



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ &
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**



**ΘΕΜΑ: «Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΨΗΛΩΝ ΔΟΣΕΩΝ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε ΚΑΙ
ΣΕΛΗΝΙΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΕΜΒΟΛΙΑΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΓΕΛΛΩΝ
ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ: ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΕΛΟ ΕΚΤΡΟΦΗΣ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ».**



**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: Μαρία Παπαπέτρου
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δρ Αριστοτέλης.Γ.Λυμπερόπουλος**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2015

Αφιερώνω στους γονείς μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία έγινε στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας της φοιτήτριας Μαρίας Παπαπέτρου και το πειραματικό μέρος εκπονήθηκε στο αγρόκτημα του Α.Τ.Ε.Ι.Θ.

Το 1^ο μέρος της εργασίας περιλαμβάνει τα εξής κεφάλαια : i) Αναπαραγωγικό σύστημα βοοειδών, ii) Επίδραση της βιταμίνης Ε και του σεληνίου στο αναπαραγωγικό σύστημα της αγελάδας, iii) Συγχρονισμός οίστρων αγελάδας, iv) Τεχνητή σπερματέγχυση, v) Διάγνωση εγκυμοσύνης.

Στο 2^ο μέρος της εργασίας αναφέρονται οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειραματισμού, τα αποτελέσματα, η συζήτηση, τα συμπεράσματα της εργασίας, καθώς και η βιβλιογραφία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καλογιάννη Δημήτριο από το Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη βοήθειά του στον προσδιορισμό της προγεστερόνης στα δείγματα της εργασίας μου και τις πληροφορίες που μου παρείχε σχετικά με την εργασία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Τσιώκα από την εταιρία Μαντζαβέλας Α.Ε. για την προσφορά των πλακών ELIZA με σκοπό τον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών στα δείγματα γάλακτος του πειραματισμού.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής μου κ. Λυμπερόπουλο Αριστοτέλη για τη βοήθειά του και τη συμπαράστασή που μου παρείχε κατά τη σύνταξη και τη συγγραφή της πτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΑ	ΣΕΛΙΔΑ
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
Α΄ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο <i>Αναπαραγωγικό σύστημα βοοειδών</i>	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο <i>Επίδραση της Βιταμίνης E και Σεληνίου στο αναπαραγωγικό σύστημα της αγελάδας.</i>	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο <i>Συγχρονισμός οίστρων αγελάδας.</i>	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο <i>Εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης στις αγελάδες.</i>	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο Διάγνωση εγκυμοσύνης στις αγελάδες	24
A) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ	24
1. Η προγεστερόνη	24
2. Η πρόωμη διάγνωση της εγκυμοσύνης	24
3. Η χρήση του προσδιορισμού της προγεστερόνης στο γάλα για τον χαρακτηρισμό της αγωνιμότητας στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες.	25
4. Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης για την παρακολούθηση της ωοθηκικής δραστηριότητας	26
B) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ	
1. Γλυκοπρωτεΐνες	28
2. Η συγκέντρωση των PAG κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στις αγελάδες	29
3. Η εφαρμογή της ανίχνευσης των PAGs στην πρόωμη διάγνωση της εγκυμοσύνης	29
Γ) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΟΥ	
1. Βασικές αρχές της υπερηχογραφίας	31
2. Εγκυμοσύνη – λοχεία	32
3. Διάγνωση της εγκυμοσύνης	33
<i>Σκοπός της εργασίας.</i>	35

Β' ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

<i>Ζωικό κεφάλαιο</i>	37
<i>Διατροφή</i>	37
<i>Συγχρονισμός οίστρων</i>	37
<i>Τεχνητή σπερματέγχυση</i>	37
<i>Συλλογή δειγμάτων γάλακτος</i>	38
<i>Προσδιορισμός της προγεστερόνης (P4) στο γάλα</i>	38
<i>Προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών (PAG) στο γάλα</i>	39
<i>Διάγνωση εγκυμοσύνης με τη χρήση του υπερηχογράφου</i>	39

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

<i>Χορήγηση υψηλών δόσεων E-Selen+βιταμίνης A.</i>	40
<i>Προσδιορισμός της προγεστερόνης (P4) στο γάλα</i>	40
<i>Προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών (PAG) στο γάλα</i>	40
<i>Διάγνωση εγκυμοσύνης με τη χρήση του υπερηχογράφου</i>	40

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
-----------------	----

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	43
---------------------	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44
---------------------	----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των υψηλών δόσεων βιταμινών A, E και σεληνίου στη γονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Για τις ανάγκες του πειραματισμού χρησιμοποιήθηκαν 6 αγελάδες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης φυλής Holstein. Τα ζώα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες την ομάδα A και την ομάδα B και η κάθε ομάδα περιελάμβανε από 3 ζώα αντίστοιχα. Στα ζώα της ομάδας A χορηγήθηκαν per os 500 ml Ovulink και στα ζώα της ομάδας B χορηγήθηκαν ενδομυϊκά 15 ml E-Selen+βιταμίνης A. Στα ζώα και των δυο ομάδων χορηγήθηκαν ενδομυϊκά 2 ml προσταγλανδίνης και μετά από 10 ημέρες χορηγήθηκαν άλλα 2 ml. Στις 48, 72 και 96 ώρες μετά τη χορήγηση της δεύτερης δόσης προσταγλανδίνης έγινε έλεγχος του οίστρου 3 φορές την ημέρα στις 8 π.μ., 12 π.μ. και στις 6 μ.μ. Στα ζώα που εκδήλωναν ασφαλή συμπτώματα οίστρου εφαρμόζονταν τεχνητή σπερματέγχυση το τρίτο βωρο από την έναρξη του οίστρου. Κατά την πρωινή αρμεγή την ημέρα εφαρμογής της τεχνητής σπερματέγχυσης και 19 ημέρες αργότερα γινόταν συλλογή δειγμάτων γάλακτος σε φιαλίδια των 6 ml. για τον προσδιορισμό της προγεστερόνης. Επίσης, την 28^η ημέρα μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης συλλέχθηκαν κατά την πρωινή αρμεγή δείγματα γάλακτος σε φιαλίδια των 6 ml. για τον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών. Για τον προσδιορισμό της προγεστερόνης στο γάλα χρησιμοποιήθηκε η ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) στερεάς φάσης. Για τον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυματική μέθοδος (ELISA). Οι αγελάδες ελέγχθηκαν 55-60 ημέρες μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης με τη βοήθεια υπερηχογράφου για επιβεβαίωση της εγκυμοσύνης. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η εκδήλωση των συμπτωμάτων του οίστρου καθώς και τα ποσοστά σύλληψης ήταν βελτιωμένα και στις δυο ομάδες. Σε 2 ζώα στην ομάδα A και 2 ζώα στην ομάδα B η συγκέντρωση προγεστερόνης στο γάλα την 19^η ημέρα κυμάνθηκε από 8 ng/ml έως 20 ng/ml τιμές που αποδεικνύουν ότι τα ζώα ήταν έγκυα. Σε ότι αφορά στον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών. Σε 2 ζώα στην ομάδα A και 2 ζώα στην ομάδα B η οπτική πυκνότητα ήταν $\geq 0,250$ γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα συγκεκριμένα ζώα είχαν υψηλή συγκέντρωση γλυκοπρωτεϊνών επομένως ήταν έγκυα. Στα υπόλοιπα ζώα η οπτική πυκνότητα στο γάλα ήταν $< 0,100$ που επιβεβαιώνει ότι τα συγκεκριμένα ζώα

είχαν χαμηλή συγκέντρωση γλυκοπρωτεϊνών επομένως δεν ήταν έγκυα. Η εγκυμοσύνη στα ζώα και των δυο ομάδων επιβεβαιώθηκε με τη χρήση υπερηχογράφου 55 ημέρες μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας μας δείχνουν ότι α) η χορήγηση υψηλών δόσεων E-Selen+βιταμίνης A μπορεί να βελτιώσει τα ποσοστά σύλληψης των αγελάδων, β) ο προσδιορισμός της προγεστερόνης ή των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα σε συνδυασμό με τη χρήση του υπερηχογράφου μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την αναπαραγωγική διαχείριση των αγελαδοτροφικών εκμεταλλεύσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΒΟΟΕΙΔΩΝ

Το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών βοοειδών αποτελείται από τα έσω και τα έξω γεννητικά όργανα. Τα πρώτα αποτελούνται από τις ωοθήκες, τους ωαγωγούς, τη μήτρα, τον κόλπο (ή κολεό), τον πρόδρομο του κόλπου και το αιδούο και την κλειτορίδα.

Εξυπηρετεί μια σειρά από λειτουργίες οι οποίες είναι: η παραγωγή ωαρίων, η υποδοχή σπέρματος, η μεταφορά των σπερματοζωαρίων στον ωαγωγό, η γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο, η μετακίνηση και η εγκατάσταση του γονιμοποιημένου ωαρίου στη μήτρα, η ανάπτυξη του εμβρύου και η εξώθηση του κατά τον τοκετό και η εξασφάλιση του κατάλληλου περιβάλλοντος για το έμβρυο.

Αναλυτικότερα οι ωοθήκες είναι δύο, μία αριστερή και μία δεξιά. Βρίσκονται στην υποσφυϊκή χώρα της κοιλιακής κοιλότητας κοντά στην είσοδο της πυελικής κοιλότητας. Έχουν στρογγυλό ή ωοειδές – αποπεπλατυσμένο σχήμα, με ανώμαλη επιφάνεια εξαιτίας της παρουσίας των ωοθυλακίων και των ωχρών σωματίων. Έχουν βάρος 15-20 γρ. περίπου και διαστάσεις 3,5x2x1,5 εκ. Εμφανίζουν δύο πόλους, δύο χείλη και δύο επιφάνειες. Ο ένας πόλος ονομάζεται και σαλπγγικό άκρο, συνδέεται με τον κώδωνα του ωαγωγού, ενώ ο άλλος ονομάζεται μητριαίο άκρο και συνδέεται με το κέρασ της μήτρας μέσω του ιδιαίτερου συνδέσμου της ωοθήκης με την κορυφή του σύστοιχου μητριαίου κέρατος. Τα χείλη ονομάζονται μεσωθηκικό στο οποίο προσφύεται το μεσωθηκίο, κρέμεται δηλαδή η ωοθήκη και το άλλο χείλος είναι ελεύθερο. Οι επιφάνειες χαρακτηρίζονται έσω και έξω. Η επιφάνειά τους είναι ανώμαλη διότι περιέχει ωχρά σωματία 1-2 και ωοθυλάκια. Το κάθε ωοθυλάκιο περιέχει στο εσωτερικό του ένα ωοκύτταρο. Τα ωοθυλάκια διακρίνονται σε άωρα και ώριμα. Τα άωρα χωρίζονται σε αρχέγονα όπου βρίσκονται στην περιφέρεια της φλοιώδους ουσίας των ωοθηκών, σε πρωτογενή ωοθυλάκια που προκύπτουν από την ενεργοποίηση του αρχέγονου ωοθυλακίου και σε δευτερογενή ωοθυλάκια που προκύπτουν από την εξέλιξη πολλών πρωτογενών ωοθυλακίων. Τα ώριμα ωοθυλάκια προκύπτουν από την εξέλιξη ενός ή περισσότερων δευτερογενών ωοθυλακίων και

αποτελούνται από τη θήκη, του κοκκώδη υμένα και την κοιλότητα ή το άντρο του ωοθυλακίου που περιέχει το ωοθυλακικό υγρό. Το ωοθυλακικό υγρό περιέχει ουσίες που προέρχονται από το πλάσμα του αίματος ή παράγονται και μεταβολίζονται μέσα σε αυτό, όπως πρωτεΐνες, ηλεκτρολύτες, διάφορες ορμόνες και διάφορα ένζυμα.

Οι ωαγωγοί ή σάλπιγγες είναι δύο μυώδεις σωλήνες, ένας αριστερός και ένας δεξιός που συνδέουν τις ωοθήκες με τα σύστοιχα κέρατα της μήτρας. Ο κάθε ωαγωγός παρουσιάζει ένα πρόσθιο ή αλλιώς κοιλιακό στόμιο, που εκβάλλει στην περιτοναϊκή κοιλότητα και ένα οπίσθιο ή αλλιώς μητριαίο στόμιο που οδηγεί στην μήτρα. Αποτελείται από τρεις μοίρες από εμπρός προς τα πίσω, τον κώδωνα, τη λήκυθο και τον ισθμό. Ο κώδωνας έχει σχήμα χωνιού που προς τα πίσω συνεχίζει με τη λήκυθο, ενώ προς τα εμπρός στρέφει το ελεύθερο στόμιο του προς την ωοθήκη. Το χείλος του ελεύθερου στομίου σχίζεται σε άνισους κροσσούς, από τους οποίους ένας ιδιαίτερα μεγάλος προσφύεται στην ωοθήκη και ονομάζεται ωοθηκικός κροσσός. Η λήκυθος είναι ελικοειδής και μυώδης σωλήνας και αποτελεί το ενδιάμεσο τμήμα και ο ισθμός αποτελεί το στενότερο τμήμα του ωαγωγού που εκβάλλει σε μία σκληρή θηλή του ελεύθερου άκρου του σύστοιχου μητριαίου κέρατος. Οι λειτουργίες του ωαγωγού είναι η συμμετοχή στην μεταφορά των σπερματοζωαρίων, η γονιμοποίηση του ωαρίου με το σπερματοζωάριο που επιτυγχάνεται στη λήκυθο, εξασφαλίζει ιδανικό περιβάλλον για τους γαμέτες και την πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου και σε αυτόν παραμένει το γονιμοποιημένο ωάριο για 3 ημέρες και μετά μεταφέρεται στην μήτρα.

Η μήτρα είναι ένα κοίλο και μυώδες όργανο που χρησιμεύει για την εγκατάσταση, ανάπτυξη και απότξη του εμβρύου. Αποτελείται από το σώμα που προς τα εμπρός διαιρείται σε δύο μακρά κέρατα, ενώ προς τα πίσω στενεύει και σχηματίζει τον τράχηλο. Ο τράχηλος ή αυχέννας της μήτρας είναι επιμήκης σκληρός, μυώδης σφιγκτήρας με στενό αυλό που ονομάζεται αυχενικός σωλήνας και έχει μήκος 5–10 εκ. Αποτελείται από ένα μητριαίο μέρος που αποτελεί τη συνέχεια της μήτρας και το κοιλικό μέρος, που προβάλλει μέσα στον κόλπο. Στην αγελάδα στον τραχηλικό αυλό υπάρχουν 3-4 εγκάρσιες πτυχές του βλεννογόνου (δακτύλιοι Burdi) των οποίων σκοπός είναι να διατηρούν το εσωτερικό της μήτρας σφραγισμένο και να προστατεύουν από μολύνσεις. Επιπλέον, ο τράχηλος της μήτρας περιέχει και μία βλέννα, την τραχηλική βλέννα που αποτελείται από μακρομόρια βλέννης επιθηλιακής προέλευσης και τα οποία στη σύνθεση τους περιλαμβάνουν γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν 25% αμινοξέα και 75% υδατάνθρακες (γαλακτόζη, γλυκοσαμίνη, σιαλικό

οξύ, φουκόζη). Οι πρωτεΐνες τις οποίες περιλαμβάνει η τραχηλική βλέννα είναι προαλβουμίνη, λιποπρωτεΐνες, αλβουμίνη, β- και γ-σφαιρίνες. Επίσης, η τραχηλική βλέννα περιέχει ένζυμα (γλυκορονιδάση, αμυλάση, φωσφορυλάση, εστεράση και φωσφατάσες) (Μάγρας και Αντωνόπουλος, 2003).

Η έκκριση της τραχηλικής βλέννας διεγείρεται από την έκκριση των οιστρογόνων και αναστέλλεται από την προγεστερόνη.

Το σώμα της μήτρας στην αγελάδα έχει μήκος 35- 40 εκ. Τα κέρατα της μήτρας είναι δύο μυώδεις σωλήνες και έχουν ελικοειδές σχήμα. Η λειτουργία της μήτρας είναι να διευκολύνει τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων, λόγω των συσπάσεων της και της έκκρισης της τραχηλικής βλέννας, προκαλεί ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων κατά τη μεταφορά τους στον ωαγωγό διαμέσου του αυλού της μήτρας, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας του ωχρού σωματίου, εξασφαλίζει τις κατάλληλες συνθήκες για την φυσιολογική ανάπτυξη και την προστασία του εμβρύου κατά τη διάρκεια της κυοφορίας και διαθέτει τους κατάλληλους μηχανισμούς για την εξώθηση του εμβρύου κατά τον τοκετό. Επίσης παράγει ή συμμετέχει στην παραγωγή ουσιών που έχουν σχέση με την λύση του ωχρού σωματίου. Μια τέτοια ουσία είναι και η προσταγλανδίνη (PGF_{2α}) η οποία όταν χορηγηθεί στην αγελάδα προκαλεί παλινδρόμηση και λύση του ωχρού σωματίου και μείωση των επιπέδων της προγεστερόνης.

Ο κόλπος είναι ένας ινομυώδης διασταλτός σωλήνας με λεπτά τοιχώματα, που τοποθετείται μεταξύ ουροδόχου κύστης και απευθυσμένου. Παρουσιάζει ένα ραχιαίο και ένα κοιλιακό τοίχωμα που εφάπτονται μεταξύ τους. Στο πρόσθιο μέρος δέχεται το κολπικό τμήμα του τραχήλου της μήτρας και στο οπίσθιο τμήμα του συνεχίζεται με το πρόδρομο του κόλπου και αυτός με το αιδόιο.

Ο πρόδρομος του κολεού παρουσιάζει δύο πλάγια τοιχώματα που εφάπτονται μεταξύ τους. Περιέχει αγγεία, νεύρα και αδένες οι οποίοι παράγουν βλενωδές έκκριμα κατά τη διάρκεια του οίστρου. Επίσης, ο μυϊκός του χιτώνας σχηματίζει το σφιγκτήρα μν του πρόδρομου του κολεού.

Το αιδόιο είναι το έξω γεννητικό όργανο του θηλυκού. Αποτελείται από δύο χείλη που ανάμεσά τους σχηματίζεται η αιδοϊκή σχισμή με μια άνω και μια κάτω γωνία.

Η κλειτορίδα είναι υποτυπώδες όργανο ομόλογο του πέους του αρσενικού. Τοποθετείται στο εσωτερικό της κάτω γωνίας της αιδοϊκής σχισμής. Απαρτίζεται από το σώμα και δύο σκέλη και τη βάλανο της κλειτορίδας που είναι ελεύθερη. Η

βάλανος της κλειτορίδας υποκαθίσταται από μία μεμβράνη συνδετικού ιστού, που καλύπτεται ατελώς από μία πτυχή, την ακροποσθία της κλειτορίδας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΕΛΗΝΙΟΥ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΑΓΕΛΑΔΑΣ

Η βιταμίνη Ε είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των κυτταρικών μεμβρανών, στην ανοσία και στην αναπαραγωγή του ζώου (NRC, 2001). Η πιο κοινή μορφή της που βρίσκεται μέσα στις ζωοτροφές είναι η α-τοκοφερόλη. Αντιθέτως, η βιταμίνη Α, πιστεύεται ότι δεν αποδομείται από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών.

Ο συνιστώμενος αριθμός των συμπληρωμάτων βιταμίνης Ε είναι 1,6 IU (διεθνείς μονάδες) για τις έγκυες αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και 0,8 IU (διεθνείς μονάδες για τις θηλάζουσες αγελάδες. Μία αγελάδα 650 kg καταναλώνει καθημερινά 1000 IU ενώ μία πρωτόγεννη αγελάδα μετά τον τοκετό καταναλώνει 500 IU (Dairy NRC, 2001). Οι αγελάδες που τρέφονται με νωπές χονδροειδείς τροφές χρειάζονται λιγότερα συμπληρώματα βιταμίνης Ε. Σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις της ρετινόλης στο πλάσμα του αίματος, η συγκέντρωση στο πλάσμα της α-τοκοφερόλης αντανακλά με την πρόσληψη της βιταμίνης Ε.

Με βάση τη βελτιστοποίηση της λειτουργίας των ουδετερόφιλων και την ελαχιστοποίηση των κλινικών μαστίτιδων, η ελάχιστη αποδεκτή συγκέντρωση της α-τοκοφερόλης στο πλάσμα του αίματος για την γαλακτοπαραγωγό αγελάδα μέσα σε μια ημέρα ή δύο ημέρες μετά τον τοκετό είναι 3 με 3,5 μg/ml (Weiss, 1998).

Οι αγελάδες σε μεταγενέστερα στάδια του θηλασμού μπορεί να έχουν ελάχιστη συγκέντρωση, καθώς υφίστανται λιγότερη καταπόνηση του ανοσοποιητικού τους συστήματος.

Σε μια αγελάδα η αναλογία της α-τοκοφερόλης ως προς τη χοληστερόλη στο αίμα μπορεί να είναι ένας ο καλύτερος δείκτης της κατάστασης της βιταμίνης Ε, διότι η α-τοκοφερόλη μεταφέρεται από τις λιποπρωτεΐνες.

Ο αυξημένος εφοδιασμός των κυτταρικών μεμβρανών με βιταμίνης Ε μπορεί να βελτιώσει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος προστατεύοντας τα ουδετερόφιλα από την επίδραση της οξειδωτικής καταπόνησης τους.

Έχει παρατηρηθεί ότι η λειτουργία των ουδετερόφιλων στο αίμα βελτιώθηκε όταν στις αγελάδες χορηγήθηκαν 1) 500 IU διεθνείς μονάδες/ημέρα για 30 ημέρες μετά τον τοκετό σε σύγκριση με εκείνες στις οποίες δεν είχε χορηγηθεί βιταμίνη E, 2) 3000 IU διεθνείς μονάδες/ημέρα από την 8^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης έως και την 4^η εβδομάδα μετά τον τοκετό, 3) 3000 IU διεθνείς μονάδες/ημέρα από την 4^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης έως και την 8^η εβδομάδα μετά τον τοκετό και με την ενδομυϊκή χορήγηση 5000 IU διεθνείς μονάδες 1 εβδομάδα πριν τον τοκετό και 4) ενδομυϊκή χορήγηση 3000 IU διεθνείς μονάδες 10 και 5 μέρες πριν τον αναμενόμενο τοκετό (Weiss, 1998).

Σε αγελάδες και μοσχίδες στις οποίες χορηγήθηκαν 1000 IU βιταμίνης E/ημέρα 6 εβδομάδες πριν τον τοκετό εκδήλωσαν συμπτώματα οίστρου σε μικρότερο χρονικό διάστημα μετά τον τοκετό (την 42^η ημέρα έναντι 62^η ημέρα), η πρώτη τεχνητή σπερματέγχυση μετά τον τοκετό εφαρμόστηκε νωρίτερα (62^η ημέρα έναντι 72^η ημέρα) σε σύγκριση με εκείνες στις οποίες δεν χορηγήθηκε βιταμίνη E (Campbell και Miller, 1998).

Η χορήγηση 1000-2000 IU βιταμίνης E/ημέρα 2 εβδομάδες πριν τον τοκετό και 1 εβδομάδα μετά τον τοκετό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ημερών μεταξύ τοκετού και σύλληψης (84 έναντι 111 ημέρες), καθώς και τον αριθμό των σπερματεγχύσεων ανά σύλληψη (1,3 έναντι 2,2) (Baldi και συν., 2000). Στις μοσχίδες κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά σύλληψης και της συγκέντρωσης της α-τοκοφερόλης στον ορό του αίματος παρουσίασαν θετική συσχέτιση. Τα ποσοστά σύλληψης δεν βελτιώνονταν όταν η συγκέντρωση της α-τοκοφερόλης υπερέβαινε τα 3 ug/ml (Laflamme και Hidioglou, 1991).

Περίπου 1 με 2% του οξυγόνου που προκύπτει από το μεταβολισμό μετατρέπεται σε είδη επαναδραστηριοποίησης του οξυγόνου (Fulbert και Cals, 1992) και υπάρχουν διάφορα ενζυμικά συστήματα στο κύτταρα και στο εξωκυτταρικό υγρό για να απομακρύνουν αυτά τα μόρια. Τα αντιοξειδωτικά συστήματα περιλαμβάνουν μόρια όπως είναι τα β-καροτένια και η βιταμίνη E, τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μπορούν να προστατεύουν τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών από την επίδραση είτε της οξείδωσης ή της μεμβράνης για να διατηρηθεί η ακεραιότητα έναντι της οξειδωτικής βλάβης και της υπεροξειδωσίας (Dargel, 1992, Di Mascio και συν., 1991). Επίσης, υπάρχουν διάφορα ένζυμα τα οποία αφαιρούν τις ελεύθερες ρίζες.

Μεταξύ αυτών, είναι η γλουταθειόνη υπεροξειδάση η οποία είναι ένα ένζυμο το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωση του σεληνίου η οποία χρησιμοποιεί τα ηλεκτρόνια από τη γλουταθειόνη και από άλλες θειόλες για να μετατρέψει τα υπεροξειδία σε νερό (Flohé και Günzler, 1976). Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να καταβάλλει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας με αποτέλεσμα να διακινδυνεύεται η κυτταρική λειτουργία (Dargel, 1992, Freeman και Crapo, 1982).

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών θα μπορούσε να αποτελέσει μία αιτία αγονιμότητας, διότι ο στερεοειδογενής ιστός των ωοθηκών (Carlson και συν., 1993, Margolin και συν., 1990), τα σπερματοζώαρια (Aitken , 1994) και τα υπό εγκατάσταση έμβρυα (Fujitani και συν., 1997) είναι ευαίσθητα στις βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες.

Η χορήγηση της βιταμίνης E σε συνδυασμό με σελήνιο την 30^η ημέρα μετά τον τοκετό έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη γονιμότητα των αγελάδων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης που δεν ήταν υπό την επίδραση θερμικής καταπόνησης. Ειδικότερα, η χορήγηση της βιταμίνης E και του σεληνίου αύξησε τη γονιμότητα των αγελάδων στις οποίες είχαν εφαρμοσθεί 2 ή και περισσότερες σπερματεγχύσεις για την επίτευξη της εγκυμοσύνης (Arechiga και συν., 1998). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι ακόμη και η χορήγηση μιας δόσης βιταμίνης E και σεληνίου αύξησε τη γονιμότητα (Arechiga και συν., 1994). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στην καλή κατάσταση που βρίσκεται η μήτρα λόγω της μειωμένης συχνότητας εμφάνισης της κατακράτησης των εμβρυικών υμένων.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η χορήγηση σεληνίου και βιταμίνης E πριν τον τοκετό μείωσε την πιθανότητα εμφάνισης μηρίτιδας στις αγελάδες (Harrison και συν., 1986). Επίσης, η χορήγηση βιταμίνης E και σεληνίου έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα ποσοστά σύλληψης στις αγελάδες (Segerson και συν., 1977) και στις προβατίνες (Segerson και συν., 1981).

Η αποτελεσματικότητα της χορήγησης σεληνίου-βιταμίνη E με σκοπό τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης της κατακράτησης του πλακούντα στις αγελάδες αρχικά αναφέρθηκε από τον Trinder και συν. (1969) και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και από άλλους ερευνητές (Julien και συν., 1976, Segerson και συν., 1981).

Η χορήγηση σεληνίου και βιταμίνης E σε αγελάδες που διατρέφονται με αποξηραμένες χονδροειδείς τροφές έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητη για να

αποφεύγετε σε αυτά τα ζώα η περίπτωση εμφάνισης κατακράτησης των εμβρυικών υμένων. Επίσης, η χορήγηση σεληνίου στα τελευταία στάδια του τοκετού ήταν αποτελεσματική στη μείωση της εμφάνισης περιπτώσεων μητρίτιδας και ωθηκικών κύστεων στη περίοδο μετά τον τοκετό (Harrison και συν., 1984).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΟΙΣΤΡΩΝ ΑΓΕΛΑΔΩΝ

Οίστρος ονομάζεται το χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου που τα ζώα εκδηλώνουν επιθυμία σύζευξης με το αντίθετο φύλο και έχουν τη δυνατότητα γονιμοποίησης. Ανάλογα με τον τρόπο εμφάνισης του οιστρικού κύκλου τα ζώα διαιρούνται σε μονοκυκλικά: εμφανίζουν οίστρο μια φορά το χρόνο, πολυκυκλικά: εμφανίζουν συχνούς παροδικούς οιστρικούς κύκλους σ' όλη τη διάρκεια του έτους και εποχικά πολυκυκλικά: όπου εμφανίζουν περιοδικούς οιστρικούς κύκλους σε ορισμένες μόνο εποχές του έτους. Η αγελάδα ανήκει στα πολυκυκλικά ζώα και στην οποία ο οιστρικός κύκλος διαρκεί 20-22 ημέρες και ο οίστρος 18-24 ώρες.

Μέθοδοι συγχρονισμού οίστρου

Ορμονικοί μέθοδοι

- Τεχνητή πρόκληση του οίστρου με τη χρήση προσταγλαδίνης:

Γίνεται ενδομυϊκή χορήγηση 25 mg PGF_{2α} μετά την 4^η ή 5^η ημέρα και μέχρι την 16^η ημέρα του οιστρικού κύκλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση του οίστρου 48-72 ώρες μετά την έγχυση της PGF_{2α}.

Εκτός από την παραπάνω μέθοδο μπορεί η χορήγηση της προσταγλαδίνης PGF_{2α} να συνδυασθεί με ανάλογες γοναδοτρόπες ορμόνες (GnRH). Ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου περιλαμβάνει τη χορήγηση της GnRH δυο φορές και μια απλή χορήγηση PGF_{2α}. Η πρώτη χορήγηση της GnRH γίνεται τυχαία ανεξάρτητα με το σε ποιο στάδιο του οιστρικού κύκλου βρίσκεται η αγελάδα (προκαλεί είτε ωοθυλακιόρρηξια ή τη δημιουργία του ωχρού σωματίου). Ακολουθεί η χορήγηση της PGF_{2α} 7 ημέρες μετά, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου ή τη δημιουργία του ωχρού σωματίου. Μετά από 48 ώρες χορηγούμε πάλι GnRH με σκοπό τη ρήξη νέου ωοθυλακίου, 17-24 ώρες μετά τη χορήγηση της.

- Τεχνητή διακοπή ωχρινικής φάσης

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χορηγούνται προσταγλανδίνες στο στάδιο της ωχρινικής φάσης με αποτέλεσμα τη λύση του ωχρού σωματίου, τη διακοπή

παραγωγής προγεστερόνης, την ενεργοποίηση των ωοθηκών και την εκδήλωση οίστρου και την πρόκληση της ρήξης του ωοθυλακίου.

- Χρησιμοποίηση ενδοκολπικών σπειραμάτων

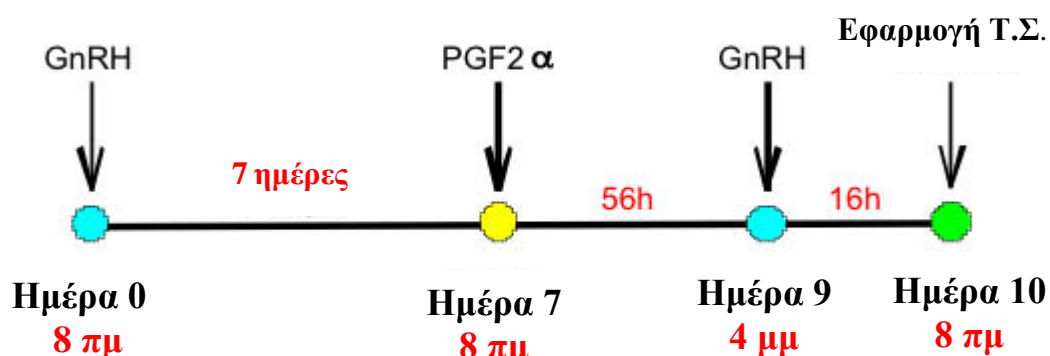
Παραμένουν στο ζώο 12 ημέρες, αφαιρούνται την 12^η ημέρα και την ίδια μέρα χορηγείται ενδομυϊκά 750-2000 IU PMSG. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση συμπτωμάτων οίστρου 36-48 ώρες μετά την εξαγωγή των σπειραμάτων.

- Χρησιμοποίηση υποδόριων εμφυτευμάτων

Τοποθετούνται υποδόρια εμφυτεύματα τα οποία είναι εμποτισμένα με προγεσταγόνα και αφαιρούνται σε 9 ημέρες. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι διαδεδομένη.

Πρωτόκολλο Ovsynch

Είναι ένα πρωτόκολλο συγχρονισμού οίστρου των βοοειδών που έχει αναπτυχθεί, δοκιμαστεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς (Pursley και συν., 1995). Βασίζεται στη χρήση δύο ορμονών των γοναδοτρόπων ορμονών (GnRH) και της προσταγλανδίνης (PGF_{2α}). Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου είναι η ακόλουθη : α) την 0 ημέρα γίνεται χορήγηση GnRH στις 8 π.μ., β) 7 ημέρες αργότερα ακολουθεί χορήγηση PGF_{2α} στις 8 π.μ., γ) 56 ώρες μετά τη χορήγηση της PGF_{2α} (9^η ημέρα) χορηγείται GnRH στις 4μ.μ. και δ) 16 ώρες αργότερα (10^η ημέρα) στις 8 π.μ. εφαρμόζεται η τεχνητή σπερματέγχυση (σχεδ 1).

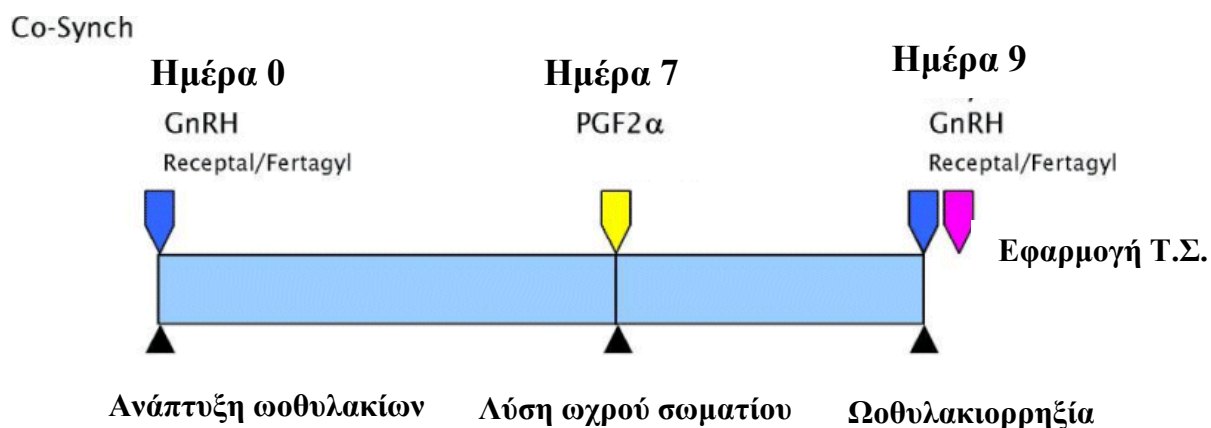


Σχεδιάγραμμα 1: Πρωτόκολλο Ovsynch συγχρονισμού οίστρων αγελάδων

Πρωτόκολλα Ονσυνχ που έχουν υποστεί μερική τροποποίηση

Πρωτόκολλο Co-synch

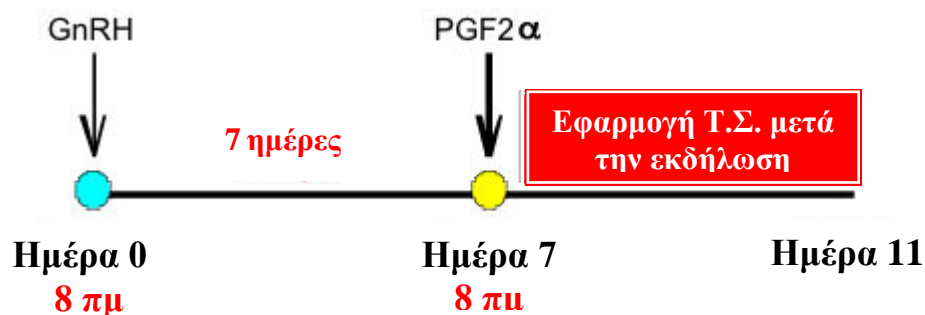
Αποτελεί πρωτόκολλο που βασίζεται στο Ονσυνχ με κάποιες τροποποιήσεις (Small και συν., 2001, DeJarnette και συν., 2001). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο εκτελείται ως εξής: α) την 0 ημέρα χορηγείται GnRH στις 8π.μ., β) την 7η ημέρα ακολουθεί χορήγηση PGF_{2α} στις 8 π.μ. και γ) την 9^η ημέρα χορηγείται πάλι GnRH και ταυτόχρονα την ίδια ημέρα εφαρμόζεται τεχνητή σπερματέγχυση στις 8 π.μ. (σχεδ. 2).



Σχεδιάγραμμα 2: Πρωτόκολλο Co-synch συγχρονισμού οίστρων αγελάδων

Πρωτόκολλο Select – synch

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιλαμβάνει: α) τη χορήγηση GnRH τη 0 ημέρα στις 8 π.μ., β) τη χορήγηση PGF_{2α} την 7^η ημέρα στις 8 π.μ. και γ) την εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης την 11^η ημέρα σε όσες αγελάδες εκδηλώσουν συμπτώματα οίστρου. Θεωρείται πιο οικονομικό από τα άλλα δυο πρωτόκολλα γιατί αποφεύγουμε τη δεύτερη χορήγηση της GnRH (σχεδ. 3).

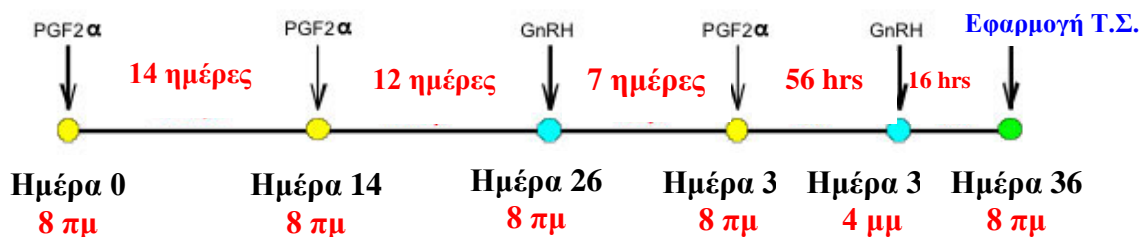


Σχεδιάγραμμα 3: Πρωτόκολλο Select–synch συγχρονισμού οίστρων αγελάδων

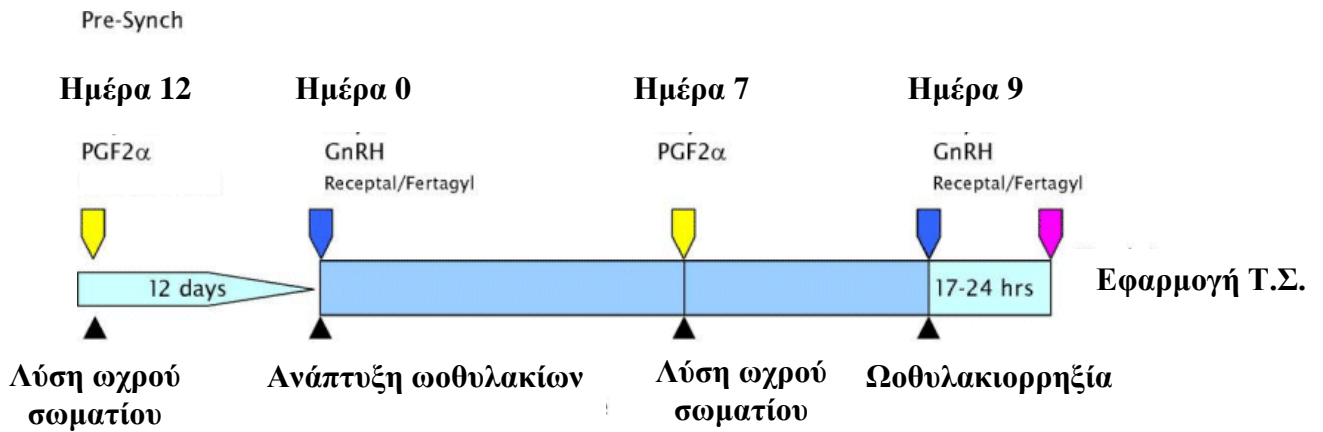
Πρωτόκολλο Pre-synch

Όπως υποδηλώνει και το όνομα του, το συγκεκριμένο πρωτόκολλο έχει ως σκοπό τον «προ-συγχρονισμό» των αγελάδων στην πρώτη φάση του οιστρικού κύκλου για βέλτιστη απόκριση στην GnRH, και με αυτόν τον τρόπο βελτιώνει τα ποσοστά σύλληψης (Moreira και συν., 2001).

Το πρωτόκολλο Pre-synch περιλαμβάνει: α) τη χορήγηση μιας δόσης PGF_{2α} (0 ημέρα), β) ακολουθεί μια δεύτερη χορήγηση PGF_{2α} μετά από 14 ημέρες, γ) 12 ημέρες μετά χορηγούμε GnRH, δ) μετά από 7 ημέρες χορηγείται πάλι PGF_{2α}, ε) ακολουθεί νέα χορήγηση GnRH, 56 ώρες μετά από τη χορήγηση της PGF_{2α} και στ) εφαρμόζεται τεχνητή σπερματέγχυση 16 ώρες μετά τη χορήγηση της GnRH (σχεδ. 4 και 5).



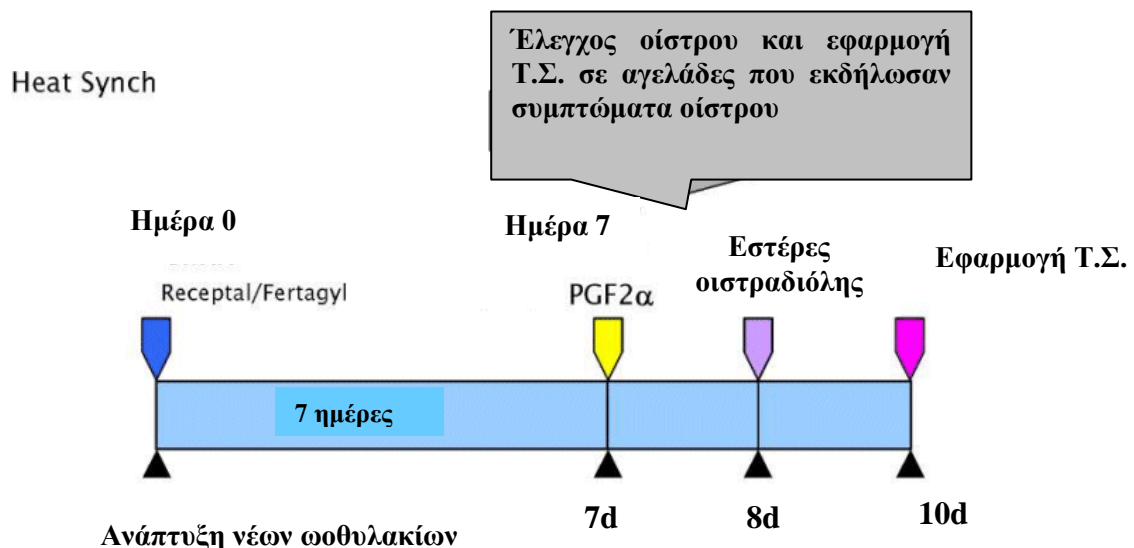
Σχεδιάγραμμα 4: Πρωτόκολλο Pre–synch συγχρονισμού οίστρων αγελάδων



Σχεδιάγραμμα 5: Πρωτόκολλο Pre-synch συγχρονισμού οίστρων αγελάδων

Πρωτόκολλο Heat- synch

Η διαφορά του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου από το βασικό πρωτόκολλο On-synch είναι ότι η δεύτερη χορήγηση της GnRH αντικαθίσταται με εστέρες οιστραδιόλης. Πιο αναλυτικά: α) την 0 ημέρα χορηγείται GnRH στις 8 π.μ., β) μετά από 7 ημέρες χορηγείται PGF_{2α} στις 8 π.μ., γ) την επομένη (8^η ημέρα) χορηγούνται εστέρες οιστραδιόλης και δ) την 10^η ημέρα εφαρμόζεται τεχνητή σπερματέγχυση. Λάτρεις του συστήματος αυτού δείχνουν ότι η οιστραδιόλη συγχρονίζει την ωοθυλακιορρηξία του κυρίαρχου ωοθυλακίου με μεγαλύτερη ακρίβεια και αυξάνει την επίδειξη της συμπεριφοράς του οίστρου σε αγελάδες που υπέστησαν τη συγκεκριμένη αγωγή (Stevenson και συν., 2004) (σχεδ. 6).



Σχεδιάγραμμα 6: Πρωτόκολλο Pre-synch συγχρονισμού οίστρων αγελάδων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΕΧΝΗΤΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗΣ ΣΤΙΣ ΑΓΕΛΑΔΕΣ

Σε όλα τα ζώα η σύζευξη έχει ως αποκλειστικό σκοπό την εναπόθεση του σπέρματος την κατάλληλη στιγμή και στο κατάλληλο σημείο, δηλαδή όταν υπάρχει ώριμο ωάριο (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Ο ταύρος είναι πάντα έτοιμος για σύζευξη (οχεία). Οι όρχεις παράγουν συνεχώς μεγάλες ποσότητες σπερματοζωαρίων. Ένας μεγάλος αριθμός από αυτά τα σπερματοζωάρια καταστρέφεται χωρίς να χρησιμοποιηθεί. (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Η προθυμία της αγελάδας για σύζευξη είναι περιορισμένης διάρκειας και εκδηλώνεται μόνο κατά τη διάρκεια του οίστρου και μάλιστα όταν υπάρχουν ικανά για γονιμοποίηση ωάρια. Η βραχεία αυτή προθυμία γίνεται εύκολα αντιληπτή από τον ταύρο (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Αντίθετα, η χρονική αυτή διάρκεια που η αγελάδα «δέχεται την επίβαση», δε γίνεται πάντα αντιληπτή από τον άνθρωπο (κτηνοτρόφο ή σπερματεγχύτη) για το λόγο αυτό θα πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένοι βιολογικοί παράγοντες και ορισμένα «συμπτώματα» του οίστρου ώστε να επιτύχουμε το άριστο αποτέλεσμα τη «γονιμοποίηση» (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Βασική προϋπόθεση για τη γονιμοποίηση αποτελεί η διαπίστωση του σταδίου του οίστρου και ο προσδιορισμός του άριστου χρόνου για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης (Τ.Σ.) (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Οι πιο κατάλληλες συνθήκες για τη γονιμοποίηση είναι να υπάρχουν γύρω από το τέλος του οίστρου και τη στιγμή της ωοθυλακιορρηξίας στη λήκυθο του ωαγωγού, ζωντανά και ικανά για γονιμοποίηση σπερματοζωάρια.

Χρονοδιάγραμμα κανονικού οίστρου

Η τεχνητή σπερματέγχυση πρέπει να γίνεται όταν η αγελάδα δέχεται την επίβαση (πρέπει να επισημάνουμε ότι η ωοθυλακιορρηξία γίνεται 6 με 12 ώρες μετά από αυτό το στάδιο) (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Με βάση το χρόνο της ωοθυλακιορρηξίας, τη διάρκεια ζωής του ωαρίου, την ταχύτητα μετακίνησης και τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων προκύπτει ότι ο άριστος χρόνος για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης πρέπει να θεωρείται το δεύτερο ήμισυ του οίστρου (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Τεχνητές σπερματεγχύσεις που γίνονται στον πρόοιστρο ή στο μέτοιιστρο καταλήγουν σε αποτυχία (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Έτσι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη :

A) Σπερματοζωάριο:

Ο χρόνος μετακίνησης και ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων στο γεννητικό σωλήνα της αγελάδας. Τα πρώτα σπερματοζωάρια φθάνουν στο ωαγωγό 2-4 λεπτά της ώρας μετά την εναπόθεση του σπέρματος, ενώ μεγάλος αριθμός από αυτά βρίσκεται μέσα σε 8 λεπτά της ώρας.

Ο χρόνος «ωρίμανσης» των σπερματοζωαρίων, ο οποίος είναι περίπου 5-6 ώρες. Όσο πλησιάζει ο χρόνος ωοθυλακιορρηξίας, τόσο πιο πολλά σπερματοζωάρια βρίσκονται στον ωαγωγό.

Η διάρκεια της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων. Γενικά, θεωρείται ότι τα σπερματοζωάρια του ταύρου είναι γόνιμα για 20-24 ώρες (για το νωπό σπέρμα) και 18 ώρες για το κατεψυγμένο σπέρμα. Αν και έχουν βρεθεί σπερματοζωάρια στον ωαγωγό 36 μέχρι 72 ώρες μετά την έγχυση του σπέρματος, αυτό όμως δε σημαίνει ότι είναι ικανά για να γονιμοποιήσουν το ωάριο (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

B) Ωάριο

Ο χρόνος ωοθυλακιορρηξίας: Η ωοθυλακιορρηξία, γίνεται 10-12 ή και 12-15 ώρες μετά από το τέλος του οίστρου.

Η διάρκεια της ικανότητας για γονιμοποίηση του ωαρίου. Η ικανότητα του ωαρίου για γονιμοποίηση φτάνει τις 4-6 ώρες (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Γενικά

Ζώα στα οποία ο οίστρος διαπιστώνεται το πρωί πρέπει να υποβάλλονται σε τεχνητή σπερματέγχυση τις πρωινές ή απογευματινές ώρες της ίδιας ημέρας.

Ζώα στα οποία ο οίστρος διαπιστώνεται το απόγευμα πρέπει να υποβάλλονται σε τεχνητή σπερματέγχυση τις πρωινές ώρες της επόμενης ημέρας.

Δεύτερη τεχνητή σπερματέγχυση στον ίδιο οίστρο πρέπει να γίνεται όταν ο οίστρος διαρκεί 36-48 ώρες ή και περισσότερο. Η δεύτερη τεχνητή σπερματέγχυση πρέπει να γίνεται 12-24 ώρες μετά την πρώτη τεχνητή σπερματέγχυση εφόσον τα ζώα εξακολουθούν να παρουσιάζουν συμπτώματα οίστρου. (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

Εκτός από τον ακριβή προσδιορισμό του χρόνου εφαρμογής της τεχνητής σπερματέγχυσης ρόλο παίζει και η ένταση των συμπτωμάτων του οίστρου. Σε περίπτωση που τα συμπτώματα είναι ασαφή και υποτονικά δεν πρέπει να γίνεται τεχνητή σπερματέγχυση (Μπελιμπασάκη και Λυμπερόπουλος, 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ ΣΤΙΣ ΑΓΕΛΑΔΕΣ

Α) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

1. Η προγεστερόνη

Το ωχρό σωματίο αναπτύσσεται στην ωοθήκη μετά τη ρήξη του ωοθυλακίου και την απελευθέρωση του ωαρίου. Στο ωχρό σωματίο παράγεται η προγεστερόνη (P4), η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Η προγεστερόνη αρχικά παράγεται από το ωχρό σωματίο στη συνέχεια εκκρίνεται στο αίμα και ακολούθως στο γάλα. Η συγκέντρωση της P4 είναι υψηλότερη στο γάλα απ' ό τι στο αίμα. Ωστόσο, είναι στενά συσχετισμένες. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο γάλα είναι ένας ακριβής τρόπος για την παρακολούθηση της ωοθηκικής δραστηριότητας και, κατά συνέπεια της αναπαραγωγικής κατάστασης μιας αγελάδας. (O'Connor M. 1974)

Σε ένα κανονικό κύκλο, τα επίπεδα της προγεστερόνης στην αγελάδα είναι σχετικά χαμηλά τόσο στο αίμα όσο και στο γάλα κατά τη διάρκεια του οίστρου. Στη συνέχεια, η προγεστερόνη αυξάνεται και στο αίμα και στο γάλα. Την 17η ή 18η ημέρα του οιστρικού κύκλου, η μείωση της προγεστερόνης είναι ένδειξη για την ανάπτυξη ενός νέου ωοθυλακίου. Αν μια αγελάδα είναι έγκυος, τα επίπεδα της προγεστερόνης δεν θα μειωθούν κατά την 17^η ή 18^η ημέρα αλλά θα διατηρηθούν σε υψηλά επίπεδα. (O'Connor M. 1974)

2. Η πρόιμη διάγνωση της εγκυμοσύνης

Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης στο γάλα εξυπηρετεί συνήθως την έγκαιρη διάγνωση της εγκυμοσύνης. Τυπικά, η προγεστερόνη στο γάλα προσδιορίζεται από την 21^η έως και την 23^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης στο γάλα των αγελάδων 20-23 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και εφόσον τα ζώα δεν έχουν εμφανίσει συμπτώματα οίστρου, είναι επωφελής. Αγελάδες που είναι έγκυες θα παρουσιάσουν υψηλά επίπεδα προγεστερόνης στο γάλα 21 ημέρες μετά την εφαρμογή της Τ.Σ., υποδεικνύοντας μια επιτυχή γονιμοποίηση. Οι

αγελάδες με χαμηλή συγκέντρωση προγεστερόνης στο γάλα υποδεικνύουν ότι το ζώο δεν είναι έγκυο και ότι βρίσκεται στο στάδιο του οίστρου. (O'Connor M. 1974)

Μια αγελάδα η οποία έχει χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης από την 19η έως την 24η ημέρα μετά την Τ.Σ. υποδηλώνει με ακρίβεια κατά 95% ότι το συγκεκριμένο ζώο δεν είναι έγκυο. Η λήψη δειγμάτων γάλακτος τη 19η ή 20η ημέρα μετά την Τ.Σ. θα βοηθήσει τον κτηνοτρόφο να παρακολουθήσει πιο προσεκτικά τα ζώα που θα παρουσιάσουν τις συγκεκριμένες ημέρες χαμηλή συγκέντρωση προγεστερόνης. (O'Connor M. 1974)

Ωστόσο, αρκετές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη έχουν αξιολογήσει τον προσδιορισμό της προγεστερόνης στο γάλα ως μια μέθοδος διάγνωσης της εγκυμοσύνης. Γενικά έχει αποδειχθεί ότι η υψηλή προγεστερόνη στις 20-24 ημέρες μετά την Τ.Σ. είναι 75% ακριβής στην επιβεβαίωση της εγκυμοσύνης. Εδώ πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι εκτός από την εγκυμοσύνη τα επίπεδα προγεστερόνης 20 με 23 ημέρες μετά την Τ.Σ. μπορεί να είναι υψηλά και σε άλλες περιπτώσεις. Τέτοια περιστατικά περιλαμβάνουν μια σοβαρή λοίμωξη της μήτρας, την παρουσία κύστεων στις ωοθήκες, τους οιστρικούς κύκλους διάρκειας 24 έως 28 ημερών και τον πρόωρο εμβρυϊκό θάνατο. (O'Connor M. 1974)

Η ημέρα της δειγματοληψίας είναι κρίσιμη. Δειγματοληψία μετά την 24^η ημέρα δεν είναι δεκτή, διότι πλέον οι αγελάδες δεν έχουν συλλάβει και αρχίζει η ανοδική τάση της έκκρισης προγεστερόνης που θα προκαλέσει ψευδώς θετική διάγνωση της εγκυμοσύνης. Επιπλέον, αν η αγελάδα γονιμοποιήθηκε όταν δεν ήταν σε οίστρο ή ήταν πλησίον του χρονικού διαστήματος έναρξης του οίστρου (ωχρινική φάση, υψηλή προγεστερόνη), η λήψη δείγματος το διάστημα από την 20^η έως την 24η ημέρα θα έδειχνε υψηλή συγκέντρωση προγεστερόνης, το ζώο όμως δεν θα ήταν έγκυο, αλλά στην κανονική ωχρινική φάση του κύκλου. (O'Connor M. 1974)

3. Η χρήση του προσδιορισμού της προγεστερόνης στο γάλα για τον χαρακτηρισμό της αγωνιμότητας στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες.

1. Βεβαιωθείτε για ύποπτους οίστρους. Αν δεν είμαστε βέβαιοι ότι μια αγελάδα είναι σε οίστρο οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιήσουμε αν πράγματι το ζώο ήταν ή δεν ήταν σε οίστρο. Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης στο γάλα μπορεί να είναι χρήσιμος για την εξακρίβωση του οίστρου εάν:

i) η αγελάδα είχε εκδηλώσει συμπτώματα οίστρου, ενώ προηγουμένως είχε διαγνωστεί έγκυος και

ii) η αγελάδα είχε εκδηλώσει συμπτώματα οίστρου , αλλά το διάστημα μεταξύ των οίστρων ήταν αρκετά μεγάλο

iii) ο κτηνοτρόφος έχει σημειώσει ότι η αγελάδα είχε εκδηλώσει συμπτώματα οίστρου βασιζόμενος μόνο στα μη ασφαλή συμπτώματα του οίστρου.

2. Αξιολόγηση της ακρίβειας του ελέγχου του οίστρου ή τον εντοπισμό σφαλμάτων κατά τον έλεγχο του οίστρου.

3. Εντοπισμός των αγελάδων που δεν έχουν συλλάβει.

4. Παρακολούθηση της ωοθηκικής δραστηριότητας μετά τον τοκετό.

5. Διαφοροποίηση των τύπων των ωοθηκικών κύστεων.

6. Αξιολογή της ανταπόκρισης του ζώου στις διάφορες ορμονικές θεραπείες.

(O'Connor M. 1974)

4. Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης για την παρακολούθηση της ωοθηκικής δραστηριότητας

Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης στο γάλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο από τους κτηνιάτρους καθώς και όσους μπορούν να κατανοήσουν τα ορμονικά πρότυπα που έχουν σχέση με τις δυσλειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος. Αυτό σημαίνει ότι συλλέγονται δείγματα γάλακτος σε καθορισμένα διαστήματα για να μπορέσουμε να έχουμε μια εικόνα της ωοθηκικής δραστηριότητας μέσω του προφίλ της προγεστερόνης. Επίσης, με τον ίδιο τρόπο μπορούμε να ανιχνεύσουμε τις αγελάδες που βρίσκονται σε άνοιστρη περίοδο και να καταγράψουμε την ανταπόκριση των ζώων σε κάποιες θεραπείες όπως είναι η χορήγηση της προσταγλανδίνης. Το εργαλείο αυτό μπορεί να μας βοηθήσει να μπορέσουμε να διαφοροποιήσουμε τις ωοθυλακικές κύστεις από τις ωχρινικές. Τέλος ο προσδιορισμός της προγεστερόνης στο γάλα μπορεί να μας φανεί χρήσιμος στην ταυτοποίηση της παρουσίας ωχρού σωματίου. Δεδομένου ότι οι προσταγλαδίνες χρησιμοποιούνται συχνότερα σε προγράμματα συγχρονισμού οίστρου για γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες και η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από την παρουσία ενός λειτουργικού ωχρού σωματίου στην ωοθήκη ο προσδιορισμός των επιπέδων προγεστερόνης στο γάλα μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για

να εξακριβώσουμε την παρουσία ή την απουσία ωχρού σωματίου. (O'Connor M. 1974).

B) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

1. Γλυκοπρωτεΐνες

Το 1991, από τις κοτυληδόνες του πλακούντα απομονώθηκε από τους Zoli και συν., μια ομάδα γλυκοπρωτεϊνών η οποία ονομάστηκε «γλυκοπρωτεΐνες που σχετίζονται με την κυοφορία των βοοειδών» (PAG), της οποίας το μοριακό βάρος ήταν 67 kDa (boPAG67kDa ή boPAG-1).

Για το προφίλ των συγκεντρώσεων των boPAG στο πλάσμα της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και την περίοδο της λοχείας χρησιμοποιήθηκε μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) (Zoli και συν., 1992β).

Οι PAG, γνωστές επίσης και με διάφορα άλλα ονόματα όπως «πρωτεΐνη Β' ειδική για την εγκυμοσύνη» (PSPB) (Butler και συν., 1982) και ως «πρωτεΐνη 60 ειδική για την εγκυμοσύνη» (PSP-60) (Mialon και συν., 1993) γενικά ανήκουν στην «ασπαρτικών πρωτεϊνών» οικογένεια που απαντώνται στον πλακούντα (Xie και συν., 1991).

Στα μηρυκαστικά η σύνθεση αυτών των πρωτεϊνών γίνεται από τα μονοκύτταρα και δικύτταρα στην εξωτερική επιθηλιακή μεμβράνη του τροφοεκτοδέρματος του πλακούντα (Zoli και συν., 1992α; Garbayo και συν., 2000; Green και συν., 2000). Τα δικύτταρα κύτταρα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στο ενδοκρινικό σύστημα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Είναι η πηγή κάποιων βασικών προϊόντων όπως είναι το λακτογόνο του πλακούντα, (Currie και συν., 1990; Wooding, 1992) και οι γλυκοπρωτεΐνες που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (Green και συν., 1998). Τα προϊόντα που παράγονται από τα δικύτταρα κύτταρα φθάνουν στον ιστό της κυοφορούσας αγελάδας και στη συνέχεια στο αίμα από την 3^η έως και την 4^η εβδομάδα μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης μέχρι και τον τοκετό (Zoli και συν., 1992β; Perenyi και συν., 2002)

Η καταγραφή αυτής της πρωτεΐνης του πλακούντα στο αίμα της κυοφορούσας αγελάδας μπορεί να αποτελέσει έναν ειδικό δείκτη για την πρώιμη διάγνωση εγκυμοσύνης στις αγελάδες από την 28^η ημέρα της εγκυμοσύνης και στο υπόλοιπο διάστημα της εγκυμοσύνης (Zoli και συν., 1992β; Szenci και συν., 1998).

Στα βοοειδή οι PAG επίσης φαίνεται να αποτελεί ένας καλός δείκτης της ζωτικότητας του εμβryo-πλακούντα (Ectors και συν., 1996) και μπορεί να είναι

χρήσιμες για την πρόβλεψη της υγείας του εμβρύου και της ανίχνευσης των πρώιμων ανωμαλιών που μπορεί να παρουσιασθούν στον πλακούντα και για τη θνησιμότητα του εμβρύου (Heyman και συν., 2002; Szenci και συν., 2003).

2. Η συγκέντρωση των PAG κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στις αγελάδες

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει μελετηθεί εκτεταμένα η συγκέντρωση των PAG κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με την πρώτη αναφορά να έχει γίνει στην εργασία των Zoli και συν., (1992). Σε αυτή την εργασία για τον προσδιορισμό των PAG χρησιμοποιήθηκε η ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) και παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση των PAG αυξανόταν συνέχεια από την 20^η ημέρα της εγκυμοσύνης μέχρι την 240^η ημέρα και στη συνέχεια ακολουθούσε μια σημαντική μείωση τις τελευταίες 10 ημέρες της εγκυμοσύνης μέχρι και 1 έως 5 ημέρες μετά τον τοκετό. Κατά την περίοδο μετά τον τοκετό (επιλόχεια περίοδος) η συγκέντρωση των PAG παρατηρήθηκε μια σταθερή μείωση με τη συγκέντρωσή τους να μην είναι ανιχνεύσιμη μετά την 100^η ημέρα μετά τον τοκετό.

3. Η εφαρμογή της ανίχνευσης των PAGs στην πρώιμη διάγνωση της εγκυμοσύνης

Τα τελευταία χρόνια ο προσδιορισμός των PAGs στο αίμα αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρώιμη διάγνωση της εγκυμοσύνης στα μηρυκαστικά. Διαφορετικοί τύποι των PAGs μπορεί να ανιχνευθούν στο αίμα χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους όπως είναι η ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) (Sousa και συν., 1999; Zoli και συν., 1992) και η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) (Friedrich και Holtz, 2010; Green και συν., 2005).

Ο προσδιορισμός των PAGs χρησιμεύει στην παρακολούθηση της εγκυμοσύνης, διότι η οποιαδήποτε διαταραχή στο έμβρυο, π.χ. θάνατος του εμβρύου, θα έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή στη λειτουργία του πλακούντα και στα προϊόντα που παράγονται από τον πλακούντα, όπως είναι οι PAGs. Στην περίπτωση που έχουμε εμβρυικό θάνατο η συγκέντρωση των PAGs θα μειωθεί απότομα και γρήγορα κάτω από τα φυσιολογικά επίπεδα που έχει μια εγκυμονούσα αγελάδα (Breukelman και συν., 2005; Ledezma-Torres και συν., 2006; Zarrouk και συν., 1999).

Οι Patel και συν., (1997) υποστηρίζουν ότι ο αριθμός των εμβρύων που κυοφορεί μια αγελάδα μπορεί να επηρεάσει τη συγκέντρωση των PAGs. Οι παραπάνω

ερευνητές σε μελέτες που πραγματοποίησαν παρατήρησαν ότι αγελάδες που κυοφορούσαν παραπάνω από ένα έμβρυο παρουσίασαν συγκέντρωση PAGs υψηλότερη από εκείνες που κυοφορούσαν ένα έμβρυο. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αποτελέσει ένα δείκτη στην περίπτωση που μια αγελάδα κυοφορεί παραπάνω από ένα έμβρυο.

Γ) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΟΥ

1. Βασικές αρχές της υπερηχογραφίας

Το σύστημα της υπερηχογραφίας αποτελείται από τον υπερηχογράφο (Scanner) και την κεφαλή (transducer ή probe). Η μονάδα παραγωγής των υπερήχων είναι οι πιεζοηλεκτρικοί κρύσταλλοι που είναι τοποθετημένοι στην κεφαλή. Βασικό χαρακτηριστικό των κρυστάλλων αυτών είναι η ιδιότητα τους να μετατρέπουν την ηλεκτρική ενέργεια σε ήχο εξαιρετικά υψηλής συχνότητας (υπερηχητικό κύμα) και αντίστροφα. Ο κρύσταλλος ανταποκρίνεται στο ηλεκτρικό ερέθισμα με διαδοχικές συστολές και διαστολές ανάλογες με τη συχνότητα του ηλεκτρικού σήματος. Η δόνηση αυτή του κρυστάλλου δημιουργεί το υπερηχητικό κύμα που μεταδίδεται προς δύο κατευθύνσεις. Η μετάδοση προς τη μία κατεύθυνση παρεμποδίζεται με τη χρήση κατάλληλου απορροφητικού υλικού. Μετά την ανάκλαση της η δέσμη των υπέρηχων που επιστρέφει στον κρύσταλλο μετατρέπεται εκ νέου σε ηλεκτρικό σήμα που μεταφέρεται στον υπερηχογράφο, όπου το σήμα ενισχύεται και προβάλλεται στην οθόνη με μορφή κουκκίδων (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998).

Η ένταση της φωτεινότητας κάθε κουκκίδας εξαρτάται από την ισχύ της ηχούς, ενώ η θέση της καθορίζεται από την απόσταση μεταξύ κεφαλής και επιφάνειας που προκάλεσε την ανάκλαση του υπερηχητικού κύματος. Η εικόνα ενός οργάνου συντίθεται από το σύνολο των κουκκίδων που περιέχουν την πληροφορία για την απόσταση και την πυκνότητα της επιφάνειας πάνω στην οποία ανακλάστηκε το υπερηχητικό κύμα. Ανάλογα με την πυκνότητα της επιφάνειας, προβάλλεται στην οθόνη σκίαση που παραλλάσει από λευκό έως μαύρο χρώμα. Τα υγρά (π.χ. ωοθυλακικό υγρό) δεν αντανακλούν την υπερηχητική δέσμη και παρουσιάζονται μαύρα, ενώ επιφάνειες μέσης (πχ παρεγχυματικά όργανα) και μεγάλης πυκνότητας (πχ οστά) παρουσιάζονται από γκρίζα έως λευκά αντίστοιχα. Η διακριτική ικανότητα ενός υπερήχου (η ικανότητα ευκρινούς αποτύπωσης δύο σχηματισμών που βρίσκονται πολύ κοντά ο ένας στον άλλο) είναι ανάλογη με τη συχνότητα του, ενώ αντίθετα, η διεισδυτική του ικανότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη. Οι συχνότητες που συνήθως χρησιμοποιούνται κυμαίνονται από 1-10 MHz, ανάλογα με τη διακριτική ή διεισδυτική ικανότητα που απαιτείται κατά περίπτωση (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998).

Ειδικότερα, για την εφαρμογή της υπερηχογραφίας στο γεννητικό σύστημα των αγελάδων θεωρείται απαραίτητη η επιλογή ενός φορητού συστήματος. Για χρήσεις που αφορούν στη διάγνωση εγκυμοσύνης και παθολογικών καταστάσεων της μήτρας και των ωοθηκών ο υπερηχογράφος θα πρέπει να συνοδεύεται από ενδοπρωκτική κεφαλή γραμμικής σάρωσης (linear array) συχνότητας 5 ή 7,5 MHz. Η επιλογή κεφαλής συχνότητας 3 MHz εκτός του ότι είναι ογκώδης και σχετικά δύσχρηστη, δεν παρέχει τη δυνατότητα ευκρινούς απεικόνισης λεπτών σχηματισμών (πχ μικρά ωοθυλάκια, ωαγωγοί). Για τη διενέργεια αναρρόφησης ωοθυλακίων, βιοψίας ωοθηκών και αμνιοκέντησης συνιστάται η χρήση ενδοκολπικής κεφαλής τύπου sector συχνότητας 5-7 MHz. (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998)

2. Εγκυμοσύνη – λοχεία

Έχει αποδειχθεί ότι το πρότυπο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων δεν επηρεάζεται τουλάχιστον κατά τη διάρκεια των πρώτων 60 ημερών της εγκυμοσύνης. Αντίθετα, αναπτύσσεται αυξημένος αριθμός ωοθυλακίων γεγονός που ίσως συνδέεται σε ορισμένες περιπτώσεις με τον πρώιμο εμβρυικό θάνατο, λόγω αυξημένης παραγωγής οιστρογόνων και διαταραχής της ισορροπίας προγεστερόνης – οιστρογόνων. Στις αγελάδες η πρώτη ωοθυλακιόρρηξία μετά τον τοκετό συνήθως δε συνοδεύεται από εμφανή συμπτώματα οίστρου. Κατά τη διάρκεια του πρώτου οιστρικού κύκλου επικρατεί το πρότυπο των δύο κυμάτων, με αποτέλεσμα ο κύκλος αυτός να είναι συνήθως μικρότερης διάρκειας από τους επόμενους (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998)

Η χρήση της υπερηχογραφίας μετά τον τοκετό παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την επίσπευση του χρόνου πρώτης σπερματέγχυσης και κατ' επέκταση τη μείωση του μεσοδιαστήματος μεταξύ τοκετών. Με τον προσδιορισμό της έναρξης της στατικής φάσης του τελευταίου κυρίαρχου ωοθυλακίου μπορεί να γίνει πρόβλεψη του χρόνου της επικείμενης ωοθυλακιόρρηξίας με απόκλιση μέχρι 6 ώρες, με αποτέλεσμα τη διενέργεια της Τ Σ στον κατάλληλο χρόνο, την επίτευξη υψηλότερου ποσοστού συλλήψεων και τη μείωση του κόστους σπερματεγχύσεων. Ο ακριβής προσδιορισμός της έναρξης της στατικής φάσης προϋποθέτει παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης των ωοθυλακίου κατά την ωοθυλακική φάση του οιστρικού κύκλου. Στην πράξη αυτό μπορεί να εφαρμοσθεί σε περιπτώσεις, που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σπέρμα

ιδιαίτερα υψηλής αξίας ή σε ζώα με ιστορικό σιωπηλών οίστρων. (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998)

3. Διάγνωση της εγκυμοσύνης

Χρησιμοποιώντας κεφαλή συχνότητας 3,5 MHz οι Chaffaux και συν το 1982 διέγνωσαν για πρώτη φορά εγκυμοσύνη σε αγελάδες την 28^η ημέρα μετά την Τ Σ. Τα εμβρυικά υγρά απεικονίζονταν με τη μορφή ακανόνιστων μη ηχογόνων περιοχών στην κοιλότητα της μήτρας, ενώ το έμβρυο (το οποίο απεικονίζονταν σαν μια ηχογόνος περιοχή μέσα στα εμβρυικά υγρά) ήταν ορατό μετά από την 35^η ημέρα. Η αξιοπιστία της υπερηχογραφίας στη διάγνωση της εγκυμοσύνης έχει διερευνηθεί σε μεγάλη έκταση σε ένα σημαντικό μεγάλο αριθμό εργασιών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρεκκλίνουν σημαντικά, σε ότι αφορά στα ποσοστά ακριβούς διάγνωσης της εγκυμοσύνης και στο χρόνο διενέργειας της εξέτασης μετά την Τ Σ. Η εξέλιξη του εμβρύου μελετήθηκε από την 10^η ημέρα έως την 60^η, ενώ υποστηρίχθηκε ότι το έμβρυο είναι ανιχνεύσιμο ήδη από την 12^η ημέρα. Από τον Kastelic ανακοινώθηκε απόλυτη ακρίβεια (100%) στη διάγνωση της εγκυμοσύνης την 20^η ημέρα μετά την Τ Σ. Σε άλλες όμως ερευνητικές ομάδες, για το χρονικό διάστημα μεταξύ της 25^{ης} και της 30^{ης} ημέρας μετά την Τ Σ η εκτίμηση της ακρίβειας παραλλάσει από 70 % έως 94%. (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998)

Η παραλλακτικότητα αυτή στη διαγνωστική ικανότητα οφείλεται σε πολλές παραμέτρους, όπως η διακριτική ικανότητα του συστήματος, η ηλικία του ζώου, η προηγούμενη παρακολούθηση του ζώου και κυρίως η εμπειρία του επεμβαίνοντος. Σε μεγάλο αριθμό εργασιών αναφέρεται επιτυχής διάγνωση εγκυμοσύνης μετά την 16^η ημέρα. Δεν πρέπει όμως να αγνοείται το γεγονός, ότι η διάγνωση αυτή προήλθε από πειραματικό σχεδιασμό, πράγμα που σημαίνει ότι παρεχόταν η δυνατότητα στενής παρακολούθησης με επαναλαμβανόμενες εξετάσεις των ζώων αμέσως μετά την Τ Σ. (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998).

Οι κεφαλές των 5 ή 7,5 MHz δίνουν περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα πρώιμης διάγνωσης εγκυμοσύνης από τις κεφαλές των 3 ή 3,5 MHz λόγω της καλύτερης διακριτικής τους ικανότητας. Για απόλυτα αξιόπιστα αποτελέσματα η διάγνωση εγκυμοσύνης σε συνθήκες εκτροφής πρέπει να διενεργείται μετά την 25^η ημέρα από την Τ Σ. Στο στάδιο αυτό η διάγνωση εγκυμοσύνης επιτυγχάνεται 10-15 ημέρες νωρίτερα από το χρόνο που θα μπορούσε να διενεργηθεί από έναν έμπειρο

κλινικό με ψηλάφηση από το απευθυσμένο. Επιπλέον, η πρώιμη διάγνωση εγκυμοσύνης με υπερηχογραφία είναι απόλυτα ακίνδυνη για την εξέλιξη του κυήματος και με την παρατήρηση της καρδιακής λειτουργίας διαπιστώνεται η φυσιολογική του εξέλιξη. (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998).

Η διάγνωση εγκυμοσύνης με προσδιορισμό της προγεστερόνης στο αίμα ή στο γάλα τη 19^η ή 20^η ημέρα μετά την Τ Σ είναι απόλυτα αξιόπιστη μόνο στην περίπτωση μη εγκυμοσύνης. Υψηλή συγκέντρωση προγεστερόνης μπορεί να ανιχνευθεί τις ημέρες αυτές σε εγκυμοσύνη αλλά και σε οιστρικούς κύκλους μεγαλύτερης διάρκειας του φυσιολογικού, ή και σε περιπτώσεις παραμένοντος ωχρού σωματίου. (Αμοιρίδης και Λυμπερόπουλος, 1998).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η επίδραση υψηλών δόσεων βιταμινών Α, Ε και Σεληνίου στη μετεμβολιακή ανταπόκριση των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής: Μελέτη σε επίπεδο εκτροφής αναπαραγωγικών και ανοσολογικών παραμέτρων

Β ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Ζωικό κεφάλαιο

Ο πειραματισμός έλαβε χώρα στο Αγρόκτημα του Αλεξάνδρειου ΤΕΙ Θεσσαλονίκης. Στο συγκεκριμένο πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν 6 αρμεγόμενες αγελάδες της φυλής Holstein ηλικίας 5-7 ετών και σωματικού βάρους 600 κιλών. Τα ζώα χωρίστηκαν σε δυο ομάδες την ομάδα Α (3 ζώα) και την ομάδα Β (3 ζώα).

Διατροφή

Στα συγκεκριμένα ζώα που έλαβαν μέρος στον πειραματισμό χορηγούνταν συμπυκνωμένες, χονδροειδείς τροφές και συμπληρωματικά χορηγούνταν και ενσίρωμα. Τα ζώα είχαν πρόσβαση στο νερό *ad libitum*

Χορήγηση E-Selen+βιταμίνης Α.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο σκευάσματα για δοκιμή το Ovulink (Neocell®) και το E-Selen+βιταμίνης Α. Στα ζώα της ομάδας Α) χορηγήθηκαν *per os* 500 ml Ovulink,. Στα ζώα της ομάδας Β χορηγήθηκαν ενδομυϊκά 15 ml E-Selen+βιταμίνης Α..

Συγχρονισμός οίστρων

Το πρωτόκολλο συγχρονισμού που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τη χορήγηση προσταγλανδίνης (Estrumate®). Στα ζώα και των δυο ομάδων χορηγήθηκαν ενδομυϊκά 2 ml προσταγλανδίνης και μετά από 10 ημέρες χορηγήθηκαν άλλα 2 ml. Ο έλεγχος του οίστρου έγινε στις 48, 72 και 96 ώρες μετά τη χορήγηση της δεύτερης δόσης προσταγλανδίνης. Ο έλεγχος γινόταν 3 φορές την ημέρα στις 8 π.μ., 12 π.μ. και στις 6 μ.μ. Στο διάστημα αυτό γινόταν καταγραφή και έλεγχος όσων ζώων εκδήλωναν ασφαλή συμπτώματα οίστρου.

Τεχνητή σπερματέγχυση

Στα ζώα που εκδήλωναν ασφαλή συμπτώματα οίστρου εφαρμόζονταν τεχνητή σπερματέγχυση το τρίτο βωρο από την έναρξη του οίστρου.

Συλλογή δειγμάτων γάλακτος

Η συλλογή δειγμάτων γάλακτος γινόταν κατά την πρωινή αρμεγή σε φιαλίδια των 6 ml. Για τον προσδιορισμό της προγεστερόνης συλλέχθηκαν 2 δείγματα γάλακτος από κάθε ζώο. Η συλλογή των δειγμάτων γάλακτος έγινε την 0 ημέρα (ημέρα εφαρμογής τεχνητής σπερματέγχυσης) και τη 19^η ημέρα από την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης. Τα δείγματα μετά τη συλλογή τοποθετούνταν στους -20°C μέχρι να γίνει η ανάλυση τους.

Για τον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών από κάθε ζώο συλλέχθηκε ένα δείγμα γάλακτος 28 ημέρες μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης. Τα δείγματα μετά τη συλλογή τοποθετούνταν στους -20°C μέχρι να γίνει η ανάλυση τους.

Προσδιορισμός της προγεστερόνης (P4) στο γάλα

Η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο γάλα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA) στερεάς φάσης (Siemens[®], 06615510 Progesterone Coat-A-Count[®] RIA Kit). Από το δείγμα γάλακτος ή τα πρότυπα αναφοράς (standards) λαμβάνονταν 100 μl και τοποθετούνταν σε πλαστικά φιαλίδια των οποίων η εσωτερική επιφάνεια ήταν επικαλυμμένη με αντίσωμα προγεστερόνης. Τα πρότυπα αναφοράς (standards) περιείχαν 1 ng/mL και 40 ng/mL προγεστερόνης. Στα σωληνάρια των δειγμάτων και των πρότυπων αναφοράς προστέθηκε 1 mL I¹²⁵-ραδιοσημασμένης προγεστερόνης. Ακολούθησε ανάδευση των φιαλιδίων και επώαση τους για 3 ώρες. Μετά την επώαση απομακρύνθηκε η υπερκείμενη στοιβάδα με σκοπό την απομάκρυνση την ποσότητα του γάλακτος και τη ¹²⁵-ραδιοσημασμένη προγεστερόνη. Τα σωληνάρια τοποθετούνταν σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (Packard AutoGamma 500, Packard Instruments, USA) και το κάθε δείγμα μετριόταν για 1 λεπτό της ώρας. Ο συντελεστής παραλλακτικότητας για τις μετρήσεις της ίδιας ημέρας (intra-assay) και για τις μετρήσεις μεταξύ διαφορετικών ημερών (inter-assay) ήταν 7,7% and 8,3%, αντίστοιχα. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 0,05 ng/mL. Συγκεντρώσεις προγεστερόνης από 0,0 ng/ml έως 1,0 ng/ml υποδηλώνουν ότι το ζώο δεν είναι έγκυο, ενώ όταν η συγκέντρωση της προγεστερόνης είναι πάνω από 7 ng/ml τότε το ζώο θεωρείται ότι είναι έγκυο.

Προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών (PAG) στο γάλα

Για τον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα χρησιμοποιήθηκαν πλάκες-ELISA 96-βοθρίων (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME). Τα βοθρία της πλάκας ήταν επικαλυμμένα με αντισώματα γλυκοπρωτεϊνών. Στα πρώτα δυο βοθρία γινόταν προσθήκη 150 μl του αρνητικού μάρτυρα που δεν περιείχε PAG και στα επόμενα δυο ακολουθούσε προσθήκη 150 μl του θετικού μάρτυρα που περιείχε PAG. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 150 μl του δείγματος του γάλακτος εις διπλούν. Τα βοθρία καλύπτονταν και επωάζονταν για 2 ώρες στους 37°C. Κατά τη διάρκεια της επώασης η πλάκα αναδεύονταν σε αναδευτήρα στις 450 στροφές ανά λεπτό της ώρας. Ακολουθούσε απομάκρυνση του υγρού που περιείχαν τα βοθρία και γινόταν πλύση του κάθε βοθρίου με αποσταγμένο νερό 4 φορές. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 100 μl από το διάλυμα ανιχνευτή. Τα βοθρία καλύπτονταν και ακολουθούσε επώαση για 30 λεπτά της ώρας στους 26°C. Ακολουθούσε απομάκρυνση του υγρού που περιείχαν τα βοθρία και γινόταν πλύση του κάθε βοθρίου με αποσταγμένο νερό 4 φορές. Προσθέταμε 100 μl από το διάλυμα δέσμευσης και η πλάκα επωάζονταν για 30 λεπτά της ώρας στους 26°C. Ακολουθούσε απομάκρυνση του υγρού που περιείχαν τα βοθρία και γινόταν πλύση του κάθε βοθρίου με αποσταγμένο νερό 4 φορές. Γινόταν προσθήκη 100 μl από το διάλυμα 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) και τα βοθρία επωάζονταν για 20-30 λεπτά της ώρας στους 26°C για να αναπτυχθεί ο χρωματισμός. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 100 μl από το διάλυμα αναστολέα της αντίδρασης (για την αναστολή του χρωματισμού). Η πλάκα ακολούθως τοποθετούνταν σε φασμαφωτόμετρο ELIZA για να μετρηθεί η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 450 nm. Αφαιρούνταν η οπτική πυκνότητα του δείγματος από την οπτική πυκνότητα του αρνητικού μάρτυρα. Όταν η τιμή ήταν <0,100 η αγελάδα θεωρούνταν μη έγκυος. Όταν η τιμή ήταν >0,100 to <0,250 η αγελάδα χρειαζόταν να ελεγχθεί και πάλι. Τέλος, όταν η τιμή ήταν ≥0,250 η αγελάδα θεωρούνταν έγκυος.

Διάγνωση εγκυμοσύνης με τη χρήση του υπερηχογράφου

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων από τον προσδιορισμό της προγεστερόνης και του αντίστοιχου προσδιορισμού των γλυκοπρωτεϊνών οι αγελάδες ελέγχθηκαν 55-60 ημέρες μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης με τη βοήθεια υπερηχογράφου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χορήγηση υψηλών δόσεων E-Selen+βιταμίνης A.

Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων σε ότι αφορά το χρονικό διάστημα εκδήλωσης και διάρκειας των συμπτωμάτων του οίστρου, αλλά ούτε και στα ποσοστά σύλληψης. Δύο αγελάδες από την ομάδα A και 2 αγελάδες από την ομάδα B εκδήλωσαν συμπτώματα οίστρου στις 48 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης προσταγλανδίνης ενώ μια αγελάδα από τη ομάδα A και μια από την ομάδα B εκδήλωσαν συμπτώματα οίστρου στις 72 ώρες.

Προσδιορισμός της προγεστερόνης (P4) στο γάλα

Τα ζώα και στις δυο ομάδες την ημέρα της εφαρμογής της τεχνητής σπερματέγχυσης (ημέρα 0) είχαν η συγκέντρωση της προγεστερόνης στο γάλα κυμάνθηκε από 0,1 ng/ml έως 0,3 ng/ml γεγονός που υποδηλώνει ότι και οι 6 αγελάδες βρίσκονταν στο στάδιο του οίστρου. Την 19^η ημέρα μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης σε 2 ζώα στην ομάδα A και 2 ζώα στην ομάδα B η συγκέντρωση προγεστερόνης στο γάλα κυμάνθηκε από 8 ng/ml έως 20 ng/ml γεγονός που δηλώνει ότι τα συγκεκριμένα ζώα είχαν συλλάβει.

Προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών (PAG) στο γάλα

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι την 28^η ημέρα μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης σε 2 ζώα στην ομάδα A και 2 ζώα στην ομάδα B η οπτική πυκνότητα ήταν $\geq 0,250$ γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα συγκεκριμένα ζώα είχαν υψηλή συγκέντρωση γλυκοπρωτεϊνών επομένως ήταν έγκυα. Στα υπόλοιπα ζώα η οπτική πυκνότητα στο γάλα ήταν $< 0,100$ που επιβεβαιώνει ότι τα συγκεκριμένα ζώα είχαν χαμηλή συγκέντρωση γλυκοπρωτεϊνών επομένως δεν ήταν έγκυα.

Διάγνωση εγκυμοσύνης με τη χρήση του υπερηχογράφου

Η διάγνωση εγκυμοσύνης με τη χρήση υπερηχογράφου έλαβε χώρα 50 ημέρες μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης και επιβεβαιώθηκε η εγκυμοσύνη στα ζώα και των δυο ομάδων που είχαν παρουσιάσει υψηλή συγκέντρωση προγεστερόνης και υψηλές τιμές οπτικής πυκνότητας σε ότι αφορά στις γλυκοπρωτεΐνες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χορήγηση βιταμινών Α και Ε σε συνδυασμό με Σελήνιο αναφέρεται ότι μπορεί να βελτιώσει την ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των βακτηριακών και ιογενών νοσημάτων (Larsen, 1988). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε μείωση της θνησιμότητας των εμβρύων (Spears και συν., 1986). Επίσης, κατά τη ξηρά περίοδο συνιστάται η χορήγηση βιταμινών Α και Ε σε συνδυασμό με Σελήνιο με σκοπό τη μείωση εμφάνισης περιπτώσεων αναπαραγωγικών διαταραχών κατά τη περίοδο μετά τη λοχεία (Cortese, 1988).

Τα αποτελέσματα της εργασίας μας έδειξαν ότι η συνδυασμένη χορήγηση βιταμινών Α και Ε και Σεληνίου βελτίωσε τη γονιμότητα στο 66,6% των αγελάδων. Η επίδραση των Βιταμινών Ε και Α καθώς και του Σεληνίου στη γονιμότητα των γαλκτοπαραγωγών αγελάδων ποικίλλει με κάποιες εργασίες να αναφέρουν ότι η συνδυασμένη χορήγηση τους αυξάνει τη γονιμότητα των αγελάδων (Arrehiga και συν., 1994, Segerson και συν., 1977) κι άλλες να αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκε καμιά επίδραση (Hidiroglou και συν., 1987, Schingoethe και συν., 1982). Οι διαφορές αυτές που παρατηρήθηκαν στα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται και στις διαφορετικές δόσεις που χορηγήθηκαν.

Ο πρώτος έλεγχος της συγκέντρωσης της προγεστερόνης την ημέρα της τεχνητής σπερματέγχυσης χρησιμοποιείται ως εργαλείο για επιβεβαίωση ότι τα ζώα την ημέρα που έγινε η σπερματέγχυση ήταν σε οίστρο. Ο δεύτερος έλεγχος της συγκέντρωσης της προγεστερόνης τη 19^η ημέρα μετά τη τεχνητή σπερματέγχυση μας επιτρέπει άμεσα να γνωρίζουμε τα ζώα που έχουν χαμηλή συγκέντρωση προγεστερόνης (< 8 ng προγεστερόνης/ml γάλακτος) γεγονός που σημαίνει ότι δεν είναι έγκυα. Γνωρίζοντας ποια ζώα είναι έγκυα μπορούμε να προγραμματίσουμε να εφαρμοστεί σε αυτά τεχνητή σπερματέγχυση σε 2 ημέρες. Αντίθετα οι αγελάδες που είχαν υψηλές συγκεντρώσεις προγεστερόνης θεωρήθηκαν έγκυες. Η εργασία μας έδειξε ότι υπάρχει μια ισχυρή σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της προγεστερόνης και της πιθανότητας το ζώο να είναι έγκυο. Η συγκέντρωση της προγεστερόνης στην εργασία μας είναι σε συμφωνία με εκείνες των Starbuck και συν., (1999), και οι οποίοι αναφέρουν συγκεντρώσεις μεταξύ 7 και 8 ng/mL και τις οποίες σχετίζουν με το μέγιστο ποσοστό σύλληψης, ενώ όταν η συγκέντρωση της προγεστερόνης ήταν χαμηλή τη συνέδεσαν με τη μείωση των ποσοστών σύλληψης.

Από τα αποτελέσματα της εργασίας μας αποδεικνύεται ότι ο προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα των αγελάδων αποτελεί μια ακριβής μέθοδος για να επιβεβαιώσουμε την κατάσταση της εγκυμοσύνης . Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα (Gajewski και συν., 2008), στην εργασία μας αποδεικνύεται ότι είναι δυνατόν να ανιχνεύσουμε την παρουσία των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα εγκύων αγελάδων πολύ νωρίτερα (28^η ημέρα vs 150^η ημέρα). Τα πλεονεκτήματα που έχει ο προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών σε σύγκριση με τον προσδιορισμό της προγεστερόνης στη διάγνωση εγκυμοσύνης είναι ότι α) το δείγμα του γάλακτος για τον προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών μπορεί να ληφθεί οποιαδήποτε στιγμή από την 30^η ημέρα της εγκυμοσύνης και μετά σε σύγκριση με τη λήψη δείγματος για τον προσδιορισμό της προγεστερόνης που πρέπει να ληφθεί τη 19^η ημέρα μετά τη σπερματέγχυση και β) η αξιοπιστία ενός θετικού αποτελέσματος της μεθόδου του προσδιορισμού της προγεστερόνης μπορεί να ανέλθει στο 80% (Sasser και Ruder 1987), σε σύγκριση με εκείνη της μεθόδου προσδιορισμού των γλυκοπρωτεϊνών η οποία μπορεί να ανέλθει στο 95-100% (Sasser και συν., 1986, Zoli και συν., 1992β, Szenci και συν., 1998).

Όπως αναφέρετε και σε άλλες εργασίες (Humblot και συν., 1988, Kirakofe και συν., 1993), τα ευρήματά μας αποδεικνύουν ότι η παρουσία της προγεστερόνης, των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα της στα πρώτα στάδια της λοχείας μπορεί να περιορίσει τη χρήση πολλών χειρισμών κάτω από συνθήκες εκτροφής.

Τέλος, τα αποτελέσματα της εργασίας μας επιβεβαιώνουν ότι ο συνδυασμός της χρήσης της μεθόδου προσδιορισμού της προγεστερόνης ή των γλυκοπρωτεϊνών σε συνδυασμό με τη χρήση του υπερηχογράφου θα βοηθήσει στον προσδιορισμό των παραγόντων που μπορεί να επηρεάζουν τη θνησιμότητα των εμβρύων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η συνδυασμένη χορήγηση E-Selen+βιταμίνης A βελτίωσε τη γονιμότητα των αγελάδων.
2. Μεταξύ των δυο σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτίωση των ποσοστών σύλληψης δεν παρατηρήθηκε καμιά διαφορά.
3. Ο πειραματισμός θα μπορούσε να επαναληφθεί και να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός ζώων για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.
4. Ο προσδιορισμός της προγεστερόνης καθώς και ο προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναπαραγωγική διαχείριση σε μια αγελαδοτροφική εκμετάλλευση.
5. Η χρήση του υπερηχογράφου την 50^η ημέρα μετά την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της προγεστερόνης είτε των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο για την επιβεβαίωση της εγκυμοσύνης στις αγελαδοτροφικές εκμεταλλεύσεις.
6. Σε μια εκτροφή η χρήση του προσδιορισμού της προγεστερόνης ή των γλυκοπρωτεϊνών σε συνδυασμό με την υπερηχογραφία παρέχει τη δυνατότητα για την καλύτερη αναπαραγωγική διαχείριση.
7. Ο προσδιορισμός των γλυκοπρωτεϊνών στο γάλα έχει το πλεονέκτημα ότι χρειάζεται ένα δείγμα την 28^η ημέρα της εγκυμοσύνης σε σύγκριση με τον προσδιορισμό της προγεστερόνης ο οποίος χρειάζεται περισσότερα από δυο δείγματα γάλακτος (0, 19 και 42^η μέρα).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arrehiga CF, Ortiz O, Hansen PJ. (1994). Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology*, 41:1251-1258.

Breukelman SP, Szenci O, Beckers JF, Kindahl H, Mulder EJH, Jonker FH, Van Der Weijden B, Revy D, Pogany K, Sulon J, Nemedi I, Taverne MAM.(2005) Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F_{2α}-metabolite (PGF_{2α}-metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. *Theriogenology*, 64:917-933.

Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, Williams RJ.(1982) Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol Reprod*, 26:925-933.

Cortese, V., 1988. Selenium and reproductive performance in dairy cattle. *Agri. Practice, Nutrition/Reprod.*, 9(4): 5-7.

Currie WB, Card CE, Michel FJ, Igotz G.(1990). Purification, partial characterization and development of a specific RIA for goat placental lactogen. *J Reprod Fertil*, 90:25-36.

Αμοιρίδης ΓΣ, Λυμπερόπουλος Α, (1998). Εφαρμογή της υπερηχογραφίας στην αναπαραγωγή αγελάδων Δελτίο της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας, 49(4):272-280.

DeJarnette M., Salverson RR, Marshall CE (2001). Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF_{2α}. *Anim Reprod Sci*, 67: 27-35.

Ectors FJ, Drion PV, Delval A, Smith LC, Sulon J, Zaaijer D, Szenci O, Remy B, Beckers JF, Ectors F.(1996) Interests of pregnancy follow-up in cows after embryo transfer special focusing on IVP and NT origin. 12th Annual Meeting AETE, 13–14 September, Lyon, France, pp. 95–102.

Friedrich M, Holtz W.(2010) Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reprod Domest Anim*, 45:142-146.

Gajewski, Z., Melo De Sousa, N., Beckers, J.F., Pawlinski, B., Olszewska, M., Thun R. & Kleczkowski, M., (2008). Concentration of bovine pregnancy associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows. *J. Physiol. Pharmacol.* 59[Supp 9]:55-64.

Garbayo JM, Green JA, Manikkam M, Beckers JF, Kiesling DO, Ealy AD, Roberts RM.(2000). Caprine pregnancy-associated glycoproteins (PAG): their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG. *Mol Reprod Dev*, 57:311–322.

Green JA, Xie S, Roberts RM.(1998). Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Rev Reprod*, 3:62-69.

Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Beckers JF, Roberts RM. (2000), Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod*, 62:1624–1631.

Green JA, Parks TE, Avalle MP, Telugu BP, McLain AL, Peterson AJ, McMillan W, Mathialagan N, Hook RR, Xie S, Roberts RM.(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.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP.(2002)Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*, 66:6–13.

Hidiroglou M, McAllister A J, Williams CJ. (1987). Parturient supplementation of selenium and vitamin E to dairy cows: assessment of selenium status and reproductive performance. *J Dairy Sci*, 70:1281-1288.

Humblot P, Camous S, Martal J, Charlery J, Jeangnyot N, Thibier M., Sasser RG. (1988). Pregnancy specific protein b, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J Reprod Fertil*, 83:215-223.

Μάγρας ΙΝ, Αντωνόπουλος ΙΚ (2003), Ανατομική των Αγροτικών Ζώων, Εκδοτικός Οίκος, Αδελφών Κυριακίδη ΑΕ., (179-195).

Kirakofe GH. Wright JM. Schalles ILK. Ruder CA. Pads S. Sasser RG. (1993). Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. *J Anim Sci*, 71:2199-2205.

Larsen, H. J. (1988). Influence of selenium on antibody production in sheep. *Res. Vet. Sci.*, 45: 4-10.

Ledezma-Torres RA, Beckers JF, Holtz W, 2006: Assessment of plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in sheep with a heterologous (anti-caPAG55+59) RIA and its potential for diagnosing pregnancy. *Theriogenology*, 66:906-912.

Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW (2001). Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rates to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 84:1646-1659.

O' Conor M. (1974). Milk progesterone analysis for determining reproductive status. Dairy Animal Science, PENSTATE UNIVERSITY, DAS 98-5.

Patel OV, Sulon J, Beckers JF, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N.(1997), Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in cow. *Eur J Endocrinol* 137:423-428.

Perenyi Z, Szenci O, Sulon J, Drion PV, Beckers JF.,(2002), Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Reprod Dom Anim* 37:100–104.

Sasser RG, Ruder CA, (1987). Detection of early pregnancy in domestic ruminants. *J Reprod Fertil, Suppl* 34, 261–271.

Pursley JR, Mee MO, and Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44:915-923.

Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, Butler JE, Hamilton WC, (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.

Schingoethe DJ, Kirkbride CA, Palmer IS, Owens M_J, Tucker W.L. (1982). Response of cows consuming adequate selenium to vitamin E and selenium supplementation prepartum. *J Dairy Sci*, 65:2338-2344.

Segerson EC Jr, Murray FA, Moxon AL, Redman DR, Conrad HR. (1977). Selenium/vitamin E: role in fertilization of bovine ova. *J Dairy Sci*, 60:1001-1005.

Μπελιμπασάκη Σ και Λυμπερόπουλος Α. (2005). Σημειώσεις εργαστηρίου αναπαραγωγής.

Small J. AJ, Ambrose D, McCaughey WP, Ward DR, Sutherland WD, Glover ND, and Rajamahendran R (2001). The effects of gonadotrophin releasing hormone in prostaglandin F2 α -based timed insemination programs for beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 81: 335–343.

Sousa NM, Zongo M, Pitala W, Boly H, Sawadogo L, Sanon M, Figueiredo JR, Gonçalves PBD, El Amiri B, Perényi Z, Beckers JF.(2003), Pregnancy-associated glycoprotein concentrations during pregnancy and the postpartum period in Azawak zebu cattle. *Theriogenology* 59:1131-1142.

Spears, J. W., R. W. Harvey and E. C. Segerson, (1986). Effects of marginal selenium deficiency and winter protein supplementation on growth, reproduction and selenium status of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 63: 586-594.

Starbuck GR, Darwash AO, Lamming GE. (1999). The importance of progesterone during early pregnancy in the dairy cow. *Cattle Pract*, 7:397–400.

Stevenson JS, Tiffany SM, Lucy MC (2004). Use of Estradiol Cypionate as a Substitute for GnRH in Protocols for Synchronizing Ovulation in Dairy Cattle. *J Dairy Sci*, 87:3298-3305

Szenci O, Beckers JF, Humblot P, Sulon J, Sasser RG, Taverne MAM(1998), Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology* 50:77–88.

Szenci O, Beckers JF, Humblot P, Sulon J, Sasser G, Taverne MA, Varga J, Baltusen R, Schekk G, (1998). Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 50:77–88.

Szenci O, Beckers JF, Sulon J, Bevers MM, Bozso nyi L, Fodor L, Kovacs F, Taverne MAM.(2003), Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profile of pregnancy associated glycoprotein 1 in heifers. *Vet J*, 165:307–313.

Wooding FBP.(1992),Current Topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13:101-113.

Xie S, Low BG, Nagel RJ, Kramer KK, Anthony RV, Zoli AP, Beckers JF, Roberts RM.(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.

Zarrouk A, Engeland IV, Sulon J, Beckers JF, 1999: Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondi* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study. *Theriogenology* 52:1095-1104.

Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F, 1991: Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod* 45:1–10.

Zoli AP, Demez P, Beckers JF, Reznik M, Beckers A, 1992 α : Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy associated glycoprotein in the bovine placentome. *Biol Rreprod* 46: 623–629.

Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF, 1992 β , Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod* 46: 83–92.