

FOLLIKULITE PUNKTEERIMINE JA MUNARAKKUDE ASPIREERIMINE ULTRAHELI KONTROLLI ALL VEISTEL

J. Kurökin

SUMMARY: *Ultrasound guided puncture of follicles and aspiration of oocytes in heifers.* The aims of the present study were to evaluate the function and the practicality of a technically modified device for ultrasound guided puncture of follicles and aspirations of oocytes, to determine the influence of ultrasound guided aspiration of oocytes once a week on cyclicity and possible traumatic effects of repeated puncture of follicles on the genital tract in heifers.

For puncture of follicles and oocyte aspiration a special stainless steel endovaginal holder equipped inside with multiple angle sector transducer (Pie Medical, 5.0–7.5 MHz) and on ventral position with single lumen needle guide was used. The major difference of the present device compared to other instruments which have been presented (Pieterse et al., 1988; Gibbons et al., 1994; Looney et al., 1994; Bols et al., 1995) is the possibility for the operator to control the movement of the aspiration needle. In most other instruments presented, the puncture of the follicles is performed by an assistant who manually pushes the needle into the follicles (Pieterse et al., 1988; Gibbons et al., 1994; Scott et al., 1994; Bungartz et al., 1995). It is advantageous if the same person controls both the direction of the probe and the puncture of the follicles. A second advantage with the present unit is that disposable needles are used which are simply changed after each puncture session.

Two heifers of the Swedish Red and White breed (13 and 14 months of age) were used in the experiment. All follicles ≥ 3 mm were punctured and the follicular fluid was aspirated. The cyclicity of heifers was determined on the basis of estrous signs and progesterone (P_4) concentrations in blood plasma. During the first 6 weeks the recovery rate of oocytes (percentage of oocytes recovered out of follicles punctured) was 36.4% (4/11). Following next 6 weeks a recovery rate of 41.4% (8/18) was achieved and after the last 4 weeks the recovery rate reached 73.7% (14/19). Our results show an increasing recovery rate by around 100% during 16 weeks ending up with final recovery rate of 73.7%. In the experiment, follicles larger 3 mm in diameter were punctured only in two heifers. This resulted in a limited total number of follicles punctured and oocytes aspirated. Also the person performing the puncture of follicles had no experience of the technique before the start of the experiment.

The once a week repeated oocyte aspirations appeared to have no influence on the cyclicity as judged by the P_4 profiles. However, no external estrous signs (e.g. vaginal discharge, vulvar reddening) were observed in 6 of the 7 estrous cycles. The lengths of the estrous cycles varied from 19 to 21 days, with a mean length of 19.71 ± 0.28 days. The mean length of estrous cycles in which two or three puncture sessions were performed was not significantly different, 19.33 ± 0.33 and 20.0 ± 0.40 days, respectively ($P > 0.05$). On an average, the P_4 levels reached maximum concentrations (21.73 ± 3.78 and 25.0 ± 0.25 nmol/l) at days 10.30 ± 1.66 and 10.25 ± 0.05 ($P > 0.05$) of the estrous cycle, independent on number of puncture sessions per cycle. There was a slight, but non-significant difference in the mean length of the luteal phases with two (13.33 ± 1.20 days) and three (16.25 ± 0.47 days) aspiration sessions per cycle ($P > 0.05$). The length of luteal regression did not differ ($P > 0.05$) between cycles with two or three aspiration sessions, 5.66 ± 1.66 and 7.50 ± 0.64 days, respectively. We can conclude that weekly punctures of follicles during a period of several estrous cycles have no influence on cyclicity in heifers.

Gross examination of the genital tracts following slaughter one week after last aspiration revealed a haematoma on the cranial side of vagina in one heifer and, in the other one, minor fibrous adhesions at the site of puncture of the vaginal wall. Histological examination of ovaries revealed an increased amount of connective tissue in one of the four ovaries.

Sissejuhatus

Maaailmas on järjest aktuaalsemaks muutunud veise munarakkude e. ootsüütide *in vitro* viljastus embrüote tootmise eesmärgil, sest siiani kasutatava, superovulatsioonil põhineva *in vivo* embrüote tootmise meetodi võimalused on võrdlemisi piiratud. Seda põhjustab väga lai varieeruvus doonorite munasarjade reaktsioonis follikulaarkasvu hormonaalsele stimuleerimisele: kuni 40% potentsiaalsetest doonoritest kas ei reageeri üldse või produtseerivad kuni 3 embrüot (Guilbault *et al.*, 1991; Callesen *et al.*, 1992; Christie *et al.*, 1992; Henriquez *et al.*, 1996). Ühe hormonaalsele stimuleerimisele reageerinud doonori kohta saadakse keskmiselt 5...6 siirdamiseks sobivat embrüot (Callesen *et al.*, 1992; Lohuis *et al.*, 1993; Reinders *et al.*, 1994; Lange, 1995; McGuirk, 1995; Gordon, 1996). Seevastu embrüote tootmine munarakkude *in vitro* viljastamise abil võimaldab saada embrüoid hulgaliselt ja ka nendelt kõrge geneetilise väärtusega lehmadel, kes hormonaalsele töötlusele ei reageeri. *In vitro* tehnoloogia kasutamisel on võimalik viljastada 80...90% munarakkudest ja saada eluvõimelisi embrüoid 40...50% munarakkude üldarvust (Hawk, Wall, 1994; Hasler *et al.*, 1995).

Siiani on embrüote tootmisel *in vitro* tingimustes munarakkude saamise põhiallikaks tapetud loomade munasarjad, kuid sel moel saadakse loomalt munarakke ainult üks kord ning on võimalik kultiveerida suhtelisel piiratud arv (maksimaalselt 15 kuni 20) embrüoid (Hamano, Kuwajama, 1993; Carolan *et al.*, 1994). Peale selle, tapetud loomade munasarjadest isoleeritud munarakud ei ole alati vabad patogeenidest (Bielanski *et al.*, 1993) ning, mis on kõige tähtsam, enamik selliselt toodetud embrüotest ei paku huvi geneetilisest aspektist, kuna tihti ei ole teada looma geneetiline väärtus (Pieterse *et al.*, 1991; Kruip *et al.*, 1994; Bols *et al.*, 1995; Gibbons *et al.*, 1995). Seetõttu on äärmiselt oluline välja töötada tehnoloogia munarakkude saamiseks elusloomadelt.

Munarakke on võimalik aspireerida elusloomade munasarjadest, kasutades transvaginaalset endoskoopiat (Webke, 1993) ja laparoskoopiat (Reichenbach *et al.*, 1993; Reichenbach *et al.*, 1994; Brem *et al.*, 1995), kuid selliste meetoditega munarakkude korduv saamine on limiteeritud armide tekkimisega operatsiooni kohal ja liidetega munasarjade piirkonnas (Pieterse *et al.*, 1991; Gibbons *et al.*, 1994; Looney *et al.*, 1994; Bungartz *et al.*, 1995; Stubbings, Walton, 1995).

Alternatiiviks nendele munarakkude saamise meetoditele on välja töötatud meetod ootsüütide aspireerimiseks elusloomade munasarjadest transvaginaalse antraalsete ovariaalfolliikulite punkteerimisega ultraheli kontrolli all (Pieterse *et al.*, 1988). See võimaldab korduvalt pika aja jooksul aspireerida ootsüüte teatud geneetilise väärtusega loomadelt, kusjuures ei ole vaja arvestada innatsükli järku ning ei ole tarvis kasutada doonorite munasarjadest follikulaarkasvu hormonaalset stimuleerimist (Pieterse *et al.*, 1988; Walton *et al.*, 1993; Bergfelt *et al.*, 1994; Kruip *et al.*, 1994; Vos *et al.*, 1994; Pavasuthipaisit *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1995; Dolman *et al.*, 1995; Gibbons *et al.*, 1995). Peale lehmade ja mullikate on sel meetodil võimalik aspireerida munarakke ka vasikate munasarjadest (Brogliatti *et al.*, 1995; Presicce *et al.*, 1995; Rick *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). See võimaldab *in vitro* tingimustes toodetud embrüotest järglaste saamisel tunduvalt lühendada generatsioonidevahelist intervalli ja sellega veelgi kiirendada karja geneetilist parandamist. Võrreldes munarakkude aspireerimise teiste kirurgiliste meetoditega on transvaginaalne, ultraheli kontrolli all toimuv antraalsetest folliikulitest munarakkude aspireerimise meetod kiirem ja ei põhjusta ka loomale traumasid (Pieterse *et al.*, 1991; Bols *et al.*, 1995; Stubbings, Walton, 1995). Viimasel ajal on see meetod võetud kasutusele mitmetes embrüosiirdamisega tegelevates kommertsfirmades (Hollandis, USA-s) *in vitro* embrüote tootmise eesmärgil, kusjuures munarakkude saamiseks kasutatakse ka neid geneetiliselt kõrgeväärtuslikke lehmi, kes ei reageeri follikulaarkasvu hormonaalsele stimuleerimisele või on sigimishäiretega (Stroud, Myers, 1993; Den Daas, Merton, 1994; Looney *et al.*, 1994; Hasler *et al.*, 1995).

Folliikulite areng loomade munasarjades on dünaamiline protsess ning likvideerides punkteerimisega juba arenenud suure folliikuli, võib häirida järgnevat follikulaarkasvu ja seega munasarja talitlust (Bergfelt *et al.*, 1994; Adams, Pierson, 1995). Folliikuli punkteerimine innatsükli varajases järgus võib pikendada luteaaljärgu algust ning kui folliikuli punkteerimine toimub innatsükli lõppjärgus, võib selle kulg pikeneda (Pieterse *et al.*, 1988; Pieterse *et al.*, 1991). Kõige selle tõttu vajab folliikulite punkteerimise meetodi kasutuselevõtt munarakkude aspireerimiseks elusloomadel mitmekülgsete uuringute läbiviimist. Esmajoones nõuab uurimist korduvalt teostatava folliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise võimalik traumaatiline mõju loomade suguelunditele ning sigimisfunktsioonile.

Ovariaalfolliikulite punkteerimise efektiivsus varieerub tunduvalt ja aspireeritud munarakkude arv sõltub mitmest faktorist, sealhulgas aspireerimiseks kasutatavatest seadmetest (Pieterse *et al.*, 1991; Simon *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1994; Vos *et al.*, 1994; Bols *et al.*, 1995; Lansbergen *et al.*, 1995; Kanitz *et al.*, 1996). Sel põhjusel omab folliikulite punkteerimiseks ja munarakkude aspireerimiseks kasutatavate seadmete täiustamine suurt praktilist tähtsust (Bols *et al.*, 1995; Gordon, 1996).

Uurimistöö eesmärk

Transvaginaalse ultraheli kontrolli all antraalsete ovariaalfolliikulite punkteerimise meetodi omandamine ja selle efektiivsuse selgitamine munarakkude aspireerimiseks elusloomadel.

Uurimistöö ülesanded

1. Omandada ultraheli kontrolli all toimuva transvaginaalse antraalsete ovariaalfolliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise tehnoloogia.
2. Selgitada välja tehniliselt modifitseeritud aspireerimisseadme funktsionaalsus ja praktilisus transvaginaalseks ovariaalfolliikulite punkteerimiseks ja munarakkude aspireerimiseks.
3. Uurida korduvalt teostatud transvaginaalse ovariaalfolliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise mõju loomade innatsüklile.
4. Uurida korduvalt läbiviidava transvaginaalse ovariaalfolliikulite punkteerimise traumaatilist mõju loomade suguelunditele.

Oma uurimused

Materjal ja meetodika

Loomad, aspireerimisseade, ultraheliaparatuur

Uuringud viidi läbi Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikooli sünnitusabi ja günekoloogia instituudis kahel 13 ja 14 kuu vanusel rootsi punast-valget tõugu mullikal. Ovariaalfolliikulite punkteerimiseks ja munarakkude aspireerimiseks kasutati koostöös Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikooli sünnitusabi ja günekoloogia instituudi teadlastega (prof. H. Gustafsson, prof. B. Larsson ja prof. H. Rodriguez-Martinez) modifitseeritud aspireerimisseadet, ultraheli sektorskannerit (Scanner 250, Pie Medical, Holland) ja intravaginaalseks kasutamiseks valmistatud mitmenurkset ultraheliandurit (Pie Medical, Holland) sagedustega 5,0...7,5 MHz. Enne munarakkude aspireerimist tehti kindlaks munasarjade seisund, folliikulite arv ja nende suurus. Selleks kasutati diagnostilist reaviisilise võrejaotusega ultraheliskannerit (Aloka SSD 210DXII, Aloka Co. Ltd., Japaa) ja suguelundite intrarektaalseks uurimiseks ettenähtud ultraheliandurit sagedusega 5,0 MHz.

Folliikulite punkteerimiseks ja munarakkude aspireerimiseks paigutati intravaginaalselt kasutatav ultraheliandur selleks spetsiaalselt konstrueeritud roostevabast terasest torujasse hoidjasse (pikkus 60 cm, sisemine läbimõõt 32,1 mm ja välimine läbimõõt 38 mm). Ultrahelianduri hoidja alumisse ossa paigutati aspireerimissüsteem, mis koosneb roostevabast terasest punkteerimisnõela hoidjast (58 cm pikk, sisemine läbimõõt 1,2 mm ja välimine läbimõõt 1,8 mm) ning vahetatavast punkteerimisnõelast (pikkus 50 mm, sisemine läbimõõt 0,8 mm ja välimine läbimõõt 1,1 mm), mis kinnitub nõelahoidja koonilisel otsal. Ultrahelianduri hoidja külge on kinnitatud käepide (13,5×3,0×3,4 cm), mis võimaldab operaatoril fikseerida aspireerimisseadme vajalikus asendis tupes ja vastava päästiku abil suunata punkteerimisnõela läbi tupeseina folliikulisse. Punkteerimisnõela hoidja operaatoripoolne ots ühendati silikoonvoolikute abil munarakkude kogumiseks ettenähtud katseklaasiga ning vaakumpumbaga.

Munarakkude aspireerimine ja selle mõju innatsüklile

Munarakkude aspireerimiseks paigutati loomad fikseerimisboksi ja nende liikumise piiramiseks süstiti intravenoosselt 1 mg 100 kg kehamassi kohta preparaati Domosedan (Orion Corp., Soome). Pärasoole kontraktsioonide ärahoidmiseks süstiti epiduraalselt 4 ml preparaati Xylocain adrenalin (Astra Läkemedel, Rootsi). Pärasoole tühjendamise ja tupeesiku puhasta-

mise järel kaeti aspireerimiseseade kontaktgeeli sisaldava latekskattega, viidi tuppe ning selle ots paigutati emakasuudme kõrvale.

Punkteerimiseks valitud munasari paigutati pärasoolde viidud käe abil vastu aspireerimiseseadme otsa, kontrollides samal ajal monitoril, et folliikul asuks punkteerimiseks ettenähtud spetsiaalselt märgistatud kohal. Vajutades päästikule punkteeriti tupesein ja seejärel folliikul, samal ajal pannes tööle vaakumpumba. Punkteeriti folliikulid läbimõõduga alates 3 mm-st. Aspireerimise lõpetamisel loputati süsteem hepariini sisaldava PBS-iga munarakkude kogumiseks ettenähtud katseklaasi. Munarakkude ülesotsimiseks kogutud vedelikus kasutati stereomikroskoopi Wild M-8 (Šveits).

Korduva transvaginaalse ultraheli kontrolli all läbiviidava ovariaalfolliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise mõju uurimiseks suguelunditele ja innatsükli teostati munarakkude aspireerimist kahel mullikal üks kord nädalas, kusjuures ühel mullikal aspireeriti munarakke kolme ning teisel nelja innatsükli jooksul. Korduvalt, üks kord nädalas teostatud folliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise mõju loomade innatsükli selgitati munasarjade ultrasonograafiliste uuringute, innatunnuste avaldumise ja vereplasma progesteroonisisalduse põhjal (innaperiood = progesteroonisisaldus vereplasmas $< 1,0$ nmol/l).

Munasarjade seisundi ja follikulaardünaamika ultrasonograafiline uurimine

Munasarjade seisundit ja follikulaardünaamikat uuriti ultrasonograafiliselt, kasutades selleks diagnostilist reaviisilise võrejaotusega ultraheliskannerit (Aloka SSD 210DXII, Aloka Co. Ltd., Jaapan) ja suguelundite intrarektaalseks kasutamiseks ettenähtud ultraheliandurit sagedusega 5,0 MHz. Munasarju uuriti kolm korda nädalas: kaks korda aspireerimisprotseduuride vahel (esmaspäev ja reede) ning veel üks kord vahetult enne aspireerimiste läbiviimist. Munasarjade ultrahelikujutisel hinnati nende seisundit ning loeti kasvanud folliikulite arv. Folliikulite suurus mõõdeti elektroonilise integraalse mõõturi abil. Kui ühel uurimisel folliikulit munasarjas ei olnud ja folliikul esines järgmisel uurimisel, loeti folliikuli kasvu algus päevast, mida arvatati uurimisvahelise intervalli pooleks jagamisega. Uuriti kokku 56 folliikuli dünaamikat. Munasarjade seisund registreeriti vastava printeri abil ultrasonogrammidel retrospektiivse analüüsi läbiviimiseks.

Hormonaalne analüüs

Hormonaalseks analüüsiks võeti mullikatel kägiveenist vereproovid hepariniseeritud katseklaasi (Venoject, Terumo Europe N.V., Belgia) neli korda nädalas (esmaspäev ja teisipäev ning neljapäev ja reede). Vereplasma eraldati kohe pärast verevõtmist tsentrifuugimise abil 15 min jooksul ($3000 \times g$) ning hoiti -20 °C juures progesteroonisisalduse määramiseni.

Progesteroonisisaldus vereplasmas määrati luministsentse immunoloogilise meetodi abil Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikooli biokeemia osakonnas, kasutades selleks reaktiivide komplekti *AMERILITE* Progesterone Assay (Johnson and Johnson Clinical Diagnostics Ltd., Inglismaa). Meetodi variatsioonikoefitsient oli alla 4% (2 nmol/l ja 160 nmol/l vahel). Keskmise proovidevaheline variatsioonikoefitsient kolme kvaliteedi kontrollproovi jaoks oli alla 15,3% (1,6 nmol/l, 17,5 ja 46,05 nmol/l). Meetodi määramise limit oli 0,18 nmol/l.

Loomade suguelundite morfoloogiline ja histoloogiline uurimine *post mortem*

Üks nädal pärast viimast folliikulite punkteerimist ja munarakkude aspireerimist saadeti loomad lihakombinaati ning nende suguelundeid uuriti morfoloogiliselt. Morfoloogilise uurimise järel teostati munasarjade histoloogiline uurimine. Munasarjad lõigati tükkideks, fikseeriti 10%-s formaliinis ning seejärel sisestati parafiini. Parafiinlõigud (5 μ m) värviti hematoksüliini ja eosiiniga.

Andmete statistiline analüüs

Innatsükli näidud, folliikulite arv looma kohta nädalas ja nende kasvukiirus, punkteeritud folliikulite ja aspireeritud munarakkude arv ning progesteroonisisalduse keskmised näidud ja keskmiste näitude standardhälbed arvatati, kasutades Statistical Analysis Systemi arvutiprogrammi (SAS, 1987). Saadud andmete hindamiseks kasutati t-testi, võrreldes erinevusi keskmiste vahel. Erinevused loeti usutavateks, kui P oli $< 0,05$.

Uurimistulemused

Munarakkude aspireerimise efektiivsus

Uurimistöö esimeseks ülesandeks oli omandada ultraheli kontrolli all toimuv folliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise tehnoloogia elusloomadel ning selgitada välja modifitseeritud aspireerimiseseadme sobivus. Modifitseeritud aspireerimiseseadet oli kerge paigutada tuppe ja kõik seadmega toimuvad manipulatsioonid tupes, selle fikseerimine emakasuudme kõrval, samuti munasarja rektaalne fikseerimine vastu selle otsa ja folliikulite punkteerimine olid kergelt teostatavad ainuüksi operaatore poolt. Meetodi omandamise alguses oli munarakkude aspireerimise efektiivsus, s.o. aspireeritud munarakkude protsent punkteeritud folliikulitest 36,4% (aspireeriti 4 munarakku 11 folliikulist). Selle järel aspireerimise efektiivsus tõusis 41,4%-ni (8 munarakku 18 folliikulist) ning lõpuks ulatus see 73,7%-ni (14/19).

Korduva transvaginaalse folliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise mõju loomade innatsüklile

Korduvat, üks kord nädalas toimuvat munarakkude aspireerimist teostati ühel mullikal kolme ja teisel nelja innatsükli jooksul. Vastavalt aspireerimise järel toimuvale follikulaarkasvule oli võimalik ühe innatsükli jooksul teostada kas kolm aspireerimisprotseduuri (kokku neljal innatsükli) või kaks aspireerimisprotseduuri (kolmel innatsükli). Kokku teostati seitsme innatsükli jooksul 18 aspireerimisprotseduuri. Esimene, teine ja kolmas munarakkude aspireerimisprotseduur viidi läbi keskmiselt vastavalt $5,14 \pm 0,82$, $11,57 \pm 0,86$ ja $17,5 \pm 1,32$ innatsükli päeval.

Visuaalselt avastatavaid innatunnuseid ei esinenud kuuel innatsükli seitsmest. Neid tunnuseid registreeriti üks kord ainult ühel mullikal ning ühel korral esines mõlemal katses olnud mullikal innajärgne verejooks. Vereplasma progesteroonisisalduse retrospektiivne analüüs näitas, et seitsme innatsükli pikkus varieerus 19 ja 21 päeva vahel ning oli keskmiselt $19,71 \pm 0,28$ päeva. Innatsükli pikkus ei olenenud sellest, kas ühe innatsükli jooksul teostati kaks või kolm aspireerimisprotseduuri – oli vastavalt $19,33 \pm 0,33$ ja $20,00 \pm 0,40$ päeva ($P > 0,05$).

Vereplasma progesteroonisisaldus saavutas maksimumi ($21,73 \pm 3,78$ nmol/l) kahe aspireerimisprotseduuri korral innatsükli jooksul keskmiselt $10,30 \pm 1,66$ innatsükli päevaks ja kolme aspireerimisprotseduuri korral $25,00 \pm 0,25$ nmol/l $10,25 \pm 0,05$ innatsükli päevaks ($P > 0,05$). Progesteroonisisalduse langus antud maksimaalsetest näitajatest minimaalse kontsentratsioonini ($< 1,0$ nmol/l) kestis kahe aspireerimisprotseduuri korral innatsükli jooksul $5,66 \pm 1,66$ päeva ja kolme aspireerimisprotseduuriga $7,50 \pm 0,64$ päeva ($P > 0,05$). Luteaaljärg kestis, kui ühe innatsükli jooksul teostati kolm aspireerimisprotseduuri, keskmiselt $16,25 \pm 0,47$ päeva ning oli kolme päeva võrra pikem, võrreldes luteaaljärgu keskmise pikkusega siis, kui ühe innatsükli jooksul teostati kaks aspireerimisprotseduuri ($13,33 \pm 1,20$ päeva). See kolmepäevane erinevus ei ole statistiliselt usutav ($P > 0,05$).

Munarakkude aspireerimise järel esines 3...6. päeval, s.o. keskmiselt $3,8 \pm 0,18$ päeva pärast, iga looma munasarjades keskmiselt $3,11 \pm 0,30$ uut folliikulit läbimõõduga $4,88 \pm 0,41$ mm. Seega folliikulite kasv oli $1,28 \pm 0,24$ mm ööpäevas. Väiksuse tõttu aspireerimata jäänud folliikulid (läbimõõt alla 3 mm) kasvasid keskmiselt kuni $3,25 \pm 0,37$ mm suuruseni ning seejärel taandarenesid $4,25 \pm 0,57$ päeva jooksul, s.o. $0,76 \pm 0,49$ mm ööpäevas.

Morfoloogilised ja histoloogilised muutused suguelundites *post mortem*

Üks nädal pärast viimase aspireerimisprotseduuri läbiviimist leiti suguelundite morfoloogilisel uurimisel ühel mullikal emakasuudme kõrval tupeseina punkteerimise kohal nõrgalt nähtav fibrinoosne katt ning teisel mullikal samal kohal verevalum. Munasarjade morfoloogilisel uurimisel silmanähtavaid muutusi ei leidunud. Histoloogilisel uurimisel leiti munasarjades sidekoerakkude mõningast suurenemist munasarja stroomas ainult ühes munasarjas neljast.

Uurimistulemuste arutelu

Meie esimeseks ülesandeks oli omandada ultraheli kontrolli all toimuva folliikulite punkteerimise ja munarakkude aspireerimise meetod elusloomadel ning selgitada välja modifitseeritud aspireerimisseadme sobivus. Modifitseeritud seadme paigutamine tuppe, munasarja paigutamine aspireerimisseadme otsa vastu ja punkteeritava folliikuli orienteerimine monitoril märgistatud kohale, aspireerimisnõela suunamine läbi tupeseina päästiku abil ja seejärel folliikulisse oli kergelt teostatav.

Aspireerimisseadme põhiline eelis võrreldes teiste kasutatavate seadmetega (Pieterse *et al.*, 1991; Gibbons *et al.*, 1994; Looney *et al.*, 1994) seisneb selles, et see võimaldab fikseerida aspireerimisseadme tupes, pärasoole kaudu hoida folliikulit vastu selle otsa, suunata aspireerimisnõela ning punkteerida folliikuleid ainuüksi operatori poolt. Teistel aspireerimisseadmetel puudub käepide ja päästik ning operatori ülesandeks on ühe käega aspireerimisseadme fikseerimine tupes ja teise käega rektaalselt munasarja hoidmine vastu selle otsa. Folliikulite punkteerimine toimub assistendi poolt, kes suunab punkteerimisnõela läbi tupeseina ning seejärel folliikulisse (Pieterse *et al.*, 1991; Gibbons *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1994, 1995; Bungartz *et al.*, 1995). Meie seadme teiseks eeliseks on vahetatavate aspireerimisnõelte kasutamise võimalus pärast munarakkude aspireerimise lõpetamist ühel loomal, millega langeb ära sama nõela desinfitseerimise vajadus teise looma jaoks, mida on vaja teha iga kord teiste aspireerimisseadmete puhul, kus aspireerimisnõel ei ole vahetatav.

Meie aspireerisime munarakke folliikulitest läbimõelduga alates 3 mm-st. Selle tõttu oli punkteeritud folliikulite ja aspireeritud munarakkude arv ühe aspireerimisprotseduuri kohta väiksem kui teistel uurijatel (Bungartz *et al.*, 1995; Lansbergen *et al.*, 1995; Pavasuthipaisit *et al.*, 1995), kes punkteerisid folliikuleid läbimõelduga alates 2 mm-st. Uuringute algul puudusid ka aspireerimise tehnilised kogemused. Munarakkude aspireerimise lõplik 73,7% efektiivsus on samasugune teiste uurijate poolt saavutatud munarakkude aspireerimise efektiivsusega transvaginaalse endoskoopia abil (Webke, 1993) või ultraheli kontrolli all läbiviidava meetodiga saadud tulemustega (Looney *et al.*, 1994; Bungartz *et al.*, 1995).

Vereplasma progesteroonisisalduse retrospektiivne analüüs näitas mõningast erinevust innatsükli keskimes pikkuses, kui ühe innatsükli jooksul teostati kaks või kolm aspireerimisprotseduuri, kuid see ei olnud statistiliselt usutav. Innatsükli pikkused ei olnud alla 18 päeva ja ei ületanud 21 päeva, mis vastab normaalse innatsükli pikkusele (Sirois, Fortune, 1988; Kastelic *et al.*, 1990). Märgitakse, et munarakkude aspireerimine innatsükli varajases järgus mõnevõrra pikendab luteaaljärgu algust, kuid innatsükli pikkust see oluliselt ei muuda (Pieterse *et al.*, 1988; Pieterse *et al.*, 1991). Meie uuringus progesteroonisisalduse analüüsi järgi ei toimunud innatsükli luteaaljärgu alguse hilinemist ning luteaalse (kollakeha) regressiooni algus ja selle perioodi pikkus meie uuringutes ei sõltunud sellest, kas ühe innatsükli jooksul teostati kaks või kolm aspireerimisprotseduuri ning meie andmed on sarnased tavaliste innatsükli vastavate näitajatega (Ginther *et al.*, 1989; Stubbings, Walton, 1995). Meie uuringus visuaalselt avastatavate innatunnuste puudumine mullikatel on täheldatud ka teiste uurijate poolt (Pieterse *et al.*, 1988).

Munasarjade ultrasonograafiline uurimine näitas, et iganädalase munarakkude aspireerimise tõttu follikulaardünaamika häiritud ei olnud ja meie poolt saadud folliikulite kasvu ja atresia kiiruse andmed ei erine näitajatest, mis on saadud follikulaardünaamika ultrasonograafilise uuringu tulemusena nendel loomad, kellel munarakke ei ole aspireeritud (Fortune *et al.*, 1988; Ginther *et al.*, 1989).

Suguelundite morfoloogilisel uurimisel leiti ühel mullikal tupeseina punkteerimise kohal fibrinoosne katt, ilmselt sein punkteerimisel tekkinud verevalumi tagajärg. Seda kinnitab teisel loomal leitud verevalum tupeseina punkteerimise kohal. Munasarjades silmaga nähtavad muutusi meie uuringus ei diagnoositud, mis erineb teiste uuringute leidudest, kus üks nädal pärast munarakkude aspireerimist diagnoositi munasarjade valkjaskesta kõvastumist (Pieterse *et al.*, 1991; Van der Schans *et al.*, 1991; Kruij *et al.*, 1994) ning leiti fibrinoosne katt kuuel munasarjal kaheksast (Gibbons *et al.*, 1994), kuid nendes uuringutes loomade seemendusele järgnev tiinestumine näitas, et need muutused olid lühiajalised ja loomade sigimisfunktsiooni ei mõjutanud. See leiab kinnitust ka teises uuringus, kus kõik 31 mullikat tiinestusid seemenduse järel 68 päeva jooksul pärast viimast munarakkude aspireerimist (Matthews *et al.*, 1995). On näidatud, et korduv ultraheli abil teostatud munarakkude aspireerimine isegi prepubertaalse perioodi jooksul ei mõjutanud loomade sigimisvõimet (Brown *et al.*, 1996).

Kokkuvõte ja järeldused

Modifitseeritud seadme kasutamisel on võimalik punkteerida kõiki folliikuleid, mille diameeter oli 3 mm või enam, ja munarakke saadi enamikust (73,3%) punkteeritud folliikulistest. Folliikulite punkteerimisel munarakkude aspireerimiseks üks kord nädalas innatsükli pikkus varieerus 19 kuni 21 päevani ja ei sõltunud sellest, kas munarakke aspireeriti innatsükli jooksul kaks või kolm korda, olles keskmiselt vastavalt 19,33 ja 20,0 päeva.

Uuringu põhjal võib järeldada, et ultraheli kontrolli all teostatud korduv transvaginaalne antraalsete folliikulite punkteerimine munarakkude saamiseks *in vitro* viljastamise eesmärgil ei mõjuta mullikate innatsükli pikkust ning folliikulite korduva punkteerimise järel tekkinud muutused tupeseinas ja munasarjas ei ole märkimisväärsed.

Tänuavaldused. Uurimistööd finantseerisid Rootsi Instituut ja Eesti Teadusfond. Autor tänab prof. H. Gustafssoni, prof. B. Larssoni ja prof. H. Rodriguez-Martinezi võimaluse eest teostada uuringud Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikooli sünnitusabi ja günekoloogia instituudis. Autor tänab prof. I. Määrseppa nõuannete ja märkuste eest artikli vormistamisel.

Kirjandus

- Adams G. P., Pierson R. A. Bovine model for study of follicular dynamics in humans. – *Theriogenology*, vol. 43, p. 113...120, 1995.
- Bergfelt D. R., Lightfoot K. C., Adams G. P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. – *Theriogenology*, vol. 42, p. 895...907, 1994.
- Bielanski A., Loeven K. S., Del Campo M. R., Sirard M. A., Willadsen S. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. – *Theriogenology*, vol. 40, p. 531...538, 1993.
- Bols P. E. J., Vandenheede J. M. M., Van Soom A., de Kruif A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. – *Theriogenology*, vol. 43, p. 677...687, 1995.
- Brem G., Reichebach H. D., Wiebke N., Wenigerking H., Palma G. *In vitro* production and breeding applications of cattle embryos produced *in vitro* after repeated endoscopically guided oocyte aspiration (OVP). – *Zuchtungskunde*, vol. 67, p. 4...14, 1995.
- Brogliatti G. M., Swan C. D., Adams G. Transvaginal ultrasound guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves. – *Theriogenology*, vol. 43, p. 177 (abstr.), 1995.
- Brown R. T., Brogliatti G. M., Adams G. P. Postpubertal fertility subsequent to repeated transvaginal oocyte collection. – *Theriogenology*, vol. 45, p. 358, 1996.
- Bungartz L., Lucas-Hahn A., Rath D., Niemann H. Collecting of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. – *Theriogenology*, vol. 43, p. 667...675, 1995.
- Callesen H., Bak A., Greve T. Embryotechnology in dairy cattle breeding. – In: A. Lauria and F. Gandolfi (Editors), *Embryonic Development and manipulation in Animal Production: Trends in Research and Applications*. – Portland Press, London and Chapel Hill, p. 207...214, 1992.
- Callesen H., Liboriussen T., Bak A., Greve T. Realised reproductive efficiency in MOET nucleus breeding cattle herds. – *Proc. 1st Integrated European Conf. on Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding*. – Krakow, p. 97...102, 1994.
- Carolan C., Monaghan P., Gallagher M., Gordon I. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. – *Theriogenology*, vol. 41, p. 1061...1068, 1994.
- Christie W. B., McGuirk B.J., Strachie R. J., Mullan J. S. Practical experience with the implementation of a MOET breeding scheme with dairy cattle. – *Ann Zootech*, vol. 41, p. 347...352, 1992.
- Den Daas N., Merton S. *In vitro* embryo production, its use. – *Proc 10th Meet EETA*. – Lyon, p. 117...124, 1994.
- Gibbons J. R., Beal W. E., Krisher R. L., Faber E. G., Pearson R. E., Gwazdauskas F. C. Effects of once-versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. – *Theriogenology*, vol. 42, p. 405...419, 1994.
- Gibbons J. R., Krisher R. L., Carlin S. K., Pearson R. E., Gwazdauskas F. C. *In vitro* embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. – *Theriogenology*, vol. 42, p. 1129...1139, 1995.

- Gordon I. Controlled reproduction in Cattle and Buffaloes. – Embryo Transfer and Associated techniques in Cattle. – Cambridge, p. 431, 1996.
- Guilbault L. A., Lussier J. G., Grasso F., Matton P., Rouillier P. Follicular dynamics and superovulation in cattle. – Can Vet, vol. 32, p. 91...93, 1991.
- Hamano S., Kuwajama M. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. – Theriogenology, vol. 39, p. 703...712, 1993.
- Hasler J. F., Henderson W. B., Hurtgen P. J., Jin Z. Q., McCauley A. D., Mower S. A., Neely B., Shuey L. S., Stokes J. E., Trimmer S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. – Theriogenology, vol. 43, p. 141...152, 1995.
- Hawk H. M., Wall R. J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. – I. Selection of oocytes and zygotes. – Theriogenology, vol. 41, p. 1571...1583, 1994.
- Henriquez M. M., Gurolla D. I., Gamboa V. J., Estrada B. E., Garcia D. B. Superovulatory response in New Zealand Holstein cows stimulated with Menopausal gonadotrophins in North-Western Mexico. – The 13th Int Cong Anim Reprod, Sidney, Australia, vol. 2, p. 24...28, 1996.
- Kanitz W., Torner H., Alm H., Becker F., Kuzmina T., Nürnberg G. Aspects of *in vitro* production of cattle embryos. – J Phys and Pharm, vol. 47, p. 55...70, 1996.
- Kruij Th. A. M., Boni R., Wurth Y. A., Roelofsen M. W. M., Pieterse M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production. – Theriogenology, vol. 42, p. 675...684, 1994.
- Lange H. Embryotransfer bei der OHG 1993/94. – Osnabrücker Schwartzbuntzucht, vol. 69, p. 37...38, 1995.
- Lansbergen L. M. T. E., van Wagtenonk-de Leeuw A. M., den Daas J. H. G., de Ruigh L., van der Streek G., Reinders J. M. C., Aarts M., Rodewijk J. Factors affecting ovum pick up in cattle. – Theriogenology, vol. 43, p. 259 (abstr.), 1995.
- Lohuis M. M., Smith C., Dekkers J. C. M. MOET results from a dispersed hybrid nucleus programme in dairy cattle. – Anim Prod, vol. 57, p. 369...378, 1993.
- Looney C. R., Lindsey B. R., Gonseth C. L., Jonson D. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. – Theriogenology, vol. 42, p. 67...72, 1994.
- Matthews L., Petersen H., Van Beek K. Use of linear ultrasound transducer for commercial application of transvaginal oocyte recovery. – Theriogenology, vol. 43, p. 275 (abstr.), 1995.
- McGuirk B. J. Experiences with a MOET breeding programme. – European Holst Fries Conf, Peebles, UK, 1995. – 9 p.
- Paul J. B., Looney C. R., Lindsay B. R., Godke R. A. Gonadotropin stimulation of cattle donors at estrus for transvaginal oocyte collection. – Theriogenology, vol. 43, p. 294 (abstr.), 1995.
- Pavasuthipaisit K., Holyoak R. G., Tocharus C., Kitiyanan Y. Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. – Theriogenology, vol. 43, p. 295 (abstr.), 1995.
- Pieterse M. C., Kappen K.A., Kruij Th. A. M., Taverne M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. – Theriogenology, vol. 30, p. 752...762, 1988.
- Pieterse M. C., Vos P. L. A. M., Kruij Th. A. M., van Benden Th. H., Willemsse A. H., Taverne M. A. M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. – Theriogenology, vol. 35, p. 19...24, 1991.
- Presicce G. A., Jiang S., Simkin M., Yang X. Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves. – Biol Reprod, vol. 52, p. 127, 1995.
- Reichebach H. D., Wiebke N., Besenfelder U. H., Modl J., Brem G. Transvaginal laparoscopic guided aspiration of bovine follicular oocytes: preliminary results. – Theriogenology, vol. 39, p. 295 (abstr.), 1993.
- Reichebach H. D., Wiebke N., Modl J., Zhu J., Brem G. Laparoscopy through the vaginal fornix of cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. – Vet Rec, vol. 135, p. 353...356, 1994.
- Reinders J. M. C., Vinke J., Markvoort G. W. F., Oldeniel J. H. M. The efficiency of the MOET program on a donor station. – Proc Assoc Eur Transfer Emb, p. 240 (abstr.), 1994.
- Rick G., Haderl K. G., Lemme E., Lucas-Hahn A., Rath D., Schindler L., Niemann H. Long-term ultrasound guided ovum pick-up in heifers from 6 to 15 months of age. – Theriogenology, vol. 45, p. 356 (abstr.), 1996.
- SAS Institute Inc., 1987. SAS/STAT™ Guide for personal computers. – Version 6th Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. – 1028 p.
- Scott C. A., Robertson L., de Modura R. T. D., Paterson C., Boyd J. S. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. – Vet Rec, vol. 23, p. 440...443, 1994.
- Simon L., Bungartz L., Rath D., Niemann H. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. – Theriogenology, vol. 39, p. 313 (abstr.), 1993.

- Stroud B. K., Myers M. W. Clinical results in a commercial IVF facility. – *Ars Vet*, vol. 9, p. 105...113, 1993.
- Stubbings R. B., Walton J. S., Armstrong D. T., Basur P. K. Recovery of bovine oocytes from small vesicular follicles for *in vitro* maturation and fertilization. – *Vet Res Com*, vol. 14, p. 71...81, 1990.
- Stubbings R. B., Walton J. S. Effect of ultrasonically guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. – *Theriogenology*, vol. 43, p. 705...712, 1995.
- Van der Schans A., Van der Westerlacen L. A. J., de Wit A. A. C., Eyestone W. E., de Boer H. A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. – *Theriogenology*, vol. 35, p. 288 (abstr.), 1991.
- Vos P. L. A. M., de Los F. A. M., Pieterse M. C., Bevers M. M., Taverne M. A. M., Dieleman S. J. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular-fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. – *Theriogenology*, vol. 41, p. 829...840, 1994.
- Walton J. S., Christie K. A., Stubbings R. B. Evaluation of frequency of ultrasound guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. – *Theriogenology*, vol. 39, p. 336 (abstr.), 1993.
- Wiebke N. *Ex vivo* collection of bovine cumulus oocyte complexes by transvaginal follicular aspiration guided by laparoscopy. – Thesis, University of Munich, 1993. – 199 p.