

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ
ΖΩΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΖΩΩΝ
ΣΤΗΝ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ:
«ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΖΩΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ ΜΕ
ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΚΛΥΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ
ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Δ. ΛΙΑΚΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χαδιώ Σ., Αναπλ. Καθηγήτρια

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ
ΖΩΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΖΩΩΝ
ΣΤΗΝ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ:
«ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΖΩΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ ΜΕ
ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΚΛΥΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ
ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Δ. ΛΙΑΚΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χαδιώ Σ., Αναπλ. Καθηγήτρια

Εξεταστική Επιτροπή:

Χαδιώ Σ., Αναπλ. Καθηγήτρια

Χαρισμιάδου Μ., Επίκουρος Καθηγήτρια

Μπιζέλης Ι., Καθηγητής

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2014

«Η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013».



«Θερμές ευχαριστίες στους καθηγητές και το προσωπικό του εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων την Κ. Χαδιώ Στέλλα, τον κ. Καλογιάννη Δημήτρη και τον κ. Μενεγάτο Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που προσέφεραν ώστε να υλοποιηθεί η συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή. Καθώς επίσης όλους εκείνους, επιφανής και μη... που συνέδραμαν, καθένας με το τρόπο του, στην ολοκλήρωσή αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος!

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Λιάκο του Αντωνίου, για τη τιμή που μας έκανε παραχωρώντας το ζωικό του κεφάλαιο για την πραγματοποίηση του πειράματος της διατριβής. Ελπίζω μέσω αυτής της διαδικασίας να δόθηκαν απαντήσεις σε αρκετά προβλήματα της εν λόγω εκτροφής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο και συνάδελφο Ιωάννη Δαούτη, διότι το εν λόγω μεταπτυχιακό πρόγραμμα ενδεχομένως να μην είχε πραγματοποιηθεί, δίχως τη παρότρυνσή του!»

ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΚΛΥΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

ΛΙΑΚΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55, email: shad@aua.gr

Περίληψη

Σκοπός του πειράματος, ήταν α) η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου συγχρονισμού του οίστρου στα πρόβατα, που βασίζεται στη χρήση ενός αναλόγου GnRH σε συνδυασμό με προσταγλανδίνη PGF_{2α} και η σύγκρισή του με ένα κλασσικό πρωτόκολλο συγχρονισμού του οίστρου, με τη χρήση ενδοκολπικών σπόγγων και χορήγηση eCG και β) η διερεύνηση της μέτρησης της συγκέντρωσης της PAG (πρωτεΐνες που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη) για τη διάγνωση της εγκυμοσύνης στο πρόβατο. Χρησιμοποιήθηκαν 30 πρόβατα, παρόμοιου σωματικού βάρους τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των 15 ατόμων η κάθε μία. Στην πρώτη ομάδα το πρωτόκολλο συγχρονισμού περιελάμβανε την εισαγωγή ενδοκολπικών προγεσταγονούχων σπόγγων, που παρέμειναν για 14 ημέρες και κατά την εξαγωγή τους χορηγήθηκαν 350IU ίππειας χοριακής γοναδοτροπίνης (eCG). Η εισαγωγή των κριών έγινε 24 ώρες μετά τη χορήγηση της eCG και ακολούθησε η παρατήρηση και καταγραφή των οίστρων. Ως ημέρα 0 θεωρήθηκε η ημέρα εισαγωγής των κριών.

Στη δεύτερη ομάδα το πρωτόκολλο συγχρονισμού περιελάμβανε μια ενδομυϊκή έγχυση ενός GnRH αναλόγου που ακολούθηθηκε από έγχυση προσταγλανδίνης επτά ημέρες μετά. Τριάντα έξι ώρες μετά την έγχυση της προσταγλανδίνης έγινε μια δεύτερη χορήγηση GnRH. Η εισαγωγή των κριών έγινε 12-14 ώρες μετά την εφαρμογή της δεύτερης GnRH και ακολούθησε ανίχνευση και καταγραφή του οίστρου. Ως ημέρα 0 θεωρήθηκε η ημέρα εισαγωγής των κριών.

Δείγματα γάλακτος λαμβάνονταν δύο φορές την εβδομάδα και για διάστημα ενός μηνός, πριν την έναρξη του πειράματος που έλαβε χώρα το πρώτο δεκαπενθήμερο του Ιουνίου για την μέτρηση των επιπέδων της προγεστερόνης. Δείγματα αίματος ελήφθησαν πριν από την έναρξη κάθε ορμονικής αγωγής και στη συνέχεια την 2^η, 5^η, 8^η, 11^η, 14^η, 17^η, 22^η, 29^η, 36^η, 45^η ημέρα μετά την εισαγωγή των κριών για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης. Επίσης στα δείγματα των ημερών 22, 36, 29 και 45 έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της PAG.

Στην πρώτη ομάδα 7 ζώα γονιμοποιήθηκαν στον πρώτο, ενώ 6 στο δεύτερο (4) και τρίτο (2) κύκλο μετά το συγχρονισμό. Τα υπόλοιπα 2 ζώα παρέμειναν στην άνοιστρη περίοδο. Στη δεύτερη ομάδα 4 ζώα παρουσίασαν κυκλική ωοθηκική δραστηριότητα μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου συγχρονισμού, αλλά μόνο ένα ζώο γονιμοποιήθηκε κατά τον κύκλο που ακολούθησε την αγωγή. Η μέτρηση των επιπέδων της προγεστερόνης στο γάλα έδειξε ότι τα υπόλοιπα ζώα βρίσκονταν σε άνοιστρη περίοδο.

Η συγκέντρωση της PAG παρουσίασε σημαντική αύξηση από την 29^η μέρα στα έγκυα ζώα, ενώ στα μη έγκυα παρέμεινε μη ανιχνεύσιμη.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η επιτυχία της μεθόδου συγχρονισμού με τη χρήση GnRH προϋποθέτει την ύπαρξη λειτουργικού ωχρού σωματίου. Παρ' όλα αυτά η αντίδραση των ζώων στην GnRH σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η συγκεκριμένη αγωγή επιτρέπει την οχεία ή την τεχνητή σπερματέγχυση σε προκαθορισμένο χρόνο την καθιστούν μια υποσχόμενη μέθοδο για τον έλεγχο των ωοθυλακιορρηξιών στο πρόβατο, η οποία αξίζει να διερευνηθεί περισσότερο. Επιπλέον η μέτρηση της PAG από την 29η ημέρα και μετά αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο για την πρόιμη διάγνωση της εγκυμοσύνης στο πρόβατο.

Λέξεις κλειδιά: Μικρά μηρυκαστικά, ωοθηκικός κύκλος, ελεγχόμενη αναπαραγωγή, πρωτόκολλα, συγχρονισμός οίστρου, PAG.

ESTRUS SYNCHRONIZATION IN SHEEP USING GONADOTROPIN RELEASING HORMONE

Abstract

This study was conducted in order to compare two estrus synchronization protocols, one based on the use of progestagen sponges followed by eCG administration and a novel one based on the use of a GnRH analogue. Mature, cross breed sheep of similar age and body weight were used and randomly assigned in one of the following groups. In group 1 estrus synchronization was based on treatment with intravaginal progestagen sponges followed by an intramuscular injection of eCG on the day of sponge withdrawal. In group 2 estrus synchronization protocol consisted of an initial administration of a GnRH analogue followed 5 days later by a prostaglandin F_{2α} administration. Thirty six hours later a second GnRH injection was given to synchronize ovulation. Fertile rams were introduced and estrus detection was carried out. Blood samples were collected on day 0 and on 2ⁿ, 5ⁿ, 8ⁿ, 11ⁿ, 14ⁿ, 17ⁿ, 22ⁿ, 29ⁿ, 36ⁿ, 45ⁿ day after ram introduction. In addition milk samples were collected biweekly during one month before the start of the experiment (June) for the determination of progesterone levels.

In the first group 7 ewes conceived during the first estrus followed synchronization and maintained pregnancy, while another 6 ewes conceived during the second (4) or third (2) estrus followed synchronization. Two of the ewes returned to anestrus.

In the second group 4 out of 15 animals exhibited an ovarian cyclicity after treatment, but only one ewe conceived during the first cycle after treatment. Milk progesterone levels indicated that the animals were in the anestrus period.

Pregnancy associated proteins (PAG) concentration was increased from day 29 onwards in pregnant animals, while remained undetectable in non pregnant ones.

The results of the present study confirmed that effectiveness of GnRH –PGF_{2α} protocol is dependent on the existence of a functional corpus luteum. Progesterone levels, as measured in milk samples indicated that animals were in anestrus period. However the induction of cyclic activity in conjunction with the ability of this method to synchronize ovulations make it a promising tool for estrus synchronization in sheep for fixed time insemination. Results of the present study also indicated that the measurement of PAG may be used for early pregnancy diagnosis in sheep.

Key Words: Small ruminative, ovarian cycle, controlled reproduction, protocols, oestrus synchronisation, PAG.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α/Α	Τίτλος	Σελίδα
Α	Περίληψη	5
Β	Abstract	7
Γ	ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ	10
1.1.	Εισαγωγή	10
1.2.	Οιστρικός κύκλος	11
1.2.1.	Ορμονική ρύθμιση	13
1.2.2.	Η ωχρινική φάση	14
1.2.3.	Δυναμική ανάπτυξης ωοθυλακίων – Ανάπτυξη κατά κύματα	15
1.2.4.	Οιστρική και άνοιστρη περίοδος	17
1.2.5.	Ωοθηκική και ενδοκρινική λειτουργία κατά τη διάρκεια της μεταβατικής περιόδου	19
1.3.	Συγχρονισμός οίστρου προβάτων	19
	Α) ΜΗ ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
1.3.1.	Η επίδραση της παρουσίας του αρσενικού	20
1.3.2.	Τεχνητή μεταβολή της φωτοπεριόδου	20
	Β) ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
1.3.3.	Εμφυτεύματα μελατονίνης	22
1.3.4.	Προγεστερόνη και ανάλογά της (προγεσταγόνα)	23
1.3.5.	Προσταγλανδίνη F _{2α} και συνθετικά ανάλογα	25
1.3.6.	Συνδυασμός χορήγησης GnRH και PGF _{2α}	26
1.4.	Γλυκοπρωτεΐνες που συνδέονται με την εγκυμοσύνη, [Pregnancy associated glycoproteins (PAGs)]	28

Δ	ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ	30
2.1.	Σκοπός του πειράματος	30
2.2.	Πρωτόκολλα συγχρονισμού οίστρου	30
2.2.1.	Υλικά και μέθοδοι	30
2.2.2.	Δειγματοληψίες	32
2.3.	Ραδιοανοσολογική μέθοδος προσδιορισμού της προγεστερόνης	33
2.4.	Μέθοδος προσδιορισμού των γλυκοπρωτεϊνών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (PAGs)	33
2.5.	Στατιστική ανάλυση	34
Ε	ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
3.1.	Σωματικό βάρος	35
3.2.	Ανίχνευση οίστρου	36
3.3.	Συγκεντρώσεις προγεστερόνης Ομάδας 1	37
3.4.	Συγκεντρώσεις προγεστερόνης Ομάδας 2	44
3.5.	Διάγνωση εγκυμοσύνης	53
3.5.1.	Προσδιορισμός προγεστερόνης	53
3.5.2.	Προσδιορισμός PAG	56
Ζ	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
ΣΤ	Συμπεράσματα	65
	Βιβλιογραφία	66

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Σήμερα συζητείται ευρέως η αναβάθμιση, ο εκσυγχρονισμός και η συστηματοποίηση της αιγοπροβατοτροφικής παραγωγής, μέσω της χρήσης τεχνικών και εφαρμογών ακριβείας που προσφέρουν απόλυτη διαχειριστική ευχέρεια σε επίπεδο εκτροφής, μεγιστοποιώντας την παραγωγή και το όφελός της.

Για την επίτευξη των στόχων αυτών, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η βέλτιστη διαχείριση της αναπαραγωγικής ικανότητας των ζώων. Θα μπορούσε να λεχθεί πως η αναπαραγωγή είναι το κομβικό σημείο, από όπου "διέρχεται" ο τομέας της ζωικής παραγωγής, διότι δίχως αυτήν, ο όρος «ζωική παραγωγή» απλά δεν υφίσταται. Συνεπώς, για να μπορέσουν να ελεγχθούν όλα εκείνα τα φαινόμενα που συντελούνται, κατά την αναπαραγωγική διαδικασία, απαραίτητη είναι η άριστη γνώση των νόμων που τη διέπουν, αλλά και του ενδοκρινικού συστήματος του ζώου και του τρόπου λειτουργίας του.

Οι σύγχρονες τάσεις, στην σημερινή αιγοπροβατοτροφία, βρίσκονται στη φάση της αναζήτησης κατάλληλων μεθόδων και εφαρμογών, που να επιτρέπουν την πρόκληση μαζικών τοκετών σε επιθυμητές περιόδους. Λύση στο πρόβλημα αυτό έρχεται να δώσει ο τομέας της Βιοτεχνολογίας της Αναπαραγωγής, μέσω της ανάπτυξης μεθόδων ακριβείας, ικανών να χρησιμοποιηθούν σε επίπεδο εκτροφής, αποτελεσματικά. Τέτοιες μέθοδοι είναι και η εφαρμογή κατάλληλων πρωτοκόλλων συγχρονισμού οίστρων στα ζώα, ανάλογα πάντοτε με τις υφιστάμενες εποχικές συνθήκες και τις ιδιαιτερότητες της κάθε εκτροφής.

Αρκετές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ωοθηκικής δραστηριότητας, με σκοπό τη αύξηση της γονιμότητας στα μικρά μηρυκαστικά. Συνδυασμός χορήγησης προγεσταγόνων και ίππειας χορειακής γοναδοτροπίνης (eCG) έχουν εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα στην πρόκληση οίστρου (Wildeus, 1999, Motlomelo et al., 2002, Fonseca et al., 2005, Husein et al., 2005). Ωστόσο, τέτοιες τεχνικές συνοδεύονται από χαμηλό ποσοστό σύλληψης κατά τον πρώτο οιστρικό κύκλο και χαμηλή γονιμότητα ειδικά κάτω από ημιξηρικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Wildeus, 1999, Husein and Kridli, 2003). Επιπλέον, αυτή η μέθοδος έχει μερικά ανεπιθύμητα μειονεκτήματα, όπως η προσκόλληση των σπόγγων στον κοιλικό βλεννογόνο, τις δυσάρεστες οσμές κατά τη στιγμή της εξαγωγής του σπόγγου (Ataman and Akoz, 2006) και το σχηματισμό αντισωμάτων έναντι της eCG, σε ορισμένα ζώα, μετά από επανειλημμένες εφαρμογές συγχρονισμού οίστρου (Roy et al., 1999).

Η αγωγή με προγεσταγόνα σε συνδυασμό με την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH), επιφέρει αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά της αγωγής με eCG (Wildeus, 1999). Μια άλλη εναλλακτική λύση θα μπορούσε να περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση της GnRH, μετά από την οποία θα ακολουθεί αγωγή με προσταγλανδίνη PGF_{2α}. Ο συγχρονισμός με τη διαδικασία αυτή έχει αναπτυχθεί και

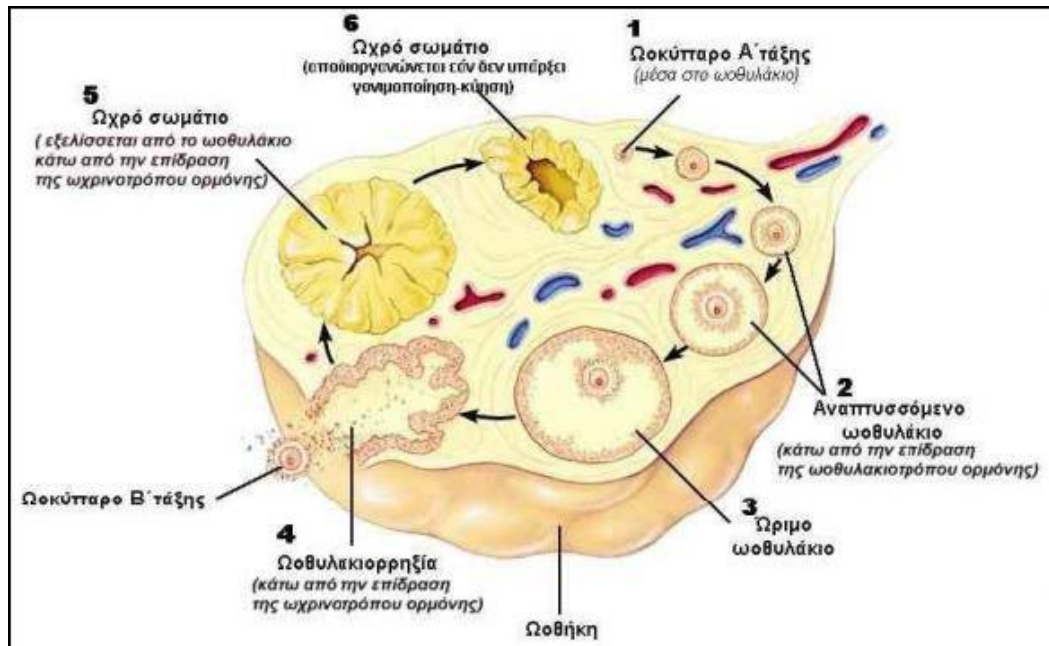
χρησιμοποιείται κυρίως, για τον έλεγχο της ωοθυλακιορρηξίας σε προγράμματα τεχνητής σπερματέγχυσης σε βοοειδή (El-Zarkouny et al., 2004). Ένα παρόμοιο πρωτόκολλο (GnRH - PGF_{2α}) χρησιμοποιήθηκε στις προβατίνες με ικανοποιητικά ποσοστά σύλληψης (Husein and Kridli, 2003, Deligiannis et al., 2005). Σε άλλη εργασία αναφέρεται ότι η χορήγηση προγεστερόνης για χρονικό διάστημα 4 ημερών πριν από την εφαρμογή της πρώτης GnRH, ήταν απαραίτητη για την αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας, ώστε να διατηρηθεί η ανταπόκριση των ωοθυλακίων στη GnRH. Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν βελτιωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης σε προβατίνες που ακολούθησαν την αγωγή (Husein and Kridli, 2003, Husein et al., 2005).

Κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, σημαντικές προσπάθειες έγιναν ώστε να αναπτυχθούν μέθοδοι συγχρονισμού του οίστρου στα μικρά μηρυκαστικά, ως διαχειριστικά εργαλεία σε επίπεδο εκτροφής και σε ερευνητικές μελέτες. Ο βασικός στόχος για το συγχρονισμό του οίστρου είναι ο έλεγχος της ωχρινόλυσης και η διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου. Βελτιωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης έχουν αναφερθεί σε βοοειδή που δέχτηκαν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου GnRH-PGF_{2α} για το συγχρονισμό του οίστρου, όταν η προγεστερόνη εφαρμόστηκε κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Alnimer and Lubbadah, 2003, El-Zarkouny et al., 2004).

Το αντικείμενο αυτής της διατριβής πραγματεύεται την αξιολόγηση της εφαρμογής ενός πρωτοκόλλου GnRH- PGF_{2α} συγχρονισμού οίστρου, σε σύγκριση με άλλες κοινές μεθόδους συγχρονισμού οίστρου σε πρόβατα, υπό πραγματικές συνθήκες εκτροφής. Επίσης απαντά στο ερώτημα της καταλληλότητας του πρωτοκόλλου αυτού και της εφαρμογής του σε ερευνητικό επίπεδο. Έχει πραγματικό ενδιαφέρον η ανάδειξη των πιθανών ιδιαιτεροτήτων και προβλημάτων της εφαρμογής αυτής, όπως αυτά προέκυψαν. Επιπροσθέτως, διερευνάται αν ο προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (PAGs) μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική μέθοδο πρώιμης διάγνωσης της κύησης στο πρόβατο.

1.2. ΟΙΣΤΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.

Το πρόβατο είναι εποχικώς πολυοιστρικό ζώο. Συνεπώς, η αναπαραγωγική του δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του έτους παρουσιάζει περιόδους δραστηριοποίησης και αδράνειας, γεγονότα που χαρακτηρίζουν την περίοδο των οίστρων και την άνοιστρη περίοδο, αντίστοιχα. Η κυκλική λειτουργία των ωοθηκών της προβατίνας επαναλαμβάνεται ανά 16 έως 18 ημέρες. Το διάστημα αυτό καλείται οιστρικός, ωοθηκικός ή γενετήσιος κύκλος (Στην εικόνα 1 απεικονίζεται η ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τα στάδια που αυτά διέρχονται σε ένα πλήρη οιστρικό κύκλο, εντός της ωοθήκης) (Ρογδάκης, 2004).



Εικόνα 1. Στάδια ωθητικού κύκλου (Σμοκοβίτης, 2007).

Οι ορμόνες που συμμετέχουν άμεσα στον έλεγχο της αναπαραγωγικής λειτουργίας προέρχονται από τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τους γεννητικούς αδένες. Στον υποθάλαμο παράγονται ειδικοί εκλυτικοί ή ανασταλτικοί παράγοντες, ή υποθαλαμικές ορμόνες, στόχος δράσεως των οποίων είναι τα κύτταρα της υπόφυσης, στα οποία παράγονται οι γοναδοτροπίνες. Οι γεννητικοί αδένες διεγείρονται από τις υποφυσιακές γοναδοτροπίνες και παράγουν τις γοναδικές ορμόνες. Ο υποθάλαμος, αρχικά, παράγει την εκλυτική ορμόνη (Gonadotropin-Releasing Hormone, GnRH), η οποία διοχετεύεται στην υπόφυση μέσω του πυλαίου αγγειακού συστήματος. Εκεί προσδένεται στους υποδοχείς της, όπου και προκαλεί την παραγωγή και έκκριση της ωχρινοποιητικής ορμόνης (Luteinizing Hormone, LH) και της ωοθυλακιοτρόπου (Follicle Stimulating Hormone, FSH). Οι ωοθήκες παράγουν κυρίως δύο είδη ορμονών, τα οιστρογόνα και τα προγεσταγόνα. Τα κυριότερα ωοθηκικά οιστρογόνα είναι η 17β-οιστραδιόλη και η οιστρόνη, τα οποία παράγονται πρωτίστως από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο. Προγεσταγόνα είναι ορμόνες οι οποίες παράγονται κυρίως στο ωχρό σωματίο και τον πλακούντα. Κυριότερος αντιπρόσωπός τους είναι η προγεστερόνη. Με την επίδραση της ωχρινοποιητικής ορμόνης στα ωοθυλάκια, τα κύτταρα της θήκης παράγουν ανδρογόνα, τα οποία στη συνέχεια, με την επίδραση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης και του ενζύμου P450 αρωματάση (Knobil and Neil, 2006), μετατρέπονται στην κοκκιώδη στιβάδα σε οιστρογόνα (οιστραδιόλη) (Ρογδάκης, 2004).

Οι ορμονικές αυτές μεταβολές του ενδοκρινικού άξονα σηματοδοτούν την έναρξη και την περαιτέρω εξέλιξη του οιστρικού κύκλου. Ως πρώτη ημέρα του οιστρικού κύκλου λαμβάνεται συνήθως η πρώτη ημέρα του οίστρου (διάρκειας 24 έως 36 ωρών), κατά την οποία η προβατίνα μεταβάλλει τη γενετήσια συμπεριφορά της, επιδεικνύει ενδιαφέρον προς τον κριό και επιτρέπει την επίβαση (Ρογδάκης, 2004).

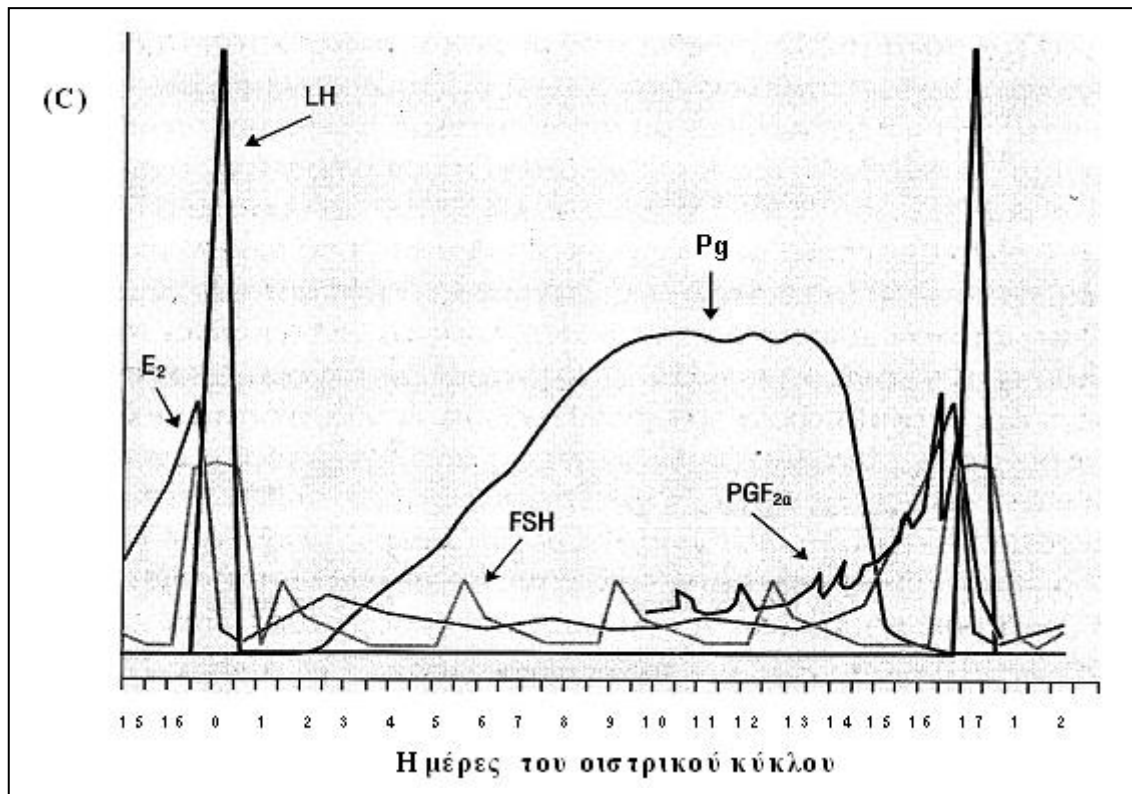
Ο οιστρικός κύκλος, με βάση τα διάφορα φαινόμενα που εμφανίζονται στις ωοθήκες, χωρίζεται σε δύο φάσεις ή περιόδους. Οι ωοθηκικές αυτές φάσεις είναι η

φάση του ωοθυλακίου και η φάση του ωχρού σωματίου. Η φάση του ωοθυλακίου διαρκεί 2 έως 3 ημέρες και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη του ωοθυλακίου ή των ωοθυλακίων, η οποία συνεχίζεται έως το στάδιο του γραφιανού ωοθυλακίου. Η ωχρινική φάση διαρκεί 14 έως 15 ημέρες περίπου και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό του ωχρού σωματίου, το οποίο εξελίσσεται και διατηρείται σε λειτουργική κατάσταση για ορισμένο χρονικό διάστημα και ακολούθως εκφυλίζεται απότομα. Τα σημεία διαχωρισμού των δύο φάσεων είναι η ωοθυλακιόρρηξια και η έναρξη παλινδρόμησης του ωχρού σωματίου. Η ωοθυλακιόρρηξια ορίζει το τέλος της περιόδου του ωοθυλακίου. Κατά τη διάρκεια του κύκλου λαμβάνουν χώρα μορφολογικές και ιστολογικές μεταβολές στις ωοθήκες, οι οποίες περιλαμβάνουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση του ωοθυλακίου, την ωοθυλακιόρρηξια και τη μετατροπή του ραγέντος ωοθυλακίου σε ωχρο σωματίο (Ρογδάκης, 2004).

1.2.1. Ορμονική ρύθμιση.

Κατά την ωχρινική φάση το ωχρο σωματίο εκκρίνει προγεστερόνη σε αυξανόμενα ποσά. Τα επίπεδα συγκέντρωσης της ορμόνης στο αίμα αυξάνονται γραμμικά από τη 2η έως την 8η περίπου ημέρα του κύκλου. Στο διάστημα από την 8η έως τη 14η ημέρα, η συγκέντρωση της ορμόνης παραμένει σχεδόν σταθερή. Κατά το διάστημα αυτό η συγκέντρωση της οιστραδιόλης παρουσιάζει αυξομειώσεις, καθώς παρατηρείται ανάπτυξη ωοθυλακίων μέχρι του σταδίου των 4 mm, προτού αυτά υποστούν ατρησία και εκφυλιστούν. Στο ίδιο διάστημα τα επίπεδα της FSH δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές, ενώ αυτά της LH ελαττώνονται βαθμιαία (Σχήμα, 1.2.1.1.) (Ρογδάκης, 2004).

Η LH εκκρίνεται κατά ώσεις. Οι εκκριτικές αυτές ώσεις διεγείρουν την έκκριση της οιστραδιόλης από τα ωοθυλάκια. Η ανασταλτική επίδραση της προγεστερόνης, στη βασική έκκριση και τη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της LH, περιορίζει την έκκριση της οιστραδιόλης. Η περίοδος μεταξύ της υποστροφής του ωχρού σωματίου και της προωθυλακιόρρηκτης ανόδου της LH χαρακτηρίζεται από μία έντονη αύξηση της έκκρισης της οιστραδιόλης. Η αύξηση αυτή της έκκρισης της οιστραδιόλης διεγείρει την παραγωγή $PGF_{2\alpha}$ από το ενδομήτριο και επομένως, την ωχρινόλυση, διεγείρει την εκδήλωση των συμπτωμάτων του οίστρου και επιπλέον, αναστέλλει την έκκριση της FSH, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της ορμόνης αυτής να ελαττώνονται σημαντικά 48 ώρες περίπου πριν από την ωοθυλακιόρρηκτη άνοδο της LH. Η αύξηση αυτή της έκκρισης της οιστραδιόλης, προφανώς, οφείλεται στην αύξηση της βασικής έκκρισης της LH ως αντίδραση στη μείωση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης που συνεπάγεται η υποστροφή του ωχρού σωματίου. Εάν η πτώση της προγεστερόνης αποτραπεί, δεν αυξάνεται ούτε η βασική έκκριση της LH ούτε η έκκριση της οιστραδιόλης. Παράλληλα με την αύξηση της βασικής συγκέντρωσης της LH, παρατηρείται αύξηση των εκκριτικών της ώσεων. Η αύξηση αυτή των εκκριτικών ώσεων της LH διεγείρει τα μεγάλα φυσιολογικά ωοθυλάκια με συνεπακόλουθο την απότομη αύξηση της έκκρισης της οιστραδιόλης.



Σχήμα 1.2.1.1. Μεταβολές της συγκέντρωσης (C) των ορμονών, κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου (E₂ = οιστραδιόλη, Pg = προγεστερόνη).

Ενώ η συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της LH αυξάνεται, το ύψος τους ελαττώνεται, προφανώς, εξαιτίας της επίδρασης στην υπόφυση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης. Παρά την ελάττωση του ύψους των εκκριτικών ώσεων της LH, η ωθήκη αντιδρά με μία μεγαλύτερη έκκριση της οιστραδιόλης. Η προωθυλακιωρρηκτική κορυφή της LH επάγει μια σειρά από γεγονότα τα οποία οδηγούν στη ρήξη του ωοθυλακίου και την απελευθέρωση του ωαρίου (Ρογδάκης, 2004).

1.2.2. Η ωχρινική φάση.

Ύστερα από τη ρήξη του ωοθυλακίου, το ρήγμα της επιφάνειας της ωοθήκης κλείνει και στη θέση του ωοθυλακίου, που κενώθηκε, διαπλάσσεται από τα υπολείμματα του τοιχώματός του, το ωχρό σωματίο. Ο σχηματισμός του τελεί κάτω από την επίδραση της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) του πρόσθιου λοβού της υποφύσεως και τον έλεγχο βέβαια του υποθαλάμου (Μιχαήλ, 1996).

Σε πρώτη φάση, μετά τη ρήξη του ωοθυλακίου, το τοίχωμά του και ειδικότερα ο κοκκώδης υμένας με την εσωτερική θήκη συμπίπτουν και στη συνέχεια πτυχώνονται. Το άντρο του ωοθυλακίου περιορίζεται σημαντικά σε έκταση και γεμίζει με τμήματα ωοθυλακικών κυττάρων και πηγμένων αιμορραγικών προϊόντων (= αιμορραγικό

σωμάτιο), ενώ αργότερα εξαφανίζεται σχεδόν τελείως. Η εξωτερική θήκη μένει αμετάβλητη και περιβάλλει και το ωχρό σωματίο (Μιχαήλ, 1996).

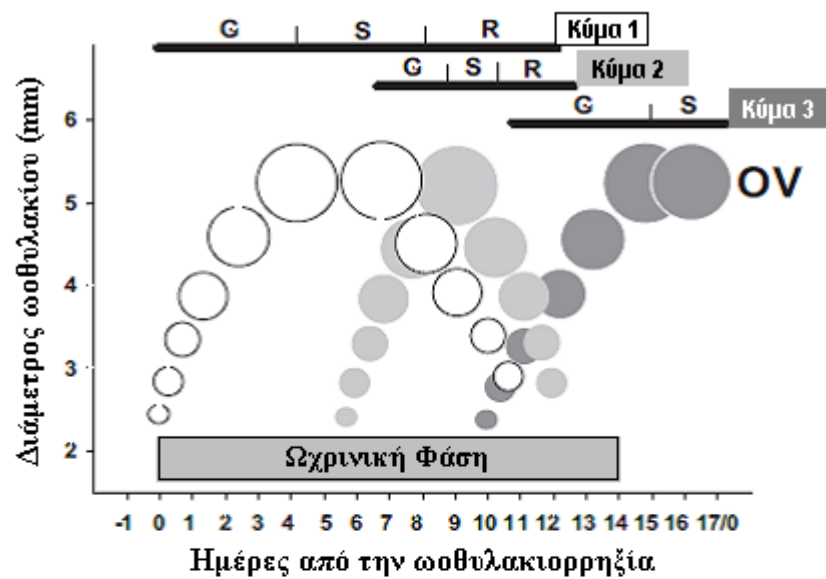
Το ωχρό σωματίο εμφανίζει την τυπική κατασκευή ενός συμπαγούς ενδοκρινούς αδένου, ο οποίος εκκρίνει την προγεστερόνη. Ο χρόνος της παραμονής του στην ωοθήκη διαφέρει, γιατί αν το ωάριο δεν γονιμοποιηθεί, το ωχρό σωματίο υποπλάσσεται και εξαφανίζεται σύντομα (= περιοδικό ωχρό σωματίο), ενώ αν γονιμοποιηθεί, υπερτρέφεται αργά, γίνεται ογκωδέστερο του περιοδικού σωματίου και διατηρείται συνήθως σχεδόν έως το τέλος της κήσης (= ωχρό σωματίο της κήσης). Και στις δύο περιπτώσεις η εκφύλιση του ωχρού σωματίου, που ακολουθεί, επιτρέπει τη μετέπειτα ωρίμανση νέου ή νέων ωοθυλακίων.

1.2.3. Δυναμική ανάπτυξης ωοθυλακίων-Ανάπτυξη κατά κύματα.

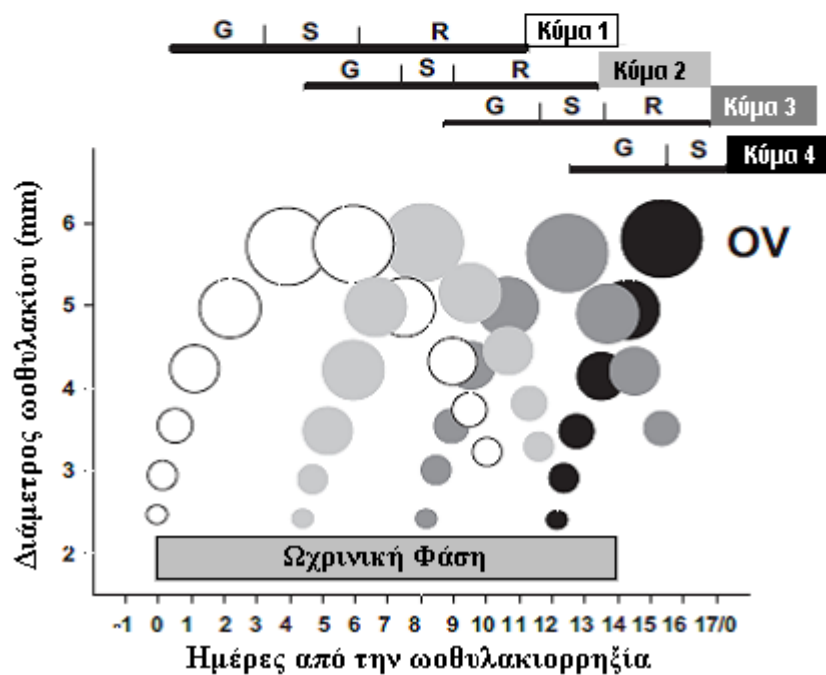
Η ανάπτυξη των γραφικών ωοθυλακίων δεν είναι μια συνεχής διαδικασία, αλλά γίνεται κατά κύματα. Ο αριθμός των κυμάτων ανάπτυξης κατά τη διάρκεια ενός οιστρικού κύκλου δεν είναι σταθερός, αλλά κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 2 και 3 κυμάτων με περιοδικότητα από 3 ως 6 ημέρες. Τα περισσότερα κύματα ανάπτυξης εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (2-3) αλλά και κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης (1 κύμα). Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων κατά κύματα λαμβάνει χώρα τόσο κατά την οιστρική, όσο και κατά την άνοιστη περίοδο, όπως επίσης και κατά τη μετάβαση από την άνοιστη στην οιστρική περίοδο (Ginther et al., 1995, Bartlewski et al., 1999a, Duggavathi et al., 2003b, Evans et al., 2000, Evans, 2003,a,b, Seekallu et al., 2010). Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής εποχής και στις υπεραγωγικές και στις μη-παραγωγικές φυλές, υπάρχουν χαρακτηριστικά 3 ή 4 ωοθυλακικά κύματα (διάγραμμα 1.2.3.1.) (Bartlewski et al., 2011).

Τα ωοθυλάκια που επιλέγονται αναπτύσσονται για 2-3 ημέρες μέχρι ένα από αυτά να ωριμάσει περισσότερο και να αποτελέσει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Μπορεί να ωριμάσουν και περισσότερα του ενός ωοθυλάκια, ενώ τα υπόλοιπα παλινδρομούν και εκφυλίζονται. Ο μηχανισμός επιλογής δεν είναι απόλυτα γνωστός, φαίνεται όμως ότι σχετίζεται με την ευαισθησία του ωοθυλακίου στις αλλαγές συγκέντρωσης της FSH (Bartlewski et al., 1999a, Duggavathi et al., 2003b). Η ωρίμανση του ωοθυλακίου χαρακτηρίζεται από τη μείωση της εξάρτησής του από την FSH και την αύξηση της εξάρτησής του από την LH. Εκτός από τη συγκέντρωση της FSH τα ίδια τα κυρίαρχα ωοθυλάκια συμμετέχουν στη διαδικασία επιλογής, μειώνοντας την ευαισθησία των υπολοίπων στις γοναδοτροπίνες. Επίσης και διάφοροι άλλοι παράγοντες, όπως ο παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας (IGF1) συντελούν στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου, αυξάνοντας τους υποδοχείς για την FSH και LH γεγονός που το καθιστά περισσότερο ευαίσθητο στη μικρή συγκέντρωση FSH και ανταποκρινόμενο στη συγκέντρωση της LH (Duggavathi et al., 2005a). Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο κάτω από την επίδραση της LH αναπτύσσεται περισσότερο και αποτελεί το ώριμο ωοθυλάκιο (Bartlewski et al., 1999a, Gibbons et al., 1999).

Μεσοωθουλακιορρηκτικό διάστημα 3-κυμάτων



Μεσοωοθυλακιορρηκτικό διάστημα 4-κυμάτων



Διάγραμμα 1.2.3.1. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης των ωοθηκικών ώριμων ωοθυλακίων που μετατρέπονται, ξεκινώντας από τη διάμετρο των 2–3mm, σε μεγαλύτερα ωοθυλάκια φτάνοντας φαινομενικά σε μια ωοθυλακιορρηκτική διάμετρο $\geq 5\text{mm}$, πριν από την παλινδρόμηση ή την ωοθυλακιορρηξία, έτσι όπως προκύπτει σε χρονολογική σειρά κατά το διάστημα 17 ημερών μετά την ωοθυλακιορρηξία, δίνοντας τυπικά 3 ή 4 ωοθυλακικά κύματα. OV = ωοθυλακιορρηξία. Η κατά προσέγγιση, διάρκεια της φάσης της ανάπτυξης (G), της στατικής φάσης (S) και αυτής της παλινδρόμησης (R) κατά τη διάρκεια της ζωής, των μεγαλύτερων ωοθυλακίων, των ωοθυλακικών κυμάτων παρουσιάζονται στο πάνω μέρος των διαγραμμάτων (Bartlewski et al., 2011).

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν την ωρίμανση και κυριαρχία των ωοθυλακίων στα πρόβατα δεν έχουν διευκρινιστεί όσο στις αγελάδες. Πιθανόν ρόλο παίζουν η φυλή, η εποχή του έτους και το αναπαραγωγικό στάδιο (Deligiannis et al., 2005).

1.2.4. Οιστρική και άνοιστρη περίοδος.

Η εποχική αναπαραγωγή στα πρόβατα ελέγχεται από φωτοπεριοδικά σήματα (Yeates, 1949). Η έναρξη της αναπαραγωγικής δραστηριότητας εμφανίζεται το φθινόπωρο, όταν μειώνεται το μήκος της φωτοπερίοδου, ενώ η μη-αναπαραγωγική εποχή (άνοιστρη) αρχίζει την άνοιξη καθώς το μήκος ημέρας αυξάνεται (Thimonier and Mauleon, 1969). Κατά την άνοιστρη περίοδο η κυκλική λειτουργία της ωοθήκης ουσιαστικά αναστέλλεται. Η διακοπή της αναπαραγωγικής δραστηριότητας, για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια του έτους, αποτελεί εξελικτική προσαρμογή. Το έναυσμα για την έναρξη της οιστρικής περιόδου είναι η μείωση της διάρκειας της ημέρας (ακριβέστερα η εναλλαγή του φωτοπεριοδισμού), που μαζί με τους άλλους κλιματολογικούς παράγοντες, τη θερμοκρασία και τη βροχή ρυθμίζουν τη βλάστηση, έτσι ώστε οι τοκετοί να συμπέσουν με εκείνη τη χρονική περίοδο όπου θα εξασφαλίζεται η πλήρης κάλυψη των αναγκών των αρνιών με γάλα (Μενεγάτος κ.σ., 1995).

Η εποχική αναπαραγωγική δραστηριότητα καθορίζεται από έναν ενδογενή ρυθμό, ο οποίος όμως συγχρονίζεται από περιβαλλοντικές επιδράσεις, με σημαντικότερη τη φωτοπερίοδο (διάρκεια ημέρας) (Arendt, 1995). Η προοδευτική μείωση της διάρκειας της ημέρας αρχίζει μετά το θερινό ηλιοστάσιο, δηλαδή 21η Ιουνίου για το Βόρειο ημισφαίριο και 21 Δεκεμβρίου για το Νότιο ημισφαίριο (Ρογδάκης, 2004).

Μεσολαβητής μεταξύ της φωτοπερίοδου και της αναπαραγωγικής δραστηριότητας είναι η ορμόνη μελατονίνη, που συντίθεται στην επίφυση κατά τη διάρκεια της νύχτας (Arendt et al., 1988). Το ερέθισμα του φωτός μεταφέρεται μέσω της φωτουπόθαλαμικής οδού στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου (Hing and Russel, 1992). Έτσι μικρής διάρκειας ημέρες μεταφράζονται σε σήμα αυξημένης διάρκειας έκκρισης μελατονίνης, ενώ αντίθετα μεγάλης διάρκειας ημέρες σε σήμα ελαττωμένης διάρκειας έκκρισης μελατονίνης (Robinson and Karsch, 1988). Τα φωτοπεριοδικά αυτά ερεθίσματα μεταφέρονται μέσω νευροενδοκρινικών οδών και μεταφράζονται σε ορμονικά σήματα που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των γονάδων (Reiter, 1980, Bittman, 1984, Lincoln, 1984). Συγκεκριμένα η μελατονίνη επηρεάζει το πρότυπο έκκρισης της GnRH ώστε να ενεργοποιηθεί η κατά ώσεις έκκριση των γοναδοτροπινών και η λειτουργία της ωοθήκης (Malraux et al., 1997).

Η διάρκεια της οιστρικής καθώς και η ένταση της άνοιστρης περιόδου εξαρτώνται από το γεωγραφικό πλάτος. Ζώα που διαβιούν σε μεγάλο γεωγραφικό πλάτος παρουσιάζουν μεγάλης διάρκειας άνοιστρη περίοδο, ενώ όσο πλησιάζουν προς τον Ισημερινό η διάρκεια της άνοιστρης περιόδου ελαττώνεται. Για τα πρόβατα γενικά οι μεσογειακές φυλές εμφανίζουν νωρίτερα οιστρική περίοδο και μικρότερης διάρκειας άνοιστρη περίοδο σε σχέση με τις βορειοευρωπαϊκές φυλές. Βέβαια η φυλή είναι

επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη διάρκεια της οιστρικής περιόδου (Robinson, 1959). Ο καθορισμός της διάρκειας της άνοιστρης περιόδου των προβατινών παρουσιάζει ενδιαφέρον τόσο από ερευνητική όσο και από οικονομική άποψη, αφού η εφαρμογή του κατάλληλου συστήματος αναπαραγωγής προϋποθέτει τη γνώση της ακριβούς διάρκειας της οιστρικής περιόδου (Μενεγάτος κ.σ., 1995).

Σε έρευνες ελληνικών φυλών προβάτων που αναφέρονται στην ετήσια ωοθηκική δραστηριότητα, έχει παρατηρηθεί διαφοροποίηση ως προς την ημερολογιακή εμφάνιση της οιστρικής και της άνοιστρης περιόδου (Μενεγάτος κ.σ., 1995). Η διάρκεια της οιστρικής περιόδου των διαφόρων φυλών προβάτου εξαρτάται από τον τόπο καταγωγής τους και από γενετικούς παράγοντες (Thimonier et al., 1969). Επίσης, είναι πιθανό ότι οι δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες, κυρίως την άνοιξη, να επηρεάζουν τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου των προβατινών, όταν αυτές εκτρέφονται σε διαφορετικό τόπο από το τόπο καταγωγής τους (Μενεγάτος κ.σ., 1995).

Δεδομένα πειραματισμών σε μετακινούμενες ποιμενικές προβατίνες Σαρακατσάνικης φυλής, έδειξαν ότι η εμφάνιση του πρώτου οίστρου στο μεγαλύτερο ποσοστό των ζώων συμβαίνει κατά το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Ιουνίου. Επίσης, προηγούμενες μελέτες, που περιλάμβαναν τις φυλές Καραγκούνικη, Καραμάνικη Κατσικά, Ζακύνθου, Θράκης, Σερρών, Σκοπέλου, Κύμης, Μυτιλήνης και Χίου, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φυλή Καραμάνικη του Κατσικά είναι η πιο πρόωμη και οι τοκετοί συγκεντρώνονται στο δεύτερο δεκαπενθήμερο του Νοεμβρίου κατά ποσοστό 43% και στο πρώτο 15ημερο του Δεκεμβρίου κατά ποσοστό 38%. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα ελληνικά πρόβατα ορεινού τύπου ή αυτά που έχουν την καταγωγή τους από τον ορεινό τύπο είναι πολύ πρόωμα ζώα, όπως συμβαίνει και στην φυλή Μπούτσικο της Ηπείρου (Μενεγάτος κ.σ., 1995).

Η μετάβαση από την άνοιστρη στην οιστρική περίοδο είναι μια βαθμιαία διαδικασία. Η διάρκεια του πρώτου κύκλου της οιστρικής περιόδου είναι συνήθως μικρή, επειδή το πρώτο ωχρό σωματίο εκφυλίζεται πρόωρα, 5 έως 6 ημέρες μετά το σχηματισμό του. Επίσης, έκδηλα συμπτώματα οίστρου εμφανίζονται συνήθως κατά το δεύτερο ή τρίτο οιστρικό κύκλο. Καθ' όλη τη διάρκεια της άνοιστρης περιόδου παρατηρείται ανάπτυξη και ατρησία ωοθυλακίων. Συχνά ανευρίσκονται ωοθυλάκια με μέγεθος παρόμοιο εκείνων που παρατηρούνται κατά την ωχρινική φάση του κύκλου και παράγουν οιστρογόνα. Επίσης, η LH συνεχίζει να εκκρίνεται κατά ώσεις, όμως η συχνότητα των εκκριτικών ώσεων είναι μικρότερη σε σύγκριση με εκείνη που παρατηρείται κατά την αναπαραγωγική περίοδο. Διαφορές μεταξύ της άνοιστρης περιόδου και της περιόδου των οίστρων υπάρχουν και στη συγκέντρωση της προγεστερόνης η οποία παραμένει σε μη ανιχνεύσιμα ποσά καθ' όλη τη διάρκεια αδράνειας της ωοθήκης. Απεναντίας, στα επίπεδα συγκέντρωσης της FSH δεν έχουν παρατηρηθεί ουσιώδεις διαφορές (Ρογδάκης, 2004).

1.2.5. Ωοθηκική και ενδοκρινική λειτουργία κατά τη διάρκεια της μεταβατικής περιόδου.

Στις προβατίνες, κατά το χρονικό μεσοδιάστημα της μετάβασης από την οιστρική στην άνοιτρο περίοδο, οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της FSH δεν επηρεάζουν, παροδικά, την εμφάνιση ωοθυλακικών κυμάτων και αυτό συμβαίνει διότι η μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης FSH αποτυγχάνει να προκαλέσει την εμφάνιση ενός ωοθυλακικού κύματος (Bartlewski et al., 1999d).

Η μετάβαση προς την άνοιτρο περίοδο συνδέεται επίσης με χαρακτηριστικά μικρότερη έκκριση οιστραδιόλης και προγεστερόνης σε σύγκριση με το μέσο της οιστρικής περιόδου, των προβατίνων (Bartlewski et al., 1999a, 1999d). Η έλλειψη συγχρονισμού μεταξύ των κορυφών της συγκέντρωσης της FSH και της εμφάνισης ωοθυλακικών κυμάτων και η μειωμένη παραγωγή οιστραδιόλης στις προβατίνες κατά τη μετάβαση στην άνοιτρο δεν οφείλονται σε αλλαγή της έκκρισης FSH (Bartlewski et al., 1999d) και είναι πιθανόν, αποτέλεσμα μειωμένης ωοθηκικής ευαισθησίας στις γοναδοτρόπες ορμόνες.

Πριν από την πρώτη ωοθυλακιόρρηξία της οιστρικής περιόδου, οι προβατίνες παρουσιάζουν αύξηση στη συγκέντρωση της προγεστερόνης, όμως καμία ωχρινική δομή δεν μπορεί να ανιχνευθεί σε μερικά ζώα, ενώ ωχρινοποιημένα μη ραγέντα ωοθυλάκια φαίνονται σε άλλα ζώα (Bartlewski et al., 1999c). Η αύξηση της συγκέντρωσης της προγεστερόνης, η οποία προηγείται της έναρξης της αναπαραγωγικής περιόδου, δεν αλλάζει τον τρόπο με τον οποίο τα ωοθυλακικά κύματα αναπτύσσονται, ως εκ τούτου, φαίνεται να είναι σημαντική κυρίως για την εκδήλωση της οιστρικής συμπεριφοράς συγχρονίζοντάς τη με την προ-ωοθυλακιόρρηκτη αιχμή της LH και τη παρεμπόδιση της πρόωρης ωχρινόλυσης κατά τη διάρκεια της επόμενης ωχρινικής φάσης (Beard and Hunter, 1996). Οι διακυμάνσεις στη συγκέντρωση της FSH δεν επηρεάζονται από τη διακοπή της άνοιτρο και οι μεγιστοποιήσεις της FSH προκαλούν την εμφάνιση ωοθυλακικών κυμάτων (Bartlewski et al., 1999c). Η έκκριση της οιστραδιόλης, φαίνεται να αποκαθίσταται, αλλά δεν είναι πλήρως συγχρονισμένη με την ανάπτυξη των μεγαλύτερων ωοθυλακικών κυμάτων, σε σύγκριση με προβατίνες που βρίσκονται σε άνοιτρο (Bartlewski et al., 1999c).

1.3. ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΟΙΣΤΡΟΥ ΠΡΟΒΑΤΩΝ.

Η αναπαραγωγή των μικρών μηρυκαστικών μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Κάποιες από αυτές περιλαμβάνουν τη χορήγηση ορμονών που τροποποιούν τη φυσιολογική αλυσίδα των γεγονότων που συμμετέχουν στον αναπαραγωγικό κύκλο. Μέθοδοι που βασίζονται στην προγεστερόνη ή τα ανάλογά της είναι βασισμένες στις επιπτώσεις τους στην ωχρινική φάση του κύκλου, μιμούμενες τη δράση της φυσικής προγεστερόνης που παράγεται από το ωχρό σωματίο μετά από την ωοθυλακιόρρηξία. Η χρήση προσταγλανδινών είναι μια εναλλακτική μέθοδος για τον έλεγχο της αναπαραγωγής, μέσω της λύσης του ωχρού σωματίου και την ανάπτυξη μιας νέας ωοθυλακικής φάσης

που καταλήγει σε ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο. Τέλος, η ανακάλυψη των ιδιοτήτων της μελατονίνης σε παραγωγικά ζώα με φωτοπεριοδική εξάρτηση, άνοιξε μια νέα μεθοδολογία για τον έλεγχο της αναπαραγωγής σε αυτά τα είδη, εισάγοντας αλλαγές στον τρόπο αντίληψης της φωτοπεριόδου και τον ετήσιο μεταβολικό ρυθμό της αναπαραγωγής. Η χρήση των ορμονών για τη πρόκληση οίστρου, έχει επιτρέψει την αύξηση στη χρήση εφαρμογών τεχνητής σπερματέγχυσης στα μικρά μηρυκαστικά, ένα πολύ χρήσιμο διαχειριστικό εργαλείο, λαμβάνοντας υπόψη τη δυσκολία ανίχνευσης του οίστρου σε αυτά τα είδη. Σε εμπορικό επίπεδο, ο συγχρονισμός του οίστρου επιτρέπει τον έλεγχο των τοκετού και της αποτελεσματικότερης διαχείρισης των νεογνών, μέσω του χρονικού καθορισμού, του απογαλακτισμού των νέων ζώων που προορίζονται για σφαγή. Επίσης, γίνεται αποτελεσματικότερη η κατανομή του προσωπικού και των εργατικών, καθώς και η χρήση των σταυλικών εγκαταστάσεων. Προγράμματα εμβρυομεταφοράς και πρόκλησης πολλαπλών ωοθυλακιορρηξιών μπορούν επίσης να εφαρμοστούν ταυτόχρονα με το συγχρονισμό του οίστρου και τη τεχνητή σπερματέγχυση. Τέλος, ορμονικές αγωγές έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την πρόκληση της ήβης σε αρνιά και ερίφια (Abecia et al., 2012).

Επιπροσθέτως, ο συγχρονισμός οίστρου μπορεί να προσφέρει και τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: 1) Οικονομικότερη χρήση συμπληρωματικής διατροφής των εγκύων αμνάδων αφού όλες βρίσκονται στο ίδιο στάδιο εγκυμοσύνης. 2) Μειωμένο κόστος εργασίας κατά τον τοκετό και ευκολότερη επίβλεψη των αρνιών λόγω της μαζικής γεννήσεώς τους. 3) Αποτελεσματικότερος σχεδιασμός του προγράμματος ευνουχισμού, της διεξαγωγής των εμβολιασμών, της διευθέτησης των βοσκοτόπων και της εμπορίας των παχυνόμενων αρνιών, λόγω της μαζικότερης παραγωγής αυτών. 4) Αποτελεσματικότερη αξιοποίηση του εργατικού δυναμικού λόγω της μικρότερης περιόδου των γεννήσεων των αρνιών, πράγμα το οποίο επιφέρει λιγότερες δυσκολίες στις άλλες αγροτικές εργασίες. 5) Λύση στο πρόβλημα των ορφανών αρνιών με την υιοθέτησή τους σε άλλες προβατίνες. 6) Βοήθεια στο χρονικό σχεδιασμό της τεχνητής σπερματέγχυσης (www.pethealth.gr/pdfs/products).

Συμπερασματικά, η αναπαραγωγή των μικρών μηρυκαστικών μπορεί να ελεγχθεί με διάφορες μεθόδους. Μερικές από αυτές περιλαμβάνουν τη χορήγηση εξωγενών ορμονών που τροποποιούν τη φυσιολογική αλυσίδα των γεγονότων που περιλαμβάνονται στον αναπαραγωγικό κύκλο, ενώ άλλες δεν περιλαμβάνουν ορμόνες, αλλά μόνο «φυσικές μεθόδους», όπως ο έλεγχος του φωτισμού ή η εισαγωγή αρσενικού στο ποίμνιο. Αυτομάτως ο διαχωρισμός αυτός κατατάσσει τις διάφορες μεθόδους συγχρονισμού του οίστρου σε ορμονικές και μη ορμονικές.

A) Μη ορμονικές μέθοδοι:

1.3.1. Η επίδραση της παρουσίας του αρσενικού.

Κατά την άνοιστρη περίοδο στις προβατίνες ή στις αίγες μπορεί να εκδηλωθεί οίστρος με την εισαγωγή του αρσενικού αν έχει προηγηθεί η απομάκρυνση των

αρσενικών για τουλάχιστον 40 ημέρες. Στην οιστρική περίοδο προκαλείται μερικός συγχρονισμός των οίστρων.

Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση γοναδοτροπινών και την εκδήλωση ωοθυλακιορρηξίας στις προβατίνες και τις αίγες (Henderson and Robinson, 2000).

Στην εισαγωγή του κριού, η προβατίνα αντιδρά με αύξηση της συγκέντρωσης της LH και των οιστρογόνων. Οι ενδοκρινικές αυτές μεταβολές οδηγούν σε ωοθυλακιορρηξία, συνήθως μέσα σε 1 έως 3 ημέρες μετά την εισαγωγή του κριού. Η ωοθυλακιορρηξία αυτή κατά κανόνα δε συνοδεύεται από οίστρο. Η απουσία οίστρου, παρά την έκκριση οιστρογόνων, οφείλεται στην απουσία προγεστερόνης κατά την άνοιστρη περίοδο, η οποία είναι αναγκαία για την προπαρασκευή των κέντρων γενετήσιας συμπεριφοράς του κεντρικού νευρικού συστήματος στη δράση των οιστρογόνων. Η τύχη του ωχρού σωματίου που σχηματίζεται μετά την πρώτη ωοθυλακιορρηξία είναι διαφορετική στις διάφορες προβατίνες. Σε ορισμένες προβατίνες η διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου είναι φυσιολογική. Οι προβατίνες αυτές εμφανίζουν οίστρο και ωοθυλακιορρηξία 16 έως 17 ημέρες μετά την εισαγωγή του κριού και μπορούν να γονιμοποιηθούν στο διάστημα αυτό. Ωστόσο, σε ένα ποσοστό περίπου 50% των θηλυκών, το ωχρό σωματίο εκφυλίζεται πρόωρα, με συνέπεια τα ζώα αυτά να εμφανίσουν για δεύτερη φορά ωοθυλακιορρηξία με σιωπηρό οίστρο 7 έως 9 ημέρες μετά την εισαγωγή του κριού. Στη περίπτωση αυτή οι πρώτες γόνιμες συζεύξεις είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν 22 έως 23 ημέρες μετά την εισαγωγή του κριού. Η παραλλακτικότητα της αντίδρασης των προβατίνων στην εισαγωγή των κριών ελαττώνεται αισθητά, όταν στις προβατίνες χορηγηθεί επί τουλάχιστον έξι ημέρες πριν από την εισαγωγή του κριού προγεστερόνη, υπό μορφή ενέσιμη ή ενδοκοιλιακών σπόγγων εμπλουτισμένων με προγεσταγόνα (Ρογδάκης, 2004).

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται επίσπευση της έναρξης της αναπαραγωγικής περιόδου κατά 3 έως 6 εβδομάδες σχεδόν στο 60-70% των θηλυκών του ποίμνιου, χωρίς ικανοποιητικά ποσοστά συγχρονισμού οίστρων. Παρά ταύτα, η μέθοδος αυτή δεν έχει καμία αποτελεσματικότητα κατά την εφαρμογή της, στο μέσο της άνοιστρης περιόδου (Henderson and Robinson, 2000).

Κατά την οιστρική περίοδο, η εισαγωγή αρσενικών σε ομάδα θηλυκών, μετά από μία περίοδο απομόνωσης, έχει ως αποτέλεσμα μικρό ποσοστό συγχρονισμού οιστρικών κύκλων και ταυτόχρονη εκδήλωση οίστρων σε μέρος του κοπαδιού (Chemineaou, 1987).

Το βασικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το χαμηλό κόστος και η μη χρησιμοποίηση εξωγενών ορμονών ενώ ως βασικό της μειονέκτημα αποτελεί η μειωμένη αποτελεσματικότητά της ως μέθοδος συγχρονισμού οίστρων (Henderson, 1991).

1.3.2. Τεχνητή μεταβολή της φωτοπεριόδου.

Τα πρόβατα είναι εποχικώς πολυοιστρικά ζώα, με συνέπεια να εκδηλώνουν οιστρική δραστηριότητα την εποχή μειούμενης φωτοπεριόδου, όταν δηλαδή η διάρκεια

του ημερήσιου φωτισμού ελαττώνεται. Έτσι η εποχή εκδήλωσης οιστρικών κύκλων μπορεί να μετατεθεί με τροποποίηση της φυσικής φωτοπερίόδου, υπό την έκθεση των ζώων σε τεχνητό φωτισμό μειούμενης διάρκειας. Η μέθοδος αυτή απαιτεί τη δημιουργία ειδικών συνθηκών σταυλισμού των ζώων και έτσι εφαρμόζεται μόνο σε πειραματικό πλαίσιο (Chemineaou et al., 1998).

Κατά τη διαδικασία της εφαρμογής αυτής απαραίτητη προϋπόθεση είναι η διαμόρφωση του χώρου παραμονής των ζώων κατάλληλα. Αυτό μπορεί να γίνει ως ακολούθως: Ο θάλαμος φωτοστεγανοποιείται και στη συνέχεια τοποθετείται ηλεκτρική εγκατάσταση λυχνιών φθορισμού, η λειτουργία των οποίων ρυθμίζεται από ηλεκτρικό χρονοδιακόπτη ανάλογα με τη διάρκεια του ημερήσιου φωτός κατά την οιστρική περίοδο. Δημιουργούνται ατομικές θέσεις ενσταβλισμού με ατομική ταΐστρα και ποτίστρα. Η θερμοκρασία του χώρου θα πρέπει να ελέγχεται καθημερινά με θερμομέτρο ελάχιστης και μέγιστης θερμοκρασίας και να παραμένει σχετικά σταθερή (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).

B) Ορμονικές μέθοδοι:

1.3.3. Εμφυτεύματα μελατονίνης.

Η ανακάλυψη της μελατονίνης από τον Lerner και τους συνεργάτες του (1958) άνοιξε νέα μονοπάτια για έρευνα, στο πεδίο της εποχικής αναπαραγωγής. Στη πραγματικότητα, το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας που αφορά τη μελατονίνη, μετά την ανακάλυψή της, είχε να κάνει με το ρόλο της στη ρύθμιση της αναπαραγωγής σε εποχικά αναπαραγόμενα ζώα (Bittman et al., 1983).

Η μελατονίνη εκκρίνεται από την επίφυση και αποτελεί το μεσολαβητή μεταξύ φωτοπερίόδου και αναπαραγωγής. Η χορήγηση μελατονίνης διεγείρει το νευροενδοκρινικό άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επίσπευση της έναρξης της αναπαραγωγικής περιόδου. Η διάρκεια της έκκρισης μελατονίνης αντικατοπτρίζει τη διάρκεια της νύχτας και επηρεάζει την επεισοδιακή έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) από τον υποθάλαμο. Η μεταβολή στην έκκριση της GnRH προκαλεί αντίστοιχες μεταβολές στην έκκριση της ωχρινοτρόπου ορμόνης, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ωοθυλακιορρηξία στα θηλυκά ζώα (Malpoux et al., 1999).

Η τοποθέτηση των εμφυτευμάτων γίνεται υποδορίως με ειδικό πιστόλι πίσω από το αφτί. Τα εμφυτεύματα παραμένουν εκεί χωρίς να απομακρυνθούν για διάστημα περίπου 40 ημερών. Η δραστική ουσία (μελατονίνη) απορροφάται σταδιακά από τον οργανισμό. Στο διάστημα αυτό τα αρσενικά διατηρούνται χωριστά από τα θηλυκά. Στη συνέχεια τα αρσενικά εισάγονται στο ποίμνιο των θηλυκών. Στην πλειονότητα (90%) των περιπτώσεων, ο οίστρος εκδηλώνεται 16 έως 18 ημέρες μετά την είσοδο των κριών και μεταξύ της 45ης και 60ης ημέρας από τη τοποθέτηση του εμφυτεύματος. Σημειώνεται ότι με τη χορήγηση μελατονίνης δεν επιτυγχάνεται μεγάλος βαθμός συγχρονισμού του οιστρικού κύκλου των ζώων (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).

Η μέθοδος εφαρμόζεται με επιτυχία λίγο πριν από την έναρξη της οιστρικής περιόδου και παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- ✓ Η εμφάνιση ομαδικών οίστρων στο τέλος της άνοιστρης περιόδου γύρω στο Μάιο με Ιούνιο, με πολύ καλά ποσοστά γονιμότητας.
- ✓ Τα πρόβατα που δεν συλλαμβάνουν με τον πρώτο οίστρο εμφανίζουν οίστρο μετά από 17 ημέρες.
- ✓ Ο δείκτης πολυδυμίας είναι υψηλότερος σε σύγκριση με το φυσικό οίστρο.
- ✓ Αποφεύγεται η μεγάλη πολυδυμία που προκαλείται στην περίπτωση χορήγησης ωοθυλακιοτρόπου γοναδοτροπίνης, όπως η eCG, σε λάθος δόση η οποία δεν είναι η επιθυμητή (Abecia et al., 2012).

1.3.4. Προγεστερόνη και ανάλογά της (προγεσταγόνα).

Τα προγεσταγόνα είναι συνθετικά ανάλογα της προγεστερόνης. Το αποτέλεσμα της χορήγησης προγεστερόνης ή προγεσταγόνων είναι η αναστολή της έκκρισης των γοναδοτροπινών και κατά συνέπεια η αναστολή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και της ωοθυλακιορρηξίας. Στην ουσία η χορήγησή τους μιμείται την ύπαρξη ωχρού σωματίου και την έκκριση από αυτό προγεστερόνης, για αυτό το λόγο χορηγούνται για χρονικό διάστημα ίσο με τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του οιστρικού κύκλου του αντίστοιχου ζωικού είδους. Όταν παύσει η χορήγησή τους, ακολουθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα έκκριση γοναδοτροπινών, με αποτέλεσμα την έναρξη της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, την ωοθυλακιορρηξία και την εκδήλωση οίστρου. Συνεπώς, όταν τα προγεσταγόνα χορηγηθούν σε μια ομάδα θηλυκών ζώων, αμέσως μετά το τέλος της αγωγής σε αυτά θα προκληθεί οίστρος ταυτόχρονα, ανεξαρτήτως σε ποια φάση αυτά βρίσκονταν κατά την έναρξη της αγωγής (Gordon, 1997).

Για τη ρύθμιση του οιστρικού κύκλου στα μικρά μηρυκαστικά έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο η προγεστερόνη όσο και διάφορα προγεσταγόνα (οξική μεδροξυπρογεστερόνη, οξική μελεγεστρόλη, οξική φθοριογεστόνη) σε ποικίλες φαρμακοτεχνικές μορφές (προμίγματα, ενέσιμα σκευάσματα, εμφυτεύματα, σπόγγοι πολουρεθάνης, ειδικές συσκευές ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων) και με διάφορες οδούς χορήγησης (από το στόμα, ενδομυϊκώς, υποδορίως, ενδοκολπικώς) (Kusina et al., 2000, Bari et al., 2001, Oliveira et al., 2001).

Επιπροσθέτως, η πιο κοινή μορφή χορήγησης προγεσταγόνων είναι η ενδοκολπική. Συσκευές ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμακευτικών ουσιών [controlled internal drug release (CIDR)], εμποτισμένες με προγεσταγονούχα χρησιμοποιούνται από το 1980 (Welch et al., 1984). Αποτελούνται από ένα σιλικονούχο ελαστομερές εμποτισμένο με προγεστερόνη. Η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο πλάσμα του αίματος αυξάνεται απότομα μετά την εισαγωγή της συσκευής, αποκτώντας τη μέγιστη τιμή 3 ημέρες μετά την εισαγωγή και τότε σταδιακά μειώνεται (Wheaton et al., 1993). Η χρήση της συσκευής, επισπεύδει την έναρξη της οιστρικής περιόδου και σε

συνδυασμό με την επίδραση του κριού, μπορεί να προκαλέσει την εκτός οιστρικής περιόδου ωθηκική δραστηριότητα (Wheaton et al., 1992).

Ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους χορήγησης προγεσταγόνων, είναι με τη χρησιμοποίηση ενδοκολπικών σπόγγων. Είναι απλός, εύχρηστος και εφαρμόζεται χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα στις προβατίνες σε όλες τις εποχές του έτους. Η μέθοδος βασίζεται στη χρησιμοποίηση ενδοκολπικών σπόγγων από πολυουρεθάνη, οι οποίοι είναι εμποτισμένοι ομοιόμορφα με προγεσταγόνα. Στο εμπόριο τα πιο συνηθισμένα είδη προγεσταγόνων που κυκλοφορούν είναι: MAP, FGA, CAP, MGA, κ.λπ. και η ποσότητα τους στους σπόγγους κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 30-60 mg ανάλογα με τη δραστηριότητα του σκευάσματος (Matthews, 1999). Οι σπόγγοι μπορούν να παραμείνουν στον κόλπο, κατά την άνοιξη περίοδο 10-12 ημέρες και στην οιστρική περίοδο 14 ημέρες από την ημέρα της τοποθέτησής τους (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).

Κατά την εξαγωγή των σπόγγων γίνεται ενδομυϊκή έγχυση ίππειας χοριακής γοναδοτροπίνης [equine chorionic gonadotrophin (eCG)], γνωστή και ως ορμόνη ορού της εγκύου φορβάδας [pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG)], η οποία παράγεται από τον πλακούντα των εγκύων φοράδων και έχει κυρίως δράση ωοθυλακιότροπου ορμόνης (σημειώνεται ότι παρουσιάζει και δράση ωχρινοτρόπου ορμόνης σε μικρό βαθμό). Στα μικρά μηρυκαστικά, η χορήγησή της κατά την ωοθυλακική φάση του οιστρικού κύκλου ή στο τέλος της αγωγής με προγεσταγόνα προάγει την ανάπτυξη ωοθυλακίων. Συνεπώς, η χορήγησή της κατά την άνοιξη περίοδο ή κατά το τέλος της και λίγο πριν την έναρξη της οιστρικής περιόδου, είναι απαραίτητη για την επιτυχή πρόκληση και τον καλύτερο συγχρονισμό των οιστρικών κύκλων. Στην οιστρική περίοδο, η χορήγηση eCG συνήθως χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της γονιμότητας και της πολυδυμίας των θηλυκών ζώων (Robinson and Smith, 1967, Langford et al., 1982, Langford et al., 1983, Killian et al., 1985, Pearce and Robinson, 1985, Mutiga and Mukasa-Mugerwa, 1992, Safranski et al., 1992, Menegatos et al., 1995, Cardwell et al., 1998).

Η δόση της eCG πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα με την εποχή του έτους, καθώς επίσης και τη φυλή και τους στόχους της εκτροφής, ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας. Οι φυλές που παρουσιάζουν υψηλό δείκτη πολυδυμίας ή/και χαμηλή εποχικότητα ανταποκρίνονται, γενικώς, εντονότερα στη δράση της eCG και οι δόσεις που απαιτούνται είναι χαμηλότερες. Επιπλέον, η χορηγούμενη δόση μειώνεται προοδευτικά, όσο πλησιέστερα στην οιστρική περίοδο επιχειρείται η πρόκληση οίστρου. Έτσι, κατά την άνοιξη ή τη μεταβατική περίοδο, η eCG χορηγείται ενδομυϊκώς, στο τέλος της αγωγής με προγεσταγόνα, σε δόση 500 έως 600 IU, ενώ στην οιστρική περίοδο η δόση της, για κάθε προβατίνα, είναι περίπου 300-400 IU. Στη πλειονότητα (95%) των περιπτώσεων, οι οίστροι εκδηλώνονται εντός 24 έως 72 ωρών μετά την αφαίρεση των σπόγγων και την έγχυση της ορμόνης, ενώ οι ωοθυλακιορρηξίες επιτυγχάνονται στις 55-70 ώρες μετά την έγχυση της eCG (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).

Μετά την αγωγή, εάν το τέλος του δεύτερου οίστρου συμβεί στην άνοιστρη περίοδο για κάποιο ζώο που δεν έχει γονιμοποιηθεί, δεν ακολουθεί επόμενος οιστρικός κύκλος (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).

Προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να μειωθεί ο χρόνος παραμονής των ενδοκολπικών σπόγγων κατά τον συγχρονισμό του οίστρου και η επίσπευση της ωοθυλακιορρηξίας. Ο σπόγγος παραμένει στο κόλπο του ζώου για 5 έως 9 ημέρες, αυτό το χρονικό διάστημα αντιστοιχεί στη μέση διάρκεια ζωής ενός ωχρού σωματίου, που μπορεί να βρίσκεται στην ωοθήκη. Έτσι με την χορήγηση μιας δόσης προσταγλαδίνης $PGF_{2\alpha}$ ή αναλόγου της, ταυτόχρονα με την εξαγωγή του σπόγγου, το υπάρχον ωχρό σωματίο λύεται. Κατά τη λήξη της αγωγής με προγεσταγόνα στις προβατίνες μπορεί να χορηγηθεί επιπλέον eCG έτσι ώστε να επισπευτεί η ανάπτυξη του επόμενου ωοθυλακικού κύματος (Pierson et al., 2001, Mcdan et. al., 2002). Η ανταπόκριση στην αγωγή είναι παρόμοια με μεγαλύτερης διάρκειας αγωγές (Letelier et al., 2009).

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου θα μπορούσαν να συνοψιστούν ως εξής:

- ✓ Η βελτίωση του ποσοστού επιτυχίας του συγχρονισμού και της γονιμότητας των ζώων σε σχέση με τα αποτελέσματα της χορήγησης μόνο προσταγλανδίνης $F_{2\alpha}$.
- ✓ Το σύντομο (σε σχέση με τις άλλες διαθέσιμες επιλογές) χρονικό διάστημα, που απαιτείται για το συγχρονισμό των οιστρικών κύκλων.
- ✓ Καθώς το κόστος εφαρμογής της μεθόδου είναι σχετικά υψηλό, στην πράξη η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για το συγχρονισμό οιστρικών κύκλων σε ζώα φυλών υψηλής γαλακτοπαραγωγής (Matthews, 1999).

1.3.5. Προσταγλανδίνη $F_{2\alpha}$ και συνθετικά ανάλογα.

Η χορήγηση φυσικής προσταγλανδίνης ή συνθετικών αναλόγων αυτής προκαλεί ωχρινόλυση και κατά συνέπεια οδηγεί σε ταχεία παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου και σε εκδήλωση οίστρου μετά από 1 έως 4 ημέρες. Η $PGF_{2\alpha}$ δρα μόνον όταν το ωχρό σωματίο βρίσκεται σε πλήρη λειτουργία. Αντίθετα, δεν προκαλεί ωχρινόλυση κατά την περίοδο της ανάπτυξης ή της φυσιολογικής παλινδρόμησης του ωχρού σωματίου. Συνεπώς η χορήγησή της κατά την άνοιστρη περίοδο είναι άωφελη (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).

Σε μια ομάδα προβατίνων ή αιγών, εφόσον δεν είναι γνωστή η ακριβής φάση του οιστρικού κύκλου καθενός ζώου ξεχωριστά, ο συγχρονισμός των οιστρικών κύκλων μπορεί να επιτευχθεί με δύο εγχύσεις $PGF_{2\alpha}$, σε διάστημα ίσο με το χρόνο πλήρους λειτουργίας του ωχρού σωματίου στο κάθε ζωικό είδος, δηλαδή 9 ημερών για τις προβατίνες. Με αυτόν τον τρόπο η δεύτερη ενδομυϊκή έγχυση προσταγλανδίνης συμπίπτει οπωσδήποτε με την ωχρινική φάση όλων των προβατίνων (Lymberopoulos et al., 2002, AI-Merestani et al., 2003).

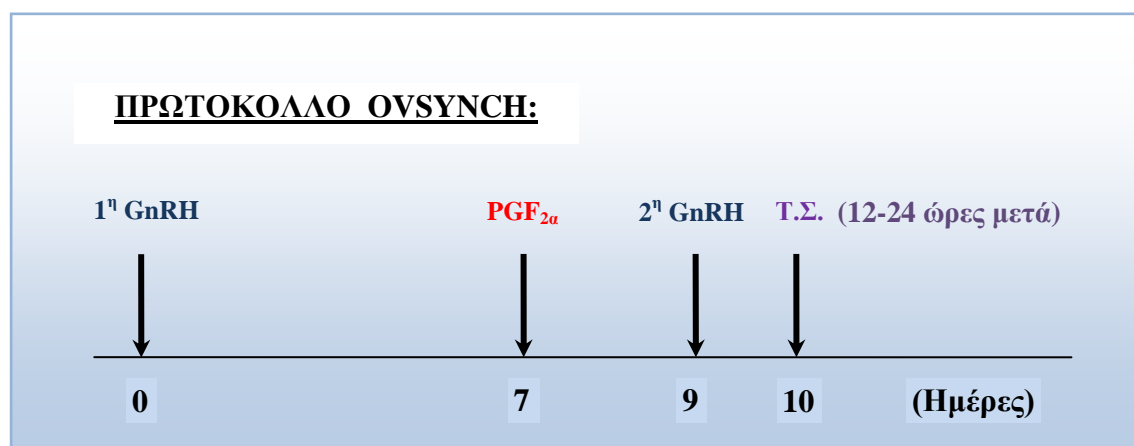
Η εκδήλωση οίστρου αναμένεται 36 έως 72 ώρες από τη 2η χορήγηση. Στη πράξη παρατηρείται μεγάλη διασπορά στην εμφάνιση των συγχρονισμένων οίστρων που φθάνει μέχρι 7-8 ημέρες μετά τη δεύτερη έγχυση (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).

Η μέθοδος αυτή δεν είναι πολύ διαδεδομένη στην πράξη και παρουσιάζει τα ακόλουθα μειονεκτήματα :

- Μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο κατά την οιστρική περίοδο των προβατίνων, όταν δηλαδή υπάρχει ωοθηκική δραστηριότητα και ωχρά σωματία. Στην άνοιστρη περίοδο δεν έχει καμία επίδραση.
- Τα σκευάσματα που κυκλοφορούν στο εμπόριο έχουν μεγάλο κόστος.
- Επιπλέον, το γεγονός ότι η χορήγηση $PGF_{2\alpha}$ σε έγκυα ζώα προκαλεί αποβολή, περιορίζει τη δυνατότητα εφαρμογής της σε εκτροφές, στις οποίες δεν τηρούνται επαρκή στοιχεία. Έτσι, στην πράξη η μέθοδος δε χρησιμοποιείται συχνά (Σαμαρτζή και Φθενάκης, 2003).
- Υπάρχει μεγάλη διασπορά οίστρων, ο συγχρονισμός δεν είναι καλός, ενώ η διακύμανση στην ανταπόκριση των ζώων και η γονιμότητα των ζώων, μετά την εφαρμογή της, είναι μειωμένη (Godfrey et al., 1999, Al-Merestani et al., 2003).

1.3.6. Συνδυασμός χορήγησης GnRH και $PGF_{2\alpha}$.

Τα τελευταία χρόνια στο τομέα του συγχρονισμού του οίστρου στις αγελάδες, γίνεται προσπάθεια εφαρμογής ενός νέου πρωτόκολλου, το οποίο προορίζεται για τη διενέργεια τυφλής σπερματέγχυσης σε προκαθορισμένο χρόνο και δίχως να έχει προηγηθεί ανίχνευση οίστρου, με πολύ καλά αποτελέσματα. Το πρωτόκολλο αυτό συνδυάζει τη χορήγηση ορμονών όπως η προσταγλαδίνη και GnRH ανάλογων. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως Ovsynch γιατί συγχρονίζει τις ωοθυλακιορρηξίες (ovulation synchronization → ov-synch) (Εικόνα 2) ανάμεσα σε ομάδες ζώων (Stevenson et al., 1999).



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των ορμονικών εφαρμογών του πρωτοκόλλου OVSYNCH.

Η βασική αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στο ότι η χορήγηση GnRH ανάλογων, σε ζώα που βρίσκονται στην ωχρινική φάση του οιστρικού κύκλου, προκαλεί είτε την ωοθυλακιορρηξία είτε την ατρησία του κυρίαρχου ωοθυλακίου το οποίο ενδεχόμενως να μην είναι ικανό να καταλήξει σε ωοθυλακιορρηκτικό μέγεθος και να μετατραπεί σε

ωχρο σωματίο. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα σε ένα καινούργιο ωοθυλακικό κύμα να εμφανιστεί ταχύτατα και ένα κυρίαρχο ωοθυλάκιο να καταλάβει τη θέση του. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι στο 85% των αγελάδων η χορήγηση GnRH, όταν γίνεται σε τυχαίο στάδιο του οιστρικού κύκλου των ζώων, μπορεί να ευθύνεται για την επικείμενη ωοθυλακιορρηξία ή ατρησία του ωχρού σωματίου, αν αυτό υπάρχει (Thatcher et al., 1989). Η χορήγηση PGF_{2a} 7 ημέρες μετά την GnRH προκαλεί παλινδρόμηση οποιασδήποτε ωχρινικής δομής που μπορεί να έχει δημιουργηθεί από αυθόρμητη ωοθυλακιορρηξία λόγω της έγχυσης του αναλόγου GnRH. Στις αγελάδες, στις οποίες το τρέχον ωοθυλακικό κύμα μεταβλήθηκε λόγω των εξωγενών ορμονικών αγωγών, πρέπει σύντομα και σε διάστημα 50-60 ωρών από την έγχυση PGF_{2a}, να εξασφαλιστεί η κατάλληλη ωρίμανση του κυρίαρχου ωοθυλακίου που θα επιτρέψει μια επαρκή και θετική αντίδραση στο επερχόμενο κύμα LH με αποτέλεσμα την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας που θα προκύψει από μια δεύτερη έγχυση GnRH, 36 ώρες μετά την PGF_{2a} (Intervet, 2003). Εικοσιέξι με τριάντα δύο ώρες μετά την δεύτερη χορήγηση GnRH, συντονισμένα εμφανίζεται στα ζώα που δέχτηκαν τις ορμονικές αγωγές ωοθυλακιορρηξία (Burke et al., 1994). Στη περίπτωση της εφαρμογής μίας τεχνητής σπερματέγχυσης (τυφλής), αυτή θα πρέπει να λάβει μέρος στις 14-24 ώρες μετά την δεύτερη αγωγή GnRH, με βέλτιστη χρονική περίοδο αυτή των 16 ωρών (Pursley et al., 1998).

Η εφαρμογή του πρωτόκολλου Ovsynch έχει υψηλό κόστος όταν εφαρμόζεται για το συγχρονισμό αγελάδων, αλλά από την άλλη πλευρά δεν απαιτείται αφιέρωση χρόνου για τη παρακολούθηση συμπτωμάτων οίστρου.

Βασιζόμενοι σε αυτό το πρωτόκολλο και τα θετικά αποτελέσματα που αποδίδει στις αγελάδες κατά τη διενέργεια προγραμματίων τεχνητής σπερματέγχυσης, γίνεται προσπάθεια, από ερευνητές, μεταφοράς του σε εφαρμογές συγχρονισμού του οίστρου στα πρόβατα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στα μικρά μηρυκαστικά η παρατήρηση του οίστρου είναι σχεδόν αδύνατη, η εφαρμογή ενός αντίστοιχου προγράμματος συγχρονισμού οίστρου, το οποίο θα ακολουθούνταν από τη διενέργεια φυσικής οχείας ή τεχνητής σπερματέγχυσης, έχει αρκετό ενδιαφέρον.

Στο πρόβατο κατά τον οιστρικό κύκλο, λαμβάνουν χώρα 2 με 4 ωοθυλακικά κύματα (Noel et al., 1993, Ravindra et al., 1994, Ginther et al., 1995, Bartlewski et al., 1999, Evans et al., 2000). Σε κάθε κύμα ένα ή περισσότερα ωοθυλάκια αναπτύσσονται και διατηρούν κυριαρχία (Webb and England, 1982). Η ωχρινοποίηση των κυρίαρχων ωοθυλακίων μπορεί να επισπευθεί μετά από ορμονική αγωγή, όπως η GnRH (Ginther et al., 1995, Rubianes et al., 1997, Murdoch and Van Kirk, 1998) ή η ανθρώπινη χορειακή γοναδοτροπίνη (Driancourt et al., 1990).

Η PGF_{2a} είναι ο κυριότερος ωχρινολυτικός παράγοντας στο πρόβατο (McCracken et al., 1972). Η ανταπόκριση του ωχρού σωματίου στη προσταγλαδίνη, περιορίζεται στο διάστημα από την 4η μέχρι τη 14η ημέρα του οιστρικού κύκλου, αν λάβουμε ως ημέρα 0 την ημέρα του οίστρου (Rowson et al., 1972, Acritopoulou and Haresign, 1980, Wiltbank and Niswender, 1992). Το στάδιο του οιστρικού κύκλου, στο οποίο θα γίνει η εφαρμογή της PGF_{2a}, επηρεάζει χρονικά την προωοθυλακιορρηκτική αιχμής της LH

(Acritopoulou and Haresign, 1980). Παρατηρείται αυθόρμητη ωχρινόλυση, και προκαλεί μια απότομη πτώση στα επίπεδα της προγεστερόνης, που ακολουθείται, περίπου 70 ώρες αργότερα και επιφέρει την ωοθυλακιορρηξία (Gordon, 1997).

Η διαχείριση της ωχρινόλυσης αποτελεί στοιχείο κλειδί για τον επόμενο συγχρονισμό οίστρου και της τεχνητής βράχυνσης ή επιμήκυνσης της διάρκειας ζωής του ωχρού σωματίου μέσω της προσταγλανδίνης (Ginther et al., 1995, Rubianes et al., 1997, Lymberopoulos et al., 2001, Menegatos et al., 2003). Οι συγχρονισμένοι οίστροι οδηγούν σε καλά ποσοστά σύλληψης όταν χρησιμοποιείται φυσική οχεία και διπλή ή μονή τεχνητή σπερματέγχυση, μετά από ανίχνευση οίστρου.

Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής, αποτελεί η γονιμοποίηση, μετά τη χορήγηση της δεύτερης GnRH, η οποία επισπεύδει και συντονίζει χρονικά την ωοθυλακιορρηξία, σε ένα δεύτερο ωοθυλακικό κύμα, περιορίζοντάς το να συμβεί σε υπολογίσιμο χρονικό διάστημα. Υπό αυτές τις συνθήκες αυτό το πρωτόκολλο μπορεί να εφαρμοστεί για εκτέλεση τεχνητής σπερματέγχυσης ή και φυσικής οχείας, σε πιο στενή χρονική περίοδο σε ομάδες ζώων (Deligiannis et al., 2005).

Μελέτες που έχουν διεξαχθεί πάνω σε αυτό το πρωτόκολλο, δείχνουν ότι η αγωγή δεν επηρεάζει την κυκλικότητα των θηλυκών, αλλά και δεν μειώνει την γονιμότητά τους (Deligiannis et al., 2005).

1.4. Γλυκοπρωτεΐνες που συνδέονται με την εγκυμοσύνη [Pregnancy- Associated Glycoproteins (PAGs)].

Η διαθεσιμότητα μέσω των για την έγκαιρη διάγνωση εγκυμοσύνης είναι πρακτικής σημασίας στις αιγοπροβατοτροφικές επιχειρήσεις. Στις αγελάδες ο πιο κοινός τρόπος ανίχνευσης εγκυμοσύνης είναι η δια απευθυσμένου ψηλάφηση. Για ανατομικούς-μορφολογικούς λόγους, αυτή η μέθοδος δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα μικρά μηρυκαστικά. Εκτός από την παρατήρηση της επιστροφής στον οίστρο, τα πιο κοινά μέσα για τη διάγνωση της εγκυμοσύνης στα μικρά μηρυκαστικά είναι η διαπρωκτική ή παρακοιλιακή υπερηχογράφηση (Martinez et al., 1998, Padilla-Rivas et al., 2005), η μέτρηση προγεστερόνης στο αίμα ή το γάλα (Agwu and Holtz, 1986), τα οιστρογόνα στο αίμα (Dhindsa et al., 1981, McArthur and Geary, 1986, Sindermann et al., 1992) ή τα περιττώματα (Holtz, 1992, Sindermann et al., 1992, Ledezma-Torres, 2002) και πιο πρόσφατα, ο προσδιορισμός γλυκοπρωτεϊνών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (PAG) στο αίμα (Sousa et al., 1999, Gonzalez et al., 1999, Batalha et al., 2001) ή το γάλα (Gonzalez et al., 2001). Η PAG μπορεί να μετρηθεί με τη ραδιοανοσολογική δοκιμασία (RIA) (Sasser et al., 1986, Zoli et al., 1992), ή την ένζυμο-συνδεδεμένη ανοσολογική δοκιμασία (ELISA) χρησιμοποιώντας μονόκλωνα (Green et al., 2005) ή πολύκλωνα αντισώματα (Friedrich and Holtz, 2004).

Οι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με την εγκυμοσύνη (PAGs) είναι μακρομόρια που παράγονται από τον ιστό του πλακούντα και απελευθερώνονται στη μητρική αιματική κυκλοφορία, όπου επιτρέπουν τη διάγνωση εγκυμοσύνης καθώς και τη παρακολούθησή της (Shahin et al., 2013).

Τόσο οι γλυκοπρωτεΐνες που συνδέονται με την εγκυμοσύνη (PAG1) όσο και η ειδική της εγκυμοσύνης πρωτεΐνη Β (PSPB), είναι είτε ίδια, είτε πολύ σχετικά αντιγόνα που απελευθερώνονται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης του πλακούντα των βοοειδών. Τα πρόβατα και άλλα μηρυκαστικά παράγουν παρόμοια προϊόντα. Υπάρχουν στοιχεία, εντούτοις, ότι αυτά τα αντιγόνα, που συσχετίζονται δομικά με τα πεψινογόνα και άλλες ασπαρτικές πρωτεΐνάσες, δεν είναι μόνο γονιδιακά προϊόντα αλλά μέλη μιας εκτενούς οικογένειας. Τα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι στην 100^η ημέρα της εγκυμοσύνης ο πρόβειος πλακούντας παράγει πολλά διαφορετικά PAGs, τα οποία διαφέρουν αρκετά ως προς την αλληλουχία και την ανοσολογική αντίδραση (Xies et al., 1997).

Η οριστική σύνδεση του εμβρυϊκού πλακούντα γίνεται όταν τα τροφοβλαστικά διπύρρηνα κύτταρα αρχίζουν να μεταναστεύουν για να μετατραπούν σε ενδομητρικά κύτταρα και να συνδράμουν στην εμφύτευση της βλαστικής κύστης στο ενδομήτριο. Επομένως αυτές οι γλυκοπρωτεΐνες είναι καλοί δείκτες τόσο της εγκυμοσύνης όσο και της εξέλιξης του εμβρυϊκού πλακούντα. Χρησιμοποιώντας ετερόλογους ραδιοανοσολογικούς παράγοντες, οι ονPAG και ονPSPB μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα των έγκυων προβατίνων περίπου την 20^η ημέρα μετά την σύζευξη. Καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η συγκέντρωση ονPAG ποικίλλει σύμφωνα με τη φυλή της προβατίνας και του φύλου και του αριθμού των εμβρύων. Μετά το τοκετό, οι συγκεντρώσεις των ονPAG και ονPSPB μειώνονται γρήγορα, φθάνοντας στα αρχικά επίπεδα την 2^η - 4^η εβδομάδα μετά τον τοκετό (Karen et al., 2003).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

2.1. Σκοπός του πειράματος.

Ο σκοπός του πειράματος ήταν διπλός: α) η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου συγχρονισμού οίστρου στα πρόβατα, που βασίζεται στη χρήση ενός ορμονικού ανάλογου GnRH σε συνδυασμό με προσταγλανδίνη PGF_{2α} και η σύγκρισή του με ένα κλασσικό πρωτόκολλο συγχρονισμού οίστρου μικρών μηρυκαστικών, στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν, ειδικοί ενδοκολπικοί σπόγγοι, εμποτισμένοι με προγεσταγονόχο σε συνδυασμό με ίππεια χορειακή γοναδοτροπίνη eCG, έτσι ώστε να διαπιστωθεί το πιο αποτελεσματικό πρωτόκολλο, όσον αφορά το ποσοστό σύλληψης, β) η σύγκριση δύο διαφορετικών μεθόδων διάγνωσης εγκυμοσύνης της μέτρησης αφ' ενός των επιπέδων συγκέντρωσης της προγεστερόνης και αφετέρου των σχετιζόμενων με τη κύηση πρωτεϊνών (PAGs), σε συγκεκριμένα διαστήματα μετά τις οχείες.

2.2. Πρωτόκολλα συγχρονισμού οίστρου.

2.2.1. Υλικά και μέθοδοι.

Η διεξαγωγή του πειράματος, πραγματοποιήθηκε στη περιοχή Κατουνίστρα Λουτρακίου του νομού Κορινθίας (γεωγραφικό πλάτος 37° 23' N/ 100m υψόμετρο). Στη συγκεκριμένη μονάδα, εκτρέφονται πρόβατα διασταύρωσης φυλών, κυρίως Χίου και Φριςλανδόμορφου, καθώς και ντόπιων ελληνικών προβάτων τα οποία ενδημούσαν στη περιοχή, υπό ημεκτατικό σύστημα εκτροφής.

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ηλικίας μεταξύ 2,5 έως 3 ετών, παρόμοιου σωματικού βάρους (43,1 kg / ± 0,5) και είχαν όλα πραγματοποιήσει έναν τουλάχιστον τοκετό. Για τη διατροφή των ζώων, χρησιμοποιήθηκαν σανός βρώμης, ως χονδροειδής ζωτροφή, σε συνδυασμό με μίγμα συμπυκνώματος του εμπορίου υπό μορφή σύμπηκτων (pellets) και πλακών λήξεως (ιχνοστοιχείων /βιταμινών). Στον Πίνακα 2.2.2.1. παρουσιάζεται η εκατοστιαία ανάλυση της χημικής σύστασης του συμπυκνώματος γαλακτοπαραγωγής και οι ποσότητες των πρόσθετων υλών, ανά κιλό ζωοτροφής. Επιπροσθέτως, στα ζώα παρέχονταν άφθονο και πολύ καλής ποιότητας νερό.

Το πείραμα έλαβε χώρα στα αρχές Ιουνίου του 2013 και διήρκησε μέχρι περίπου τις αρχές Αυγούστου. Επίσης κατά το ίδιο διάστημα και συγκεκριμένα το πρώτο μήνα, τα ζώα ζυγίζονταν εβδομαδιαία.

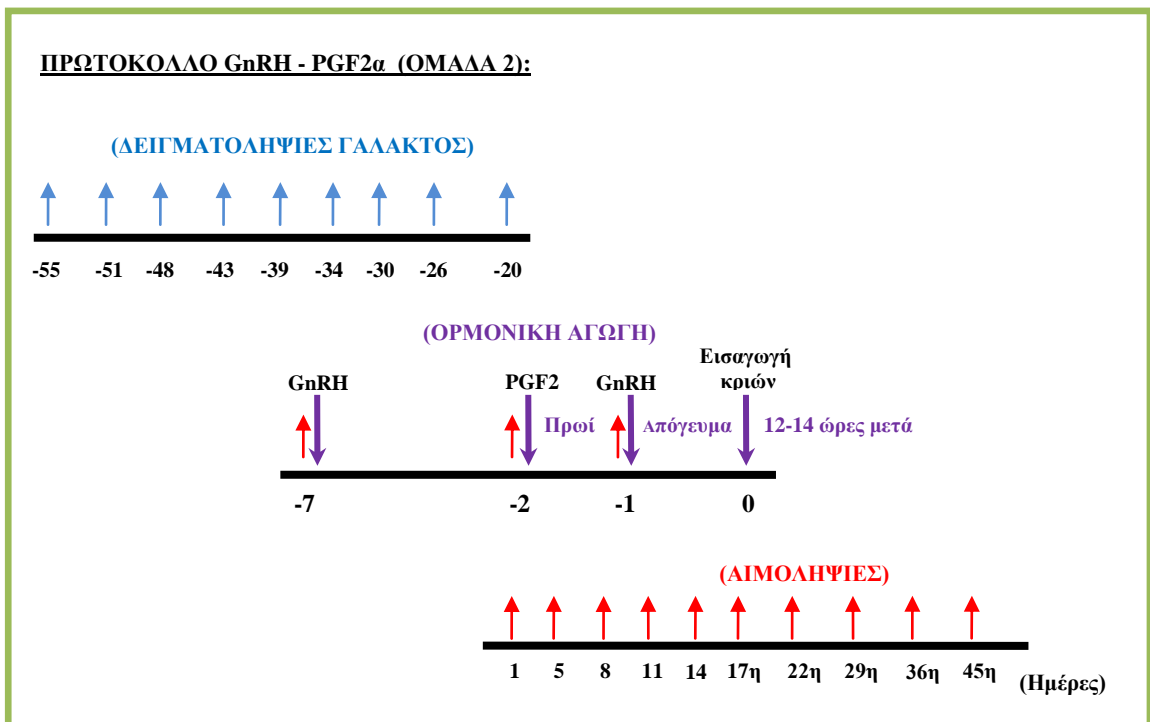
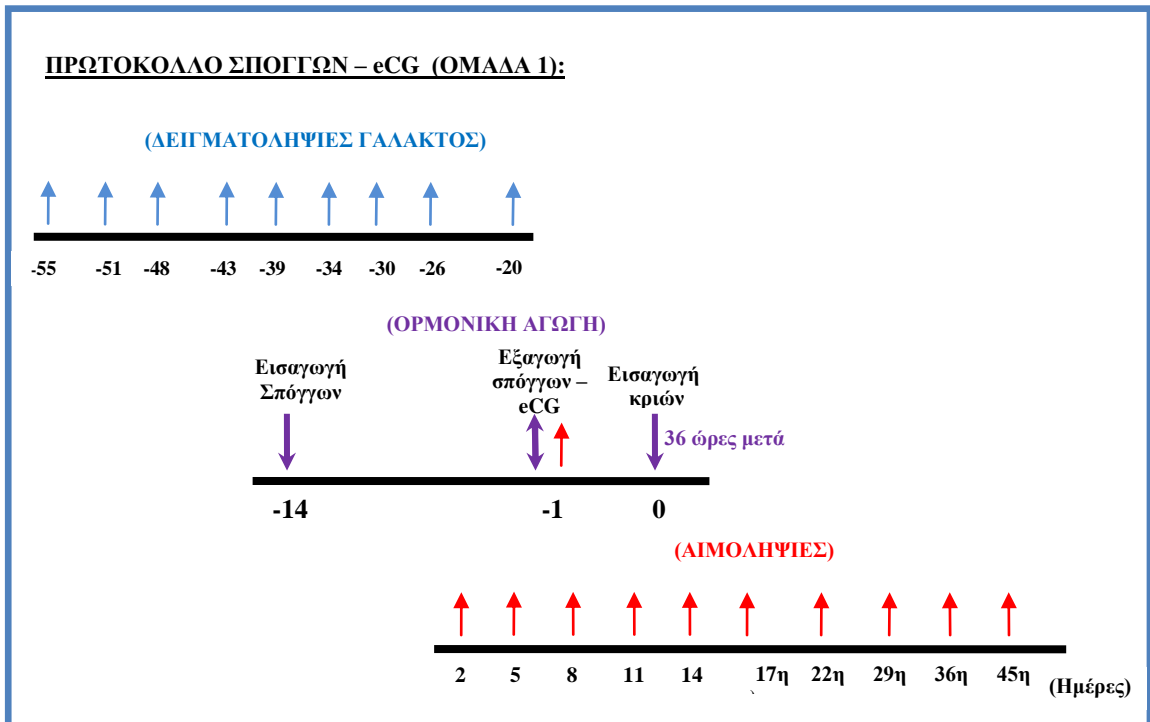
Το πείραμα περιελάμβανε δυο ομάδες ζώων των 15 ατόμων η κάθε μία υπό συνθήκες πλήρους στάβλισης και ξεχωριστά. Οι χώροι τροποποιήθηκαν ώστε να υπερκαλύπτουν τις ελάχιστες απαιτούμενες ανάγκες των 1,2 m²/ζώο (Παπαβασιλείου και Νικολάου, 2001), για κάθε ομάδα, υπό στεγάστρο με ικανοποιητικό αερισμό και μικροκλίμα.

1^η Ομάδα. Το πρωτόκολλο της ομάδας αυτής περιελάμβανε την εισαγωγή ενδοκολπικών προγεσταγονούχων σπόγγων, οι οποίοι περιείχαν 60 mg Οξικής Μεδροξυπρογεστερόνης (VERAMIX Urjohn company, Kalamazoo, Michigan, USA, Pfizer Helas A.E.). Οι σπόγγοι παρέμειναν για 14 ημέρες και κατά την εξαγωγή τους χορηγήθηκαν 350IU, ίππειας χορειακής γοναδοτροπίνης (eCG) (Intergonan, Intervet International B.V., Holland). Η εισαγωγή των κριών έγινε 24 ώρες μετά τη χορήγηση eCG και ακολούθησε η παρατήρηση και καταγραφή των οίστρων. Ως ημέρα 0 θεωρήθηκε η ημέρα εισαγωγής των κριών (Εικόνα 3).

2^η Ομάδα. Το πρωτόκολλο συγχρονισμού περιελάμβανε μια ενδομυϊκή έγχυση 1,5 ml ενός GnRH αναλόγου (Receptal, Intervet International BV, Boxmeer, Holland). Επτά ημέρες μετά στα ζώα χορηγήθηκαν 0,5 ml προσταγλανδίνης (PGF_{2α}) (Pronilen, Intervet International BV, Boxmeer, Holland) και 36 ώρες μετά ακολούθησε μια δεύτερη αγωγή με 1,5 ml GnRH. Η εισαγωγή των κριών έγινε 12-14 ώρες μετά την εφαρμογή της δεύτερης GnRH και ακολούθησε ανίχνευση και καταγραφή του οίστρου. Ως ημέρα 0 ελήφθη η ημέρα εισαγωγής των κριών (Εικόνα 3).

Πίνακας 2.2.2.1.: Χημική σύσταση (%) του μίγματος γαλακτοπαραγωγής και σύνθεση των πρόσθετων υλών, ανά κιλό ζωοτροφής.

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ (%)		ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΥΛΕΣ (ανά κιλό ζωοτροφής)	
Ολικές Αζωτούχες Ουσίες	22,5 %	Βιταμίνη Α	12.000 IU
Ολικές Λιπαρές Ουσίες	3,5 %	Βιταμίνη D3	1.200 IU
Ινώδεις Ουσίες	8,0 %	Βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη)	20 IU
Ολική Τέφρα	8,0 %	Σίδηρος	100 mg
Ασβέστιο	1,4 %	Μαγγάνιο	50 mg
Φώσφορος	0,6 %	Ψευδάργυρος	150 mg
		Ιώδιο	6.5 mg
		Κοβάλτιο	2 mg
		Σελήνιο	200 µg
		Μορφή Ζωοτροφής: Σύμπηκτα (Pellets) 6mm	



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των ορμονικών εφαρμογών και δειγματοληψιών (γάλακτος πριν τις ορμονικές αγωγές - αίματος μετά τις ορμονικές αγωγές) όπως αυτές έλαβαν μέρος, στις ομάδες 1 και 2, ξεχωριστά.

2.2.2. Δειγματοληψίες.

Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα έναρξης του πρωτοκόλλου συγχρονισμού, πριν από κάθε ορμονική αγωγή και στη συνέχεια την 2, 5, 8, 11, 14, 17,

22, 29, 36, 45 ημέρα για την ομάδα 1 και την 1, 5, 8, 11, 14, 17, 22, 29, 36 και 45 ημέρα για την ομάδα 2 μετά την εισαγωγή των κριών (Εικόνα 3). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 στροφές ανά λεπτό και το πλάσμα του αίματος αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυση για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης.

Επίσης στα δείγματα των ημερών 22, 36, 29 και 45 έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της PAG.

Από τα τέλη Απριλίου μέχρι και την έναρξη του πειράματος δείγματα γάλακτος συλλέγονταν από όλες τις προβατίνες για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης.

Η διαδικασία του πειράματος, επίσης περιλάμβανε την καταγραφή στοιχείων που αφορούσαν τους τοκετούς, μέσω των οποίων τελικά επιβεβαιώθηκαν οι αρχικές εκτιμήσεις εγκυμοσύνης χρονικά, συνεκτιμώντας τις παρατηρήσεις των οχείων αλλά και των συγκεντρώσεων της προγεστερόνης για κάθε ζώο. Επίσης, πρόσθετα στοιχεία συλλέχθηκαν, όπως το μέγεθος της τοκετοομάδας, το βάρος των γεννηθέντων αμνών, το φύλο αυτών, τυχόν δυστοκίες αλλά και η διάρκεια κυοφορίας για κάθε ζώο, που έμεινε έγκυο εντός της διάρκειας των αιμοληψιών και κατά προσέγγιση σε αυτά που η σύλληψη έγινε μετά το πέρας των αιμοληψιών. Οι πρώτοι τοκετοί ξεκίνησαν στις 13/11/13 και διήρκησαν μέχρι τις 25/2/14 (τελευταίος τοκετός).

2.3. Ραδιοανοσολογική μέθοδος προσδιορισμού της προγεστερόνης.

Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης της προγεστερόνης, μετρήθηκαν με τη ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA), με τη βοήθεια του kit Coat-A-Count Progesterone της Siemens Healthcare Diagnostics. Το kit βασίζεται στην αντίδραση στερεάς φάσης αντιγόνου (προγεστερόνη) – αντισώματος. Η αντίδραση διεξάγεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες που είναι επικαλυμμένοι εσωτερικά με ειδικό αντίσωμα έναντι της προγεστερόνης. Η προγεστερόνη του ορού (του αίματος ή του γάλακτος) συναγωνίζεται με την σεσημασμένη I^{125} προγεστερόνη για τις θέσεις του αντισώματος. Η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε σε 0,02 ng/ml, και ο συντελεστής παραλλακτικότητας μεταξύ και εντός της ίδιας δοκιμασίας ήταν 5,6% και 3,9%, αντίστοιχα.

2.4. Μέθοδος προσδιορισμού των γλυκοπρωτεϊνών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (PAGs).

Οι συγκεντρώσεις των PAG, μετρήθηκαν με την ενζυμοανοσολογική μέθοδο (ELISA) ειδική για προσδιορισμό γλυκοπρωτεϊνών αγελάδας. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε Εργαστήριο Φυσιολογίας, Κλινική Μαιευτικής και Αναπαραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

2.5. Στατιστική ανάλυση.

Για την ανάλυση των δεδομένων του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS version 14.0, SPSS inc. USA. Για τα επίπεδα της προγεστερόνης των δύο ομάδων κατά τις ημέρες -1, 1, 7, 10, 13, 17 έγινε ανάλυση διασποράς με τη μέθοδο ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις με παράγοντες (α) το χρόνο (ημέρες) και (β) τις ομάδες με διαφορετική εφαρμογή πρωτοκόλλου συγχρονισμού. Με την ίδια μέθοδο αναλύθηκαν και οι τιμές της προγεστερόνης των ημερών 17, 22 των εγκύων ζώων κατά τη διάγνωση εγκυμοσύνης, καθώς επίσης και τα σωματικά βάρη για τις ημέρες -3, 5, 12 και 26. Όσον αφορά τη PAG των εγκύων ζώων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης One Way Anova με παράγοντα τον χρόνο (ημέρες).

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

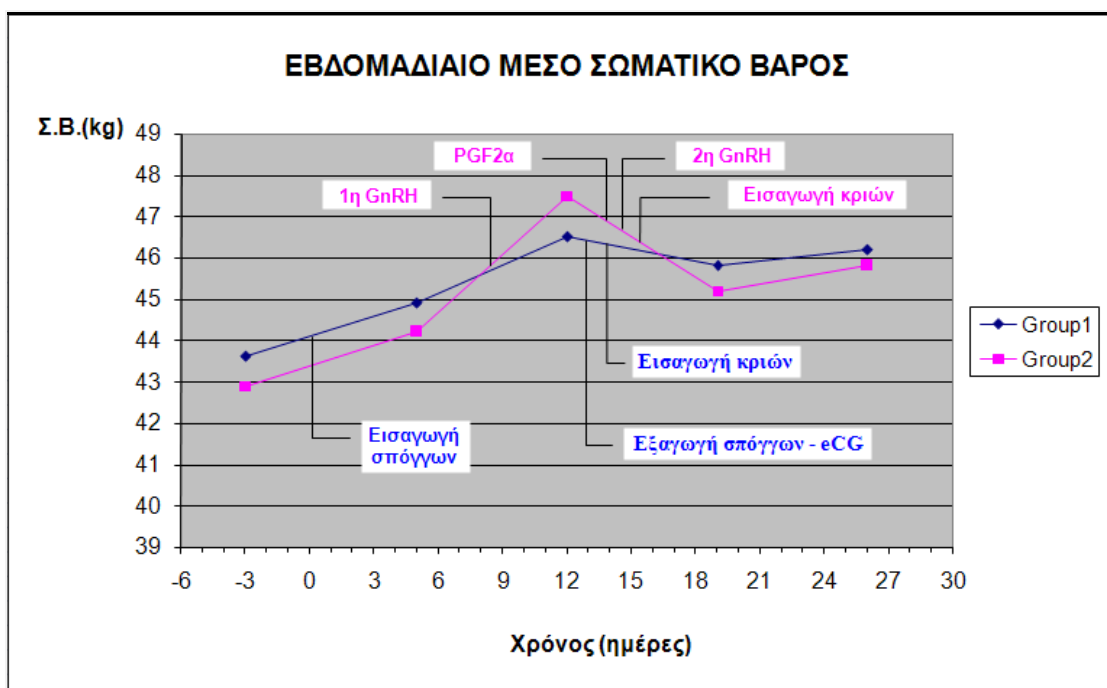
3.1. Σωματικό βάρος.

Η παρακολούθηση των σωματικών βαρών (kg) της κάθε ομάδας ξεκίνησε λίγο πριν από την έναρξη των ορμονικών αγωγών και διήρκεσε περίπου ένα μήνα. Στον πίνακα 3.1.1. και στο διάγραμμα 3.1.1. παρουσιάζεται η εξέλιξη του σωματικού βάρους των προβατίνων 3 ημέρες πριν από την εισαγωγή των σπόγγων (ημέρα 0) και για διάρκεια ενός μηνός. Κατά το χρονικό διάστημα των ημερών 0 έως 14 προέκυψε αύξηση σωματικού βάρους, για κάθε ομάδα ενώ σταθεροποιούνται αργότερα (διάγραμμα 3.1.1.).

Πίνακας 3.1.1. Εξέλιξη των μέσων σωματικών βαρών (\pm τυπική απόκλιση) σε κιλά (kg), των 2 ομάδων αρχίζοντας λίγο πριν την έναρξη των ορμονικών αγωγών (εισαγωγή σπόγγων \rightarrow ημέρα 0) και για χρονικό διάστημα ενός μηνός.

ΜΕΣΟ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ (kg)					
	Χρόνος (ημέρες)				
	-3	5	12	19	26
Ομάδα 1	43,6(\pm 7,02)	44,9 (\pm 6,27)	46,5 (\pm 6,19)	45,8 (\pm 6,17)	46,2 (\pm 6,42)
Ομάδα 2	42,9 (\pm 4,48)	44,2 (\pm 5,16)	47,5 [†] (\pm 6,38)	45,2 (\pm 5,26)	45,8 (\pm 5,48)

[†] Στο σωματικό βάρος της 12^{ης} ημέρας στη δεύτερη ομάδα 3 προβατίνες εντοπίστηκαν να έχουν καταναλώσει ποσότητα σανού βρώμης πριν το προσδιορισμό του σωματικού βάρους, διαφοροποιώντας το μέσο σωματικό βάρος της ομάδας

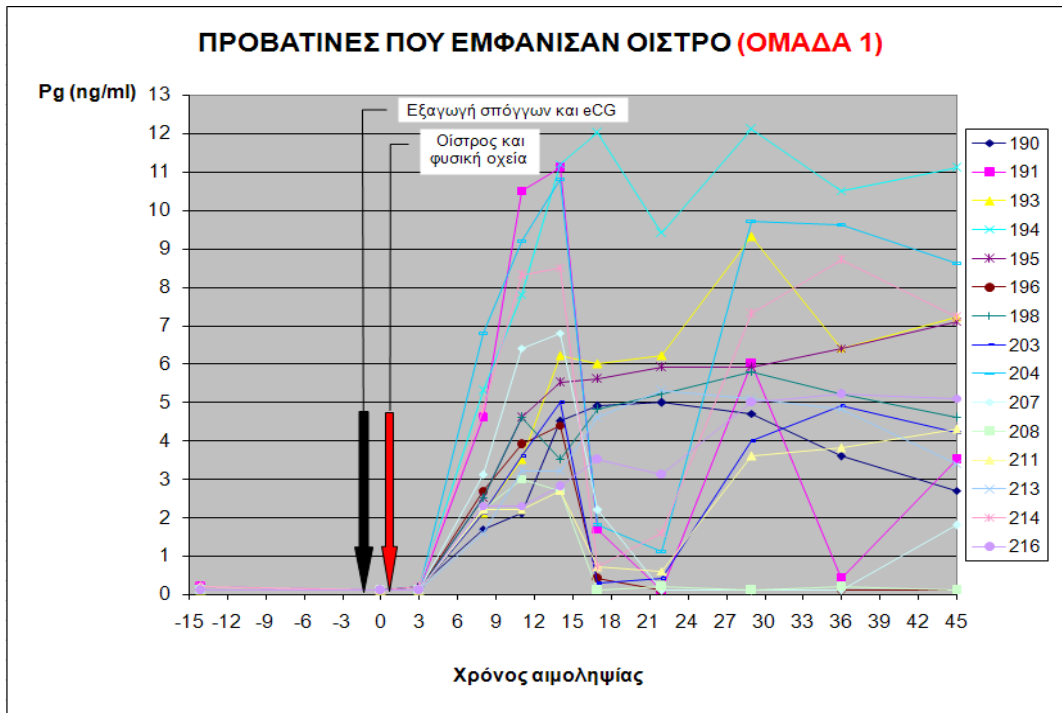


Διάγραμμα 3.1.1. Εξέλιξη του μέσου σωματικού βάρους κάθε ομάδας, κατά το χρονικό διάστημα λίγο πριν την έναρξη των ορμονικών αγωγών και κατά τη διάρκεια ενός μήνα περίπου.

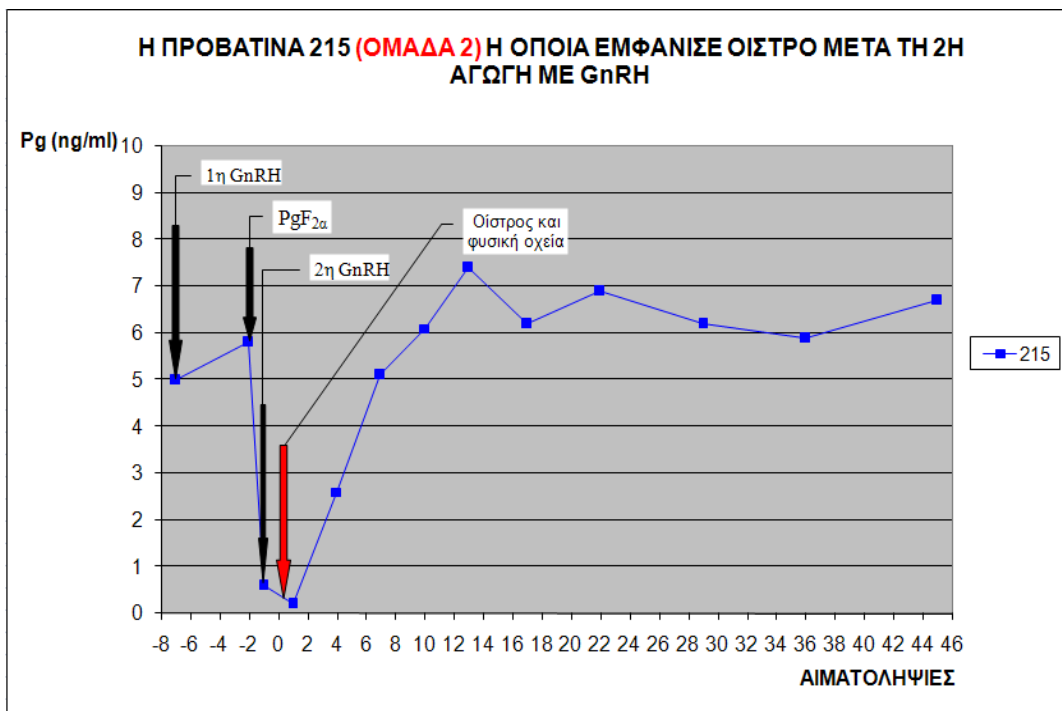
3.2. Ανίχνευση οίστρου.

Η ανίχνευση του οίστρου βασίστηκε στη παρατήρηση των οχείων. Όλα τα ζώα της ομάδας 1 (100%) εμφάνισαν οίστρο σε διάστημα 39 (± 3 ώρες) ωρών μετά την εξαγωγή των σπόγγων και την ορμονική αγωγή της eCG (διάγραμμα 3.2.1.).

Στην ομάδα 2 ένα μόνο ζώο (6,6%) εκδήλωσε οίστρο περίπου 12-13 ώρες μετά τη δεύτερη έγχυση GnRH (διάγραμμα 3.2.2.), σε αντίθεση με το (93,4%) των ζώων το οποίο δεν εμφάνισε.



Διάγραμμα 3.2.1. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατινών της ομάδας 1, οι οποίες εμφάνισαν οίστρο αμέσως μετά την ορμονική αγωγή.

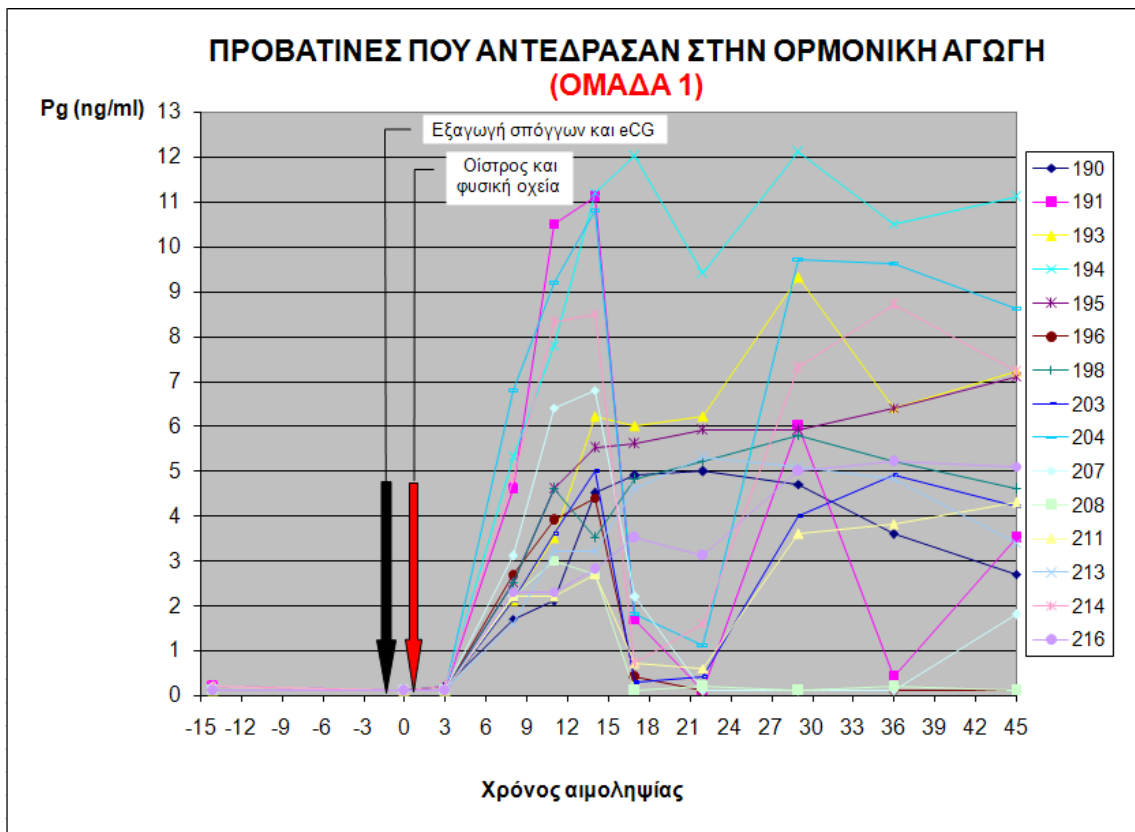


Διάγραμμα 3.2.2. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης της προβατίνας 215 της ομάδας 2, η οποία εμφάνισε οίστρο αμέσως μετά την ορμονική αγωγή.

3.3. Συγκεντρώσεις προγεστερόνης Ομάδας 1.

Στον Πίνακα 3.3.1. παρουσιάζονται οι τιμές για τη συγκέντρωση της προγεστερόνης της ομάδας 1 καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Στο διάγραμμα 3.3.1. απεικονίζεται η εξέλιξη της συγκέντρωσης της Pg (ng/ml) στον ορό του αίματος των προβατίνων της ομάδας 1 από την εισαγωγή των σπόγγων και μετά, οι οποίες αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή.



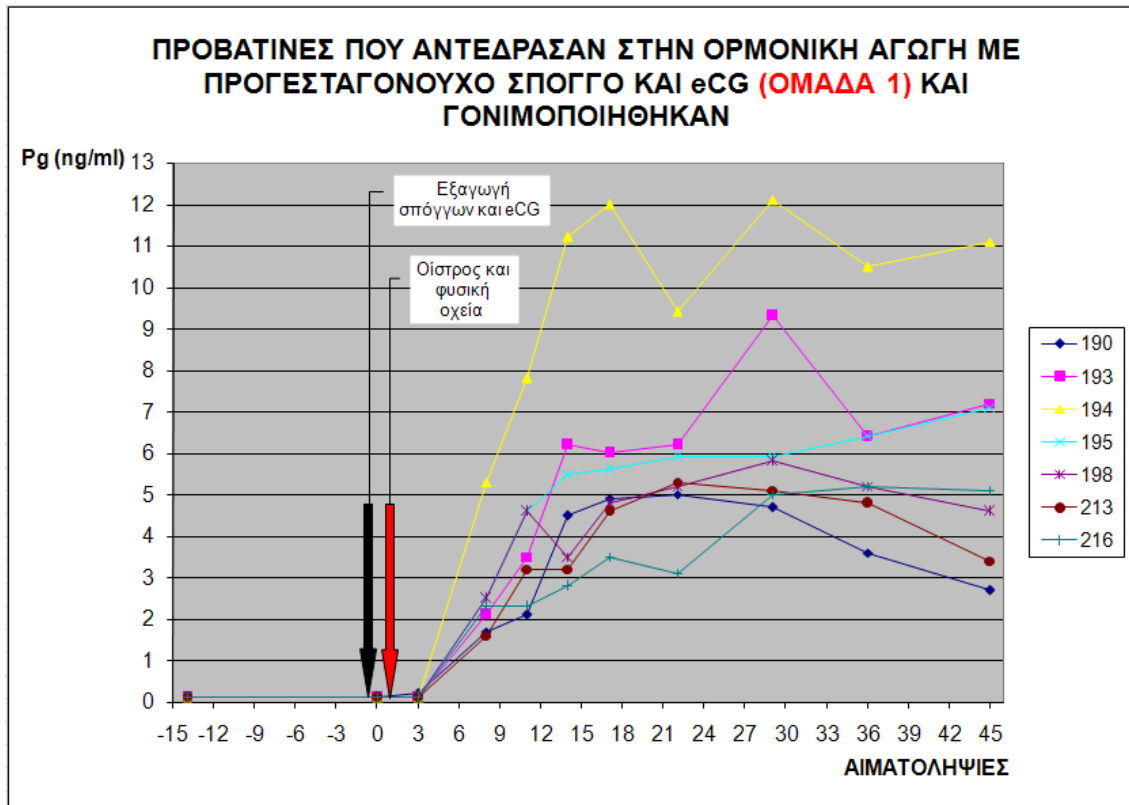
Διάγραμμα 3.3.1. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατίνων της ομάδας 1 πριν από την ορμονική αγωγή, κατά τη διάρκεια αυτής και για 45 ημέρες μετά την εισαγωγή των κριών, οι οποίες αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή με προγεσταγονούχο σπόγγο και eCG.

Πίνακας 3.3.1. Συγκενρωτικός πίνακας των τιμών της συγκέντρωσης της προγεστερόνης (σε ng/ml) καθώς επίσης και οι μέσοι όροι τους (\pm τυπική απόκλιση) στον ορό γάλακτος και αίματος, όπως προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων, ανά ημερομηνία δειγματοληψίας και για κάθε ζώο ξεχωριστά, της ομάδας 1 η οποία δέχτηκε την ορμονική αγωγή, με ενδοκολπικούς προγεσταγονούχους σπόγγους – eCG. Ως ημέρα 0 ορίζεται η ημέρα εισαγωγής των κριών .

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ng/ml (ΟΜΑΔΑ 1)

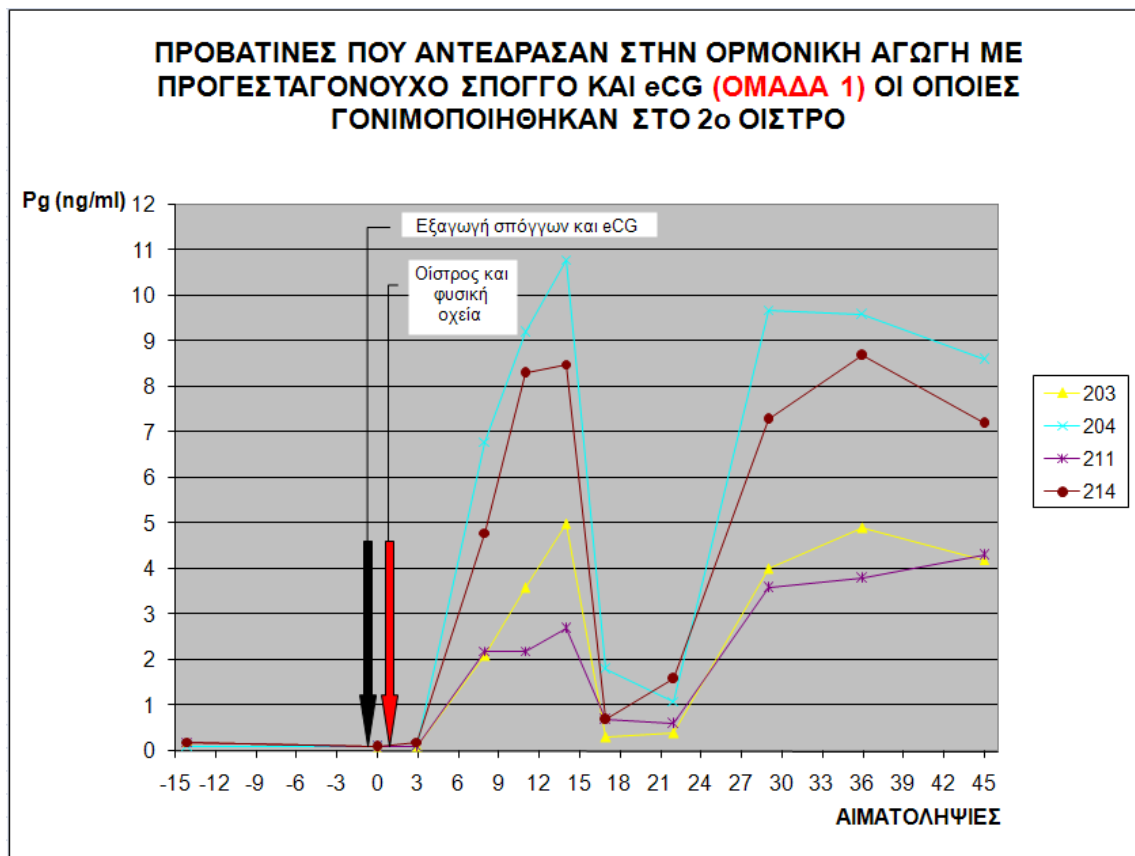
Αριθμός Ζώου	Δείγματα γάλακτος			Δείγματα αίματος									
	-30η ημέρα	-26η ημέρα	-20η ημέρα	-1 Εξαγωγή σπόγγων-ECG	2η ημέρα	7η ημέρα	10η ημέρα	13η ημέρα	17η ημέρα	22η ημέρα	29η ημέρα	36η ημέρα	45η ημέρα
190	0,1	0,1	-	0,1	0,2	1,7	2,1	4,5	4,9	5	4,7	3,6	2,7
191	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	4,6	10,5	11,1	1,7	0,1	6	0,4	3,5
193	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,1	3,5	6,2	6	6,2	9,3	6,4	7,2
194	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	5,3	7,8	11,2	12	9,4	12,1	10,5	11,1
195	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,5	4,6	5,5	5,6	5,9	5,9	6,4	7,1
196	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,7	3,9	4,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1
198	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,5	4,6	3,5	4,8	5,2	5,8	5,2	4,6
203	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	2,1	3,6	5	0,3	0,4	4	4,9	4,2
204	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	6,8	9,2	10,8	1,8	1,1	9,7	9,6	8,6
207	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	3,1	6,4	6,8	2,2	0,1	0,1	0,1	1,8
208	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,2	3	2,7	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
211	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	2,2	-	2,7	0,7	0,6	3,6	3,8	4,3
213	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,6	3,2	3,2	4,6	5,3	5,1	4,8	3,4
214	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	4,8	8,3	8,5	0,7	1,6	7,3	8,7	7,2
216	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,3	-	2,8	3,5	3,1	5	5,2	5,1
Μέσος όρος	<i>0,140</i>	<i>0,133</i>	<i>0,136</i>	<i>0,100</i>	<i>0,113</i>	<i>3,100</i>	<i>5,438</i>	<i>5,927</i>	<i>3,287</i>	<i>2,953</i>	<i>5,253</i>	<i>4,660</i>	<i>4,733</i>
Τυπική απόκλιση	<i>0,063</i>	<i>0,049</i>	<i>0,050</i>	<i>0,000</i>	<i>0,035</i>	<i>1,536</i>	<i>2,700</i>	<i>3,107</i>	<i>3,185</i>	<i>2,987</i>	<i>3,514</i>	<i>3,413</i>	<i>3,081</i>

Από το σύνολο των προβατίνων, στις οποίες προκλήθηκε αρχικά οίστρος συνέλαβαν στον πρώτο κύκλο 7 προβατίνες από τις 15 και σε ποσοστό 46,6% (διάγραμμα 3.3.2.).



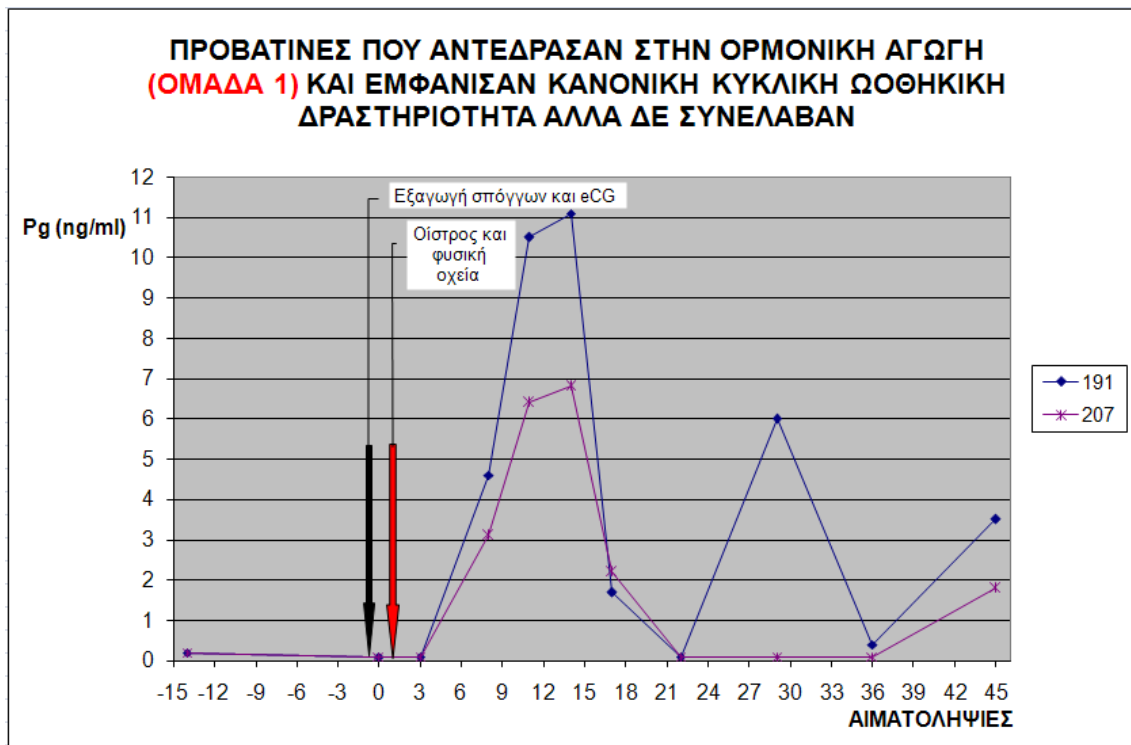
Διάγραμμα 3.3.2. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατίνων της ομάδας 1, για τις οποίες η γονιμοποίηση ήταν επιτυχής από τον πρώτο κύκλο.

Τέσσερις από τις 15 προβατίνες απέτυχαν να συλλάβουν αμέσως μετά την ορμονική αγωγή και σε ποσοστό 26,6%, γονιμοποιήθηκαν στο δεύτερο οιστρικό που ακολούθησε 16-17 ημέρες μετά τον πρώτο (διάγραμμα 3.3.3.).



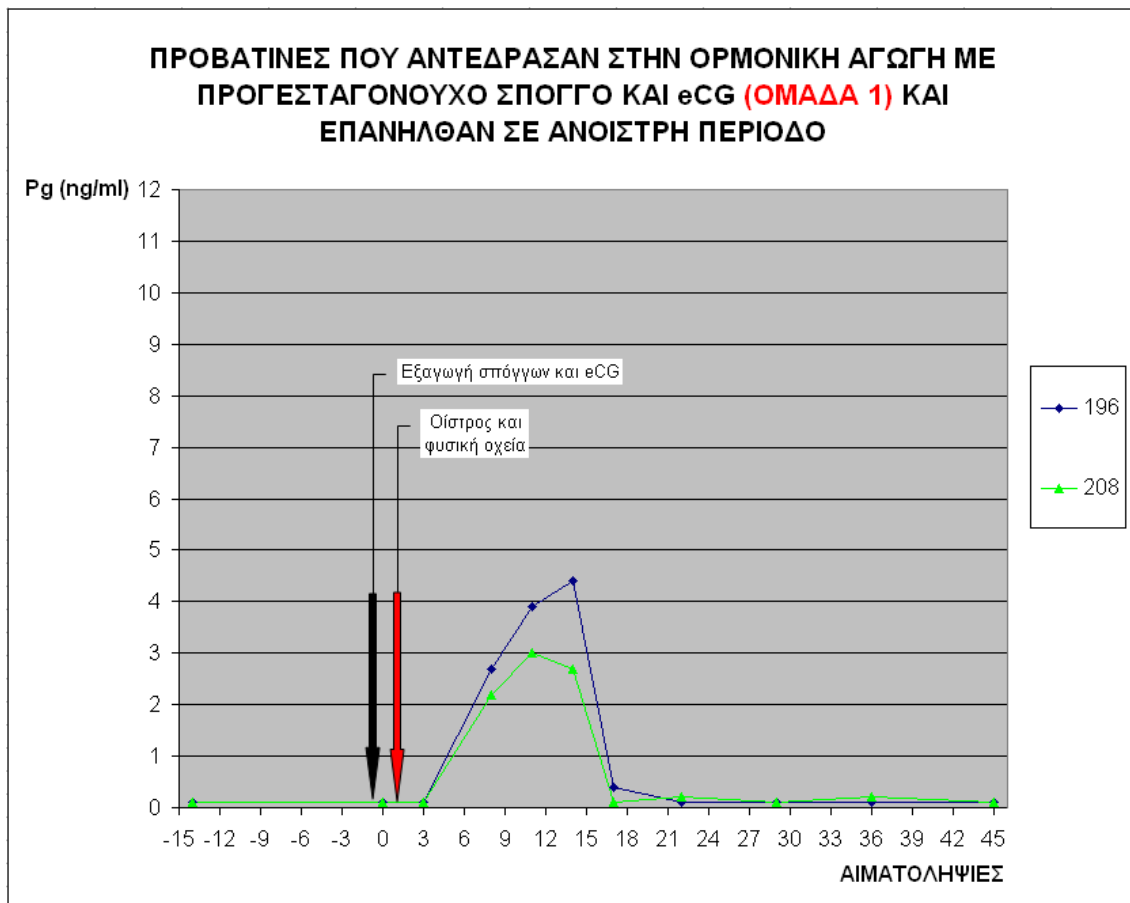
Διάγραμμα 3.3.3. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατινών, στις οποίες η γονιμοποίηση επετεύχθη στο δεύτερο οίστρο.

Ακολούθως, 2 προβατίνες από τις 15 (13,3%) παρουσίασαν κανονική κυκλική ωοθηκική δραστηριότητα, αλλά δεν συνέλαβαν.



Διάγραμμα 3.2.4. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατινών της ομάδας 1, οι οποίες αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή με προγεσταγονούχο σπόγγο - eCG και εμφάνισαν κανονική κυκλική ωοθηκική δραστηριότητα, αποτυγχάνοντας να συλλάβουν.

Τέλος 2 προβατίνες (13,3%) μετά τον πρώτο κύκλο παρουσίασαν άνοιστρη περίοδο.



Διάγραμμα 3.2.5. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατινών της ομάδας 1, οι οποίες αφού αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή επανήλθαν σε άνοιστρη περίοδο.

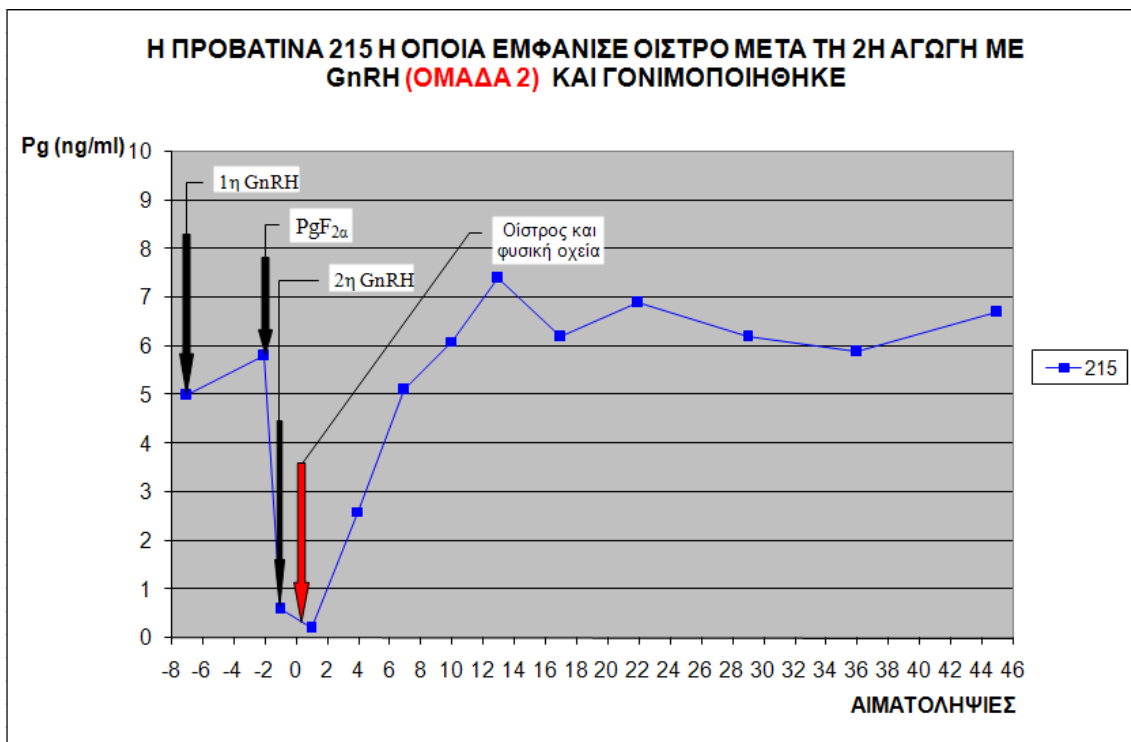
Η διαδικασία του πειράματος, επίσης περιλάμβανε την καταγραφή στοιχείων που αφορούσαν τους τοκετούς, μέσω των οποίων τελικά επιβεβαιώθηκαν οι αρχικές εκτιμήσεις εγκυμοσύνης χρονικά, συνεκτιμώντας τις παρατηρήσεις των οχείων αλλά και των συγκεντρώσεων της προγεστερόνης για κάθε ζώο. Επίσης, πρόσθετα στοιχεία συγκρατήθηκαν, όπως το μέγεθος της τοκετοομάδας, το βάρος των γεννηθέντων αμνών, το φύλο αυτών, τυχόν δυστοκίες αλλά και η διάρκεια κυοφορίας για κάθε ζώο, που έμεινε έγκυο εντός της διάρκειας των αιμοληψιών και κατά προσέγγιση σε αυτά που η σύλληψη έγινε μετά το πέρας των αιμοληψιών.

3.4. Συγκεντρώσεις προγεστερόνης της Ομάδας 2.

Στον Πίνακα 3.4.1. παρουσιάζονται οι τιμές για τη συγκέντρωση της προγεστερόνης της ομάδας 2 καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Στην ομάδα 2 από τα 15 ζώα του πειράματος 4 (26,6%) αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή GnRH - PGF_{2α} (διαγράμματα 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3., 3.4.4.)

Όπως για στην ομάδα 1 έτσι και για την ομάδα 2, συντάχθηκαν κατάλληλα διαγράμματα. Στο διάγραμμα 3.4.1. απεικονίζεται η εξέλιξη της συγκέντρωσης της Pg (ng/ml) στον ορό αίματος της προβατίνας 215, της ομάδας 2 η οποία αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH – PGF_{2α} εμφανίζοντας οίστρο 12 με 14εις ώρες μετά τη τελευταία αγωγή με GnRH, ο οποίος οδήγησε σε επιτυχή κυοφορία, δηλαδή μία από τις 15 και σε ποσοστό 6,6%.



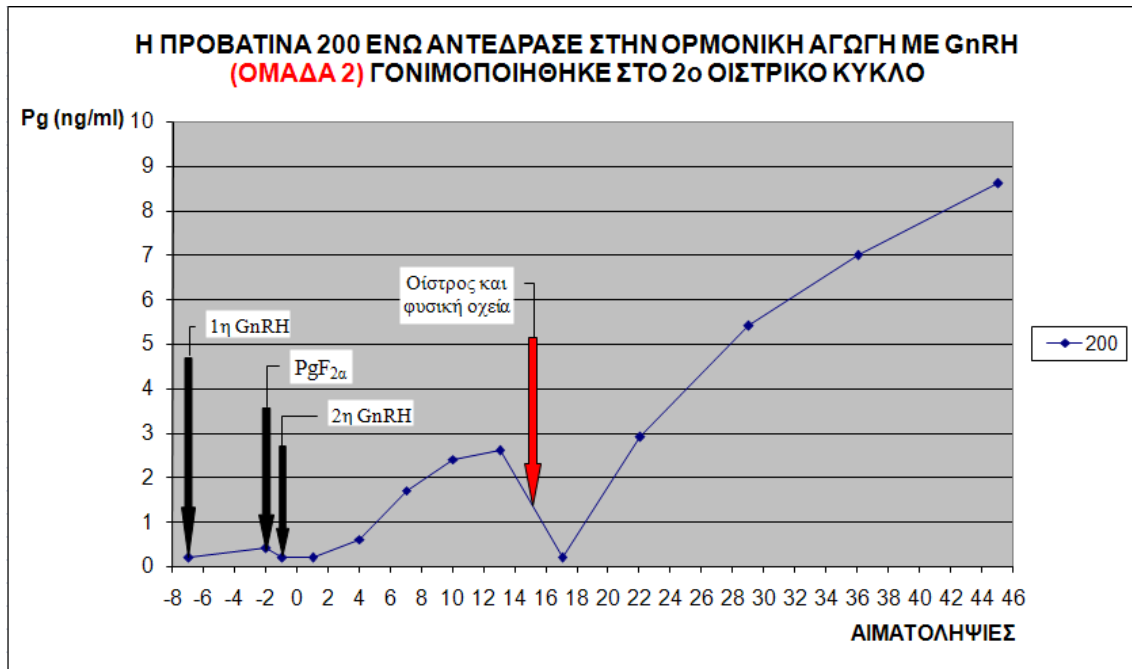
Διάγραμμα 3.4.1. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης της προβατίνας νούμερο 215 της ομάδας 2, η οποία αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH και οδήγησε σε επιτυχή κυοφορία.

Πίνακας 3.4.1. Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών της συγκέντρωσης της προγεστερόνης (σε ng/ml) καθώς επίσης και οι μέσοι όροι τους (\pm τυπική απόκλιση) στον ορό γάλακτος και αίματος, όπως προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων, ανά ημερομηνία δειγματοληψίας και για κάθε ζώο ξεχωριστά, της ομάδας 2 η οποία δέχτηκε την ορμονική αγωγή, με GnRH – PGF_{2α}. Ως ημέρα 0 ορίζεται η ημέρα εισαγωγής των κριών.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ (Pg) ng/ml (ΟΜΑΔΑ 2)

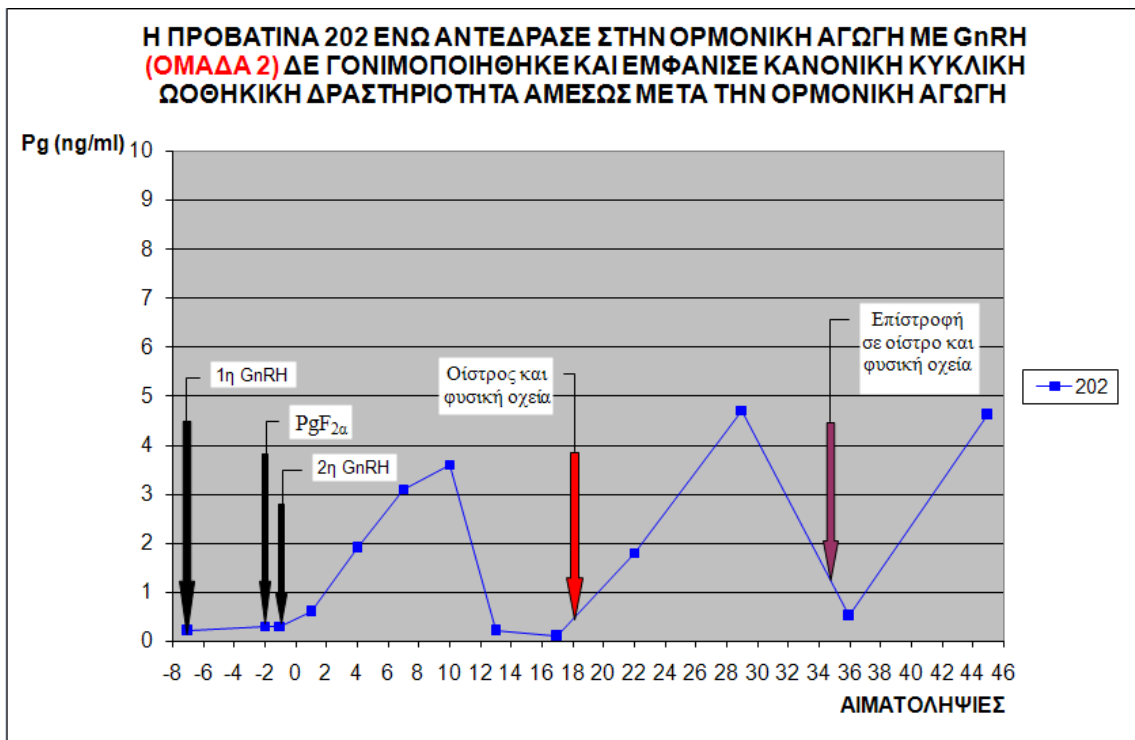
Αριθμός Ζώου	Δείγματα γάλακτος			Δείγματα αίματος												
	-32η ημέρα	-28η ημέρα	-22η ημέρα	-7 ημέρα 1η GnRH	-2 ημέρα PGF _{2α}	-1 ημέρα 2η GnRH	1η ημέρα	4η ημέρα	7η ημέρα	10η ημέρα	13η ημέρα	17η ημέρα	22η ημέρα	29η ημέρα	36η ημέρα	45η ημέρα
189	0,2	0,2		0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,8	2	0,3
192	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,8
197	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4
199	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,4	0,5	0,9	1,3
200	-	0,1	-	0,2	0,4	0,2	0,2	0,6	1,7	2,4	2,6	0,2	2,9	5,4	7	8,6
202	-	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,6	1,9	3,1	3,6	0,2	0,1	1,8	4,7	0,5	4,6
205	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	1,6	2,6	0,1
206	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
209	0,3	0,2	0,2	0,2	0,7	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
210	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,8	2,3	2,5	0,8	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2
212	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
215	0,1	0,1	0,1	5	5,8	0,6	0,2	2,6	5,1	6,1	7,4	6,2	6,9	6,2	5,9	6,7
217	0,4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4	0,6	0,5	0,6	0,6
218	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	1,3	0,5	0,1	0,1	0,9	3,9	0,5	5
219	0,1	0,1	0,1	0,2	0,7	0,2	0,3	0,3	0,5	0,2	0,1	0,1	0,5	0,7	2,5	1,2
Μέσος όρος	0,154	0,133	0,131	0,493	0,653	0,213	0,207	0,533	1,013	1,107	0,853	0,587	1,033	1,667	1,600	2,013
Τυπική απόκλιση	0,096	0,061	0,063	1,247	1,437	0,118	0,127	0,742	1,476	1,779	1,923	1,559	1,797	2,195	2,147	2,786

Η προβατίνα νούμερο 200, ενώ φαίνεται πως αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH, τελικά εμφάνισε οίστρο στο δεύτερο οιστρικό κύκλο, στον οποίο και συνέλαβε, δηλαδή μία από τις 15 και σε ποσοστό 6,6%, γονιμοποιήθηκαν στον δεύτερο οιστρικό κύκλο (διάγραμμα 3.4.2.).



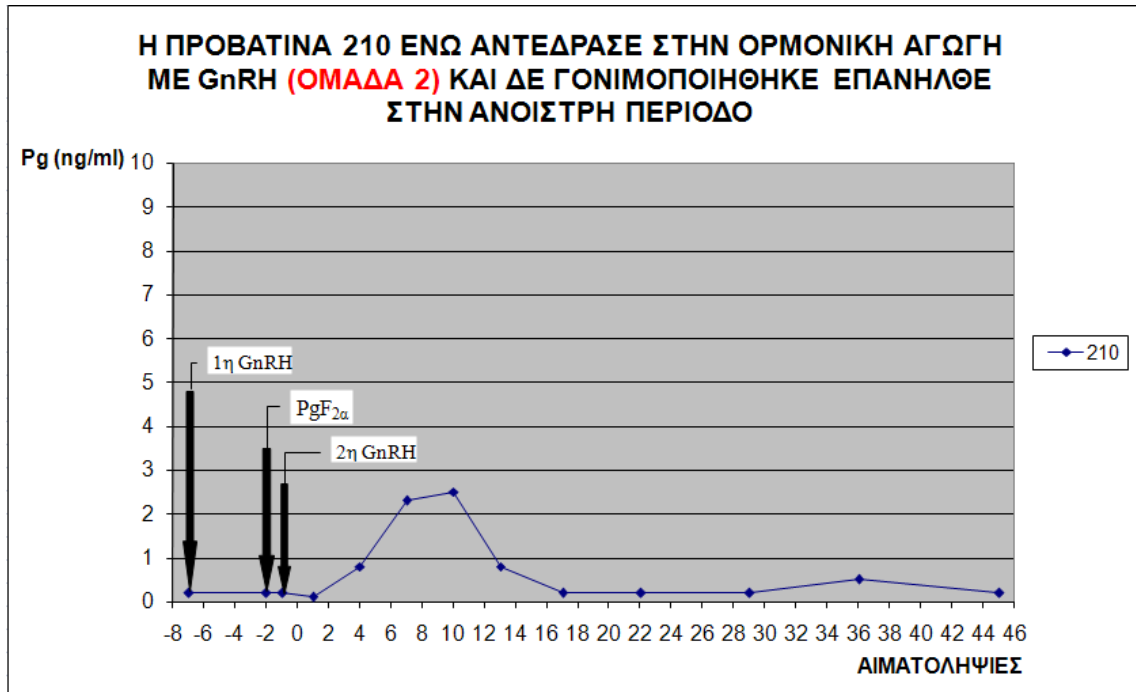
Διάγραμμα 3.4.2. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης της προβατίνας νούμερο 200 της ομάδας 2, η οποία αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH και κατάφερε να γονιμοποιηθεί στο δεύτερο οιστρικό κύκλο.

Η προβατίνα νούμερο 202, ενώ αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH, δε συνέλαβε αλλά εμφάνισε κυκλική ωθητική δραστηριότητα αμέσως μετά την ορμονική αγωγή αποτυγχάνοντας να γονιμοποιηθεί (διάγραμμα 3.4.3.).



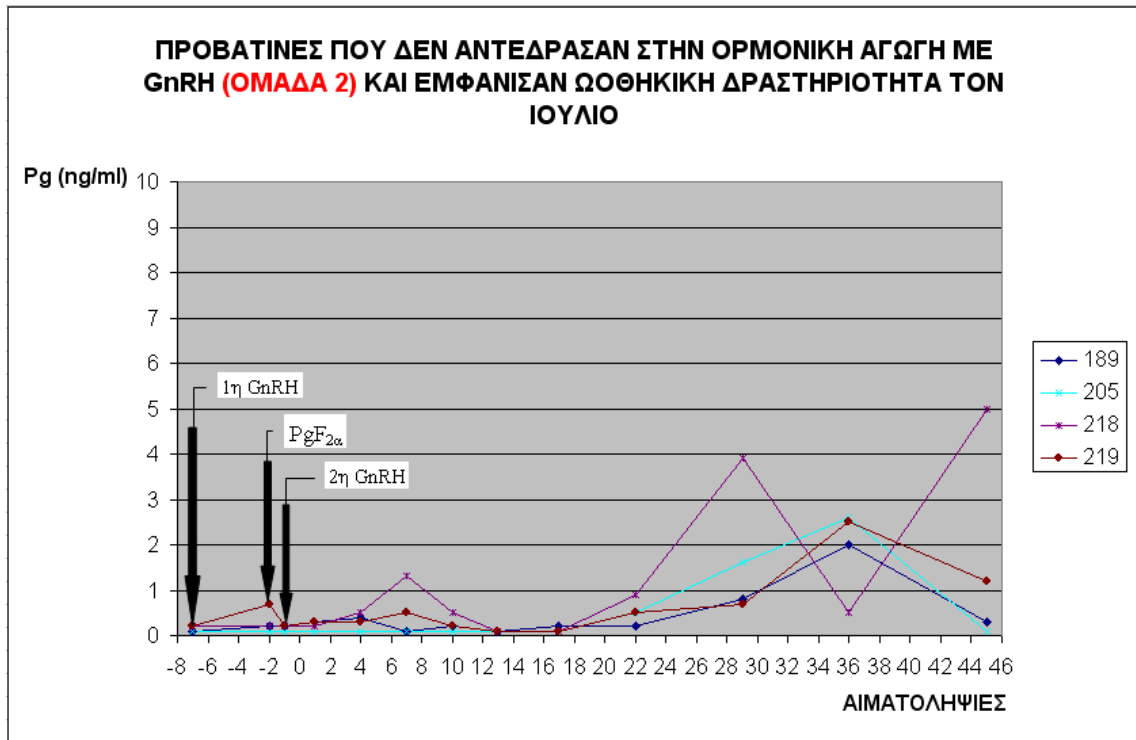
Διάγραμμα 3.4.3. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης της προβατίνας νούμερο 202 της ομάδας 2, η οποία ενώ αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH δε γονιμοποιήθηκε και εμφάνισε κανονική κυκλική ωθητική δραστηριότητα αμέσως μετά την ορμονική αγωγή.

Η προβατίνα νούμερο 210, αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH, χωρίς επιτυχή σύλληψη και στη συνέχεια επανήλθε στην άνοιστρη περίοδο (διάγραμμα 3.4.4.).



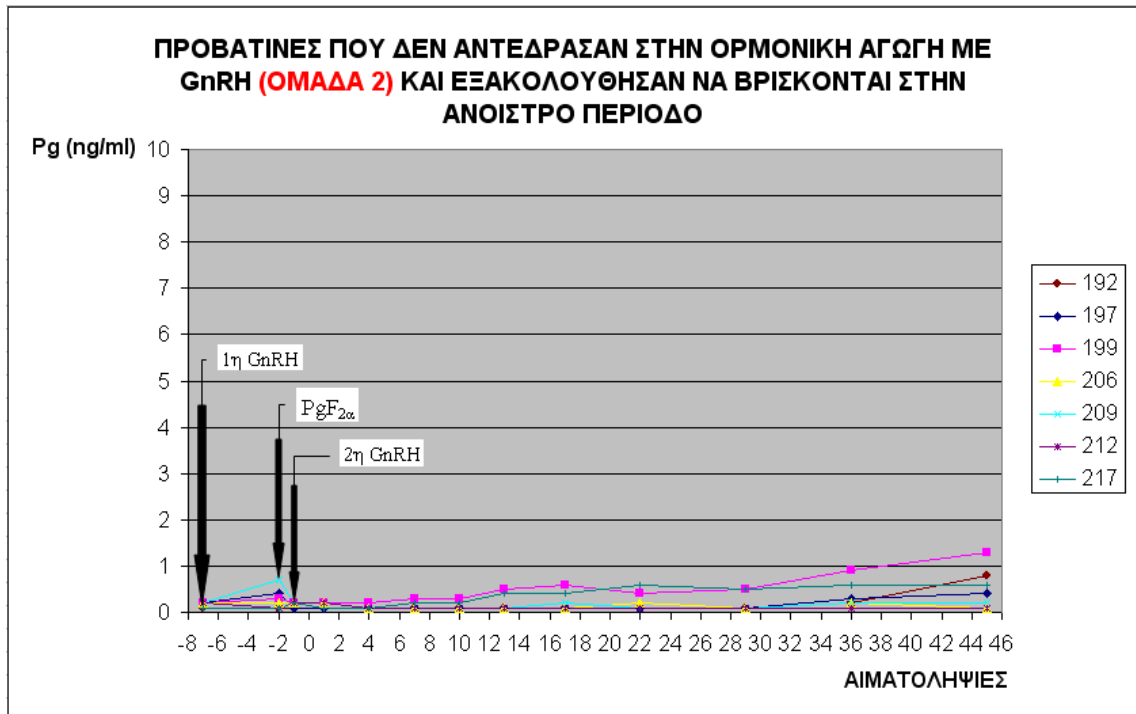
Διάγραμμα 3.4.4. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης της προβατίνας νούμερο 210 της ομάδας 2, η οποία ενώ αντέδρασε στην ορμονική αγωγή με GnRH, δε συνέλαβε και επανήλθε στην άνοιστρη περίοδο.

Τέσσερις από τις 15 προβατίνες και σε ποσοστό 26,6% δεν αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή με GnRH και στη συνέχεια, εμφάνισαν ωοθηκική δραστηριότητα τον Ιούλιο (διάγραμμα 3.4.5.).



Διάγραμμα 3.4.5. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατίνων της ομάδας 2 πριν από την ορμονική αγωγή, κατά τη διάρκεια αυτής και για 45 ημέρες μετά την εισαγωγή των κριών, οι οποίες δεν αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή με GnRH και εμφάνισαν ωοθηκική δραστηριότητα τον Ιούλιο.

Τέλος οι 7 υπόλοιπες προβατίνες της ομάδας 2 δεν αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή με GnRH και στη συνέχεια εξακολούθησαν να βρίσκονται στην άνοιστρη περίοδο (διάγραμμα 3.4.6.).

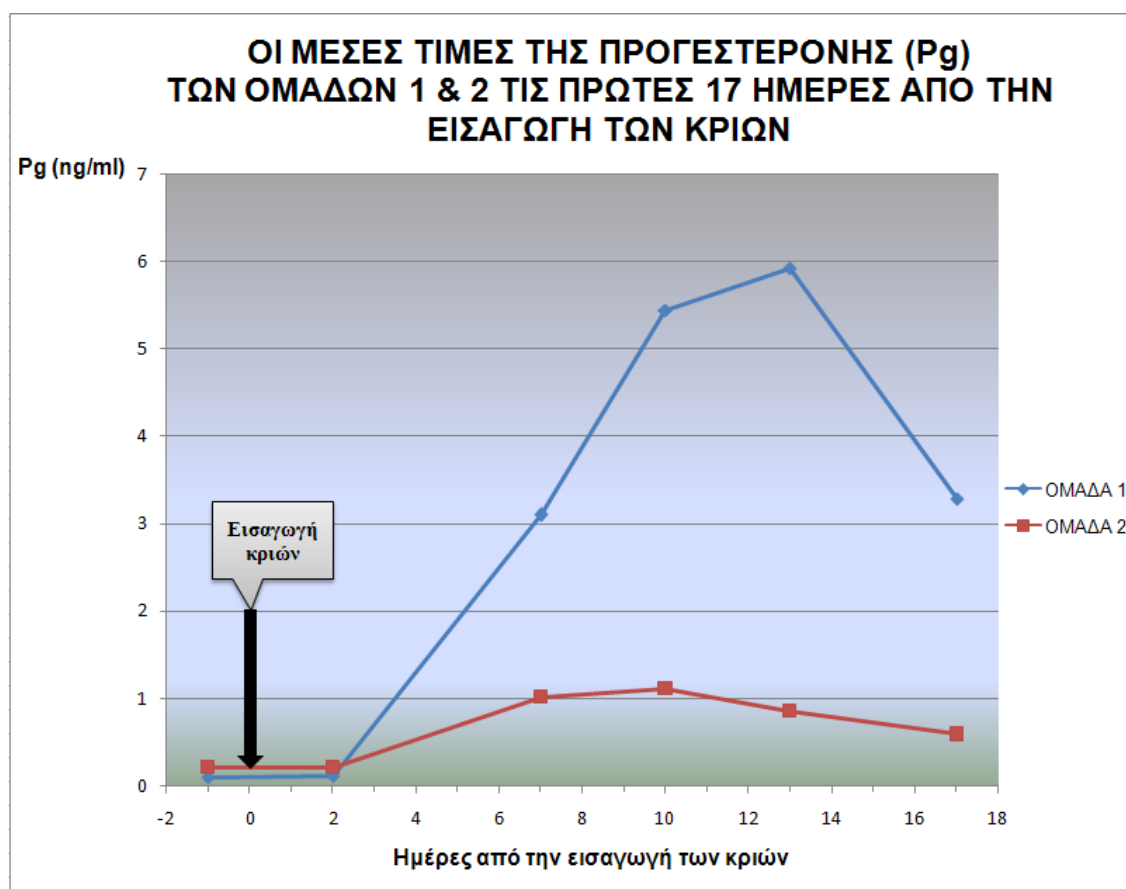


Διάγραμμα 3.4.6. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατινών της ομάδας 2, οι οποίες δεν αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή με GnRH και παρέμειναν στην άνοιστρη περίοδο.

Όπως και στο πρωτόκολλο της ομάδας 1 ομοίως και στην ομάδα 2, καταγράφηκαν στοιχεία που αφορούσαν τους τοκετούς, μέσω των οποίων τελικά επιβεβαιώθηκαν οι αρχικές εκτιμήσεις εγκυμοσύνης χρονικά, συνεκτιμώντας τις παρατηρήσεις των οχειών αλλά και των συγκεντρώσεων της προγεστερόνης για κάθε ζώο. Επίσης, πρόσθετα στοιχεία συγκρατήθηκαν, όπως το μέγεθος της τοκετοομάδας, το βάρος των γεννηθέντων αμνών, το φύλο αυτών, τυχόν δυστοκίες αλλά και η διάρκεια κυοφορίας για κάθε ζώο, που έμεινε έγκυο εντός της διάρκειας των αιμοληψιών και κατά προσέγγιση σε αυτά που η σύλληψη έγινε μετά το πέρας των αιμοληψιών.

Πίνακας 3.4.2. Συγκεντρωτικός πίνακας, των αποτελεσμάτων της εφαρμογής των δύο πρωτοκόλλων συγχρονισμού προβάτων.

Ομάδες	Αριθμός ζώων	Ζώα που αντέδρασαν	Ζώα που έμειναν έγκυα στον 1ο κύκλο	Ζώα που έμειναν έγκυα στον 2ο κύκλο
1 (Πρωτόκολλο σπόγγου- eCG)	15	15 (100%)	7 (46,6%)	4 (26,6%)
2 (Πρωτόκολλο GnRH-PgF _{2α})	15	4 (26,6%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)



Διάγραμμα 3.4.7. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης των μέσων τιμών της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των προβατίνων των ομάδων 1 και 2 για το χρονικό διάστημα μιας ημέρας πριν την εισαγωγή των κριών (-1) έως και την 17^η ημέρα από αυτήν.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, οι μέσες τιμές της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των δύο ομάδων, για το χρονικό διάστημα από την ημέρα -1 (μια ημέρα πριν την εισαγωγή των κριών) έως και την ημέρα 17 από την εισαγωγή των κριών, είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$). Δηλαδή, οι καθημερινές τιμές της συγκέντρωσης (Pg) κατά μέσο όρο στα ζώα της ομάδας 1, ήταν συγκριτικά υψηλότερες με τις αντίστοιχες τιμές των ζώων της ομάδας 2 (Διάγραμμα 3.4.7.). Σύμφωνα με τον πίνακα 3.4.2, στην ομάδα 1 το (100%) των ζώων αντέδρασε στην ορμονική αγωγή, το

(46,6%) των ζώων έμειναν έγκυα κατά τη διάρκεια του πρώτου οιστρικού κύκλου, ενώ το (26,6%) έμειναν έγκυα στον δεύτερο οιστρικό κύκλο. Στην ομάδα 2 το (26,6%) των ζώων αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή, το (6,6%) έμειναν έγκυα κατά τη διάρκεια του πρώτου οιστρικού κύκλου και το (6,6%) έμειναν έγκυα στον δεύτερο οιστρικό κύκλο. Αναμφισβήτητα, η εφαρμογή των προγεσταγονούχων σπόγγων και της eCG, είχε καλύτερα αποτελέσματα από ό,τι το πρωτόκολλο GnRH- PGF_{2α}, καταφέροντας την επιτυχή σύλληψη κατά το πρώτο και το δεύτερο οίστρο μετά την συγχρονισμό σε 11 από τις 15 (73,3%) προβατίνες της ομάδας.

3.5. Διάγνωση εγκυμοσύνης.

3.5.1. Προσδιορισμός προγεστερόνης.

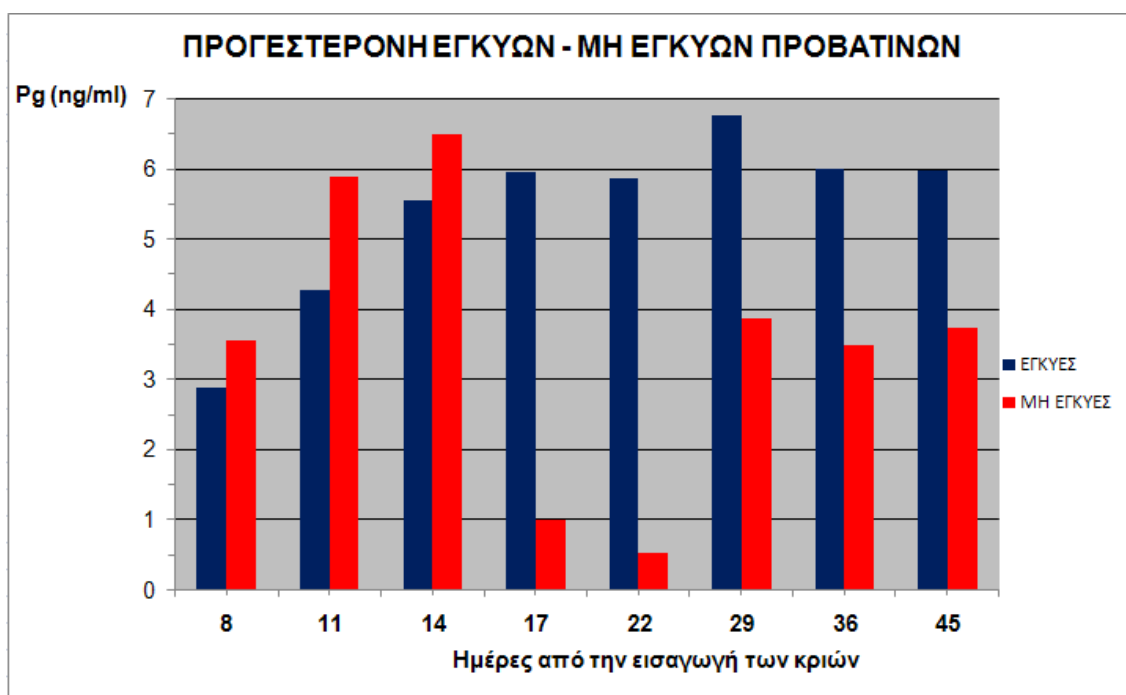
Από την ανάλυση των δεδομένων της συγκέντρωσης της προγεστερόνης των 16 προβατίνων που εμφάνισαν οίστρο αμέσως μετά τις ορμονικές αγωγές και των δύο ομάδων προέκυψαν τα ακόλουθα. Οι τιμές της προγεστερόνης των προβατίνων 190, 193, 194, 195, 198, 213, 215, 216 παρέμειναν υψηλές, μετά την 8^η ημέρα με τιμές άνω του 1ng/ml, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενεργού ωχρού σωματίου στις ωοθήκες τους (πίνακας 3.5.1.1.). Ενώ στις υπόλοιπες 8 που δε κατάφεραν να συλλάβουν, οι τιμές είχαν ανοδική τάση μέχρι την 14^η-15^η ημέρα και μεταξύ 15^{ης}-17^{ης} ημέρας μειώνονταν σημαντικά (πίνακας 3.5.1.2.), εξαιτίας της παλινδρόμησης του ωχρού σωματίου.

Πίνακας 3.5.1.1. Τιμές της συγκέντρωσης της προγεστερόνης (Pg) σε ng/ml, καθώς και ο μέσος όρος τους (\pm τυπική απόκλιση) ανά ημέρα δειγματοληψίας, των 8 προβατίνων που έμειναν έγκυες, αμέσως μετά την εφαρμογή των ορμονικών αγωγών.

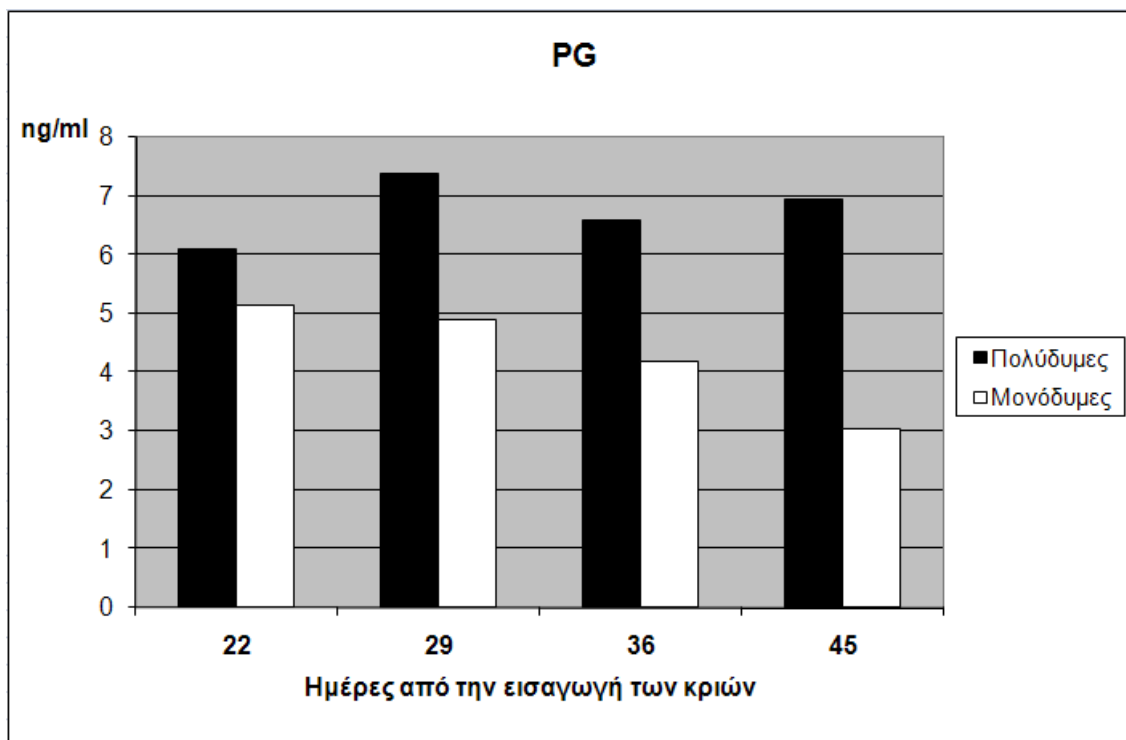
Pg (ng/ml)								
Ημέρες από την εισαγωγή των κριών								
Αριθμός ζώου	8	11	14	17	22	29	36	45
190	1,7	2,1	4,5	4,9	5	4,7	3,6	2,7
193	2,1	3,5	6,2	6	6,2	9,3	6,4	7,2
194	5,3	7,8	11,2	12	9,4	12,1	10,5	11,1
195	2,5	4,6	5,5	5,6	5,9	5,9	6,4	7,1
198	2,5	4,6	3,5	4,8	5,2	5,8	5,2	4,6
213	1,6	3,2	3,2	4,6	5,3	5,1	4,8	3,4
215	5,1	6,1	7,4	6,2	6,9	6,2	5,9	6,7
216	2,3	2,3	2,8	3,5	3,1	5	5,2	5,1
Μέσος όρος:	2,89	4,28	5,54	5,95	5,87	6,76	6,01	5,98
Τυπική απόκλιση:	1,46	1,94	2,78	2,59	22,43	19,67	18,84	21,76

Πίνακας 3.5.1.2. Τιμές της συγκέντρωσης της προγεστερόνης (Pg) σε ng/ml, καθώς και ο μέσος όρος τους (\pm τυπική απόκλιση) ανά ημέρα δειγματοληψίας, των 8 προβατινών που δε κατάφεραν να μείνουν έγκυες, αμέσως μετά την εφαρμογή των ορμονικών αγωγών.

		Pg (ng/ml)							
		Ημέρες από την εισαγωγή των κριών							
Αριθμός ζώου		8	11	14	17	22	29	36	45
191		4,6	10,5	11,1	1,7	0,1	6	0,4	3,5
196		2,7	3,9	4,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1
203		2,1	3,6	5	0,3	0,4	4	4,9	4,2
204		6,8	9,2	10,8	1,8	1,1	9,7	9,6	8,6
207		3,1	6,4	6,8	2,2	0,1	0,1	0,1	1,8
208		2,2	3	2,7	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
211		2,2	2,2	2,7	0,7	0,6	3,6	3,8	4,3
214		4,8	8,3	8,5	0,7	1,6	7,3	8,7	7,2
Μέσος όρος:		3,56	5,89	6,50	0,99	0,53	3,86	3,48	3,73
Τυπική απόκλιση:		0,60	1,11	1,19	0,28	0,20	1,29	1,40	1,09



Διάγραμμα 3.5.1.1. Η μέση συγκέντρωση της προγεστερόνης στον ορό αίματος των 8 έγκυων προβατινών, όπως παρουσιάζονται μεταξύ της 8ης και 45ης ημέρας από την εισαγωγή των κριών.



Διάγραμμα 3.5.1.2. Η μέση συγκέντρωση της προγεστερόνης στον ορό αίματος των μονόδυμων και πολύδυμων προβατινών, όπως παρουσιάζονται μεταξύ της 22ης και 45ης ημέρας από την εισαγωγή των κριών.

Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης ήταν ανιχνεύσιμες σε 8 από τις 8 (100%) έγκυες προβατίνες (πίνακας 3.5.2.4.). Το εύρος της συγκέντρωσης της προγεστερόνης την 22 ημέρα, στις μη εγκυμονούσες προβατίνες ήταν μεταξύ 0,1-1,1 ng/ml. Στις έγκυες προβατίνες, οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν μεταξύ 3,1-9,4 ng/ml την 22 ημέρα και 2,7-11,1 ng/ml την 45 ημέρα. Κατά τις ημέρες 22, 29, 36 και 45, οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης δείχνουν να είναι χαμηλότερες στις προβατίνες που κυοφορούσαν ένα έμβρυο από εκείνες που κυοφορούσαν πολλαπλά έμβρυα (πίνακας 3.5.1.3.) (διάγραμμα 3.5.1.2.).

Πίνακας 3.5.1.3. Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση των τιμών της συγκέντρωσης της προγεστερόνης σε ng/ml, μεταξύ των δειγματοληψιών από τη 17-45 ημέρα από την εισαγωγή των κριών, των μονόδυμων και των πολύδυμων προβατινών.

	Ημέρες από την εισαγωγή των κριών				
	17	22	29	36	45
ΠΟΛΥΔΥΜΕΣ					
Μ.Ο.τιμών PG (ng/ml)	6,35(±2,94)	5,96(±2,27)	7,62(±3,00)	6,74(±2,19)	7,02(±2,56)
ΜΟΝΟΔΥΜΕΣ					
Μ.Ο.τιμών PG (ng/ml)	4,75(±0,21)	5,15(±0,21)	4,9(±0,28)	4,2(±0,85)	3,05(±0,49)

Όσον αφορά τη σύγκριση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της προγεστερόνης μεταξύ έγκυων και μη έγκυων προβατίνων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) σε 95,0% διάστημα εμπιστοσύνης, από την 17^η ημέρα και μετά όπως χαρακτηριστικά φαίνεται και στο διάγραμμα 3.5.1.1..

3.5.2. Προσδιορισμός PAG.

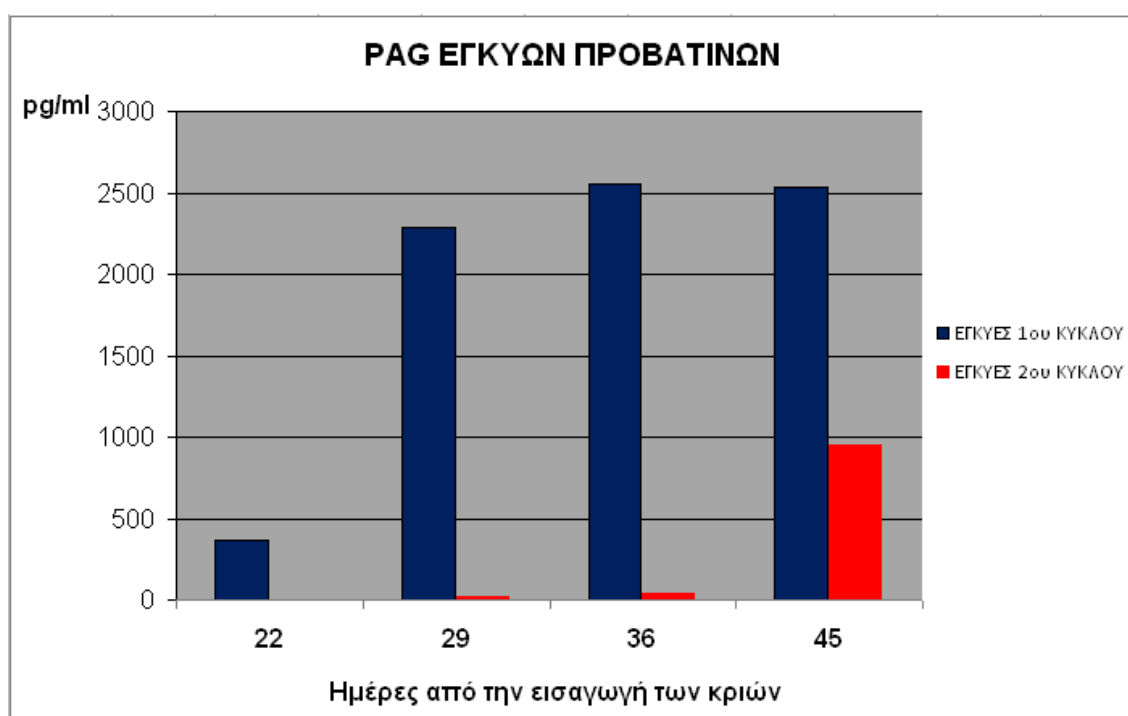
Οι τιμές των PAG μέχρι την 17 ημέρα της κυοφορίας παρέμειναν πολύ χαμηλές έως μηδενικές, ενώ από την 22 ημέρα και μετέπειτα οι τιμές αυξάνονταν σημαντικά (πίνακας 3.5.2.1.), στις 8 προβατίνες που κατάφεραν να μείνουν έγκυες και άνω των 200-250 pg/ml. Στις προβατίνες που δεν ήταν έγκυες οι τιμές των PAG παρέμειναν χαμηλές καθόλη τη διάρκεια.

Πίνακας 3.5.2.1. Τιμές της (PAG) σε pg/ml, καθώς και ο μέσος όρος τους (\pm τυπική απόκλιση) ανά ημέρα δειγματοληψίας, των 8 προβατίνων που έμειναν έγκυες, αμέσως μετά την εφαρμογή των ορμονικών αγωγών.

Αριθμός ζώου	PAG (pg/ml)			
	<i>Ημέρες από την εισαγωγή των κριών</i>			
	22	29	36	45
190	25	1279	1733	2278
193	476	1610	1566	1803
194	846	4057	3686	3858
195	215	2197	2763	2288
198	578	2888	3285	2672
213	0	1308	2406	2700
215	361	1704	1334	1801
216	455	3264	3645	2860
Μέσος όρος:	369,5	2288,38	2552,25	2532,5
Τυπική απόκλιση:	284,939	1016,26	941,899	665,855

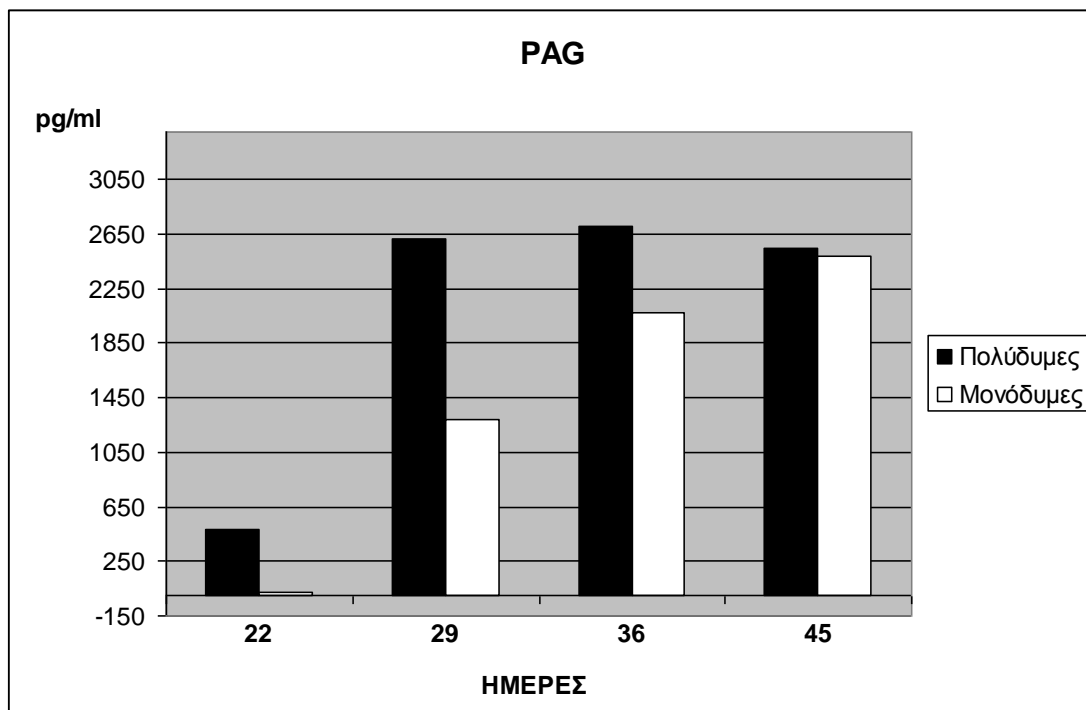
Πίνακας 3.5.2.2. Τιμές της (PAG) σε pg/ml, καθώς και ο μέσος όρος τους (\pm τυπική απόκλιση) ανά ημέρα δειγματοληψίας, των 8 προβατίνων που δεν κατάφεραν να μείνουν έγκυες, αμέσως μετά την εφαρμογή των ορμονικών αγωγών.

PAG (pg/ml)				
Αριθμός ζώου	<i>Ημέρες από την εισαγωγή των κριών</i>			
	22	29	36	45
191	0	0	142	35
196	0	0	0	218
203	0	0	0	698
204	0	30	189	2181
207	0	142	0	0
208	0	0	0	0
211	0	0	0	2434
214	0	0	0	2028
<i>Μέσος όρος:</i>	<i>0</i>	<i>21,5</i>	<i>41,375</i>	<i>949,25</i>
<i>Τυπική απόκλιση:</i>	<i>0</i>	<i>49,8082</i>	<i>77,6346</i>	<i>1077,12</i>



Διάγραμμα 3.5.2.1. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης των επιπέδων της PAG των έγκυων προβατίνων του πρώτου και του δεύτερου κύκλου από την 22 ημέρα έως την 45 ημέρα από την εισαγωγή των κριών.

Από τα τελικά αποτελέσματα που προέκυψαν μετά τους τοκετούς, οι προβατίνες 190 και 213 γέννησαν από έναν αμνό η κάθε μία, οι 193, 198, 215 και 216 γέννησαν από δύο αμνούς η κάθε μία, ενώ οι 194 και 195 κατάφεραν να κυοφορήσουν από 3 αμνούς η κάθε μία.



Διάγραμμα 3.5.2.2. Η μέση συγκέντρωση της PAG στις 8 εγκυμονούσες προβατίνες, παρουσιάζοντας ανιχνεύσιμες τιμές από την 22 έως την 45 ημέρα, από την εισαγωγή των κριών.

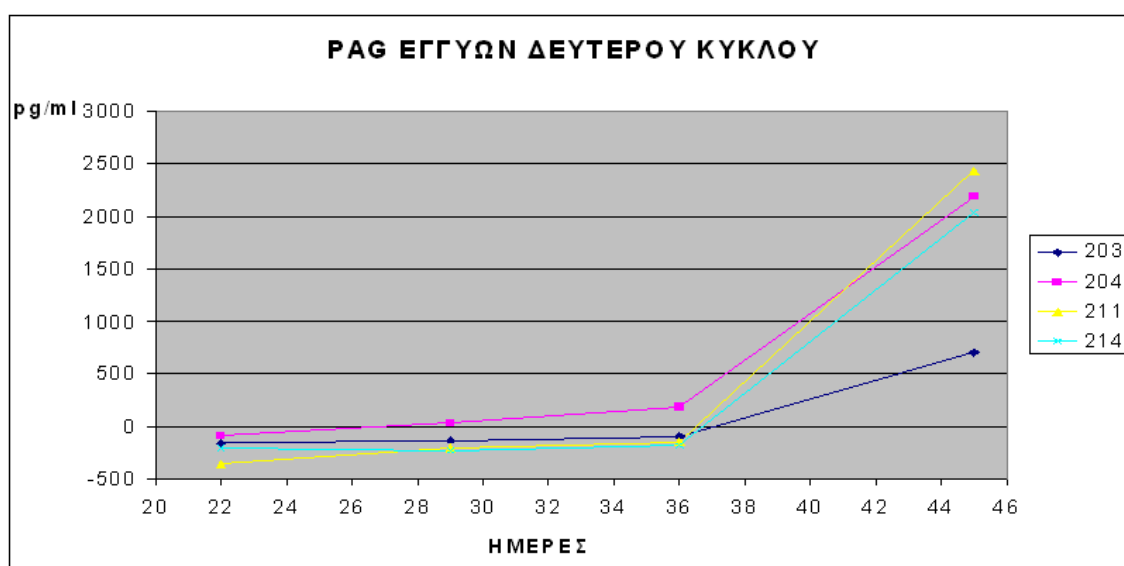
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.5.2.2. κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η μέση συγκέντρωση των τιμών της PAG ήταν υψηλότερη στις πολύδυμες (πίνακας 3.5.2.2.) εγκυμοσύνες απ' ότι στις μονόδυμες (πίνακας 3.5.2.3.) Εντούτοις, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων η θεώρηση αυτή μπορεί να θεωρηθεί επισφαλής. Όσον αφορά τη διάγνωση εγκυμοσύνης, η ακρίβεια στην ανίχνευση των έγκυων προβατίνων φαίνεται πως βελτιώνεται, στα δείγματα που ελήφθησαν μετά την ημέρα 22 της εγκυμοσύνης. Η ειδικότητα (ακρίβεια για την ανίχνευση των μη εγκυμονούντων προβατίνων) ήταν 100% μετά την 22 ημέρα (πίνακας 3.5.2.4.).

Από τη στατιστική ανάλυση, των μέσων τιμών των PAGs στις έγκυες και στις μη έγκυες προβατίνες, προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$). Συγκριτικά, όπως φαίνεται και από στο διάγραμμα 3.5.2.1., οι τιμές των PAG τις ημέρες 22, 29, 36, 45 στις έγκυες προβατίνες είναι πάντοτε υψηλότερες έναντι των μη έγκυων προβατίνων που είναι σχεδόν μηδαμινές, όντας φυσιολογικό διότι η ανίχνευση PAG έχει νόημα μόνο υπό την ύπαρξη εγκυμοσύνης. Τα επίπεδα των PAG που εμφανίζονται ανεβασμένα κατά την ημέρα 45 στις μη έγκυες, αφορούν τα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης των προβατίνων που έμειναν έγκυα στο δεύτερο κύκλο για αυτό και φαίνονται αυξημένα.

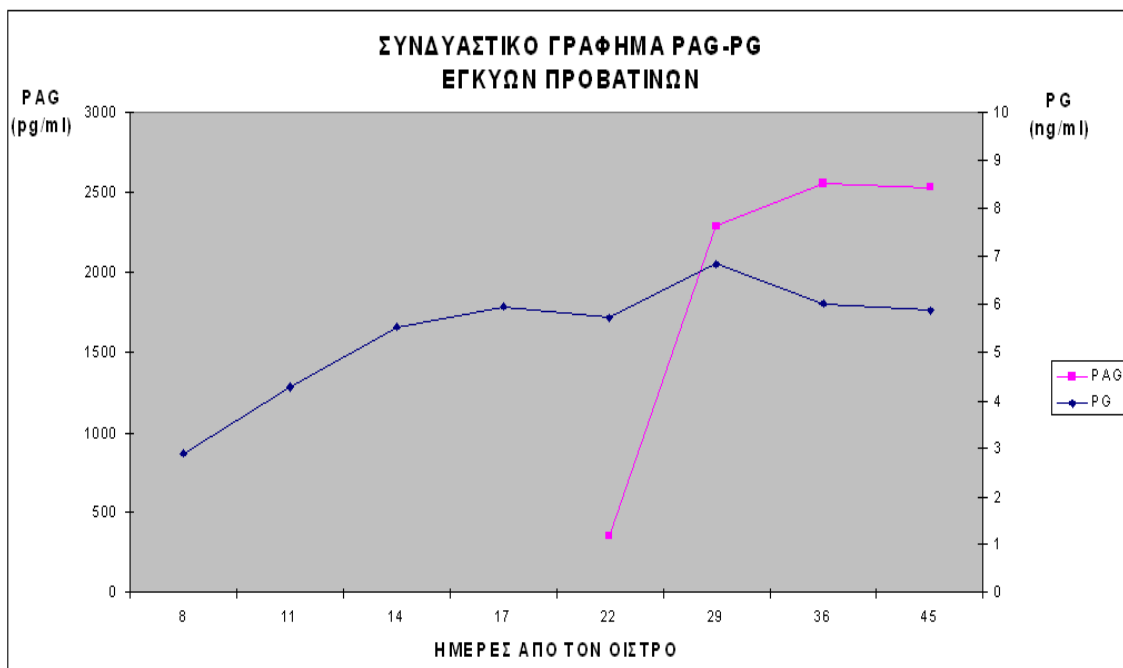
Πίνακας 3.5.2.2. Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση των τιμών της PAG από την 22 μέχρι 45 ημέρα από την εισαγωγή των κριών, των πολύδυμων και των μονόδυμων προβατίνων.

	Ημέρες από την εισαγωγή των κριών			
	22	29	36	45
ΠΟΛΥΔΥΜΕΣ				
Μ.Ο.τιμών PG (ng/ml)	514(±213,61)	2803,2(±958,08)	2989(±1035,60)	2696,2(±775,82)
ΜΟΝΟΔΥΜΕΣ				
Μ.Ο.τιμών PG (ng/ml)	12,5(±17,68)	1293,5(±20,51)	2069,5(±475,88)	2489(±298,40)

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προβατίνες 203, 204, 211, 214 που δε κατάφεραν να συλλάβουν στο πρώτο οίστρο, αλλά κατάφεραν να μείνουν έγκυες στο δεύτερο οιστρικό κύκλο και 16-17 ημέρες μετά, φαίνεται να έχουν ανοδικές τιμές PAG μεταξύ των δειγματοληψιών της 36-45 ημέρας από την εισαγωγή των κριών (διάγραμμα 3.5.2.3.).



Διάγραμμα 3.5.2.3. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης των επιπέδων της PAG των προβατίνων που έμειναν έγκυες στο δεύτερο οιστρικό κύκλο, μετά την εισαγωγή των κριών.



Διάγραμμα 3.5.2.4. Συνδυαστικό γράφημα της εξέλιξης της μέσης συγκέντρωσης της προγεστερόνης καθώς και των μέσων επιπέδων ΡΑΓ των έγκυων προβατινών από την 8 έως την 45 ημέρα για την προγεστερόνη και από την 22 έως την 45 ημέρα για την ΡΑΓ, από την εισαγωγή των κριών.

Πίνακας 3.5.2.4. Ακρίβεια διάγνωσης εγκυμοσύνης, σύμφωνα με τη μέθοδο της ΡΑΓ και της προγεστερόνης στον ορό αίματος προβατινών, 22-45 ημέρες μετά την εκδήλωση οίστρου και την επιτυχή επίβαση από το κριό.

Μέθοδος	Αριθμός ζώων	Διάγνωση έγκυων	Διάγνωση μη έγκυων
PAG	16	8/8 (100%)	8/8 (100%)
PG	16	8/8 (100%)	8/8 (100%)

Πίνακας 3.5.2.5. Τιμές PAG και προγεστερόνης στον ορό αίματος κατά το χρονικό διάστημα από την 17 έως την 45 ημέρα από την εισαγωγή των κριών, των πολύδυμων προβατίνων.

Αριθμός Ζώου:		ΗΜΕΡΕΣ				
		17	22	29	36	45
193	PAG (pg/ml)	-	476	1610	1566	1803
	PG (ng/ml)	6	6,2	9,3	6,4	7,2
194	PAG (pg/ml)	-	846	4057	3686	3858
	PG (ng/ml)	12	9,4	12,1	10,5	11,1
195	PAG (pg/ml)	-	215	2197	2763	2288
	PG (ng/ml)	5,6	5,9	5,9	6,4	7,1
198	PAG (pg/ml)	-	578	2888	3285	2672
	PG (ng/ml)	4,8	5,2	5,8	5,2	4,6
215	PAG (pg/ml)	-	361	1704	1334	1801
	PG (ng/ml)	6,2	6,9	6,2	5,9	6,7
216	PAG (pg/ml)	-	455	3264	3645	2860
	PG (ng/ml)	3,5	3,1	5	5,2	5,1

Πίνακας 3.5.2.6. Τιμές PAG και προγεστερόνης στον ορό αίματος κατά το χρονικό διάστημα από την 17 έως την 45 ημέρα από την εισαγωγή των κριών, των μονόδυμων προβατίνων.

Αριθμός Ζώου:		ΗΜΕΡΕΣ				
		17	22	29	36	45
190	PAG (pg/ml)	-	25	1279	1733	2278
	PG (ng/ml)	4,9	5	4,7	3,6	2,7
213	PAG (pg/ml)	-	0	1308	2406	2700
	PG (ng/ml)	4,6	5,3	5,1	4,8	3,4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη αυτή συγκρίθηκαν δύο πρωτόκολλα συγχρονισμού του οίστρου σε προβατίνες. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η εφαρμογή του πρωτοκόλλου με τη χρήση προγεσταγονούχων σπόγγων έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα (στο 1^ο και 2^ο οιστρικό κύκλο συνέλαβαν 11 από τα 15 ζώα) σε σχέση με αυτό της συνδυασμένης χορήγησης GnRH και PGF_{2α}, κατά το οποίο απάντησαν 4 ζώα από τα 15 στην ορμονική αγωγή και μόνο ένα ζώο κατάφερε να γονιμοποιηθεί αμέσως μετά από αυτή.

Η εφαρμογή του δευτέρου πρωτοκόλλου προϋποθέτει την ύπαρξη λειτουργικού ωχρού σωματίου και επομένως είναι εφαρμόσιμο μόνο κατά την οιστρική περίοδο. Αν και σύμφωνα με τα δεδομένα της εκτροφής το χρονικό διάστημα (πρώτο 15ήμερο Ιουνίου) θεωρείται ότι είναι η έναρξη της οιστρικής περιόδου, τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της προγεστερόνης στα δείγματα γάλακτος έδειξαν ότι τα ζώα βρίσκονταν ακόμη στην άνοιστρη περίοδο. Αυτός είναι και ο πιο σημαντικός λόγος αποτυχίας αυτής της μεθόδου. Το μοναδικό ζώο που εμφάνισε ωθητική δραστηριότητα πριν την έναρξη του πειραματισμού ήταν το ζώο 215 το οποίο και αντέδρασε θετικά στην αγωγή με GnRH και PGF_{2α}. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο μέρος των ζώων, τα οποία έλαβαν μέρος στο πείραμα, βρίσκονταν σε άνοιστρη περίοδο, συνεπώς σε επίπεδο ωθήκης δεν υπήρχε ωχρό σωματίο, η παρουσία του οποίου είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική εφαρμογή του πρωτοκόλλου με τον ορμονικό συνδυασμό της GnRH και της PGF_{2α}. Κάτι που ενδεχομένως να δικαιολογεί την απουσία οίστρου, είναι η απουσία προγεστερόνης η οποία είναι αναγκαία για την προπαρασκευή των κέντρων γενετήσιας συμπεριφοράς του κεντρικού νευρικού συστήματος στη δράση των οιστρογόνων, όπως συμβαίνει στην άνοιστρη περίοδο, αλλά και κατά τον πρώτο οίστρο της ενήβωσης όπου στον υποθάλαμο δεν έχουν σχηματιστεί οι κατάλληλοι υποδοχείς που να μεταφράζουν τα ωθητικά ερεθίσματα, τέτοιες καταστάσεις συνήθως συνοδεύονται από μικρή ωχρινική φάση και σιωπηρούς οίστρους

Επιπροσθέτως η παραπάνω άποψη ενισχύεται, από τις κλιματολογικές συνθήκες που επικράτησαν κατά τη διάρκεια της άνοιξης και συνεχίστηκαν μέχρι την έναρξη του πειράματος, γεγονός που θα μπορούσε να αιτιολογήσει την καθυστέρηση της έναρξης της οιστρικής περιόδου στα ζώα. Μιας και το φαινόμενο εμφανίστηκε και σε λοιπές εκτροφές της ευρύτερης περιοχής, θα πρέπει να επισημανθεί ότι τόσο το σύστημα διαχείρισης που εφαρμόζεται αποκλειστικά σε κάθε εκτροφή, όσο και οι μεταβολές στις καιρικές συνθήκες, μπορούν να επηρεάσουν την εποχική αναπαραγωγική ικανότητα των εκτρεφόμενων ζώων. Ειδικότερα, σε εκτροφές που εφαρμόζουν εκτατικό, ή ημικτατικό σύστημα διαχείρισης, τα φαινόμενα μεταβολής είναι εντονότερα, διότι επηρεάζεται η διατροφή των ζώων, μέσω της ποιότητας της χορτονομής κατά τη βόσκηση, η οποία μπορεί να μεταβάλλεται, λόγω καιρικών συνθηκών.

Από τα αποτελέσματα της δεύτερης ομάδας προκύπτει επίσης ότι αν και τα ζώα δεν παρουσίασαν οίστρο ένα ποσοστό ζώων εμφάνισε κυκλικότητα μετά την ορμονική χορήγηση. Φαίνεται πως τέσσερεις προβατίνες (26%) αντέδρασαν στην ορμονική αγωγή, μία κατάφερε να συλλάβει επιτυχώς μετά την αγωγή και άλλη μια έμεινε έγκυος

στον δεύτερο κύκλο, ενώ οι άλλες δύο εμφάνισαν κάποια κυκλικότητα μετά από κάποιο χρονικό διάστημα από την αγωγή. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει επειδή το ωχρό σωματίο εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αγωγή προσταγλανδίνης, μέχρι και 2 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία. Επομένως, ίσως να απαιτούνται υψηλότερες δόσεις για να προκαλέσουν ωχρινόλυση, κατά τη διάρκεια της πρώιμης ωχρινικής φάσης (Abecia et al., 2012). Ίσως κάποια τροποποίηση στην δοσολογία της προσταγλανδίνης να αλλάζει το τελικό αποτέλεσμα.

Επιπλέον, ο αριθμός των ωοθυλακίων σε κάθε προβατίνα ξεχωριστά επηρεάζει το μεσοδιάστημα από την εφαρμογή της $PGF_{2\alpha}$ μέχρι την εμφάνιση του οίστρου (Viñoles et al., 1998). Εάν κατά την εφαρμογή της $PGF_{2\alpha}$ ένα κυρίαρχο ωοθυλάκιο είναι παρόν, ο οίστρος και η ωοθυλακιορρηξία εμφανίζονται σχετικά γρήγορα, εντούτοις, εάν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο είναι ήδη σε φάση παλινδρόμησης, ένα νέο ωοθυλάκιο χρειάζεται να αναδυθεί και να αυξηθεί και γι' αυτό το λόγο ο οίστρος και η ωοθυλακιορρηξία καθυστερούν (Fierro et al., 2013).

Επίσης, μια άλλη πρόταση θα μπορούσε να είναι η παράλληλη εφαρμογή της «επίδρασης του αρσενικού» μαζί με τη δεύτερη έγχυση $PGF_{2\alpha}$, έτσι ώστε να μειωθεί η ποικιλομορφία στο συγχρονισμό της ωοθυλακιορρηξίας μετά από την ορμονική αγωγή. Η «επίδραση του αρσενικού», αν και χρησιμοποιείται συνήθως για την επίσπευση της αιχμής της LH και της ωοθυλακιορρηξίας κατά τη διάρκεια της εποχικής άνοιστρου, αυξάνει επίσης την έκκριση της LH, κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, σε προβατίνες που βρίσκονται σε οίστρο (Delgadillo et al., 2009), καθώς επίσης σε προβατίνες που τους έχει χορηγηθεί προγεσταγονούχος αγωγή (Evans et al., 2004), ή και σε προβατίνες που εφαρμόστηκε αγωγή με προσταγλανδίνη (Contreras-Solis et al., 2009).

Κατά συνέπεια, ο συνδυασμός $PGF_{2\alpha}$ κατά τη διάρκεια της πρώιμης ωχρινικής φάσης μαζί με την «επίδραση του αρσενικού» μπορεί να είναι μια επαρκής εναλλακτική λύση για το συγχρονισμό του οίστρου πριν από την τεχνητή σπερματέγχυση ή τη φυσική οχεία, δίχως την ανίχνευση οίστρου (Contreras - Solis et al., 2009). Παρόλα αυτά, η χρήση της GnRH ή της «επίδρασης του αρσενικού» στα πρωτόκολλα που βασίζονται στην προσταγλανδίνη, για χρονικά καθορισμένη τεχνητή σπερματέγχυση ή φυσική οχεία χρειάζονται βάσεις και έρευνα πεδίου για να καθοριστεί ο βέλτιστος χρόνος αφ' ενός της χορήγησης GnRH και αφ' ετέρου της εισαγωγής των αρσενικών.

Η εφαρμογή βελτιωμένης διατροφής μπορεί επίσης να βελτιώσει την ποιότητα των ωοθυλακίων και να αυξήσει το ρυθμό της ωοθυλακιορρηξίας, επειδή οι βραχυπρόθεσμες αυξήσεις στη διατροφή μπορούν να διεγείρουν την ωογένεση στα πρόβατα (Scaramuzzi et al., 2010). Η συμπληρωματική χορήγηση σιτηρεσίου με υψηλή ενέργεια και πρωτεΐνη, π.χ., καρπού λούπινων για 6 ημέρες (Viñoles et al., 2010), ή καρπού καλαμποκιού μαζί με σόγια για 7 ημέρες, ή με τη χρήση των βελτιωμένων λιβαδιών (π.χ., *corniculatus Lotus*) για 12 ημέρες (Viñoles et al., 2009), αύξησε τον αριθμό ωοθυλακίων μεγέθους 3 mm, του ρυθμού ωοθυλακιορρηξίας κατά 14% και τον αριθμό γεννήσεων δίδυμων αρνιών.

Όσον αφορά τη διάγνωση της εγκυμοσύνης και οι δυο μέθοδοι εμφάνισαν άριστα αποτελέσματα, εντοπίζοντας σε ποσοστό 100% τις έγκυες και τις μη έγκυες προβατίνες. Σαν μεθοδολογίες, η χρήση της προγεστερόνης πέρα από το ότι απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό, εμφανίζει μια δυσκολία ως προς τον εντοπισμό των μη έγκυων ζώων, με μια δειγματοληψία. Μπορεί να οδηγηθεί σε εσφαλμένο αποτέλεσμα εντοπίζοντας προγεστερόνη λειτουργικού ωχρού σωματίου το οποίο αργότερα να παλινδρομήσει (16 -17 ημέρα).

Σε αντίθεση η μέθοδος της PAG, με μια μόνο δειγματοληψία μετά την 23^η ημέρα της εγκυμοσύνης, μπορεί να διαγνώσει την εγκυμοσύνη με ασφάλεια. Επιπρόσθετα, όπως φάνηκε και από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, μετά την 36^η ημέρα ήταν δυνατός ο εντοπισμός των έγκυων ζώων του δεύτερου κύκλου, συνεπώς με συμπληρωματική ανάλυση ή με μια μεμονωμένη δειγματοληψία μετά τις 36 ημέρες της κυοφορίας, θα μπορούσε να γίνει διάγνωση όλων των έγκυων ζώων του πρώτου και δεύτερου οιστρικού κύκλου.

Σε πείραμα που διεξήχθη σε εξήντα τρεις προβατίνες της Ιταλικής φυλής Sarda, τη 18^η ημέρα της εγκυμοσύνης, ανιχνεύθηκαν στον ορό αίματος, συγκεντρώσεις PAG, σε 26 από τις 43 (60,5%) και σε 41 από τις 43 (95,3%) έγκυες προβατίνες με τη χρήση μεθόδων RIA. Όπως προέκυψε, η ανίχνευση των PAGs ήταν δυνατή από την 24^η ημέρα σε όλα τα έγκυα ζώα. Την 24^η ημέρα, η υψηλότερη διαφορά στις συγκεντρώσεις PAG παρατηρήθηκε με τη χρήση RIA-srPool, με μέγιστη συγκέντρωση στις μη εγκυμονούσες προβατίνες τα 0,3 ng/ml και ελάχιστη συγκέντρωση στις έγκυες προβατίνες τα 4,8 ng/ml. Οι συγκεντρώσεις PAG που μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας RIA-706 στις μη εγκυμονούσες και έγκυες προβατίνες είχαν μικρότερο εύρος ή ήταν πλησιέστερες (μέγιστο στις μη εγκυμονούσες προβατίνες 0,8 ng/ml και ελάχιστο στις έγκυες προβατίνες 2,7 ng/ml, αντίστοιχα). Σε όλες τις αναλύσεις κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι συγκεντρώσεις της PAG ήταν σημαντικά υψηλότερες στις πολύδυμες κηήσεις σε σχέση με τις μονόδυμες. Εντούτοις, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές έτσι ώστε να ληφθούν ως ασφαλές μέσο διαφοροποίησης μεταξύ, πολύδυμων και μονόδυμων κηήσεων. Όσον αφορά τη διάγνωση εγκυμοσύνης, η ευαισθησία (ακρίβεια ανίχνευσης των εγκύων προβατίνων) βελτιώθηκε και στις δύο μεθόδους PAG-RIA όταν τα δείγματα ελήφθησαν μετά την 24^η ημέρα της εγκυμοσύνης. Η ειδικότητα (ακρίβεια της μεθόδου κατά την ανίχνευση των μη εγκύων προβατίνων) ήταν 100% για όλες τις περιόδους (Barbato et al., 2009).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο συγχρονισμός του οίστρου όπως εκτενώς αναλύθηκε στη παρούσα διατριβή, έχει αρκετά πλεονεκτήματα κατά την εφαρμογή του. Οι μέθοδοι μπορεί να ποικίλουν ως προς τον τρόπο εφαρμογής, επιτρέποντας μια ευχέρεια επιλογής ανάλογα τη κάθε περίπτωση ξεχωριστά.

Εντούτοις, όποιος ασχολείται με την αναπαραγωγή του προβάτου, θα πρέπει να χειρίζεται με συνετό τρόπο τη λειτουργική της διαδικασία. Η επιτυχής εφαρμογή προγραμμάτων συγχρονισμού οίστρου ως υποβοηθούμενη τεχνική αναπαραγωγής, απαιτεί βαθιά γνώση εξειδικευμένων λεπτομερειών και διεργασιών του αναπαραγωγικού συστήματος, απαραίτητες για την επίτευξη, ορθολογικά σωστών αποτελεσμάτων ανά περίπτωση και περίπτωση.

Το πρωτόκολλο συγχρονισμού οίστρου προγεσταγενούχων σπόγγων και eCG, απέδωσε πολύ καλά αποτελέσματα, σε αντιδιαστολή με το πρωτοκόλλου GnRH-PGF_{2α}, το οποίο φαίνεται πως η απαραίτητη προϋπόθεση της ύπαρξης ωχρού σωματίου στην ωοθήκη, για την ομαλή λειτουργία του. Επομένως η εφαρμογή του στο πρόβατο πρέπει να γίνεται μόνο αν είμαστε σίγουροι ότι βρίσκεται ήδη στην οιστρική περίοδο.

Θα μπορούσε να ειπωθεί πως υπάρχουν προοπτικές ανάπτυξης και εξέλιξης νέων μεθόδων στο τομέα του συγχρονισμού του οίστρου των προβάτων. Επιπλέον, μια νέα προσέγγιση που υποστηρίζει τη χρήση της βιοδιέγερσης «biostimulation» (δηλ., τα διεγερτικά αποτελέσματα στα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των θηλυκών, π.χ., η αρχή της ήβης, η έκφραση οίστρου, η επίσπευση της ωοθυλακιόρρηξιας, τα οποία προκαλούνται με τη παρουσία του αρσενικού) αντί της εξωγενούς χορήγησης ορμονών και φαρμακευτικών αγωγών για τον έλεγχο και τη βελτίωση της παραγωγικότητας των προβάτων και των αιγών, ίσως φανεί χρήσιμη στο μέλλον (Martin et al., 2004). Αυτό μπορεί να αποτελέσει μακροπρόθεσμο στόχο, για αυτούς που εμπλέκονται με την ζωική παραγωγή όλων των χωρών, έτσι ώστε να αρχίσουν να κινούνται προς πιο καθαρές, πράσινες και ηθικές πρακτικές εφαρμογές (Abecia et al., 2012).

Η χρήση των PAGs για την πρόωμη διάγνωση της κύησης με την μέθοδο ELISA θα δώσει τη δυνατότητα στους παραγωγούς, να την εφαρμόζουν σε επίπεδο εκτροφής. Χρειάζεται λοιπόν περαιτέρω έρευνα ώστε η μέθοδος να μπορεί να εφαρμόζεται απλά και φθηνά απ' ευθείας από τον παραγωγό. Χρειάζεται επίσης επί πλέον διερεύνηση η πιθανότητα πρόωμης διάγνωσης πολυδυμίας, μέσω αυτής της μεθόδου.

Τέλος η μέθοδος της συνδυαζόμενης χρήσης GnRH-PGF_{2α} για το συγχρονισμό του οίστρου στα πρόβατα, αν χρησιμοποιηθεί την κατάλληλη εποχή μπορεί να αποδειχθεί καταλληλότερη γιατί ενώ τα περισσότερα πρωτοκόλλα προκαλούν συγχρονισμό οίστρων αυτή επιφέρει επιπλέον τον συγχρονισμό ωοθυλακικών κυμάτων, είναι συντομότερη και κυρίως επιτρέπει την τυφλή σπερματέγχυση και τον προγραμματισμό των οχειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Μενεγάτος Ι., Δεληγιάννης Κ., Λαϊνός Θ., Καλογιάννης Δ., Στοφόρος Ε., (1995). Η ετήσια ωοθηκική δραστηριότητα προβατίνων Καραγκούνικης φυλής. *ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ* 46 (2), 113-119.
- Μενεγάτος Ι., Νικολάου Ε., Καλογιάννης Δ., Μάτζιος Α., Στοφόρος Ε., (1995). Η ετήσια ωοθηκική δραστηριότητα προβατίνων ορεινής φυλής Ηπείρου (Μπούτσικο) σε συνθήκες εντατικής εκτροφής. *ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ* 46 (1), 39-46.
- Μιχαήλ Σωτ.,Γ., (1990,1997,2004,2010). Συγκριτική Ανατομική των Κατοικίδιων Θηλαστικών. *Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε.*, Θεσσαλονίκη, σελ. 588-590.
- Μιχαήλ Σωτ.,Γ., (1996). Ιστολογία. *Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε.*, Θεσσαλονίκη, σελ. 365-373.
- Παπαβασιλείου Δ., Νικολάου Ε., (2001). Γενική και ειδική Ζωοτεχνία. Πρόγραμμα σπουδών Εφαρμοσμένη Αγροοικολογία, Ιωάννινα.
- Ρογδάκης Ε., (2004). Αναπαραγωγή του Προβάτου. *Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη*, Αθήνα.
- Σαμαρτζή Φ., Φθενάκης Γ.Χ., (2003). Παρεμβάσεις ρύθμισης του οιστρικού κύκλου των μικρών μηρυκαστικών. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας*. 54 (4): 351-361. (Ανασκόπηση).
- Σμοκοβίτης Αθ.,(2007). Φυσιολογία. *Αφοί Κυριακίδη*, Θεσσαλονίκη.

Διεθνής Βιβλιογραφία:

- Abecia J.A., Forcada F., Gonzalez-Bulnes A., (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 130: 173– 179.
- Acritopoulou S., Haresign W., (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2a given at different stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*; 58:219–23.
- Agwu J.O., Holtz W., (1986). Progesterone test for controlling fertility in goats. *Ziegenzuechter* 2 (3), 17–19.
- Al-Merestani M.R., Zarkawi M., Warden M.F., (2003) Improving the reproductive efficiency, pregnancy diagnosis and monitoring the resumption of luteal activity in Indigenous Damascus goats. *Domestic Animal Reprouction*, 38: 36-40.
- Alnimer M., Lubbadah W., (2003). Effect of using progesterone releasing intravaginal device with ovsynch program on reproduction in dairy cattle during summer season. *Asian- Australas J Anim Sci* 16, 1268–1273.

- Arav A., Gavish Z., Elami A., Natan Y., Revel A., Silber S., Gosden R.G., Patrizio P., (2010). Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries. *Reproductive BioMedicine Online*, 20: 48-52.
- Arendt J., (1995). Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. Chapman Hall, London, pp. 112–160.
- Arendt J., Symons A.M., English J., (1988). How does melatonin control seasonal reproductive cycles. *Reprod Nutr Dev* 28:387–397.
- Ataman M.B., Akoz M., (2006). GnRH-PGF2a and PGF2a-PGF2a synchronization in Akkaraman cross-bred sheep in the breeding season. *Bull Vet Inst Pulawy* 50, 101–104.
- Barbato O., Sousa N.M., Debenedetti A., Canali C., Todini L., Beckers J.F., (2009). Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology*. 72 : 993–1000.
- Bari F., Khalid M., Olf B., Haresign W., Murray A., Merrel B., (2001). The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, 56: 147-155.
- Bartlewski P.M., Beard A.P., Cook S.J., Chandolia R.K., Honaramooz A., Rawlings N.C., (1999a). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in Prolificacy. *Reproduction and Fertility*, 115: 111-124.
- Bartlewski P.M., Beard A.P., Rawlings N.C., (1999c). Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 67–88.
- Bartlewski P.M., Beard A.P., Rawlings N.C., (1999d). Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 51–66.
- Bartlewski P.M., Baby T.E., Giffin J.L., (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, 124: 259–268.
- Batalha E.S., Sulon J., Figueiredo J.R., Beckers J.F., Espescht C.J.B., Martins R., (2001). Plasma profile of pregnancy associated glycoprotein (PAG) in pregnant Alpine goats using two radioimmunoassay (RIA) systems. *Small Rumin. Res.* 42, 111–118.
- Beard A.P., Hunter M.G., (1996). Effects of exogenous oxytocin and progesterone on GnRH-induced short luteal phases in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fertil.* 106, 55–61.
- Bittman E.L., Karsch F.G., Hopkins J.W., (1983). Role of pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*. 113: 29-336.

- Bittman E. L., (1984). Melatonin and photoperiodic time measurement : evidence from rodents to ruminants, 155-192. In *The pineal gland*, Ed. R. J. REITER. Raven Press, New York.
- Cardwell B.E., Fitch G.Q., Geiser R.D., (1998). Ultrasonic evaluation for the time of ovulation in ewes treated with norgestoment followed by pregnant mare's serum gonadotrophin. *Animal Science*, 76, 2235- 2238.
- Chemineau P., (1987). Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats - a review. *Livestock Production Science*, 17: 135-147.
- Chemineau P., Baril G., Leboeuf B., Maurel M.C., Roy F., Pellicer-Rubio M., Malpoux B., Cognie Y., (1999). Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *Reproduction and Fertility*, 54: 129-142.
- Chemineau P., Malpoux B., (1998). Melatonin and reproduction in domestic farm animals. *Therapie*, 53: 445-452.
- Coelho L.A., (2001). Estudo sobre a atividade ciclica reprodutiva e o perfil plasmatico de melatonina em femeas ovinas, sob fotoperíodo natural, no Estado de Sao Paulo, Thesis. Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of Sao Paulo, Pirassununga, Brazil.
- Contreras-Solís I., Vásquez B., Díaz T., Letelier C., López Sebastian A., González Bulnes A., (2009). Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval Cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology*; 71: 1018–25.
- Delgadillo A.J., Gelezb H., Ungerfeld R., Hawkend P.A.R., Martind G.B., (2009). The ‘male effect’ in sheep and goats - Revisiting the dogmas. *Behavioural Brain Research*; 200/ 2: 304–314.
- Deligiannis C., Valasi I., Rekkas C.A., Goulas P., Theodosiadou E., Lainas T., Amiridis G.S., (2005). Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine insemination in ewes. *Reprod. Dom. Anim* 40: 6-10.
- Dhindsa D.S., Metcalfe J., Resko J.A., (1981). Oestrogen concentrations in systemic plasma of pregnant Pygmy goats. *J. Reprod. Fertil.* 62, 99–103.
- Driancourt M.A., Bodin L., Boomarov O., Thimonier J., Elsen J.M., (1990). Number of mature follicle ovulating after a challenge of human chorionic gonadotrophin in different breeds of sheep at different physiological stages. *Animal Science*, 68: 719-724.
- Duggavathi R., Bartlewski P.M., Barrett D.M.W., Rawlings N.C., (2003b). 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.

- Duggavathi R., Bartlewski P.M., Agg E., Flint S., Barrett D.M.W., Rawlings N.C., (2005a). The effect of the manipulation of FSH-peak characteristics on follicular wave dynamics in sheep: does an ovarian-independent endogenous rhythm in FSH secretion exist? *Biol. Reprod.* 72, 1466–1474.
- Duggavathi R., Bartlewski P.M., Barrett D.M.W., Rawlings N.C., (2005b). The temporal relationship between the pattern of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late luteal phase of sheep. *Theriogenology* 64, 393–407.
- El-Zarkouny S.Z., Cartmill J.A., Hensley B.A., Stevenson J.S., (2004). Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J Dairy Sci* 87, 1024–1037.
- Evans A.C.O., Duffy P., Hynes N., Boland M.P., (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, 53, 699-715.
- Evans A.C.O., (2003a). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 240–246.
- Evans A.C.O., (2003b). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 289–306.
- Fonseca J.F., Bruschi J.H., Zambrini F.N., Demczuk E., Viana J.H.M., Palhaõ M.P., (2005). Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. *Anim Reprod* 2, 50–53.
- Fierro S., Gil J., Viñoles C., Olivera-Muzante J., (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe. *Theriogenology* 79 399–408. (Review).
- Friedrich, M., Holtz, W., (2004). Establishment of an ELISA to assess PAG concentrations in blood and milk of dairy cows. *Reproduction Abstract Series*. 31 (P9), 21.
- Gibbons J.R., Kot K., Thomas D.L., Wiltbank M.C., Ginther O.J., (1999). Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology* 52, 1005–1020.
- Ginther O.J., Kot K., Wiltbank M.C., (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, 43, 689-703.
- Godfrey R.W., Collins J.R., Hensley E.L., Wheaton J.E., (1999). Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. *Theriogenology*, 51:985-997.
- Goldman B.D., (1999) The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids* 64:679–685.

- Gonzalez-Bulnes, A., Baird, D.T., Campbell, B.K., Cocero, M.J., Garcia R.M., Inskip E.K., Lopez-Sebastian, A., McNeily, A.S., Santiago-Moreno J., Souza C.J. and Veigaa-Lopez A., (2004). Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction Fertility and Development*, 16(4), 421-35.
- Gonzalez F., Cabrera F., Batista M., Rodriguez N., Alamo D., Sulon J., Beckers J.F., Garcia A., (1999). Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentration in plasma samples. *Theriogenology*, 52, 717–725.
- Gonzalez F., Sulon J., Calero P., Batista M., Gracia A., Beckers J.F., (2001). Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats. *Theriogenology*. 56, 671–676.
- Gordon I., (1997). *Controlled Breeding in Sheep and Goats*. CAB international, Oxford.
- Green J., Parks T., Avasle M., Telegu B., McLain A., Peterson A., McMillan W., Mathialagan N., Hook R., Xie S., Roberts R.M., (2005). The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*. 63, 1481–1503.
- Hafez Y.H., Khalifa E.I., El-Shafie M.H., Abdel Khalek T.M.M., Ahmed M.E. and Shehata E.I., (2011). Effect of energy flushing pre-mating and during mating season on production and reproduction performance of Zaraibi goats. *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences*, 6 (1): 7-14.
- Henderson D.C., (1991). Control of the breeding season in sheep and goats. In: *Sheep and Goat Practice*. Bailliere Tindall, London, 11-27.
- Henderson D.C., Robinson J.J., (2000). The reproductive cycle and its manipulation. In: *Diseases of Sheep*. 3rd ed, Blackwell, Oxford, 25-34.
- Hing-Sing Y., Russel J.R., (1992). Melatonin biosynthesis, physiological effects and clinical applications. Library of Congress Cataloging in Publication Data. International Standard Book Number 0-8493-6900-2. CRC Press.Florida.
- Holtz W., (1992). Pregnancy diagnosis through faecal estrogens in goats. In: Scaftenaar, W., Buiters, R.M., Dieleman, S.J. (Eds.), *The First International Symposium on Faecal Steroid Monitoring in Zoo Animals*. Rotterdam, pp. 62–67.
- Husein M.Q., Kridli R.T., (2003). Effect of progesterone prior to GnRH–PGF2a treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Reprod Dom Anim* 38, 228–232.
- Husein M.Q., Ababneh M.M., Haddad S.G., (2005). The effects of progesterone priming on reproductive performance of GnRH–PGF2 a-treated anestrous goats. *Reprod Nutr Dev* 45, 689–698.
- Intervet, (2003). Control of oestrus. In: *Compendium of animal reproduction*. (Ed. P. Broers) Intervet International B.V.

- Karen A., Beckers J.F., Sulon J., Sousa N.M., Szabados K., Reczigel J., Szenci O., (2003). Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy – associated glycoproteins tests. *Theriology*. 59: 1941-1948.
- Keator C.S., Custer E.E., Hoagland T.A., Schreiber D.T., Mah K., Lawson A.M., Slayden O.D., McCracken J.A., (2010). Evidence for a potential role of neuropeptide Y in ovine corpus luteum. function. *Domestic Animal Endocrinology*, 38: 103–114.
- Killian D.B., Kiesling D.O., Warren J.E. Jr., (1985). Lifespan of corpora lutea induced in estrous-synchronized cycling and anestrous ewes. *J Anim Sci*, 61:210-215.
- Knobil E., Neil J.D., (2006). Knobil and Neil’s physiology of reproduction, Τόμος 1, Gulf Professional Publishing, Oxford, U.K.
- Kusina N.T., Tarwirei, Hamudikuwanda H., Agumba G., Mukwena J., (2000). A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF2alpha, and their combination on efficacy of estrus synchronization and fertility of Mashona goat does. *Theriogenology*, 53:1567-1580.
- Langford G.A., (1982). Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progestogen-treated sheep in confinement. *J Anim Sci*, 54:1205-1211.
- Langford G.A., Ainsworth L., Wolynetz M.S., (1982). Reproductive response of progestogen-treated sheep in confinement to a single and double insemination. *J Anim Sci*, 54:12-17.
- Langford G.A., Marcus G.J., Batra T.R., (1983). Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestogentreated sheep. *J Anim Sci*, 57:307-312.
- Ledezma-Torres R.A., (2002). Pregnancy-associated Glycoprotein (PAG) in Blood of Sheep and Estrogen Concentration in Feces of Goats as means of Pregnancy Diagnosis. *Cuvillier, Goettingen, Germany, ISBN: 3-89873-589-3*. (German with English abstract).
- Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W., (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2587.
- Letelier C.A., Contreras-Solis I., Garcva-Fernández R.A., Ariznavarreta C., Tresguerres J.A., Flores J.M., Gonzalez-Bulnes A., (2009). Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology* 71, 676–682.
- Letelier C.A., Contreras-Solis I., García-Fernández R.A., Sánchez M.A., García-Palencia P., Sánchez B., (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim Rep Sci*; 126: 61–9.

- Lincoln G. A., (1984). The pineal gland. In *Reproduction in mammals*, Book 3, 2nd ed., Hormonal control of reproduction, pp. 52-75, Eds C. R. AUSTIN & R. V. SHORT, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Lymberopoulos A.G., Amiridis G.S., Kuhholzer B., Besenfelder U., Christodoulou V., Vainas E., Brem G., (2001). Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology*, 55: 1855-1862.
- Lymberopoulos A.G., Boscas C.M., Dellis S., Papia A., S., Belibasaki, (2002). Oestrous synchronization under range conditions in dairy goats treated with different PGF₂ α doses during the transitional period in Greece. *Animal Science*, 75: 289-294.
- Malpoux B., Viguie C., Skinner D.C., (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* 44:431-438.
- Malpoux B., Thiery J.C., Chemineau P., (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction and Nutrition Development*, 39: 355-366.
- Martin G.B., Scaramuzzi R.J., (1983). The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. *J Steroid Biochem*, 19:869-875.
- Martin G.B., Milton J., Davidson R., Banchero Hunzicker G., Lindsay D., Blache D., (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci.*, 82-83:231-46.
- Martinez M., Bosch P., Bosch R., (1998). Determination of early pregnancy and embryonic growth in goats by transrectal ultrasound scanning. *Theriogenology*, 49: 1555-1565.
- Matthews J., (1999). *Diseases of the Goat*, 2nd ed, Blackwell, Oxford.
- McArthur C.P., Geary A., (1986). Field evaluation of a pregnancy immunoassay for the detection of estrone sulphate in goats. *J. Endocrinol.* 110, 133-136.
- McCracken J.A., Glew M.E., Scaramuzzi R.J., (1970). Corpus luteum regression induced by prostaglandin F₂-alpha. *J Clin Endocrinol Metab*; 30:544-6.
- McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K., Samuelsson, B., (1972). Prostaglandin F₂ α identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nat. New Biol.* 238, 129-134.
- Mcdan M, Shalaby A.H., Sharawy S., Watanabe G., Taya K., (2002). Induction of estrus during the non-breeding season in Egyptian Baladi goats. *Vet Medical Science*, 64: 83-85.
- Menegatos J., Chadio S., Kalogiannis D., 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.

- Motlomelo K.C., Greyling J.P.C., Schwalbach L.M.J., (2002). Synchronization of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Rumin Res* 45, 45-49.
- Mutiga E.R., Mukasa-Mugerwa E., (1992). Effect of the method of estrus synchronization and PMSG dosage on estrus and twinning in Ethiopian Menze sheep. *Theriogenology*, 38:727-734.
- Murdoch W.J., Van Kirk E.A., (1998). Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in follicular phase. *Endocrinology*, 139, 3480-3484.
- Nagvi, S.M.K., Soren, N.M. and Karim S.A., (2011). Effect of concentrate supplementation on performance, ovarian response, and some biochemical profile of Malpura ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 43, 905-913.
- Noel B., Bister J.L., Paquay R., (1993). Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *Reproduction and Fertility*, 99, 695-700.
- Oliveira M.A., Guido S.I., Lima P.F., (2001). Comparison of different protocols used to induce and synchronise oestrous cycle of Saanen goats. *Small Ruminant Research*, 40: 149-153.
- Padilla-Rivas G., Sohnrey B., Holtz W., (2005). Early pregnancy detection by real-time ultrasonography in Boer goats. *Small Rumin. Res.* 58, 87-92.
- Pearce D.T., Robinson T.J., (1985). Plasma progesterone concentration ovarian and endocrinological responses and sperm transport in ewes with synchronized estrus *J Reprod Fertil*, 75:49-62.
- Pierson J.T., Baldassarre H., Keefer C.L., Downey B.R., (2001). Seasonal variation in preovulatory events associated with synchronization of estrus in dwarf goats. *Theriogenology*, 56: 759-769.
- Pursley J., Silcox R. and Wiltbank M., (1998). Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 2139-2144.
- Ravindra J.P., Rawlings N.C., Evans A.C.O., Adams G.P., (1994). Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *Reproduction and Fertility*, 101: 501509.
- Reiter R. J., (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.*, 1, 109-131.
- Rivas-Munoz R.E., Camillo E., Rodriguez R., Leyva C., Mellade M. and Veliz F.G., (2010). Effect of body condition score of does and use of bucks subjected to added artificial light on estrus response of Alpine goats. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 1285-1289.
- Roberts R.M., Xie S., Nagel R.J., Low B.G., Green J., Beckers I.F., (1995). Glycoproteins of the aspartic proteinase gene family secreted by the developing

- placenta. In: Takahashi K (ed.), *Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications*. New York: Plenum Press: 231-240.
- Robinson J. E., Karsch F. J., (1988). Timing the breeding season of the ewe : what is the role of daylength ? *Reprod. Nutr. Develop.*, 28, 365-374.
- Robinson T.J., (1959). The estrus cycle of the ewe and doe. In: Cole HH, Cupps PT (eds). *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, New York : 291- 333.
- Robinson T.J., Moore N.W., Holst P.J., Smith J.F., (1967). The evaluation of several progestagens administered in intravaginal sponges for the synchronization of estrus in the entire cycle merino ewe. In: *The Control of the Ovarian Cycle in Sheep*. University Press, Sydney 76-101.
- Robinson T.J., Smith J.F., (1967). The evaluation of SC-9880 impregnated intravaginal sponges used with or without PMS for the advancement of the breeding season of British breed ewes. In: *The Control of the Ovarian Cycle in Sheep*. University Press, Sydney 144-157.
- Rollag M.D., O'Callaghan P.L., Niswender G.D., (1978) Serum melatonin concentrations during different stages of the annual reproductive cycle in ewes. *Biol Reprod* 18:279–285.
- Rowson L.E., Tervit R., Brand A., (1972). The use of prostaglandin for synchronization of oestrus in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*; 29, 145. (Abstract).
- Roy F., Maurel M.C., Combes B., Vaiman D., Crihiu E.P., Lantier I., Pobel T., Deletang F., Combarous Y., Guillou F., (1999). The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biol Reprod* 60, 805–813.
- Rubianes E., Beard A., Dierschke D.J., Bartlewski P., Adams G.P., Rawlings N.C., (1997). Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF₂ α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology*, 48, 1093-1104.
- Sasser R.G., Ruder C.A., Ivani K.A., Butler J.E., Hamilton W.C., (1986). Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.* 35, 936–942.
- Safranski T.J., Lamberson W.R., Keisler D.H., (1992). Use of melengestrol acetate and gonadotrophins to induce fertile estrus in seasonally anestrus ewes. *J Anim Sci*, 70:2935-2941.
- Sboros V., Averkiou M., Lampaskis M., Thomas D.H., Silva N., Strouthos C., Docherty J., McNeilly A.S., (2011). Imaging of the Ovine Corpus Luteum Microcirculation with Contrast Ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 37 : 59-68.

- Scaramuzzi R.J., Brown H.M., Dupont J., (2010). Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: a perspective. *Reprod Dom Anim* 45: 32–41.
- Seekallu S.V., Toosi B.M., Duggavathi R., Barrett D.M.W., Davies K.L., Waldner C., Rawlings N.C., (2010). Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology* 73, 670–680.
- Shahin M., Friedrich M., Gaulty M., Beckers J.F., Holtz W., (2013). Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera. *Theriogenology*. 113 : 141–144.
- Sindermann, B., Sohnrey, B., Holtz, W., Palme, R., (1992). Pregnancy detection in goats by faecal estrogen determination. In: Lokeshwar, R.R. (Ed.), Recent Advances in Goat Production. *Nutan Printers, New Delhi, India*, pp. 1400–1403.
- Sousa N.M., Garbayo J.M., Figueiredo J.R., Sulon J., Goncalves P.B., Beckers J.F., (1999). Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Rumin. Res.* 32, 137–147.
- Stevenson J., Kobayashi Y. and Thompson K., (1999). Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin – releasing hormone and prostaglandin F2 alpha. *J. Dairy Sci.* 82: 506-515.
- Thatcher W., Macmillan K., Hansen P. and Drost M., (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31: 149-164.
- Thimonier J., Mauleon P., (1969). Variations saisonnières du comportement d' oestrus et des activités ovariennes et hypophysaires chez les ovins. *Ann Biol Bioch Biophys*, 9: 233- 250.
- Viñoles C, Rubianes E., (1998). Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can J Anim Sci* 78: 429–31.
- Viñoles C, Meikle A, Martin GB., (2009). Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Anim Rep Sci* 113:82–92.
- Viñoles C, Paganoni B, Glover KMM, Milton JTB, Blache D, Blackberry MA, (2010). The use of a “first-wave model” to study the effect of nutrition on ovarian follicular dynamics and ovulation rate in the sheep. *Reproduction* 140:865–74.
- Webb R., England B.G., (1982). Relationship between LH receptor concentration in thecal and granulosa cells in vivo and in vitro steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *Reproduction and Fertility*, 66, 169-180.

- Welch R.A.S., Andrewes W.D., Barnes D.R., Bremer K., Harvey T.G., (1984). CIDR dispensers for oestrus and ovulation control in sheep. In: Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction & Artificial Insemination, vol. 3, Urbana, IL, USA, pp. 354–355.
- Wheaton J.E., Carlson K.M., Windels H.F., Johnston L.J., (1993). CIDR: a new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 127–141.
- Wheaton J.E., Windels H.F., Johnston L.J., (1992). Accelerated lambing using exogenous progesterone and the ram effect. *J. Anim. Sci.* 70, 2628–2635.
- Wildeus S., (1999). Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goat . *Proc Am Soc Anim Sci.* Available at: <http://www.asas.org/symposia/9899proc/0016.pdf>.
- Wiltbank M.C., Niswender G.D., (1992). Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*; 28, 103-110.
- Xie S., Green J.A., Bao B., Beckers J.F., Valdez K.E., Hakami L., Roberts R.M., (1997). Multiple pregnancy-associated glycoproteins are secreted by day 100 ovine placental tissue. *Biol Reprod*; 57:1384–93.
- Xie S., Green J., Beckers J.F., Roberts R.M., (1995). The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene*; 159:193-197.
- Xie S., Nagel R.E., Green J., Beckers J., Roberts R.M., (1996). Trophoblast-specific processing and phosphorylation of pregnancy-associated glycoprotein-1 in day 15 to 25 sheep placenta. *Biol Reprod*; 54:112- 119.
- Xie S., Low B.G., Kramer K.K., Nagel R.J., Anthony R.V., Zoli A.P., Beckers J.F., Roberts R.M., (1991). Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:10247-10251.
- Yeates N.J.M., (1949). The breeding season of sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *J Agric Sci* 39:1–43.
- Zoli AP, Beckers JF, Ectors E, (1990). Isolation of an ovine pregnancy-specific protein. *Theriogenology*; 33:66. (Abstract).
- Zoli A.P., Beckers J.F., Wouters-Ballman P., Closset J., Falmagne P., Ectors E., (1991). Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod*; 45:1-10.
- Zoli A., Guilbaut L., Delahaut P.H., Benitez-Ortiz W., Beckers J.F., (1992). Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.* 46, 83–92.

Λιαδικτιακές τοποθεσίες:

<http://www.courseweb.uottawa.ca/medicine-histology/English/Reproduction/female/>

http://www.cswri.res.in/divisions_physiology_biochemistry.asp

<http://www.pethealth.gr/pdfs/product>

<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Melatonin>

[http://www.rbej.com/content/Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models](http://www.rbej.com/content/Regulation_of_ovulation_rate_in_mammals:_contribution_of_sheep_genetic_models), Fabre S. et al.

[http://www.rbmojournal.com/article/Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries](http://www.rbmojournal.com/article/Ovarian_function_6_years_after_cryopreservation_and_transplantation_of_whole_sheep_ovaries), Arav A. et al.

[http://www.reproduction-online.org/content/X-linked inhibitor of apoptosis protein and active caspase-3 expression patterns in antral follicles in the sheep ovary](http://www.reproduction-online.org/content/X-linked_inhibitor_of_apoptosis_protein_and_active_caspase-3_expression_patterns_in_antral_follicles_in_the_sheep_ovary), Phillipps H.R. et al.

[http://www.sbri.fr/files/publications/Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols](http://www.sbri.fr/files/publications/Cryopreservation_of_the_ovary_by_vitrification_as_an_alternative_to_slow-cooling_protocols), Courbiere B. et al.

[http://www.sciencedirect.com/science/article/Ultrasound in Medicine & Biology](http://www.sciencedirect.com/science/article/Ultrasound_in_Medicine_&_Biology) Sboros V. et al.

[http://www.sciencedirect.com/science/article/In vitro growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue](http://www.sciencedirect.com/science/article/In_vitro_growth_of_human_primordial_follicles_from_frozen-banked_ovarian_tissue), Picton H.M. and Gosden R.G.