθε μία από τις ομάδες X3, X4, X5, σε 9 ζώα της ομάδας X2 και σε όλα τα ζώα της ομάδας Φ2.

Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β (E2) προσδιορίστηκε σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν από τα προαναφερθέντα ζώα, πριν από την κάθε έγχυση FSH και πριν από την αναρρόφηση των ωοθυλακίων. Δύο επιπλέον δείγματα αίματος συλλέχθηκαν δύο και 24 ώρες μετά την OPU από τα ζώα που υποβλήθηκαν σε ακτινογραφικό έλεγχο (9 ζώα της ομάδας X2, 6 ζώα της X5, όλα τα ζώα της Φ2).

Δείγματα αίματος (5 ml) συλλέγονταν από τη σφαγίτιδα φλέβα σε σωλήνες αιμοληψίας υπό κενό (CAT PLUS 10ml 16x100mm, BD Vacutainer Systems Preanalytical Solutions, Ηνωμένο Βασίλειο). Τα δείγματα αφήνονταν να πήξουν στους 4°C για 3 ώρες και στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 3000rpm επί 10 λεπτά. Ακολούθως, διαχωριζόταν ο ορός και συντηρούταν στους -20°C μέχρι τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ορμονών.

Όταν οι αμνάδες που γεννήθηκαν το χειμώνα συμπλήρωσαν τον 6^ο μήνα της ζωής τους, ένας κριός γνωστής γονιμότητας εισήχθη σε κάθε ομάδα και παρέμεινε για τρεις μήνες, με σκοπό την ανίχνευση των οίστρων και τη φυσική οχεία. Η διάγνωση της εγκυμοσύνης έγινε 55 ημέρες μετά την απομάκρυνση των κριών από το κοπάδι, με τη βοήθεια υπερηχογράφου (AMI B7, Alliance Medical, Que, Καναδάς) που έφερε κεφαλή σάρωσης κυκλικού τομέα (Sector) μεταβλητής συχνότητας (2,6–6 MHz). Επίσης, καταγράφηκαν οι τοκετοί των οχευθέντων ζώων κατά την πρώτη και δεύτερη αναπαραγωγική περίοδο τους και υπολογίστηκε ο δείκτης πολυδυμίας τους (αριθμός αρνιών που γεννήθηκαν / αριθμός εγκύων ζώων). Τα ζώα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο είχαν οπτική και οσφρητική επαφή με ένα κριό, δίχως ωστόσο να συγχρωτίζονται με αυτόν.

3.4.3 Εκτίμηση σωματικού βάρους και ανάπτυξης οστών

Όλες οι αμνάδες ζυγίστηκαν στη γέννηση, στον απογαλακτισμό (42 ημερών), στην ηλικία των 2 μηνών και στη συνέχεια κάθε μήνα μέχρι την αναμενόμενη ηλικία ενήβωσης που ήταν οι 8 (X1, X2, X3, X4 και X5) και οι 12 μήνες (Φ1 και Φ2).

Για να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της ορμονικής αγωγής στη σωματική ανάπτυξη, τα ζώα, εκτός από την εκτίμηση του σωματικού βάρους τους, υποβλήθηκαν και σε ακτινογραφικό έλεγχο. Από 6 ζώα της ομάδας X1, από 9 της X2, από 6 της X5, και από όλα τα ζώα της ομάδας Φ1 και της Φ2 λήφθηκαν ακτινογραφήματα του δεξιού αντιβραχίου τους σε προσθιοπίσθια και πλάγια προβολή. Σε κάθε περίπτωση οι ρυθμίσεις του ακτινολογικού μηχανήματος προσαρμόζονταν με γνώμονα το σωματικό βάρος του ζώου. Όλες οι ακτινογραφήσεις πραγματοποιήθηκαν στη Χειρουργική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι ηλικίες ακτινογράφησης των ζώων ανά ομάδα πειραματόζωων ήταν οι εξής: οι αμνάδες των ομάδων X1, X2 και X5 ακτινογραφήθηκαν σε ηλικία 4, 6 και 8 μηνών, ενώ εκείνες των ομάδων Φ1 και Φ2 σε ηλικία 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 και 18 μηνών.

Η σύγκλειση της κάτω επιφυσιακής γραμμής της κερκίδας θεωρήθηκε πλήρης όταν η ταινιοειδής διαύγαση του συζευκτικού χόνδρου δεν ήταν πλέον ορατή και το μήκος της κερκίδας παρέμενε αμετάβλητο (Stubbs και συν. 1996). Το μήκος της κερκίδας μετρήθηκε στα ακτινογραφήματα πλάγιας προβολής του αντιβραχίου και αντιστοιχούσε στην απόσταση από το μέσο της αρθρικής επιφάνειάς της με το βραχιόνιο έως το μέσο της αρθρικής επιφάνειάς της με τον καρπό.

Ως δείκτης ολοκλήρωσης της σωματικής ανάπτυξης και οστικής ωρίμανσης ορίστηκε η ηλικία του ζώου στην οποία σταθεροποιούνταν ο ρυθμός της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας. Μελετήθηκε, επίσης, εάν η οστεοποίηση του κάτω συζευκτικού χόνδρου διαχωριζόταν από την κατά μήκος αύξηση της κερκίδας μετά από συγκεκριμένη ηλικία, σε αντιστοιχία με ότι έχει παρατηρηθεί κατά την ανάπτυξη του μετακαρπίου (Oberbauer και συν. 1988).

3.4.4 Μικροσκοπική εξέταση ωοθηκών

Δύο αμνάδες της ομάδας X2 οι οποίες δεν ενηβώθηκαν μέχρι τον 13^ο μήνα της ηλικίας τους, και μία αμνάδα της ομάδας X5 η οποία ενηβώθηκε μέχρι τον 10^ο μήνα αλλά δε γονιμοποιήθηκε από κριό θανατώθηκαν στο 14^ο μήνα της ζωής τους. Αμέσως μετά τη θανάτωση αφαιρέθηκε το γεννητικό σύστημα των ζώων (τράχηλος, μήτρα,

ωαγωγοί και ωοθήκες), εξετάστηκε μακροσκοπικά και έγινε μικροσκοπική εξέταση των ωοθηκών.

Οι ωοθήκες μονιμοποιήθηκαν σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10%. Στη συνέχεια τεμαχίστηκαν επιμήκως σε 2 ημιμόρια (τμήματα) και ακολούθησε επεξεργασία (σε ιστοκινέτα) σε διαλύματα αλκοολών και έγκλειση σε παραφίνη. Με τη χρήση μικροτόμου έγιναν ιστολογικές τομές πάχους 5 μm . Οι τομές βάφτηκαν με αιματοξυλίνη-εωσίνη, καθώς και με την ειδική χρώση τρίχρωμη Masson. Η μικροσκοπική εξέταση των τομών πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο κοινού φωτισμού (Zeiss Axioskop) και λήφθηκαν μικροφωτογραφίες (Nikon Coolpix 4500).

3.4.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ορμονών

Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA) και όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης προγεστερόνης

Η συγκέντρωση της προγεστερόνης στον ορό του αίματος προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη ραδιοανοσολογική μέθοδο στερεής φάσης (solid-phase) με ιχνηθέτη το ^{125}I (Coat-a-Count, Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, ΗΠΑ). Το αντίσωμα έναντι της προγεστερόνης κουνελιού που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ενσωματωμένο στην επικάλυψη του πυθμένα των πλαστικών σωληναρίων (coated tubes).

Αρχικά τοποθετούνταν 1,0 ml ^{125}I προγεστερόνης σε δύο κενά σωληνάρια (χωρίς επικάλυψη αντισώματος) για τη μέτρηση των ολικών κρούσεων (TC). Η πρότυπη καμπύλη (standard curve) γινόταν τοποθετώντας στα έτοιμα πλαστικά σωληνάρια 100 μl πρότυπου διαλύματος προγεστερόνης συγκέντρωσης 0, 0,1, 0,5, 2, 10, 20 και 40 ng/ml. Ακολουθούσε η προσθήκη 100 μl δείγματος ορού προς εξέταση. Με σκοπό τον προσδιορισμό του ενδο-συντελεστή παραλλακτικότητας (intraassay coefficient of variation) και του μεταξύ των μετρήσεων συντελεστή παραλλακτικότητας (interassay coefficient of variation) γινόταν προσθήκη 2 δειγμάτων γνωστής υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης προγεστερόνης ανά 50 δείγματα προς εξέταση.

Μετά την προσθήκη των δειγμάτων ακολουθούσε η προσθήκη 1,0 ml ραδιοσημασμένης με ^{125}I προγεστερόνης σε όλα τα σωληνάρια που περιείχαν δείγμα ορού ή πρότυπου διαλύματος προγεστερόνης. Το αργότερο σε 10 λεπτά από την προσθήκη της ^{125}I προγεστερόνης γινόταν καλή ανάδευση του περιεχομένου των

σωληναρίων με χρήση κυκλομείκτη, και ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες.

Μετά το πέρας της επώασης γινόταν αναρρόφηση του περιεχομένου όλων των σωληναρίων εκτός των δύο TC. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνταν σε μετρητή γ ακτινοβολίας (WIZARD, 1470 Automatic gamma counter, Perkin ElmerTM life sciences-WALLAC, Φιλανδία) και παρέμεναν για μέτρηση των κρούσεων για 1 λεπτό το καθένα. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων γινόταν με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης. Η ευαισθησία της μεθόδου σύμφωνα με τον κατασκευαστή είναι 0,02 ng/ml.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης οιστραδιόλης-17β

Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β (οιστραδιόλη ή E2) στον ορό του αίματος προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ραδιοανοσολογική μέθοδο στερεής φάσης (solid-phase) με ιχνηθέτη το ¹²⁵I (Spectria®, Orion Diagnostica Oy, Espoo, Φιλανδία). Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο ο πυθμένας πλαστικών σωληναρίων ήταν επικαλυμμένος με πολυκλωνικό αντι-αντίσωμα οιστραδιόλης κουνελιού. Η μέθοδος τροποποιήθηκε με την προσθήκη επιπλέον προτύπων διαλυμάτων χαμηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης στην πρότυπη καμπύλη και με την αύξηση του χρόνου επώασης κατά μισή ώρα.

Αρχικά, γινόταν προσθήκη 500 μl ¹²⁵I οιστραδιόλης σε δύο κενά σωληνάρια (χωρίς επικάλυψη αντισώματος) για τη μέτρηση των ολικών κρούσεων (TC). Η πρότυπη καμπύλη έγινε τοποθετώντας στα έτοιμα πλαστικά σωληνάρια 100 μl πρότυπου διαλύματος οιστραδιόλης συγκέντρωσης 0, 1,7, 3,4, 6,8, 13,6, 41, 136, 410, 1,360 και 4,100 pg/ml. Εν συνεχεία, γινόταν προσθήκη 100 μl δείγματος ορού προς εξέταση. Με σκοπό τον προσδιορισμό του ενδο-συντελεστή παραλλακτικότητας (intraassay coefficient of variation) και του μεταξύ των μετρήσεων συντελεστή παραλλακτικότητας (interassay coefficient of variation) γινόταν προσθήκη 2 δειγμάτων γνωστής υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης ανά 50 δείγματα προς εξέταση.

Μετά την προσθήκη των δειγμάτων ακολουθούσε προσθήκη 500 μl ραδιοσημασμένης με ¹²⁵I οιστραδιόλης σε όλα τα σωληνάρια που περιείχαν δείγμα ορού ή πρότυπου διαλύματος οιστραδιόλης και αναμιγνύονταν σε κυκλομείκτη. Έπειτα, τα δείγματα καλύπτονταν με ελαστικό φιλμ (parafilm) και επωάζονταν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2,5 ώρες.

Μετά το πέρας της επώασης γινόταν αναρρόφηση του περιεχομένου των σωληναρίων, εκτός των TC. Έπειτα, τα σωληνάρια ξεπλένονταν προσθέτοντας 1 ml διαλύματος πλύσης (washing solution) και μετά από ήπια ανακίνηση αναρροφόνταν το

περιεχόμενό τους, εκτός των TC. Στη συνέχεια γινόταν η μέτρηση των κρούσεων του κάθε δείγματος για 1 περίπου λεπτό σε μετρητή γ ακτινοβολίας (WIZARD, 1470 Automatic gamma counter, Perkin ElmerTM life sciences-WALLAC, Φινλανδία). Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων γινόταν με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης. Η ευαισθησία της μεθόδου αυξήθηκε σε σχέση με την αντίστοιχη του κατασκευαστή. Μετά από αφαίρεση του διπλάσιου της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου από το μέσο όρο της συγκέντρωσης του πρότυπου με 0 pg/ml συγκέντρωση διαλύματος, η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε στα 0,392 pg/ml (n=10) (Chard 1990).

Πίνακας 3.1: Διασταυρούμενη αντίδραση αντιορού προγεστερόνης και οιστραδιόλης με άλλα στεροειδή σύμφωνα με τον κατασκευαστή (η ονομασία των στεροειδών καταγράφεται με τον αντίστοιχο αγγλικό όρο).

ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΣ σχετιζόμενο με προγεστερόνη	διασταυρούμενη αντίδραση %	ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΣ σχετιζόμενο με οιστραδιόλη	διασταυρούμενη αντίδραση %
Progesterone	100	Oestradiol	100
Kaurostenediol	MA	Ethinylloestradiol	1,4
Corticosterone	0,9	Oestrone	0,97
Cortisol	0,03	16-Oxooestradiol	0,86
Danazol	0,006	Oestradiol-17-glucuronide, Na-salt	0,08
11-Deoxycorticosterone	2,2	Oestradiol-17-valerate	0,08
11-Deoxycortisol	0,01	Progesterone	<0,05
DHEA-SO4	0,002	Corticosterone	0,02
20α-Dihydroprogesterone	0,2	2-Hydroxyoestradiol	0,01
Oestradiol	MA	17α-Oestradiol	0,008
17α-Hydroxyprogesterone	3,4	Oestradiol-3-sulphate, Na-salt	0,005
Medroxyprogesterone	0,3	norethisterone	0,004
Pregnane	MA	Oestrone-glucoronide, Na-salt	<0,003
5β-Pregnan-3α-ol-20-one	0,05	Oestradiol-3,17-disulphate, Na-salt	<0,003
5α-Pregnan-3,20-dione	9,0	Mesterolone	0,002
5β-Pregnan-3,20-dione	3,2	Norethisterone acetate	<0,002
Pregnenolone	0,1	Oestradiol-17-sulphate, Na-salt	<0,002
5-Pregnen-3β-ol-20-one-sulfate	0,05	Oestradiol-diglucoronide	0,0014
Testosterone	0,1	norgestrel	0,001
MA: μη ανιχνεύσιμη		Kaurostenediol	<0,001
		Cortisol	<0,001
		Cortisone	<0,001
		danazol	<0,001
		ethisterone	<0,001
		Oestrone-3-Beta-D-glucuronide	<0,001
		Oestrone-3-sulphate	<0,001
		Testosterone	<0,001

3.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS έκδοση 11.5 για Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, ΗΠΑ). Η εκτίμηση της σημαντικότητας διενεργήθηκε στο επίπεδο 5%.

Η συγκέντρωση της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης κατά τη διάρκεια της ορμονικής αγωγής των πειραματόζων αναλύθηκε με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης για επανειλημμένες μετρήσεις. Στις συγκρίσεις αυτές ο χρόνος της αιμοληψίας ήταν ο παράγοντας εντός των μετρήσεων (within-subjects factor) προγεστερόνης (1 έως 3) ή οιστραδιόλης (1 έως 7 ή 1 έως 9) στα ίδια ζώα όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο τμήμα του κεφαλαίου II (τμήμα 2.5).

Οι διάμεσες τιμές της ηλικίας ενήβωσης μεταξύ των ομάδων X1, X2, X3, X4 και X5 συγκρίθηκαν με τη δοκιμή Kruskal-Wallis. Οι μέσοι όροι της ηλικίας ενήβωσης μεταξύ των ομάδων Φ1 και Φ2 συγκρίθηκαν με τη δοκιμή t. Το ποσοστό των ζώων που ενηβώθηκαν μέχρι τον 10^ο μήνα της ηλικίας και το ποσοστό εγκυμοσύνης μεταξύ των ομάδων X1, X2, X3, X4 και X5 συγκρίθηκε με τη δοκιμή χ^2 του Pearson.

Οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους σε σχέση με την ηλικία ζύγισης όπως και μεταξύ των ομάδων X1, X2, X3, X4, X5 και Φ1, Φ2, αντίστοιχα, συγκρίθηκαν με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης για επανειλημμένες μετρήσεις. Ως παράγοντας εντός των μετρήσεων (within-subjects factor) ορίστηκε η ηλικία ζύγισης και ως παράγοντας μεταξύ των μετρήσεων (between-subjects factor) οι ομάδες X1, X2, X3, X4, X5 ή Φ1, Φ2. Οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους μεταξύ των ομάδων που ενηβώθηκαν μέχρι το 10^ο μήνα της ηλικίας τους και εκείνων που δεν ενηβώθηκαν συγκρίθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης για επανειλημμένες μετρήσεις, όπως περιγράφεται στο τμήμα 2.5.

Οι μεταβολές των μέσων όρων του μήκους της κερκίδας σε διάφορες ηλικίες ακτινογράφησης και της διαφοράς της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας μεταξύ δύο διαδοχικών ακτινογραφήσεων μελετήθηκε στο χρόνο (within-subjects factor) και μεταξύ των ομάδων (X1, X2, X5 και Φ1, Φ2, αντίστοιχα) (between-subjects factor) με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης για επανειλημμένες μετρήσεις (τμήμα 2.5). Επίσης, η σύγκριση των μέσων όρων του μήκους της κερκίδας σε ηλικία 6 και 8 μηνών μεταξύ των ομάδων X1 και Φ1 όπως και μεταξύ των X2 και Φ2 έγινε με τη δοκιμή t.

3.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προσδιορισμός συγκέντρωσης ορμονών

Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης ο ένδο-συντελεστής παραλλακτικότητας βρέθηκε να είναι $0,303 \pm 0,022$, δηλαδή 7,261% για το δείγμα της χαμηλής συγκέντρωσης προγεστερόνης ($n=10$), και $6,052 \pm 0,133$, δηλαδή 2,198% για το δείγμα της υψηλής συγκέντρωσης προγεστερόνης ($n=10$). Ο μεταξύ των μετρήσεων συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν $0,301 \pm 0,017$, δηλαδή 5,648% για το δείγμα της χαμηλής συγκέντρωσης προγεστερόνης ($n=320$), και $6,051 \pm 0,202$, δηλαδή 3,338% για το δείγμα της υψηλής συγκέντρωσης προγεστερόνης ($n=320$). Η ειδικότητα της μεθόδου (διασταυρούμενη αντίδραση με διάφορα στεροειδή) ορίζεται από τον κατασκευαστή (Πίνακας 3.1). Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης ο ένδο-συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν $0,890 \pm 0,094$, δηλαδή 10,562% για το δείγμα της χαμηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης ($n=10$), και $14,545 \pm 0,772$, δηλαδή 5,308% για το δείγμα της υψηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης ($n=10$). Ο μεταξύ των μετρήσεων συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν $0,899 \pm 0,110$, δηλαδή 12,236% για το δείγμα της χαμηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης ($n=50$), και $14,691 \pm 0,856$, δηλαδή 5,830% για το δείγμα της υψηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης ($n=50$). Η ειδικότητα της μεθόδου (διασταυρούμενη αντίδραση με διάφορα στεροειδή) ορίζεται από τον κατασκευαστή (Πίνακας 3.1).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της προγεστερόνης σε δείγματα που συλλέχθηκαν από 62 ζώα πριν από την 1^η (ημέρα 0) και την 2^η χορήγηση (ημέρα 3) καπρoϊκής υδροξυπρογεστερόνης και πριν από την αναρρόφηση των ωοθυλακίων (ημέρα 6) έδειξε ότι η συγκέντρωση της προγεστερόνης αυξανόταν ($p < 0,0001$) μετά την 1^η και 2^η χορήγηση. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της προγεστερόνης ήταν μικρότερη την ημέρα 0 σε σχέση με την ημέρα 3 ($p = 0,029$) και 6 ($p < 0,0001$) όπως και την ημέρα 3 σε σχέση με την ημέρα 6 ($p < 0,0001$) (Διάγραμμα 3.1.α). Η χορήγηση της ορμόνης δεν προκάλεσε παρατεταμένη άνοδο στη συγκέντρωση της προγεστερόνης του ορού του αίματος. Αντιθέτως, προκάλεσε μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωση της προγεστερόνης πριν από την αναρρόφηση των ωοθυλακίων μέχρι της συγκέντρωσης των $0,79 \text{ ng/ml}$, η οποία μέσα σε μία εβδομάδα μειωνόταν ($p < 0,0001$) στα βασικά επίπεδα ($0,002$ έως $0,18 \text{ ng/ml}$).

Η ορμονική διέγερση των ωοθηκών έπειτα από χορήγηση FSH είχε ως αποτέλεσμα καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων (≥ 7 μεγάλα ωοθυλάκια διαμέτρου $\geq 3 \text{ mm}$) σε κάποια ζώα ($n=34$) ενώ σε κάποια άλλα ($n=40$) παρουσιάστηκε μέτρια ή καμία

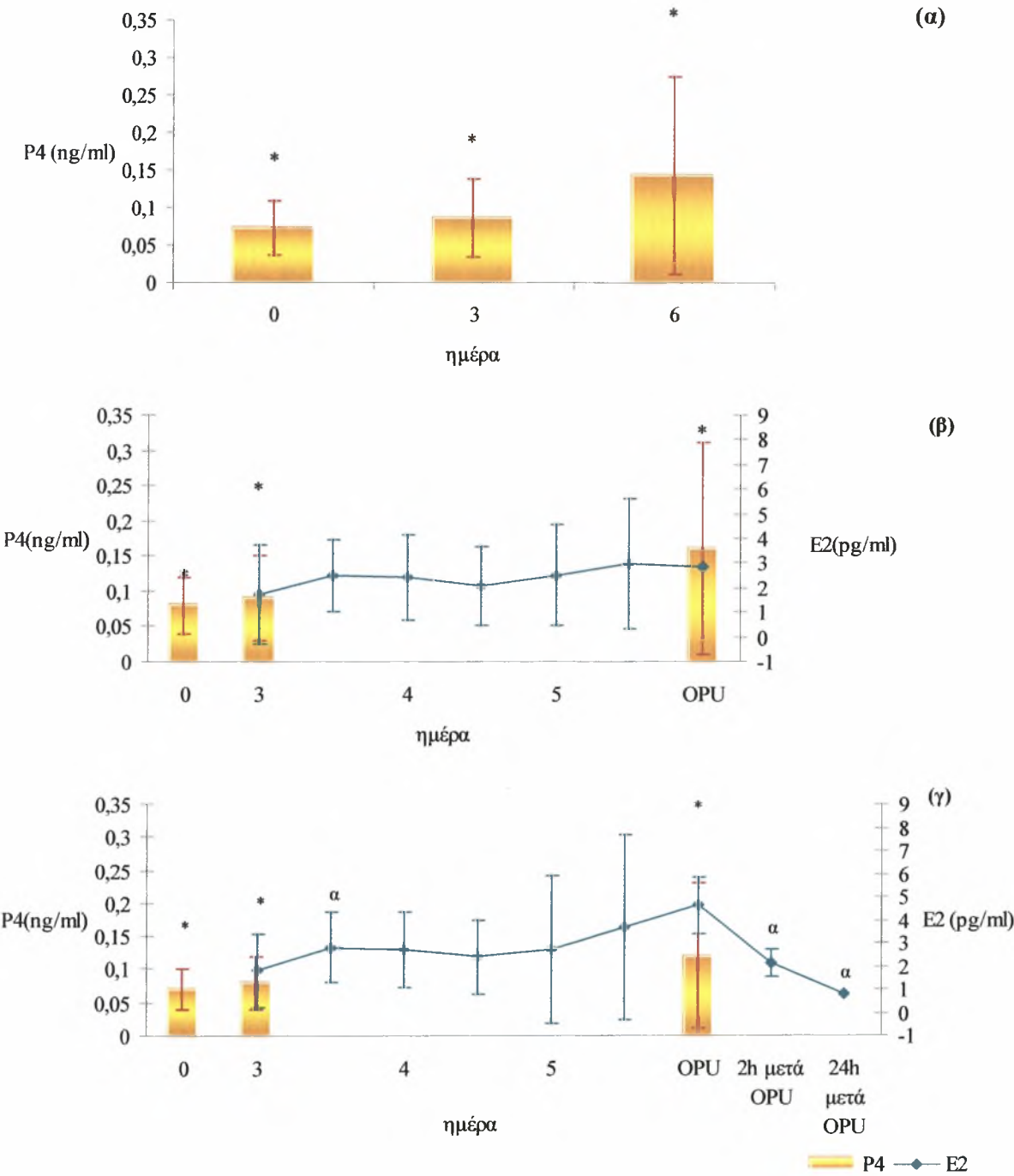
αντίδραση των ωοθηκών (≤ 5 μεγάλα ωοθυλάκια διαμέτρου ≥ 3 mm). Στις αμνάδες με καλή αντίδραση των ωοθηκών η συγκέντρωση της οιστραδιόλης παρουσίαζε σταδιακή αύξηση από την πρώτη χορήγηση FSH έως το χρόνο της αναρρόφησης, ενώ σε εκείνες με φτωχή αντίδραση η συγκέντρωση παρέμενε σχετικά σταθερή. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση του συνόλου των δειγμάτων που λήφθηκαν από τα ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα (6 ζώα από την κάθε ομάδα πειραματοζώων) όπως και από εκείνα που υποβλήθηκαν σε ακτινογραφικό έλεγχο (9 ζώα της ομάδας X2, 6 ζώα της ομάδας X5 και όλα τα ζώα της ομάδας Φ2).

Στα πειραματόζωα που γεννήθηκαν το χειμώνα η συγκέντρωση της οιστραδιόλης δε διέφερε ($p=0,079$) μεταξύ των διαδοχικών δειγμάτων. Η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή της οιστραδιόλης πριν από την πρώτη χορήγηση FSH ήταν 0,11 pg/ml και 3,5 pg/ml, αντίστοιχα, ενώ πριν από την αναρρόφηση ήταν 0,04 pg/ml και 10,76 pg/ml, αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.1.β).

Στις αμνάδες-πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε ακτινογραφικό έλεγχο η συγκέντρωση της οιστραδιόλης μεταβάλλονταν με το χρόνο ($p<0,0001$). Συγκεκριμένα, αυξανόταν από την 1^η στη 2^η χορήγηση FSH ($p=0,001$), στη συνέχεια παρέμενε σταθερή μεταξύ των επόμενων διαδοχικών χορηγήσεων (το μέγιστο p ήταν 0,102) και μέχρι την αναρρόφηση, ενώ μειωνόταν 2 ώρες ($p=0,002$) και 24 ώρες ($p<0,0001$) μετά την αναρρόφηση. Η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή της οιστραδιόλης πριν από την πρώτη χορήγηση FSH ήταν 0,11 pg/ml και 3,99 pg/ml, αντίστοιχα, ενώ πριν από την αναρρόφηση ήταν 0,04 pg/ml και 22,71 pg/ml, αντίστοιχα. Επίσης, η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή της οιστραδιόλης 2 ώρες μετά την αναρρόφηση ήταν 0,04 pg/ml και 4,60 pg/ml, αντίστοιχα, ενώ 24 ώρες μετά την αναρρόφηση ήταν 0,04 pg/ml και 3,40 pg/ml, αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.1.γ).

Διάγραμμα 3.1: Κατανομή (μέσος όρος± τυπική απόκλιση) της συγκέντρωσης της P4 και της E2 κατά τη διάρκεια της ορμονικής αγωγής:

(α) της P4 σε όλα τα μελετούμενα ζώα (n=62), (β) της E2 σε σχέση με την P4 στα μελετούμενα ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα (n=42) και (γ) της E2 σε σχέση με την P4 στα ζώα που υποβλήθηκαν σε ακτινογραφικό έλεγχο.



Σημείωση: οι τιμές της P4 που είναι σημειωμένες με αστερίσκο (*) και της E2 που είναι σημειωμένες με το γράμμα (α) σε δεδομένη χρονική στιγμή διαφέρουν ($p<0,05$) από τις αντίστοιχες της αμέσως προηγούμενης χρονικής στιγμής

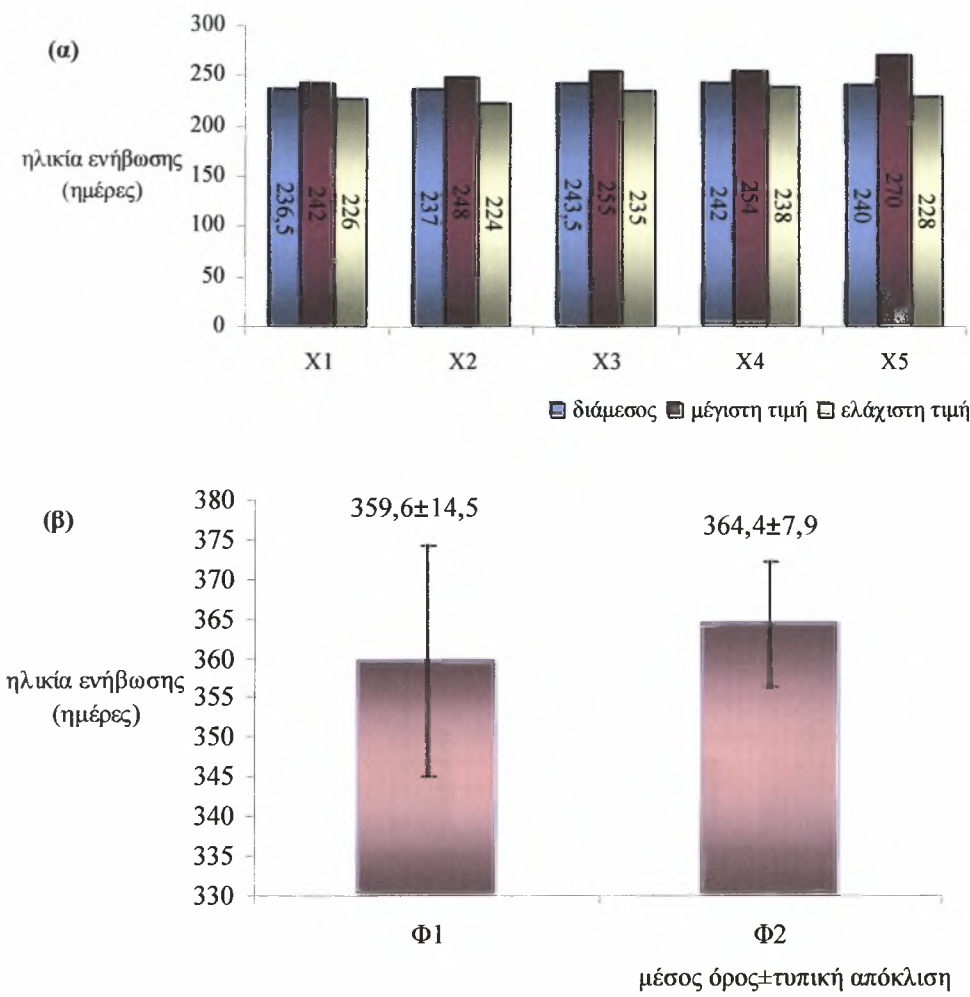
Ενήβωση

Με βάση τη συγκέντρωση της προγεστερόνης στον ορό του αίματος ως ενήβωση ορίστηκε ο χρόνος της έναρξης της πρώτης φυσιολογικής διάρκειας ωχρινικής φάσης (12 έως 14 ημερών) (McNatty και συν. 1998). Οι αμνάδες θεωρήθηκε ότι ενηβώθηκαν όταν είχαν συγκέντρωση προγεστερόνης μεγαλύτερη του 1 ng/ml σε τουλάχιστον τρία από τέσσερα διαδοχικά δείγματα αίματος (αιμοληψίες δύο φορές την εβδομάδα). Σε πολλές αμνάδες (όλες που γεννήθηκαν το φθινόπωρο και 15 από εκείνες που γεννήθηκαν το χειμώνα) η πρώτη άνοδος στη συγκέντρωση της προγεστερόνης που παρατηρήθηκε αποτελούσε μια φυσιολογική και πλήρους διάρκειας ωχρινική φάση. Μολαταύτα, 32 ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα παρουσίασαν μία ή περισσότερες μικρής διάρκειας ωχρινικές φάσεις, πριν από την εμφάνιση της φυσιολογικής διάρκειας ωχρινικής φάσης. Η συγκέντρωση της προγεστερόνης στις μικρής διάρκειας ωχρινικές φάσεις ήταν μικρού εύρους (0,5-1,0 ng/ml) και μικρής διάρκειας (1 έως 6 ημέρες). Πριν την ενήβωση, εκτός της περιόδου της ορμονικής αγωγής, η συγκέντρωση της προγεστερόνης ήταν γενικά χαμηλή και κυμαινόταν από 0,002 έως 0,424 ng/ml, παρότι παρατηρήθηκαν σε κάποια ζώα παροδικές αυξήσεις το πολύ έως 1,0 ng/ml.

Ο χρόνος ενήβωσης δε διέφερε ($p=0,069$) μεταξύ των ομάδων X1, X2, X3, X4 και X5 και η πλειονότητα των ζώων που γεννήθηκαν το χειμώνα ενηβώθηκε από την ηλικία των 224 έως εκείνη των 270 ημερών (συνολικός διάμεσος 240 ημέρες) (Διάγραμμα 3.2.α). Συνολικά, όμως, 10 αμνάδες των ομάδων X1, X3, X4, X5 και 3 της ομάδας X2 δεν ενηβώθηκαν μέχρι το 10^ο και το 13^ο μήνα της ηλικίας τους, αντίστοιχα (21,7%). Το ποσοστό των αμνάδων που ενηβώθηκαν δε διέφερε ($p=0,910$) μεταξύ των ομάδων X1, X2, X3, X4 και X5, και ήταν 10 από τις 12 (83,3%), 9 από τις 12 (75%), 8 από τις 12 (66,7%), 10 από τις 12 (83,3%) και 10 από τις 12 (83,3%), αντίστοιχα.

Σε ό,τι αφορά στα ζώα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο, όλες οι αμνάδες ενηβώθηκαν σε ηλικία 340 έως 381 ημερών (συνολικός μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση: $362 \pm 11,3$) ενώ ο χρόνος ενήβωσης δε διέφερε ($p=0,534$) μεταξύ των μαρτύρων και των πειραματόζων (Διάγραμμα 3.2.β).

Διάγραμμα 3.2: Ηλικία ενήβωσης (ημέρες) στις ομάδες (α) X1, X2, X3, X4 και X5 και τις (β) Φ1 και Φ2

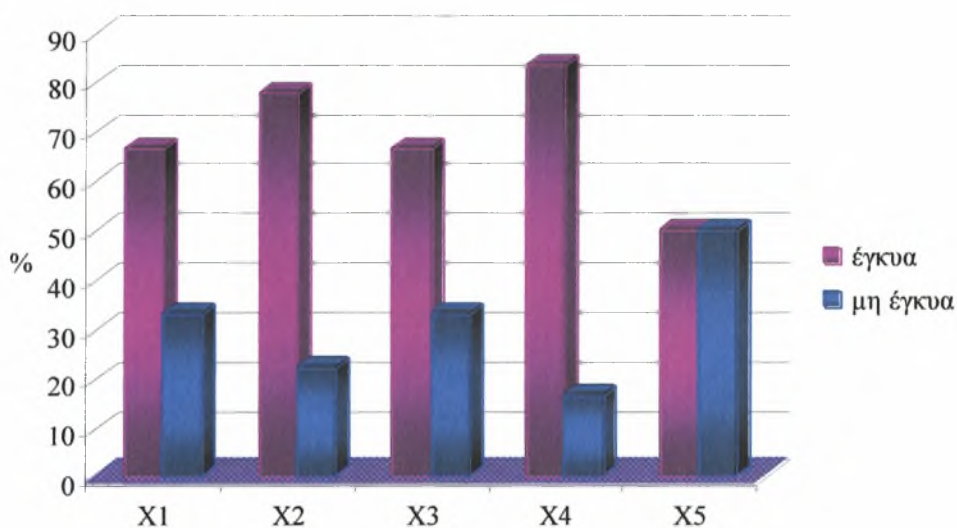


Διάγνωση εγκυμοσύνης

Η μελέτη της συγκέντρωσης της προγεστερόνης στην περίοδο της ενήβωσης έδειξε ότι 16 αμνάδες γονιμοποιήθηκαν στον πρώτο οίστρο και 25 στο δεύτερο οίστρο που ακολούθησε την ενήβωση (σύνολο 41). Κατά τη διάρκεια της πρώτης αναπαραγωγικής περιόδου των αμνάδων η διάγνωση της εγκυμοσύνης με υπερηχογραφία έδειξε ότι 8 από τις 12 (66,7%), 9 από τις 12 (75,0%), 8 από τις 12 (66,7%), 10 από τις 12 (83,3%) και 6 από τις 12 (50%) αμνάδες των ομάδων X1, X2, X3, X4 και X5, αντίστοιχα, ήταν έγκυες (συνολικό ποσοστό 68,3%) (Διάγραμμα 3.3). Όσα ζώα διαγνώστηκαν έγκυα διατήρησαν την εγκυμοσύνη μέχρι τέλους (ποσοστό εγκυμοσύνης=ποσοστό γεννήσεων) και τελικά γέννησαν 47 υγιή αρνιά (δείκτης πολυδυμίας 1,15αρνιά/προβατίνα).

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης αναπαραγωγικής περιόδου οι αμνάδες, εκτός των 3 αμνάδων των ομάδων X2 και X5 που θανατώθηκαν, που δεν ενηβώθηκαν ή δε διαγνώσθηκαν ως έγκυες ($n=16$) κατά την πρώτη αναπαραγωγική περίοδό τους, ξεκίνησαν κυκλική δραστηριότητα (οίστρους) από τις αρχές Ιουλίου, γονιμοποιήθηκαν και γέννησαν φυσιολογικά. Συνολικά 57 προβατίνες γέννησαν 74 υγιή αρνιά στο τέλος της 2^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου (δείκτης πολυδυμίας 1,31 αρνιά/προβατίνα).

Διάγραμμα 3.3: Ποσοστό εγκυμοσύνης στις ομάδες X1, X2, X3, X4 και X5 κατά την πρώτη αναπαραγωγική περίοδο



Σωματικό βάρος και ανάπτυξη οστών

Οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους αυξάνονταν με την πρόοδο της ηλικίας σε όλες τις ομάδες των ζώων που γεννήθηκαν το χειμώνα ($p<0,0001$). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων και του σωματικού βάρους ήταν σημαντική ($p<0,0001$). Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση ήταν σημαντική συγκρίνοντας τους μάρτυρες (X1) με την ομάδα X2 ($p<0,0001$), X3 ($p=0,039$), X5 ($p=0,015$) αλλά όχι με την ομάδα X4 ($p=0,063$) αποτέλεσμα που σημαίνει ότι η αύξηση του σωματικού βάρους μεταξύ των ομάδων X1 και X4 γινόταν σταθερά με τον ίδιο τρόπο σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ανά δύο συγκρίσεις. Όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ της ομάδας X1 και της κάθε ομάδας των πειραματοζώων, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ομάδες διέφεραν μεταξύ τους ($p=0,001$) και συγκεκριμένα οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους ήταν μεγαλύτεροι στην ομάδα X1 σε σχέση με την X2 σε ηλικία 4 ($p=0,001$) και 5 ($p=0,006$) μηνών

(Πίνακας 3.2). Οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους των ζώων που γεννήθηκαν το χειμώνα και ενηβώθηκαν στην περίοδο που μελετήθηκε και εκείνων που δεν ενηβώθηκαν αυξάνονταν σε σχέση με την ηλικία ($p<0,0001$) ενώ δεν υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ τους σε σχέση με το βάρος ($p=0,220$) ούτε και σημαντική διαφορά μεταξύ τους στην κάθε ηλικία ζύγισης ($p=0,343$) (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.2: Κατανομή του σωματικού βάρους (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) μεταξύ των ομάδων X1, X2, X3, X4 και X5 από τη γέννηση έως τον 8^ο μήνα της ηλικίας.

ηλικία	Ομάδα X1 (n=12) kg	Ομάδα X2 (n=12) kg	Ομάδα X3 (n=12) kg	Ομάδα X4 (n=12) kg	Ομάδα X5 (n=12) kg
γέννηση	4,8 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 1,0	4,1 $\pm$ 0,7	4,9 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,9
απογαλακτισμός	13,2 $\pm$ 2,7	14,9 $\pm$ 3,2	15,4 $\pm$ 2,7	15,9 $\pm$ 2,8	12,8 $\pm$ 2,5
2μηνών	16,7 $\pm$ 2,8	16,2 $\pm$ 3,6	18,9 $\pm$ 2,8	19,4 $\pm$ 2,8	16,5 $\pm$ 3,0
3μηνών	22,5 $\pm$ 3,1	18,4 $\pm$ 4,5	24,6 $\pm$ 2,8	25,1 $\pm$ 2,9	21,7 $\pm$ 4,3
4μηνών	28,5 $\pm$ 3,6 ^B	20,5 $\pm$ 5,4 ^A	30,3 $\pm$ 2,8	30,8 $\pm$ 2,7	26,8 $\pm$ 5,3
5μηνών	31,4 $\pm$ 3,7 ^B	24,8 $\pm$ 5,5 ^A	33,3 $\pm$ 2,5	33,8 $\pm$ 2,8	31,3 $\pm$ 4,9
6μηνών	34,4 $\pm$ 3,9	29,2 $\pm$ 5,7	36,3 $\pm$ 2,8	36,8 $\pm$ 2,9	31,6 $\pm$ 4,9
7μηνών	36,8 $\pm$ 4,0	33,6 $\pm$ 6,0	39,0 $\pm$ 2,6	39,5 $\pm$ 2,7	33,3 $\pm$ 4,9
8μηνών	39,5 $\pm$ 4,3	38,0 $\pm$ 6,5	41,5 $\pm$ 2,9	42,0 $\pm$ 2,8	34,9 $\pm$ 4,9

* οι τιμές μεταξύ της ομάδας X1 (μάρτυρες) και της κάθε ομάδας των πειραματοζώων που είναι σημειωμένες με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν ($p<0,05$)

Πίνακας 3.3: Κατανομή του σωματικού βάρους (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) των ζώων που γεννήθηκαν το χειμώνα και ενηβώθηκαν (n=47) και εκείνων που δεν ενηβώθηκαν (n=13) στην περίοδο που μελετήθηκε.

Ηλικία	Ενηβώθηκαν (kg)	Δεν ενηβώθηκαν (kg)
γέννηση	4,4 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 0,8
απογαλακτισμός	14,6 $\pm$ 3,2	14,1 $\pm$ 2,1
2μηνών	17,7 $\pm$ 3,5	17,0 $\pm$ 2,3
3μηνών	22,7 $\pm$ 4,3	21,2 $\pm$ 4,1
4μηνών	27,8 $\pm$ 5,4	25,6 $\pm$ 5,7
5μηνών	31,0 $\pm$ 5,1	29,3 $\pm$ 5,3
6μηνών	33,9 $\pm$ 5,0	32,4 $\pm$ 5,0
7μηνών	36,7 $\pm$ 5,0	35,3 $\pm$ 4,8
8μηνών	39,3 $\pm$ 5,2	38,2 $\pm$ 4,8

Στα ζώα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους αυξάνονταν σε σχέση με την ηλικία όπως ακριβώς και στα ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα ($p<0,0001$). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων και του σωματικού βάρους δεν ήταν σημαντική ($p=0,369$) καθώς επίσης οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους δε differed μεταξύ των ομάδων Φ1 και Φ2 στις διάφορες ηλικίες ($p=0,874$) (Πίνακας 3.4).

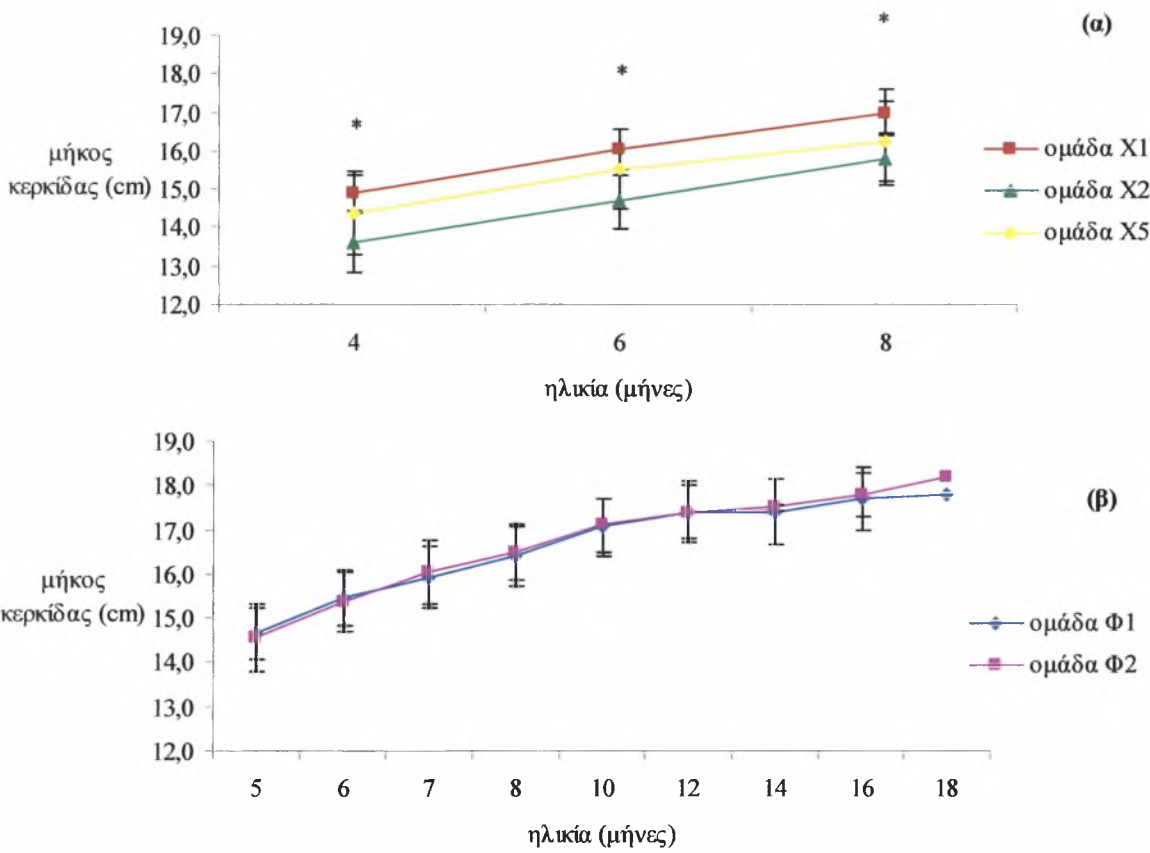
Πίνακας 3.4: Κατανομή του σωματικού βάρους (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) των ομάδων Φ1 και Φ2 από τη γέννηση έως το 12^ο μήνα της ηλικίας.

ηλικία	Ομάδα Φ1 (n=5) kg	Ομάδα Φ2 (n=5) kg
γέννηση	4,2 $\pm$ 0,7	4,3 $\pm$ 0,9
απογαλακτισμός	14,3 $\pm$ 2,8	15,0 $\pm$ 3,3
2μηνών	16,0 $\pm$ 3,1	16,5 $\pm$ 3,6
3μηνών	18,7 $\pm$ 3,5	20,1 $\pm$ 5,1
4μηνών	21,6 $\pm$ 4,1	21,3 $\pm$ 6,0
5μηνών	23,9 $\pm$ 4,6	23,5 $\pm$ 6,8
6μηνών	28,1 $\pm$ 4,3	28,5 $\pm$ 7,6
7μηνών	31,8 $\pm$ 4,2	30,4 $\pm$ 7,8
8μηνών	33,1 $\pm$ 4,8	31,1 $\pm$ 7,6
9μηνών	33,6 $\pm$ 4,9	31,7 $\pm$ 7,5
10μηνών	34,0 $\pm$ 5,3	32,0 $\pm$ 7,6
11μηνών	34,5 $\pm$ 5,1	32,3 $\pm$ 7,5
12μηνών	34,8 $\pm$ 5,3	32,5 $\pm$ 7,0

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του μήκους της κερκίδας εντός των ομάδων X1, X2 και X5 έδειξε ότι το μήκος της κερκίδας αυξανόταν σε σχέση με την ηλικία κατά την οποία έγινε η ακτινογράφιση ($p<0,0001$) και ήταν μεγαλύτερο στην ηλικία των 8 μηνών σε σχέση με εκείνη των 6 και των 4 μηνών, όπως επίσης στην ηλικία των 6 μηνών σε σχέση με εκείνη των 4 μηνών. Η αλληλεπίδραση της ομάδας με την ηλικία ακτινογράφισης ήταν σημαντική ($p=0,002$) μόνο μεταξύ των ομάδων X2 και X5. Οι μέσοι όροι του μήκους της κερκίδας ήταν μεγαλύτεροι ($p=0,004$) στην ομάδα X1 σε σχέση με τη X2 σε όλες τις ακτινογραφικές εξετάσεις (Διάγραμμα 3.4).

Οι μέσοι όροι του μήκους της κερκίδας εντός των ομάδων Φ1 και Φ2 αυξάνονταν σε σχέση με την ηλικία έως το 10^ο μήνα, σταθεροποιούνταν ($p>0,078$) από το 12^ο έως το 14^ο μήνα και πάλι αυξάνονταν (το μέγιστο p ήταν 0,033) από το 14^ο έως το 18^ο μήνα της ηλικίας. Πάντως, δε σημειώθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του μήκους της κερκίδας και των ομάδων ($p=0,122$) καθώς επίσης οι μέσοι όροι δε differed μεταξύ των ομάδων Φ1 και Φ2 στις διάφορες ηλικίες ακτινογράφισης ($p=0,877$) (Διάγραμμα 3.4).

Διάγραμμα 3.4: Κατανομή του μήκους της κερκίδας (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση) μεταξύ των ομάδων (α) X1, X2 και X5, και (β) Φ1 και Φ2



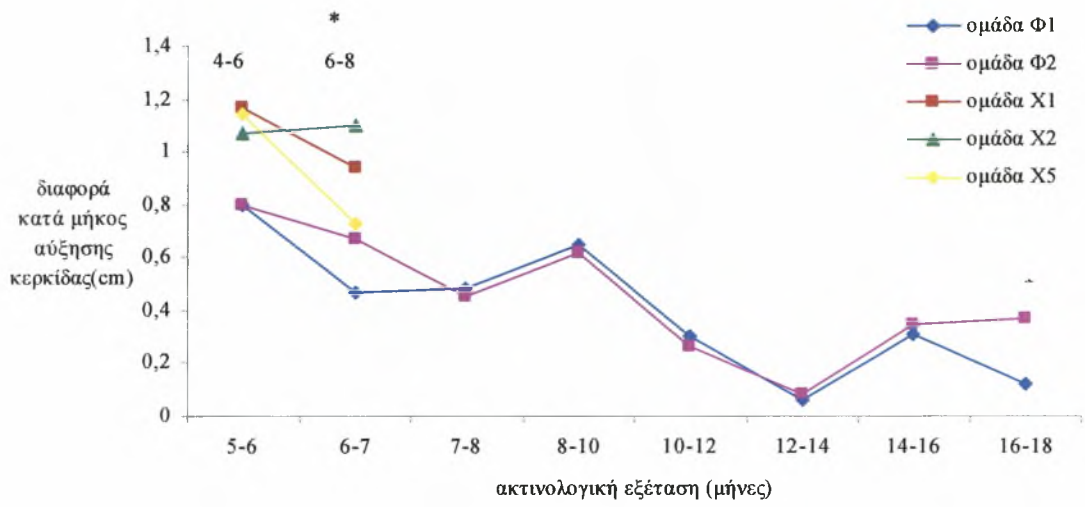
*το μήκος της κερκίδας είναι μεγαλύτερο (το μέγιστο p είναι 0,032) στην ομάδα X1 σε σχέση με την X2 σε όλες τις ηλικίες ακτινογράφησης

Η διαφορά της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας από τον 4^ο στον 6^ο μήνα όπως και από τον 6^ο στον 8^ο μήνα εντός των ομάδων X1, X2 και X5, μειωνόταν σε σχέση με την ηλικία ακτινογράφησης ($p < 0,0001$) αν και αριθμητικά παρέμενε σχεδόν σταθερή στην ομάδα X2. Η αλληλεπίδραση της ομάδας σε σχέση με την ηλικία ήταν σημαντική ($p < 0,0001$) μόνο μεταξύ των μαρτύρων και της ομάδας X2 και X5, αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι μεταξύ των τριών ομάδων δε διέφεραν ($p = 0,104$) παρά το ότι στις ανά δύο συγκρίσεις η διαφορά της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας από τον 6^ο στον 8^ο μήνα ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα X2 σε σχέση με την X1 και μικρότερη στην ομάδα X5 σε σχέση με την X1 ($p < 0,0001$) (Διάγραμμα 3.5).

Εντός της ομάδας Φ1 και Φ2 η διαφορά της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας μεταξύ δύο συνεχόμενων ακτινογραφήσεων μεταβαλλόταν ($p < 0,0001$) σε σχέση με την ηλικία (Διάγραμμα 3.5). Επίσης, υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση ($p = 0,031$) στη διαφορά της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας σε σχέση με την ομάδα. Όμως, οι μέσοι

όροι της παραπάνω διαφοράς δε διέφεραν μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων (p=0,132). Σημειώνεται ότι η μικρότερη διαφορά στην κατά μήκος αύξηση της κερκίδας μεταξύ δύο διαδοχικών ακτινογραφήσεων παρατηρήθηκε μεταξύ του 12 και 14 μήνα της ηλικίας και για τις δύο ομάδες (Πίνακας 3.5).

Διάγραμμα 3.5: Κατανομή (μέσος όρος) της διαφοράς στην κατά μήκος αύξηση της κερκίδας μεταξύ διαδοχικών ακτινογραφημάτων μεταξύ των ομάδων X1, X2, X5 και Φ1, Φ2.



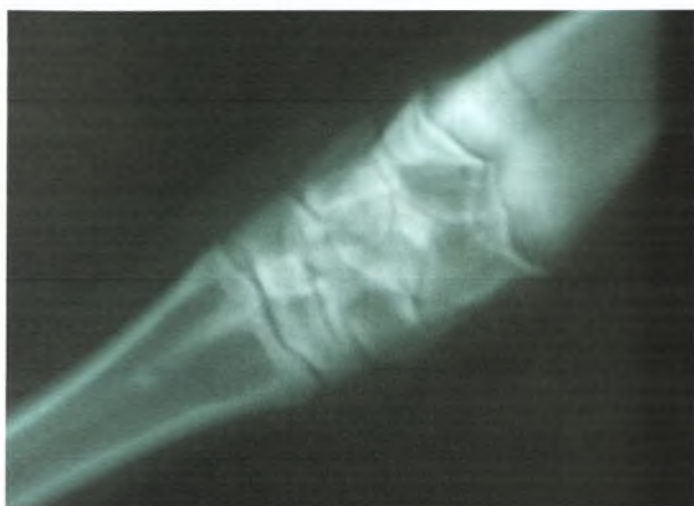
*οι τιμές της διαφοράς της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας μεταξύ των ομάδων X1 και X2 όπως και μεταξύ των X1 και X5 από τον 6^ο στον 8^ο μήνα διαφέρουν (p<0,0001)

Πίνακας 3.5: Κατανομή (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση) της διαφοράς της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας μεταξύ διαδοχικών ακτινογραφημάτων ληφθέντων στην ομάδα Φ1 και Φ2.

διαφορά κατά μήκος αύξησης κερκίδας	ομάδα Φ1	ομάδα Φ2
5 στους 6 μήνες	0,80±0,15	0,80±0,19 ^α
6 στους 7 μήνες	0,47±0,04 ^α	0,67±0,15 ^α
7 στους 8 μήνες	0,48±0,14 ^α	0,45±0,10 ^α
8 στους 10 μήνες	0,65±0,12 ^α	0,62±0,06
10 στους 12 μήνες	0,30±0,07	0,26±0,10
12 στους 14 μήνες	0,06±0,07	0,08±0,08
14 στους 16 μήνες	0,31±0,11	0,35±0,1 ^α
16 στους 18 μήνες	0,12±0,08	0,37±0,15 ^α

Σημείωση: οι τιμές μέσα στην ίδια στήλη μεταξύ διαδοχικών κελιών που δεν είναι σημειωμένες με το γράμμα ‘α’ διαφέρουν (το μέγιστο p είναι 0,039)

Στις ομάδες X1, X2 και X5 η σύγκλειση της επιφυσσιακής γραμμής του περιφερικού άκρου της κερκίδας δεν ολοκληρώθηκε μέχρι την ηλικία των 8 μηνών. Στις ομάδες Φ1 και Φ2 η σύγκλειση της αντίστοιχης επιφυσσιακής γραμμής δεν ήταν πλήρης μέχρι την ηλικία των 18 μηνών με εξαίρεση δύο ζώα που ήταν σχεδόν πλήρης σ' αυτή την ηλικία.



(α) Προσθιοπίσθια ακτινογραφική απεικόνιση της περιφερικής επιφυσσιακής γραμμής της δεξιάς κερκίδας αμνάδας ηλικίας 5 μηνών

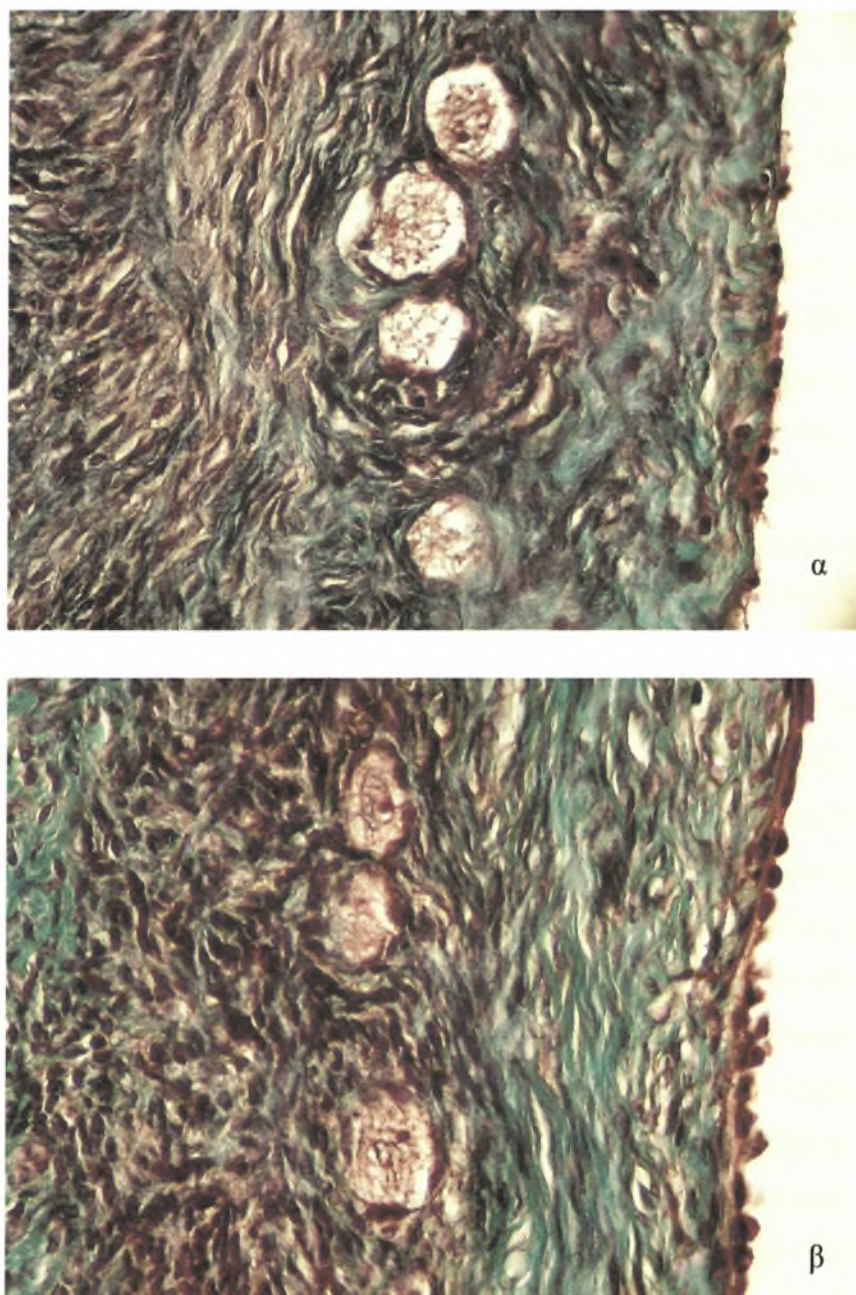


(β) Προσθιοπίσθια ακτινογραφική απεικόνιση της περιφερικής επιφυσσιακής γραμμής της δεξιάς κερκίδας ζυγούρας ηλικίας 18 μηνών

Εικόνα 3.1: Ακτινογραφική απεικόνιση της δεξιάς κερκίδας θηλυκού προβάτου

Μικροσκοπική εξέταση ωοθηκών

Κατά την μικροσκοπική εξέταση των ωοθηκών παρατηρήθηκαν όλες οι μορφές των ωοθυλακίων δηλαδή αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή και διαφορετικού μεγέθους τριτογενή ωοθυλάκια. Χαρακτηριστική αλλοίωση ήταν η πάχυνση του ινώδη χιτώνα λόγω αύξησης του συνδετικού ιστού. Η αύξηση του συνδετικού ιστού παρατηρήθηκε επίσης στη φλοιώδη ουσία των ωοθηκών, καθώς επίσης και γύρω από ομάδες διαμέσων κυττάρων (ή δομές που μοιάζουν με διάμεσο αδένα) (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Μικροσκοπική εικόνα ωοθήκης (α) μάρτυρα και (β) μετά από επανειλημμένη αναρρόφηση των ωοθυλακίων

3.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι σύγχρονες μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που αξιοποιούν τις άνηβες αμνάδες ως πηγή ωαρίων για την παραγωγή εμβρύων *in vitro* είναι πλέον ηθικά αποδεκτές. Ωστόσο, τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται στις άνηβες δότριες πρέπει να είναι ασφαλή, να διαφυλάττουν την ευζωία των ζώων και να μην εκθέτουν σε κίνδυνο την μελλοντική αναπαραγωγική ικανότητά τους. Η έρευνα που παρουσιάζεται αποτελεί την πρώτη αναφορά σε παρενέργειες που θα μπορούσε να προκαλέσει η αναρρόφηση των ωοθυλακίων σε άνηβα ζώα σε ό,τι αφορά στο χρόνο ενήβωσης και στη μελλοντική γονιμότητά τους.

Οι αλληλεπιδράσεις των ενδογενών και εξωγενών παραγόντων που ρυθμίζουν το χρόνο ενήβωσης είναι πολύπλοκες και σε κάποιο βαθμό αδιευκρίνιστες (Ebling 2005). Στην παρούσα έρευνα, η συγκέντρωση της προγεστερόνης στον ορό του αίματος μέχρι την ενήβωση, εκτός της περιόδου της ορμονικής αγωγής, ήταν γενικά χαμηλή και κυμαινόταν από 0,002 (οριακά ανιχνεύσιμη συγκέντρωση) μέχρι 0,424 ng/ml. Η χορήγηση καπροϊκής υδροξυπρογεστερόνης δεν προκάλεσε παρατεταμένη άνοδο στη συγκέντρωση της προγεστερόνης στην περιφερική κυκλοφορία του αίματος. Αντιθέτως, προκάλεσε μια ήπια αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης πριν την αναρρόφηση των ωοθυλακίων μέχρι του επιπέδου των 0,79 ng/ml (ημέρα 6), η οποία μέσα σε λιγότερο από μία εβδομάδα μειώθηκε στα βασικά επίπεδα (0,002-0,18 ng/ml). Ωστόσο, πολύ πριν την ενήβωση κάποια ζώα εμφάνισαν παροδικές αυξήσεις της συγκέντρωσης της προγεστερόνης έως 1ng/ml σε τυχαία δείγματα αίματος και ανεξάρτητα από την ορμονική αγωγή. Με δεδομένο ότι ωοθυλακιόρρηξιες ή σχηματισμός ωχρών/λευκών σωματίων δεν ανιχνεύθηκαν κατά τις λαπαροσκοπικές παρατηρήσεις, αυτές οι παροδικές αυξήσεις μπορούν να αποδοθούν στην καταπόνηση που προκαλείται από τις αιμοληψίες, άρα σε προγεστερόνη μη ωοθηκικής προέλευσης (Meikle και συν. 1998) ή σε μη ρηχθέντα αλλά μερικώς ωχρινοποιημένα ατρητικά ωοθυλάκια (Takeva και συν. 1997). Είναι, επίσης, πιθανόν η αναρρόφηση όλων των μεγάλων ωοθυλακίων να προκάλεσε μερική ωχρινοποίηση του τοιχώματος των ωοθυλακίων. Σε αγελάδες μετά την αναρρόφηση των ωοθυλακίων έχει περιγραφεί η ανάπτυξη συμπληρωματικών ωχρών σωματίων που έχουν χαμηλότερη ικανότητα παραγωγής προγεστερόνης σε σχέση με τα φυσιολογικά (Stubbings και Walton , 1995, Amiridis 1996, Amiridis και συν. 2000, Petyim και συν. 2000, 2003). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί σχηματισμός συμπληρωματικών ωχρών σωματίων σε ορμονικό περιβάλλον που τυπικά δεν προάγει την ωχρινοποίηση (Amiridis και συν. 2000). Στην

παρούσα έρευνα η αναρρόφηση των ωοθυλακίων δεν προκάλεσε τη δημιουργία ωχρινικών σχηματισμών, που να ήταν τουλάχιστον ορατοί κατά τη λαπαροσκοπική παρατήρηση των ωοθηκών. Το μόνο στοιχείο που παρατηρήθηκε στα μηνιαία μεσοδιαστήματα μεταξύ των OPU ήταν τα σημεία προηγούμενης αναρρόφησης που είχαν τη μορφή μικρών-σημειακών σχηματισμών που περιείχαν υπολείμματα πύγματος αίματος.

Η ορμονική αγωγή που εφαρμόστηκε εκτός της αύξησης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης προκάλεσε και αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης στα ζώα που παρουσίασαν καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων. Η ελάχιστη και η μέγιστη συγκέντρωση της οιστραδιόλης πριν από την πρώτη χορήγηση FSH ήταν 0,11 pg/ml και 3,99 pg/ml, αντίστοιχα, ενώ πριν από την αναρρόφηση ήταν 0,04 pg/ml και 22,71 pg/ml, αντίστοιχα. Στις αμνάδες από την ηλικία των 7 εβδομάδων το υποθαλαμικό κέντρο ελέγχου της προωθυλακιορρηκτικής κορύφωσης της GnRH (surge center) μπορεί να ανταποκριθεί σε αυξήσεις της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης προκαλώντας την προωθυλακιορρηκτική έκκριση της LH (Foster και Karsch 1975). Προκειμένου όμως να ενεργοποιηθεί η κορύφωση της έκκρισης της LH, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παρατεταμένη αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2 έως 4 pg/ml για 24 με 48 ώρες (Foster 1984). Σε αμνάδες που δεν υποβάλλονται σε ορμονική αγωγή η απουσία αυτής της αύξησης στη συγκέντρωση της οιστραδιόλης οφείλεται στην ανεπάρκεια της τονικής έκκρισης της LH, γεγονός που αποδείχθηκε μετά από ωριαία χορήγηση LH για 48 ώρες (Foster και συν. 1984). Επιπλέον, σε αμνάδες στις οποίες χορηγήθηκε προγεστερόνη ακολουθούμενη από χορήγηση FSH δύο φορές ημερησίως για 4 ημέρες, η κορύφωση στην έκκριση της LH ανιχνεύθηκε 38 ώρες περίπου μετά την έναρξη της χορήγησης της FSH (Sumbung και συν. 1987). Στην παρούσα έρευνα, παρότι σε πολλές αμνάδες παρατηρήθηκε παρατεταμένη αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης για 60 περίπου ώρες, δεν προκλήθηκε ωοθυλακιορρηξία, πιθανότατα λόγω της αυξανόμενης συγκέντρωσης προγεστερόνης που κατέστειλε την επεισοδιακή έκκριση της LH. Είναι γνωστό ότι ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, διαμέσου του οποίου η οιστραδιόλη διεγείρει και η προγεστερόνη καταστέλλει την κορύφωση της έκκρισης της LH, είναι λειτουργικός σε αμνάδες πολύ πριν από την ηλικία ενήβωσης (Foster και Karsch 1975).

Σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες (Berardinelli και συν. 1980, Fitzgerald και Butler 1982, Keisler και συν. 1983, Huffman και συν. 1987, Ryan και συν. 1991, Santiago-Moreno και συν. 2000, Bartlewski και συν. 2006), αρκετά από τα ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα εμφάνισαν μία ή περισσότερες μικρής διάρκειας ωχρινικές

φάσεις πριν από την πρώτη φυσιολογικής διάρκειας ωχρινική φάση, στις οποίες η αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης ήταν μικρού εύρους (0,5 έως 1 ng/ml) και μικρής διάρκειας (1 έως 6 ημέρες). Γι' αυτό το λόγο η ενήβωση θα μπορούσε να θεωρηθεί είτε ως μια σταδιακή είτε ως μια αιφνίδια διαδικασία. Ομοίως, μικρής διάρκειας ωχρινικές φάσεις πριν από την πρώτη φυσιολογικής διάρκειας ωχρινική φάση παρατηρούνται και στις ενήλικες προβατίνες κατά τη μετάβαση από την άνοιξη στην ένοιστη περίοδο και μετά τη λοχεία (I'Anson και Legan 1988, Garverick και συν. 1992). Η πηγή αυτής της προγεστερόνης στις αμνάδες πιστεύεται ότι είναι κάποιος ωχρινικός ιστός της ωοθήκης (Berardinelli και συν. 1980, Takeva και συν. 1997) ή και διάμεσα κύτταρα της ωοθήκης (Takeva και συν. 1997). Οι ανεπαρκείς ωχρινικές φάσεις γενικώς αποδίδονται (1) στη σταδιακή μείωση της αυξημένης αρνητικής επίδρασης της οιστραδιόλης στην τονική έκκριση της LH (Ebling 2005), (2) σε πρόωμη ωχρινόλυση εξαιτίας αυξημένης ευαισθησίας του νεοσχηματισμένου ωχρού σωματίου στην ενδογενή PGF_{2α} (Ryan και συν. 1991) ή (3) σε αυξημένη έκκριση της PGF_{2α} από την μήτρα της αμνάδας (Ryan και συν. 1991). Σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες (Fitzgerald και Butler 1982, Keisler και συν. 1983) τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι μικρής διάρκειας ωχρινικές φάσεις δεν είναι απαραίτητες για την ενήβωση γιατί δεν παρατηρήθηκαν σε όλα τα ζώα. Φαίνεται ότι οι μικρής διάρκειας ωχρινικές φάσεις παρέχουν ένα ερέθισμα για την έναρξη των οίστρων και των ωοθυλακιωρρηξιών, εφόσον άλλοι καθοριστικοί παράγοντες όπως είναι η ηλικία, το σωματικό βάρος και η εποχή, είναι ικανοί να υποστηρίξουν την αναπαραγωγή.

Η ενήβωση δε συμβαίνει απαραίτητα σε συγκεκριμένη ηλικία, σωματικό βάρος και μήνα του έτους, αλλά φαίνεται ότι καθορίζεται από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις των παραπάνω παραγόντων με την εποχή της γέννησης. Οι αμνάδες πρέπει να διαβιώσουν σε εποχή αυξανόμενης φωτοπερίοδου και να διατηρήσουν την 'εμπειρία' των ημερών με μεγάλη διάρκεια φωτός κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού έτσι ώστε να ενηβωθούν το φθινόπωρο, κατά τη διάρκεια της εποχής με μικρή διάρκεια ημέρας (Foster και συν. 1985). Η διάρκεια της άνηβης περιόδου εξαρτάται από τη διάρκεια της άνοιξης περιόδου της κάθε φυλής, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο μήνας της γέννησης καθορίζει το χρόνο ενήβωσης (Dyrmondsson και Lees 1972, Fitzgerald και Butler 1982). Έχει υποστηριχθεί ότι η φωτοπερίοδος δεν επιδρά στην ενήβωση μόνο μετά τη γέννηση (Foster και συν. 1988a, Herbosa και συν. 1994), αλλά και κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής (Helliwell και συν. 1997). Έτσι, λοιπόν, αμνάδες Καραγκούνικης φυλής που γεννιούνται το Δεκέμβριο και τον Ιανουάριο και ανατρέφονται υπό φυσιολογική φωτοπερίοδο, αρχίζουν την κυκλική

δραστηριότητά τους σε ηλικία περίπου 238 ημερών (Pappa-Michailidou και συν. 1999), ενώ εκείνες που γεννιούνται νωρίς το Νοέμβριο ενηβώνονται περίπου σε ηλικία 300 ημερών (Bizelis και συν. 1990). Έχει προταθεί ότι για την εκδήλωση της ήβης είναι απαραίτητο τα ζώα να έχουν διαβιώσει ημέρες μικρής διάρκειας φωτός και να διαθέτουν το ελάχιστο-κρίσιμο σωματικό βάρος (Foster και Ryan 1981a, Santiago-Moreno και συν. 2000), το οποίο για την Καραγκούνικη φυλή έχει υπολογιστεί στα 26-28kg (Bizelis και συν. 1990). Αμνάδες που γεννιούνται το χειμώνα ή την άνοιξη μπορούν να ενηβωθούν κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου της φυλής, ενώ εκείνες που γεννιούνται το φθινόπωρο ενηβώνονται μετά από ένα χρόνο (Foster και συν. 1985). Στην παρούσα μελέτη, η πλειονότητα των αμνάδων που γεννήθηκαν το χειμώνα ενηβώθηκαν σε ηλικία που κυμαινόταν από 224 έως 270 ημέρες ενώ όλα τα ζώα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο ενηβώθηκαν από την 340^η έως την 381^η ημέρα της ζωής τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η πρώτη ωοθυλακιορρηξία συνέβη σε αμνάδες που είχαν σωματικό βάρος από 26 έως 47,5 kg, ενώ στις περισσότερες από αυτές το σωματικό βάρος ήταν αρκετά μεγαλύτερο από εκείνο που ορίστηκε ως «κρίσιμο» από τους Bizelis και συν.(1990).

Η ορμονική αγωγή που εφαρμόστηκε προκάλεσε παροδική αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης. Εντούτοις, η αγωγή αυτή δεν οδήγησε σε πρόωμη ενήβωση, αλλά τα ζώα ενηβώθηκαν σε γενικές γραμμές στον αναμενόμενο για τη φυλή χρόνο. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες στις οποίες η χορήγηση οιστραδιόλης σε συνδυασμό με ή χωρίς προγεστερόνη ή η χορήγηση LH ή GnRH ή PMSG σε αμνάδες πριν την ενήβωση προκάλεσε ωοθυλακιορρηξία, αλλά σύντομα τα ζώα επανήλθαν στην ‘άνοιστη’ κατάσταση που χαρακτηρίζει τα άνηβα ζώα (Tounson και συν. 1977, Whyman 1978, Foster και συν. 1984, Keisler και συν. 1985). Η ευαισθησία του κέντρου της προωθυλακιορρηκτικής κορύφωσης της GnRH στην θετική δράση της οιστραδιόλης είναι υψηλή καθ’ όλη τη διάρκεια της άνηβης ζωής (Foster και Karsch 1975, Foster και συν. 1985). Επίσης, η τονική έκκριση της GnRH έχει υψηλή ευαισθησία στην αρνητική δράση της οιστραδιόλης πολύ πριν από την ηλικία ενήβωσης (Foster και Ryan 1979, Foster 1981). Είναι γνωστό ότι λίγο καιρό πριν από την ενήβωση αυτή η ευαισθησία στην αρνητική δράση της οιστραδιόλης μειώνεται προκαλώντας ολοένα και συχνότερα απελευθέρωση της GnRH και, επομένως, αυξημένη παραγωγή οιστραδιόλης μέχρι τελικά να προκληθεί η προωθυλακιορρηκτική έκκριση της GnRH (Foster και Ryan 1979). Η μείωση της ευαισθησίας της GnRH και της LH στην αρνητική δράση της οιστραδιόλης και όχι η συγκέντρωση της οιστραδιόλης είναι ο μηχανισμός που οδηγεί στην ενήβωση. Συνεπώς,

με δεδομένο ότι η ρύθμιση του χρόνου ενήβωσης γίνεται κυρίως από το κέντρο του υποθαλάμου που είναι υπεύθυνο για την τονική έκκριση της GnRH αντί εκείνου που είναι υπεύθυνο για την προωθυλακιωρρηκτική έκκριση της GnRH εξηγείται γιατί, παρά τις αυξημένες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης που παρατηρήθηκαν στα ζώα της παρούσας μελέτης, δεν επιταχύνθηκε ο χρόνος ενήβωσης.

Σε αναλογία με ό,τι παρατηρείται σε άλλες φυλές προβάτων (Foster και Ryan 1981b), η διάρκεια της 1^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου μετά την ενήβωση των αμνάδων Καραγκούνικης φυλής είναι μικρότερη (112 ημέρες) (Bizelis και συν. 1990) από ότι εκείνη των προβατίνων (190 ημέρες) (Μενεγάτος και συν. 1995). Συνήθως, οι αμνάδες ενηβώνονται μετά την έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου της φυλής, όπως επίσης μεταβαίνουν στην άνοιστη περίοδο νωρίτερα από ότι οι προβατίνες. Σε αμνάδες και προβατίνες Καραγκούνικης φυλής έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου της πρώτης ωοθυλακιωρρηξίας και της διάρκειας της αναπαραγωγικής περιόδου, στοιχείο που δείχνει ότι εάν η ωοθυλακιωρρηξία συμβεί νωρίς η αναπαραγωγική περίοδος θα διαρκέσει περισσότερο (Bizelis και συν. 1990, Μενεγάτος και συν. 1995). Στην παρούσα έρευνα, 16,7% από τις αμνάδες των ομάδων X1, X3, X4 και X5 δεν ενηβώθηκαν μέχρι το 10^ο μήνα της ηλικίας τους, ενώ 5% των αμνάδων της ομάδας X2 δεν ενηβώθηκαν μέχρι το 13^ο μήνα της ηλικίας τους. Το συνολικό ποσοστό που υπολογίστηκε (21,7%) είναι σχεδόν το ίδιο με εκείνο προηγούμενης έρευνας (Dyrmondsson και Lees 1972), σύμφωνα με την οποία το 21,21% των ζώων δεν άρχισαν κυκλική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της 1^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου. Γενικά, ο ρυθμός ανάπτυξης αυτών των ζώων ήταν βραδύτερος σε σχέση με εκείνον των ζώων που ενηβώθηκαν κατά την 1^η αναπαραγωγική περίοδο (Dyrmondsson και Lees 1972, Foster και Ryan 1981b). Στην παρούσα έρευνα, η σύγκριση του σωματικού βάρους σε διάφορες ηλικίες των αμνάδων που ενηβώθηκαν και εκείνων που δεν ενηβώθηκαν, έδειξε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης δε διέφερε. Έχει υποστηριχθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις το ελάχιστο-κρίσιμο σωματικό βάρος δεν είναι απαραίτητο για την ενήβωση (Foster και Ryan 1979, Adam και συν. 1998). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι η ηλικία ενήβωσης σχετίζεται θετικά με το ρυθμό ανάπτυξης (Foster και Ryan 1979). Σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η μεταβολική κατάσταση είναι το στοιχείο κλειδί για την έναρξη της αναπαραγωγικής λειτουργίας (Schneider και συν. 2000). Αν δεχθούμε αυτά τα δεδομένα, μπορεί να υποτεθεί ότι δε διέθεταν όλα τα ζώα τη μεταβολική κατάσταση που θα μπορούσε να υποστηρίξει την ενήβωση και την αναπαραγωγή τους. Επομένως, το 16,7% των ζώων είτε ενηβώθηκαν μετά τον 10^ο μήνα της ηλικίας τους, αλλά κατά τη διάρκεια της 1^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου είτε

ενηβώθηκαν ένα χρόνο μετά κατά τη διάρκεια της 2^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου. Σε ό,τι αφορά στα 3 ζώα της ομάδας X2 (5%), σίγουρα δεν ενηβώθηκαν κατά την 1^η αναπαραγωγική περίοδο τους γιατί ο 13^{ος} μήνας συνέπεσε με το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου της φυλής. Τον επόμενο χρόνο η έναρξη της κυκλικής δραστηριότητας των ζώων παρατηρήθηκε στις αρχές της αναπαραγωγικής περιόδου της φυλής, δηλαδή νωρίτερα από ότι κατά την 1^η αναπαραγωγική περίοδο.

Η επίδραση της παρουσίας του αρσενικού στο χρόνο ενήβωσης έχει αποδειχθεί σε διάφορα είδη ζώων (Senger 2003). Στην παρούσα έρευνα τα μισά από τα ζώα που γεννήθηκαν το χειμώνα ενηβώθηκαν από τις 238 έως τις 248 ημέρες, ενώ τα 7 από τα 10 ζώα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο από τις 359 έως τις 364 ημέρες της ζωής τους. Στο παρελθόν υποστηρίχτηκε ότι η παρουσία κριών συγχρόνισε το χρόνο της πρώτης οχείας (Dyrmondsson και Lees 1972) και επιτάχυνε τον πρώτο οίστρο σε αμνάδες κατά 2 εβδομάδες περίπου (O'Riordan και Hanrahan 1989). Στα ζώα που γεννήθηκαν το φθινόπωρο δεν παρατηρήθηκε επίσπευση του αναμενόμενου χρόνου ενήβωσής τους, παρότι είχαν οσφρητική και οπτική επαφή με ένα κριό από τον 7^ο μήνα της ηλικίας τους.

Το μικρότερο σωματικό βάρος των αμνάδων της ομάδας X2 (υποβλήθηκαν σε OPU 4 φορές) σε σχέση με εκείνων της ομάδας X1 (μάρτυρες) μπορεί να αποδοθεί στη προεγχειρητική νηστεία πριν από την κάθε αναρρόφηση. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από την επιτάχυνση του ρυθμού σωματικής ανάπτυξης κατά τη διάρκεια των επόμενων τριών μηνών και τη φυσιολογική αναπαραγωγική ικανότητα των αμνάδων της ομάδας X2, διότι το 75% αυτών γέννησαν υγιή αρνιά. Εξάλλου, η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι το σωματικό βάρος των αμνάδων της ομάδας Φ2 που υποβλήθηκαν 4 φορές σε αναρρόφηση ωοθυλακίων και νηστεία δε διέφερε από εκείνο των μαρτύρων της ομάδας Φ1 που υποβλήθηκαν επίσης 4 φορές σε νηστεία.

Γενικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναπαραγωγική ικανότητα των ζώων δεν επηρεάζεται από την αναρρόφηση ωοθυλακίων, αφού συνολικά το 68,3% των ζώων γονιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της 1^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου και γέννησε υγιή αρνιά. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες έρευνες όπου αποδείχθηκε το ίδιο σε άνηβες μοσχίδες (Looney και συν. 1995, Brown και συν. 1996, Presicce και συν. 1997) και παρατηρήθηκε τυχαία σε αμνάδες (Kelly και συν. 2005). Κατά αναλογία, η επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων (5 φορές) σε προβατίνες δεν επηρεάζει τη μετέπειτα γονιμότητα των ζώων (Alberio και συν. 2002). Εντούτοις, παρότι κάποιες αμνάδες της παρούσας έρευνας ενηβώθηκαν δε διαγνώστηκαν ως έγκυες (6/60). Αυτή η αποτυχία εγκατάστασης της εγκυμοσύνης μετά από συζεύξεις αμέσως μετά την ενήβωση θα μπορούσε να αποδοθεί σε ανωριμότητα του γεννητικού συστήματος να

υποστηρίζει την εγκυμοσύνη (Lewis και Berardinelli 2001). Εναλλακτικά, έχει υποστηριχθεί ότι σε ζώα της παραπάνω κατηγορίας παρατηρούνται πρώιμοι εμβρυϊκοί θάνατοι λόγω ωχρινικής ανεπάρκειας και χαμηλής έκκρισης ιντερφερόνης-τ τις πρώτες 14 ημέρες μετά τη σύλληψη (Abecia και συν. 2001). Επομένως, με βάση τη γονιμότητα στη 2^η αναπαραγωγική περίοδο θα μπορούσε να υποστηριχθεί με ασφάλεια ότι αυτές οι ζυγούρες θα είχαν γονιμοποιηθεί καθυστερημένα σε σχέση με τις υπόλοιπες κατά τη διάρκεια της 1^{ης} αναπαραγωγικής περιόδου (μετά τον 10^ο μήνα της ηλικίας τους) αν συνέχιζαν να συγχρωτίζονται με κριούς.

Κατά την μικροσκοπική εξέταση των ωοθηκών χαρακτηριστική αλλοίωση ήταν η πάχυνση του ινώδη χιτώνα λόγω αύξησης του συνδετικού ιστού και η αύξηση του συνδετικού ιστού στη φλοιώδη ουσία των ωοθηκών, καθώς επίσης και γύρω από ομάδες διάμεσων κυττάρων. Σε αντιστοιχία σε αγελάδες που υποβλήθηκαν σε επανειλημμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων, η μικροσκοπική εξέταση των ωοθηκών τους έδειξε αυξημένη ποσότητα ουλώδη και συνδετικού ιστού στον ινώδη χιτώνα και στο στρώμα συνδετικού ιστού της φλοιώδους ουσίας της ωοθήκης (Kruip και συν. 1994, Petyim και συν. 2001, McEnoy και συν. 2002, Chastant-Maillard και συν. 2003). Παρότι έχει αποδειχθεί ότι οι αναρροφήσεις ωοθυλακίων σε αγελάδες επηρεάζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τις ορμονικές αλληλεπιδράσεις, εντούτοις πολύ σύντομα μετά τις επανειλημμένες αναρροφήσεις η φυσιολογική κυκλική δραστηριότητα των ζώων αποκαθίσταται (McEnoy και συν. 2006).

Όπως προαναφέρθηκε, το σωματικό βάρος των αμνάδων της ομάδας X1 ήταν μεγαλύτερο από εκείνων της ομάδας X2 στην ηλικία των 4 και 5 μηνών. Αντίστοιχα, το μήκος της κερκίδας ήταν μεγαλύτερο στα ζώα της ομάδας X1 που ακτινογραφήθηκαν σε σχέση με εκείνα της X2 σε ηλικία 4, 6 και 8 μηνών. Είναι εύλογο να υποτεθεί ότι ο καθυστερημένος ρυθμός ανάπτυξης στα ζώα της ομάδας X2 σε σχέση με τα υπόλοιπα, επέδρασε και στην κατά μήκος αύξηση των οστών. Η τελευταία παρατήρηση στηρίζεται στην αριθμητικά σταθερή κατά μήκος αύξηση της κερκίδας των αμνάδων της ομάδας X2 μεταξύ διαδοχικών ακτινογραφήσεων σε αντίθεση με τις αμνάδες των ομάδων X1 και X5 στις οποίες η διαφορά της κατά μήκος αύξησης της κερκίδας μειωνόταν με την πρόοδο της ηλικίας. Σε ό,τι αφορά στην ακτινογραφική εξέταση των αμνάδων των ομάδων Φ1 και Φ2, το μήκος της κερκίδας αυξανόταν μέχρι την ηλικία των 10 μηνών, σταθεροποιούνταν από τον 12^ο μέχρι τον 14^ο μήνα, και στη συνέχεια και πάλι αυξανόταν μέχρι τον 18^ο μήνα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στο 75% των ζώων των ομάδων Φ1 και Φ2 η διαφορά στην κατά μήκος αύξηση της κερκίδας από τον 12^ο στον 14^ο μήνα ήταν μικρότερη του 1mm. Σύμφωνα με την έρευνα του Stubbs και συν. (1996)

εάν το μήκος της κερκίδας σε γάτες αυξηθεί λιγότερο από 1mm μέσα σε ένα μήνα τότε η επιφυσιακή γραμμή μπορεί να θεωρηθεί κλειστή ακόμη κι αν η ταινιοειδής διαύγαση του συζευκτικού χόνδρου είναι ακτινογραφικά ορατή (growth arrest).

Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης αυξανόταν σταδιακά στα ζώα που έδειξαν ανταπόκριση στην ορμονική αγωγή αλλά 24 ώρες μετά την αναρρόφηση των ωοθυλακίων μειωνόταν στα βασικά επίπεδα. Προηγούμενη έρευνα που έγινε σε ενήλικες προβατίνες έδειξε ότι όσα περισσότερα ωοθυλάκια αναρροφώνται τόσο γρηγορότερα μειώνεται η συγκέντρωση της οιστραδιόλης (Evans και συν. 2002). Σύμφωνα με τον Garrigus (1965) τα οιστρογόνα επισπεύδουν την οστεοποίηση των συζευκτικών χόνδρων καθώς πλησιάζει η ηλικία που φυσιολογικά θα οστεοποιούνταν. Στην παρούσα έρευνα δεν παρατηρήθηκε πλήρης σύγκλειση της περιφερικής επιφυσιακής γραμμής της κερκίδας μέχρι την ηλικία των 18 μηνών, παρότι σε δύο ζώα ήταν σχεδόν πλήρης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα προηγούμενης έρευνας κατά την οποία η σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών του μετακαρπίου θηλυκών προβάτων είχε επιτευχθεί σε ηλικία 557 ημερών (~18,5 μηνών) (Ho και συν. 1989). Επομένως, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η σύγκλειση της κάτω επιφυσιακής γραμμής της κερκίδας σε θηλυκά πρόβατα Καραγκούνικης φυλής μπορεί να ολοκληρωθεί από την ηλικία σχεδόν των 18 μηνών. Εντούτοις, στην έρευνα του Oberbauer και συν (1988) από την ηλικία των 480 ημερών η πλειονότητα των αμνάδων φυλής Suffolk x Dorset εμφάνισαν σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών του μετακαρπίου και είχαν αποκτήσει το ώριμο μήκος του οστού. Επιπλέον, έδειξαν ότι το 95% της ανάπτυξης του μετακαρπίου ολοκληρώνεται από την ηλικία των 171 ημερών αν και οι επιφυσιακές γραμμές παραμένουν ανοικτές για τουλάχιστον ακόμη 300 ημέρες. Σημειώνεται ότι στην παρούσα έρευνα το μήκος της κερκίδας δεν άλλαξε σημαντικά μεταξύ του 12^{ου} και 14^{ου} μήνα της ηλικίας ενώ κατά μέσο όρο αυξήθηκε επιπλέον 3,7% από τον 12^ο στον 18^ο μήνα. Θεωρώντας, λοιπόν, ότι το ώριμο μήκος της κερκίδας αποκτήθηκε από την ηλικία των 12 μηνών, το 95% της ανάπτυξής της είχε ολοκληρωθεί από την ηλικία των 8 μηνών. Τα παρόντα αποτελέσματα σε συνδυασμό με εκείνα προηγούμενης μελέτης της κατά μήκος αύξησης του μετακαρπίου (Oberbauer και συν. 1988), δηλώνουν ότι στα πρόβατα μετά από κάποια ηλικία, αναλόγως με τη φυλή και το φύλο, ο ρυθμός ανάπτυξης του αντιβραχίου διαχωρίζεται από τη σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών δηλώνοντας ότι οι ανοιχτές επιφυσιακές γραμμές δε συνοδεύονται απαραίτητα από περαιτέρω κατά μήκος αύξηση των οστών. Επιπλέον, φαίνεται ότι η εποχή της γέννησης, παρότι επηρεάζει το χρόνο ενήβωσης, δε συνδέεται με τη σκελετική ανάπτυξη και τη σύγκλειση των επιφυσιακών γραμμών αφού το μήκος

της κερκίδας μεταξύ των ζώων που γεννήθηκαν το χειμώνα και το φθινόπωρο δε διέφερε στην ηλικία των 6 και 8 μηνών. Συνεπώς, η ορμονική διέγερση των ωοθηκών και η αναρρόφηση των ωοθυλακίων δεν παρεμβαίνει στη σύγκλειση των επιφυσιικών γραμμών και στην απόκτηση ενός ώριμου μυοσκελετικού συστήματος ικανού και αναγκαίου για την υποστήριξη και τη διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας. Τελικά, μπορεί να υποστηριχθεί ότι οι αμνάδες Καραγκούνικης φυλής που γεννιούνται το χειμώνα μπορούν να γονιμοποιούνται με ασφάλεια αμέσως μετά την ενήβωσή τους, σε αναλογία με ό,τι έχει παρατηρηθεί σε αμνάδες φυλής Clun Forest (Dyrmondsson και Lees 1972), δίχως να επηρεάζεται αρνητικά η σωματική ανάπτυξή τους.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τόσο η ορμονική αγωγή διέγερσης των ωοθηκών όσο και η αναρρόφηση των ωοθυλακίων, ακόμη και αν εφαρμόζονται κατ' επανάληψη, δεν επηρεάζουν σημαντικά την ενδοκρινική κατάσταση και την αναπαραγωγική ικανότητα των αμνάδων. Αυτό αποδεικνύεται από το φυσιολογικό, τελικά, ρυθμό ανάπτυξης, τη φυσιολογική ενήβωση και την αναπαραγωγική απόδοση των αμνάδων που υποβάλλονται σε αναρροφήσεις ωοθυλακίων.

3.8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Μενεγάτος Ι, Δελγιάννης Κ, Λαϊνας Θ, Καλογιάννης Δ, Στοφόρος Ε, 1995: Η ετήσια ωοθηκική δραστηριότητα προβατίνων Καραγκούνικης φυλής. ΔΕΚΕ 46 113-119.

Abecia JA, Forcada F, Juniga O, 2001: Differences in reproductive performance, embryo development, interferon-tau secretion by the conceptus and luteal function in ewe lambs synchronized in oestrus before or after the spontaneous onset of luteal activity preceding puberty. *Reprod Dom Anim* 36 73-79.

Adam CL, Findlay PA, Kyle CE, Young P, 1998: Effect of restricted nutrition on timing of puberty in female Soay sheep. *J Reprod Fertil* 112 31-37.

Alberio R, Olivera J, Roche A, Alabart J, Folch J, 2002: Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. *Small Rumin Res* 46 81-87.

Amiridis GS, 1996: Effects of follicular aspiration on the bovine oestrous cycle. Phd Thesis, University of Glasgow, Glasgow.

Amiridis GS, Robertson L, Jeffcoate IA, Belibasaki S, Boyd JS, O'Shaughnessy PJ, 2000: Formation of a secondary corpus luteum after ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Acta Vet Hung* 48 193-198.

- Anel L, Sevillano C, Alvarez M, Alegre B, Anel E, Dominguez JC, Carbajo MT, De La Fuente J, 1997: Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. *Theriogenology* 47 152.
- Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR, 1997: Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9 333-339.
- Bagu ET, Madgwick S, Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DMW, Rawlings NC, 2004: Effects of treatment with LH or FSH from 4 to 8 weeks of age on the attainment of puberty in bull calves. *Theriogenology* 62 861-873.
- Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC, 2006: Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs. *Small Rumin Res* 63 189-198.
- Berardinelli JG, Dailey RA, Butcher RL, Inskeep EK, 1980: Source of circulating progesterone in prepubertal ewes. *Biol Reprod* 22 233-236.
- Bizelis JA, Deligeorgis SG, Rogdakis E, 1990: Puberty attainment and reproductive characteristics in ewe lambs of Chios and Karagouniki breeds raised on two planes of nutrition. *Anim Reprod Sci* 23 197-212.
- Brown RT, Brogliatti GM, Adams GP, 1996: Postpubertal fertility subsequent to repeated transvaginal oocyte collection in calves. *Theriogenology* 45 358.
- Chard T, 1990: Characteristics of Immunoassays – sensitivity. In: Burdon RH, van Knippenberg (eds). *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*. ELSEVIER, Amsterdam, the Netherlands, pp. 172-186.
- Chastant-Maillard S, Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier-Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard JP, 2003: Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction* 125 555-563.
- Dyrmundsson OR, Lees JL, 1972: Attainment of puberty and reproductive performance in Clun Forest ewe lambs. *J agric Sci Camb* 78 39-45.
- Ebling JFP, 2005: The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129 675-683.
- Evans ACO, Flynn JD, Duffy P, Knight PG, Boland MP, 2002: Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123 59-66.
- Fitzgerald J, Butler WR, 1982: Seasonal effects and hormonal patterns related to puberty in ewe lambs. *Biol Reprod* 27 853-863.

- Foster DL, 1981: Mechanism for delay of first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). *Biol Reprod* 25 85-92.
- Foster DL, 1983: Photoperiod and sexual maturation of the female lamb: early exposure to short days perturbs estradiol feedback inhibition of luteinizing hormone secretion and produces abnormal ovarian cycles. *Endocrinology* 112 11-17.
- Foster DL, 1984: Preovulatory gonadotropin surge system of prepubertal female sheep is exquisitely sensitive to the stimulatory feedback action of estradiol. *Endocrinology* 115 1186-1189.
- Foster DL, Ebling FJ, Claypool LE, 1988a: Timing of puberty by photoperiod. *Reprod Nutr Dev* 28 349-364.
- Foster DL, Ebling FJ, Claypool LE, Woodfill CJ, 1988b: Cessation of long day melatonin rhythms time puberty in a short day breeder. *Endocrinology* 123 1636-1641.
- Foster DL, Karsch FJ, 1975: Development of the mechanism regulating the preovulatory surge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 97 1205-1209.
- Foster DL, Ryan KD, 1979: Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. *Endocrinology* 105 896-904.
- Foster DL, Ryan KD, 1981a: Endocrine mechanisms governing transition into adulthood in female sheep. *J Reprod Fertil* 30 (Suppl) 75-90.
- Foster DL, Ryan KD, 1981b: Premature seasonal inhibition of tonic LH secretion by oestradiol in the female lamb and its consequences. *J Reprod Fertil* 63 289-294.
- Foster DL, Ryan KD, Goodman RL, Legan SJ, Karsch FJ, Yellon SM, 1986: Delayed puberty in lambs chronically treated with oestradiol. *J Reprod Fertil* 78 111-117.
- Foster DL, Ryan KD, Papkoff H, 1984: Hourly administration of luteinizing hormone induces ovulation in prepubertal female sheep. *Endocrinology* 115 1179-1185.
- Foster DL, Yellon SM, Olster DH, 1985: Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *J Reprod Fertil* 75 327-344.
- Garrigus US, 1965: Influence of diethylstilbestrol on feed utilization and carcass merit in lambs. *Univ of Illinois, Urbana*, p 1.
- Garverick HA, Zollers Jr WG, Smith MF, 1992: Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in

animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci* 28 111-124.

Gustafsson PO, Beling CG, 1969: Estradiol-induced changes in beagle pups: effect of prenatal and postnatal administration. *Endocrinology* 85 481-491.

Helliwell RJA, Wallace JM, Aitken RP, Racey PA, Robinson JJ, 1997: The effect of prenatal photoperiodic history on the postnatal endocrine status of female lambs. *Anim Reprod Sci* 47 303-314.

Herbosa CG, Wood RI, I'Anson H, Foster DL, 1994: Prenatal photoperiod and the timing of puberty in the female lamb. *Biol Reprod* 50 1367-1376.

Ho L, Field RA, Russell WC, Riley ML, Ercanbrack SK, Williams FL Jr, 1989: Influence of gender, breed and age on maturity characteristics of sheep. *J Anim Sci* 67 2460-2470.

Huffman LJ, Inskeep EK, Goodman RL, 1987: Changes in episodic luteinizing hormone secretion leading to puberty in the lamb. *Biol Reprod* 37 755-761.

I'Anson H, Legan SJ, 1988: Does the first LH surge of the breeding season initiate the first full-length cycle in the ewe? *J Reprod Fertil* 82 761-767.

I'Anson H, Terry SK, Lehman MN, Foster DL, 1997: Regional differences in the distribution of gonadotropin-releasing hormone cells between rapidly growing and growth-restricted prepubertal female sheep. *Endocrinology* 138 230-236.

Keisler DH, Inskeep EK, Dailey RA, 1983: First luteal tissue in ewe lambs: influence on subsequent ovarian activity and response to hysterectomy. *J Anim Sci* 57 150-156.

Keisler DH, Inskeep EK, Dailey RA, 1985: Roles of pattern of secretion of luteinizing hormone and the ovary in attainment of puberty in ewes lambs. *Dom Anim Endocrinol* 2 123-132.

Kelly JM, Kleemann DO, Walker SK, 2005: Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology* 63 1876-1890.

Kinder JE, Bergfeld EG, Wehrman ME, Peters KE, Kojima FN, 1995: Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 49 393-407.

Kruip Th.A.M., Boni R., Wurth Y.A., Roelofsen M.W.M., Pieterse M.C., 1994: Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42 675-684.

Lewis AW, Berardinelli JG, 2001: Gross anatomical and histomorphometric characteristics of the oviduct and uterus during the pubertal transition in sheep. *J Anim Sci* 79 167-175.

- Lloyd HM, Meares JD, Jacobi J, Thomas FJ, 1971: Effects of stilboestrol on growth hormone secretion and pituitary cell proliferation in the male rat. *J Endocrinol* 51 473-481.
- Looney CR, Damiani P, Lindsey BR, Long CR, 1995: Use of prepuberal heifers as oocyte donors for IVF: effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology* 43 269.
- McEvoy TG, Thompson H, Dolman DF, Watt RG, Reis A, Staines ME, 2002: Effects of epidural injections and transvaginal aspiration of ovarian follicles in heifers used repeatedly for ultrasound-guided retrieval of ova and embryo production. *Vet Rec* 151 653-658.
- McEvoy TG, Alink FM, Moreira VC, Watt RG, Powell KA, 2006: Embryo technologies and animal health - consequences for the animal following ovum pick-up, *in vitro* embryo production and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 65 926-942.
- McNatty KP, Isaacs KL, Gentle L, Berry L, Hudson NL, Young W, McLeod BJ, 1998: Bioactive and immunoreactive FSH concentrations in ewe and ram lambs over the first year of life. *Anim Reprod Sci* 51 155-166.
- Meikle A, Tasende C, Garofalo EG, Forsberg M, 1998: Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. *Anim Reprod Sci* 54 75-85.
- O'Riordan EG, Hanrahan JP, 1989: Advancing first estrus in ewe lambs. *Farm Food Res* 20 25-27.
- Oberbauer AM, Krook L, Hogue DE, Currie WB, Thonney ML, 1988: Dietary calcium and metacarpal growth in ewes. *J Nutr* 118 976-981.
- Padmanabhan V, Mieber CD, Borondy M, l'Anson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL, Beitins IZ, 1992: Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 131 213-220.
- Pappa-Michailidou V, Avdi M, Zafrakas A, Alifakiotis T, 1999: Prepubertal plasma FSH concentrations and their relationship with reproductive performance in three Greek breeds of sheep. *Small Rumin Res* 33 37-41.
- Petyim S, Bage R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B, 2000: The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47 627-640.
- Petyim S, Bage R, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B, 2001: Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48 449-463.

Petyim S, Bage R, Hallap T, Bergqvist AS, Rodriguez-Martinez H, Larsson B, 2003: Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology* 60 175-188.

Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X, 1997: Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* 56 386-392.

Quirke JF, 1979: Effect of body weight on the attainment of puberty and reproductive performance of Galway and Fin-galway female lambs. *Animal Prod* 28 297-307.

Ryan KD, Goodman RL, Karsch FJ, Legan SJ, Foster DL, 1991: Patterns of circulating gonadotropins and ovarian steroids during the first periovulatory period in the developing sheep. *Biol Reprod* 45 471-477.

Salmeri KR, Bloomberg MS, Scruggs SL, Shille V, 1991a: Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical, and behavioral development. *J Am Vet Med Assoc* 198 1193-1203.

Salmeri KR, Olson PN, Bloomberg MS, 1991b: Elective gonadectomy in dogs: a review. *J Am Vet Med Assoc* 198 1183-1192.

Santiago Moreno J, Gomez Brunet A, Gonzalez de Bulnes A, Villar D, Lopez Sebastian A, 2000: Attainment of puberty in the European Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and the domestic manchega ewe (*Ovis aries*). *Reprod Dom Anim* 35 49-52.

Schneider JE, Zhou D, Blum RM, 2000: Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm Behav* 37 306-326.

Senger PL, 2003: Puberty. In: Senger PL (ed). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions, Inc. WA, USA. pp 128-143.

Smith MF, Burrell WC, Broadway J, Wiltbank JN, 1979: Estrus and pregnancy in beef heifers following use of the synchro-mate-B treatment (SMB)¹². *Theriogenology* 12 183-195.

Snel-Oliveira MV, Tury E, Pereira DC, Malagoli JrD, Nascimento NV, Santos ES, Rumpf R, 2002: Histopathological lesions in the ovaries after ultrasound guided transvaginal ovum pick up (OPU) in Nelore prepubertal calves. *Theriogenology* 57 687.

Stubbings RB, Walton JS, 1995: Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 43 705-712.

Stubbs WP, Bloomberg MS, Scruggs SL, Shille VM, Lane TJ, 1996: Effects of prepubertal gonadectomy on physical and behavioral development in cats. *J Am Vet Med Assoc* 209 1864-1871.

Sumbung FP, Williamson P, Carson RS, 1987: Response of prepubertal ewes primed with monensin or progesterone to administration of FSH. *J Reprod Fertil* 81 317-325.

Takeva Z, Georgieva R, Bulahbel S, Georgiev H, 1997: The interstitial gland of ovary of ewes from birth to sexual maturity. *Anim Reprod Sci* 48 235-246.

Trounson AO, Willadsen SM, Moor RM, 1977: Reproductive function in prepubertal lambs: ovulation, embryo development and ovarian steroidogenesis. *J Reprod Fertil* 49 69-75.

Van Sickle DC, 1985: Control of bone growth. *J Anim Sci* 61 (Suppl. 2) 76.

Whyman D, 1978: Oestrous and ovarian responses to exogenous progesterone and oestrogen in prepubertal ewe lambs in relation to the fecundity of their dams. *J Reprod Fertil* 53 323-330.

Yellon SM, Foster DL, 1985: Alternate photoperiods time puberty in the female lamb. *Endocrinology* 116 2090-2097.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

**Πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ωοθήκων στην
πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων με βάση
τη συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β**

Ο πειραματισμός αυτός έχει υποβληθεί για κρίση σε διεθνές περιοδικό

Oestradiol concentration as a predictor of ovarian response

in FSH stimulated ewe-lambs

Valasi I, Leontides L, Menegatos I and Amiridis GS

4.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε να γίνει πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων (ΠΠΑΩ) με γνώμονα τη συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β (E2) στον ορό του αίματος. Χρησιμοποιήθηκαν 37 αμνάδες οι οποίες υποβλήθηκαν σε αναρρόφηση των ωοθυλακίων (OPU) στην ηλικία των 8 έως 20 εβδομάδων. Πριν από την OPU εφαρμοζόταν ορμονική αγωγή που απαρτιζόταν από διπλή χορήγηση προγεστερόνης και έξι διαδοχικές χορηγήσεις FSH. Η συγκέντρωση της E2 προσδιορίστηκε σε δείγματα αίματος που συλλέγονταν πριν από την κάθε χορήγηση FSH και πριν από την OPU. Κατά τη λαπαροσκοπική παρατήρηση των ωοθηκών γινόταν καταγραφή του αριθμού και της διαμέτρου των εμφανών ωοθυλακίων. Η ανταπόκριση των ωοθηκών χαρακτηρίστηκε ως καλή όταν παρατηρούνταν ≥ 6 μεγάλα ωοθυλάκια διαμέτρου >2 mm (ομάδα A1), ως μέτρια όταν παρατηρούνταν 2 έως 5 μεγάλα ωοθυλάκια (A2) και ως φτωχή όταν ο αριθμός των μεγάλων ωοθυλακίων ήταν ≤ 1 (A3). Η συγκέντρωση της E2 ήταν μεγαλύτερη ($p<0,05$) στην ομάδα A1 σε σχέση με την A3 πριν από τη 2^η, 3^η, 4^η, 5^η και 6^η χορήγηση FSH καθώς και πριν από τη διενέργεια της OPU. Επίσης, ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα A1 σε σχέση με την A2 πριν από την 6^η έγχυση FSH και αμέσως πριν από την OPU ($p<0,05$). Το μοντέλο λογιστικής ανάλυσης παλινδρόμησης, με βάση τη συγκέντρωση της E2 τη χρονική στιγμή 6 (6^η χορήγηση FSH) προέβλεψε σωστά το 100% των ζώων που δε θα εμφάνιζαν καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων. Τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο προσδιορισμός της E2 στον ορό του αίματος 12 ώρες πριν τη διενέργεια της OPU μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο πρόβλεψης των καλών αμνάδων-δοτριών ωαρίων. Μελετώντας τη διακύμανση της συγκέντρωσης της E2 κατά τη διάρκεια της ορμονικής αγωγής οι αμνάδες που δεν πρόκειται να ανταποκριθούν σε αυτή μπορούν να εντοπισθούν 12 ώρες μετά την πρώτη χορήγηση FSH.

4.2 ABSTRACT

In the present study the oestradiol concentration was used as a predictor of ovarian response in stimulated lambs. Thirty-seven lambs aging 8-20 weeks were used as oocyte donors. Prior to laparoscopic follicular aspiration (OPU) lambs were treated twice with progesterone followed by 6 sequential injections of FSH. Oestradiol-17β (E2) concentration was assessed in blood samples collected before each FSH injection and

OPU. Ovarian response was characterized as good when ≥ 6 large follicles with diameter >2 mm were recorded (group A1), as moderate when the number of large follicles was 2-5 (A2) and as poor when the number of large follicles was ≤ 1 (A3). Oestradiol concentration was higher ($p < 0.05$) in group A1 compared with A3 before the 2nd, 3rd, 4th, 5th and 6th FSH injection and just before the OPU. E2 was also higher in group A1 compared with A2 12 hours before and at the time of OPU ($p < 0.05$). Using as predictor the E2 concentration of the sample collected before the 6th FSH injection all lambs with moderate and poor ovarian response could be detected. Lambs exhibiting poor ovarian response could be detected on the basis of differentiation of E2 concentration between the first two blood samples.

4.3 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αποδείχθηκε ότι οι νεαρές δότριες ωαρίων μπορούν να χρησιμοποιούνται επανειλημμένως δίχως να επηρεάζεται η μετέπειτα αναπαραγωγική ικανότητά τους.

Ο σημαντικότερος περιοριστικός παράγοντας στην εφαρμογή των προγραμμάτων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η παραλλακτικότητα και η αδυναμία πρόβλεψης της ανταπόκρισης των ωοθηκών στην ορμονική αγωγή διέγερσης τόσο σε άνηθα όσο και σε ενήλικα ζώα. Η ανταπόκριση των ωοθηκών αμνάδων στην ορμονική αγωγή διέγερσης της ανάπτυξης των ωοθυλακίων ποικίλλει ανάλογα με τη φυλή, την ηλικία, το άτομο (γενετικό υπόβαθρο) και την ορμονική αγωγή (Sonjaya και Driancourt 1987, Ptak και συν. 1999, 2003). Ο πληθυσμός και η διάμετρος των ωοθυλακίων αμέσως πριν από την έναρξη της ορμονικής αγωγής έχει συσχετισθεί με την ανταπόκριση των ωοθηκών σε αμνάδες (Sonjaya και Driancourt 1987, Armstrong και συν. 1997, Meikle και συν. 1998), άνηβες μοσχίδες (Revel και συν. 1995, Armstrong και συν. 1997, Taneja και συν. 2000), προβατίνες (Driancourt 1987, Cognié 1999, Lopez Sebastian και συν. 1999, Gonzalez-Bulnes και συν. 2000, 2002a, b, 2003) και αίγες (Gonzalez-Bulnes και συν. 2004). Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη διακύμανση της ανταπόκρισης των ωοθηκών είναι η διατροφή (O'Callaghan και συν. 2000), το στάδιο του οιστρικού κύκλου (Rubianes και συν. 1997, Gonzalez-Bulnes και συν. 2002c, Menchaca και συν. 2002, Rubianes και Menchaca 2003), η δόση της χορηγούμενης ορμόνης (Samartzi και συν. 1995a, b), η εποχή του έτους (ένοιστρη, άνοιστρη) (Bister και συν. 1999) και η καθαρότητα του ορμονικού σκευάσματος ιδιαίτερα σε σχέση με την περιεκτικότητα σε LH (Murphy και συν. 1984, Cognié 1999).

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε ακραία αποτελέσματα που ποικίλλουν, από παντελή απουσία ανάπτυξης ωοθυλακίων (Samartzi και συν. 1995a, b, Boscos και συν. 1997, Ptak και συν. 1999, 2003, Amiridis και συν. 2002) μέχρι και υπερβολική ανάπτυξη αυτών, γεγονός το οποίο τελικά μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των ωαρίων που συλλέγονται (Moor και συν. 1985, Foote και Ellington 1988).

Ο βαθμός ανταπόκρισης στην αγωγή της πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιόρρηξίας σε προβατίνες είναι δυνατό να καταγραφεί με τακτικές απεικονίσεις των ωοθηκών με υπερηχογραφία δια μέσου του απευθυσμένου. Η μέθοδος αυτή μπορεί να δώσει πληροφορίες για το εάν η κατάσταση των ωοθηκών πριν από την έναρξη της ορμονικής αγωγής διέγερσης θα μπορούσε να συσχετισθεί με την τελική ανταπόκρισή τους στην αγωγή (Rubianes και συν. 1997, Lopez Sebastian και συν. 1999, Gonzalez-Bulnes και συν. 2002b, 2004). Θεωρητικά, η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε αμνάδες διότι η εκτίμηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων είναι εφικτή καθ' όλη τη διάρκεια της άνηβης ζωής τους (Bartlewski και συν. 2006). Ωστόσο, η υπερηχογραφία εκτός του ότι είναι ιδιαίτερα επώδυνη για τα ζώα (εξαιτίας ανατομικών λόγων) και υποβάλλει τις αμνάδες σε έντονη καταπόνηση, έχει ως βασικό μειονέκτημα την αδυναμία διαχωρισμού των ατρητικών από τα υγιή ωοθυλάκια (Rubianes και συν. 1997, Gonzalez-Bulnes και συν. 2002b).

Μια εναλλακτική μέθοδος επιλογής των αμνάδων-δοτριών ωαρίων θα μπορούσε να είναι η συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β στον ορό του αίματος. Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β είναι δείκτης της 'υγείας' των ωοθυλακίων (Campbell και συν. 1995) και καθορίζει το δείκτη ωοθυλακιόρρηξιων (αριθμός προωοθυλακιόρρηκτικών ωοθυλακίων) (Baird και συν. 1991). Η αγωγή με γοναδοτροπίνες ενεργοποιεί το ενζυμικό σύστημα της αρωματάσης των κοκκωδών κυττάρων αυξάνοντας έτσι την παραγωγή οιστραδιόλης (McNeilly και συν. 1991). Οι μηχανισμοί παραγωγής οιστρογόνων από τα ωοθυλάκια των αμνάδων μετά από χορήγηση γοναδοτροπινών δε διαφέρουν από αυτούς των ενηλίκων προβατίνων (Trownson και συν. 1977, Worthington και Kennedy 1979, Tassell και Kennedy 1980). Ωστόσο, τα γρααφιανά ωοθυλάκια των αμνάδων δεν ανταποκρίνονται στις εξωγενείς γοναδοτροπίνες μέχρι την ηλικία των 2 με 4 εβδομάδων (Mansour 1959). Ο ηλικιακός αυτός περιορισμός ισχύει διότι τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων των αμνάδων αναπτύσσονται επαρκώς μετά τις 2 έως 4 εβδομάδες (Kennedy και συν. 1974).

Η παγκοσμίως πλέον αποδεκτή ηθική της χρησιμοποίησης πειραματόζων επιβάλλει κάθε πειραματισμός να χρησιμοποιεί τον ελάχιστο αριθμό ζώων και τα ζώα

αυτά να υφίστανται την ελάχιστη δυνατή καταπόνηση. Ο παρών πειραματισμός σχεδιάστηκε με γνώμονα τα παραπάνω. Επιχειρήθηκε να προβλεφθεί η αντίδραση στην πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων (ΠΠΑΩ) με βάση τη συγκέντρωση της E2 σε διάφορα στάδια της αγωγής. Με τον τρόπο αυτό ζώα που δεν αντιδρούν στην ορμονική αγωγή δε θα υποβάλλονται σε άσκοπους χειρισμούς.

4.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.4.1 Πειραματόζωα και ορμονική αγωγή

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 37 αμνάδες Καραγκούνικης φυλής ηλικίας 8 έως 20 εβδομάδων. Σ' όλες τις αμνάδες εφαρμόστηκε το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο ορμονικής αγωγής και OPU που περιγράφεται στο κεφάλαιο II (ομάδα ΜΣ, Πίνακας 2.1, Διάγραμμα 2.1). Κατά το χρόνο της λαπαροσκοπικής παρατήρησης των ωοθηκών καταγράφηκε ο αριθμός και η διάμετρος των εμφανών ωοθυλακίων. Η κατάταξη των καταγεγραμμένων ωοθυλακίων έγινε με βάση τη θετική συσχέτιση της διαμέτρου με την ικανότητα ανάπτυξης των περιεχομένων ωαρίων *in vitro*: ως μικρά εκείνα με ≤ 2 mm και ως μεγάλα εκείνα με >2 mm διάμετρο (Ledda και συν. 1999). Η αναρρόφηση των ωοθυλακίων και η εκτίμηση της ποιότητας των συλλεχθέντων ωαρίων έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο II (2.4.2 και 2.4.3, αντίστοιχα). Ο πειραματισμός του τμήματος αυτού διενεργήθηκε στην Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ. και στο Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Παλαμά Καρδίτσας.

Με βάση τον αριθμό των μεγάλων ωοθυλακίων, οι αμνάδες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: την ομάδα A1 (καλή ανταπόκριση, αριθμός μεγάλων ωοθυλακίων ≥ 6), την A2 (μέτρια ανταπόκριση, αριθμός μεγάλων ωοθυλακίων 2 έως 5) και την A3 (απουσία ανταπόκρισης, αριθμός μεγάλων ωοθυλακίων ≤ 1).

Δείγματα αίματος συλλέγονταν πριν από την κάθε χορήγηση FSH και πριν από την OPU (κάθε δώδεκα ώρες, $n=7$). Τα δείγματα αίματος αφήνονταν να πήξουν σε θερμοκρασία 4°C, και ο ορός αποθηκευόταν στους -20°C έως τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης.

4.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης οιστραδιόλης-17β

Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης-17β (οιστραδιόλη ή E2) στον ορό του αίματος προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ραδιοανοσολογική μέθοδο στερεής φάσης (solid-

phase) με ιχνηθέτη το ^{125}I (RIA) (Spectria®, Orion Diagnostica Oy, Espoo, Φινλανδία) όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο III (3.4.5).

4.5 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το SAS έκδοση 8 (Cary, North Carolina, USA). Η εκτίμηση της σημαντικότητας διενεργήθηκε στο επίπεδο 5%.

Οι διάμεσες τιμές του αριθμού των μεγάλων ωοθυλακίων συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων A1, A2 και A3 με τη δοκιμή Kruskal-Wallis. Οι πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων έγιναν με τη δοκιμή Mann-Whitney και εκτιμήθηκαν ως σημαντικές με προσαρμογή της κρίσιμης τιμής p με τη μέθοδο Bonferroni. Οι διάμεσες τιμές του αριθμού των συλλεχθέντων ωαρίων συγκρίθηκαν με τη δοκιμή Mann-Whitney μόνο μεταξύ των ομάδων A1 και A2 διότι οι αμνάδες της ομάδας A3 δεν υποβλήθηκαν σε OPU λόγω της απουσίας ανάπτυξης ωοθυλακίων. Η ποιότητα των συλλεχθέντων ωαρίων και το ποσοστό συλλογής αυτών (αριθμός αναρροφηθέντων/ αριθμός συλλεχθέντων ωαρίων %) μεταξύ των ομάδων A1 και A2 συγκρίθηκαν με τη δοκιμή χ^2 του Pearson.

Οι μέσοι όροι της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων A1, A2 και A3 με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης για επανειλημμένες μετρήσεις στο λογισμικό PROC MIXED. Στις συγκρίσεις αυτές η ομάδα ήταν ο παράγοντας μεταξύ των μετρήσεων οιστραδιόλης στα ζώα, ενώ ο χρόνος (1 έως 7) ήταν ο παράγοντας εντός των μετρήσεων οιστραδιόλης στα ίδια ζώα. Σε αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό, ο οποίος είναι παραγοντικός με επανειλημμένες μετρήσεις, το αναλυτικό ενδιαφέρον εστιάζεται στο κατά πόσο οι μέσοι όροι της οιστραδιόλης μεταβάλλονταν με τον χρόνο και στο κατά πόσο οι μεταξύ των ομάδων διαφορές των μέσων όρων οιστραδιόλης μεταβάλλονταν με τον χρόνο. Αρχικά, αναλύθηκαν μοντέλα με διαφορετικές μορφές συγκρότησης της συνδιακύμανσης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η μορφή της σύνθετης συμμετρίας, του πρώτου βαθμού αυτο-συσχετισμού και η ασυγκρότητα μορφή. Η απόφαση ως προς το ποια μορφή συγκρότησης είχε την καλύτερη προσαρμογή στα δεδομένα βασίστηκε στη μεγαλύτερη τιμή του κριτηρίου του Akaike. Ακολούθως, οι πολλαπλές ανά δύο συγκρίσεις έγιναν με τις κατάλληλες εντολές CONTRAST.

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Testart και συν. 1977, Gonzalez-Bulnes και συν. 2003) και τα αποτελέσματα των προηγούμενων συγκρίσεων των μέσων όρων της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης μεταξύ των ομάδων A1, A2 και A3, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο λογιστικής ανάλυσης παλινδρόμησης που προβλέπει εάν μία αμνάδα θα

παρουσιάσει ή δε θα παρουσιάσει καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων τη χρονική στιγμή 6 (12 ώρες πριν από τη διενέργεια OPU). Η προγνωστική αξία του μοντέλου εκτιμήθηκε εφαρμόζοντας τη διαδικασία σε μέρος των δειγμάτων. Για την ανάπτυξη του μοντέλου επιλέχθηκε τυχαία και χρησιμοποιήθηκε το 75% (n=28) των αποτελεσμάτων (Dohoo και συν. 2003). Οι προϋποθέσεις του μοντέλου ελέγχθηκαν σύμφωνα με τους Hosmer και Lemeshow (1989). Το μοντέλο που αναπτύχθηκε, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για να υπολογισθεί η πιθανότητα που έχει καθένα από τα υπόλοιπα 9 ζώα να ανταποκρίνεται καλά στην ορμονική αγωγή (ανάπτυξη ≥ 6 μεγάλων ωοθυλακίων). Τα ζώα των οποίων η πιθανότητα ήταν $<0,5$ κατηγοριοποιήθηκαν ως μη ανταποκρινόμενα ενώ εκείνα με πιθανότητα $\geq 0,5$ ως ανταποκρινόμενα. Οι προβλεπόμενες συχνότητες ανταποκρινόμενων και μη ζώων συγκρίθηκαν με τις ήδη παρατηρημένες με τη δοκιμή συμμετρίας του Mc Nemar.

4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά τη λαπαροσκοπική παρατήρηση η διάμεσος τιμή του αριθμού των μεγάλων ωοθυλακίων ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα A1 σε σχέση με την A2 και A3, όπως επίσης στην A2 σε σχέση με την A3 (διάμεσος και εύρος: 11 και 6-24, 5 και 2-6, 0 και 0-1 για τις ομάδες A1, A2, A3, αντίστοιχα, $p<0,0001$) (Διάγραμμα 4.1α). Η διάμεσος τιμή του αριθμού των συλλεχθέντων ωαρίων ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα A1 από ότι στην A2 (διάμεσος και εύρος: 5 και 1-11, 2 και 1-6, αντίστοιχα, $p=0,01$). Η ποιότητα των συλλεχθέντων ωαρίων δε διέφερε μεταξύ των ομάδων A1 και A2 ($p=0,208$) (ωάρια ποιότητας A και B/ συνολικός αριθμός συλλεχθέντων ωαρίων: 23/81, 4/26, αντίστοιχα).

Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης ο ένδο-συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν $0,890 \pm 0,094$, δηλαδή 10,562% για το δείγμα της χαμηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης (n=10), και $14,545 \pm 0,772$, δηλαδή 5,308% για το δείγμα της υψηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης (n=10). Ο μεταξύ των μετρήσεων συντελεστής παραλλακτικότητας ήταν $0,914 \pm 0,130$, δηλαδή 14,23% για το δείγμα της χαμηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης (n=20), και $14,685 \pm 0,827$, δηλαδή 5,63% για το δείγμα της υψηλής συγκέντρωσης οιστραδιόλης (n=20). Η ειδικότητα της μεθόδου (διασταυρούμενη αντίδραση με διάφορα στεροειδή) ορίζεται από τον κατασκευαστή (Πίνακας 3.1, σελ. 126).

Τη χρονική στιγμή 1(1^η FSH) οι μέσοι όροι της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης των ομάδων A2 και A1, A3 και A1, δε διέφεραν ενώ ο μέσος όρος της A2 ήταν μεγαλύτερος ($p=0,036$) από αυτόν της A3. Για τις ακόλουθες χρονικές στιγμές οι μέσοι όροι της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης διαμορφώθηκαν ως ακολούθως:

2^η FSH: μέσος όρος A2 > μέσο όρο A3 ($p=0,002$),

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A3 ($p=0,007$),

μέσος όρος A2 = μέσο όρο A1

3^η FSH: μέσος όρος A2 = μέσο όρο A3,

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A3 ($p=0,017$),

μέσος όρος A2 = μέσο όρο A1

4^η FSH: μέσος όρος A2 = μέσο όρο A3,

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A3 ($p=0,013$),

μέσος όρος A2 = μέσο όρο A1

5^η FSH: μέσος όρος A2 = μέσο όρο A3,

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A3 ($p=0,015$),

μέσος όρος A2 = μέσο όρο A1

6^η FSH: μέσος όρος A2 = μέσο όρο A3,

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A3 ($p=0,0008$),

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A2 ($p=0,0011$)

OPU: μέσος όρος A2 = μέσο όρο A3,

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A3 ($p=0,0007$),

μέσος όρος A1 > μέσο όρο A2 ($p=0,0018$) (Διάγραμμα 4.1β).

Το μοντέλο λογιστικής ανάλυσης παλινδρόμησης ήταν:

$$\ln \left[\frac{P(A1)}{1 - P(A1)} \right] = - 7,44 (3,52) + 2,4 (1,22) \cdot E2_{time6}$$

όπου ln: φυσικός λογάριθμος

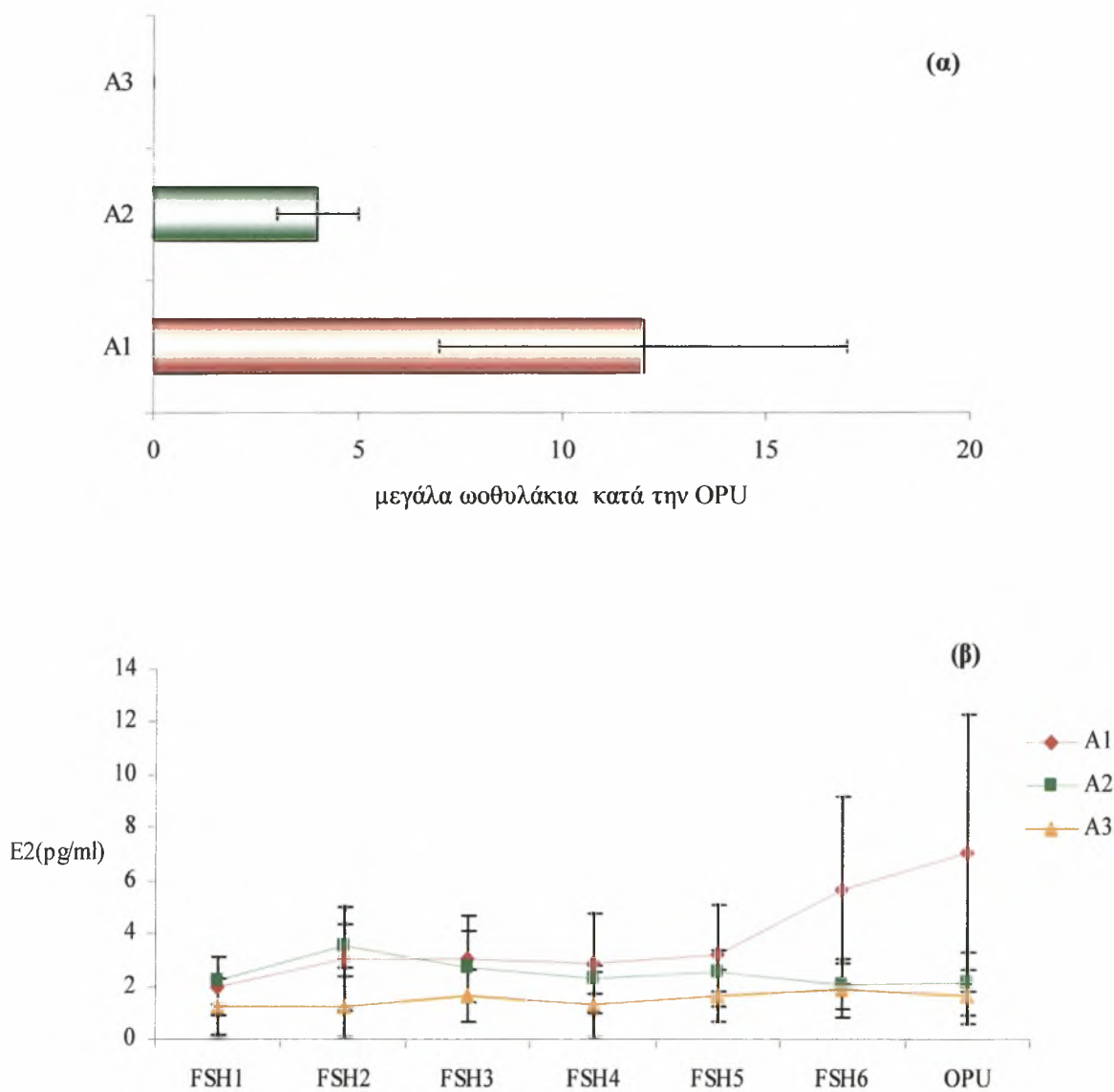
P: πιθανότητα

A1: αμνάδα με καλή ανταπόκριση στην ορμονική αγωγή

$E2_{time6}$: η συγκέντρωση της $E2$ τη χρονική στιγμή 6 (FSH6)

Το παραπάνω μοντέλο πρόβλεψε σωστά 5 από τα 5 ζώα που δεν ανήκαν στην ομάδα A1 και 3 από τα 4 ζώα που ανήκαν στην ομάδα A1 (Mc Nemar's $\chi^2=1$, $p=0,32$).

Διάγραμμα 4.1: Κατανομή (μέσος όρος±τυπική απόκλιση) της συγκέντρωσης της E2 πριν από την κάθε χορήγηση FSH και πριν από την OPU (κάθε 12 ώρες) μεταξύ των ομάδων A1 (καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων), A2 (μέτρια ανάπτυξη ωοθυλακίων) και A3 (απουσία ανάπτυξης ωοθυλακίων).



Σημείωση: η συγκέντρωση της E2 είναι μεγαλύτερη ($p<0,05$) στην ομάδα A1 σε σχέση με την A2 τις χρονικές στιγμές 6 (FSH6) και 7 (OPU) και σε σχέση με την A3 σε όλες, εκτός της 1^{ης} (FSH1), χρονικές στιγμές

4.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα είναι η πρώτη διεθνώς στην οποία αναδεικνύεται η αξία της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης ως εργαλείου πρόβλεψης της ανταπόκρισης των ωοθηκών των αμνάδων στην αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων. Πρωταρχικό ενδιαφέρον της έρευνας ήταν η εντόπιση των καλών δοτριών ωαρίων. Παράλληλα όμως ενδιαφέρον παρουσίασε η πρόκληση των κακών δοτριών. Με τον τρόπο αυτό θα αποφεύγονταν οικονομικές δαπάνες και επιπλέον συγκεκριμένα πειραματόζωα δε θα υποβάλλονταν σε άσκοπους και αναποτελεσματικούς χειρισμούς. Ως καλές αμνάδες-δότριες ωαρίων ορίστηκαν όσες εμφάνισαν κατά το χρόνο της OPU ≥ 6 μεγάλα ωοθυλάκια μεγέθους >2 mm, ενώ ως κακές αυτές στις οποίες δεν αναπτύχθηκαν μεγάλα ωοθυλάκια (≤ 1). Επιλέχθηκαν τα ωοθυλάκια της αναφερθείσας διαμέτρου επειδή αφενός μπορούν να αναρροφηθούν, αλλά κυρίως γιατί τα ωάρια που προέρχονται από τα μεγάλης διαμέτρου ωοθυλάκια αναπτύσσονται καλύτερα *in vitro* (Moog και Trounson 1977, Cognié 1999, Ledda και συν. 1999, Mermillod και συν. 1999).

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επιβεβαιώνουν ότι η διακύμανση και η παραλλακτικότητα της ανταπόκρισης των ωοθηκών των αμνάδων στην ΠΠΑΩ αποτελεί ίσως το σημαντικότερο περιοριστικό παράγοντα στην εφαρμογή τέτοιων χειρισμών. Έχει αποδειχθεί ότι πέραν της ηλικίας και του πρωτοκόλλου ορμονικής αγωγής, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων επηρεάζεται κυρίως από το άτομο (γενότυπος) (Ptak και συν. 2003). Εντούτοις, παρότι επιβεβαιώθηκε η εξάρτηση της ανταπόκρισης της ωοθήκης από το άτομο (κεφάλαιο II) προσδιορίστηκε επίσης ότι η μειωμένη ανάπτυξη ωοθυλακίων σε συγκεκριμένες ηλικίες μπορεί να βελτιωθεί αυξάνοντας την χρησιμοποιούμενη δόση της FSH. Στην παρούσα έρευνα όπου χρησιμοποιήθηκε η ίδια δόση FSH ανεξαρτήτως ηλικίας, το 27,03% (10/37) των αμνάδων παρουσίασε μέτρια αντίδραση στην ορμονική αγωγή, ενώ επίσης το ίδιο ποσοστό των αμνάδων δεν αντέδρασαν σχεδόν καθόλου. Σε ό,τι αφορά στις αμνάδες που εμφάνισαν καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων στο τέλος της ορμονικής αγωγής (45,94%), η συγκέντρωση της οιστραδιόλης κατά την έναρξη της αγωγής δεν ήταν δυνατό να προβλέψει την τελική αντίδραση των ωοθηκών. Σε αυτές τις αμνάδες η συγκέντρωση της οιστραδιόλης άρχισε να αυξάνει σταδιακά 12 ώρες μετά την 1^η χορήγηση FSH παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή στο χρόνο διενέργειας της OPU. Ομοίως, βρέθηκε ότι η χορήγηση PMSG σε μοσχίδες προκαλεί αύξηση στη συγκέντρωση της οιστραδιόλης 24 ώρες αργότερα, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα της ορμόνης ανιχνεύονται κατά την προωοθυλακιορρηκτική

έκκριση των γοναδοτροπινών (Testart και συν. 1977). Επίσης, στην προηγούμενη μελέτη παρατηρήθηκε ποσοτική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης και του αριθμού των προωθυλακιωρρηκτικών ωοθυλακίων. Εξάλλου, σε προβατίνες φυλής Χίου που υπέστησαν ορμονική αγωγή με σπόγγο και PMSG ή εμφύτευμα και PMSG, η υψηλότερη συγκέντρωση οιστραδιόλης παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο 21 ώρες μετά το πέρας της αγωγής και 37 ή 12 ώρες πριν από την προωθυλακιωρρηκτική έκκριση της LH, αντίστοιχα (Menegatos και συν. 2003).

Το κύριο εύρημα της μελέτης αυτής αποτελεί το ότι, με γνώμονα τη συγκέντρωση της E2 12 ώρες πριν από τη διενέργεια της OPU, είναι εφικτή η απόλυτη πρόβλεψη των ζώων που θα εμφανίσουν μέτρια ή καμία ανάπτυξη ωοθυλακίων. Σύμφωνα με τους Gonzalez-Bulnes και συν. (2003), στις ενήλικες προβατίνες η συγκέντρωση της οιστραδιόλης 12 ώρες πριν από τον οίστρο, κατά τη διάρκεια και 24 ώρες μετά από αυτόν είναι ενδεικτική του πληθυσμού των υγιών ωοθυλακίων. Στην παρούσα έρευνα μελετώντας τη μεταβολή της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης μεταξύ των δύο πρώτων χορηγήσεων της FSH κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός των φτωχών από τις καλές δότριες, παρότι σε αυτό το χρονικό διάστημα δεν ήταν δυνατή η πρόβλεψη των καλών δοτριών ωαρίων.

Η αδυναμία χρήσης της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης κατά τα αρχικά στάδια της αγωγής ως κριτηρίου πρόβλεψης της αντίδρασης της ωοθήκης πιθανόν οφείλεται στην κατάσταση ανάπτυξης (follicular status) των ωοθυλακίων ή και στην παρουσία ατρητικών ωοθυλακίων, τα οποία έχουν χαμηλή οιστρογονική δραστηριότητα (Tassell και Kennedy 1980, Mann και συν. 1992). Για την ερμηνεία της παραλλακτικότητας της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης πρέπει να ληφθούν υπόψη τα παρακάτω. Τα γρααφιανά ωοθυλάκια αρχίζουν να εκκρίνουν οιστραδιόλη όταν αποκτούν διάμετρο μεγαλύτερη των 2 mm (Carson και συν. 1981, Tsonis και συν. 1983, 1984) και ανταποκρίνονται στις γοναδοτροπίνες όσα έχουν διάμετρο $\geq 1,8$ mm (Sonjaya και Driancourt 1987). Τα ατρητικά ωοθυλάκια αμνάδων ανταποκρίνονται στη χορήγηση PMSG συνεχίζοντας την ανάπτυξή τους, δίχως όμως να βελτιώνεται η οιστρογονική δραστηριότητά τους (Worthington και Kennedy 1979, Tassell και Kennedy 1980). Σε προβατίνες το επίπεδο της τελικής ανταπόκρισης στην ορμονική διέγερση των ωοθηκών εξαρτάται θετικά από τον αριθμό των ωοθυλακίων διαμέτρου 1-2-3 mm και αρνητικά από τον αριθμό των μεγάλων ωοθυλακίων κατά την έναρξη της ορμονικής αγωγής (Rubianes και συν. 1997, Cognié 1999, Gonzalez-Bulnes και συν. 2000, 2002b, Veiga-Lopez και συν. 2005). Η παρουσία μεγάλων ωοθυλακίων κατά την έναρξη της αγωγής πιθανόν να εξασθενεί την ικανότητα ανάπτυξης των μικρότερων (Rubianes και συν. 1997, Gonzalez-Bulnes και

συν. 2000, 2002c, Veiga-Lopez και συν. 2005) σε αντιστοιχία με ό,τι συμβαίνει κατά τη διαδικασία επιλογής του(ων) κυρίαρχου(ων) ωοθυλακίου(ων) στις προβατίνες (Campbell και συν. 1995, van den Hurk και Zhao 2005) και στις αγελάδες (Amiridis και συν. 2006).

Μέχρι στιγμής η πλειονότητα των προσπαθειών επιλογής δοτριών ωαρίων-εμβρύων έχουν εστιαστεί σε ενήλικα ζώα. Σε έρευνα που έγινε σε προβατίνες φυλής Χίου αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση της προγεστερόνης στον ορό του αίματος μία ημέρα πριν από την προγραμματισμένη συλλογή εμβρύων είναι ενδεικτική της απουσίας ή και της ελάχιστης ανταπόκρισης των ωοθηκών στην ορμονική αγωγή (Amiridis και συν. 2002). Σε αντιστοιχία, η συγκέντρωση της προγεστερόνης την ημέρα της συλλογής εμβρύων σε συνδυασμό με τη δόση της χορηγούμενης PMSG, παρέχει στοιχεία για την ανταπόκριση των ωοθηκών στην αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (Samartzi και συν. 1995a). Επίσης, βρέθηκε ότι ο αριθμός των βιώσιμων εμβρύων σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση της οιστραδιόλης στην περι-οιστρική περίοδο (Gonzalez-Bulnes και συν. 2003). Μελέτες σε προβατίνες (Gonzalez-Bulnes και συν. 2002b) και αίγες (Gonzalez-Bulnes και συν. 2004) έδειξαν ότι η κατάσταση των ωοθυλακίων και η συγκέντρωση της ανασταλτίνης κατά την έναρξη της ορμονικής αγωγής σχετίζεται θετικά με την απόδοση σε έμβρυα. Στις παραπάνω έρευνες υποστήριχθηκε ότι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανασταλτίνης μπορεί να αποτελέσει στην πράξη ένα κριτήριο επιλογής ζώων δοτριών ωαρίων-εμβρύων. Εντούτοις, είναι γνωστό ότι η οιστραδιόλη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες κυρίως από τα μεγάλα με οιστρογονική δραστηριότητα ωοθυλάκια (oestrogenic follicles) ενώ η ανασταλτίνη παράγεται από τα μεγάλα υγιή ωοθυλάκια, από εκείνα που δεν έχουν αποκτήσει ακόμη οιστρογονική δραστηριότητα, όπως και από ατρητικά ωοθυλάκια (Baird και συν. 1991, Mann και συν. 1992). Ανεξαρτήτως του αν και κατά πόσο η χορήγηση γοναδοτροπινών μπορεί να αναστείλει την ατρησία των ωοθυλακίων (Dott και συν. 1979, Draincourt και συν. 1987, Rubianes και συν. 1997), όπως προαναφέρθηκε, τα ατρητικά ωοθυλάκια παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα παραγωγής οιστρογόνων (Moor και συν. 1978, Hay και συν. 1979, Murdoch 1992, Rosales-Torres και συν. 2000) και τα ωάριά τους παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης *in vivo* και *in vitro* (Rubianes και συν. 1997, Gonzalez-Bulnes και συν. 2003).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η διακύμανση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης στα αρχικά στάδια της αγωγής (2 πρώτες χορηγήσεις FSH) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια ισχυρή ένδειξη για τον εντοπισμό των κακών δοτριών ωαρίων και τον αποκλεισμό των συγκεκριμένων ζώων από τους περαιτέρω χειρισμούς.

Επιπλέον, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος 12 ώρες πριν από τη διενέργεια της αναρρόφησης των ωοθυλακίων μπορεί να προβλέψει το 100% των αμνάδων που δε θα παρουσιάσουν καλή ανάπτυξη ωοθυλακίων μετά την ορμονική αγωγή. Το τελευταίο είναι εφικτό διότι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης, για παράδειγμα, δέκα υποψήφιων δοτριών ωαρίων μπορεί να ολοκληρωθεί το πολύ σε 4 έως 4,5 ώρες, δηλαδή τουλάχιστον 7 ώρες πριν από την προγραμματισμένη OPU. Εν κατακλείδι, συνδυάζοντας τις μετρήσεις στις τρεις προηγούμενες χρονικές στιγμές γίνεται εφικτή η επιλογή των ζώων που θα υποβληθούν τελικά σε αναρρόφηση ωοθυλακίων.

4.8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amiridis GS, Rekkas CA, Fthenakis GC, Vainas E, Lymberopoulos A, Christodoulou V, Belibasaki S, 2002: Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. *Theriogenology* 57 1143-1150.

Amiridis GS, Tsiligianni T, Vainas E, 2006: Follicle ablation improves the ovarian response and the number of collected embryos in superovulated cows during early stages of lactation. *Reprod Dom Anim*, in press.

Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR, 1997: Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9 333-339.

Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS, 1991: Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil* 43 (Suppl) 125-138.

Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC, 2006: Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs. *Small Rumin Res* 63 189-198.

Bister J-L, Noël B, Perrad B, Mandiki SNM, Mbayahaga J, Paquay R, 1999: Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Dom Anim Endocrinol* 17 315-328.

Boscós C, Vainas E, Kouskoura T, Samartzi F, Vafiadis D, Dellis S, 1997: Superovulatory response of Chios and Friesian ewes to two FSH-P dose levels. *Reprod Dom Anim* 32 195-198.

Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R, 1995: Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil* 49 (Suppl) 335-350.

Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG, 1981: Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine

follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod* 24 105-113.

Cognié Y, 1999: State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51 105-116.

Dohoo I, Martin W, Stryhn H, 2003: Veterinary Epidemiology Research. AVC Inc Univ of Prince Edward Island. Charlottetown P.EI, Canada.

Dott HM, Hay MF, Cran DG, Moor RM, 1979: Effect of exogenous gonadotrophin (PMSG) on the antral follicle population in the sheep. *J Reprod Fertil* 56 683-689.

Driancourt MA, 1987: Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J Reprod Fertil* 80 207-212.

Draincourt MA, Fry RC, Clarke IJ, Cahill LP, 1987: Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J Reprod Fertil* 79 635-641.

Foote RE, Ellington JE, 1988: Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology* 29 111-123.

Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Carrizosa JA, Urrutia B, Souza CJ, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A, McNeilly AS, 2004: Plasma inhibin A determination at start superovulatory FSH treatments is predictive for embryo outcome in goats. *Dom Anim Endocrinol* 26 259-266.

Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Castellanos V, Santiago-Moreno J, Ariznavarreta C, Dominguez V, Lopez-Sebastian A, Tresguerres JA, Cocero MJ, 2003: Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod Nutr Dev* 43 17-28.

Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Santiago-Moreno J, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ, 2002c: Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology* 58 1607-1614.

Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Souza CJH, Santiago-Moreno J, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ, Baird DT, 2002a: Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod Dom Anim* 37 357-361.

Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A, 2000: Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54 1055-1064.

Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Souza CJH, Groome NP, Garcia-Garcia RM, Lopez-Sebastian A, Baird DT, 2002b: Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of

ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology* 57 1263-1272.

Hay MF, Moor RM, Cran DG, Dott HM, 1979: Regeneration of atretic sheep ovarian follicles *in vitro*. *J Reprod Fertil* 55 195-207.

Hosmer JrDW, Lemeshow S, 1989: *Applied Logistic Regression*. John Wiley Sons Inc.

Kennedy JP, Worthington CA, Cole ER, 1974: The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J Reprod Fertil* 36 275-282.

Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S, 1999: Follicular size affects the meiotic competence of *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev* 39 503-508.

Lopez Sebastian A, Gonzalez de Bulnes A, Santiago Moreno J, Gomez Brunet A, Townsend EC, Inskip EK, 1999: Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish merino ewes. *Theriogenology* 52 505-514.

McNeilly AS, Picton HM, Campbell BK, Baird DT, 1991: Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J Reprod Fertil Suppl* 43 177-186.

Mann GE, McNeilly AS, Baird DT, 1992: Hormone production *in vivo* and *in vitro* from follicles at different stages of the oestrous cycle in the sheep. *J Endocrinol* 132 225-234.

Mansour AM, 1959: The hormonal control of ovulation in the immature lamb. *Journal of Agricultural Science* 52 87-94.

Meikle A, Tasende C, Garofalo EG, Forsberg M, 1998: Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. *Anim Reprod Sci* 54 75-85.

Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E, 2002: Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58 1713-1721.

Menegatos J, Chadio S, Kalogiannis T, Kouskoura T, Kouimtzis S, 2003: Endocrine events during the peri-estrous period and the subsequent estrous cycle in ewes after estrus synchronization. *Theriogenology* 59 1533-1543.

Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y, 1999: Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil* 54(Suppl) 449-460.

Moor RM, Hay MF, Dott HM, Cran DG, 1978: Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J Endocrinol* 77 309-318.

- Moor RM, Osborn JC, Crosby IM, 1985: Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fertil* 74 167-172.
- Moor RM, Trounson AO, 1977: Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 49 101-109.
- Murdoch WJ, 1992: Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Dom Anim Endocrinol* 9 219-24.
- Murphy BD, Mapletoft JR, Manns J, and Humphrey WD, 1984: Variability in gonadotrophin preparations as a factor in superovulatory response. *Theriogenology* 21, 117-125.
- O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP, 2000: Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 118 303-313.
- Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P, 1999: Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod* 61 1568-1574.
- Ptak G, Tischer M, Bernabo N, and Loi P, 2003: Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biol Reprod* 69 278-285.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y, 1995: Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilize oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil* 103 115-120.
- Rosales-Torres AM, Avalos-Rodriguez A, Vergara-Onofre M, Hernandez-Perez O, Ballesteros LM, Garcia-Macedo R, Ortiz-Navarrete V, Rosado A, 2000: Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev* 55 270-281.
- Rubianes E, Menchaca A, 2003: The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci* 78 271-287.
- Rubianes E, Ungerfeld R, Viiioles C, Rivero A, Adams GP, 1997: Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47 1479-1488.
- Samartzi F, Belibasaki S, Vainas E, Boscós C, 1995a: Plasma progesterone concentration in relation to ovulation rate and embryo yield in Chios ewes superovulated with PMSG. *Anim Reprod Sci* 39 11-21.
- Samartzi F, Boscós C, Vainas E, Tsakalof P, 1995b: Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during spring and autumn. *Anim Reprod Sci* 39 215-222.

- Sonjaya H, Driancourt MA, 1987: Ovarian follicles during infancy in Romanov and Ile-de-France ewe lambs. *J Reprod Fertil* 81 241-248.
- Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X, 2000: Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 62 206-213.
- Tassell R, Kennedy JP, 1980: Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb--fine structure and histochemistry. *Aust J Biol Sci* 33 675-687.
- Testart J, Kann G, Saumande J, Thibier M, 1977: Oestradiol-17beta, progesterone, FSH and LH in prepubertal calves induced to superovulate. *J Reprod Fertil* 51 329-336.
- Trounson AO, Willadsen SM, Moor RM, 1977: Reproductive function in prepubertal lambs: ovulation, embryo development and ovarian steroidogenesis. *J Reprod Fertil* 49 69-75.
- Tsonis CG, Carson RS, Findlay JK, 1984: Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 beta and testosterone concentrations, and diameter and atresia of individual ovine follicles. *J Reprod Fertil* 72 153-163.
- Tsonis CG, Quigg H, Lee VW, Leversha L, Trounson AO, Findlay JK, 1983: Inhibin in individual ovine follicles in relation to diameter and atresia. *J Reprod Fertil* 67 83-90.
- van den Hurk R, Zhao J, 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63 1717-1751.
- Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Dominguez V, Cocero MJ, 2005: The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology* 63 1973-1983.
- Worthington CA, Kennedy JP, 1979: Ovarian response to exogenous hormones in six-week-old lambs. *Aust J Biol Sci* 32 91-95.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

Συμπεράσματα και προοπτικές

Συμπεράσματα

Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής οδηγούν σε συμπεράσματα τα οποία – σε διαφορετικό βαθμό το καθένα – θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην περαιτέρω προσπάθεια αναβάθμισης του γενετικού υλικού των προβάτων, όπως επίσης και στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος και κυρίως των ωοθηκών των αμνάδων μέχρι την ενήβωσή τους.

Επιγραμματικά, τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα ακόλουθα:

1. Η φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων των αμνάδων Καραγκούνικης φυλής μέχρι της ηλικίας των έξι μηνών δε διαφέρει από αυτή των ξενικών φυλών που έχουν ήδη μελετηθεί.
2. Στην ηλικία των 4 μηνών η ανταπόκριση των ωοθηκών στην ΠΠΑΩ είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Η χαμηλή αυτή ανταπόκριση όπως και η μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης των συλλεγόμενων ωαρίων είναι αναστρέψιμη αν έχει διενεργηθεί ένα μήνα νωρίτερα αναρρόφηση όλων των ορατών ωοθυλακίων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η χρησιμοποίηση αμνάδων σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης πρέπει να ακολουθεί αυστηρό σχεδιασμό για την αποφυγή άσκοπων παρεμβάσεων και δαπανών.
3. Στην ηλικία των 3 έως 5 μηνών τόσο ο αριθμός των ωοθυλακίων όσο και των ωαρίων που συλλέγονται από αμνάδες που υποβάλλονται σε επανειλημμένες αναρροφήσεις εξαρτάται από τη δόση της χορηγούμενης FSH. Αυτό αποδεικνύεται με τη σαφή βελτίωση τόσο του αριθμού των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων όσο και του αριθμού των συλλεγόμενων ωαρίων, όταν η δόση της FSH προσαρμόζεται στο σωματικό βάρος του κάθε ζώου. Το εύρημα αυτό λύνει σε μεγάλο βαθμό το πρόβλημα της τεράστιας παραλλακτικότητας της δόσης που χρησιμοποιείται διεθνώς για την ΠΠΑΩ από τις διάφορες ερευνητικές ομάδες.
4. Η αγωγή της ΠΠΑΩ και η επακόλουθη αναρρόφηση των ωοθυλακίων - τουλάχιστον με τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν στη μελέτη αυτή - δεν επιδρά στην ενήβωση, στη μυοσκελετική ανάπτυξη και στην αναπαραγωγική ικανότητα των αμνάδων ανεξάρτητα από την εποχή γέννησης των ζώων. Ως εκ τούτου, οι μέθοδοι που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή μπορούν με ασφάλεια να αποτελέσουν εναλλακτικές προσεγγίσεις σε προγράμματα ταχείας γενετικής βελτίωσης των προβάτων.
5. Σημαντικό εύρημα αποτελεί η δυνατότητα ασφαλούς πρόβλεψης των αμνάδων με μέτρια και κακή απόδοση σε ωάρια με προσδιορισμό της συγκέντρωσης της

οιστραδιόλης στον ορό του αίματος 12 ώρες πριν από την προγραμματισμένη αναρρόφηση ωοθυλακίων. Με τον τρόπο αυτό δεν υποβάλλονται τα ζώα σε άσκοπες χειρουργικές επεμβάσεις, ενώ παράλληλα μειώνεται το κόστος ανά συλλεχθέν ωάριο-έμβρυο εξαιτίας του μειωμένου αριθμού των εργατοωρών και του περιορισμένου όγκου των αναλωσίμων. Πρώιμος αποκλεισμός των κακών δοτριών μπορεί να γίνει ήδη από τη 12^η ώρα μετά την έναρξη της ορμονικής αγωγής, γεγονός που συρρικνώνει περαιτέρω το τελικό κόστος παραγωγής εμβρύων εξαιτίας της χρησιμοποίησης της FSH μόνο στις περιπτώσεις που αναμένεται καλό ποσοστό συλλογής ωαρίων.

Προοπτικές μελλοντικής έρευνας

1. Για ερευνητικούς καθαρά λόγους, ως σημείο περάτωσης της παρούσας μελέτης επιλέχθηκε η φάση της *in vitro* ωρίμανσης του ωαρίου. Από πρακτική άποψη - αν και ενδεικτικό της δυνατότητας γονιμοποίησης και εξέλιξης του εμβρύου - το στάδιο αυτό είναι περιορισμένης σημασίας. Το ζητούμενο είναι η εξωσωματική παραγωγή κατάλληλων για μεταφορά εμβρύων και κυρίως η γέννηση απογόνων. Με αυτό το δεδομένο η φυσική συνέχεια αυτής της μελέτης είναι η *in vitro* γονιμοποίηση των συλλεγόμενων ωαρίων και η μεταφορά των *in vitro* παραγόμενων εμβρύων με τελικό στόχο τη δημιουργία απογόνων από άνηβες δότριες ωαρίων.
2. Μολονότι στην παρούσα έρευνα έχει αποδειχθεί ότι η αγωγή ΠΠΑΩ και η αναρρόφηση των ωοθυλακίων δεν επηρεάζει την ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα της δότριας, οι ορμονικές αλληλεπιδράσεις τόσο από τη χορήγηση της FSH όσο και από την αναρρόφηση των ωοθυλακίων, με τη συνεπακόλουθη απομάκρυνση της κύριας πηγής οιστραδιόλης και ανασταλτίνης, δεν έχουν αξιολογηθεί. Η ενδοκρινική μελέτη του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση - ωοθήκες, με βάση το μοντέλο της αναρρόφησης ωοθυλακίων, είναι πιθανό να αναδείξει νέες πτυχές στην κατανόηση της φυσιολογίας της ενήβωσης. Μελέτες με αντίστοιχη μεθοδολογία σε ενήλικα ζώα έθεσαν νέα ερωτηματικά σε θέματα φυσιολογίας της αναπαραγωγής που μέχρι τότε θεωρούνταν δεδομένα.
3. Η παρούσα μελέτη στηρίχθηκε σε ζώα Καραγκούνικης φυλής που παρουσιάζουν μεγάλης διάρκειας άνοιστρη περίοδο και χαμηλό δείκτη πολυδυμίας. Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η συμπεριφορά των δοτριών που ανήκουν σε άλλες φυλές (π.χ. Χίου), οι οποίες παρουσιάζουν πρακτικά έλλειψη άνοιστρης

περιόδου και μεγαλύτερο δείκτη πολυδυμίας άρα, κατά συνθήκη, καλύτερη ωοθηκική δραστηριότητα.

4. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που έγινε σε άνηβες δότριες ωαρίων και, κατά συνέπεια, στηρίχθηκε σε μεγάλο βαθμό σε δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία, όπως και στην εμπειρία των ερευνητών που ασχολούνται με τις ενήλικες δότριες. Παράμετροι που παρουσιάζονται ως δευτερεύουσας σημασίας αποδεικνύεται ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην τελική έκβαση του πειραματισμού και, κατά συνέπεια, ο βαθμός συνεισφοράς της καθεμίας πρέπει να εκτιμηθεί και κατά το δυνατό να βελτιωθεί. Ως τέτοιοι παράγοντες χαρακτηρίζονται η εφαρμοζόμενη υποπίεση αναρρόφησης, η διάμετρος και το μήκος της βελόνας και των ελαστικών σωλήνων αναρρόφησης, η σύνθεση των υποστρωμάτων ωρίμανσης – γονιμοποίησης - καλλιέργειας, και πιθανόν οι συνθήκες επώασης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Age, FSH Dose and Follicular Aspiration Frequency Affect Oocyte Yield from Juvenile Donor Lambs

I Valasi¹, L Leontides², Th Papanikolaou¹ and GS Amiridis¹

¹Clinic of Reproduction and Obstetrics; ²Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production, Veterinary Faculty, University of Thessaly, Karditsa, Greece

Contents

Experiments were conducted to determine the effects of lamb age, frequency of follicular aspirations, and hormone stimulation by fixed or variable FSH dose, on the number of collected oocytes and their maturational competence. In trial 1, the characteristics of follicular population (number and diameter of follicles) were studied in 40 lambs which were slaughtered at the age of 30 days (S1), 42 days (S2), 60 days (S3) and 5–6 months (S4), each n = 10. In trial 2, 27 lambs were divided into four groups. group MF lambs (n = 6) had follicular aspiration (OPU) in four monthly intervals commencing from the age of 8–9 weeks (sessions MF1, MF2, MF3 and MF4). In groups SF2, SF3 and SF4 (each n = 6), OPU was conducted once during the 12–13, 16–17 and 20–21 week of age, respectively. Ovarian stimulation was conducted with fixed FSH dose (3.52 mg/animal). In trial 3, 10 lambs (group MV) were treated as those of group MF apart from the FSH dose, which was administered according to the body weight in a dose of 0.27 mg/kg. The number and the size of follicles, the number and the quality of collected oocytes and the maturational competence of the oocytes were compared between and within groups. In trial 1, the total number and the number of small follicles were greater in groups S1 and S2 compared with those of S3 and S4 (p < 0.01). Similarly, the follicular population was greater in group MF1 than in group SF3 (p < 0.01). In sessions MF2, MF3, MV2, MV3 and MV4, more oocytes were collected in comparison with those from the respective once-aspirated age mates (groups SF2, SF3 and SF4). In total, more (p = 0.02) oocytes per donor were collected from group MV (15.2 ± 5.5) than from group MF (9.0 ± 3.2). An absolute maturational failure was observed in oocytes collected from groups SF2 and SF3. Maturational competence varied between 16.7% and 58.3% (p = 0.017) among sessions of group MF, but it was more uniform among sessions of group MV (range 12.5–42.9%, p > 0.05). Our results indicate that firstly, the number and the quality of harvested oocytes from juvenile lambs can be much improved if follicular stimulation regime is adjusted to the body weight. Secondly, in terms of follicular population and oocyte quality, 3 and 4-month-old lambs are naturally bad oocyte donors, but this characteristic can be reversed by a previous follicular ablation.

Abbreviations: MF, Multiple aspirations – fixed gonadotrophin dose; SF, Single aspiration – fixed gonadotrophin dose; MV, Multiple aspirations – variable gonadotrophin dose.

Introduction

The ovarian follicular population of ewe-lambs varies according to the age, breed, ovulation rate-litter size (Tassell et al. 1983; Sonjaya and Driancourt 1987; Jorio et al. 1991; Bartlewski et al. 2006). In prepubertal lambs, follicular development appears to be unrelated to the classical follicular wave like pattern (Rawlings et al. 2003; Bartlewski et al. 2006) which commonly

occurs to prepubertal heifers and adult ewes (Noel et al. 1993; Evans et al. 1994). The follicular population and the number of large follicles are not stable during prepubertal life of sheep. Rather, there are particular time periods at which the total follicular number increases (Kennedy et al. 1974; Tassell et al. 1978; Bartlewski et al. 2006).

In recent years, a considerable interest has been triggered in using juvenile animals as oocyte-donors targeting to *in vitro* embryo production. In this way, an accelerated genetic gain can be achieved by shortening the generation interval. To this end, oocytes can be collected from abattoir material or by *in vivo* follicular aspiration. Although in the majority of studies the ovaries were exposed by means of mid-ventral laparotomy (Armstrong et al. 1997; Ptak et al. 1999, 2003; Kelly et al. 2005), laparoscopic approaches are also employed for follicular aspiration in ewe-lambs aging at least 2 months (Anel et al. 1997; Valasi et al. 2005). Follicular aspiration in prepubertal lambs is performed after ovarian stimulation using a variety of hormonal regimes, which usually combine gonadotrophins and progestagens (Earl et al. 1995; Anel et al. 1997; Ledda et al. 1999a; Ptak et al. 1999; Morton et al. 2004; Kelly et al. 2005). While the necessity of using gonadotropin support before follicular ablation is incontestable, some authors question the role of progestagens in preventing maturation of oocytes during FSH treatment and in sensitizing the hypothalamic–pituitary–ovarian axis (Kelly et al. 2005).

Ovarian response of stimulated lambs varies depending on age, individuals, hormonal treatment and on the follicular status before stimulation (Meikle et al. 1998; Ptak et al. 2003). In general, the gonadotrophin doses in single or repeatedly aspirated lambs is given irrespectively of the lambs' age and body weight (Anel et al. 1997; Ptak et al. 1999, 2003). Our previous observations (I. Valasi, unpublished data) revealed that lambs with lower body weight had a better response to ovarian stimulation in comparison with heavier age-mates.

Despite the gradual, age-dependent decrease in the number of developed follicles and oocytes recovered that was observed in lambs (Ptak et al. 2003), calves (Taneja et al. 2000) and prepubertal goats (Baldassarre and Karatzas 2004), the overall number of recovered oocytes from prepubertal lambs and goats was higher than that from adult animals (Ptak et al. 1999; Koeman et al. 2003; Baldassarre and Karatzas 2004). The latter finding reinforces the attempts of using valuable prepubertal lambs as oocyte donors early in their life by testing new stimulation protocols.

	RDA	757	B	Dispatch: 24.7.06	Journal: RDA	CE: Kavitha
Journal Name	Manuscript No.			Author Received:	No. of pages: 8	PE: Mahalakshmi

Several studies have been conducted to evaluate the developmental competence of oocytes collected from prepubertal animals and their subsequent potential for *in vitro* embryo production. In some studies, oocytes collected from prepubertal animals showed a lower developmental competence (Revel et al. 1995; O'Brien et al. 1996; Ledda et al. 1997; O'Brien et al. 1997a; Presicce et al. 1997; Ptak et al. 1999; Kochhar et al. 2002), whereas in others the latter was similar to that of oocytes derived from adult donors (Armstrong et al. 1997; Mogas et al. 1997; Izquierdo et al. 2002; Koeman et al. 2003). Current knowledge indicates that maturation is the more limiting step for the *in vitro* embryo production (Mermillod et al. 1999) which – to some extent – can be affected by the age of the oocyte donor (Revel et al. 1995; Ledda et al. 1997; O'Brien et al. 1997a).

This study was designed in an attempt to increase the oocyte yield from young lambs for *in vitro* embryo production. To this end, the following parameters have been evaluated (1) the ovarian response and recovery of oocytes after laparoscopic follicular aspiration (OPU) at different ages; (2) the effect of repeated stimulation and follicular aspiration on ovarian response; (3) the possible effects of gonadotrophin dose adjusted to body weight, on ovarian response; and (4) the developmental competence during *in vitro* maturation (IVM) of oocytes collected from once or repeatedly aspirated Karagouniko lambs.

Materials and Methods

Animals

Karagouniko breed ewe-lambs were kept in a sheltered paddock (latitude 39°, 26' north) and after weaning, they were fed alfalfa hay and a commercial concentrate mixture. Lambs were weighed at birth, at weaning (42 days), at second month of age and thereafter at monthly intervals until the fifth month of their age. The experiments were conducted under a special license issued by the Greek Ministry of Agriculture.

Trial 1

This trial was conducted to assess the normal follicular status at particular ages, and to examine if this status is related to the outcome of the ovarian stimulatory treatments which would be applied in the forthcoming trials 2 and 3.

Forty lambs were divided into four equal groups according to their age (S1, ageing 4 weeks; S2, ageing 6 weeks; S3, ageing 8 weeks and S4, aging 20–24 weeks). The lambs were slaughtered without any hormonal pre-treatment; the ovaries were excised, placed in a thermos and transferred immediately to the laboratory. The follicular population on the ovarian surface was evaluated according to number and follicular diameter. Those having diameter <2 mm (gonadotrophin-responsive) were considered as small follicles and those having diameter ≥2 mm (gonadotrophin-responsive) as large follicles (van den Hurk and Zhao 2005) (Ledda et al. 1999b).

Trial 2

At the age of 7–8 weeks, 27 ewe-lambs were randomly divided into four groups MF, n = 9; SF2, n = 6; SF3, n = 6; SF4, n = 6]. Follicular aspiration (OPU) was performed in lambs aged 12–13, 16–17 and 20–21 weeks (groups SF2, SF3 and SF4, respectively). Starting from the 8th to 9th week of age in group MF lambs, OPU was performed four times (session MF1, MF2, MF3 and MF4) in monthly intervals. Before OPU, ovarian stimulation was carried out with the same hormonal regimes. The experimental design and the hormonal treatment used are presented in Table 1 and Fig. 1.

Trial 3

Ten Karagouniko lambs (group MV) 7–8 weeks old were serially aspirated as those of group MF. In this group, follicular stimulation was carried out with

	Group of donors	Age of donors (weeks)	Treatment
TRIAL 2	Group MF1 (first OPU)	8 9	25 mgP4 ^a i.m. twice 3.52 mg FSH ^b i.m.in six equal doses, every 12 h OPU
	Group MF2 (second OPU)	12 13	As in MF1
	Group MF3 (third OPU)	16 17	As in MF1
	Group MF4 (fourth OPU)	20 21	As in MF1
	Group SF2	12 13	As in MF1
	Group SF3	16 17	As in MF1
	Group SF4	20 21	As in MF1
TRIAL 3	Group MV1 (first OPU)	8 9	25 mg P4 ^a i.m. twice 3.52 mg FSH ^b i.m. in six equal doses, every 12 h OPU
	Group MV2 (second OPU)	12 13	25 mg P4 ^a i.m. twice 0.27 mg/kgFSH ^b i.m. in six equal doses, every 12 h OPU
	Group MV3 (third OPU)	16 17	As in MV2
	Group MV4 (fourth OPU)	20 21	As in MV2

Table 1. Hormonal treatment of oocyte donors

^aProluton Depot, Schering AG, German.
^bOvagen, Bodinco B.V., The Netherlands.

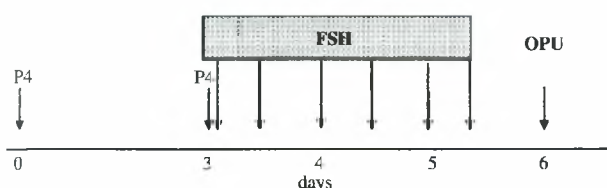


Fig. 1. Time scheduled of the treatment protocol used

variable FSH dose, which was adjusted to the body weight of each lamb (Table 1). At first OPU session (session MV1), the administered FSH dose was the same with that of group MF1 (3.52 mg/lamb), since body weight was not different between the animals of the two groups (14.9 ± 2.98 and 16.5 ± 3.63 kg for MF1 and MV1, respectively; $p > 0.05$). Thereafter, in group MV lambs (session MV2, MV3 and MV4) the FSH dose was adjusted to 0.27 mg/kg.

Follicular aspiration

Donor lambs were anaesthetized with a combination of an intramuscular injection of xylazine (0.1 mg/kg; Rompun, Veterin, Greece) and an intravenous thiopentone administration (10 mg/kg, 2.5%; Thiopental, Nycomed, Germany).

Before any follicle puncture was performed, the total number and the diameter of all visible follicles were recorded and classified according to their size: small < 2 mm or large ≥ 2 mm.

Follicular aspiration was carried out laparoscopically (250.2 H; Schödlly Fiberoptic GMBH, Germany) with the animal in dorsal recumbency. The 20 G aspiration needle (Spinocan®, 20 G, 75 mm; Braun Medical, M. Enzersdorf, Austria) was connected by an elastic tube (internal diameter 1.5 mm) to the vacuum pump (Medela-Vario, 6002601 Switzerland) which was adjusted to aspirate 13–15 ml water/min. The oocytes were collected into a 10 ml sterilized glass tube containing 1 ml phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2 at 37°C). All OPU sessions were carried out by the same operator who was not aware of the treatment used.

Oocyte evaluation and *in vitro* maturation

Immediately after OPU, cumulus oocyte complexes (COCs) were collected and classified according to the criteria set by de Loos *et al.* (de Loos *et al.* 1989) into four classes, A, B (high quality) and C, D (inferior quality). All collected oocytes were included in the study apart from those having darkened or degenerated ooplasm.

Selected COCs were washed four times in TCM 199 (12–202; ICN Biomedicals, xxx, OH, USA) supplemented with 1.77 mM Ca-lactate (2103; Merck, xxx, Germany), 0.62 mM L-glutamine (G8540; Sigma, St Louis, MO, USA), 8.66 mM NaHCO_3 (S5761; Sigma), 5.34 mM Hepes (sodium salt, H6147; Sigma), 2.07 mM Na-pyruvate (P3662; Sigma), 0.05 mM penicilline K-salt (7794; Sigma) and 0.025 mM streptomycin sulphate (9137; Sigma) [Modified Parker's Medium (MPM)]. COCs

were then transferred to 4-well plates (Nunc, Rockslide, Denmark) containing 400 μl of MPM supplemented with 10% (v/v) heat inactivated oestrus cow serum (OCS) and 22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ovine pituitary FSH (Ovagen, Bodinco B.V., The Netherlands) and cultured for 24 h at 39°C in an atmosphere of 5% CO_2 in air with maximum humidity.

To assess meiotic/nuclear maturation, COCs were mechanically denuded of surrounding cells (vortexing in 2.96% w/v sodium citrate solution), mounded under glass-slides, fixed in acetic acid : methanol (1 : 3 v/v) and stained with orcein.

Stages of nuclear maturation of oocytes were categorized as germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI) or metaphase II (MII).

Statistical analyses

All the analyses were done in SAS, ver. 8 (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) and evaluated for significance at the 5% level.

Trial 1

The means of total number and number of small follicles were compared among groups S1, S2, S3 and S4 by one-way analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons were done by the Tukey test. The medians of the number of large follicles were compared among the aforementioned groups by the Kruskal–Wallis test.

Trials 2 and 3

The means of total follicular population, number of large and small follicles and of collected oocytes were compared among groups MF1, SF2, SF3 and SF4 by one-way ANOVA. Multiple comparisons were done by the Tukey test. The medians of the number of large follicles and of collected oocytes were compared among the aforementioned groups by the Kruskal–Wallis test. Multiple comparisons were done by the Mann–Whitney *U* test and evaluated for significance at Bonferroni adjusted *p*-values.

For repeatedly aspirated groups (MF1–4 and MV1–4), comparisons of means of total follicular population, number of large and small follicles and of collected oocytes were done, separately for each outcome in PROC MIXED. In this repeated-measures analysis, the main interest was in how the mean values of the outcomes of the differently treated animals changed over time. Initially, models assuming different covariance structures – namely, compound symmetry, first-order autoregressive, and unstructured – were fitted to the data. The decision on which of the three structures provided the best fit was based on the largest Akaike's Information Criterion. Subsequently, the values of each parameter were modelled with time as a categorical variable with four levels. Multiple comparisons were made with appropriate ESTIMATE statements. Moreover, the means of the overall number of collected oocytes (at all sessions) per donor in group, MF and MV were compared by *t*-test.

The means of follicular population and collected oocytes were compared between groups MF2 and SF2, MF3 and SF3, MF4 and SF4, MV1 and MF1, MV2 and MF2, MV3 and MF4 and MV4 and MF4 by *t*-test.

The recovery rate of oocytes (number of collected oocytes per number of aspirated follicles), the quality of collected oocytes and the percentage of mature oocytes, after IVM procedure among and between different groups, were analysed using chi-square or Fisher's exact test. Among compared groups, multiple comparisons were done by chi-square or Fisher's exact test and evaluated for significance at Bonferroni adjusted *p*-values. Oocytes with high quality were recorded as those of grades A and B and matured oocytes those that had reached the metaphase II (MII).

Results

Trial 1

The total number and the number of small follicles were larger ($p \leq 0.01$) in group S1 and S2 compared each with S3 and S4. The number of large antral follicles did not differ ($p = 0.15$) among groups S1, S2, S3 and S4 (Fig. 2).

Trials 2 and 3

Follicular response

Within group MF, two lambs (22.2%) did not respond to any of the four repeated hormonal stimulations showing declining number of small follicles in the sequential OPU sessions (<2 mm in diameter). Poor follicular response (only one to two large follicles) was recorded in additional three lambs at the third and the fourth OPU. Thus, in group MF the overall proportion of lambs with poor follicular response increased at the third and the fourth OPU sessions (from 22.2% at the first and the second OPU to 55.5% at the third and fourth sessions). Poor follicular response showed 66.6% of lambs in group SF2, 33.3% in group SF3 and 16.6%

in group SF4. In group MV, none of the lambs showed poor follicular response.

The results referring to follicular development and collected oocytes between once (SF) and repeatedly (MF) aspirated groups are shown in Fig. 3. In the same figure, the results of follicular development and the numbers of collected oocytes between groups stimulated with a fixed (group MF) and variable (group VF) FSH dose are also depicted.

The overall number of collected oocytes per donor in group MF and MV did not differ ($p = 0.1$) and was (mean $\pm$ SD) 14.4 ± 5.7 and 19.4 ± 4.4 , respectively. The sum of collected oocytes per donor of the second, third and fourth OPU sessions (when different FSH doses were administered) was larger ($p = 0.02$) in group MV compared with MF (15.2 ± 5.5 and 9.0 ± 3.2 for groups MV and MS, respectively).

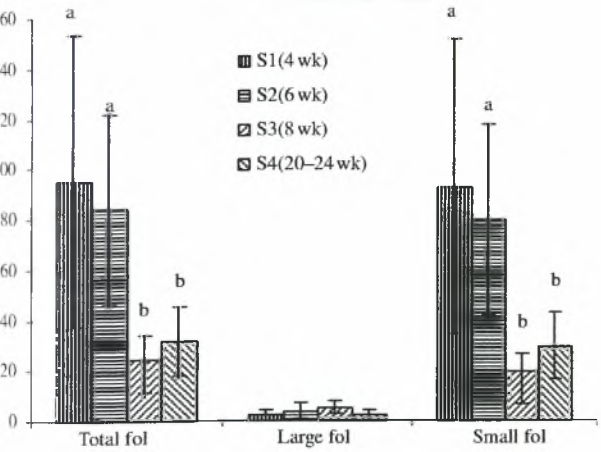


Fig. 2. Distribution (mean $\pm$ SD) of total number, number of large (≥ 2 mm) and small (<2 mm) follicles among unstimulated lambs slaughtered at 4, 6, 8 and 20–24 weeks of ages. Bars marked with different letter differ significantly ($p < 0.05$)

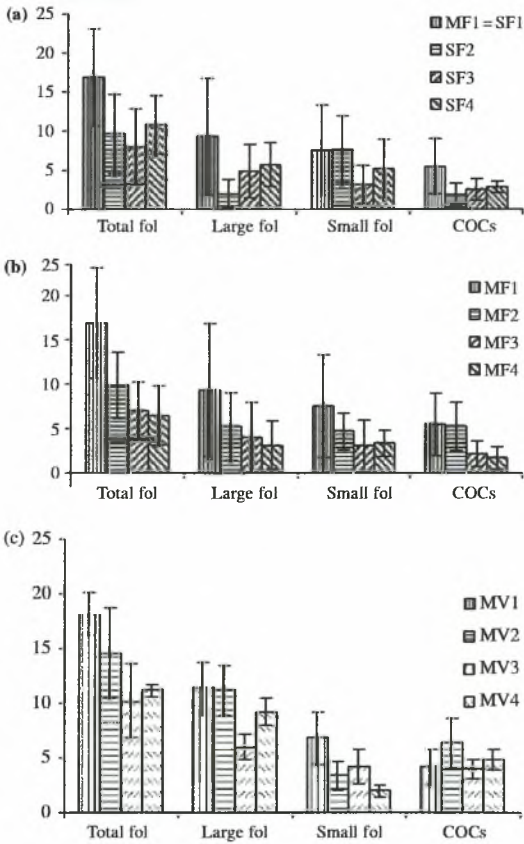


Fig. 3. Distribution (mean $\pm$ SD) of total number of follicles, number of large, small follicles and collected oocytes (COCs) in groups (a) MF1 = SF1, SF2, SF3, SF4 (single aspirated used fixed dose of FSH, upper panel); (b) MF1, MF2, MF3, MF4 (multiple aspirated using fixed dose of FSH, middle panel); and (c) MV1, MV2, MV3, MV4 (multiple aspirated using variable dose of FSH, lower panel) after stimulation at 2, 3, 4 and 5 months of age, respectively. Significant differences ($p < 0.05$) found compared groups within each graph and between graphs (b) and (a) or (c), respectively. Total follicles: SF1 > SF3; SF4 > MF4; MF1 > MF2, MF3, MF4; MF2 > MF4; MV1 > MV2; MV4 > MS4. Large follicles: MF1 > MF3, MF4; MF2 > MF4; MV2 > MF2; MV4 > MF4. COCs: SF1 > SF2; MF2 > SF2; MF1 > MF3, MF4; MF2 > MF3, MF4; MV2 > MV3; MV3 > MF3; MV4 > MF4

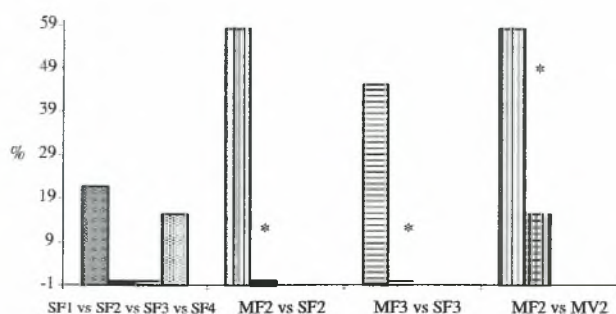


Fig. 4. Percentage of mature oocytes after *in vitro* maturation (IVM) among groups MF1 = SF1, SF2, SF3, SF4, between groups MF2 and SF2, MF3 and SF3, MF2 and MV2. *Difference ($p < 0.05$) between groups compared. Note: percentages of matured oocytes of groups SF2 and SF3 are 0%

The oocyte recovery rate varied in different groups from 32.8% to 88.7% (mean percentage 50.1%). The highest recovery rates were recorded in groups MF2 and MV2 (88.7% and 61.5%, respectively, $p = 0.002$).

Quality of oocytes and maturational competence

The proportions of high quality-oocytes for group and/or session did not differ and was different only when groups MF1 and MF4 (40.5% and 0%, respectively, $p = 0.002$) and MF4 and SF4 (0.0% and 35.3%, respectively, $p = 0.02$) were compared.

Comparison between different groups at different ages (MF1 vs SF2 vs SF3 vs SF4) showed that although the percentage of mature oocytes was lower in group SF2 (0%) and SF3 (0%) compared with group MF1 (21.7%) and SF4 (15.4%) (Fig. 4), the difference was not significant ($p = 0.2$). After IVM, more mature oocytes were found in group, MF2 (58.3%, $p = 0.02$) and MF3 (45.5%, $p = 0.03$) compared with SF2 and SF3, respectively, while the maturational status between group, MF4 (16.7%) and SF4 (15.4%) was not different.

The percentage of mature oocytes differed ($p = 0.04$) among groups MF1, MF2, MF3 and MF4. Pairwise comparisons at Bonferroni adjusted p -value (critical $p = 0.008$) were insignificant, the lowest being between groups MF1 and MF2 ($p = 0.017$). The percentage of mature oocytes did not differ among groups MV1, MV2, MV3 and MV4 (mature/total oocytes: 12.5%, 15.4%, 42.9% and 40%, respectively).

Between groups subjected to repeated follicular aspiration, the maturational status at the same age was only better ($p = 0.003$) in group MF2 compared with MV2 (58.3 and 15.4%, respectively, Fig. 4).

Discussion

Results from the current study confirm previous findings in lambs and kids that follicular development after ovarian stimulation using fixed FSH doses decreases with the age of donor (Ptak et al. 2003; Baldassarre and Karatzas 2004). Our data indicate that this decrease can be reversed by performing OPU at earlier ages. The most interesting finding of the present study is that improved follicular development and oocyte yield can be

achieved when the stimulatory FSH dose is adjusted to the body weight of aspirated lambs. Even though the higher FSH doses did not improve developmental competence of collected oocytes, the overall blastocyst formation per donor is expected to be improved through the higher oocytes yield. Still, the low maturation rate of oocytes from juvenile lambs is the major limiting factor for blastocyst formation.

Progestational priming – in the form of intravaginal sponges or pessaries – before ovarian stimulation is a common practice between many research groups when follicular aspiration is to be performed in juvenile lambs (Earl et al. 1995; O'Brien et al. 1996; Armstrong et al. 1997; Ledda et al. 1999a; Kelly et al. 2005). According to our preliminary observations, 24 h after progestagen intravaginal sponges insertion (1 cm in diameter and 3 cm long), acute haemorrhagic vulvovaginitis was diagnosed in approximately 30% of treated lambs. Thus, for the welfare of the animals, in the present experiment, the sponge pre-treatment was replaced by intramuscular injections of progesterone.

Data from trial 1 indicate that in Karagouniko lambs, the pattern of follicular growth and development does not differ substantially from that of other breeds (Kennedy et al. 1974; Tassell et al. 1978). The number of large antral follicles, although not significantly different, increased progressively from the first to the second month and declined thereafter at the sixth month of age.

In trial 2 of our study, after gonadotrophin stimulation, the follicular population followed the pattern, non-stimulated lambs and was the highest during the second month (group MF1), then decreased gradually during the third (group SF2) and became the lowest during the fourth month (group SF3). In seeking to explain this finding, one could assume that, as in prepubertal goats (Baldassarre and Karatzas 2004), either a negative interaction exists between a particular age of the donor and sensitivity to gonadotropin stimulus or that the number of follicles at the time of hormonal treatment commencement is directly related to the number of follicles after FSH challenge. The latter hypothesis was supported from studies in lambs, calves (Armstrong et al. 1997; Meikle et al. 1998; Taneja et al. 2000) and adult ewes (Gonzalez-Bulnes et al. 2000).

A gradual decrease both in follicular population and in large follicle number was detected among different sessions of group MF. The variability of ovarian response in prepubertal lambs to hormonal stimulation is attributed to age, to differences between individuals and to hormonal treatment (Ptak et al. 1999, 2003). At the same age, the donor dependency was clearly found in group MF which is generally in concert with previous reports in lambs (Ptak et al. 2003) and in calves (Taneja et al. 2000). It has been found that the poorest response occurs in 3-month-old donors (Ptak et al. 2003). Donors of this age in our study showed a good follicular response both in groups MF and MV. This discrepancy could be attributed to differences between breeds of donor lambs. Interestingly, in both trials the poorest follicular response in repeatedly aspirated lambs was detected at the third OPU session. This observation indicates that apart from the age and the donor breed,

the antecedent follicular aspirations caused reduction in the number of follicles and collected oocytes at the third and fourth OPU session of group MF as was previously observed for adult ewes (Morton et al. 2005a). The observations of Remy et al. (1991) that xenogenic FSH is responsible for antibody production and refractoriness in goats cannot stand true in our study since, firstly FSH was of sheep origin and secondly the ovarian response, especially when adjusted FSH dose was used, indicated the lack of such refractoriness. The pattern of follicular development in lambs after OPU has not been extensively studied. It is believed that in young lambs normal follicular development does not follow the wave-like pattern which occurs in prepubertal calves and adult ewes and it is mainly affected by the reason of birth, age and breed for yet unknown (unsolved) reasons (Bartlewski et al. 2006). It has been demonstrated that the ovarian response to gonadotrophins is positively related to the number of 2–3 mm follicles present in the ovaries at the start of superovulatory treatment (Gonzalez-Bulnes et al. 2000); follicles of this size become gonadotrophin dependent.

Follicular response was good in all OPU sessions in group MV which could be ascribed to the greater FSH dose administered. Previous studies supported that prepubertal donors needed lower hormone doses than adults did, due to their lower body weight (Armstrong et al. 1997) and hence the same FSH dose was administered irrespectively of the body weight. In group MV, lambs ovarian response appeared to be – at least at particular ages – dose dependent and not age dependent. This is exemplified by the higher follicular population during the fifth month and the higher number of large follicles at the third and fifth month of age in comparison with the respective MF subgroups. Furthermore, if the results from the first session were omitted (since both groups received the same dose of FSH), in the remaining three sessions, where the dose adjustment was practically applied, significantly more oocytes were collected per donor from group MV than from group MF.

In previous studies, it was supported that the efficiency of embryo production from prepubertal oocytes increased with age of donor-lambs (Morton et al. 2005b), calves (Presicce et al. 1997) and kids (Baldassarre and Karatzas 2004). However, O'Brien et al. (1997b) found that while oocytes collected from 3 to 6-weeks-old stimulated lambs and from 16 to 24-weeks-old unstimulated ones, have the same maturational capacity, the proportion of oocytes forming blastocysts was greater in those derived from younger than from older lambs. In contrast, Earl et al. (1995) reported that the developmental competence of oocytes collected from 8 to 9-weeks-old stimulated lambs was not different from those of 4-month-old unstimulated lambs. In the present study, the percentage of matured oocytes was not different among donor-lambs ageing 2 and 5 months (group MV1 and SF4, respectively) but none of the collected oocytes from 3 and 4-month-old lambs (group SF2 and SF3) matured *in vitro*. Beyond the possible differences between breeds in the responsiveness to the hormonal treatment and the different timing of follicular development, another explanation for this discrepancy could be the health status of the

aspirated follicles. A higher proportion of developmentally competent oocytes are contained in larger follicles than in smaller ones (Ledda et al. 1999b). Developmental competence of oocytes from small follicles is disturbed in higher degree by follicular atresia in comparison with that of oocytes from larger follicles (Mermillod et al. 1999). Thus, in groups SF2 and SF3, the developmental failure during IVM would suggest that the majority of aspirated follicles were in the process of atresia. In fact, in ewe-lambs, early stages of atresia are observed as early as the fourth week of age, and all follicles ≥ 1 mm showed some signs of atresia (Kennedy et al. 1974; Tassell et al. 1978; Sonjaya and Driancourt 1987). It is known that atresia can be prevented in early stages after gonadotrophin administration, albeit the negative effects on the oocyte (Worthington and Kennedy 1979; Tassell and Kennedy 1980). Hence, the highest proportion of matured oocytes from groups MF2 and MF3 in comparison with those of SF2 and SF3 should be sought to follicle health status, since previous aspirations had deprived the ovary of atretic follicles.

Using higher FSH dose, a better ovarian response at 3 and 5 months of age and more collected oocytes per lamb at 4 and 5 months of age was achieved in comparison with the fixed FSH dose, but without resulting in a better developmental competence of the collected oocytes. Many of the published studies provide enough empirical evidence to prove that gonadotropin treatment did not affect the developmental capacity of collected oocytes from lambs (O'Brien et al. 1997a; Ledda et al. 1999a), ewes (Morton et al. 2005a) or prepubertal and adult goats (Mogas et al. 1997), while others showed detrimental effects of superovulation on oocyte quality (Moor et al. 1985).

In this study, the proportion of matured oocytes was rather low, which was possibly attributed to the duration of their maturation. It has been reported that after 26 h of IVM more oocytes reach MII stage in comparison with those matured for 24 h (Kochhar et al. 2002) while others did not find any difference (O'Brien et al. 1996; Ledda et al. 1997). Another likely explanation for the low maturation proportion is the quality of oocytes, which is related to their origin (from large or small follicles) (Lonergan et al. 2003). Our results revealed that the quality of collected oocytes was only different between groups MF1–MF4 and MF4–SF4, without affecting significantly the percentage of matured oocytes. Aspirating follicles by means of a vacuum pump undoubtedly, leads to detachment of cumulus cells from collected oocytes (Shirazi et al. 2005). Oocytes collected in such a way inevitably undergo a mechanical denudation of cumulus cells but their ooplasm is not affected as it is manifested by the lack of signs of degeneration or darkened areas. However, the deficiency of compact cumulus cells negatively affects the IVM procedure.

The results described in the present study provide strong evidence that adjustment of FSH dose to body weight of juvenile lambs, results in an increased number of oocytes suitable for fertilization. Moreover, the low number and developmental competence of oocytes collected at particular ages can be reversed by a follicle ablation conducted one month earlier.

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by the project PENED 2001 (project code 01E4280, contributors European Union, General Secretariat of Research and Technology of Greece, and the dairy industry FAGE SA). Ms I. Valasi is subsidized by the same project.

References

- Anel L, Sevillano C, Alvarez M, Alegre B, Anel E, Dominguez JC, Carbajo MT, De La Fuente J, 1997: Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. *Theriogenology* **47**, 152.
- Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR, 1997: Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* **9**, 333–339.
- Baldassarre H, Karatzas CN, 2004: Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* **82–83**, 255–266.
- Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC, 2006: Ultrasonographic study of antral follicle development during sexual maturation in ewe lambs. *Small Rumin Res* **63**, 189–198.
- Earl CR, Irvine BJ, Kelly JM, Rowe JP, Armstrong DT, 1995: Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology* **43**, 203.
- Evans AC, Adams GP, Rawlings NC, 1994: Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil* **102**, 463–470.
- Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A, 2000: Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* **54**, 1055–1064.
- van den Hurk R, Zhao J, 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**, 1717–1751.
- Izquierdo D, Villamediana P, López-Bejar M, Paramio MT, 2002: Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* **57**, 1431–1441.
- Jorio A, Mariana JC, Lahlou-Kassi A, 1991: Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. *Anim Reprod Sci* **26**, 239–250.
- Kelly JM, Kleemann DO, Walker SK, 2005: Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology* **63**, 1876–1890.
- Kennedy JP, Worthington CA, Cole ER, 1974: The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J Reprod Fertil* **36**, 275–282.
- Kochhar HP, Wu B, Morris LH, Buckrell BC, Pollard JW, Basrur PK, King WA, 2002: Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod Dom Anim* **37**, 19–25.
- Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H, Downey BR, 2003: Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* **60**, 879–889.
- Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S, 1997: Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J Reprod Fertil* **109**, 73–78.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S, 1999a: Production and lambing rate of blastocysts derived from in vitro matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes. *J Anim Sci* **77**, 2234–2239.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S, 1999b: Follicular size affects the meiotic competence of in vitro matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev* **39**, 503–508.
- Loneragan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP, 2003: Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim* **38**, 259–267.
- de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TA, 1989: Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* **24**, 197–204.
- Meikle A, Tasende C, Garofalo EG, Forsberg M, 1998: Priming effect of exogenous oestradiol on luteinizing hormone secretion in prepubertal lambs. *Anim Reprod Sci* **54**, 75–85.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y, 1999: Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **54**, 449–460.
- Mogas T, Palomo MJ, Izquierdo MD, Paramio MT, 1997: Developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology* **47**, 1189–1203.
- Moor RM, Osborn JC, Crosby IM, 1985: Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fertil* **74**, 167–172.
- Morton KM, Catt SL, Hollinshead FK, Maxwell WM, Evans G, 2004: Production of lambs after the transfer of fresh and cryopreserved in vitro produced embryos from prepubertal lamb oocytes and unsorted and sex-sorted frozen-thawed spermatozoa. *Reprod Dom Anim* **39**, 454–461.
- Morton KM, de Graaf SP, Campbell A, Tomkins LM, Chis Maxwell WM, Evans G, 2005a: Repeat ovum pick-up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod Dom Anim* **40**, 422–428.
- Morton KM, Catt SL, Maxwell WM, Evans G, 2005b: In vitro and in vivo developmental capabilities and kinetics of in vitro development of in vitro matured oocytes from adult, unstimulated and hormone-stimulated prepubertal ewes. *Theriogenology* **64**, 1320–1332.
- Noel B, Bister JL, Paquay R, 1993: Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J Reprod Fertil* **99**, 695–700.
- O'Brien JK, Dwyer D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G, 1996: Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev* **8**, 1029–1037.
- O'Brien JK, Catt SL, Ireland A, Maxwell WMC, Evans G, 1997a: In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* **47**, 1433–1443.
- O'Brien JK, Beck NF, Maxwell WM, Evans G, 1997b: Effect of hormone pre-treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of oocytes in vitro and vivo. *Reprod Fertil Dev* **9**, 625–631.
- Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X, 1997: Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* **56**, 386–392.
- Presicce GA, Senatore EM, De Santis G, Stecco R, Terzano GM, Borghese A, De Mauro GJ, 2002: Hormonal stimulation and oocyte maturational competence in prepubertal Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* **57**, 1877–1884.
- Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P, 1999: Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod* **61**, 1568–1574.
- Ptak G, Tischner M, Bernabo N, Loi P, 2003: Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biol Reprod* **69**, 278–285.

- Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM, 2003: Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci* **78**, 259–270.
- Remy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumande J, Chupin D, Beckers JF, 1991: Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating-hormone. *Theriogenology* **36**, 389–399.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y, 1995: Low developmental capacity of in vitro matured and fertilize oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil* **103**, 115–120.
- Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM, 2005: A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. *Small Rumin Res* **58**, 283–286.
- Sonjaya H, Driancourt MA, 1987: Ovarian follicles during infancy in Romanov and Ile-de-France ewe lambs. *J Reprod Fertil* **81**, 241–248.
- Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X, 2000: Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* **62**, 206–213.
- Tassell R, Kennedy JP, 1980: Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb – fine structure and histochemistry. *Aust J Biol Sci* **33**, 675–687.
- Tassell R, Chamley WA, Kennedy JP, 1978: Gonadotrophin levels and ovarian development in the neonatal ewe lamb. *Aust J Biol Sci* **31**, 267–273.
- Tassell RJ, Kennedy JP, Bindon BM, Piper LR, 1983: Ovarian follicles of new-born Merino lambs from genetic lines which differ in fecundity. *Aust J Biol Sci* **36**, 351–355.
- Valasi I, Papanikolaou Th, Dimitriadis I, Deligiannis C, Amiridis GS, 2005: Ovum pick-up (OPU) in dairy lambs does not affect onset of puberty and future fertility. *Reprod Dom Anim* **40**, 388 (abstract).
- Worthington CA, Kennedy JP, 1979: Ovarian response to exogenous hormones in six-week-old lambs. *Aust J Biol Sci* **32**, 91–95.

Submitted: xx.xx.200x

Author's address (for correspondence): GS Amiridis, Clinic of Reproduction and Obstetrics, Veterinary Faculty, University of Thessaly, Trikalon str, PO Box 199, 43100 Karditsa, Greece. E-mail gsamir@vet.uth.gr



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Theriogenology xxx (2006) xxx–xxx

Theriogenology

www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the

Oocyte pick-up in juvenile lambs affects neither onset of puberty nor their future fertility

Irene Valasi^a, I. Menegatos^b, Th. Papanikolaou^a,
P. Goulas^c, G.S. Amiridis^{a,*}

^aDepartment of Reproduction and Obstetrics, Veterinary Faculty, University of Thessaly,
Trikalon Str., PO Box 199, 43100 Karditsa, Greece

^bDepartment of Anatomy & Physiology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 11855 Athens, Greece

^cDepartment of Animal Reproduction, Technological Educational Institution, Larissa 41110, Greece

Received 22 May 2006; received in revised form 29 June 2006; accepted 8 July 2006

Abstract

A study was designed to evaluate whether the time of onset of puberty and fertility of young ewe lambs would be affected by oocyte pick-up conducted in single or repeated sessions during the first months of lambs' live. Five groups of lambs from the Karagouniko breed were used (A–E each $n = 12$). In group A no treatments were applied (control group) while, laparoscopic follicular aspiration (OPU) was performed early in the third, fourth and fifth month of lambs age (groups C–E, respectively). From the second to fifth month of their age, group B lambs were aspirated four times in monthly intervals. All lambs were weighed at birth, weaning, at second month and monthly thereafter until the eighth month of age. Progesterone priming and ovarian stimulation by serial FSH administrations proceeded each OPU session. To determine onset of puberty blood progesterone concentration was assayed in samples collected initially every week and after the seventh month of age twice weekly. From the seventh month a fertile ram was introduced in each group and oestrous behavior/mating was daily monitored and recorded. Pregnancy diagnosis was carried out by transabdominal ultrasound scanning 55 days after rams' removal. At the fourth and fifth month of age group B lambs were lighter ($p < 0.05$) than controls, but this difference was later equalized. The time of onset of puberty did not differ between groups ($p = 0.069$) and ranged between 224 and 270 days. Some animals ($n = 15$) entered puberty with a full-length luteal phase having progesterone concentration greater than 1 ng/ml, while others ($n = 32$) exhibited one or two short luteal phases before luteal length restoration. During the first breeding season 41 animals were fertilized and maintained pregnancy to term, without noticeable differences between groups ($p = 0.555$). During the second breeding season, all ewes were naturally served and lambled at the expected time.

It is concluded that OPU in young dairy lambs does not affect the time of onset of puberty, the endocrine profile of the lambs and it does not compromise their future fertility even if it is applied at four successive months.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Oocyte pick-up; Puberty; Progesterone; Sheep; Fertility

1. Introduction

In the recent years the demand for accelerated genetic gain of farm animals has been triggering the use of juvenile animals as a source of oocytes for in vitro embryo production. In vivo oocyte retrieval is, in

* Corresponding author. Tel.: +30 2441066073;

fax: +30 2441066077.

E-mail address: gsamir@vet.uth.gr (G.S. Amiridis).

general, preceded by ovarian stimulation, which is accomplished by a variety of hormonal regimes, resulting in increased follicular number and size. Based on the number and quality of collected oocytes, good oocyte-donor lambs, could be stimulated and aspirated repeatedly [1,2]. We have recently shown that the number and developmental competence of oocytes collected at particular ages from Karagouniko lambs can be improved by a follicle ablation conducted 1 month earlier [2]. Moreover, the latter study indicated that the adjustment of FSH dose to body weight of juvenile lambs results in an increased number of oocytes suitable for fertilization.

Follicular aspiration in ewe lambs is carried out either by laparotomy or by laparoscopic techniques because. The former approach is believed to minimize the formation of post-operative adhesions [3,4]. Nonetheless, it has been found that repeated transvaginal ovum pick-up in prepubertal calves caused histological lesions in their ovaries. These lesions, if in great extent, could alter the normal ovarian function and could possibly affect their future fertility [5].

The onset of puberty is a complicated process which is regulated by genetics (breed), growth rate, metabolic cues, nutrition, stress, social cues, photoperiod and gonadal steroids [6–8].

Experimental data have shown that premature exposure to short days can lead either to early or late onset of puberty depending on the age at which the lambs were exposed to the artificial photoperiod [7,9,10]. Delayed onset of puberty also occurs in undernourished lambs [7,10]. Hormonal treatments may also affect the timing of onset of puberty; early puberty can be induced in prepubertal heifers treated

aspiration after ovarian stimulation in Karagouniko ewe lambs on their (a) onset of puberty, (b) body weight and (c) future reproductive performance.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatments

All experiments described in this study were approved and carried out under a special license issued by the Hellenic Ministry of Rural Development and Food (license no. 1520/14-4-2003).

Sixty Karagouniko breed ewe lambs born during winter of 2003–2004 were kept in an open paddock (latitude 39°26'N). After weaning the lambs were fed alfalfa hay (up to 1 kg/head/day) and a commercial concentrate mixture (up to 0.5 kg/head/day). At the age of 7–8 weeks, ewe lambs were divided into five equal groups (A–E; $n = 12$). In lambs of group A no treatment was applied (control group). Laparoscopic follicular aspiration (OPU) was performed one time in lambs aged 12–13 weeks (group C), 16–17 weeks (group D) or 20–21 weeks (group E). In group B lambs, starting from the eighth to ninth week of age four OPU replicates were performed in monthly intervals. Before each OPU, ovarian stimulation was carried out with the same hormonal regime. Before each OPU session lambs received two injections of 25 mg of progesterone 3 days apart [Day 0 (first P4 injection) and Day 3 (second P4 injection), Proluton Depot, Schering AG, Germany]. Beginning on D3, ovarian stimulation was carried out by 3.52 mg ovine FSH (Ovagen, Bodinco B.V., Holland), given in six occasions at 12 h intervals [2]. Prior to each scheduled OPU, lambs were deprived of food and water

