



**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**



**КАТЕДРА „АКУШЕРСТВО, РЕПРОДУКЦИЯ И РЕПРОДУКТИВНИ
НАРУШЕНИЯ”**

БРАНИМИР АЛДИНОВ СИНАПОВ

**ВЛИЯНИЕ НА КИНЕМАТИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ НА СЕМЕННАТА
ТЕЧНОСТ И РАННОТО ГОНАДОТРОПИНОВО ТРЕТИРАНЕ
ВЪРХУ РЕПРОДУКТИВНОТО СЪСТОЯНИЕ И ЕМБРИОНАЛНАТА
СМЪРТНОСТ ПРИ ОВЦЕ ОТ НАПРАВЛЕНИЕ ЗА МЛЯКО**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина

Професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина

**Научна специалност “Акушерство и гинекология на животните и болести на
новородени животни”**

Стара Загора

2024 година



**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**



**КАТЕДРА „АКУШЕРСТВО, РЕПРОДУКЦИЯ И РЕПРОДУКТИВНИ
НАРУШЕНИЯ”**

БРАНИМИР АЛДИНОВ СИНАПОВ

**ВЛИЯНИЕ НА КИНЕМАТИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ НА СЕМЕННАТА
ТЕЧНОСТ И РАННОТО ГОНАДОТРОПИНОВО ТРЕТИРАНЕ
ВЪРХУ РЕПРОДУКТИВНОТО СЪСТОЯНИЕ И ЕМБРИОНАЛНАТА
СМЪРТНОСТ ПРИ ОВЦЕ ОТ НАПРАВЛЕНИЕ ЗА МЛЯКО**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина

Професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина

Научна специалност “Акушерство и гинекология на животните и болести на
новородени животни“

Научен ръководител: Проф. д-р Станимир Ангелов Йотов

Стара Загора

2024 година

Дисертационният труд е структуриран в XII глави, написани на 179 страници и онагледени с 26 фигури и 10 таблици. Библиографската справка включва 385 заглавия, от които 9 на кирилица и 376 на латиница.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № 4361/04.12.2023 г. на ректора на Тракийски университет – Стара Загора.

Дисертацията е обсъдена и предложена за публична защита на заседание на разширен катедрен съвет на катедра „Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения” при Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет, проведено на 18.03.2024 г.

Извазвам благодарност и признателност на научния ми ръководител проф. д-р Станимир Ангелов Йотов за компетентното ръководство и оказаната помощ при разработването и написването на дисертационния труд.

Благодаря на целия колектив на катедра „Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения” при Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет за неоценимата помощ по време на обучението в докторската програма и подготовката на дисертацията.

Сърдечно благодаря на доц. д-р Георги Бонев Георгиев от Аграрен факултет на Тракийски университет за оказаното съдействие при извършване на експериментите и полезните съвети при подготовката на дисертационния труд.

Не на последно място, искам да благодаря на семейството ми за оказаната безпрекословна подкрепа по време на обучението в докторската програма.

Публичната защита на дисертационния труд пред Научното жури ще се състои на..... от..... часа, в..... на Ветеринарномедицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Научен” на Ветеринарномедицински факултет и на Интернет страницата на Тракийски университет – <https://trakia-uni.bg/>.

СЪДЪРЖАНИЕ

Стр.

I. УВОД.....	1
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	2
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	2
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	15
V. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....	34
VI. ИЗВОДИ.....	48
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	49
VIII. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА.....	50
IX. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	50
X. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....	50
XI. РЕЗЮМЕ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК (SUMMARY).....	51

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

БСИО - бременни след изкуствено осеменяване овце
ДБ - двуплодна бременност
ДМЛ - диаметър на маточния лумен
ЕБ - едноплодна бременност
ЖА - женски агнета
ИО - изкуствено осеменяване
КЕС - късна ембрионална смъртност
МА - мъжки агнета
НС - неподвижни сперматозоиди
НПП - непрогресивна подвижност
ОЗСПК - овце заплодени след покриване от коч
ОП - обща подвижност
ПП - прогресивна подвижност
РЕ - размер на ембриона
РЕС - ранна ембрионална смъртност
СБ - стойност на бременността
СБА - среден брой на родените агнета
ТБ - триплодна бременност
ЧКЕС - частична късна ембрионална смъртност
CASA - компютърно-асиситиран анализ на сперма
CIDR - интравагинално устройство с контролирано освобождаване на прогестерон
CRL - черепно-опашна дължина
CL - жълто тяло
cm - сантиметър
°C - градус по Целзий
ELISA - ензимно-свързан имуносорбентен анализ
EIA - ензимен имуноанализ
ELFA - ензимно-свързан имунофлуоресцентен анализ
FGA - флуорогестон ацетат
FSH - фоликулостимулиращ хормон
GnRH - гонадотропен освобождаващ хормон
IFN τ - интерферон тау
hCG - човешки хорионов гонадотропин
IU - международни единици
kg - килограм
Mean - средна стойност
mg - милиграм
 μ g - микрограм
min - минута
ml - милилитър
 μ L - микролитър
mm - милиметър
MHz - мегахерц
LH - лутеинизиращ хормон
LIN - линейност на движението
MAP - медроксипрогестерон ацетат
MRP - майчино разпознаване на бременността

N - отрицателна контрола
n - брой
ng/ml - нанограм на милилитър
nmol/ml - наномол на милилитър
OD - оптична плътност
oPAG - овчи гликопротеин свързан с бременността
P - ниво на значимост
P4 - прогестерон
PAG - гликопротеин свързан с бременността
PAGs - гликопротеини свързани с бременността
PGF2 α - простагландин еф две алфа
PMSG, eCG - серумен хорионов гонадотропин от бременни кобили
R - корелационен коефициент
RIA - радиоимунен анализ
S - проба
s - секунда
SD - стандартно отклонение
STR - праволинейни настъпателни движения
VAP - средна скорост на пътя
VCL - криволинейна скорост
VSL - скорост по права линия
% - процент



I. УВОД

Отглеждането на високопродуктивни овце (*Ovis aries*) от породи за мляко в интензивни овцеферми с целогодишен цикъл на млекопроизводство е продиктувано от повишеното търсене на млечни продукти и възможността за реализацията им на българския и международен пазар. Ускореното производство на сурово мляко е предпоставка за бърза амортизация на животните и води до значителни икономически загуби, вследствие по-нисък млеконадой и загуба на животни с ценни генетични качества. Минимизирането на негативните ефекти и повишаването на икономическата ефективност на овцефермата изисква бързо възпроизводство на популацията, базирано на оптимален репродуктивен мениджмънт.

Асистираните репродуктивни технологии синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване със семенна течност от елитни разплодници са високо ефективни инструменти за постигане на оптимална репродукция в съвременните овцеферми за производство на мляко. Основните насоки за осигуряване на адекватно репродуктивно състояние на овцете след приложение на асистираните репродуктивни технологии са използване на семенна течност от селектирани кочове, внедряване на съвременни диагностични методи за доказване на бременност и ембриофеталните загуби и хормонално третиране с цел превенция на ембрионалната смъртност.

Множество фактори, като породен и възрастов състав на животните, сезон, лактация, метод за синхронизация и вид на изкуственото осеменяване, оказват влияние върху репродуктивните параметри. Това изисква провеждане на изследвания с оглед адаптиране на протоколите за синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване към специфичните особености на женските животни в овцефермата и избор на най-добрите донори на семенна течност.

Удължената лактация на високопродуктивните овце е предразполагащ фактор за ниска заплодяемост и висока смъртност на ембрионите през ранната гестационна фаза, водещи до понижаване на репродуктивната ефективност. Проучването на промените в основните механизми протектиращи бременността в най-ранния етап след осеменяване и откриването на точни индикатори за доказване на ранна бременност и негативните събития в началната гестационна фаза, са от ключово значение за редуциране на ембрионалните и фетални загуби. Използването на хормонални интервенции през ранния период след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване на овцете са предмет на интензивни изследвания през последните години.

Независимо от получените до момента данни, въпросите за репродуктивното състояние на овцете от млечно направление след приложение на асистираните репродуктивни технологии синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване, все още представляват интерес за научната общност. Високотехнологичните методи за преценка на спермата и реалните индикатори за висока оплодителна способност на сперматозоидите на коча са обект на усилено изучаване.

Информацията за профилите на прогестерон и гликопротеините свързани с бременността през ранния период след осеменяване и възможностите за доказване и редуциране на ембрионалната смърт при този тип овце е недостатъчна, а понякога противоречива. Липсва детайлна информация за високопродуктивни овце от направление за мляко, отглеждани в нашата страна.

Всичко това беше предпоставка за извършване на допълнителни изследвания и обуславя актуалността на темата на дисертационния труд. Получените резултати биха могли да се използват за ефективно управление на репродуктивния процес в интензивни овцеферми за производство на мляко.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Да се проучи влиянието на някои кинематични параметри на семенната течност и ранното гонадотропиново третиране върху различни показатели на репродуктивното състояние и ембрионалната смъртност при овце (*Ovis aries*) от направление за мляко, след приложение на асистиранни репродуктивни технологии през размножителен сезон.

2. Задачи

2.1. Установяване на влиянието на някои кинематични параметри на семенната течност от кочове върху репродуктивното състояние на овце от направление за мляко след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване.

2.2. Проучване на влиянието на ранното гонадотропиново третиране след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване върху профила на прогестерон при овце от направление за мляко и възможностите за доказване на ранна ембрионална смъртност.

2.3. Проучване на влиянието на ранното гонадотропиново третиране след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване върху профила на гликопротеините свързани с бременността при овце от направление за мляко и възможностите за доказване на късна ембрионална смъртност.

2.4. Проучване на влиянието на ранното гонадотропиново третиране след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване върху репродуктивното състояние и биометричните показатели диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при овце от направление за мляко с нормално протичаща бременност и частична късна ембрионална смъртност.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Опитни животни

Експериментите в представения дисертационен труд бяха извършени при 677 животни в периода от 2021-2023 година, отглеждани в две интензивни овцеферми за производство на овче мляко (Фиг. 1). В експерименталните модели бяха използвани 34 коча и 643 високопродуктивни овце-майки от направление за мляко (27 коча и 481 животни от породата Източнофризийска овца и 7 коча и 162 овце от породата Асааф) в размножителен сезон (август-октомври).

Технологията на отглеждане и на двете проди овце беше свободна в групови боксове. Храненето на животните беше чрез обща смесена дажба, съобразена с изискванията за пол, порода, възраст и стадий на лактация, приемът на вода беше на воля. Доенето на овцете беше автоматично в доилна зала. Опитите бяха проведени през размножителния период. Всички процедури бяха в съответствие с минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията за използване, отглеждане и/или доставката им, включени в българското законодателство (Наредба № 20/1.11.2012 г.).



Фигура 1. Високопродуктивни овце от направление за мляко от породите Източнофризийска овца (А) и Асааф (В) отглеждани в интензивни овцеферми.

2. Използвани методи

2.1 Бонитировка, клинично изследване и формиране на опитните групи.

Предварително беше извършена бонитировка на животните с цел изравняване на техния статус. Общото здравословно състояние на овцете се определяше чрез рутинните клинични методи използвани във ветеринарната медицина. Всички животни с отклонения в здравословното състояние бяха изключвани от опитите. Подготовката на животните за осеменителната кампания включваше стрижба, извършване на необходимите противопаразитни и имунопрофилактични мероприятия. При формиране на групите бяха отчитани показателите порода, възраст, живо тегло и средно дневна млечност на овцете.

2.2 Синхронизация на еструса.

Синхронизацията на еструса беше извършена чрез интравагинални тампони Syncro-part® (Ceva Sante Animale, France) съдържащи 30 mg Cronolone (флуорогестон ацетат). Тампоните се поставяха във влагалището със специален апликатор за тампони при дребни преживни животни (Фиг. 2).



Фигура 2. Дейности по синхронизация на еструса при високопродуктивни овце от направление за мляко.

За по-лесно въвеждане на апликатора във влагалището той беше предварително ослизен. След поставяне на тампоните те престояваха във влагалището за 12 дни. През този период се следеше за спонтанното им изпадане. При отстраняване на тампона се отчиташе наличието на неспецифичен секрет, изтичащ от външния полов орган.

Овце с изпаданал тампон и наличие на неспецифичен секрет по време на осеменяването бяха изключвани от опитите. Непосредствено след изваждане на тампоните всяко животно беше инжектирано мускулно с 500 UI Folligon (PMSG) (Folligon[®], MSD Animal Health, Bulgaria). Овцете проявили отклонения в здравословното състояние между изваждане на тампоните и осеменяването бяха изключени от експериментите.

2.3 Получаване, преценка, обработка и съхранение на спермата.

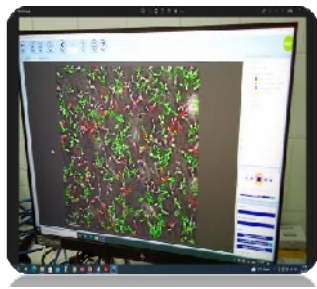
Семенната течност беше получена чрез метода на изкуствената вагина от опитен оператор и подложена на макроскопска (обем, гъстота, цвят, мирис и наличие на чужди примеси) и микроскопска преценка (Фиг. 3). Използвани бяха само еякулати отговарящи на стандартните изисквания за свежа сперма от кочове (обем ≥ 0.5 ml; консистенция гъста, мощност на вълната ≥ 3 по скалата от 1 до 5, патология < 14 %, липса на аглутинация) (Evans and Maxwell, 1987). Еякулати с отклонения в изследваните показатели не бяха използвани.



Фигура 3. Получаване и преценка на семенна течност от кочове.

Селекцията на кочовете-пепиниери се базираше на макроскопската, микроскопската преценка на еякулатите и предварително определяне на кинематични параметри на семенната течност, чрез система за компютърно-асистиран анализ (CASA, SCA[®] Microptic, Spain) (Фиг. 4). Подготовката на пробите за компютърно-асистиран анализ на спермата включваха предварително хомогенизиране на еякулата, вземане на количество от 0.2 ml и разреждане със сперморазредител Steridyl (Minitube, Germany) от 1:100 до 1:200, в зависимост от гъстотата на спермата. След това 10 μ L от пробата се поставяше върху предварително затоплено предметно стъкло и покриваше с покривно стъкло с размери 20x20 mm и дебелина 0.17 mm. Пробата се изследваше чрез фазовоконтрастен микроскоп Nikon и отчитане на данните от софтуерната програма. Получените еякулати в деня на изкуственото осеменяване бяха преценени първоначално макроскопски, след което се извършваше микроскопско изследване за определяне на показателите концентрация, подвижност на сперматозоидите, наличие на патология и аглутинация.

Разреждането на семенната течност до желаната концентрация беше извършено чрез сперморазредител за кочове (Steridyl, Minitube, Germany), а разредената семенна течност беше съхранявана на водна баня при температура 35⁰ C до момента на осеменяване на последната овца за предпазване на сперматозоидите от хиперактивация.



Concentration				
1.067.66 M/mL	1.291.19 M/Sample	Volume (ml): 1.20	Dilution 1:11	
Progression				
Progression	Total	%	M/mL	M/Sample
Progressive (PR)	1958	87.19	990.84	1,117.01
Non-progressive (NP)	210	11.75	125.47	150.66
Immotile (IM)	16	1.06	11.36	13.62

Фигура 4. Компютърно-асистиран анализ на семенна течност (CASA).

2.4 Изкуствено осеменяване и покриване на овцете от фертилни кочове след синхронизация на еструса.

2.4.1 Изкуствено осеменяване на овцете след синхронизация на еструса.

Изкуственото осеменяване на овцете беше извършено програмирано в периода 52-60-ти час след изваждане на тампоните. За целта овцете бяха предварително фиксирани, поставяни на специален станок и след почистване на външния полов орган задната част се повдигаше високо. Във влагалището беше въведен предварително ослизен с неспермициден гел спекулум, като се извършваше преценка на вагиналната картина. След откриване на външната част на маточната шийка, спермата беше депозирана плитко до средно цервикално. Еднократната доза сперма за осеменяване на овца беше с обем 0.25 ml и съдържаеше 80×10^6 подвижни сперматозоиди (Фиг. 5).



Фигура 5. Извършване на изкуствено осеменяване при високопродуктивни овце.

2.4.2 Покриване на овцете от фертилни кочове след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване.

Повторно въвеждане на кочове във втория експеримент беше извършено на 12-ия ден след изкуственото осеменяване. Овцете в пасивна фаза на еструса бяха покрити от фертилни кочове с предварително преценена чрез CASA семенна течност, съгласно случния план и половия режим на мъжките разплодници.

2.5 Определяне на концентрацията на прогестерон.

Кръвните проби за определяне на прогестерон бяха получени в специални епруветки (Vacuum Tube Sterile, Plain) от vena jugularis. След центрофугиране и отделяне на кръвната плазма тя беше съхранена в стерилни епруветки при температура -20°C до извършване на анализа.

Концентрациите на прогестерон бяха определени чрез автоматизиран количествен ензимно-свързан имунофлуоресцентен анализ на система MiniVidas (ELFA, VIDAS, ImmunoDiagnostic Assay System, bioMerieux, France) и VIDAS® Progesterone kit. Вариациите на кита бяха в рамките на и между серийните измервания, съответно от 5.7-3,8% и 6.2-3,8% и диагностична чувствителност варираща от <0.25ng/ml до 80 ng/ml.

2.6 Определяне на концентрацията на гликопротеините свързани с бременността.

Кръвните проби бяха получени в специални епруветки (Vacuum Tube Sterile, Plain) от vena jugularis. След центрофугиране и отделяне на кръвния серум, той беше съхранен в стерилни епруветки при температура -20°C до извършване на анализа. Концентрациите на PAGs бяха измерени чрез ELISA система и използване на търговски Alertys Ruminant Pregnancy Tes® (IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME, USA), следвайки инструкциите на производителя. Резултатите от анализите бяха представени като оптична плътност (OD) на пробата, коригирана чрез изваждане на OD на пробата (S) и OD на отрицателната контрола (N), измерена при дължина на вълната 450 nm. Крайният резултат се интерпретираше като S-N. Когато S-N стойността за всяка проба беше ≥ 0.300 , животното беше записано като бременно, а < 0.300 като небременно (Rovani et al., 2019). Минус стойностите на S-N бяха приравнени на нула при статистическото изчисление. Точност, чувствителност и специфичност на PAGs теста за определяне на бременност на ден 35 бяха отчитани на базата на ехографските резултати от ден 60 след изкуственото осеменяване.

2.7 Ехографски изследвания.

Ехографските изследвания бяха извършени чрез ултразвуков апарат Sono-Scare S2 Vet (SonoScare, China) с линейна мултичестотна сонда (5.0-12.0 MHz) чрез трансректален и трансабдоминален достъп (Фиг. 6). Ехографската находка беше документирана чрез софтуерната програма на апарата, а ехографските изображения записани на електронен носител.



Фигура 6. Ехографско изследване за бременност на високопродуктивни овце чрез трансректален и трансабдоминален достъп.

2.7.1 Трансректален ехографски достъп.

При трансректалния достъп животните бяха изследвани в правостоящо положение. За по-лесно манипулиране, сондата беше предварително ослизена с ехографски гел. След мануелно почистване на ректалната ампула от фекални маси тя се въвеждаше в ректума. За първоначален ориентир беше използвана визуализацията на пикочния мехур (анехогенна структура с кръгла или крушовидна форма откриваща се непосредствено пред recten ossis rubis), като се сканираше областта латерално и краниоентрално от него. При необходимост сондата се завърташе наляво и дясно под ъгъл 90^0 и придвижваше напред към коремната кухина, до ясна идентификация на изследваната структура.

2.7.2 Трансабдоминален ехографски достъп.

Трансабдоминалното изследване също беше изпълнено при правостоящо положение на животните. Ехографското сканиране беше извършено в дясната ингвинална област свободна от вълна. При негативна ехографска картина изследването се провеждаше двустранно. Предварително върху сканиращата повърхност на сондата беше поставено обилно количество ехографски гел за по-добър контакт с кожата и по-ясен образ. Внимателно се повдигаше задния крайник на овцата и сондата се поставяше в изследваната област, като посоката на ултразвуковите лъчи се насочваше първоначално към тазовата кухина. За получаване на ясна картина и фокусиране на ехографския образ, сондата се движеше много бавно, без да се отделя от кожата. В зависимост от гестационната фаза се сканираше областта над млечната жлеза, от ингвиналната гънка краниоентрално по цялото поле с насочване на ултразвуковия лъч в различни посоки.

2.7.3 Използвани индикатори за диагностика на бременност, проследяване на ембриофеталното развитие и определяне на жизнелостта на ембриона/фетуса.

При всяко животно бяха регистрирани датите на осеменяване. За ден 0 на бременността се приемаше денят на изкуствено осеменяване, като се отчитаха следните индикатори:

Увеличен маточен лумен изпълнен с околоплодна течност - визуализация на единична или множество анехогенни области в матката, локализирани около пикочния мехур и оградени от ехогенна стена.

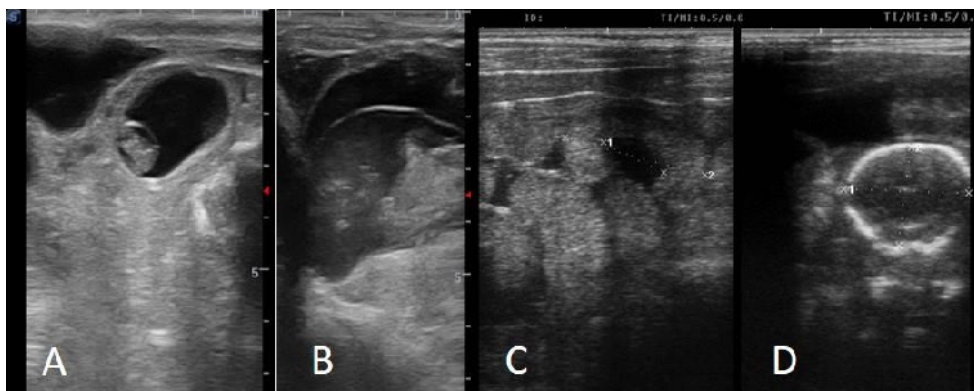
Ембрион или фетус - наблюдаване на ехогенна структура с овална или неправилна форма или диференцирани части на плод в анехогенния маточен лумен.

Сърдечна дейност на ембриона/фетуса - ясна визуализация на ритмични контракции на ембриона, предоминантно в неговата средна част или наблюдение на феталното сърце с движения на сърдечните клапи и септи.

Плацентоми - ехогенни образувания изпъкнали над повърхността на маточната лигавица или ехогенни образувания с С-образна форма свързани с маточната стена.

Части на плода - ясно диференциране на ехогенни заложи на крайници глава и тяло на плода.

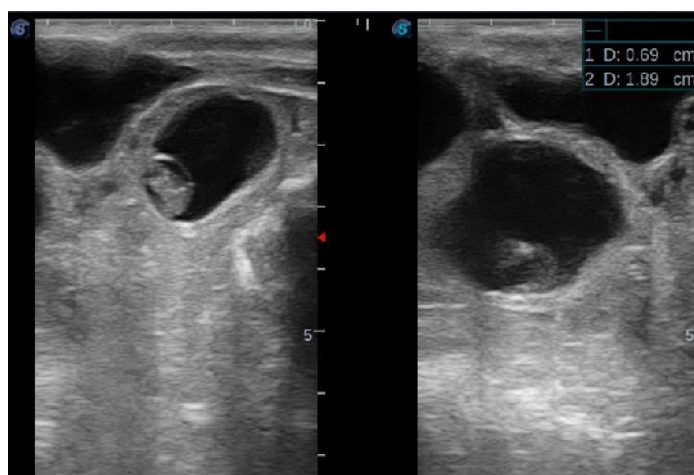
Положителната диагноза бременност в периода 20-35-ти ден се основаваше на визуализацията на ехогенен ембрион, разположен в увеличения маточен лумен, изпълнен с анехогенна околоплодна течност. На 60-ия ден диагнозата се базираше на наблюдение на части на плода, видима сърдечна дейност и плацентоми. Отрицателната диагноза за бременност се поставяше при липса на горепосочените индикатори за бременност, съобразно времето за изследване след осеменяване.



Фигура 7. Индикатори за диагностика на бременност и ембрио-фетално развитие при овце (А - ембрион; В - фетус; С - плацентоми; D - фетален череп).

2.7.4 Ехографско определяне на броя на ембрионите.

Определянето на броя на ембрионите беше базирано на тяхното преброяване по метода описан от Gearhart et al. (1988). За по-лесното им преброяване и елиминирание на диагностичната грешка беше използван В/В режим на работа на ехографския апарат (Фиг. 8). След сравняване на данните от две последователни изследвания, беше изчислен точния брой на ембрионите за съответната гестационна фаза.



Фигура 8. Ехографска картина на ембрионите при двуплодна бременност на овца (В-В режим на работа на апарата).

2.7.5 Ехографска идентификация на ембрионалната смъртност.

Случаите с редуциран брой на ембрионите, установен при две последователни ехографски изследвания, но с установен поне един жизнен ембрион при последния ехографски преглед бяха приемани като частична късна ембрионална смъртност. Случаите с установена пълна липса на ембрион/и след предходно установена бременност бяха приемани за тотална късна ембрионална смъртност.

2.8 Статистическа обработка на данните и снимков материал.

Получените резултати бяха обработени чрез компютърна статистическа програма Statistica 7.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA).

Определяни бяха средни стойности и стандартно отклонение (Mean±Sd), относителен дял (%), влияние на фактора (Wilks-lambda), корелационен коефициент (R) и степен на достоверност (P).

Сравняването на две средни стойности или пропорции се извършваше чрез параметричен анализ за сравнение на средни аритметични стойности и пропорции, базиран на t критерия на Student. За сравняване на повече от две средни стойности се използваше ANOVA (analysis of variance) и LSD или post-hoc Tukey-test. Влиянието на фактора беше определено чрез ANOVA и Wilks-lambda тест, а зависимостите между различните параметри чрез корелационен анализ. Разликите се приемаха за достоверни при минимално ниво на статистическа значимост $P < 0.05$.

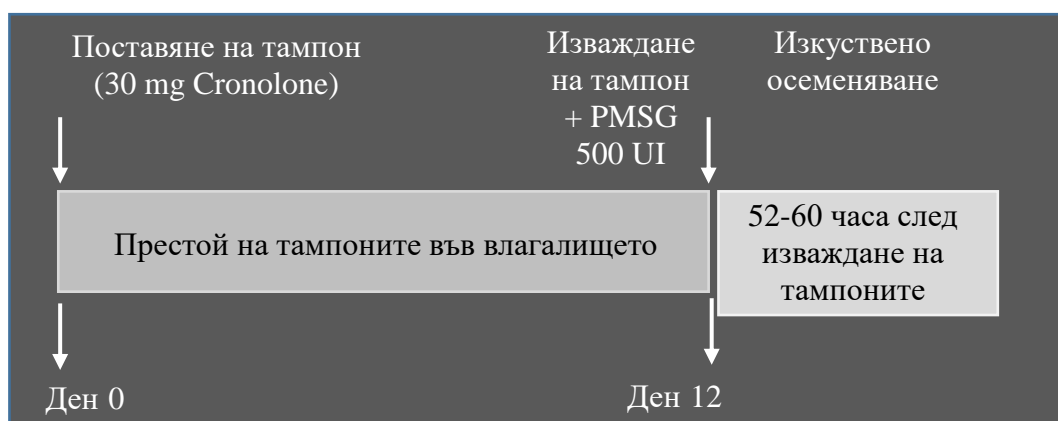
Ехографските снимки бяха записани чрез софтуера на ехографския апарат и прехвърлени на електронен носител. Фотографските снимки бяха направени с високочестотна дигитална камера от мобилен телефон. Допълнително снимковият материал беше обработен чрез компютърна програма Microsoft PowerPoint (Microsoft Corp. Inc.).

3. Опитни постановки

3.1 Влияние на кинематичните параметри на семенната течност от кочове върху репродуктивно състояние на овце от направление за мляко след приложение на асистиран репродуктивни технологии.

В опита бяха включени 15 коча и 487 овце-майки в размножителен период. Животните бяха разделени на групи в зависимост от породата. В група I бяха включени 8 коча и 325 овце от породата Източнофризийска овца и група II 7 коча и 162 овце от породата Асааф.

Женските животни от породата Източнофризийска овца бяха на възраст от 2 до 3 години и живо тегло между 60 и 70 kg, а мъжките на възраст от 1.8 до 3 години и живо тегло между 80 и 90 kg. Женските животни от породата Асааф бяха на възраст от 2 до 3 години и живо тегло между 65 и 70 kg, а мъжките на възраст от 2 до 3 години и живо тегло между 90 и 100 kg. Технологията на отглеждане беше свободна в отделни помещения, храненето с обща смесена дажба и получаване на вода на воля. Доенето беше автоматизирано в доилна зала. Овцете бяха в края на лактацията (средно дневна млечност <250 ml). Всички овце бяха подложени на синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване със свежа сперма (Фиг. 9).



Фигура 9. Схема на синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване при високопродуктивни овце от направление за мляко.

Еякулатите на кочовете бяха получени чрез метода на изкуствената вагина, след което беше направена макроскопска, микроскопска и CASA анализ. Използвани бяха само добри еякулати, отговарящи на стандартните изисквания за свежа сперма от кочове.

Отчетени бяха възраст (месеци), живо тегло (kg) на мъжките разплодници, обем на еякулата (ml) и концентрация на сперматозоидите ($\times 10^9/\text{ml}$). Кинематичните параметри включваха обща, прогресивна и непрогресивна подвижност на сперматозоидите, неподвижни сперматозоиди, LIN и STR в % и VAP, VCL и VSL в $\mu\text{m/s}$ (Фиг. 10).



Фигура 10. Блок схема на опитната постановка при овце от направление за мляко след приложение на асистиран репродуктивни технологии.

След отчитане на данните от раждането бяха определени следните параметри характеризиращи репродуктивното състояние на овцете от съответната порода:

Стойност на бременността определена при раждане (%) – брой на родилите животни/брой на осеменените животни $\times 100$ (Kaulfuss et al., 1999)

Среден брой на родените агнета за една овца (n) - брой на родените агнета/брой на родилите овце

Животни с едноплодна бременност (%) - брой на овцете родили един плод/общ брой на родилите овце x 100

Животни с двуплодна бременност (%) - брой на овцете родили два плода / общ брой на родилите овце x 100

Животни с триплодна бременност (%) - брой на овцете родили три плода/общ брой на родилите овце x 100

Мъжки агнета (%) - брой на родените мъжки агнета/общ брой на родените агнета x 100

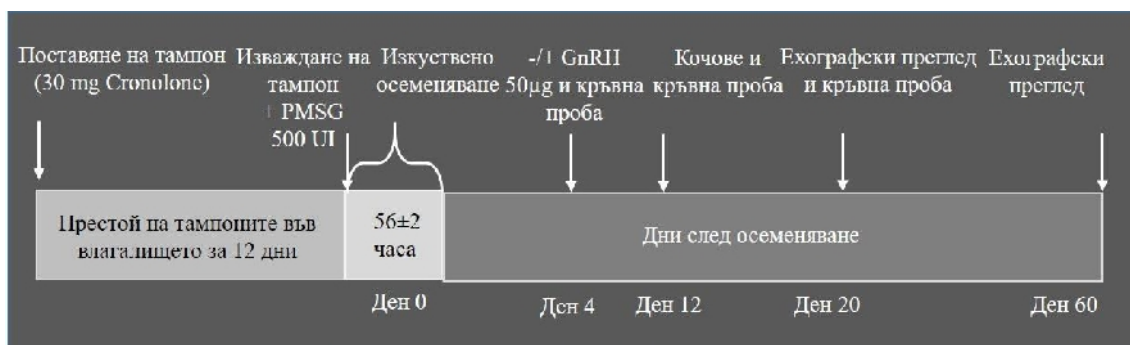
Женски агнета (%) - брой на родените женски агнета/общ брой на родените агнета x 100

Сравняването на средните стойности и процентите за отчетените параметри при мъжките и женските животни беше извършено чрез параметричен метод за сравнение на средни аритметични стойности и пропорции, базиран на t критерия на Стюdent. Влиянието на параметрите на семенната течност върху репродуктивното състояние на овцете се определяше чрез вариационен и корелационен анализ.

3.2 Влияние на ранното гонадотропиново третиране върху профила на прогестерон при овце от направление за мляко и доказване на ранна ембрионална смъртност.

В опитната постановка за модел бяха използвани 11 коча и 67 овце-майки от породата Източнофризийска овца в края на лактацията, отглеждани в интензивна овцеферма за мляко. Овцете бяха на възраст от 2 до 3 години с живо тегло тегло 65-70 kg и технология на свободно отглеждане в групови боксове. Опитът беше проведен през размножителен период (септември - октомври). Всички овце бяха подложени на синхронизация на еструса и изкуственото осеменяване със свежа сперма.

Животните бяха разделени в две групи - I (контролна група, n=30) и II (GnRH група, n=37). Група I не беше третирана, а група II получаваше 50 µg гонадорелин като диацетат (Ovarelin®, Ceva Sante Animale, Франция) на ден 4-ти след изкуственото осеменяване. Фертилни кочове в съотношение мъжки/женски 1/6 бяха въведени във всяка група на ден 12 и отстранени на ден 20 след изкуственото осеменяване (Фиг. 11).



Фигура 11. Опитна постановка при определяне на ефекта на ранното GnRH третиране върху прогестероновия профил при овце от направление за мляко.

Ехографски изследвания за бременност бяха проведени на 20-ия и 60-ия ден.

Всички овце бяха изследвани първоначално чрез трансабдоминална ехография, а при отрицателна диагноза за бременност и чрез трансректална ехография. Въз основа на резултатите от ехографските прегледи овцете бяха разделени на небременни и бременни.

Кръвни проби за анализ на прогестерон бяха получени на дни 4, 12 и 20 след изкуственото осеменяване. Статистическият анализ на P4 концентрациите при всички животни на 12-ия ден, показваше значително ($P < 0.003$) по-високи стойности при бременните, отколкото при небременни овце. За изключване на възможното влияние на броя на ембрионите и GnRH третирането, най-ниската концентрация на прогестерон за животните в двете групи на Ден 12, но с доказана бременност чрез ехография на ден 20, бяха приети като индикативни за бременност на Ден 12 след изкуственото осеменяване. Подгрупите от небременни овце, овце заплодени след покриване от коч (ОЗСПК) и бременни след изкуствено осеменяване (БСИО) за контролната и GnRH групата бяха сформирани ретроспективно на базата на данните от последното ехографско изследване.

Овцете, регистрирани като небременни чрез ехография на 20-ия ден, но имали концентрации на прогестерон над индикативните за бременност на 12-ия ден, бяха приемани за животни претърпели ранна ембрионална смърт. Ранната ембрионална смъртност (РЕС) се изчисляваше като процент на животните с ембрионална загуба, спрямо общия брой на овцете във всяка група.

Категоризацията на животните в контролната и GnRH групата се базираше на данните от ехографските изследвания за бременност. Процентите на небременни и бременни животни се отчитаха спрямо общия брой животни в групата през отделните дни на изследване и общо за периода.

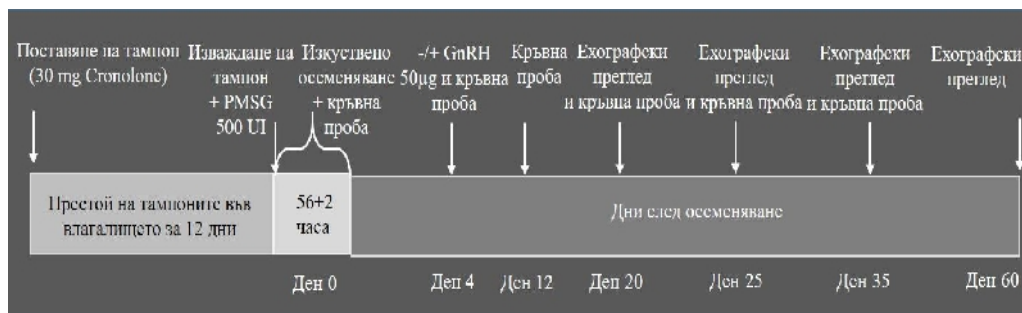
Концентрациите на прогестерон (ng/mL) в отделните подгрупи при контролните и хормонално третирани овце в зависимост от деня след изкуствено осеменяване бяха представени като средни аритметични стойности ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) и сравнени чрез ANOVA и post-hoc Tukey-test. Ефектите на деня след изкуствено осеменяване, GnRH третирането и репродуктивното състояние (небременни, заплодени след покриване от коч и бременни овце) върху прогестероновия профил се определяха чрез ANOVA и Wilks-lambda test. Разликите се приемаха за достоверни при минимално ниво на значимост $P < 0.05$.

3.3. Влияние на ранното гонадотропиново третиране върху гликопротеините свързани с бременността при овце от направление за мляко и доказване на късна ембрионална смъртност.

В опитната постановка за модел бяха използвани 4 коча и 65 овце-майки от породата Източнофризийска овца в края на лактацията, отглеждани в интензивна овцеферма за производство на мляко. Животните бяха на възраст от 2 до 3 години с живо тегло тегло 65-70 kg и технология на свободно отглеждане в групови боксове. Опитът беше проведен през размножителен период (септември-октомври). Всички овце бяха подложени на синхронизация на еструса и изкуственото осеменяване със свежа сперма.

Животните бяха разделени в две групи - I (контролна група, $n=35$) и II (GnRH група, $n=30$). Група I не беше третирана, а група II получаваше 50 μg гонадорелин като диацетат (Ovarelin®, Ceva Sante Animale, Франция) на ден 4 след изкуственото осеменяване.

Ехографски изследвания за бременност бяха извършени на дни 20, 25, 35 и 60 след изкуственото осеменяване (Фиг. 12).



Фигура 12. Опитна постановка при определяне на ефекта на ранното GnRH третиране върху гликопротеините свързани с бременността при овце от направление за мляко.

Всички овце бяха изследвани първоначално чрез трансабдоминална ехография, а при отрицателна диагноза за бременност и чрез трансректална ехография. Случаите с липса на ембрион/и след предходно установена бременност се считаха за късна ембрионална смърт. Късната ембрионална смъртност (КЕС) се изчисляваше на базата на непотвърдените положителни диагнози за бременност, спрямо всички положителни диагнози, поставени при предходното ехографско изследване. Въз основа на резултатите от ехографските прегледи на овцете през различните дни след осеменяване, животните от контролната и GnRH третираната група бяха категоризирани в подгрупи като небременни, бременни и овце с късна ембрионална смърт на ембриона.

Отчетени бяха общите стойности на небременни, бременни животни и овце с късна ембрионална смъртност. Сравнението на стойностите беше извършено чрез праметричен анализ за сравнение на проценти.

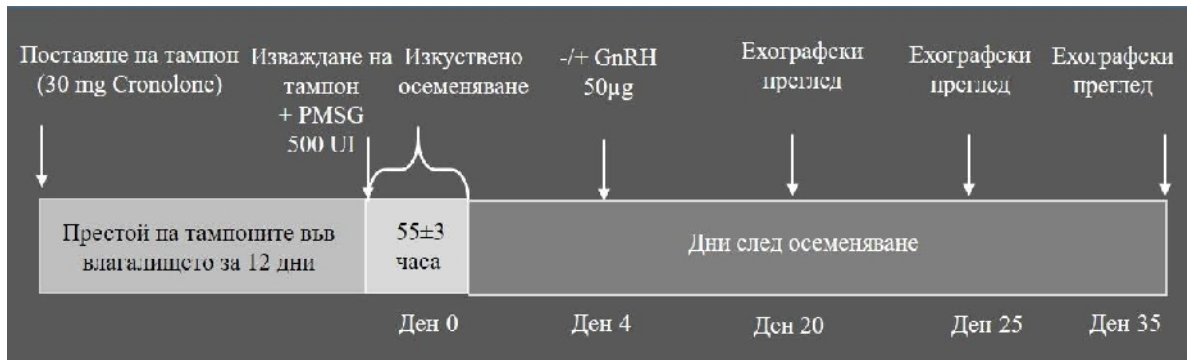
Концентрациите на гликопротеините свързани с бременността бяха представени като измерена стойност на оптичната плътност на пробата минус тази на негативната контрола и се определяха на дни 0, 12, 25 и 35 след изкуственото осеменяване. Когато стойността за всяка проба беше ≥ 0.300 , животното беше определяно като бременно.

За целта бяха използвани ELISA и Alertys Ruminant Pregnancy Tes[®] (IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME, USA). Точност, чувствителност и специфичност на PAG теста за определяне на бременност на ден 35-ти се отчитаха след сравнение на PAGs данните с ехографските резултати от ден 60 след изкуственото осеменяване, използвайки метода адаптиран от Ricci et al. (2015). Стойностите на PAGs за животните с различен репродуктивен статус (небременни, бременни и овце с късна ембрионална смърт на ембриона) от контролната и хормонално третираната група бяха представени като графика и сравнени чрез ANOVA и post-hoc Tukey-test. Връзката между дните след осеменяване и промяната в концентрациите на PAGs при различните подгрупи беше изследвана чрез корелационен анализ.

3.4 Влияние на ранното гонадотропиново третиране върху репродуктивното състояние и биометричните показатели диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при овце от направление за мляко с нормално протичаща бременност и частична късна ембрионална смъртност.

В опита бяха включени 4 коча и 24 овце-майки от породата Източнофризийска овца, отглеждани в интензивна овцеферма за производство на мляко. Животните бяха на възраст от 2.5 до 3.2 години с живо тегло 65-75 kg и технология на свободно отглеждане в групови боксове. Опитът беше проведен през размножителен период (август-септември).

Всички овце бяха синхронизирани и изкуствено осеменени със свежа сперма, след което бяха разделени на контролна група (n=12) и GnRH третирана група (n=12), инжектирана с 50 µg GnRH (Ovarelin, Ceva Sante Animale, France) на ден 4 след осеменяването (Фиг. 13).



Фигура 13. Опитна постановка при определяне на ефекта на ранното GnRH третиране върху репродуктивно състояние и някои биометрични показатели при овце от направление за мляко.

Ехографски изследвания за бременност на овцете бяха извършени на 20-ти, 25-ти и 35-ти ден след осеменяване. Определяни бяха параметри характеризирани репродуктивното състояние, като стойност на бременността, животни с едноплодна и многоплодна бременност и процент на животните с тотална и частична късна ембрионална смърт. При бременните овце от контролната и хормонално третираната група беше определен броя на ембрионите и стойностите на биометричните показатели диаметър на маточния лумен (ДМЛ) и размер на ембриона (РЕ) за съответните гестационни дни. Измерването на диаметъра на маточния лумен (в надлъжен срез проекция на ембриона) и размера на ембрионите (в надлъжен срез проекция) в сантиметри се извършваше чрез софтуера на ехографския апарат (Фиг. 14).

Случаите с редуциран брой на ембрионите, установен при две последователни ехографски изследвания, но с установен поне един жизнен ембрион при последния ехографски преглед, се приемаха като частична късна ембрионална смъртност и бяха изчислени спрямо общия брой овце. Случаите с непотвърдена положителна диагноза след предходно установена бременност се приемаха за тотална късна ембрионална смърт.



Фигура 14. Ехографски изображения при определяне на диаметър на маточния лумен и размер на ембриона през различните гестационни дни.

Поради липса на достоверни разлики в показателите ДМЛ и РЕ за нетретирани и хормонално третирани овце и тези с едноплодна и многоплодна бременност, бяха определени стойностите за овце с нормално протичаща бременност и с частична късна ембрионална смърт, общо за двете групи.

Стойностите на едни и същи показатели, характеризиращи репродуктивното състояние при овцете от контролната и хормонално третираната група бяха сравнени чрез параметричен анализ, а връзката между дните на бременността и промяната в ДМЛ и РЕ беше изследвана чрез корелационен анализ.

V. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Влияние на кинематичните параметри на семенната течност от кочове върху репродуктивно състояние на овце от направление за мляко след приложение на асистиран репродуктивни технологии.

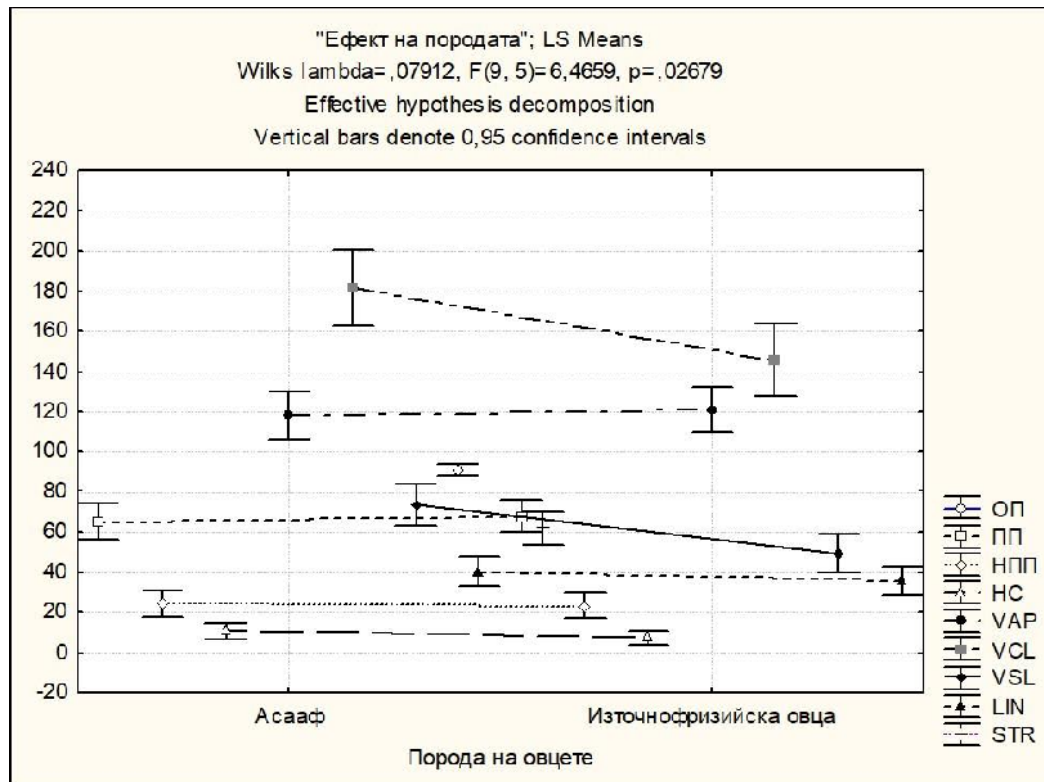
Получените резултати за възраст, живо тегло и параметри еякулата на разплодниците от двете породи са представени на Табл. 1. При сравняване на средните стойности за възраст на кочовете (ВК), живо тегло (ЖТ), обем на еякулата (ОЕ) и концентрация на сперматозоидите не бяха доказани достоверни разлики.

Таблица 1. Възраст, живо тегло и параметри на еякулата при кочове от породите Източнофризийска овца и Асааф.

Порода	ВК (месеци)	ЖТ (kg)	Параметри на еякулата	
			ОЕ (ml)	КС (x 10 ⁹ /ml)
Източнофризийска овца (n=8)	40±6.9	81.7±2.9	1.68±0.63	2.58±0.96
Асааф (n=7)	32.6±3.2	73.9±4.6	1.59±0.32	2.02±0.93

ВК - възраст на кочовете, ЖТ - живо тегло, ОЕ - обем на еякулата,
КС - концентрация на сперматозоидите

Вариационният анализ беше индикативен за значително влияние на породата на кочовете върху показателите характеризиращи подвижността и скоростните характеристики на сперматозоидите (Wilks-lambda =0.079, P=0.026) (Фиг. 15).

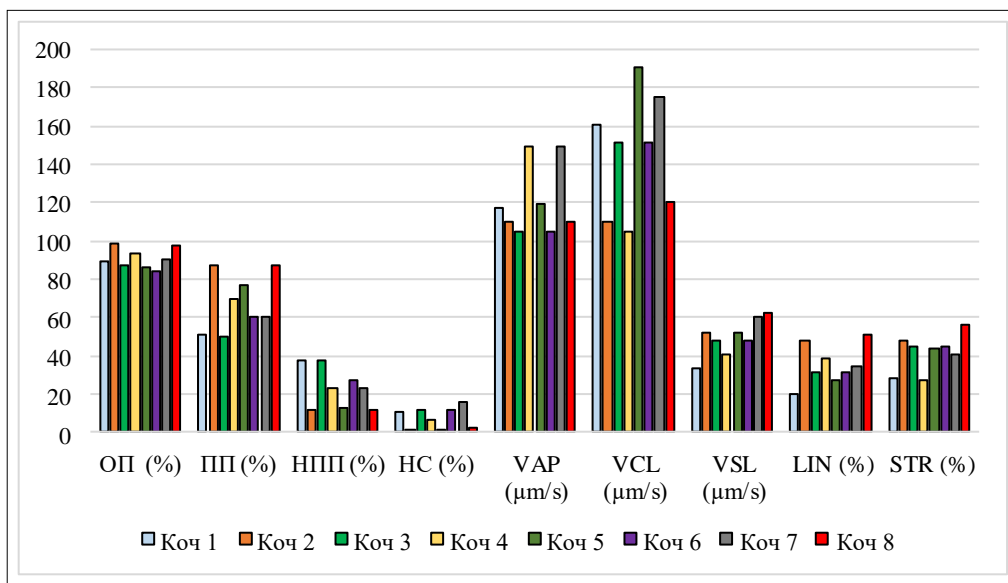


Фигура 15. Ефект на породата на овците върху кинематичните параметри на семенната течност.

ОП - обща подвижност, ПП - прогресивна подвижност, НПП - непрогресивна подвижност, НС - неподвижни сперматозоиди, VAP - средна скорост на пътя, VCL - криволинейна скорост, VSL - скорост по права линия, LIN - линейност на движението, STR - праволинейни настъпателни движения

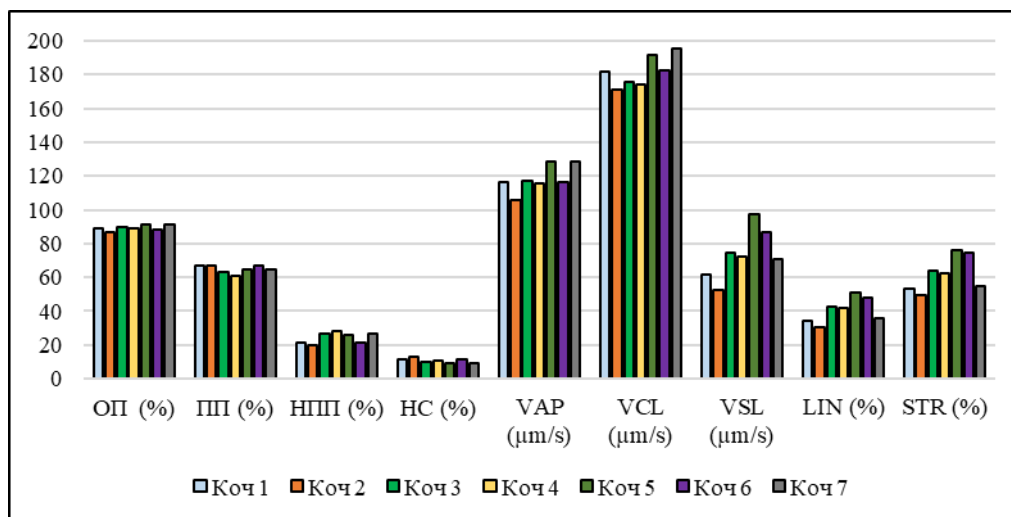
Данните при отделните кочове също показваха индивидуална вариабилност в характеристиките на двигателната активност. За породата Източнофризийска овца показателят обща подвижност за кочове №№ 2, 4 и 8 беше с около 10% по-висок от тези при останалите разплодници (Фиг. 16). Подобни увеличения (>15%) бяха регистрирани за ПП при кочове №№ 2, 3, 4 и 7, за НПП при кочове №№ 1 и 3 и за НС при кочове №№ 1, 3 и 6.

В същото време, вариабилността в общата подвижност и прогресивната подвижност при породата Асааф беше по-слабо изразена, с известни различия в непрогресивната подвижност и неподвижните сперматозоиди, съответно при кочове №№ 4 и 7 и кочове №№ 2 и 6 (Фиг. 17).



Фигура. 16 Кинематични параметри на семенната течност при различните кочове от породата Източнофризийска овца.

ОП - обща подвижност, ПП - прогресивна подвижност, НПП - непрогресивна подвижност, НС - неподвижни сперматозоиди, VAP - средна скорост на пътя, VCL - криволинейна скорост, VSL - скорост по права линия, LIN - линейност на движението, STR - праволинейни настъпателни движения



Фигура 17. Кинематични параметри на семенната течност при различните кочове от породата Асааф.

ОП - обща подвижност, ПП - прогресивна подвижност, НПП - непрогресивна подвижност, НС - неподвижни сперматозоиди, VAP - средна скорост на пътя, VCL - криволинейна скорост, VSL - скорост по права линия, LIN - линейност на движението, STR - праволинейни настъпателни движения

По-значителни индивидуални разлики бяха регистрирани в кинематичните параметри. За породата Източнофризийска овца разликите бяха в показателите VAP при кочове №№ 4 и 7 ($>150\mu\text{m/s}$), VCL при кочове №№ 1, 5 и 7 ($\geq 160\mu\text{m/s}$), VSL при кочове №№ 7 и 8 ($>60\mu\text{m/s}$) и LIN и STR при кочове №№ 2 и 8 ($>50\%$). За кочовете Асааф те бяха най-ясно изразени в показателите VAP при кочове №№ 5 и 7 ($>120\mu\text{m/s}$), VCL при кочове №№ 1, 5 и 7 ($\geq 180\mu\text{m/s}$), VSL при кочове №№ 5 и 6 ($>80\mu\text{m/s}$), за LIN при коч № 5 ($>50\%$) и STR при кочове №№ 5 и 6 ($>60\%$).

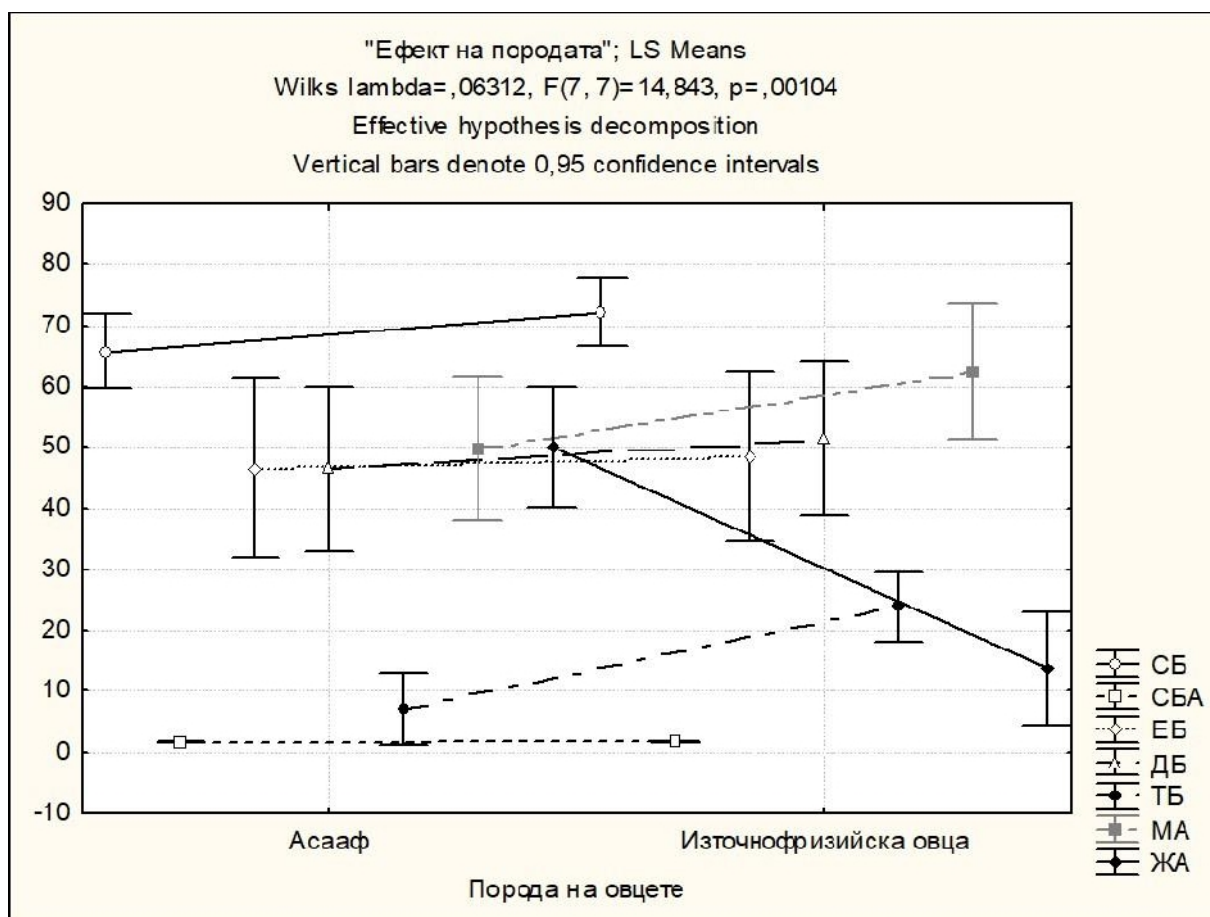
При отчитане на репродуктивно състояние на овцете беше установено, че породата оказва влияние върху някои от неговите характеристики ($\text{Wilks-lambda} = 0.63$, $P=0.01$) (Фиг. 18). Стойността на бременността, средния брой агнета за овца, процента на животни с двуплодна бременност и стойностите за мъжки и женски агнета не се различаваха значително между породите Източнофризийска овца и Асааф (Табл. 2). Едноплодните бременности обаче, бяха повече в групата на овцете от породата Асааф, отколкото в групата на Източнофризийските овце ($46.5\pm 24.5\%$ срещу $20.6\pm 9.7\%$; $P<0.01$), докато резултатът за триплодната бременност беше противоположен ($19.1\pm 16.7\%$ срещу 4.2 ± 7.2 ; $P<0.04$).

Таблица 2. Параметри характеризиращи репродуктивното състояние на овце от породите Източнофризийска овца и Асааф.

Порода	Параметри характеризиращи репродуктивното състояние						
	СБ (%)	СБА (n)	ЕБ (%)	ДБ (%)	ТБ (%)	МА (%)	ЖА (%)
Източнофризийска овца (n=325)	74.2±8.93	1.89±0.2	20.6±9.7 ²	60.3±14.2	19.1±16.7 ²	49.3±8.7	50.7±8.7
Асааф (n=162)	66.7±7.8	1.75±0.1	46.5±24.5 ¹	49.3±23.2	4.2±7.2 ¹	49.9±14.9	50.1±14.9

СБ - стойност на бременността, СБА - среден брой на родените агнета за овца,
 ЕБ - едноплодна бременност, ДБ - двуплодна бременност, ТБ - триплодна бременност,
 МА - мъжки агнета, ЖА - женски агнета

Стойностите в колоната с различни цифри се различават при ниво на значимост $P<0.05$



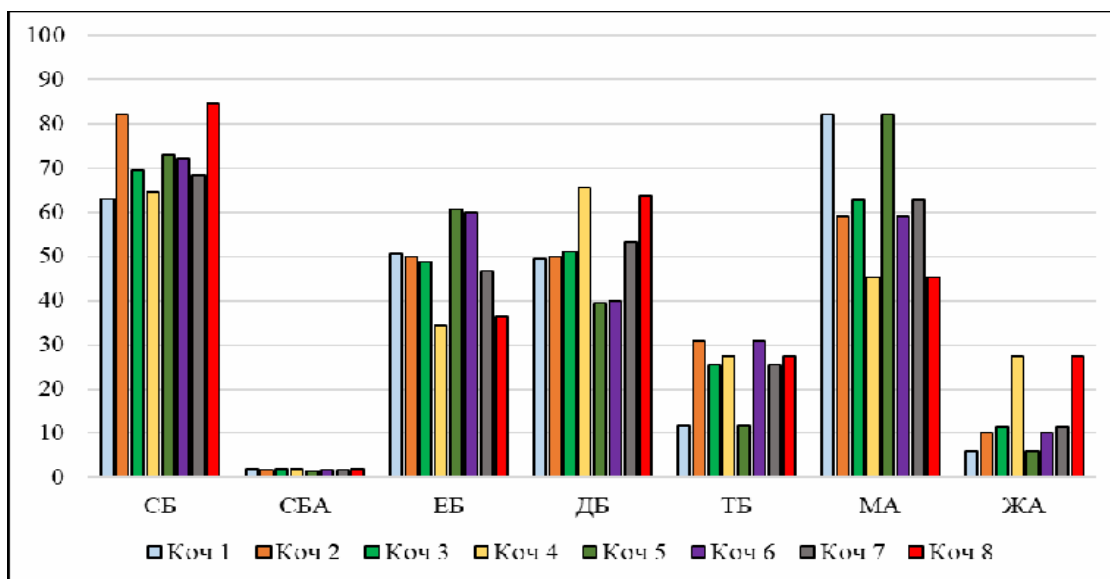
Фигура 18. Ефект на породата на овците върху характеристиките на репродуктивното състояние на овците.

СБ - стойност на бременността, СБА - среден брой на родените агнета за овца,
 ЕБ - едноплодна бременност, ДБ - дуплодна бременност, ТБ - триплодна бременност,
 МА - мъжки агнета, ЖА - женски агнета

Резултатите за показателите характеризиращи репродуктивното състояние на овците в зависимост от използвания коч за осеменяване също показваха индивидуални различия (Фиг. 19 и 20).

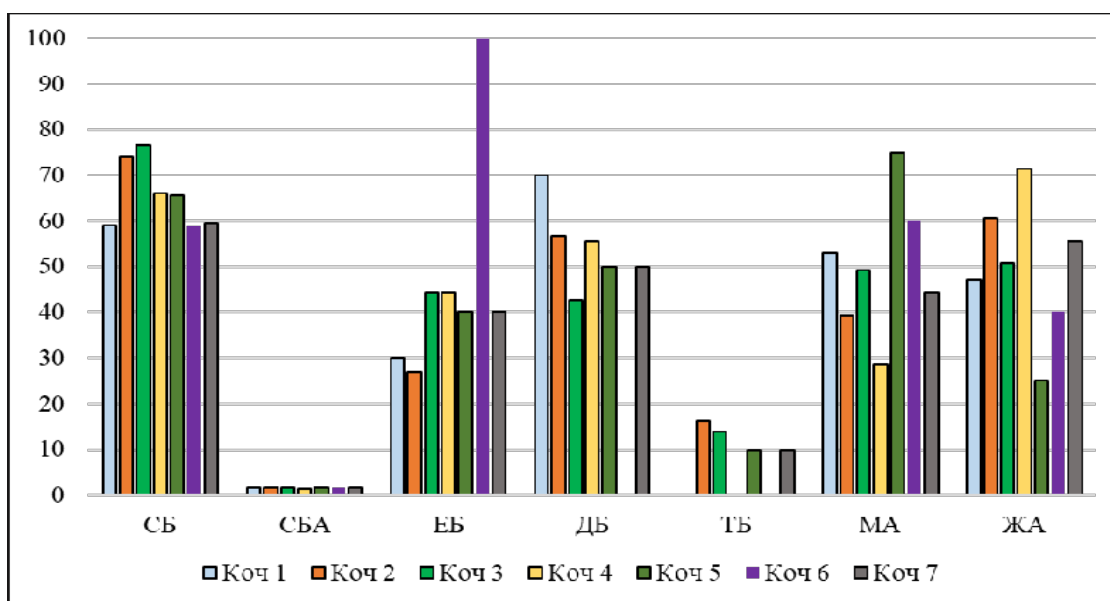
За породата Източнофризийска овца, стойностите на бременността бяха при кочове №№ 2 и 8 бяха >80% и надвишаваха тези при останалите разплодници, докато най-високи стойности на ДБ и ТБ се установяваха, съответно при кочове №№ 4 и 8 и кочове №№ 2 и 6.

Подобен резултат за породата Асааф беше констатиран при кочове №№ 1 и 2, свързано с най-високи стойности на дуплодна и триплодна бременност. Данните за триплодна ($\geq 30\%$) бременност при кочове №№ 2 и 6 от породата Източнофризийска овца надвишаваха най-високата стойност ($\geq 16.2\%$) за същия показател, регистрирана при породата Асааф. Правеше впечатление изключително силната индивидуална вариабилност в процента на родените мъжки и женски агнета, в зависимост от използвания разплодник и при двете породи.



Фигура 19. Репродуктивно състояние на овце от породата Източнофризийска овца в зависимост от използвания мъжки разплодник.

СБ - стойност на бременността, СБА - среден брой на родените агнета за овца,
 ЕБ - едноплодна бременност, ДБ - дуплодна бременност, ТБ - триплодна бременност,
 МА - мъжки агнета, ЖА - женски агнета



Фигура 20. Репродуктивно състояние на овце от породата Асааф в зависимост от използвания мъжки разплодник.

СБ - стойност на бременността, СБА - среден брой на родените агнета за овца,
 ЕБ - едноплодна бременност, ДБ - дуплодна бременност, ТБ - триплодна бременност,
 МА - мъжки агнета, ЖА - женски агнета

Поради факта, че липсваха достоверни разлики във възрастта, живото тегло и параметрите на еякулата на кочовете между отделните породи и с оглед елиминиране на индивидуалните ефекти на коча и породата върху кинематичните параметри и показателите характеризиращи репродуктивното състояние, връзките между различните кинематични параметри и между характеристиките на репродуктивното състояние бяха изследвани, общо за двете породи (Табл. 3 и Табл. 4).

При отчитане на корелационните зависимости между характеристиките на подвижността и скоростните индикатори на сперматозоидите, корелацията на общата подвижност с прогресивната подвижност и линейността на движението беше положителна ($P < 0.05$), а корелациите с неподвижните сперматозоиди и криволинейната скорост бяха отрицателни ($P < 0.05$) (Табл. 3). От своя страна, прогресивната подвижност беше в положителна корелация с LIN и STR, докато с НПП, НС и VCL, колелацията беше отрицателна ($P < 0.05$). Подобна отрицателна зависимост беше установена между НПП и ПП спрямо STR и между LIN и VCL ($P < 0.05$). Показателите VSL и LIN бяха в силна положителна зависимост със STR ($P < 0.05$).

Резултатите за връзката между кинематика на сперматозоидите и репродуктивно състояние показваха тенденция към положителна зависимост на ОП със СБ ($P = 0.052$) и висока положителна корелация между ПП и СБ ($P < 0.05$). Зависимостите на VCL със СБ, ДБ и ТБ бяха отрицателни ($P < 0.05$), докато тези на LIN и STR със СБ, СБА, ДБ и ТБ бяха положителни ($P < 0.05$).

Установена беше тенденция ($P = 0.051$) увеличената стойност на бременността да води до повишаване на средния брой на родените агнета и силна положителна зависимост между СБА и ТБ ($P < 0.05$) (Табл. 4). Същевременно средният брой на родените агнета корелираше отрицателно с едноплодната бременност и положително с триплодната бременност ($P < 0.05$). Отчетени бяха много високи отрицателни корелации между едноплодна и двуплодна бременност ($P < 0.05$) и родените мъжки и женски приплоди ($P < 0.05$). Влиянието на останалите показатели върху тези два параметъра беше незначително.

Таблица 3. Коефициенти на корелация между кинематичните параметри на сперматозоидите и характеристиките на репродуктивното състояние.

	ОП	ПП	НПП	НС	VAP	VCL	VSL	LIN	STR
ОП	1								
ПП	0.78*	1							
НПП	-0.56	-0.96*	1						
НС	-1.00*	-0.78*	0.56	1					
VAP	0.45	0.55*	-0.28	-0.28	1.00				
VCL	-0.74*	-0.59*	-0.36	-0.39	0.16	1.00			
VSL	0.35	0.40	0.45	0.53	0.10	0.15	1.00		
LIN	0.74*	0.80*	0.42	0.49	0.25	-0.60*	0.29	1.00	
STR	0.47	0.56*	-0.68*	-0.76*	-0.39	-0.10	0.92*	0.88*	1.00
СБ	0.51	0.62*	-0.11	-0.11	0.62*	-0.65*	0.35	0.86*	0.55*
СБА	0.30	0.21	-0.23	-0.20	0.31	-0.47	0.52	0.87*	0.77*
ЕБ	-0.13	0.17	-0.28	0.13	0.30	-0.18	0.48	0.51	0.30
ДБ	0.04	-0.25	0.34	-0.04	0.08	-0.53*	0.10	0.62*	0.62*
ТБ	0.24	0.15	-0.09	-0.24	0.26	-0.71*	0.27	0.64*	0.54*
МА	0.18	0.09	-0.03	-0.18	0.15	-0.16	0.23	0.47	0.38
ЖА	-0.18	-0.09	0.03	0.18	0.26	-0.08	0.34	0.38	0.44

ОП - обща подвижност; ПП - прогресивна подвижност; НПП - непрогресивна подвижност;

НС - неподвижни сперматозоиди; VAP - средна скорост на пътя, VCL - криволинейна скорост; VSL - скорост по права линия; LIN - линейност на движението; STR - праволинейни настъпателни движения; СБ - стойност на бременността; СБА – среден брой на родените агнета за овца;

ЕБ - едноплодна бременност; ДБ - двуплодна бременност; ТБ - триплодна бременност; МА - мъжки агнета; ЖА - женски агнета

Корелационните коефициенти маркирани със звездичка (*) са значими при ниво $P < 0.05$

Таблица 4. Коефициенти на корелация между характеристиките на репродуктивното състояние.

	СБ	СБА	ЕБ	ДБ	ТБ	МА	ЖА
СБ	1						
СБА	0.55	1					
ЕБ	-0.49	-0.52*	1				
ДБ	0.23	0.27	-0.92*	1			
ТБ	0.72*	0.67*	-0.38	-0.01	1		
МА	-0.11	-0.13	0.14	0.01	-0.37	1	
ЖА	0.11	0.13	-0.14	-0.01	0.37	-1.00*	1.00

СБ - стойност на бременността; СБА – среден брой на родените агнета за овца; ЕБ - едноплодна бременност;

ДБ - двуплодна бременност; ТБ - триплодна бременност; МА - мъжки агнета; ЖА - женски агнета

Корелационните коефициенти маркирани със звездичка (*) са значими при ниво $P < 0.05$

5.2 Влияние на ранното третиране с гонадотропен освобождаващ хормон върху профила на прогестерон при овце от направление за мляко и доказване на ранна ембрионална смъртност.

Резултатите от ехографското изследване за бременност на ден 20 след изкуственото осеменяване показваха, че процентите на небременните овце в двете групи не се различават съществено (Табл. 5). Установена беше тенденция към увеличаване на процента на бременните овце в GnRH групата, спрямо контролната група ($P=0.54$). Шест овце (37.5%) в контролната група и десет (62.5%) от хормонално третираната група определени като от небременни на 20-ия ден, бяха регистрирани като бременни при втория ехографски преглед. Процентите на небременни и бременни животни в двете групи на ден 60 също не се различаваха съществено.

Въпреки това, бременните овце в GnRH групата на 60-ия ден бяха значително ($P<0.05$) повече от установените на 20-ия ден (83.8% срещу 56.8%). Общата стойност на бременни животни в двете групи беше по-висока от регистрираната за небременните овце (76.1% срещу 23.9%; $P<0.05$).

Анализът на ефектите на отделните фактори върху прогестероновите концентрации показваше, че те нямат съвместно влияние върху P4 профила (GnRH x PC, сила на ефекта=0.26, $P=0.65$). Прогестероновите профили на небременните овце в контролната и GnRH третираната група, не се различаваха значително от ден 4-ти до ден 20-ти след изкуственото осеменяване. За разлика от това, допълнителният анализ на самостоятелните ефекти на GnRH третирането и репродуктивното състояние на животните беше показателен за значително влияние на всеки от изследваните фактори върху прогестероновия профил (Wilks-lambda GnRH=0.80, $P=0.0045$; и Wilks-lambda =0.094, $P=0.000$) (Фиг. 21AB).

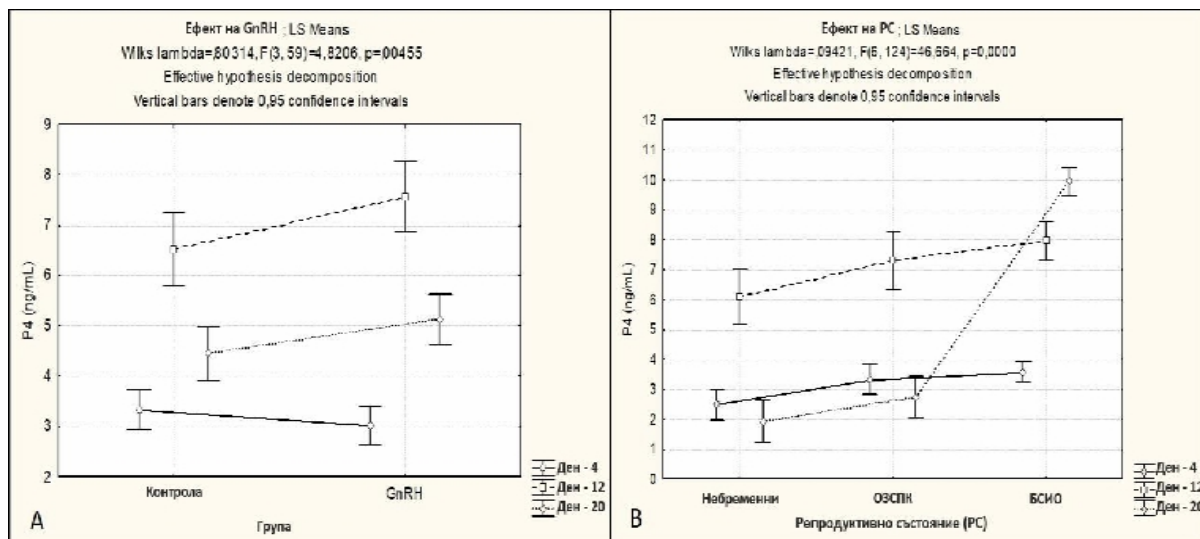
Таблица 5. Небременни и бременни овце в контролната и GnRH третираната група през различните дни след изкуствено осеменяване, базирано на ехографските диагнози.

Ден след ИО	Групи			
	Небременни овце		Бременни овце	
	Контрола n=30	GnRH n=37	Контрола n=30	GnRH n=37
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
20	53.3 (16)	43.2 (16)	46.7 (14)	56.8 (21) ¹
60	30.8 (10)	16.2 (6)	69.2 (20)	83.8 (31) ²
Общо	23.9 (16/67) ^a		76.1 (51/67) ^b	

ИО - изкуствено осеменяване; GnRH - гонадотропен освобождаващ хормон

Стойностите в колоната с различни цифри се различават при ниво на значимост $P<0.05$

Стойностите в редицата с различни букви се различават при ниво на значимост $P<0.05$



Фигура 21. Ефект на GnRH третирането (А) и репродуктивно състояние на животните (В) върху концентрациите на прогестерон през различните дни след осеменяване.

ИО - изкуствено осеменяване; GnRH - гонадотропен освобождаващ хормон;
 ОЗСПК - овце заплодени след покриване от коч; БСИО - бременни след изкуствено осеменяване овце

Средните концентрации на прогестерон при небременните овце в двете групи на 12-ия ден бяха по-високи ($P < 0.05$), в сравнение с измерените P4 концентрации на 4-ия ден (Табл. 6).

Таблица 6. Концентрации на прегестерон при небременни, овце заплодени след покриване от коч (ОЗСПК) и бременни след изкуствено осеменяване животни (БСИО) в контролната и GnRH третираната група (Mean±SD, ng/mL) .

Ден след ИО	Група I (контролна, n=30)			Група II (GnRH, n=37)		
	Небременни (n=10)	ОЗСПК (n=6)	БСИО (n=14)	Небременни (n=6)	ОЗСПК (n=10)	БСИО (n=21)
4	2.45±1.01 ^{a1}	3.82±1.95 ^{ab1}	3.74±0.73 ^{b1}	2.56±0.79 ^{a1}	3.03±0.88 ^{bc1}	3.45±0.98 ^{b1}
12	5.82±1.65 ^{a2}	6.43±2.52 ^{ab1}	7.53±1.09 ^{bc2}	6.50±2.11 ^{ab2}	7.81±2.44 ^{bc2}	8.38±0.91 ^{c2}
20	1.91±0.95 ^{a1}	1.97±0.88 ^{a2}	9.47±1.96 ^{c3}	1.93±0.43 ^{a1}	3.20±0.99 ^{b1}	10.26±1.69 ^{c3}

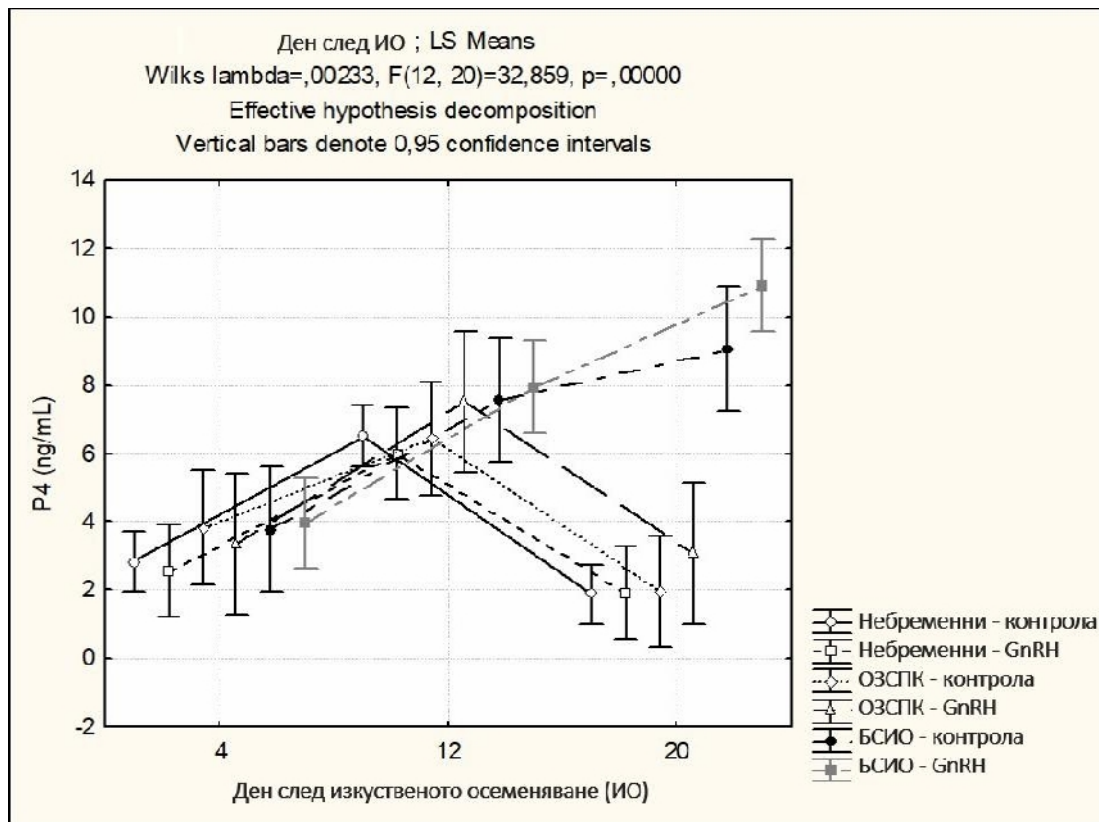
ИО - изкуствено осеменяване; GnRH - гонадотропен освобождаващ хормон;
 ОЗСПК - овце заплодени след покриване от коч; БСИО - бременни след изкуствено осеменяване овце

Стойностите в колоната с различни цифри се различават при ниво на значимост $P < 0.05$
 Стойностите в редицата с различни букви се различават при ниво на значимост $P < 0.05$

След това те бързо се понижаваха, като на ден 20 бяха близки до регистрираните на ден 4 и значително ($P < 0.05$) по-ниски от измерените стойности на ден 12. Подобно повишаване на P4 между ден 4-ти и 12-ти и спад на ден 20-ти след изкуственото осеменяване се наблюдаваше при овцете, заплодени след покриване от коч. Въпреки това, средната концентрация на P4 на ОЗСПК на ден 20-ти беше значително по-висока в GnRH, в сравнение с контролната група (3.20 ± 0.99 ng/mL срещу 1.97 ± 0.88 ng/mL; $P < 0.05$). Трябва да се отбележи, че независимо от по-ниската концентрация на прогестерон при ОЗСПК в GnRH групата, спрямо същите в контролната група на ден 4-ти (3.03 ± 0.88 ng/mL срещу 3.82 ± 1.95 ng/mL), концентрацията на P4 на ден 12-ти беше относително повишена, спрямо тази при небременните овце в GnRH групата (7.81 ± 2.44 ng/mL срещу 6.50 ± 2.11 ng/mL).

На ден 20-ти P4 при ОЗСПК в група II в оставаше по-висок от установения за небременните животни и ОЗСПК в контролната група.

При бременните животни след изкуствено осеменяване от различните групи беше установен силен положителен ефект на деня след осеменяване върху прогестероновия профил (Wilks-lambda=0.023, $P=0.000$; Фиг. 22) със значими ($P < 0.05$) разлики между средните стойности на P4, измерени през различните дни (Табл. 6).



Фигура. 22 Ефект на деня след изкуственото осеменяване върху концентрациите на прогестерон през различните дни след изкуствено осеменяване.

ИО - изкуствено осеменяване; GnRH - гонадотропен освобождаващ хормон;
 ОЗСПК - овце заплодени след покриване от коч; БСИО - бременни след изкуствено осеменяване овце

Средните стойности на P4 при бременните овце след изкуствено осеменяване в групи I и II на дни 4, 12 и 20 се различаваха статистически ($P < 0.05$). Тези данни подкрепяха предходния резултат за по-силен ефект на репродуктивния статус, в сравнение с GnRH ефекта върху концентрацията на прогестерон (сила на ефекта 1 срещу 0.74).

На ден 4-ти след осеменяването нивото на P4 при БСИО беше относително по-ниско в група II, отколкото в група I, а на дни 12 и 20 се установяваше тенденция да бъде по-високо при GnRH третираните, в сравнение с нетретираните овце. Освен това, на ден 20-ти средните прогестероновы концентрации при БСИО в група I и II бяха значително ($P < 0.05$) по-високи от тези в останалите подгрупи.

Ретроспективният анализ на концентрацията на прогестерон, измерена на 12-ия ден след изкуственото осеменяване и данните от ехографското изследване, показваха вероятност за настъпила ранна ембрионална смъртност в 33.3% и 24.3%, съответно при контролните и GnRH третираните овце, но без регистрирана статистическа разлика ($P = 0.19$). Изчислената обща стойност на ранната ембрионална смъртност за двете групи беше 25.4% (Табл. 7).

Таблица 7. Ранна ембрионална смъртност в различните групи, определена въз основа на измерените минимални концентрации на прогестерон за бременни животни на 12-ия ден след изкуствено осеменяване.

Индикативни стойности на прогестерон за бременност		
(P4 > 5.08 ng/mL) (P4 > 6.60 ng/mL)		
	Контролна група	GnRH група
	(n=30)	(n=37)
	% (n)	% (n)
PEC	33.3 (10)	24.3 (9)
Общо	25.4 (17)	

P4 - прогестерон; PEC - ранна ембрионална смъртност

5.3 Влияние на ранното третиране с гонадотропен освобождаващ хормон върху гликопротеините свързани с бременността при овце от направление за мляко и доказване на късна ембрионална смъртност.

Проведените ехографски изследвания в периода 20-ти 60-ти ден след изкуственото осеменяване показаха, че процентите на небременни овце в двете групи (22.9% и 16.7%) са идентични до последния преглед за бременност. Данните от ехографията на ден 20-ти след изкуственото осеменяване показваха тенденция към повишаване на процента на бременни овце в GnRH групата (83.3%), спрямо регистрирания (77.1%) в контролната група, но без статистическа значимост ($P > 0.05$) (Таблица 8).

Таблица 8. Небременни, бременни и овце с късна ембрионална смъртност в контролната и GnRH третираната група според дните след изкуствено осеменяване, базирано на ехографските диагнози.

Ден след ИО	Групи					
	Небременни		Бременни		КЕС	
	Контрола n=35 % (n)	GnRH n=30 % (n)	Контрола n=35 % (n)	GnRH n=30 % (n)	Контрола n=27 % (n)	GnRH n=25 % (n)
20	22.9 (8)	16.7 (5)	77.1 (27)	83.3 (25)	0 (0)	0 (0)
25	22.9 (8)	16.7 (5)	51.4 (18)	63.3 (19)	33.3 (9)	24 (6)
35	22.9 (8)	16.7 (5)	51.4 (18)	63.3 (19)	0 (0)	0 (0)
60	22.9 (8)	16.7 (5)	51.4 (18)	63.3 (19)	0 (0)	0 (0)
Общо	20 (13/65) ^a		56.9 (37/65) ^b		23.1 (15/65) ^a	

ИО - изкуствено осеменяване; GnRH - гонадотропен освобождаващ хормон;

КЕС - късна ембрионална смъртност

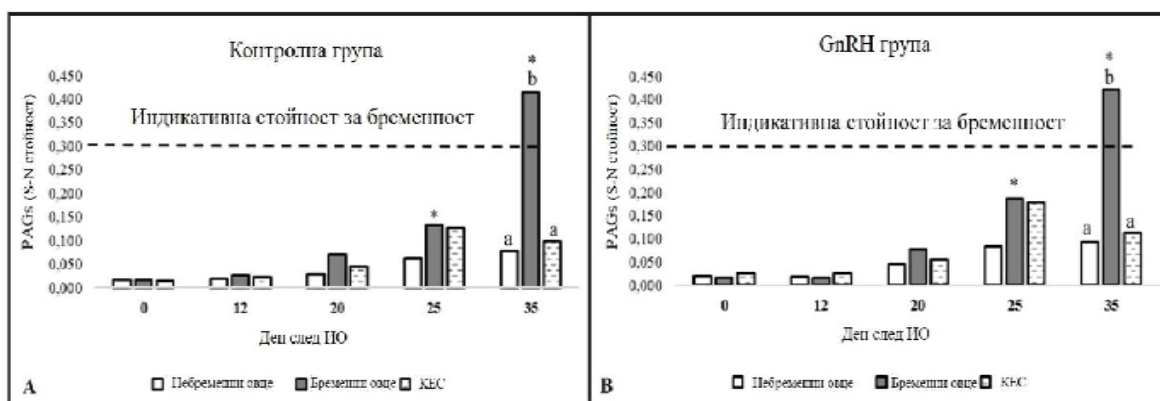
Стойностите в редицата с различни букви се различават при ниво на значимост $P < 0.05$

На ден 25-ти след изкуственото осеменяване, бременните животни от двете групи намаляваха съответно с 25.7% и 20%, като на ден 60 достигаха 51.4% за контролната и 63.3% за GnRH групата.

Ехографските резултати за бременност на 25-ия ден бяха индикативни за 33.3% и 24% късна ембрионална смъртност в периода 20-25-ти гестационен ден, респективно при контролните и GnRH инжектираните овце. Ехографията на ден 60-ти в двете групи потвърждаваше резултатите, получени на ден 25-ти след изкуственото осеменяване. Общата стойност на бременните овце (56.9%) беше значително ($P < 0.05$) по-висока от регистрираните стойности (20% и 23.1%) за небременни и овце с тотална късна ембрионална смърт.

Резултатите от изследването на гликопротеините свързани с бременността бяха показателни за отсъствие на разлики в PAGs профилите при овце с едно и също репродуктивно състояние в контролната и GnRH групата между 4-ти и 35-ти ден след изкуственото осеменяване. Средните стойности на PAGs при всички животни в периода от ден 0 до ден 20-ти след изкуственото осеменяване бяха > 0.100 и значително по-ниски от индикативната стойност за бременност на теста (Фиг. 23).

На ден 25-ти средните стойности на PAGs за двете подгрупи с късна ембрионална смърт (0.126 ± 0.072 и 0.179 ± 0.029) при контролните и третираните овце бяха по-високи от тези (0.062 ± 0.038 и 0.083 ± 0.023) в подгрупите на небременните животни, но значимост на разликите не беше регистрирана. На ден 35-ти след изкуственото осеменяване, нивата на PAGs при бременните животни от контролната и GnRH третираната група (0.414 ± 0.125 и 0.421 ± 0.121) бяха значително ($P < 0.05$) по-високи в сравнение със средните стойности (0.078 ± 0.053 и 0.093 ± 0.034) при небременни овце и тези с КЕС (0.099 ± 0.062 и 0.113 ± 0.058). Едно бременно животно в контролната група имаше стойност (0.296) под индикативната за бременност ($S-N \geq 0.300$).



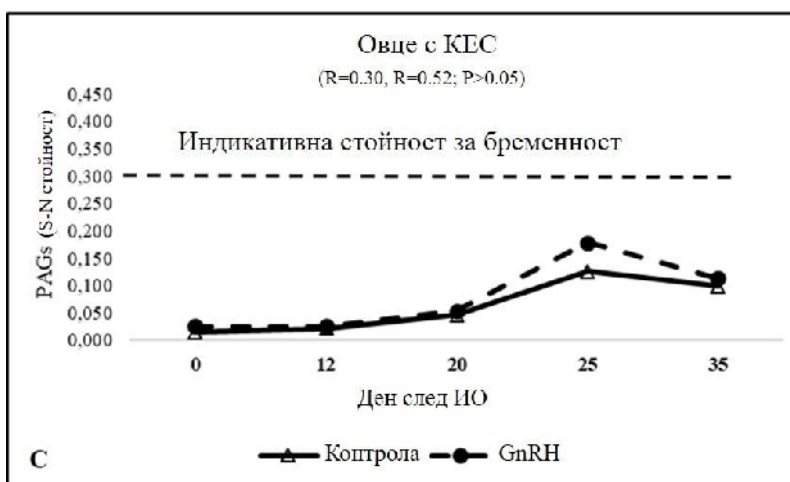
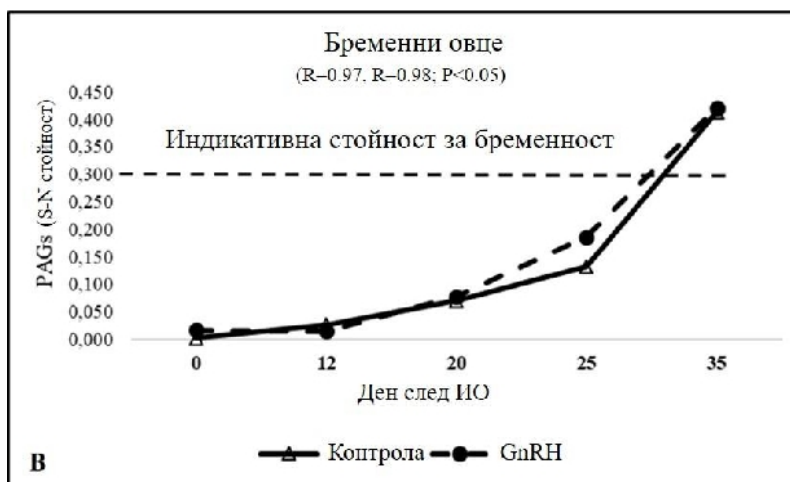
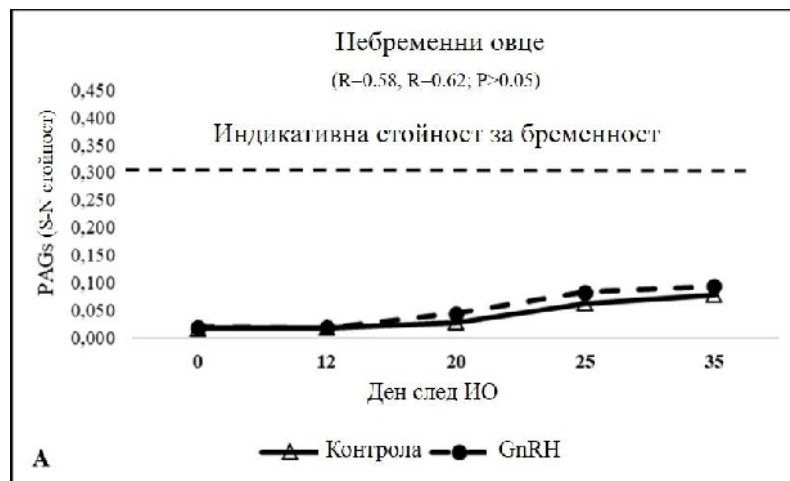
Фигура 23. Гликопротеини свързани с бременността (Mean±Sd) при контролни (А) и GnRH третиранни овце (В) според репродуктивното състояние и индикативната стойност за бременност.

GnRH - гонадотропен освобождаващ хормон; КЕС - късна ембрионална смъртност
Стойностите с различни букви в един и същ ден се различават при $P < 0.05$.

Стойностите в една и съща група, маркирани със звездичка (*) в различни дни се различават при $P < 0.05$.

Същевременно PAGs в подгрупите с КЕС бяха по-ниски от регистрираните за същите подгрупи на ден 25-ти и близки до средните стойности при небременните овце. Корелационният анализ показваше значителен ефект на деня след изкуствено осеменяване върху PAGs стойностите само при бременните овце (контрола $R=0.97$ и GnRH $R=0.98$; $P < 0.05$) (Фиг. 24В). Гликопротеините свързани с бременността започваха да се увеличават на ден 20-ти и бързо нарастваха между ден 25-ти и ден 35-ти. Подобен ефект на деня след ИО в другите подгрупи не беше регистриран ($R \leq 0.62$; $P > 0.05$) (Фиг. 24 АС).

Въпреки това, беше констатирано, че гликопротеините свързани с бременността при овцете с късна ембрионална смърт доказана чрез ехография, нарастват от ден 20-ти до ден 25-ти, след което се понижават между ден 25-ти и ден 35-ти. Допълнителния анализ относно доказване на бременност при овце чрез използвания тест установи, че достоверно разграничаване на небременни и бременни животни е възможно на ден 35-ти след изкуственото осеменяване. Сравняването на PAGs диагнозите за бременност с ехографските резултати, показваше 97.3% чувствителност, 100% специфичност и 98% точност на PAG теста, като тези показатели бяха изключително близки до получените за ехографския метод (Табл. 9).



Фигура 24. Гликопротеини свързани с бременността при небременни (А), бременни (В) и овце с късна ембрионална смъртност (С) според деня след изкуствено осеменяване и индикативната стойност за бременност.

ИО - изкуствено осеменяване; GnRH - гонадотропен освободаващ хормон;

КЕС - късна ембрионална смъртност

Таблица 9. Чувствителност, специфичност и точност на ехографския метод и Alertys Ruminant Pregnancy тест за доказване на бременност на ден 35 след изкуственото осеменяване (адаптирани от Ricci et al., 2015).

	Чувствителност ¹ % (n/n)	Специфичност ² % (n/n)	Точност ³ % (n/n)
Ultrasound	100 (37/37)	100 (13/13)	100 (50/50)
PAGs ELISA	97.3 (36/37)	100 (13/13)	98 (49/50)

¹ Процент на бременните овце с положителен резултат за бременност от ехография и PAG тест.

² Процент на небременни овце с отрицателен резултат за бременност от ехография и PAG тест.

³ Процент на бременните и небременните овце, точно класифицирани чрез ехография и PAG тест.

5.4 Влияние на ранното третиране с гонадотропен освобождаващ хормон върху репродуктивното състояние и биометричните показатели диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при овце от направление за мляко с нормално протичаща бременност и частична късна ембрионална смъртност.

Данните за параметрите характеризиращи репродуктивното състояние на овцете след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване са отразени в Табл. 10.

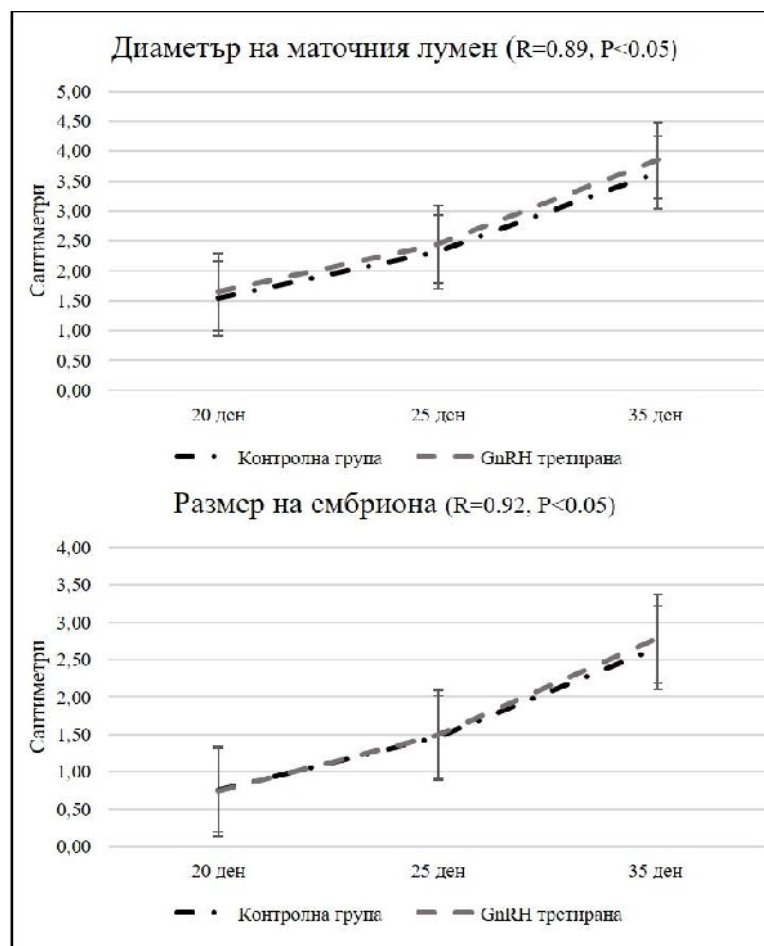
Таблица 10. Параметри характеризиращи репродуктивното състояние при контролни и GnRH третирани овце.

Параметри	Групи животни		
	Контролна група (n=12)	GnRH третирана група (n=12)	P стойност
Стойност на бременността, %, (n)	58.3 (7/12)	69.2 (9/12)	0.098
Едноплодна бременност, %, (n)	57.1 (4/7)	44.4 (4/9)	0.69
Многоплодна бременност, %, (n)	42.9 (3/7)	55.6 (5/9)	0.53
Частична късна ембрионална смъртност, %, (n)	14.3 (1/7)	22.2 (2/9)	0.61
Тотална късна ембрионална смъртност, %, (n)	28.6 (2/7)	0 (0/9)	0.06

Регистрирана беше тенденция към повишаване на стойността на бременността при GnRH третираните овце, спрямо контролните животни (69.2% срещу 58.3%; $P=0.098$). Овцете с многоплодна бременност бяха с 12.7% повече при животните с хормонално третиране, спрямо контролните животни (2 двуплодни и три триплодни срещу 3 двуплодни бременности). Случаите на частична късна ембрионална смъртност бяха констатирани в периода от 20-ти до 25-ти ден на бременността, като стойностите между отделните групи не се различаваха достоверно. Общата частична късна загуба на ембриони (18.8%) беше наблюдавана единствено при овце с многоплодна бременност (1 двуплодна в контролата и 1 двуплодна и 1 триплодна бременност в GnRH групата).

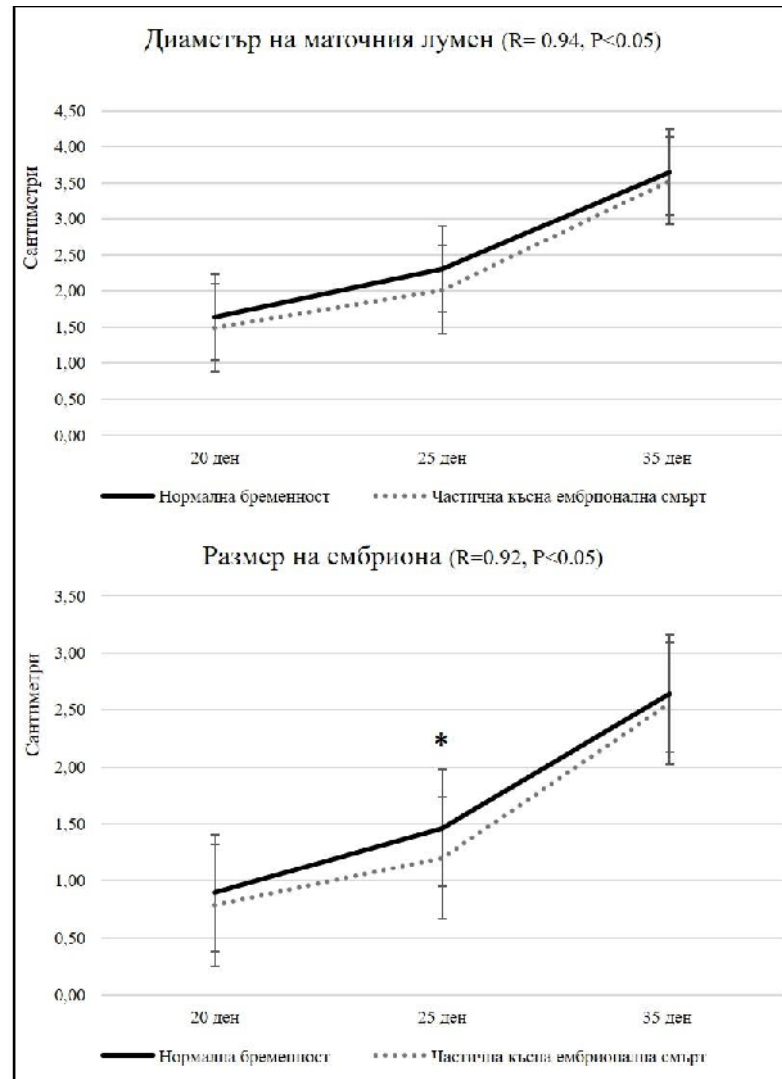
Тотална късна ембрионална смърт беше установена само при две овце-майки (28.6%) с едноплодна бременност в контролната група между 25-ти и 35-ти ден на бременността.

След изключване на случаите с тотална късна ембрионална смърт, резултатите от измерванията на диаметъра на маточния лумен и размера на ембриона ($n=31$) бяха индикативни за липса на съществени различия в изследваните биометрични показатели между контролни и GnRH третирани овце и в зависимост от вида на бременността за периода 20-35-ти ден. Стойностите и в двете групи корелираха силно положително с дните на бременността ($R=0.89$ и $R=0.92$; $P<0.05$) (Фиг. 25). Достоверни разлики в стойностите на ДМЛ и РЕ между нетретираните и хормонално третирани овце не бяха доказани.



Фигура 25. Диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при овцете в контролната ($n=5$) и GnRH ($n=9$) третираната група.

Поради този факт, ефекта на частичната късна ембрионална смърт беше изследван чрез определяне на зависимостите на ДМЛ и РЕ при всички животни с нормално протичаща бременност и тези с частична късна ембрионална смъртност. Анализът при животните с нормално протичаща бременност показваше силна положителна корелация на двата биометрични показателя и гестационните дни ($R=0.94$; $R=0.92$; $P<0.05$), независимо от вида на бременността (Фиг. 26).



Фиг. 26 Диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при овце с нормално протичаща бременност (n=4) и с частична късна ембрионална смърт (n=3).

Стойности за един и същ период, маркирани със звездичка (*) се различават при $P<0.05$.

Регистрирано беше, че при частична загуба на ембрион, интензитетът на нарастване на диаметъра на маточния лумен не се променя значително. Въпреки това, размерът на ембриона при овце с частична късна ембрионална смърт на ден 25 беше понижен, в сравнение с този при животни с нормално протичаща бременност ($P<0.05$). По-късно стойността на този биометричен показател се повишаваше, като на 35-ия ден достигаше регистрираната стойност при овце с нормално протичаща бременност.

VI. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Овцефермите за производство на мляко са класифицирани като екстензивни, полуинтензивни и интензивни въз основа на капиталовите инвестиции и технологиите за хранене и отглеждане на животните (Gelasakis et al., 2010; Tzanidakis et al., 2014). Управлението на интензивните овцеферми за мляко има за цел получаване на най-голяма печалба от овца, представлява предизвикателство за съвременната овцевъдна индустрия и е предмет на засилен изследователски интерес (Rushen, 2003; Gelasakis et al., 2010; Pulina et al., 2018).

Системите за интензивно овцевъдство предполагат висока концентрация на животните. Хранителните ресурси са под много строг контрол и се управляват с най-модерната за времето технология. Отглеждането на овцете изисква осигуряване на адекватен репродуктивен мениджмънт и хранителен режим с липса или много кратък престой на овцете на пасището, което е технологично свързано с фермата. Специфично за този вид ферми е необходимостта от приспособяване на животните към отглеждане в големи групи и промените в околната среда, запазване на еднообразието в рамките на групата по отношение на нуждите от хранителни вещества и осигуряване на адекватно хуманното отношение. С оглед производството на повече продукция се предпочитат породи овце с висока млечна продуктивност, като Източнофризийска овца, Асааф Аваси, Лакон и други (Goddard, 2006; Nedeva, 2020).

Данните за приложението на асистираните репродуктивни технологии, адекватният избор на най-добрите кочове за разплод, възможностите за диагностика на ранната бременност и редуциране на ембрионалните загуби чрез хормонални интервенции в ранния гестационен период при високопродуктивни овце, отглеждани в интензивни ферми за производство на мляко са все още недостатъчни или дискуссионни.

1. Влияние на кинематичните параметри на семенната течност върху репродуктивно състояние на овце от направление за мляко след приложение на асистираните репродуктивни технологии.

Настоящият дисертационен труд представя информация относно възможностите за оптимизиране на репродуктивния процес в интензивни овцеферми за производство на мляко, като в експерименталните модели са използвани овце от породите Източнофризийска овца и Асааф. Познаването на техните репродуктивни и продуктивни особености е от ключово значение за използване на асистираните репродуктивни технологии синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване.

Индикатор за ефективността от съвместното приложение на асистираните репродуктивни технологии синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване при високопродуктивните овце е тяхното репродуктивно състояние. В повечето случаи то се основава на отчитане на основни репродуктивни показатели, като стойност на бременността, среден брой на родените приплоди, процент на едноплодна и многоплодна бременност, съотношение мъжки женски приплоди и др. (Банков и кол. 1989; Бонев и кол., 2003; Bonev et al., 2012; Gazalp 2010; Yotov, 2018; Fornazari et al., 2018; Reinoso-Peláez et al., 2023). Основните елементи обуславящи успеха на горепосочените биотехнологии са адекватна подготовка на мъжките и женските животни за заплождане, избор на кочове-пепиниери с висок фертилитет, използване на подходящи протоколи за синхронизация на еструса и осигуряване на високо квалифициран персонал за извършване на манипулациите (Evans and Maxwell, 1987; Abecia et al., 2012; Gibbons et al., 2019).

Едно от най важните мероприятия при оценка на репродуктивното състояние на мъжките разплодници преди включването им в осеменителната кампания е изследване на качеството на семенната течност.

В рутинната практика най-често се извършва макроскопска преценка на еякулата и микроскопско изследване на семенната течност за определяне на общата подвижност на спермалната маса, концентрацията и морфологията на сперматозоидите (Evans and Maxwell, 1987; David et al., 2015). Тези изследвания, обаче не са достатъчна гаранция за избор на разплодниците с най-висок фертилитет като донори на сперма, поради непълна информация по отношение на мотилитета на спермата и субективизъм на изследването (Gaffney et al., 2011; Gallego et al., 2018).

В нашето проучване отсъствието на достоверни разлики в биометричните индикатори на кочовете от двете породи беше показателно за изравнена извадка на включените в експеримента разплодници. Близките средни стойности на параметрите на еякулата потвърждаваха това и бяха в унисон с обема на еякулата и концентрацията на сперматозоидите за породата Източнофризийска овца ($>1.5\text{ml}$ и $3\text{-}6.7 \times 10^9/\text{ml}$) и Асааф ($>1\text{ml}$ и $3 \times 10^9/\text{ml}$), установени съответно от Vara (2017) и Fornazari et al. (2018). Независимо от факта, че селекцията на кочове-пепиниери се извършва при съблюдаване на стандартните изискванията за свежа семенна течност от кочове, на преден план все още стои въпроса за точни критерии при избора на най-добрите мъжки животни (David et al., 2015). Получените от нас данни за връзката между CASA генерираните параметри на семенната течност и репродуктивното състояние, даваха допълнителна информация за адекватен избор на кочове с висока оплодителна способност на сперматозоидите от породите Източнофризийска овца и Асааф. Детайлната информация за характеристиките на кинематиката на спермата беше индикатор за значително породно влияние (Wilks-lambda = 0.079, P=0.026), въпреки близката възраст на кочовете, идентичните сезон и методи за получаване и обработка на семенната течност и известно генетично сходство между двете породи.

Това влияние според нас се дължеше преди всичко на различията в горепосочените показатели на семенната течност между отделните разплодници и беше основание резултатите да се анализират първоначално в тази светлина. Разликите в общата, прогресивната, непрогресивната подвижност и неподвижните сперматозоиди, и преди всичко, значителната вариабилност в повечето скоростни показатели на сперматозоидите в различните еякулати, беше доказателство за силно изразен индивидуален ефект на коча и при двете породи.

Подобни опити при кочове от породата Суфолк също установяват индивидуални вариации в стойностите на VAP (от 115.8 ± 5.7 до $126.5 \pm 5.7 \mu\text{m/s}$), VCL (от 204.2 ± 6.8 до $209.2 \pm 6.8 \mu\text{m/s}$), VSL (от 93.2 ± 5.9 до $108.2 \pm 5.9 \mu\text{m/s}$) и LIN (от 44.0 ± 1.2 до $51.5 \pm 1.2 \%$) (Robayo et al., 2008). Според Abadjieva et al. (2014) обаче, процентите на бързо, средно, слабо подвижни и неподвижни сперматозоиди в еякулатите на кочове от породата Синтетична Популация Българска Млечна овца получени през размножителен сезон, са съответно $77.88 \pm 6.23\%$, $17.24 \pm 4.52\%$, $4.72 \pm 1.71\%$ и $0.16 \pm 0.05\%$. Регистрираните стойности на VAP, VCL, VSL, LIN и STR за последователно изброените показатели са $58.1 \pm 3.46 \mu\text{m/s}$, $106.22 \pm 9.06 \mu\text{m/s}$, $30.68 \pm 1.61 \mu\text{m/s}$, $29.32 \pm 1.44\%$ и $55.24 \pm 1.70\%$. Neila-Montero et al. (2023) изследват семенна течност на кочове от породата Асааф в началото и края на размножителния сезон чрез CASA, като съобщават обща подвижност ($>80\%$), прогресивна подвижност ($>75\%$) на сперматозоидите и LIN ($>37\%$), близки до установените в представеното изследване. Резултатите на някои от предходните автори за едни и същи показатели се различават от получените за кочовете от породата Източнофризийска овца и Асааф, което подкрепя изказаното становище за наличие на породни и индивидуални различия.

Обяснения за тези несъответствия биха могли да бъдат вариации в степента на зрялост на сперматозоидите, наличните енергийни запаси и състав на спермалната плазма при различните кочове. Процесът на матурация на сперматозоидите предизвиква промени в подвижността, които са отговорни за ефективността на тяхната миграция през женския репродуктивен тракт и постигане на успешно заплождане (Van de Noek et al., 2022). Сперматозоидите придобиват активирана подвижност в репродуктивния тракт на мъжките животни по време на преминаване през епидидималния канал. Тази първоначална способност за движение на сперматозоида включва придобиване на потенциал за флагелация, координиране и модулиране на флагелума за вълнова форма на движение, обуславящи характерния модел на „плуване на сперматозоида“ (Yeung and Cooper, 2002). Активираната подвижност се характеризира със симетрични движения на опашката с ниска амплитуда, които позволяват на сперматозоидите да бъдат прогресивно подвижни в среда с нисък вискозитет, като семенната плазма (Yanagimachi, 1994). Освен това, подвижността на мъжките гамети зависи и от енергийните запаси (Freitas et al., 2016). Първичен източник на енергия е аденозин трифосфата, получен чрез окислително фосфорилиране и цикъла на Кребс в митохондриите на средната част и гликолиза в основната част на флагелума. Той се използва от аксонемални динеинови аденозинтрифосфатази, за да се предизвика удари на флагелума.

В допълнение, различни автори (Maxwell et al., 2007; Wang et al., 2020) установяват влияние на компоненти от спермалната плазма върху мотилитета на сперматозоидите. Резултатите на Ivanova et al. (2021) показват породни различия в протеиновите фракции на семенна плазма на кочове. Според Neila-Montero et al. (2023), разликите в експресията на протеини от спермалната плазма са свързани с енергийния метаболизъм, взаимодействията сперматозоиди-овоцити и структурата на флагелума, които водят до промени във функционалната активност на спермалните клетки.

Друга причина за индивидуалното и породно влияние може да бъде различното съотношение на субпопулациите от сперматозоиди в еякулатите на отделните кочове. В подкрепа на това твърдение, Yániz et al. (2015) констатира, че разпределението на субпопулациите на сперматозоидите в семенна течност на кочове с висок и нисък фертилитет се различават значително. Кочовете с по-висока фертилитет имат по-висок процент сперматозоиди от субпопулация 2 (бързо и линейно движение) и по-нисък процент от субпопулация 3 (бързо и нелинейно движение). Последващо проведено изследване, съобщава за по-висок дял на подвижните сперматозоиди при наличие на увеличена субпопулация спермални клетки с интактна плазмена мембрана и акрозома (Yániz et al., 2018). Информацията в това направление е все още недостатъчна и въпроса се нуждае от задълбочени проучвания в бъдеще.

Независимо от всичко горепосочено, голяма част от опитите до момента са извършени в лабораторни условия с получаване на индиректни доказателства за оплодителната способност на сперматозоидите, без да се отчита фертилитета на кочовете при теренни експерименти. Това още веднъж аргументираше необходимостта от извършване на допълнителни изследвания и търсене на връзката между кинематика на семенната течност и репродуктивните способности на мъжките животни, базирано на отчитане на информацията за репродуктивното състояние на овцете след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване. Резултатите за СБ, СБА, ДБ, МА и ЖА при изследваните породи овце не се различаваха значително по между си и бяха сходни с регистрираните от Allison (1995) и Yotov et al. (2022) за породата Източнофризийска овца и Fornazari et al. (2018) за породата Асааф.

Основното влияние на породата се реализираше, чрез достоверно ($P < 0.05$) висок процент триплодна бременност при Източнофризийската овца и вероятно се дължеше на генетично детерминираната по-висока плодовитост за породата (Allison, 1995). В тази връзка, Graham (1997) установяват достигане на 280% плодовитост при възрастни Източнофризийски овце. Допълнително доказателство за влияние на този фактор беше повишения процент на едноплодна бременност при при породата Асааф, спрямо регистрирания при Източнофризийската овца ($P < 0.05$). Информацията за репродуктивното състояние на овцете е била използвана от различни автори (O' Meara et al., 2008; Vicente-Fiel et al., 2014, Yotov et al., 2022) за *in vivo* определяне на репродуктивния потенциал на мъжките животни. Повечето опити за доказване на функционалната активност на сперматозоидите са сведени до определяне на връзката им с репродуктивното състояние в зависимост от общата подвижност на спермалната маса, индивидуалната подвижност на спермалните клетки и неподвижните сперматозоиди, регистрирани чрез конвенционални методи или CASA, без да се отчита кинематиката на спермата (Gaffney et al., 2011; David et al., 2015).

Вариабилността в характеристиките на репродуктивното състояние в зависимост от използвания разплодник съвпаднаше с твърденията в други изследвания (Vicente-Fiel et al., 2014, Yotov et al., 2022; Neila-Montero et al., 2023) за възможно разделяне на кочовете с нисък и висок фертилитет, когато характеристиките на подвижността се използват като прогностични маркери. Според нашата хипотеза, високата обща и прогресивна подвижност на сперматозоидите е първото необходимо условие за постигане на по-висока заплодяемост. Крайният резултат обаче, зависи и от други кинематични параметри, като ALH и WOB с важна роля за транспорта на спермата в половия апарат на овцете (Yániz et al., 2015; Van de Hoek et al., 2022).

Това се потвърждаваше от факта, че кочове с близки стойности в общата и прогресивната подвижност, показваха различна стойност за характеристиките на репродуктивното състояние, особено ясно изразено при разплодниците от породата Асааф. Тази информация беше основание за определяне на връзките между различните CASA параметри от една страна, и зависимостите им с репродуктивните параметри от друга, като се елиминират ефектите на породата и коча.

Системите за компютърно-асистиран анализ на семенна течност позволяват анализ на голям брой сперматозоиди за кратко време, като по този начин осигуряват набор от количествени данни за различните видове подвижност и скоростни параметри, което оптимизира надеждността на метода (Valverde et al., 2020). Корелационният анализ потвърждаваше нашето предположение за влияние на скоростните индикатори на сперматозоидите върху общата и прогресивната им подвижност и характеристиките на репродуктивното състояние на овцете. Увеличаването на VAP, LIN и STR имаше силно положително влияние върху ОП и ПП, като от своя страна, увеличението на ПП оказваше положителен ефект върху стойността на бременността. В същото време, повишението на VCL имаше отрицателно влияние върху двата вида подвижност и LIN, свързано с понижаване на показателите СБ, ДБ и ТБ. Повишаването на VAP, LIN и STR кореспондираше положително със стойността на бременността. Последните два показателя имаха позитивен ефект и върху средния брой родени агнета, реализиран чрез положителната връзка с двуплодната и триплодна бременност. Горепосоченото беше в съгласие с резултатите на други автори (Del Olmo et al., 2008; Vicente-Fiel et al., 2014), провеждали подобни експерименти с кочове от други породи. Този резултат беше показателен за възможностите отделни кинематични показатели на спермата да се използват при определяне на фертилитета на кочове от породите Източнофризийска овца и Асааф.

Липсата на статистически установена зависимост на кинематиката на сперматозоидите с процента на родените мъжки и женски агнета означаваше, че други фактори имат определящо значение за пола на плода.

При отчитане ефекта на репродуктивното състояние на овцете от млечно направление е препоръчително изследване и на връзките между отделните характеристики на репродуктивното състояние, с оглед по-точно *in vivo* определяне репродуктивния капацитет на разплодниците и получаване на по-пълна информация за репродуктивната ефективност от използваните асистирани репродуктивни технологии (Tanga et al., 2021).

Допълнителният анализ в тази насока показваше тенденция ($R=0.55$; $P=0.051$) увеличената стойност на бременността да води до по-висок среден брой агнета от овца, съобщено и от други изследователи (Gazal, 2010; Madrigali et al., 2021), но силна положителна връзка не беше установена. Логично беше с СБА да корелира положително с двуплодната, а не само с триплодната бременност ($R=0.67$; $P=0.05$). Обяснение за отсъствието на силна положителна корелация на стойността на бременността със средния брой агнета от една овца може да бъде факта, че СБ е съотношение между брой осеменени и брой родили овце, без да се отчита дали заплодените животни са с едноплодна или многоплодна бременност.

В определени случаи, стойността на бременността е много висока, но значителен процент от бременностите са едноплодни. От друга страна, съотношението между едноплодни и двуплодни бременности в групата може да окаже влияние върху корелациите. Наличието на равен брой едноплодни и двуплодни бременности или по-голям брой едноплодни бременности, обуславя липсата на положителната връзка със средния брой родени агнета от овца. Повишеният процент триплодна бременност обаче, може да подобри показателя СБА, потвърдено от високия корелационен коефициент ($R=0.67$; $P=0.051$).

Изхождайки от този резултат и информацията за пряка зависимост на броя на родените агнета от броя на овулациите (Drouilhet et al., 2013), бихме си позволили да приемем, че при интерпретация на показателя СБА за *in vivo* определяне на репродуктивния капацитет на кочовете трябва да се отчита и генетично детерминираната биологичната плодовитост на породата овце.

Заключителният анализ потвърждаваше, че изследването на различните видове подвижност и скоростните характеристики на сперматозоидите чрез компютърно-асистиран анализ на семенната течност е изключително полезен диагностичен и прогностичен инструмент в репродукцията на овцете. Обобщените резултати показваха, че увеличените ПП, VAP, LIN и STR, оказват силно положително влияние ($P<0.05$) върху двигателната активност на мъжките гамети и репродуктивното състояние на овцете. Те биха могли да се включат като индикатори за определяне качеството на свежа сперма при предварителния избор на кочове с висок фертилитет от породите Източнофризийска овца и Асааф. Определянето на точни референтни стойности за тези показатели обаче, се нуждае от допълнителни изследвания на по-голям брой еякулати, получени през размножителен сезон и съобразяване с възрастовата и породна принадлежност на животните.

2. Влияние на ранното гонадотропиново третиране върху профила на прогестерон при овце от направление за мляко и доказване на ранна ембрионална смъртност.

Адекватното производство на прогестерон при овцете зависи от функционалното състояние на жълтото тяло и представлява основен фактор в механизма за защита на бременността през ранния гестационен период (Mukasa-Mugerwa and Viviani, 1992; Niswender et al., 2000; Pasciu et al., 2021).

Изследването на прогестероновия профил осигурява ценна информация за протичането на половия цикъл, бременността, наличието на патологични процеси през гестационната фаза и ефективността на различните видове хормонални интервенции (Davies et al., 2006; Ganaie et al., 2009; Hashem et al., 2015; Fernandez et al., 2019; García et al., 2022).

Различни автори съобщават за инжектиране на гонадотропен освобождаващ хормон (GnRH) в деня на осеменяване или на ден 1, 2, 4, 7 или 12 след това, като изследват връзката с репродуктивното състояние на овцете (Cam end Kurran, 2004; Mirzaei et al., 2014; Hashem et al., 2015; Fernandez et al., 2019; Didarkhah and Vatandoost, 2022; Nikbakht et al., 2022). Получените до момента резултати в тази област са доста разнообразни. Информацията за влияние на GnRH третирането през първите няколко дни след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване върху производството на прогестерон, стойностите на бременността и ранната ембрионална смъртност при високопродуктивни млечни овце е ограничена и доста противоречива.

Получените данни за близки проценти на небременни и бременни след изкуствено осеменяване овце в контролната и GnRH групата на 20-ия ден след осеменяването бяха показателни за незначително директно влияние на приложението на гонадотропен освобождаващ хормон върху стойността на бременността. Този резултат беше в съответствие със съобщенията на други автори, използвали GnRH третиране на ден 4-ти (Fernandez et al., 2019) или в периода 2-ри и 5-ти ден след изкуствено осеменяване (Nikbakht et al., 2022). Въпреки това, регистрацията на значително по-високата ($P < 0.05$) обща стойност на бременността на 60-ия ден при хормонално третираните животни, беше индикатор за индиректно положително влияние на GnRH третирането върху резултатите за бременност.

Това беше подкрепено от факта, че повечето животни от GnRH групата, определени като небременни на ден 20-ти, бяха възстановили еструса преди 20-ия ден след изкуственото осеменяване, и бяха идентифицирани като заплодени след покриване от коч. Възможна причина за тази находка може да бъде бързото повишаване на P4 след инжектиране на GnRH и достигане на прогестероново ниво, необходимо за активиране на простагландиновата синтеза и лизиране на жълтото тяло, свързано с по-ранно възобновяване на редовната естрална активност при третираните овце. Доказано е, че при преживните животни прогестерона и естрадиола регулират маточната секреция на простагландин F2a, който причинява лутеолизата (Silva et al., 1991; Goff, 2004).

Независимо от по-ниския процент на овцете заплодени след покриване от коч в контролната група, значителната ($P < 0.05$) разлика между общата стойност на бременни и небременни животни показваше, че комбинацията от GnRH инжекция на ден 4-ти след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване, с въвеждане на фертилни кочове на ден 12-ти, може да подобри репродуктивното състояние на ниво стадо. Zonturlu et al. (2018) също посочват увеличение в процента на бременните животни (до 96.6%) след инжектиране на овцете с GnRH на дни 0 и 9 след осеменяване и въвеждане на коч в стадото.

Информацията за прогестероновия профил на овцете третиран с GnRH и заплодени от коч или изкуствено осеменени е противоречива. Hashem et al. (2015) инжектират 4.2 µg бусерелин на дни 0 или 7 и двукратно на дни 0 и 7 след покриване от мъжки разплодник на нелактиращи овце от породата Раман. Най-голяма средна концентрация на P4 е била наблюдавана в групите GnRH7 и GnRH 0 и 7, последвани от GnRH 0 и контролната група. Изследване на овце-майки от породата езерен Гашгай през пролетния сезон разкрива значително по-висока серумна концентрация на прогестерон във всички групи, получавали GnRH (25 µg като диацетат) на дни 1, 2, 5, 7 и 12, в сравнение с контролната група (Nikbakht et al., 2022).

В противречие с този резултат, Ayaseh et al. (2020) съобщават, че инжектирането на hCG или 4.2 µg бусерелин при Каракулски овце на дни 0 и 5 след изкуствено осеменяване, не води до повишение на прогестерона.

Настоящото проучване показваше сходство в прогестероновите профили на овце с един и същ репродуктивен статус в контролната и гонадотропин третираната група. Този резултат обаче, не изключваше напълно благоприятния ефект на GnRH върху лутеалната функция и последващото увеличаване на производството на ендогенен прогестерон.

Анализът на основния ефект на GnRH върху P4 концентрацията беше в съгласие с направеното твърдение. Бързото повишаване на прогестерона при овцете заплодени след покриване от коч (ОЗСПК) между дни 4 и 12 след ИО, въпреки по-ниското му изходно ниво на ден 4-ти, в сравнение с контролната група, може да се приеме като доказателство за повишена лутеална активност при GnRH третираните овце. Известно е, че и други фактори (възраст, порода, телесно състояние и лактационен статус на овцете) имат влияние върху кръвната концентрация на прогестерон при преживните животни (Kamil, 2019; Garsia et al., 2022). Освен това, адекватният отговор на животните към третирането с гонадотропини зависи и от вида на GnRH агониста и неговата доза (Picard-Hagen et al., 2015). Mirzaei et al., (2011) третират кръстосани дебелоопашати овце с ниска (4.2 µg) и висока (8.4 µg) доза бусерелин, съответно на 5-ия и 19-ия ден след въвеждането на разплодника. На 12-ия ден след това, високата доза GnRH водила до значително по-високи плазмени концентрации на P4 ($P < 0.05$), в сравнение с ниската доза GnRH и без GnRH. Горепосочената информация може да обясни несъответствието на настоящите резултати със съобщенията на някои автори за различен P4 профил при нетретиран и GnRH третиран овце.

Съществува вероятност, отговорът на Източнофризийските овце към използвания гонадотропин аналог да е бил по-слаб от този на другите породи овце. Допълнителни подробни изследвания могат да изяснят въпроса за дозата и времето на приложение на GnRH, които осигуряват значително по-високо увеличение на P4 при Източнофризийски овце в края на лактацията.

Репродуктивното състояние имаше значителен ($Wilks\text{-}\lambda = 0.023$, $P = 0.000$) ефект върху прогестероновите профили на животните с близък модел (небременни и ОЗСПК) между дни 4 и 20 след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване. Подобно повишаване на P4 до ден 12-ти и понижаване до ден 18 е било установено от Garcia et al. (2022) при небременни овце. Въпреки че факторния анализ не показваше съвместно влияние на всички фактори, беше установена тенденция ($P = 0.057$) за повишаване на P4 нивата при ОЗСПК и бременните животни след изкуствено осеменяване, следствие на GnRH инжекцията. Гореспоменатите подгрупи имаха относително по-ниски изходни нива на P4, в сравнение с тези на нетретираните подгрупи на ден 4, но техният прогестерон беше относително по-висок на дни 12 и 20 след осеменяването. Подобен ефект върху средната концентрация на прогестерон е констатиран от Farrag et al. (2017) при раждали Барки овце.

Бременността оказваше съществено влияние върху прогестероновия профил, изразяващ се в постепенно покачване на P4 между 4-ти и 12-ти ден, последвано от бързо нарастване до ден 20-ти. Този резултат беше близък до данните на Ganaie et al. (2009). Те съобщават за значително увеличение на средната концентрация на прогестерон от дни 0-6 до дни 16-30 при бременни овце от породата Коридел, докато при тези със възстановен еструс, прогестерона спадал до по-малко от 1.0 ng/ml. Значителните разлики ($P < 0.05$) между нивата на прогестерон при небременни и бременни след изкуствено осеменяване овце в групите I и II на 20-ия ден, показваха, че измерването на P4 в този период може да се използва за доказване на бременност, но само при липса на въвеждане на коч след изкуственото осеменяване. В противен случай, съществува риск от голям брой фалшиво отрицателни диагнози, вследствие на повторно заплождане от коч на небременните, но проявили еструс овце. Това беше потвърдено от ехографската регистрация на бременни животни на 60-ия ден, произхождащи от тези, определени като небременни на 20-ия ден.

Според Vinales et al. (2012), моделът и концентрациите на прогестерон се повлияват от фазата на бременността. Те регистрират на ден 12-ти след осеменяването по-високи стойности при бременни, отколкото при небременни овце от всички групи ($P = 0.01$). Концентрациите на P4 намалявали при небременни овце между дни 12 и 17, очакваното време на възвръщане към еструс. Същият ефект беше наблюдаван и в нашето проучване, като на тази база беше изчислена вероятността за настъпила ранна ембрионална смъртност в различните групи. Независимо от незначителните разлики в регистрираните стойности за ранна ембрионална смъртност при третирани и нетретирани с гонадотропен хормон животни, получената стойност в GnRH групата беше с 9% по-ниска, в сравнение с тази за контролата. Установената значително ($P < 0.05$) по-висока средна концентрация на P4 при гонадотропин третирани, спрямо нетретирани овце и ОЗСПК на ден 20-ти, подкрепяше косвено хипотезата за положителен ефект на GnRH третиранието върху редуцията на ранната ембрионална смъртност. Според Sam and Kuran (2004) гонадотропиновата инжекция в този период стимулира P4 производството от наличното жълто тяло или образуване на допълнителни жълти тела. Според други автори, прогестеронът упражнява предимно индиректен ефект върху концепцията чрез ендометриума, като регулира растежа на бластоциста и удължаването на ембриона (Spenser, 2013; Coleson et al., 2015).

Липсата на достатъчно развит ембрион, който да сигнализира на майката за разпознаване на бременността, води до „изключване“ на гени свързани в маточната възприемчивост, настъпва лутеолиза и концентрациите на P4 намаляват. В този случай, животното възстановява еструса и получава друга възможност за заплождане (Spenser, 2013). Гореспоменатата информация кореспондираше с получения от нас резултат за повече овце с възстановен еструс след GnRH инжектиране, които бяха определени като бременни по време на втория ехографски преглед. Ефективна превенция на ембрионалната смъртност при овце-майки чрез прилагане на GnRH или FGA на 4-ия и 12-ия ден след осеменяване е съобщена и от Ataman et al. (2013). Общата стойност на PEC в нашето проучване беше близка до регистрираните 27% между дни 10 и 17 (Vinales et al., 2012), $30 \pm 13\%$ (Rickard et al., 2017) между овулацията и преди имплантацията и 28% между дни 3 и 14 на бременността (Juengel et al., 2023). От друга страна, липсата на статистическа разлика в стойностите на PEC между нетретирани и GnRH третирани овце, предполагаше влияние и на допълнителни фактори, различни от прогестерона, върху загубата на ембриони в най-ранната гестационна фаза. В този контекст, Hoskins et al. (2021) съобщават, че прогестеронът може да ускори развитието на ембриото, но ролята му в механизмите на имплантиране и запазване на бременността е сложна и изисква детайлни изследвания за изясняване на неговите

терапевтични свойства в репродукцията на животните. Обобщената информация беше показателна, че инжектирането на GnRH (50 µg гонадорелин като диацетат) на ден 4-ти след изкуствено осеменяване няма ясно изразено директно влияние върху стойността на бременността след синхронизация на еструса и изкуственото осеменяване, но комбинацията от ранно гонадотропиново третиране с въвеждане на коч на ден 12-ти, води до подобряване на репродуктивното състояние на ниво стадо на ден 60-ти.

Този ефект се дължи на увеличаване на броя на овцете, заплодени след покриване от коч. Факторите третиране с гонадотропен освобождаващ хормон, репродуктивен статус и ден след изкуственото осеменяване оказват влияние върху концентрацията на прогестерон, независимо един от друг и имат значителен (Wilks-lambda тестове, $P < 0.005$) ефект върху прогестероновия профил. При използване на горепосочения вид репродуктивен мениджмънт, детайлите в прогестероновите нива на ден 12-ти и ден 20-ти след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване могат да бъдат разглеждани в контекста на различното им репродуктивно състояние. Те биха могли да дадат информация за наличието на ранна ембрионална смъртност. Приложението на GnRH на ден 4-ти след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване при изследваната порода овце за мляко с голяма вероятност ще редуцира ранната ембрионална смъртност. За изясняване на интимния механизъм на този ефект са необходими допълнителни изследвания.

3. Влияние на ранното гонадотропиново третиране върху гликопротеините свързани с бременността при овце от направление за мляко и доказване на късна ембрионална смъртност.

Различните стратегии за подобряване на репродукцията при овцете включват синхронизация на еструса, изкуствено осеменяване, диагностика на ранната бременност чрез ехография или определяне на гликопротеините свързани с бременността и хормонално третиране за намаляване на ранните и късни ембрионални загуби (Rovani et al., 2016; Menchaca et al. al., 2017; Alvarez et al., 2019; Fernandez et al., 2019; Roberts et al., 2019).

Ехографията и измерването на гликопротеините свързани с бременността чрез RIA или ELISA са съвременни методи за откриване на бременност при дребните преживни животни (Ganaie et al., 2009).

Чувствителността на двуизмерния ехографски метод достига 40% на 21-ия ден от бременността, след което се увеличавала до 100% на 39-ия ден. Въпреки това, съществуват известни грешки, тъй като правилната диагноза зависи от достъпа за изследване и положението на плода, гестационния стадий, характеристиките на сондата, оператора и др. (Jones et al., 2016).

Алтернативен метод за диагностика на ранната бременност е измерването на гликопротеините свързани с бременността в кръв или мляко (Sousa et al., 2006; El Amiri et al., 2007, Karen et al., 2004; Ganaie et al., 2009; Roberts et al., 2019). Различни проучвания (Karen et al., 2003, 2006; Hussein et al., 2015; Roberts et al., 2019; Meshref et al., 2022) представят висока точност ($> 90\%$) на RIA или ELISA методите за доказване на бременност при овце с период на тестване между ден 16-ти и 45-ти след осеменяване. Наскоро проведено проучване съобщава за използване на измерването на PAGs при доказване на ранна ембрионална загуба (De Carolis et al., 2020). Информацията за ефекта от ранното приложение на гонадотропини върху оцеляването на ембриона или плода и концентрациите на гликопротеините свързани с бременността при овце е противоречива (Cam and Kuran, 2004; Hashem et al., 2015; Chaves et al., 2017; Fernandez et al., 2019; Meshref et al., 2022).

Много въпроси, свързани с контролиране на ембрионалната смъртност при овцете, все още остават област с възможност за изследване (Chundekkad et al., 2020).

Предполага се, че благоприятния ефект на екзогенните гонадотропини върху жизнеността на ембриона е свързан с повишаване на P4 нивото след третиране, което води до секреция на ембрионални субстанции и подобряване на маточната среда (Kleemann et al., 1994). Според Cam and Kuran (2004) обаче, човешкия хорионов гонадотропин (hCG) и GnRH действат различно върху оцеляването на ембриона, тъй като само приложението на hCG стимулирало неговия растеж.

Те приемат, че лутеотрофното действие на GnRH или hCG се изразява в повишаване на прогестероновата концентрация, необходима за адекватна вътрематочна среда, водещо до по-висока устойчивост на ембриона и намалени ембрионални загуби.

Hashem et al. (2015) използват еднократно третиране с GnRH седем дни след осеменяването и отчитат редукция в загубата на бременност в периода от 40-ия ден след осеменяване до раждането. В противоречие с това, Fernandez et al. (2019) не констатират съвместен ефект върху стойността на бременността след прилагане на hCG или GnRH на ден 4-ти след изкуствено осеменяване, но установяват понижение в загубите на бременност на ден 33-ти след осеменяването.

Настоящото проучване представя резултати относно влиянието на третирането с GnRH на ден 4-ти след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване върху PAGs при високопродуктивни овце за мляко и връзката с диагностика на ранната бременност и късната ембрионална смъртност. Незначителните разлики в стойностите на PAGs до ден 20-ти между нетретирани и третирани овце, независимо от техния репродуктивен статус, бяха индикатор за липса на значителен ефект от ранното GnRH приложение върху производството на PAGs през първите 20 дни след изкуствено осеменяване. Резултатите показваха, че в този период, профилът на PAGs при овцете с различен репродуктивен статус е сходен и няма възможност за разграничаване на небременни и бременни овце или предсказване на късна ембрионална смъртност, настъпила след 20-ия ден на бременността.

Тези данни кореспондираха с резултатите на други автори (Rovani et al., 2016; Chaves et al., 2017), използвали подобни ELISA тестове и определили откриваеми концентрации на PAGs в овчия серум на 28-ия или 33-ия ден след осеменяване.

Въпреки това, Meshref et al. (2022) и De Carolis (2020) представят информация за доказване на бременност, съответно на 16-ти и 18-ти ден след осеменяване. Това несъответствие с нашите резултати може да се обясни с различните методи и тестове за измерване на PAGs, разлики във възрастта или индивидуални характеристики на животните.

В този аспект, изследване на комбинациите от антитела в лабораторен и търговски ELISA тест, съобщава за влияние на използваните антитела върху точността на теста за доказване на бременност и прогнозиране на оцеляването на ембриона по време на ранната гестационна фаза (Gatea et al., 2018). Важно е ветеринарните лекари да познават ограниченията при разчитане на резултатите от различните PAG тестове и потенциала за погрешна класификация при откриване на бременни животни, свързани с промени в секрецията на PAGs по време на бременност или перзистиране на PAGs в кръвообращението на майката след загуба на бременността (Roberts et al., 2019).

В настоящият експеримент, времето след изкуствено осеменяване имаше значително ($P < 0.05$) влияние върху профила на PAGs при бременните животни, докато при небременните животни и овцете с късна ембрионална смъртност (КЕС), настъпила между 20-ия и 25-ия ден, то беше незначително. Подобно прогресивно нарастване на PAGs от деня на заплождане до 60-ия ден е било определено и при бременни овце от породите Сардинска и Лакон (De Carolis et al., 2020).

Третирането с GnRH нямаше съществен ефект върху профилите на PAGs при небременни животни и овце с КЕС между Ден 4-ти и 35-ти след изкуственото осеменяване. Това се потвърждаваше от ниските стойности на корелационните коефициенти с липса на значимост ($P > 0.05$). Определянето на индикативни стойности на PAGs за разграничаване на небременни овце и животни с късна ембрионална смърт в двете групи на 25-ия и 35-ия ден беше невъзможно, поради тяхните близки стойности.

Независимо от това, трябва да се отбележи, че стойностите при овцете с КЕС започваха да намаляват в периода от 25-ия до 35-ия ден. Това даваше основание да се приеме, че намаляването на концентрациите на PAGs при две последователни измервания може да бъде индикатор за настъпила или предстояща ембрионална или фетална смърт.

Verberckmoes et al. (2004) използват RIA тест, базиран на овчи PAG и установяват, че някои овце от породите Суфолк и Тексел показвали абнормален PAG профил между 25-ти и 35-ти ден след заплождане. Средната концентрация на PAGs при тези овце на 25-ия ден била в референцията за бременност. За разлика от нормалните бременни овце обаче, тези с абнормален PAG профил имали значително по-ниски концентрации на 35-ия ден. В заключението на Hussein et al. (2017) е посочено, че намаляването на серумните концентрации на PAGs между 28-ия и 45-ия ден може да бъде използвано за предсказване на ембрионална или фетална смъртност при овцете. Roberts et al. (2017) използват търговски тест за доказване на бременност при говеда за откриване на PAG1 и BioPRYN анализ за PSPB при бременни овце и определят уникални гестационни профили въз основа на спецификите на анализа. Те съобщават, че PAGs не могат да бъдат полезни маркери за фетален растеж при овцете, но PAG1 може ефективно да се използва като индикатор за брой на фетусите.

В нашето проучване откриването на късна ембрионална смъртност се основаваше на ехографските диагнози. Животните с КЕС не бяха определени като бременни чрез използвания PAGs тест на ден 25-ти, тъй като техните PAGs стойности бяха под референцията на използвания тест и близки до регистрираните за небременни овце. От друга страна, тази разлика в концентрацията на PAGs при изследваните овце може да бъде обяснена с влияние на породната принадлежност на животните, описано от някои автори (Roberts et al., 2019; De Carolis et al., 2020).

По отношение на репродуктивния статус, данните от ехографията бяха показателни за тенденция ($P = 0.059$) към увеличаване на бременните овце и намаляване на късната ембрионална смъртност, настъпила между 20-ия до 25-ия ден в GnRH третираната група.

Други изследвания също съобщават за положителен ефект на GnRH инжектирането между дни 4 и 12 след осеменяване върху стойността на бременността и преживяемостта на ембриона (Ataman et al., 2013; Cam et al., 2004; Hashem et al., 2015). Получените общи стойности за бременни овце и късна ембрионална смъртност бяха близки до съобщената обща стойност на бременността (66.7%) и загуби на ембриони (23.1%) при овце-майки от породата Рахмани, подложени на подобно третиране (Hashem et al., 2015).

Допълнителният анализ относно откриване на бременните животни чрез използвания тест се базираше на индикативната стойност за бременност, определена от производителя. Достоверните разлики в концентрациите на гликопротеините свързани с бременността и сравняването на резултатите от PAG теста с ехографските диагнози на ден 60-ти, бяха показателни за висока чувствителност (97.3%) и точност (98%) на PAG теста за диагностика на бременност при породата Източнофризийска овца на ден 35-ти след изкуственото осеменяване.

За разлика от нас, Chaves et al. (2017) констатираат подобен резултат (93.75% чувствителност и 100% точност) при овце от породата Морада Нова още на 28-ия ден. Akkose (2020) обаче, регистрираат 97.6% точност на ELISA-PAG теста за диагностика на бременност при породата Аваси в периода 34-38 ден след осеменяване. Цялата горепосочена информация е доказателство, че въпросът за комбинираното използване на GnRH третиране и измерване на PAGs, като инструмент за намаляване на ембрионалната смъртност и подобряване на репродуктивната ефективност при овцете се нуждае от интензивно проучване.

В подкрепа на това твърдение са проведените през последните години няколко експеримента за откриване на едри преживни животни с риск от ембрионална смъртност (Pohler et al., 2016; Barile et al., 2021) и/или за използване на фармакологични интервенции за намаляване загубата на ембриони (Passeli et al., 2022).

Според Barile et al. (2021) съществува остра нужда от допълнителни изследвания относно определяне на правилните прогнозни стойности на PAG тестовете до приемлива точка за използване в репродуктивния мениджмънт. Те могат да осигурят внедряването на тези тестове като диагностичен инструмент за подобряване на репродуктивното управление на фермата чрез стратегии за хормонална интервенция при животни, идентифицирани с риск от загуба на ембриони. Във връзка с този въпрос, Pacelli et al. (2022) използват еднократна инжекция на GnRH на ден 35-ти след изкуственото осеменяване при биволи с риск от ембрионална смъртност, доказан чрез PAGs анализ. Това третиране водело до повишаване на концентрацията на PAGs, намаляване на загубата на бременност в ранната гестационна фаза и подобряване на стойността на бременността.

Базирайки се на анализа на получените резултати и дискусиата може да се обобщи, че приложението на гонадотропен освобождаващ хормон на ден 4 след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване на овцете показва тенденция да подобряване на репродуктивното състояние без значим ефект върху профила на PAGs при животни с различно репродуктивно състояние до ден 20-ти след изкуственото осеменяване. Прогресивното намаляване на гликопротеините свързани с бременността, регистрирано при двукратно измерване през десет дневен период след 25-ия ден на бременността, може да служи като прогностичен маркер за настъпила или предстояща късна ембрионална смърт. Средните стойности на PAGs при бременните Източнофризийски овце значително ($P < 0.05$) се увеличават между 25-ия и 35-ия ден на бременността с достоверни разлики ($P < 0.05$) между двете категории животни на ден 35-ти. Това е предпоставка използвания PAG да се приеме като подходящ за доказване на ранна бременност при породата Източнофризийска овца на 35-ия ден след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване.

4. Влияние на ранното гонадотропиново третиране върху репродуктивното състояние и биометричните показатели диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при овце от направление за мляко с нормално протичаща бременност и частична късна ембрионална смъртност.

Положителното въздействие на екзогенно приложените гонадотропини в ранния период след осеменяване води до повишена митотична активност на ендотелните клетки и формиране на адекватна капилярна мрежа за кръвоснабдяване на жълтото тяло. Това обуславя постъпване на голямо количество от произведения прогестерон в системното кръвообръщение, което е необходимо за нормално развитие на ембриона и плацентата (Feraga, 1993). Nephew et al. (1994) приемат, че по-едрият ембрион отделя повече IFN- γ , който предпазва жълтото тяло от PGF 2α индуцирана лутеализа и по този начин запазва бременността.

Подобен ефект е бил регистриран след третиране с LH или hCG и се е осъществявал чрез индуциране на васкуларния ендотелен фактор на растежа (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF), който повишавал силно митотичната активност на ендотелните клетки в развиващото се жълто тяло (Doraiswami et al., 1995). По-добро запазване на бременността при овце след по-бързо и по-ранно покачване на прогестерона в началния гестационен стадий е констатирано от O'Connell et al. (2013). Според Khan et al. (2007) третирането с GnRH или LH препарати води до адекватна жълтотелна функция, нарастване на зародиша и оказва влияние върху плацентацията.

Проучвайки ефекта от третиране с човешки хорионов гонадотропин, Khan et al. (2009) регистрират по-добра преживяемост на ембрионите не само при бременните овце, но и при животните заплодени след второ осеменяване.

Данните от проведеното изследване показваха тенденция към повишаване на стойността на бременността при GnRH третираните овце, спрямо контролните животни (62.9% срещу 58.3%; $P=0.098$). Подобни ефекти бяха констатирани и в другите експерименти във връзка с дисертационния труд. Sirjani et al. (2011) регистрират по-висок среден брой и по-голямо живо тегло на родените агнета при третиране с гонадотропен освобождаващ хормон след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване на овцете. Тези резултати кореспондират с данните от нашия експеримент, за относително повече случаи на многоплодна бременност при GnRH третираните животни. Ataman et al. (2013) не доказват значително влияние върху броя на родените агнета след GnRH инжектиране на овце на ден 4-ти след осеменяването, но регистрират значително редуциране на ембрионалната смъртност при третиране с гонадотропен хормон или прогестеронов аналог. Противоречивите резултати по темата бяха индикативни, че редица въпроси свързани влиянието на ранното гонадотропиново третиране след осеменяване върху промените в матката и развитието на ембриона, както и връзката на плацентарната функция с оцеляването на ембриона остават недостатъчно изяснени. Gordon et al. (1997) съобщават за 3% до 4% загуба на потенциалното потомство за всеки 20-дневен период след 25-ия ден на бременността. Според Dixon et al. (2007) по-голяма част от овцете (36.7%) показват частична ембрионална смъртност (загуба на един, а не всички ембриони), докато тотална ембрионална смъртност (загуба на всички ембриони) се регистрира в 20.5% и 3.8%, съответно за едноплодна и многоплодна бременност. Значително по-висока тотална ембрионална/фетална загуба (29.50%) при овце е регистрирана от Hussein et al. (2016).

В представеното изследване случаите с частична късна ембрионална смъртност в двете групи (18.8%) бяха близки до установените от горепосочените автори и се срещаша в периода 20-25-ти ден на бременността, при овцете носещи повече ембриони. Това потвърждаваше хипотезата за предразположеност на овцете с висока плодовитост към ембрионална загуба преди завършване на плацентацията. Rickard et al. (2017) също съобщават за повишени стойности на ембрионалната смъртност в пред- и пери имплантационния период. Приложението на ехографския метод за следене на различни биометрични показатели при бременните животни дава полезна информация за ембриофеталното развитие, промените в плацентацията и определяне жизнеността на ембрионите, които са важни индикатори за нормално протичане на бременността (Buckrell et al., 1986; Yotov et al., 2005; Ganaie et al., 2009; Jones et al., 2016; Karadaev et al., 2018). По време на ранната бременност няколко ембриона или целия плод могат да се наблюдават на екрана, което подпомага измерването на диаметрите на маточния лумен и ембриона и черепно-опашната дължина (Crown-Rump Length - CRL) (Karen 2009; Succu et al., 2023). В съгласие с установените от нас положителни корелации ($R=0.89$; $R=0.92$; $P<0.05$) между стойностите за диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при контролни и GnRH третираните овце в периода 20-35-ти гестационен

ден, са данните на Ardakani et al. (2022) за линейно нарастване на диаметъра на гестационния сак с напредване на бременността. Succu et al. (2023) също доказват значително ($P < 0.05$) увеличаване на черепно-опашната дължина на овчия ембрион с увеличаване на гестационната възраст, установено чрез морфометрични и ултразвукови изследвания.

Тази информация кореспондираше с отчетената зависимост между стойностите на изследваните биометрични показатели и дните на бременността ($R=0.94$ и $R=0.92$; $P < 0.05$) и при овцете с нормално протичаща бременност и частична късна ембрионална смърт.

Необходимо е да се отбележи обаче, че при частичната загуба на ембрион, интензитетът на нарастване на ембрионите в периода преди настъпването ѝ беше по-слаб. След това той се увеличаваше, като на 35-ия ден от бременността, средният размер на ембриона не се различаваше от този при овце с нормално протичаща бременност. В подкрепа на представените данни Fenwick et al. (2002) и Magli et al. (2007) съобщават, че здравите ембриони имат определени характеристики в периода преди имплантацията, които ги правят различни от ембрионите с понижена жизнеспособност. Една такава характеристика е клетъчното делене, като късното или бавното делене на ембрионалните клетки водило до неуспешна бременност. Sugimura et al. (2018) анализират консумацията на кислород от дялящите се ембриони и доказват, че ниската скорост на консумация на кислород води до понижен интензитет на нарастване, дължащ се на по-бавното делене. Grazul-Bilska et al. (2010) свързват растежа на ембриона и плацентарната функция с васкуларизацията. Те наблюдавали най-драматично увеличение в плътността на съдовите капиляри в матката на овце в периода 14-20-ти ден от бременността с поддържане до ден 30-ти.

Отсъствието на достоверни разлики в изследваните биометрични показатели при животни с едноплодна и многоплодна бременност може да се обясни с равномерното развитие на ембрионите при овцете до 25-ия гестационен ден или породни особености в интензитета на ембрионалния растеж през ранния гестационен период, регистрирани и от други автори (Succu et al., 2023; Ferreira-Silva et al., 2018).

Анализираната информация беше показателна, че третирането с GnRH на ден 4 след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване не оказва пряко влияние върху диаметъра на маточния лумен и размера на ембриона. Вероятните ефекти могат да бъдат индиректни и се нуждаят от допълнително детайлно изследване. Рискът от частична късна ембрионална смъртност при високопродуктивните овце от направление за мляко беше повишен между 20-ти и 25-ти ден от бременността. При частична късна ембрионална смъртност беше установено известно понижаване в интензитета на растеж на ембрионите, но този ефект беше краткотраен и не оказваше съществено влияние върху бъдещото развитие на оцелелите ембриони. Независимо от това, получения резултат може да бъде предпоставка за бъдещи проучвания на връзката между интензитет на нарастване на ембриона и предсказване на риска от загуба на бременността, особено при овце с едноплодна бременност.

Силните положителни корелации ($P < 0.05$) между дните на бременността и стойностите на ДМЛ и РЕ показват, че съвместното използване на двата показателя може да се прилага успешно за ехографско определяне на гестационната фаза при животни от породата Източнофризийска овца, особено в случаите с неизвестна дата на осеменяване. Направеното твърдение се подкрепя от други автори, които изследват промените в матката и големината на ембриона чрез ехография, с цел определяне на гестационната възраст на плода при овце (Karen et al., 2009) и кози (Karadaev et al., 2018). За реализация на това обаче, съществува необходимост всички измервания да се извършват в точно определена проекция на ембриона.

VII. ИЗВОДИ

1. Изследването на кинематичните параметри на семенната течност чрез компютърно-асистиран анализ има висока диагностична стойност и може да се използва успешно за точно определяне на качеството на свежа семенна течност от кочове след отчитане на индивидуалните и породни особености на разплодниците. Показателите средна скорост на пътя (VAP), линейност на движението (LIN) и праволинейни настъпателни движения (STR) корелират положително ($R \geq 0.55$; $P < 0.05$) с общата и прогресивната подвижност на сперматозоидите, докато криволинейната скорост (VCL) има отрицателна корелация ($R \geq 0.59$; $P < 0.05$) с подвижността на спермата.

2. Стойностите на кинематичните параметри на семенната течност оказват влияние върху репродуктивното състояние на овцете от направление за мляко, подложени на синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване със свежа-разредена сперма в размножителен сезон. Повишаването на стойностите на показателите VAP, LIN и STR кореспондира силно положително ($R = 0.62$; $R = 0.86$ и $R = 0.55$; $P < 0.05$) със стойността на бременността при овцете. Прогресивната подвижност, VAP, LIN и STR биха могли да се използват като подходящи индикатори при селекцията на кочове-пепиниери с висок фертилитет от породите Източнофризийска овца и Асааф.

3. Приложението на гонадотропен освобождаващ хормон (50 μg гонадорелин като диацетат) на ден 4-ти не оказва директно влияние върху стойността на бременността след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване. Въпреки това, комбинацията от ранно гонадотропиново третиране и въвеждането на коч на ден 12-ти след осеменяването, води до подобряване на репродуктивното състояние на ниво стадо, чрез увеличаване на броя на заплодените животни след покриване от коч.

4. Факторите ранно третиране с гонадотропен освобождаващ хормон и репродуктивен статус на овцете действат независимо един от друг и оказват значително (Wilks-lambda тестове, $P < 0.005$) влияние върху концентрацията на прогестерон от 4-ия до 20-ия ден след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване. Детайлите в прогестероновия профил на ден 12-ти и ден 20-ти, разглеждани в контекста на различното репродуктивно състояние на Източнофризийската порода овце, биха могли да дадат информация за наличието на ранна ембрионална смъртност.

5. Приложението на гонадотропен освобождаващ хормон на четвъртия ден след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване не оказва значително влияние върху средните стойности на гликопротеините свързани с бременността (PAGs) при животни с различно репродуктивно състояние (небременни, бременни и овце с КСЕ) до 20-ия ден след изкуственото осеменяване.

6. Прогресивното намаляване на гликопротеините свързани с бременността при двукратно последователно измерване през десетдневен период след 25-ия ден на бременността може да бъде индикатор за настъпила или предстояща късна ембрионална смъртност.

7. Средните стойности на PAGs между небременни и бременни овце на ден 35-ти след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване (0.414 ± 0.125 и 0.421 ± 0.121 срещу 0.078 ± 0.053 и 0.093 ± 0.034), се различават достоверно ($P < 0.05$). Това позволява измерването им да се използва за доказване на ранна бременност с чувствителност 97.3% на използвания ELISA-PAG тест.

8. Третирането с 50 μg гонадотропен освобождаващ хормон след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване на овцете не оказва директно влияние върху показателите диаметър на маточния лумен и размер на ембриона през ранния гестационен период.

9. Частична късна ембрионална смъртност при високопродуктивните овце от направление за мляко с многоплодна бременност може да се наблюдава между 20-ия 25-ия ден на бременността. Тя обуславя понижен интензитет на нарастване на останалите жизнени ембриони ($P < 0.05$) в този период, без значителен ефект върху бъдещото им развитие.

VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални приноси

1. Проведено е първото комплексно проучване в нашата страна на връзката между кинематични параметри на семенната течност от кочове и показатели, характеризиращи репродуктивното състояние на овце от породите Източнофризийска овца и Асааф след приложение на асиситирани репродуктивни технологии.

2. Извършен е *in vivo* експеримент за установяване на влиянието на кинематичните параметри върху репродуктивното състояние на овцете и са посочени подходящи маркери за определяне на репродуктивния потенциал на кочове от породите Източнофризийска овца и Асааф.

3. Установено е съвместното влияние на гонадотропиново третиране на ден 4 след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване и репродуктивния статус върху прогестероновия профил през първите двадесет дни след осеменяване на овце от направление за мляко. Определени са възможностите за доказване на ранна ембрионална смъртност.

4. Установено е влиянието на гонадотропиновото третиране на ден 4 след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване върху профила на гликопротеините свързани с бременността в ранния гестационен период на породите за мляко Източнофризийска овца и Асааф. Определен е подходящ критерий за доказване и прогнозиране на късна ембрионална смъртност.

Потвърдителни приноси

1. Регистрирани са вариациите в CASA генерираните кинематични параметри на свежа семенната течност в зависимост от породата и индивидуалните особености на коча.

2. Доказан е положителния ефект на ранното гонадотропиново третиране след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване и въвеждането на коч в стадото на ден 12-ти върху репродуктивното състояние на овце от направление за мляко.

3. Потвърдени са критичните периоди за настъпване на ранна и късна ембрионална смърт при овцете и наличието на частична късна ембрионална смърт при животните с многоплодна бременност.

4. Установена е възможността за диагностика на ранната бременност при млечни породи овце чрез използване на ELISA-PAG тест за измерване на гликопротеините свързани с бременността в кръвен серум.

5. Потвърдена е високата диагностична стойност на биометричните показатели диаметър на маточния лумен и размер на ембриона за ехографско доказване на ранната бременност и определяне на гестационната фаза.

IX. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Селекцията на кочове-пепиниери от породите Източнофризийска овца и Асааф с висок фертилитет да се извършва в размножителен сезон с включване CASA определени кинематични параметри, като диагностични маркери за качеството на семенната течност.

2. Ранното третиране с гонадотропен освобождаващ хормон след синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване да се използва за редуциране на ембрионалните загуби и подобряване на репродуктивното състояние на овцете от направление на мляко, особено във ферми с ниска репродуктивна ефективност.

3. Диагностиката на ранна бременност чрез ELISA-PAG тест за определяне на гликопротеините свързани с бременността в кръвен серум на овцете от направление за мляко да се извършва на 35-ия ден след осеменяването.

X. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Публикации свързани с дисертацията в международни научни списания с имакт фактор и импакт ранг.

1.1 Stanimir Yotov & Branimir Sinapov 2023. Effect of GnRH administration on pregnancy-associated glycoproteins in dairy sheep with different reproductive status. *Acta Scientiae Veterinariae*, 51:1920: 1-8. (Web of Science, IF 2022=0.200)

1.2 Stanimir Yotov, Branimir Sinapov 2023. Reproductive performance and progesterone profile in dairy sheep after GnRH administration on Day 4 post artificial insemination. *Veterinarija ir Zootechnika*, 81(1): 14-22. (Scopus, SJR 2022=0.128).

2. Публикации свързани с дисертацията в международни и български списания с научно рецензиране.

2.1 Branimir Sinapov, Stanimir Yotov 2023. Relationship between some kinematic parameters of ram semen and reproductive performance of dairy sheep after application of assisted reproductive technologies. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, 12(09): 307-317.

2.2 Йотов С., Синапов Б. 2022. Ембрионална смърт и редуциране на ембрионалните загуби при овце. *Ветеринарна сборка*, 5-6: 57-59.

XI. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Sinapov, B., S. Yotov, M. Karadaev & B. Ivanova, 2021. Reproductive and biometric parameters in ewes after estrus synchronisation with or without subsequent GnRH treatment and effect of partial embryonic death on some biometric parameters, Third International Scientific Conference "Veterinary Medicine in Service of People" Stara Zagora, Bulgaria, October 22-23, 2021.

2. Б. Синапов, Б. Иванова 2022. Кинематични параметри на сперматозоидите и репродуктивен отговор на овце от породата Източнофризийска овца след приложение на асистиран репродуктивни технологии. Сборник от XXXII МЕЖДУНАРОДНА ONLINE НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ „70 години „Мини Марица – изток“ – енергийна независимост и национална сигурност“, 02-03 юни 2022 г.

3. B. Sinapov, G. Bonev, S. Yotov 2023. Relationships between ram biometric indicators, semen motility and reproductive response in dairy sheep subjected to estrus synchronization and artificial insemination. Abstract book of International Scientific Conference One health, 12 may 2023, Stara zagora, Bulgaria, O-04: 15-16.

XI. РЕЗЮМЕ НА АНГЛИЙСКИ (SUMMARY)

This dissertation presents information on the influence of some important sperm kinematic parameters and early gonadotropin treatment on reproductive status and embryonic mortality in dairy sheep. In the experimental models, sheep of the East Friesian and Asaaf breeds, raised in intensive dairy sheep farms with a year-round milk production cycle were used. The influence of some sperm kinematic parameters of the rams semen on the sheep reproductive performance after the application of the assisted reproductive technologies, estrus synchronization and artificial insemination was determined. The effects of early gonadotropin treatment on progesterone profiles, pregnancy-associated glycoproteins and the ability for detection of early and late embryonic mortality by their measurement were studied. The effect of early gonadotropin treatment on some biometric parameters as uterine lumen diameter and embryo size in sheep with normal pregnancy and partial late embryonic mortality were also determined.

The analysis of the results and the conducted discussion show that the evaluation of the sperm kinematic parameters of the ram semen by Computer-assisted semen analysis can be successfully used to accurately assess the quality of fresh semen from rams after taking into account the individual and breed characteristics of the males.

Progressive motility, VAP, LIN and STR are suitable indicators in the selection of high fertility rams from the East Friesian and Asaaf breeds. Administration of gonadotropin-releasing hormone on Day 4 after estrus synchronization and artificial insemination with ram introduction on Day 12 can improve reproductive performance at flock level. The details in the progesterone profile at Day 12 and Day 20, considered in the context of different reproductive status determined by ultrasound, could provide information about the presence of early embryonic mortality. A progressive decrease in pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) when measured twice consecutively over a ten-day period after Day 25 of gestation may be an indicator of ongoing or impending late embryonic mortality. Measurement of PAGs by commercial ELISA-PAG tests on Day 35 after artificial insemination is an appropriate method for early pregnancy diagnosis in sheep. Partial late embryonic mortality in high-yielding dairy ewes with multiple pregnancies can be observed between Day 20 and Day 25 of pregnancy. It can be a reason for reduced intensity of the viable embryos growth in this period, without a significant effect on their future development.

The summarized information could be used for improvement of the reproductive process in intensive dairy sheep farms.