



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Branimira Špoljarić

**USPOREDBA UČINKA RAZLIČITIH
INDUKCIJSKIH POSTUPAKA NA
RASPLOĐIVANJE MLIJEČNIH KRAVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Branimira Špoljarić

**COMPARISON OF DIFFERENT
INDUCTION PROTOCOL EFFECTS ON
FERTILITY OF DAIRY COWS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

BRANIMIRA ŠPOLJARIĆ

**USPOREDBA UČINKA RAZLIČITIH
INDUKCIJSKIH POSTUPAKA NA
RASPLOĐIVANJE MLIJEČNIH KRAVA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Darko Gereš

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Branimira Špoljarić

**COMPARISON OF DIFFERENT
INDUCTION PROTOCOL EFFECTS ON
FERTILITY OF DAIRY COWS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. dr. sc. Darko Gereš

Zagreb, 2015.

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr. sc. Darku Gerešu, na pruženoj slobodi u odabiru teme i nesebičnom sudjelovanju u svakom segmentu izrade ovog rada. Nadalje, hvala prof. dr. sc. Juraju Grizelju, prof. dr. sc. Marku Samardžiji, prof. dr. sc. Renati Barić- Rafaj i dr. sc. Josipi Kuleš na pomoći u organizaciji pokusa i analizi podataka, i napose doc. dr. sc. Silviju Vinci na statističkoj obradi istih. Od srca hvala i svim kolegama s Klinike na pruženoj potpori. I na koncu, hvala mojim roditeljima i mojoj obitelji, zbog koje ovo sve i jest...

SAŽETAK

USPOREDBA UČINKA RAZLIČITIH INDUKCIJSKIH POSTUPAKA NA RASPLOĐIVANJE MLIJEČNIH KRAVA

Cilj kontroliranog rasplodivanja je poboljšanje plodnosti. Današnja razina razumijevanja folikularne dinamike rezultirala je razvojem sustava kontroliranog rasplodivanja s fiksnim vremenom osjemenjivanja i resinkronizacijom plotkinja koje nisu koncipirale, uz pomoć farmakoloških metoda indukcije folikulogeneze, luteolize i luteogeneze te ranom ultrazvučnom dijagnostikom graviditeta. Ovsynch protokol je rutina u poslijeporodnom rasplodivanju te programu resinkronizacije koji se koriste za poboljšanje učinkovitosti i skraćenje trajanja ponovnih inseminacija. Kako se najveći postotak koncepcije postigne ako se s protokolom započne sredinom ciklusa, najbolji način za postizanje tog cilja jest primjena presinkronizacijskih protokola koji prethode Ovsynchu, a za bolju sinkronizaciju faza ciklusa. Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 60 visokomliječnih krava podijeljenih u tri jednake skupine. Prva skupina je primila presinkronizaciju sa GnRH i PGF 9 i 2 dana prije početka Ovsyncha, druga samo PGF 2 dana prije Ovsyncha, a treća skupina je bila kontrolna i primila je samo Ovsynch. 23 dana po UO sve krave su primile GnRH a sedam dana kasnije su ultrazvukom pregledane na gravidnost. Plotkinjama koje nisu koncipirale je nastavljena resinkronizacija Ovsynchom. Postotak koncepcije se značajno razlikovao u fazi sinkronizacije, i krave koje nisu bile presinkronizirane su imale najslabiju koncepciju. U fazi resinkronizacije sve tri grupe su imale podjednaku stopu gravidnosti. Nesumnjivo je da protokoli koji se baziraju na Ovsynchu predstavljaju velik korak u shvaćanju i korištenju reprodukcije. Njihov cilj je kontrola rasta, funkcije i trajanja dominantnog folikula kako bi se poboljšala plodnost. U konačnici, dolazi i do poboljšanja mliječnosti, smanjenja stopa pobola i izlučenja i stvaranja dovoljnog broja zamjenskih junica.

Ključne riječi: mliječne krave; Ovsynch, presinkronizacija, resinkronizacija, GnRH, PGF, koncepcija

EXTENDED SUMMARY

COMPARISON OF DIFFERENT INDUCTION PROTOCOL EFFECTS ON FERTILITY OF DAIRY COWS

Aim: The aim of controlled reproduction is enhanced fertility. Knowledge of the factors and mechanisms involved in folliculogenesis and luteogenesis has resulted in development of controlled reproduction system with timed artificial insemination, resynchronization of cows that did not conceive at first AI, and strategies for better embryo survival rate. This is achieved through pharmacologically induced methods of folliculogenesis, luteolysis and luteogenesis and resynchronization in due time, with the main goal of enhancing fertility and preventing subfertility. Ovsynch is a routine procedure in postpartal insemination programs and in resynchronization programs, which are used to shorten the period between inseminations. Since the midluteal phase of oestrous cycle is desired time to start the protocol, the best way to achieve this is to apply presynchronization protocols. This induction protocols precede Ovsynch, and thanks to them, better cycle synchronization is achieved.

Methodology: The research was conducted on one dairy farm in Croatia, on 60 cows divided in three equal groups, each comprised of 20 animals. The first group A was presynchronized with GnRh and PGF nine and two days before starting Ovsynch. The second group B was presynchronized with just one application of PGF two days before Ovsynch. The third group C served as control, and was not subjected to presynchronization. All cows were artificially inseminated at fixed time. 23 days after TAI, GnRH was applied to all cows, as a start of Ovsynch in resynchronization. Seven days later, all cows were checked on pregnancy with ultrasound. Those diagnosed as non-pregnant continued with Ovsynch and TAI. Blood samples were collected for analysis of hormones (progesteron, estradiol, luteinizing hormone) and several metabolic parameters (urea, creatinin, cholesterol, total protein, glucosis, ALT, AST, GGT). Also, body condition score, parity and lactation was analysed for all cows.

Results: The results indicate that cows receiving presynchronization had better pregnancy rate compared to cows that received Ovsynch only (A 29,41 %, B 47,37 % and C 21,05 %). In resynchronization, conception rate did not differ among groups, and was around 30 %. However, BCS, parity and lactation did not have any effect on pregnancy rate. Analysis of luteinizing hormone showed that all cows had ovulated. Progesteron concentration differed significantly between group C and groups A and B ($p < 0,001$) on the start of Ovsynch in

synchronization, thus indicating that combined protocols are more effective due to better homogenization of folliculogenesis and synchronization of ovulation.

Conclusion: There is no doubt that the protocols that are based on Ovsynch (simple, and modified, but combined) represent a major step in understanding and managing the reproduction. The philosophy of this aspect is controlled induction of a new follicular wave and induction of ovulation synchronization. This is only a phase of research, one of which goals is a control of growth, function and duration of the dominant follicle, all in order to enhance fertility. Finally that would enhance milk production, reduce the morbidity and culling rate, and create a sufficient number of replacement heifers. Both of these two combined synchronization protocols used in this research are original, and they have not been previously used on dairy cow farms. Therefore, they are not found in up-to date literature. Due to good results, their application should be furtherly evaluated.

Key words: dairy cows, Ovsynch, presynchronization, resynchronization, GnRH, PGF, conception

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	2
2.1. Spolni ciklus krave	2
2.2. Regulacija spolnog ciklusa	2
2.3. Endokrinološka razdoblja spolnog ciklusa	4
2.3.1. Razdoblje pregonadotropnog vrhunca	4
2.3.2. Razdoblje postgonadotropnog vrhunca	4
2.3.3. Lutealna faza	5
2.4. Dvostanično dvogonadotropinska teorija	6
2.5. Folikularna dinamika	6
2.5.1. Folikularna dinamika prije puberteta	6
2.5.2. Folikularna dinamika za vrijeme spolnog ciklusa	7
2.5.3. Folikularna dinamika u postpartalnom razdoblju	9
2.5.4. Osobitosti folikularne dinamike u visokomliječnih krava	10
2.6. Upravljanje spolnim ciklusom	11
2.6.1. Sinkronizacija estrusa	12
2.6.2. Sinkronizacija ovulacije	14
2.7. Ovsynch	15
2.8. Presinkronizacija	18
2.9. Resinkronizacija	20
2.10. Ostali faktori koji utječu na plodnost	22
2.10.1. Postpartalni anestrus	22
2.10.2. Mliječnost	23
2.10.3. Tjelesna kondicija i negativni energetske balans	23

2.11. Metabolički profil krava	24
3. OBRAZLOŽENJE TEME	26
4. MATERIJALI I METODE	28
4.1. Životinje	28
4.2. Sinkronizacijski protokoli	31
4.3. Uzorkovanje krvi	34
4.4. Ultrazvučna dijagnostika	35
4.5. Ocjena tjelesne kondicije	36
4.6. Određivanje koncentracije hormona (luteinizirajući hormon, progesteron i estradiol)	37
4.7. Određivanje biokemijskih parametara	38
4.8. Statistička analiza podataka	39
5. REZULTATI	41
5.1. Servis- period	41
5.2. Ocjena tjelesne kondicije (BCS)	42
5.3. Laktacija	43
5.4. Mliječnost	44
5.5. Uspjeh koncepcije	45
5.6. Embrionalna smrtnost	46
5.7. Konačni postotak gravidnih životinja	47
5.8. Koncentracija progesterona	48
5.9. Koncentracija estradiola	51
5.10. Koncentracija LH	53
5.10.1. Protokol A	54
5.10.2. Protokol B	59

5.10.3. Protokol C	64
5.11. Korelacijski odnosi između varijabli za krave u istraživanju	72
5.11.1. Korelacijski odnosi između tjelesne kondicije, laktacije i mliječnosti u prvih 100 dana laktacije za krave u istraživanju	72
5.11.2. Korelacijski odnosi između vrijednosti koncentracija progesterona i estradiola u krvi po danima pokusa	73
5.12. Utjecaj vrijednosti progesterona na dane pokusa na uspješnost koncepcije između protokola	76
5.12.1. CR1	76
5.12.2. CR2	79
5.13. Uspjeh koncepcije ovisno o vrijednosti koncentracije progesterona na dane početka protokola (-9, 33) i dane osjemenjivanja (9, 42) u pre- i resinkronizacijskom dijelu pokusa	81
5.13.1. CR1	81
5.13.2. CR2	82
5.14. Usporedba vrijednosti koncentracije progesterona u dane po aplikaciji GnRH i analoga PGF, ovisno o uspjehu koncepcije	83
5.15. Razlika u koncentraciji progesterona na dan osjemenjivanja kod krava koje su koncipirale u pre.- i resinkronizacijskom dijelu pokusa	86
5.16. Analiza biokemijskih parametara	88
5.16.1. Parametri energetskeg i metabolizma bjelančevina (ukupne bjelančevine, albumini, ureja, kreatinin i glukoza)	88
5.16.2. Enzimi i jetreni markeri (bilirubin, kolesterol, ALT, AST i GGT)	95
6. RASPRAVA.....	103
7. ZAKLJUČCI	114
8. POPIS LITERATURE	115
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA	134

1. UVOD

Plodnost je glavni čimbenik ekonomičnosti mliječnog govedarstva. U posljednja tri desetljeća je opažen trend smanjivanja plodnosti s istovremenim porastom mliječnosti. Visokoproduktivne mliječne krave u jačoj su ili slabijoj mjeri subfertilne, zbog niza razloga: uvjeta života, visoke proizvodnje, stresa, hranidbe. U peripartalnom razdoblju one zbog negativnog energetskeg balansa nisu kadre sintetizirati dostatnu energiju i proteine, zbog čega dolazi do metaboličkih poremećaja koji negativno utječu na hormonalni status a posljedično i na plodnost, te je u porastu incidencija postpartalnih anestrusa, abnormalnih ciklusa i prolongiranih lutealnih faza u visokomliječnim krava. Cilj kontroliranog rasplodivanja je poboljšanje plodnosti. Današnja razina razumijevanja čimbenika i upravljačkih mehanizama folikulogeneze i luteogeneze rezultirala je dinamičnim razvojem sustava kontroliranog rasplodivanja sa fiksnim vremenom osjemenjivanja, resinkronizacijom u plotkinja koje nisu koncipirale kao i strategijom poboljšanja preživljavanja embrija, čimbenika poboljšanja plodnosti i ekonomske probitačnosti. To se postiže farmakološkim metodama indukcije folikulogeneze, luteolize i luteogeneze (Ovsynch) te pravovremenom resinkronizacijom sa ciljem povećanja efikasnosti rasplodivanja te prevencije subfertilnosti. Protokol je danas rutina poslijeporodnih rasplodivanja kao i programa reinseminacije koji se koriste za poboljšanje učinkovitosti i skraćenje trajanja ponovnih inseminacija u krava koje nisu koncipirale. Obzirom da je postotak koncepcije najveći kad protokol započne sredinom ciklusa, najbolji način za postizanje tog cilja jest primjena presinkronizacijskih protokola, tj. indukcijskih postupaka koji prethode Ovsynch-u, a kojima se postiže bolja sinkronizacija faza ciklusa, zbog opetovanih aplikacija hormona. Smisao presinkronizacije je priprema faze ciklusa za primjenu Ovsyncha, tj. sinkronizacija sredine ciklusa. Poanta je u održavanju lutealne razine progesterona, odnosno njegova arteficialna suplementacija sve do inducirane regresije CL, budući su sublutealne razine progesterona sinonim snižene plodnosti. Naravno, najbolji je učinak kada je u vrijeme prve injekcije GnRH prisutan dominantni folikul, a posebno je učinkovit u anovulacijskih krava.

Cilj ovog istraživanja je usporediti uspjeh dvaju presinkronizacijskih protokola sa Ovsynchom, uz analizu čimbenika koji mogu utjecati na sam uspjeh koncepcije (tjelesna kondicija, paritet, mliječnost). Nadalje, istražiti će se uspjeh resinkronizacije ovisno o korištenom presinkronizacijskom protokolu a analizirat će se i metabolički status krava i njegov utjecaj na rasplodivanje.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Spolni ciklus krave

Krava je poliestrična, najčešće monoovulatorna, vrsta životinje, kod koje tjeranje traje tijekom cijele godine, uz blago naglašenu sezonost. Spolni ciklus se sastoji od 4 faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus, a spolna aktivnost se prekida samo u vrijeme graviditeta ili bolesti. Pubertet u junica nastupa sa oko 16 mjeseci. Spolni ciklus traje 21 dan (18 do 24, ovisno o broju folikularnih valova), samo tjeranje traje prosječno 18 h (4 do 24) a ovulacija se javlja oko 30 h nakon početka vanjskih znakova tjeranja (GAVERICK i SMITH, 1993.; GAVERICK i LUCY, 2002.) Estrusni ciklus se može podijeliti u dvije različite faze: folikularnu (od 19 dana pa do estrusa) i lutealnu (od dana 1 do dana 18); ili u četiri različita razdoblja: estrus (dan 0), metestrus (dan 1 do 3), diestrus (dan 4 do 18) i proestrus (dan 19 pa do pojave znakova estrusa). Sam estrus je karakteriziran pasivnim aktom opasivanja, uz rast folikula i pripremu za ovulaciju; u metestrusu dolazi do finalnog zrenja folikula i ovulacije, formacije mladog žutog tijela i početka lučenja progesterona, koji kulminira u diestrusu. Razgradnjom žutog tijela ponovno počinje folikularna faza i novi ciklus (HANSEN, 1985.; CROWE, 2002.; WALKER i sur., 1996.).

2.2. Regulacija spolnog ciklusa

Regulacija spolnog ciklusa je određena složenim odnosima središnjeg živčanog sustava, sekretornih i ciljnih tkiva te određenim hormonima. Glavnu osovinu čini sustav hipotalamus-hipofiza- jajnik. Naime, vanjski podražaji različitog podrijetla (mirisni, slušni, zvučni, taktilni) se u središnjem živčanom sustavu preko hipotalamus-hipofiza-jajnik osovine pretvaraju u informacije bitne za reprodukciju (DAY i ANDERSON, 1998.). Na poticaj iz središnjeg živčanog sustava, endokrini neuroni hipotalamusa stvaraju gonadotropne releasig hormone (GnRH). Zahvaljujući bliskom smještaju hipotalamusa i hipofize, GnRH hipotalamo-hipofiznim portalnim krvotokom dolaze do adenohipofize i utječu na lučenje gonadotropnih hormona: folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Lučenje svih

navedenih hormona je pulzatorne prirode, i upravo su promjene amplitude i frekvencije lučenja GnRH odgovorne za promjene lučenja hipofize. Mnogi vanjski (fotoperiod, feromoni, hranidbeni i metabolički status jedinke) i unutarnji (povratni mehanizam gonada) čimbenici svoj utjecaj na spolnu aktivnost jedinke iskazuju putem moduliranja lučenja GnRH. Pulzatorna sekrecija LH iz adenohipofize usko prati pulzatorno lučenje GnRH iz hipotalamusa, koji potiče i biosintezu i lučenje LH te obnavljanje njegovih izvora u hipofizi. Na biosintezu FSH djeluju i različiti čimbenici od strane gonada, iako je GnRH nezamjenjiv u njegovu održavanju. Hipofizne zalihe FSH su malene i ne nadmašuju njegovu sekreciju, za razliku od zaliha LH, koje su i deseterostruko veće nego hipofizne zalihe FSH. Na nivou jajnika, FSH potiče rast folikula. Pod njegovim utjecajem u granulosa stanicama dolazi do aromatizacije testosterona u estradiol -17 β . Estradiol putem pozitivne povratne sprege na hipotalamus i hipofizu potiče lučenje GnRH. Nakon što estradiol pređe određeni prag, hipotalamus odgovori vrhuncem GnRH koji rezultira lučenjem LH. Uloga LH jest stimulacija maturacije folikula, produkcije estradiola i u konačnici ovulacije, a utječe i na formiranje i rano održavanje žutog tijela (corpus luteum, CL) (HANSEL i CONVEY, 1983.; LUCY i sur., 1992.; GARVERICK i SMITH, 1993.). Osim estradiola, granulosa stanice proizvode i inhibin, koji vrši negativnu povratnu spregu na otpuštanje FSH iz hipofize i time kontrolira razvoj folikula. Nakon ovulacije, ostaci folikula se pod djelovanjem LH remodeliraju u žuto tijelo, šupljina folikula se ispunja krvnim žilama, granulosa stanice se povećaju i dolazi do lučenja progesterona i oksitocina (KARSCH, 1984.). Progesteron je hormon odgovoran za normalnost ciklusa u krave, i nakon koncepcije, primarno je odgovoran za održavanje graviditeta. Smanjuje lučenje GnRH i time sprječava nove ovulacije. Nadalje, progesteron priprema maternicu za primanje embrija u smislu zadebljanja endometrija i sprječavanja mogućih kontrakcija miometrija a koje bi mogle smetati nidaciji. Ukoliko po ovulaciji ne dođe do oplodnje i posljedično nema prepoznavanja graviditeta, onda endometrij negravidne maternice luči prostaglandin F2 α (PGF2 α). PGF2 α potiče luteolizu djelovanjem na velike lutealne stanice CL kao i na sužavanje krvnih žila koje opskrbljuju CL. Oksitocin koji se izlučuje iz CL se veže na receptore na negravidnoj maternici i stimulira lučenje PGF2 α . Po razgradnji CL dolazi do pada koncentracije progesterona, a time i do prestanka blokade na hipotalamus i opet počinje pulzatorno lučenje GnRH te nova folikularna faza sa zrenjem folikula, estrusom i ovulacijom (GAVERICK I LUCY, 2002.; NOAKES, 2009.; PTASZYNSKA, 2009.)

2.3. Endokrinološka razdoblja spolnog ciklusa

Kako bi se lakše opisala hormonalna interakcija za vrijeme spolnog ciklusa, STEVENSON (2007.) isti dijeli na tri endokrinološka razdoblja: pregonadotropni vrhunac, postgonadotropni vrhunac i lutealno razdoblje.

2.3.1. Razdoblje pregonadotropnog vrhunca

Razdoblje pregonadotropnog vrhunca počinje prestankom funkcije žutog tijela a završava preovulatornim valom FSH i LH, koji izazivaju ovulaciju zrelog folikula za 24 do 30 h kasnije. Dolazi do rapidnog pada koncentracije progesterona, istovremenog porasta koncentracije estradiola i ubrzanog rasta preovulatornih folikula. Padom koncentracije progesterona dolazi do porasta bazalne koncentracije LH na jedan puls po satu, ali sa niskim amplitudama. Uigrani porast lučenja LH i estradiola u konačnici rezultira pojavom estrusa, gdje je estradiol odgovoran i za inicijaciju estrusnog ponašanja i za preovulatorni LH val. Čini se da estradiol potiče frekventniju pulzaciju GnRH od strane hipotalamusa i potiče osjetljivost hipofize na pulseve GnRH. Preovulatorni val FSH i LH traje 8 do 10 sati, a prestaje kad hipofiza postaje refrakтерна na GnRH pulseve (tzv. "down regulation" zbog smanjenja broja receptora za GnRH i pražnjenja zaliha za LH). Smanjena koncentracija estradiola kao i povećana koncentracija progesterona mogu imati negativan utjecaj na lučenje GnRH te u konačnici blokirati preovulatorni FSH i LH val (HANSEL i CONVEY, 1983.; FORTUNE, 1994.).

2.3.2. Razdoblje postgonadotropnog vrhunca

Postgonadotropni vrhunac karakterizira pad koncentracije estradiola poslije nastupa estrusa, zbog luteinizacije folikula. Mehanizmi ovulacije su slični onima kod upale, a proces rupturiranja folikula je reguliran mnoštvom intrafolikularnih medijatora. Dolazi do naglog pada estradiola u folikularnom sadržaju i do porasta progesterona, jer se i teka i granulosa stanice diferenciraju

u lutealne stanice za vrijeme formacije žutog tijela. Teku stanice se diferenciraju u male, a granulosa u velike lutealne stanice. Ostatak metestrusa karakteriziraju niske koncentracije LH, estradiola i progesterona u krvi. Često neposredno prije ovulacije ili 23 do 30 h po početku preovulatornog vrhunca dolazi do sekundarnog porasta FSH koji je kritičan za regrutaciju novog folikularnog vala. Taj sekundarni FSH val je najvjerojatnije posljedica nestanka produkcije inhibina od strane folikula za vrijeme ovulacije (HANSEL i CONVEY, 1983.; ESPEY, 1994.; WOOD, 1999.; NISWENDER, 2000.).

2.3.3. Lutealna faza

Lutealna faza počinje sa lučenjem značajne koncentracije progesterona od strane žutog tijela, koja nakon 4 do 5 dana ciklusa prelazi 1ng/ml u krvi. S uspostavom progesteronske dominantne negativne povratne sprege modificira se i lučenje LH ponovno na manju frekvenciju i veću amplitudu. Osmog do desetog dana progesteron dostiže svoj vrhunac, koji se podudara sa maksimalnom težinom nastalog žutog tijela. Za lučenje progesterona su odgovorne i male (15% lučenja) i velike lutealne stanice (85%), s time da male imaju gotovo sve receptore za LH, a velike za PGE2 i PGF2 α . Iako su koncentracija i sposobnost vezanja receptora za PGF2 α jednake na dane 2, 4, 6 i 10 spolnog ciklusa, nije jasno zašto je CL prije petog dana refrakteran na djelovanje PGF2 α . Velike lutealne stanice proizvode i neurofizin i oksitocin, identične onima lučenima od hipotalamusa a pohranjenima u neurohipofizi. Za vrijeme graviditeta u ranoj fazi, oko 20 dana velike lutealne stanice nestaju, a dio malih lutealnih povećava svoj promjer. Nakon 14 dana dominacije progesterona endometrij počinje lučiti PGF2 α u pulsevima od kojih svaki traje do 6 sati, a ukupno traju oko 36 sati. Pod djelovanjem PGF2 α dolazi do regresije ili smrti žutog tijela, naglog pada koncentracije progesterona i oksitocina na bazalne koncentracije u perifernoj krvi i u sadržaju CL unutar 6 do 10 sati. PGF2 α lučen od materničnog roga ipsilateralnog jajniku sa aktivnim CL iz venske krvi materničnih vena prelazi aktivnim transportom u ovarijalne arterije. Dosadašnje spoznaje ukazuju da PGF2 α svoj luteolitički učinak postiže djelomično direktnim učinkom na lutealne stanice a djelomično indirektno smanjenjem protoka krvi kroz CL. Nije dokazano je li to vazokonstriktorsko djelovanje PGF2 α uzrok ili posljedica same luteolize (STEVENSON, 2007.; NOAKES, 2009.). Sve se više važnosti daje utjecaju oksitocina na luteolizu. Naime, raspadanjem CL dolazi do otpuštanja oksitocina koji djeluje na endometrij i pojačava lučenje PGF2 α . Za sam početak

luteolize je odgovoran porast koncentracije estradiola kojeg luči dominantni folikul nastao kasnije u ciklusu. Estradiol inducira oksitocinske receptore na endometriju, koji, kad se na njih veže oksitocin, aktiviraju fosfolipazu A2 i otpuštanje arahidonske kiseline što, kaskadnim nizom reakcija, rezultira nastankom PGF2 α i eventualnom luteolizom. Luteolitički pulsevi PGF2 α se podudaraju sa istovremenim porastom koncentracije estradiola i padom koncentracije progesterona (NISWENDER, 2000.).

2.4. Dvostanično dvogonadotropinska teorija

Optimalna sinteza estrogena u jajnicima je ovisna o suradnji dvaju gonadotropina i dvaju tipova stanica (FSH i LH, te teka i granulosa stanica; dvostanično dvogonadotropinski model); dok je biosinteza progesterona ovisna primarno o LH u granulosa luteiniziranim stanicama (FORTUNE, 1994.; NISWENDER, 2000.). Sazrijevanje folikula omogućuje koordinirana akcija FSH i LH preko receptora u teka i granulosa stanicama. LH se veže na receptore u teka stanicama i, stimulacijom aktivnost 17 α -hidroksilaze, stimulira produkciju androgena iz kolesterola u pregnenolon i androstenedion koji kroz bazalnu membranu difundira u granulosa stanice gdje se konvergira u testosteron. Povišena razina testosterona aktivira enzim aromatazu pod čijim djelovanjem se testosteron konvergira u estradiol, koji se potom prelazi u folikularnu tekućinu ili kroz bazalnu membranu ulazi u cirkulaciju, na taj način povisujući koncentraciju estradiola, koja opet, inhibira sintezu progesterona iz pregnenolona što se naziva dvostanično dvogonadotropnim modelom (FORTUNE, 1994.).

2.5. Folikularna dinamika

2.5.1. Folikularna dinamika prije puberteta

U vremenu prije puberteta dolazi do razvoja grupa folikula u pravilnim vremenskim intervalima počevši od drugog tjedna života (ADAMS, 1994.; HAFEZ i HAFEZ, 2008.; NOAKES, 2009.). Sa odrastanjem jedinke se povećava promjer dominantnog folikula ali i broj folikula po valu, što govori o usklađivanju funkcije hipofize i jajnika. Dakle, hipotalamusna

neaktivnost, odnosno nedostatno lučenje GnRH u hipotalamo-hipofizni krvotok, je odgovorna za prepubertalni status. Naime, prema gonadostatskoj teoriji puberteta (DAY i ANDERSON, 1998.; STEVENSON, 2007.) estradiol blokira lučenje LH i GnRH zbog njihove visoke osjetljivosti na negativnu spregu estradiola. Sukladno tome, nadolaskom puberteta povećava se prag podražljivosti hipotalamusa na estrogene, što znači da hipotalamus postaje manje osjetljiv na estradiolovu negativno povratnu spregu. Time se smanjuje i inhibični učinak na moduliranje lučenja GnRH i LH kojima raste frekvencija lučenja. Sam ulaz u pubertet karakterizira daljnji porast frekvencije lučenja LH i pojava ovulacije, s posljedičnim porastom progesterona u krvi. Nakon toga slijedi normalna uspostava estrusnog ciklusa koja je u krava prekinuta samo za vrijeme gravidnosti ili teže poremetnje hranidbenog statusa životinje.

2.5.2. Folikularna dinamika za vrijeme spolnog ciklusa

Kod monoovulatornih vrsta, rast folikula na jajnicima se odvija periodičkim valovima razvoja folikula, tzv. folikularnim valom. Folikularni valovi se javljaju tokom cijelog estrusnog ciklusa u krava. Najučestaliji je ciklus sa dva vala razvoja folikula, a moguća su i tri do četiri vala. Svaki folikularni val karakterizira rast folikula promjera većeg od 4 mm koji se u pravilu ustanovljuje retrogradno, po odabiru dominantnog folikula (FORTUNE i sur. 1988.; GINTHER i sur., 1996a., 2001.; MIHM i sur., 2002.; HAFEZ i HAFEZ, 2008.). Svaki val se sastoji od kohorte folikula promjera 1-2 mm koji počinju rasti u promjeru (faza odabira), a najveći od njih postaje dominantan i nastavlja rast (faza selekcije), dok ostali degeneriraju i atreziraju. GINTHER i sur. (2000.) navodi kako se kod goveda, nakon što folikuli dosegnu 8,5 mm u promjeru, u pravilu izdvoji jedan, dominantni folikul iz kohorte rastućih folikula, i to naziva folikularnom devijacijom. Nakon devijacije, dominantni folikul nastavlja svoj rast, dok subordinantnim folikulima brzina rasta opada i eventualno se počinju smanjivati. Poznato je da ulogu u koordinaciji rasta i razvoja folikula imaju FSH, LH i porodica inzulina nalik čimbenika rasta (IGF- I). WILTBANK i sur. (2011a.) opisuju su dva vala lučenja FSH u periovulatornom periodu, regulirana od strane hipotalamusa preko GnRH te inhibirana čimbenicima od strane jajnika, napose estradiolom i inhibinom. Estradiol je odgovoran za preovulatorni GnRH val koji rezultira otpuštanjem i FSH i LH, a njihov preovulatorni porast slijedi i drugi val FSH, koji se povezuje sa pojavom i rastom prvog folikularnog vala u ciklusu. Taj val FSH je vezan za privremeni pad koncentracije inhibina A i smanjenu koncentraciju estradiola zbog LH vala.

Koncentracija FSH opada negdje u vrijeme devijacije folikula, koja je privremeno vezana sa porastom LH receptora u granulosa stanicama i prijemljivošću na LH u većini provedenih studija. Naime, dokazano je da je razvoj prijemljivosti na LH povezan sa devijacijom bitan za stjecanje ovulatorne sposobnosti, dok su dominantni folikuli razvijani u stanjima smanjenog lučenja LH bili manje veličine, što govori o zatajivanju selekcijskog mehanizma. Dakle, uloga LH u rastu folikula nakon devijacije se pokazuje sve važnijom, vjerojatno zbog nastajanja LH receptora na granulosa stanicama dominantnog folikula.

Jednom kad postane dominantan, folikul nastavlja tri faze razvoja: rast, za vrijeme kojeg mu se povećava promjer kroz 6 dana; zatim staza rasta (2-3 dana) u koji mu se promjer ne mijenja te naposljetku regresija, kad dolazi do smanjenja promjera i atrezije samog folikula (ukoliko je pod progesteronskom dominacijom suprimirano lučenje LH). Bez obzira koliko valova bilo u ciklusu, prvi uvijek počinje oko prvog dana ciklusa (STEVENSON, 2007.), dok se drugi, treći i četvrti javljaju u varijabilna vremena, ovisno o duljini ciklusa. Krave sa duljim ciklusom imaju veći broj folikularnih valova. Neki autori navode kako kod krava najčešće postoje tri vala razvoja folikula tokom jednog estrusnog ciklusa (PIERSON i GINTHER, 1984.; FORTUNE i sur., 1988.; SAVIO i sur. 1988.): prvi val se javlja rano u ciklusu i odgovoran je za porast estradiola 6 dana ciklusa (GLENCROSS i sur., 1973.); drugi val se javlja 15 do 17og dana ciklusa i važan je za početak luteolize (HUGHES i sur., 1987.; FOGWELL i sur., 1985.). Treći val se javlja za vrijeme proestrusa i rezultira ovulatornim folikulom. COLAZO i MAPLETOFT (2014.) navode kako se prvi val javlja na dan ovulacije, tj. Dan poslije estrusa (dan 0). u ciklusu sa dva vala, drugi val se javlja na dan 9 ili 10, dok u ciklusu sa tri vala drugi val nastupa osmog ili devetog dana, a treći val 15. ili 16.og dana ciklusa. Prvi folikularni val je posljedica sekundarnog porasta FSH poslije preovulatornog vrhunca. Jedan do dva dana prije svakog slijedećeg vala folikula dolazi do kratkotrajnog porasta koncentracije FSH. Neposredno po prelasku najvećeg folikula u kohorti u dominantni folikul, dolazi i do porasta u koncentraciji estradiola. Najveći folikul dominira nad ostalim folikulima u kohorti lučenjem različitih tvari, uključujući inhibin (TAYA i sur., 1996.). Obzirom na fino reguliranu pojavnost folikularnih valova, u svakoj fazi ciklusa je na jednom jajniku prisutan barem jedan dominantni folikul. To otežava točnu dijagnostiku faze spolnog ciklusa samo na temelju rektalne palpacije jajnika (STEVENSON, 2007.).

2.5.3. Folikularna dinamika u postpartalnom razdoblju

FSH valovi se javljaju tijekom cijelog graviditeta u krava, s time da su na početku folikuli veći a koncentracija FSH niža (u 4. mjesecu promjer je 11,1 mm a koncentracija 0,79 ng/mL), a prema kraju graviditeta stanje se mijenja, tj. koncentracija raste a folikuli su sve manji (u 9. mjesecu promjer je 8,5 mm a koncentracija 1,01 ng/mL). Prvi postpartalni FSH val se javlja između drugog i sedmog dana (GINTHER i sur., 1996b.; WILLIAMS i sur., 1996.), a samo razdoblje od poroda do prve postpartalne ovulacije ovisi koji će val rezultirati ovulacijom. Dakle, prvi dominantni folikul iz prvog postpartalnog folikularnog vala može atrezirati, ovulirati ili postati veliki anovulatorni folikul, npr. cista. SAVIO i sur. (1990.) navode kako je dominantni folikul prvog vala ovulirao u 74 % krava, dok se kod 21% krava pretvorio u cistu. BUTLER i sur. (2006.) imaju nešto drugačije rezultate: samo 31 % krava je ovuliralo, kod 44 % krava je došlo do atrezije dominantnog folikula zbog niske koncentracije estradiola. Kod ostatka je došlo do nastanka velikog anovulatornog folikula koji je postao cista u 15 % slučajeva, a kod preostalih 11 % krava je lučio velike koncentracije estradiola ali bez ovuliranja. Pulzatorno lučenje LH za vrijeme dominantne faze folikularnog vala je vjerojatno glavni pokretač rasta i produkcije estradiola od strane dominantnog folikula. Stoga je nedostatno lučenje LH vjerojatno limitirajući faktor koji rezultira nedovoljnom produkcijom estradiola i posljedičnom atrezijom dominantnog folikula iz prvog postpartalnog folikularnog vala (CROWE, 2008.). Razvoj anovulatornih cista koje produciraju enormne količine estradiola još nije razjašnjen. Vjerojatno je u pozadini sublutealna koncentracija progesterona koja nastaje kao posljedica otpuštanja progesterona iz masnog tkiva prilikom gubitka tjelesne težine u ranom postpartalnom periodu, a koja onemogućuje pozitivnu spregu estradiola na hipotalamus, tj. ne dolazi do GnRH/LH vala potaknutog estradiolom (GUMEN i WILTBANK., 2002., 2005.; HATLER i sur., 2003.; RODRIGUES i sur. 2011.). I sljedeći valovi podliježu istoj sudbini kao i prvi postpartalni. Temeljeno na brojnim pokazateljima, kao što su estrusna aktivnost, praćenje ovulacije i koncentracije progesterona u mlijeku, STEVENSON i sur. (1997.) su pokazali kako kod 95 % krava u prva četiri tjedna po teljenju dolazi do normalne ciklične aktivnosti na jajnicima, dok se otprilike 20 do 25 % krava poslije 60 dana postpartalno (trajanje volunteer waiting period-a) nalazi u anestrusu.

Iako se prvi folikularni val javlja 4 do 12 dana postpartalno, prva ovulacija nastupa u prosjeku $33,3 \pm 2,1$ dan kod američkog holštajna. Taj kasniji nastup ovulacije je povezan sa negativnom energetskim balansom u ranom postpartalnom razdoblju i redukcijom u pulzaciji

LH, koja je potrebna za stimulaciju finalnih stadija rasta folikula i produkcije estradiola. Međutim kasniji nastup ovulacije nije povezan sa povećanom mliječnošću. ERB (1984.) je pokazao kako veća mliječnost nije uzrokovala anovulaciju ali kako su anovulatorne krave imale bolju mliječnost. Anovulacija se javljala kod krava sa tjelesnom kondicijom ispod 2,5 boda i malim promjerom folikula; dok je većina anovulatornih krava imala odgovarajuću tjelesnu kondiciju i folikule veće od 20 mm, a samo 20 % anovulatornih krava je imalo tjelesnu kondiciju iznad 3,25 boda.

2.5.4. Osobitosti folikularne dinamike u visokomliječnih krava

Fiziologija reprodukcije je donekle promijenjena u mliječnih krava, i u kontroli folikularne dinamike na umu treba imati nekoliko posebitosti: kao prvo, mliječne krave imaju sniženu razinu cirkulirajućeg estradiola obzirom na veličinu dominantnog folikula; možda zbog ubranog metabolizma estradiola kod krava sa velikim folikulima (SANGSRITAVONG i sur., 2002.), Opažen je i pad cirkulirajućeg estradiola sa porastom mliječnosti (LUCY i sur., 1992.; LOPEZ i sur., 2005.). Obzirom da to utječe i na smanjenje ekspresije estrusa, programi koji koriste umjetno osjemenjivanje u fiksno vrijeme (timed artificial insemination, TAI) se mogu optimizirati sa umjetnim osjemenjivanjem u vrijeme ovulacije, dok kod onih bez TAI period do ovulacije može biti jako varijabilan. Nadalje, kod visokoproduktivnih mliječnih krava koje se osjemenjuju na estrus, dolazi do porasta promjera folikula usporedo sa rastom mliječnosti (WILTBANK i sur., 2006.). Međutim, zbog već spomenute niže razine estradiola, sama ovulacija može kasniti zbog nedostatka pokretanja GnRH/LH vala, što može objasniti smanjenu plodnost kod krava osjemenjivanih na estrus (SANTOS i sur., 2010.). Kao treće, kod mliječnih krava je visok postotak anovulacije, bilo kao posljedica većeg folikula (a ipak manjeg od veličine za cistu) koji se može riješiti TAI programima jer je u njegovoj etiologiji neosjetljivost hipotalamusa na estradiolovu pozitivnu povratnu spregu. Međutim, anovulatorne ili krave sa niskom razinom progesterona na početku Ovsynch protokola često imaju slabiju plodnost nego one sa višom razinom progesterona (GUMEN i sur. 2003.; BISINOTTO i sur., 2010.). Zadnja posebnost mliječnih krava jest povećana učestalost dvostrukih ovulacija vezano sa porastom mliječnosti (LOPEZ i sur., 2005.).

Visoka mliječnost je povezana sa promjenama u fiziologiji reprodukcije koje mogu biti u pozadini smanjene reproduktivne učinkovitosti (WILTBANK i sur., 2006.). Krave u laktaciji

imaju kraći estrus, slabije stope koncepcije (20-40 %) i veći postotak embrionalne smrtnosti u odnosu na junice. Druge patologija kojima uzrok može biti povezan sa povećanom mliječnošću su: promjena vremena do prve ovulacije, prerana luteoliza, kratki ciklusi, zakašnjela luteoliza ili perzistentni CL, produljeni interlutealni intervali, nastanak folikularnih cista i anovulacija, te promjene u folikularnoj dinamici, morfologiji jajnika, duljini estrusa i koncentraciji hormona. Neke od ovih promjena su povezane sa mliječnošću dok kod drugih veza nije utvrđena (WILTBANK i sur., 2006.). Naime, povećana mliječnost je povezana sa ubrzanim metabolizmom steroidnih hormona i njihovom bržom razgradnjom, koja može imati utjecaja na normalne aspekte reprodukcije, obzirom da steroidni hormoni, napose progesteron, imaju centralnu ulogu u gotovo svim aspektima reprodukcije (XU, 2002.).

2.6. Upravljanje spolnim ciklusom

Kako bi se kravama omogućio oporavak od negativnog energetskeg balansa te potpuna involucija maternice poslije poroda, s umjetnim osjemenjivanjem se ne počinje do određenog postpartalnog razdoblja, unatoč mogućim vidljivim estrusima (CHEBEL, 2008.). Riječ je o tzv. voluntary waiting periodu (VWP) koji je specifičan za svako stado, no kod mliječnih krava se kreće između 45 i 60 dana po porodu (CHEBEL, 2008., INCH AISRI i sur., 2008.). Međutim, problematika loše ekspresije estrusa kod visokomliječnih krava rezultira i puno kasnijim osjemenjivanjem. Krave koje ne zabređaju u za to optimalno vrijeme ostaju u stadu iako im je mliječnost snižena, i, ako zabređaju, to se desi već pred kraj laktacije te će u tranzicijski period ući predebele, a poznato je da neoptimalna tjelesna kondicija u tranziciji i za vrijeme teljenja rezultira većim negativnom energetskeg balansom i posljedičnim problemima u reprodukciji (CHEBEL, 2008.; ROCHE i sur., 2009.). Ukoliko se VWP produlji na 50 do 75, odnosno 75 do 100 dana postpartalno, postotak koncepcije mora biti viši kako bi se postigao isti postotak gravidnih krava kao i kod VWP kraćeg trajanja (CHEBEL, 2008). INCH AISRI i sur. (2008.) su analizirali optimalno trajanje VWP. Sa ekonomskog gledišta, svaki VWP dulji od 6 tjedana je urokovao gubitke. Prema procjenama, VWP u trajanju od 6 tjedana rezultira međutelidbenim razdobljem od 391 dan, umjetnim osjemenjivanjem na 11 tjedan postpartalno, prosječnom mliječnošću od 8200 kg mlijeka i prosječnim brojem teladi od 0,93. Produljenjem VWP sa 6 na 10 tjedna postpartalno, međutelidbeno razbolje se produljilo na 406 dana, mliječnost se smanjila na 8135 kg, kao i broj teladi na 0,90, ali indeks osjemenjivanja je pao s 1,98 na 1,76.

Optimalno trajanje VWP se razlikovalo među kravama, te je kod 37 % krava iznosilo 6 tjedana, a kod 63 % krava je optimalno trajalo do 8 tjedana, s time da se nakon šestog tjedna smanjivao postotak krava koje su ulazile u optimalni VWP, te je nakon 9 tjedana samo 10 % krava bilo u optimalnom razdoblju. VWP dulji od 10 tjedana se preporuča za primipare krave koje se tele zimi, sa niskom mliječnošću ali visoke perzistencije, sa kasnijim postpartalnim ovulacijama i postpartalnom patologijom. No, ponekad treba imati na umu da, iako je kraći VWP ekonomski poželjniji, produljeni međutelidbeni intervali mogu biti profitabilniji. Uvođenje sinkronizacijskih programa sa fiksnim vremenom osjemenjivanja u management reprodukcije mliječnih krava je smanjilo servis period za otprilike 17 dana (CHEBEL, 2008).

2.6.1. Sinkronizacija estrusa

Sinkronizacija estrusa u krava, pa tako i u drugih vrsta, vuče korijene još iz 1960. godina, i još je uvijek u razvoju (XU, 2002.; PETERS i PURSLEY, 2002.; VAN EERDENBURG i sur., 2002.; MACMILLAN i sur., 2003.; DOBSON i sur., 2008.). Kod krava, razlozi za korištenje programa sinkronizacije su raznoliki: od smanjenja troškova vezanih za detekciju estrusa, poboljšavanja upravljanja farmom zbog efikasnijeg uočljavanja životinja koje se tjeraju, povećavanja broja jedinki koje će koncipirati u isto vrijeme kako bi se lakše organizirao nadzor i skrb nad teljenjem, te za olakšavanje metoda multiple ovulacije i embriotransfera (THATCHER i sur., 1989.; XU, 2002.) Neophodna je primjena reproduktivnog managementa u svrhu rješavanja rasplodne neučinkovitosti. Zato su razvijeni različiti sustavi sinkronizacije ovulacije i primjene umjetnog osjemenjivanja. Kritične točke tih programa su učinkovita regulacija trajanja žutog tijela i folikula, te osiguravanje odgovarajućeg hormonalnog miljea (WILTBANK i sur., 2011b.). Naime, od svih hormona uključenih u regulaciju spolnog ciklusa, progesteron se smatra glavnim dirigentom (XU, 2002.) i stoga upravljanje njegovom koncentracijom ima za posljedicu kontrolu estrusa. Kontrola se postiže ili artificijelnim produljenjem lutealne faze korištenjem egzogenog progesterona ili gestagena, ili skraćanjem lutealne faze uz pomoć prostaglandina F_{2α} ili njegovih analoga. Kako je razvoj folikula odgovoran za regulaciju aktivnosti žutog tijela, farmakološka manipulacija folikularnom dinamikom bi mogla utjecati na njegov vijek (THATCHER i sur., 1989.).

Kad je riječ o korištenju progesterona, cilj je oponašanje lutealne faze, umetanjem intavaginalnih ili subkutanih pripravaka progesterona (MACMILLAN i PETERSON, 1993.;

CHENAULT i sur., 2003.) Postupak traje 9-14 dana, a estrus uslijedi 2 do 3 dana po uklanjanju pripravka egzogenog progesterona. Kravama sa žutim tijelom progesteron prevenira spontanu luteolizu. Ako je pripravak primijenjen u ranoj fazi ciklusa (prvih pet dana) on koči formiranje novog CL ili ograničava trajanje života novonastalom CL. U oba slučaja, uklanjanjem umetka, u roku tri dana nastupa novi estrus. Zbog tehničkih razloga aplikacije, razvijeni su sustavi sa depo pripravcima progesterona (PRID; CIDR). Međutim, iako su doze progesterona u ovim sustavima uspješne u supresiji estrusa i ovulacije, nisu uspješne u sprečavanju nastanka perzistentnog dominantnog folikula, koji nastaje zbog nepostojanja funkcionalnog žutog tijela, te je posljedično plodnost smanjena unatoč sinkroniziranom estrusu. Stoga su programi sinkronizacije estrusa bazirani na suplementaciji progesterona nadopunjeni primjenom PGF2 α , Ovsynchom (XU i sur., 1997.; XU, 2002.; STEVENSON i sur., 2006.).

S druge strane, postoji nekoliko pripravaka i analoga prostaglandina koji se mogu koristiti u sinkronizaciji estrusa (FETROW i BLANCHARD, 1987.; PURSLEY i sur., 1995.). Ovisno o hormonalnom okruženju i regresiji žutog tijela, svaki dominantni folikul može sazrijeti i ovulirati. Aplikacija prostaglandina inducira ovulaciju (naravno ako je apliciran u fazi zrelog folikula) i nastanak novog dominantnog folikula iz novog folikularnog vala, što rezultira duljom folikularnom fazom. Jednokratna aplikacija prostaglandina između sedmog i 17.og dana ciklusa će uspješno razgraditi postojeće žuto tijelo, te će inducirati estrus. Međutim, mlado žuto tijelo (6. i 7. dan ciklusa) nije senzibilizirano na prostaglandine, i zato nakon jedne aplikacije prostaglandina svega dvije trećine tretiranih jedinki reagira novim estrusom tijekom naredna 72 sata (XU, 2002.). Kako bi se postigla što veća sinkronost estrusa, razvijen je sustav sa dvije uzastopne aplikacije prostaglandina u razmaku 11 do 14 dana uz inseminaciju po detektiranom estrusu. Time se osigurava postojanje žutog tijela kod druge aplikacije. Problem je ponovno u vremenu inseminacije (STEVENSON i sur., 1987.). Kod junica do estrusa nastupa unutar 7 dana, s tim da je najviše tjeranja između 48. i 72. sata poslije drugog prostaglandina. Kod starijih krava je jača disperzija i stoga su nešto bolji sa 14-dnevnim razmakom između dvije aplikacije (SENGER, 1994.; XU i sur., 1997.; BORMAN i sur., 2003.). Najbolji je način da se krave, nakon druge injekcije prostaglandina nisu imale estrus, još jedanput (treći puta) tretiraju sa PGF2 α , nakon čega se inseminiraju uz fiksno vrijeme, obično 56-72 sata („Targeted Breeding“; LEBLANC i sur., 1998.; XU, 2002.; PTASZYNSKA, 2009.). Možda je i bolja metoda kombinacija dvokratnog prostaglandinskog protokola sa Ovsynchom jer se postiže najbolja homogenizacija folikula, budući Ovsynch počinje u optimalnoj fazi (LEBLANC i sur., 1998.; NEBEL i JOBST, 1998.; STEVENSON i sur., 1999.).

2.6.2. Sinkronizacija ovulacije

Skraćeni vremenski okvir i lakše otkrivanje plotkinja u estrusu je svakako prednost korištenja sinkronizacije estrusa, no i dalje ostaju problemi upravljanja velikim brojem životinja i otkrivanja pravog trenutka za inseminaciju. Osim uspješnog sinkroniziranja estrusa i ovulacije, sinkronizacijski programi moraju uzrokovati ovulaciju rastućeg dominantnog folikula, kako bi pospješili plodnost (AHMAD i sur., 1995.). Rješenje se nalazi u korištenju programa koji omogućavaju umjetno osjemenjivanje u točno određeno vrijeme (TAI), a koji su sastavni dio protokola sinkronizacije ovulacije (XU, 2002.; WILTBANK i sur., 2011c.). Visokoproduktivne krave imaju slabije izražen estrus nego niskoproduktivne, pa bi programi koji se koriste sa TAI trebali rezultirati većom plodnošću nego programi koji koriste umjetno osjemenjivanje na detektirani estrus. Plodnost bi se mogla povećati optimiziranjem rasta folikula za vrijeme programa sinkronizacije ovulacije, kojoj bi se trebalo i prilagoditi vrijeme osjemenjivanja. To bi sve trebalo rezultirati poboljšanjem učinkovitosti upravljanja i plodnosti. Hormonalni milje i trajanje rasta folikula su glavni čimbenici za optimiziranje plodnosti u programima sa fiksnim umjetnim osjemenjivanjem, jer mogu utjecati na plodnost mijenjajući funkciju jajne stanice, broj i/ili funkciju granulosa/teka stanica, stanje u jajovodu i/ili maternici te na druge reproduktivne parametre.

Kako bi programi sinkronizacije ovulacije bili što uspješniji, pažnju treba posvetiti postizanju optimalne veličine i kvalitete folikula jer je poznato da folikuli veće a tako i manje ovulatorne veličine negativno utječu na plodnost (WILTBANK i sur., 2011c.). Neophodno je pod kontrolom držati rast dominantnog folikula u svrhu postizanja optimalnog promjera ovulatornog folikula, koji će kasnije osigurati adekvatnu produkciju estradiola u vrijeme oko umjetnog osjemenjivanja te kasniju formaciju žutog tijela koji će lučiti progesteron u dovoljnoj koncentraciji za potporu razvoja embrija bez kompromitiranja sazrijevanja oocite. Kritičan trenutak jest sinkronizacija novog folikularnog vala na početku programa, a koja povlači za sobom odstranjenje funkcionalnog dominantnog folikula, bilo fizikalnom destrukcijom bilo hormonalnom inhibicijom gonadotropina i regresijom folikula (BODENSTEINER i sur., 1996.). Sve metode sinkronizacije rasta folikula su učinkovite jedino kad uspiju odstraniti dominantni folikul, tj. kad on ovulira na primjenu GnRH ili gonadotropina.

Jedan od programa sinkronizacije ovulacije se bazira na kombinaciji estradiola i progesterona (WILTBANK i sur., 2011.), no zbog direktive EU o nekorištenju estradiola kod

nas nije primjenjiv. Kravama se istovremeno sa aplikacijom estradiol benzoata intravaginalno postavlja depo pripravak progesterona. Porast razine cirkulirajućeg estradiola uz visoku koncentraciju progesterona uzrokuje regresiju postojećih folikula i pokretanje novog vala 3 do 5 dana kasnije. Sedmog dana plotkinjama se daje prostaglandin koji će razgraditi eventualno postojeće žuto tijelo, a dan kasnije kravama se aplicira estradiol cipionat i vadi se intravaginalni progesteronski implantant. Posljedični polagani porast estradiola u okruženju niske koncentracije progesterona rezultira sinkronizacijom ovulacije i omogućuje umjetno osjemenjivanje u fiksno vrijeme (SOUZA i sur., 2005.)

U praksi se dominantni folikul rješava najčešće uzrokovanjem ovulacije pomoću GnRH. Program sinkronizacije ovulacije baziran na aplikacijama GnRH i prostaglandina, najčešće korišten kod mliječnih krava jest tzv. „Ovsynch“, kojeg su opisali PURSLEY i sur. još 1995. godine. Riječ je o dvijema aplikacijama GnRH sedam i dva dana poslije prostaglandina, i umjetnim osjemenjivanjem 16 do 24 sata poslije drugog GnRH.

„Cosynch“ je modifikacija Ovsyncha koja se koristi više u managementu reprodukcije tovnih pasmina goveda. Od Ovsyncha se razlikuje u tome što se plotkinje umjetno osjemenjuju istovremeno sa drugom aplikacijom GnRH, te se tako smanjuje broj manipulacija stokom (COLAZO i MAPLETOFT, 2014.). Druga aplikacija GnRH se daje od 48 do 72 sata poslije prostaglandina. „Select-synch“ je modifikacija u kojoj nema druge aplikacije GnRH, nego se krave osjemenjuju na opaženi estrus u razdoblju od 5 dana poslije prostaglandina.

2.7. Ovsynch

Reducirana reproduktivna učinkovitost u mliječnih krava je temelj za razvoj različitih strategija kontroliranog rasplodivanja u sustavu umjetnog osjemenjivanja za poboljšanje uspješnosti koncepcije mliječnih krava (THATCHER i sur., 2006.). Jedan od najčešće korištenih protokola za sinkronizaciju ovulacije je Ovsynch (PURSLEY, 1995.). Riječ je o metodi gdje se kombiniranjem GnRH sedam dana prije i dva dana poslije prostaglandina sinkronizira ovulacija omogućujući vremenski točno umjetno osjemenjivanje. Naime, aplikacija GnRH inducira LH i FSH val sa vrhuncom otprilike 2 h poslije davanja, i povratkom na bazalne koncentracije otprilike 4 h nakon davanja. Ukoliko taj val gonadotropina rezultira ovulacijom, otprilike 24 h nakon davanja dolazi do novog vala FSH sa pojavom novog

folikularnog vala (BODENSTEINER i sur., 1996.). Također, rezultat će nastankom žutog tijela koje će biti osjetljivo na prostaglandine u trenutku njihove aplikacije. Nakon razaranja žutog tijela i posljedičnog smanjenja razine progesterona, stvaraju se povoljni uvjeti za ovulaciju dominantnog folikula nastalog posljedično na prvi GnRH, a druga aplikacija GnRH uzrokuje njegovu ovulaciju. Najveća stopa graviditeta se postiže kad je umjetno osjemenjivanje dovršeno 16 h po aplikaciji drugog GnRH (PURSLEY i sur., 1998.). Iako ovulacija na prvi GnRH nije obvezatan zahtjev za uspješnu koncepciju, opažena je slabija stopa koncepcije u krava koje nisu ovulirale nakon prve injekcije GnRH (THATCHER i sur., 2002.; GALVAO i SANTOS, 2010.; VASCONCELOS i sur., 1999.). Uspjeh koncepcije varira od 35 do 65 %, i ne razlikuje se od uspjeha prvog postpartalnog osjemenjavanja pri detektiranom estrusu.

Postotak krava koje ovuliraju ovisi o fazi ciklusa. Dobar ovulatorni odgovor na prvu aplikaciju GnRH u Ovsynch protokolu ima pozitivan utjecaj na sinkronizaciju i stopu gravidnosti kod mliječnih krava (VASCONCELOS i sur., 1999.). Naime, najveći postotak ovulacije poslije druge injekcije GnRH (89 %) je ostvaren kod krava koje su imale najvišu stopu ovulacije nakon prve aplikacije GnRH (96 %), u vremenu između petog i devetog dana ciklusa, dok su postoci za ranije i kasnije faze folikulogeneze slabiji (BELLO i sur., 2006.; VASCONCELOS i sur. 1999.; MOREIRA i sur., 2000a.). Najniži je postotak ovulacije (do 23%) je ukoliko se sa Ovsynchom počne u prva 4 dana ciklusa, zbog nepostojanja LH receptora početkom folikulogeneze (CHENAULT i sur., 1975.; VASCONCELOS i sur., 1999.). Međutim, krave u ranoj fazi ciklusa imaju bolji postotak sinkronizacije nego krajem ciklusa, vjerojatno zato što nije bilo ovulacije prije aplikacije GnRH, te je progesteron u vrijeme aplikacije prostaglandina, ali i za vrijeme trajanja cijelog protokola, bio visok, što je blokiralo ekspresiju LH hormona. S druge strane, krave u kojih je Ovsynch započeo kasnije i koje su ovulirale prije GnRH, imale su fiziološku luteolizu prije aplikacije prostaglandina. Stoga je moguće da je anovulatorni folikul (u vrijeme prvog GnRH), postao ovulatorni u vrijeme drugog GnRH. Iako je postotak steonosti (broj steonih u prvom servisu) kod Ovsyncha jednak kao i kod krava osjemenjenih uz detektirani estrus, postotak koncepcije (broj steonih/broj osjemenjenih) je obično niži, iz razloga što sinkronizacija ovulacije podbaci kod otprilike trećine krava. Očito je da krave koje ne ovuliraju nakon druge aplikacije GnRH i nemaju veliku šansu koncipirati. One koje ovuliraju mogu ovulirati sa malim folikulom (manji od optimalne veličine: 14 do 19 mm), čak 42,4 %. Ovulacija folikulakoji veličinom odstupaju od optimalne, za posljedicu ima sniženu plodnost ili zbog nezrelih oocita te posljedično smanjene koncentracije progesterona (SOUZA i sur., 2007.).

COLAZO i sur. (2009.) navode kako je postotak sinkronizacije kod Ovsyncha bio samo 68 %, jer je kod 11 % krava ovulacija nastupila prije umjetnog osjemenjivanja, 15 % krava nije reagiralo na PGF luteolizom, a kod 9 % krava nije uslijedila ovulacija nakon druge injekcije GnRH. VASCONCELOS i sur. (1999.) tvrdi da je uspjeh sinkronizacije 87 do 100 %, ali je postotak steonosti svega 32 - 42 %, ovisno o fazi ciklusa u kojoj je započeo Ovsynch.

Prije tridesetak godina je dokazana veza između cirkulirajuće razine progesterona prije umjetnog osjemenjivanja i posljedične plodnosti. Naime, za svaki porast koncentracije za 1ng/ml u razdoblju prije osjemenjivanja, plodnost raste 10 % (FONSECA i sur., 1983.). Pokazano je da porast koncentracije progesterona smanjuje frekvenciju LH valova (STUMPF i sur., 1993.). Predovulatorni folikuli u krava sa niskim progesteronom jače su pod utjecajem LH i postaju perzistentni folikuli, što je najvjerojatnije bitan etiopatogenetski razlog snižene plodnosti, zbog ovulacije perzistentnih folikula čime se bitno ugrožava mogućnost preživljavanja embrija (CERRI i sur., 2009.). Stoga postupci kojima se skraćuje trajanje dominacije poboljšavaju plodnost (smanjuje se razdoblje između prvog GnRH i prostaglandina, a povećava od aplikacije prostaglandina do druge injekcije GnRH). Protokoli sa skraćanjem vremena dominacije folikula i produljenim trajanjem proestrusa vjerojatno stimuliraju plodnost, uz uvjet potpune regresije žutog tijela, jer sublutealne razine progesterona ugrožavaju plodnost (SOUZA i sur., 2007.). Osim progesterona, bitna je i koncentracija estradiola, čija se rastuća koncentracija veže za optimizaciju preovulatornog hormonalnog okruženja u protokolima sa umjetnim osjemenjivanjem, barem po pitanju željenog promjera folikula, čime se može poboljšati plodnost u krava podvrgnutih programima s umjetnim osjemenjivanjem (PANCARCI i sur., 2002.; BORMAN i sur., 2003.).

Iako je povećanje plodnosti uočljivo u odnosu na osjemenjivanje na vidljivi estrus, metaanaliza iz 2005. je pokazala da nema poboljšanja plodnosti kod usporedbe Ovsyncha sa drugim protokolima (RABIEE i sur., 2005.). Svaka metoda koja sinkronizira estrus će sinkronizirati i vrijeme ovulacije, no to često nije dovoljno za postizanje dobrog uspjeha pri umjetnom osjemenjivanju. Prethodna sinkronizacija funkcije jajnika bi mogla omogućiti veću plodnost sa programima sinkronizacije ovulacije. Povećanje razine progesterona kod krava sa niskom razinom progesterona prije sinkronizacije prostaglandinima povećava postotak gravidnih krava pri slijedećem osjemenjivanju. Stoga se mnogi presinkronizacijski protokoli baziraju na povećanju koncentracije progesterona u razdoblju prije osjemenjivanja.

2.8. Presinkronizacija

Jedna od metoda jest tzv. Presynch-Ovsynch: dvostruka aplikacija prostaglandina u razmaku od 14 dana, nakon čega se kreće sa Ovsynchom protokolom bilo 11 d (GALVAO i sur., 2007.), 12 d (MOREIRA i sur., 2001.) ili 14 d (NAVANUKRAW i sur., 2004.) poslije druge aplikacije PGF. Cilj je opetovanim aplikacijama prostaglandina dovesti plotkinje u fazu ciklusa između petog i 12. dana ciklusa, kad će imati najbolji odgovor na Ovsynch (COLAZO i MAPLETOFT, 2014.). Ovisno o autorima, ova metoda u usporedbi sa samim Ovsynchom značajno poboljšava postotak graviditeta u svih (NAVANUKRAW i sur., 2004.; GALVAO i sur., 2007;) ili samo u cikličnih krava (MOREIRA i sur., 2001.). Postotak steonosti kod presinkronizacije je iznosio 49 % (MOREIRA i sur., 2001.) i 47 % (EL ZARKOUNY i sur., 2004.) u odnosu 38 % steonosti kod samog Ovsyncha. Iako su isti autori pokazali kako je razdoblje od 12 dana između zadnjeg prostaglandina i početka Ovsyncha rezultiralo povećanjem postotka gravidnosti za 10 do 12 %, zbog praktičnosti se u mliječnom govedarstvu usvojio interval od 14 dana, tako da sve aplikacije padaju na isti dan u tjednu, iako su GALVAO i sur. (2007.) ustanovili pad postotka steonosti sa 41 na 34 %. MOREIRA i sur. (2001.) navode kako ova metoda nije bila uspješna u indukciji ovulacije za anovulatorne krave, dok GUMEN i sur. (2003.), primjenjujući ovu metodu presinkronizacije, navode visok postotak ovulacije u anovulatornih krava nakon prve aplikacije GnRH iz Ovsyncha, iako ovisno o stanju folikularnog vala u vrijeme aplikacije navedenog hormona. Međutim plodnost nakon TAI je ipak bila jako snižena u anovulatornih krava. Stoga je kod njih možda bolje koristiti presinkronizacijske metode koje induciraju nastanak žutog tijela prije početka Ovsynch protokola. Tako bazirani presinkronizacijski protokoli bi trebali poboljšati plodnost i kod anovulatornih krava (HERLIHY i sur., 2012.).

Na tom se principu temelji Double-Ovsynch (SOUZA i sur., 2008.; WILTBANK i sur., 2011b.). Dakle, koriste se uzastopno dva Ovsynch protokola, tako da je razmak između treće i četvrte aplikacije GnRH sedam dana. Prvi Ovsynch ima zadaću presinkronizirati i inducirati cikličnost i ovulaciju na treći GnRH, kako bi u slijedećoj fazi omogućio što veću uspješnost osjemenjivanja, zbog povišene razine progesterona prije aplikacije prostaglandina (WILTBANK i sur., 2011b.). Pokazalo se da je Double Ovsynch imao veći postotak graviditeta u donosu na Presynch- Ovsynch, ali samo kod primiparih krava (65 % i 45 %), dok kod multiparih to nije bilo opaženo, te se postotak gravidnih kretao oko 40 % (SOUZA i sur., 2008.).

Osim gore navedenih programa presinkronizacije, BELLO i sur. (2006.) opisuju presinkronizaciju primjenom prvo prostaglandina a dva dana kasnije i GnRH, sa ciljem povećanja broja životinja koje će u vrijeme prvog GnRH u Ovsynchu imati folikul ovulatorne veličine. Ovsynch je započinan 4, 5, i 6 dana nakon GnRH. Autori su ustanovili kako je na prvi GnRH u Ovsynchu ovuliralo najviše krava kojima je Ovsynch počeo 5 ili 6 dana iza presinkronizacijskog GnRH (67 i 85 %), dok je postotak koncepcije bio značajno viši u krava sa intervalom od 6 dana između presinkronizacije i Ovsyncha (50 %) nego kod samog Ovsyncha (27 %). Nadalje, RIBEIRO i sur. (2011.) opisuju presinkronizaciju sa prostaglandinom te tri dana kasnije GnRH i za šest dana sinkronizacija Cosynchom. Postotak koncepcije je bio sličan kao i kod BELLO i sur. (2006.) i nije bio bolji nego kod krava kod kojih se koristio program Presynch-Ovsynch.

Osim presinkroniziranja faze ciklusa na bazi prostaglandina i GnRH, moguće je i korištenje progesterona ili progestina. Poznato je da progesteron suprimira estrus i sprječava ovulaciju blokirajući otpuštanje LH, te tako uzrokuje smanjeni rast dominantnog folikula. Međutim progesteron ne utječe na lučenje FSH i stoga dolazi do razvoja folikularnih valova za vrijeme trajanja funkcionalnog žutog tijela. Ukoliko se u kontroli spolnog ciklusa koriste prirodni ili sintetski derivati progesterona u trajanju duljem od prirodnog vijeka žutog tijela, prestankom njihovog djelovanja dolazi do sinkronog estrusa ali sa niskom plodnošću (COLAZO i MAPLETOFT, 2014.). Naime, progestini imaju manji supresijski učinak na LH, i pod njihovim djelovanjem dolazi do kontinuiranog rasta dominantnog folikula koji, zbog izloženosti učestalim niskim LH pulsevima, postaje perzistentan (SAVIO i sur., 1993.; XU, 2002.). Zbog povećavanja pulzatorne aktivnosti LH progestini se koriste u presinkronizaciji krava u postpartalnom razdoblju te u junica (COLAZO i MAPLETOFT, 2014.). Poznato je da trećina tretiranih krava ne odreagira na Ovsynch, djelomice i zbog preuranjenih ovulacija. Kako bi se one spriječile, može se koristiti modificirani Ovsynch sa dodatkom progesterona u trajanju sedam dana, između aplikacija prvog GnRH i prostaglandina. Dokaz njegove uspješnosti su više stope steonosti u odnosu na sami Ovsynch. Tako EL ZARKOUNY i sur. (2004.) navode uspjeh od 59 % kod protokola sa progesteronom, dok je uspjeh kod samog Ovsyncha bio 36 %. Ovaj sustav je napose dobar kod anovulatornih krava, kod kojih je postotak steonosti (64 %) bio gotovo duplo viši nego u samom Ovsynchu (32 %). Kod cikličnih krava nema razlike u postotku graviditeta (EL ZARKOUNY i sur., 2004.) Iako suplementacija progesterona u Ovsynchu rezultira povećanjem postotka steonih krava sa 22 na 35 %, uspjeh koncepcije je i dalje ovisan o pozitivnom ovulatornom odgovoru na prvi GnRH, jer kod krava koje nisu

ovulirale na prvi GnRH postotak gravidnosti iznosi 9 (sa progesteronom) odnosno 4 % (bez progesterona). Stoga je upitna i korist automatskog dodavanja progesterona u Ovsynch kod sinkronizacije acikličnih krava (COLAZO i MAPLETOFT, 2014.), dok su isti autori pokazali njegovu korist prilikom resinkronizacije i aplikacijom 32 dana po umjetnom osjemenjivanju.

2.9. Resinkronizacija

Temelj implementaciji programa resinkronizacije jest skraćenje vremenskog intervala između prvog i drugog umjetnog osjemenjivanja (BARTOLOME i sur., 2005a). Zbog smanjene ekspresije estrusa i samim time njegove detekcije u visokomliječnih krava, resinkronizaciju estrusa je potrebno kombinirati sa resinkronizacijom ovulacije i fiksnim vremenom osjemenjivanja (LOPEZ i sur., 2004.). Ti programi se mogu koristiti samo nakon detekcije negravidnih plotkinja, obzirom da uključuju luteolizu (GALVAO i sur., 2007.) Dosadašnji resinkronizacijski protokoli su se bazirali na određivanju faze spolnog ciklusa nakon pregleda negravidne plotkinje rektalnom palpacijom maternice i pronalaska žutog tijela na jajnicima sa ili bez ultrazvučnog pregleda u trenutku dijagnostike gravidnosti, te se metoda resinkronizacije birala ovisno o postojanju žutog tijela (BARTOLOME i sur., 2002., 2005a.). Drugi princip se oslanjao na spontanu resinkronizaciju poslije prethodnih osjemenjivanja primjenom skraćenih protokola sa prostaglandinama za indukciju luteolize i potom GnRH za indukciju ovulacije (STEVENSON i sur., 2003.). Prema rezultatima istraživanja od BARTOLOME i sur. (2005b.), kod najvećeg dijela krava (64,3 %) do prvog estrusa poslije osjemenjivanja dolazi u periodu između 17 i 24 dana, 22 % krava estrus pokazuje iza 25 dana a samo 13,7 % prije 17 dana poslije umjetnog osjemenjivanja, dok 55 % krava u istraživanju 30.-og dana poslije prethodnog umjetnog osjemenjivanja (na dan ultrazvučne dijagnostike steonosti) nije bilo u diestrusu, tj. fazi pogodnoj za početak sinkronizacije Ovsynchom. Kako navode određeni autori (MOREIRA i sur., 2000b.; CHEBEL i sur., 2003.; FRICKE i sur., 2003.) primjena ultrazvuka u dijagnostici steonosti je omogućila započimanje resinkronizacijskih protokola Ovsynchom 7 dana prije same dijagnostike, kako bi na sam dan pregleda negravidne plotkinje mogle dobiti injekciju prostaglandina. Aplikacija GnRH sedam dana prije same dijagnostike bi trebala povećati postotak krava prijemljivih na prostaglandine na dan njihove moguće aplikacije u slučaju negativne dijagnoze steonosti (BARTOLOME i sur., 2005b., 2005c.). Aplikacija GnRH sedam dana prije dijagnostike steonosti može ubrzati period do reinseminacija pod uvjetom da

ne suprimira pojavu estrusa (CHEBEL i sur., 2003.) ili ne utječe na preživljavanje embrija na resinkroniziranom umjetnom osjemenjivanju (FRICKE i sur., 2003.). Međutim, bez obzira na protokole korištene u resinkronizaciji, uspjeh koncepcije se nije bitno razlikovao (GALVAO i sur., 2007.; BARTOLOME i sur., 2005a.). GALVAO i sur. (2007.) su istraživali učinke tri resinkronizacijska programa bazirana na dodatku progesterona i sinkronizaciji sa GnRH, prostaglandinima i estradiol cipionatom, u različitim intervalima od prethodnog umjetnog osjemenjivanja. Uspjeh koncepcije se nije razlikovao obzirom na primijenjenu metodu, te se nakon 31 dan se kretao oko 38 %, odnosno oko 34 % nakon 61 dana. BARTOLOME i sur. (2005a.) su uspoređivali uspjeh koncepcije poslije resinkronizacije Ovsynchom i Heatsynchom. Programe su počimali 27.og dana poslije prethodne inseminacije, na dan ultrazvučne dijagnostike gravidnosti. Istraživanje je pokazalo kako se postotak gravidnih plotkinja u resinkronizaciji nije razlikovao između primijenjenih protokola, te je iznosio 25,2 % u Ovsynchu i 25,8 % u Heatsynchu 27 dana nakon umjetnog osjemenjivanja. U slijedećem istraživanju, isti autori (BARTOLOME i sur., 2005b.) su uspoređivali protokole sinkronizacije ovulacije ovisno o fazi ciklusa s početkom 30 dana poslije prethodnog umjetnog osjemenjivanja, te je Ovsynch rezultirao prihvatljivim postotkom koncepcije kod krava (34,4 % u diestrusu i 30,1 % u proestrusu, 24,1 % u metestrusu). Zaključuju kako bi se trebale koristiti različite strategije sinkronizacije folikularnog vala prije samo dijagnostike steonosti kako bi se povećao postotak krava u diestrusu u vrijeme planirane aplikacije prostaglandina. BARTOLOME i sur. (2005c.) u trećem istraživanju su ispitivali uspjeh koncepcije ukoliko se 23 dana nakon prethodnog umjetnog osjemenjivanja, tj. sedam dana prije ultrazvučne dijagnostike svim kravama aplicira GnRH, a prilikom negativne dijagnoze steonosti im se primijeni sinkronizacijski program ovisno o nalazu faze ciklusa. Postotak gravidnih krave kojima je resinkronizacija Ovsynchom započeta u diestrusu je nakon 30 dana iznosio 27,5 %. Također, kod krava koje nisu bile podvrgnute resinkronizaciji, interval između dva umjetna osjemenjivanja je bio 20 dana duži nego kod krava sa žutim tijelom na dan 30 i podvrgnutima dvama brzim resinkronizacijskim protokolima. Aplikacija GnRH 21 dan poslije umjetnog osjemenjivanja nije smanjila postotak gravidnosti u već osjemenjenih plotkinja, a rezultirala je postotkom steonosti usporedivim sa uspjehom ostvarenim sa počimanjem Ovsyncha 28. og dana po dijagnostici steonosti (CHEBEL i sur., 2003.). Pomicanje aplikacije GnRH bliže prethodnom osjemenjivanju, na dan 19, također ne utječe na moguću gravidnost već osjemenjenih krava, međutim, u usporedbi sa Ovsynchom početim 26 ili 33 dana poslije umjetnog osjemenjivanja, rezultira slabijim postotkom koncepcije, sa 34 odnosno 38 % na 23

% (FRICKE i sur., 2003.). Rana resinkronizacija 27 do 29 dana poslije umjetnog osjemenjivanja skraćuje servis period za 22-23 dana (STEVENSON i sur., 2003.).

2.10. Ostali faktori koji utječu na plodnost

Obzirom da je plodnost kompleksan pojam vezan je i za mnoge faktore, uključujući infekcije maternice, negativni energetske balans, koncentraciju ureje u krvi, vitaminski status životinje, plodnost mužjaka, točnost detekcije estrusa, tehniku osjemenjivanja i sl.

2.10.1. Postpartalni anestrus

Jedan od razloga za korištenje sinkronizacijskih programa jest veliki broj krava u anestrusu koji se kreće od 8 do 56% (EL ZARKOUNY i sur., 2004.; SILVA i sur., 2007.), a koji je glavni doprinositelj neplodnosti krava (EL ZARKOUNY i sur., 2011.). Kako nedostatak ili jako slabo vidljivi znakovi estrusa otežavaju detekciju krava za umjetno osjemenjivanje, produljuju se servis period i vrijeme do prvog osjemenjavanja. STEVENSON i sur. (1997.) utvrđuju kako anestrus može biti povezan sa bolestima, slabim unosom suhe tvari, negativnim energetske i lošom tjelesnom kondicijom. Stoga bi određeni metabolički markeri mogli doprinijeti boljem razumijevanju uzroka i povezanosti različitih učinaka sa produljenom anovulacijom (EL ZARKOUNY i sur., 2011.). Reproaktivna uspješnost je uvjetovana čimbenicima koji opet uvjetuju uspostavljanje gestacije, kao npr. proteini u hrani (ELROD i BUTLER, 1993.; ELROD i sur., 1993.), mliječnost (LABEN i sur., 1982.) i energetske balans (HARESING, 1981.). Poznato je da hrana bogata proteinima može imati detrimentalan učinak na ekspresiju estrusa (ORIHUELA, 2000.). Povećan unos proteina će rezultirati povećanom mliječnošću, međutim ukoliko nije popraćen adekvatnim unosom energije, nastane negativni energetske balans, koji opet povećava rizik produljenog razdoblja anestrusa (FERGUSON, 1991.) zbog smanjenog razvoja folikula, smanjene produkcije estradiola i posljedične ekspresije estrusa. Retrogradnom analizom je ustanovljeno da su anovulatorne krave, koje su ušle u protokole sinkronizacije, imale smanjenu plodnost i veće gubitke graviditeta od cikličnih krava (STERRY i sur., 2006.). Međutim, primjena GnRH u anovulatornih krava 5 dana nakon umjetnog osjemenjavanja je poboljšala njihovu plodnost. Obzirom da se broj anovulatornih krava u stadu kreće od 16,2 %

(CARTMILL i sur., 2001.) do 20,2 % (GUMEN i sur., 2003.), smatra se da bi bilo najbolje identificirati anovulatorne krave i tretirati ih prije ili poslije osjemenjavanja u svrhu izliječenje anovulacije, bez nepotrebnog utjecaja na ciklične krave (SILVA i sur., 2007.). Stoga je potrebno poraditi na takvim strategijama.

2.10.2. Mliječnost

Postotak koncepcije i embrionalna smrtnost su dva pokazatelja plodnosti sa direktnim ekonomskim implikacijama u mliječnom govedarstvu. WASHBURN i sur. (2002.) SU analizom dvadesetgodišnjeg razdoblja od 1976. do 1999. došao do podataka o padu koncepcije sa oko 55 na 35 % uz istovremeni porast mliječnost, a podatci o njihovoj međusobnoj uzročno posljedičnoj povezanosti su kontradiktorni kod različitih autora. Neovisno o mliječnosti, jasno je da krave u laktaciji imaju slabije postotke koncepcije od junica. Nadalje, iako je početni postotak fertilizacije sličan, kvaliteta embrija kod junica je osjetno bolja nego kod krava, dok je kod krava izloženih toplinskom stresu smanjen i uspjeh fertilizacije kao i kvaliteta embrija (SARTORI I SUR., 2002). Dakle, mliječnost može imati utjecaj na reproduktivne parametre za vrijeme toplinskog stresa, jer je kod krava sa visokom produkcijom mlijeka porast tjelesne temperature veći nego kod krava sa manjom produkcijom u istim uvjetima toplinskog stresa.

2.10.3. Tjelesna kondicija i negativni energetske balans

Tjelesna kondicija je važan faktor u managementu mliječnih krava. Iako postoje različiti sustavi ocjenjivanja tjelesne kondicije (body condition score, BCS), svima je zajedničko da niske vrijednosti obilježavaju mršavost, a više vrijednosti pretilost životinja. Iako je svim sisavcima zajednička karakteristika lipolize i katabolizma mišića za prehranu mladunčadi, kod krava se selekcijom na visoku mliječnost u zadnjih pedesetak godina postigla još veća mobilizacija tjelesnih rezervi, koja za posljedicu ima mnoge promjene u fiziologiji. Naime, krave selektirane na visoku mliječnosti imaju i vrlo sniženu kondiciju u trenutku njene najniže vrijednosti. Neoptimalna tjelesna kondicija u vrijeme teljenja rezultira većim gubitkom mase i posljedičnim negativnom energetskom balansom (ROCHE i sur., 2009.). Dokumentiran je odnos između energetskog balansa i plodnosti, a napose učinka tjelesne kondicije za vrijeme

teljenja i pripusta te trajanja negativnog energetskeg balansa postpartalno na plodnost (CHAGAS i sur., 2007.). Promjene tjelesne kondicije gotovo zrcalno prate profil mliječnosti krava između dva teljenja, te su slične obrnuto okrenutoj krivulji laktacije (ROCHE i sur., 2009.). Krave mršave u prvih 50 do 100 dana poslije teljenja zbog genetskih uvjetovanih promjena u somatotropnoj osovini, osjetljivosti perifernih tkiva na inzulin te homeostatske regulacije lipolize u masnom tkivu. Sve do uspostave normalne somatotropne osovine i prolaska rezistencije na inzulin sama hranidba nema utjecaja na promjene tjelesne kondicije krava u prva četiri tjedna po teljenju. Stoga su vrijednosti tjelesne kondicije u vrijeme teljenja, njena najniža vrijednosti postpartalno i razlika između njih povezani sa mliječnošću, zdravljem i reprodukcijom. Opažena je i veza između tjelesne kondicije i postpartalnog anestrusa, servis perioda i uspješnosti koncepcije. Preniska tjelesna kondicija za vrijeme rane laktacije je povezana sa sporijom uspostavom jajničke aktivnosti, smanjenjem frekvencije pulseva LH, slabim odgovorom folikula na gonadotropine i smanjenom funkcionalnošću folikula (CHAGAS i sur., 2007.). Zbog genetski uvjetovane velike mliječnosti, rezistencija tkiva na inzulin rezultira trošenjem glukoze isključivo za sintezu mlijeka, a poznato je da inzulin i IGF-I imaju direktan utjecaj na jajnike. Stoga je moguće da su oni medijatori utjecaja energetskeg balansa i tjelesne kondicije na reproduktivne sposobnosti krava (CHAGAS i sur., 2007.). Za vrijeme negativnog energetskeg balansa dolazi do supresije lučenja LH i razvoja dominantnih folikula sa smanjenom produkcijom estradiola neophodnog za indukciju preovulatornog vala gonadotropina. Težina negativnog energetskeg balansa je povezana sa vremenom potrebnim za uspostavljanje normalne jajničke aktivnosti postpartalno, a za održanje plodnosti na normalnom nivou, krave moraju imati normalne estruse u periodu od 30 do 45 dana po porodu, te metode detekcije estrusa moraju biti uspješne (ROCHE i sur., 2000.). Međutim, utjecaj negativnog energetskeg balansa se proteže u postpartalno razdoblje i nakon što krave počnu vraćati svoju težinu, a očituje se u tzv. „carry-over“ učinku negativnog energetskeg balansa na kvalitetu folikula u trajanju dva do tri mjeseca (PTASZYNSKA, 2009.).

2.11. Metabolički profil krava

Kako bi se procijenio zdravstveni i metabolički status krave, rutinski krvni profili podrazumijevaju analizu parametara metabolizma bjelančevina i energije (ukupne bjelančevine, albumini, globulini, ureja, keatinin, glukoza, trigliceridi i NEFA), enzima i

markera jetrenog statusa (alanin aminotransferaza- ALT, aspartat aminotransferaza- AST, alkalna fosfataza- ALP, gama glutamil transferaza- GGT, laktat dehidrogenaza, kreatini kinaza, kolesterol te ukupni i vezani bilirubin) i na koncu minerala (kalcij, fosfor, magnezij, natrij, kalij i klor) (COZZI i sur., 2011.). Krave u tranzicijskom periodu pokazuju akutni upalni odgovor vezano za steonost i laktaciju, čak bez prisutnosti istovremene bakterijske infekcije ili druge patologije. Posljedično dolazi do metaboličkog stresa koji kompromitira imuni sustav domaćina (TREVISI i sur., 2012.). Jačina, ozbiljnost i moguće posljedice tog upalnog odgovora se mogu karakterizirati indeksom funkcionalnosti jetre (BERTONI i sur., 2006.), koji gore navedeno stanje definira na temelju proteina negativne akutne faze tijekom prvog mjeseca laktacije (albumini, kolesterol i bilirubin). Krave sa visokom funkcionalnošću jetre u prvom mjesecu laktacije imaju brži porast albumina i kolesterola, te manji porast bilirubina. Povećane koncentracije AST ukazuju na postojanje određene patologije (STENGARDE i sur., 2010.). Određena fiziološka stanja također mijenjaju vrijednosti parametara, dok su varijacije drugih limitirane utjecajem homeostatskih kontrolnih mehanizama (COZZI i sur., 2011). Tako paritet utječe na koncentraciju ukupnih bjelančevina, globulina, kreatinina, ALP, GGT, kratinin kinaze i fosfora, te su ukupne bjelančevine i glubulini više u starijih krava i ljeti. Isto tako, stadij laktacije utječe na koncentracije NEFAe, AST, GGT, kreatinin kinaze i kolesterola. Nadalje, sezona utječe na koncentracije ukupnih bjelančevina, globulina, kreatinina, ALP, fosfora, natrija i klora. Koncentracija glukoze zbog homeostatske regulacije i nije optimalan pokazatelj energetskeg statusa krava (HERDT, 2000.), dok povišene koncentracije GGT ukazuju na oštećenje jetre (MOORE, 1997.), međutim kod zdravih krava može biti i posljedica učestalije izloženosti stresu kod starijih krava. Sa progresom laktacije dolazi i do povišenja koncetracije određenih enzima i jetrenih markera u krvi. Porast kolesterola se objašnjava promjenama koncentracije serumskog lipoproteina tijekom laktacije (RAPHAEL i sur., 1973.), dok za sada u literaturi nema objašnjenja glede porasta koncentracija GGT i AST skupa sa progresom laktacije (COZZI i sur., 2011.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj uspješnog mliječnog gospodarstva je krava koja oteli jedno tele godišnje i ima zadovoljavajuću laktaciju od 305 dana. Međutim, selekcija na visoku mliječnost ima negativne učinke na plodnost. Današnja razina razumijevanja čimbenika i upravljačkih mehanizama folikularne dinamike rezultirala je razvojem sustava kontroliranog rasplodivanja sa fiksnim vremenom osjemenjivanja i resinkronizacijom u plotkinja koje nisu koncipirale, sve u svrhu povećanja efikasnosti rasplodivanja te prevencije subfertilnosti. To se postiže farmakološkim metodama indukcije folikulogeneze, luteolize i luteogeneze te pravovremenom resinkronizacijom. PURSLEY i sur., (1995) su osmislili protokol Ovsynch sa umjetnim osjemenjivanjem bez detekcije estrusa. Riječ je o kombiniranoj primjeni sintetskih analoga gonadotropnog releasig hormona (GnRH) i prostaglandina F2 α (PGF2 α) (GnRH-7d PGF2 α -2d GnRH- 24h UO), koji uzrokuju redom: ovulaciju postojećeg dominantnog folikula i sinkronizaciju novog folikularog vala (GnRH), potom razgradnju žutog tijela (PGF) čime se omogućuje ovulacija dominantnog folikula iz novog folikularnog vala (GnRH) za 24 do 32h zbog poticanja porasta predovulacijske razine LH. Ovaj postupak rezultira sinkroniziranom ovulacijom uz TAI, 17-24 sata nakon druge injekcije GnRH, a postao je rutinskim protokolom poslijeporodnih rasplodivanja i programa reinseminacije. Međutim, ukoliko u vrijeme aplikacije prvog GnRH nije prisutan dominantni folikul, doći će atrezije nezrelih folikula, pa će novi folikularni val nastati unutar tri dana, i rezultat će razvojem dominantnog folikula tijekom sljedećih sedam dana, a već postojeće žuto tijelo će onemogućiti spontanu ovulaciju prije druge aplikacije GnRH. Obzirom da je ustanovljeno kako je najveći postotak uspješnosti ostvaren kad se sa protokolom započne sredinom ciklusa, najbolji način za postizanje tog cilja jest primjena presinkronizacijskih protokola, tj. indukcijskih postupaka koji prethode Ovsynch-u, a kojima se postiže bolja sinkronizacija faza ciklusa, zbog opetovanih aplikacija hormona. Smisao presinkronizacije je priprema faze ciklusa za primjenu Ovsyncha, tj. sinkronizacija sredine ciklusa. Zbog boljih rezultata rasplodivanja, kao i ekonomičnosti, tj. minimaliziranja trajanja razdoblja do detekcije steonosti i novog postupka rasplodivanja, plotkinje koje nisu koncipirale po prethodnom UO potrebno je resinkronizirati. Aplikacija GnRH sedam dana prije detekcije steonosti nema negativan utjecaj na inicijalnu stopu graviditeta i prekid steonosti u plotkinja, a skraćuje trajanje reindukcije pa se reinseminacija obavlja već 32. dan nakon prethodnog osjemenjavanja. Istraživanjima je ustanovljeno kako je u većine krava interestrusni interval 22 dana. Temeljem tih odrednica, preporuka je GnRH aplicirati 22-23 dana po UO, tj.

sedam dana prije UZV dijagnostike graviditeta (30. dana), kako bi se sinkronizirao folikularni val i osiguralo aktivno CL osjetljivo na PGF 30 dana po UO. Time se skraćuje period do sljedeće reinseminacije.

Cilj ovog istraživanja jest:

1. istražiti učinkovitost dva presinkronizacijska protokola u kontroliranom rasplodivanju, međusobno i u odnosu na klasični Ovsynch.,
2. istražiti koji je od dva protokola učinkovitiji u kombinaciji sa resinkronizacijskim postupcima opetovane inseminacije.,
3. temeljem praćenja razine hormona odrediti optimalno vrijeme za TAI.,
4. istražiti pozitivnu korelaciju izabranog postupka i bolje plodnosti.,
5. ustanoviti učinkovit induksijski protokol koji bi postao obrazac za rutinski rad u kontroliranom rasplodivanju u Hrvatskoj.

Standardizacijom postupka poboljšali bi se reproduksijski, zdravstveni i proizvodni pokazatelji, što podrazumijeva ekonomski boljitak i poboljšanje plodnosti mliječnih krava.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Životinje

Istraživanje je provedeno na farmi mliječnih krava „Zdenačka farma d.o.o.“ u Velikim Zdencima, a u okviru projekta „Smanjena plodnost mliječnih krava“ Ministarstva znanosti, obrazovanje i sporta. U istraživanju je sudjelovalo 56 krava Holštajn- frizijske pasmine u dobi od 2 do 5 godina. Ovisno o dnevnoj proizvodnji mlijeka, krave su hranjene mješavinom koncentrata da zadovolji i nadiđe dnevne potrebe (Tablice 1. i 2.). Krave su bile smještene na dubokoj stelji, dijelom u objektima sa otvorenom sunčanom stranom, a do izmuzišta su išle po za to predviđenim koridorima (Slika 1.).



Slika 1. Smještaj krava

Na mužnju su prvo išle krave sa najvećom mliječnošću, a zadnje one u karenci. Po izmuzivanju krave iz istraživanja su se odvajale i upućivale u stojnice gdje im se, po potrebi uzimala krv, aplicirali hormoni i radila ultrazvučna pretraga. Umjetno osjemenjivanje se obavljalo ili u stojnicama ili na hranidbenom hodniku gdje su krave bile fiksirane

uglavljivanjem (Slika 2. i 3.). Za sve krave su zabilježeni podaci o tjelesnoj kondiciji, paritetu i mliječnosti u prvih 100 i u 305 dana laktacije, te koliko je dana prošlo od poroda do ulaska u protokol.

Tablica 1. Primjer obroka za proizvodnju od 35L

Sirovina	Udio (kg)	Sirovina	Udio (kg)	Sirovina	Udio (kg)
Kukuruzna silaža	25	Kukuruzna silaža	24	Kukuruzna silaža	30
Slama	1	Sijeno lucerke	2	Sijeno lucerke	1
Pšenične posije	8	Pšenične posije	1,7	Pšenične posije	2
Kalcij-karbonat	0,22	Kalcij-karbonat	0,15	Kalcij-karbonat	0,06
Stočna sol	0,05	Stočna sol	0,03	Stočna sol	0,03
Smjesa g- zitar 20%	5	Smjesa g-zitar 20%	5	Smjesa g-zitar 21%	7,5
Soja	1,5	UDP	3	UDP	1,8
Vit (antimast)	0,1	Vit (antimast)	0,1	Sme bovi top	0,05
Energjin	0,05	Energjin	0,2	Rindamin gm	0,05
Glicerin	2	Glicerin	0,2	Glicerin	0,3
Soda	4	Soda	3	Soda	5
Grašak		Sjenaža ljulja	2	Repa	4
Svježi repin rezanac		Grašak		Grašak	
	47,17		41,48		51,94

Tablica 2: primjeri obroka za proizvodnju od 22 L

Sirovina	Udio (kg)	Sirovina	Udio (kg)	Sirovina	Udio (kg)
Kukuruzna silaža	20	Kukuruzna silaža	25	Kukuruzna silaža	22,5
Slama	1	Sijeno lucerke	1	Sijeno lucerke	1
Pšenične posije	8	Pšenične posije	2	Slama	0,5
Kalcij-karbonat	0,22	Kalcij-karbonat	0,1	Pšenične posije	2
Stočna sol	0,05	Stočna sol	0,03	Kalcij-karbonat	0,05
Smjesa g- zitar 20%	1	Smjesa g-zitar 20%	5	Stočna sol	0,03
Soja	1,5	UDP	1	Smjesa g-zitar 21%	5,2
Vit (antimast)	0,1	Vit (antimast)	0,1	UDP	1,2
Energjin	0,05	Energjin	0,1	Sme bovi top	0,05
Glicerin	0,2	Soda	0,1	Soda	0,15
Soda	0,05	Repa	5	Repa	5
Grašak	2	Grašak	4	Grašak	5
Svježi repin rezanac	4				
	38,17		43,43		42,68



Slika 2. Krave pripremljene za umjetno osjemenjivanje fiksirane uglavljivanjem

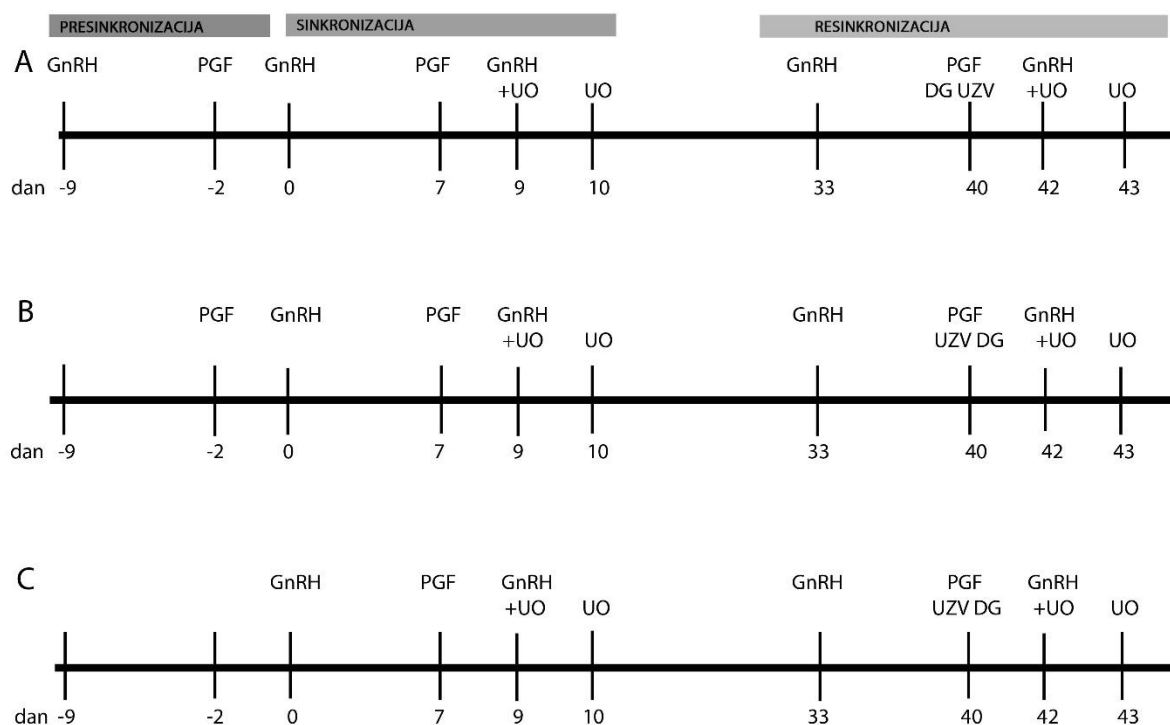
4.2. Sinkronizacijski protokoli

Većem broju krava u istraživanju je ovo bilo prvo postpartalno osjemenjivanje, dok je za ostale prošlo minimalno 30 dana od aplikacije zadnjeg hormona prije ulaska u istraživanje. Krave su slučajnim odabirom podijeljene u 3 grupe po 20 životinja, ali su tokom pokusa iz grupe A, što zbog bolesti a što zbog osjemenjivanja van protokola, izbačene 4 životinje, pa je ukupan broj krava koji je završio cijeli pokus 56. Skupine A i B su bile podvrgnute presinkronizacijskim protokolima, dok je skupina C bila kontrolna, i bila je podvrgnuta standardnom sinkronizacijskom protokolu Ovsynch (PURSLEY i sur., 1995.ste). Standardni Ovsynch protokol se sastoji od aplikacije sintetskog analoga GnRH dan 0, sintetskog analoza PGF2 α dan 7, sintetskog analoga GnRH dan 9, te dvokratnog umjetnog osjemenjivanja, 6 i 24 h po zadnjoj aplikaciji GnRH. U prvoj skupini (A) se primjenjivala presinkronizacija aplikacijom sintetskog analoga GnRH -9. dana (nulti dan se smatra dan kada počinje Ovsynch protokol), potom sintetskog analoga PGF2 α -2. dan i 0. dan se počelo sa standardnim Ovsynch protokolom. U drugoj skupini (B) se koristila presinkronizacija jednokratnom aplikacijom sintetskog analoga PGF2 α -2. dan i 0 dan se počeo standardnim Ovsynch protokolom. Sve krave su bile osjemenjene dvokratno, 6 i 24 h nakon druge aplikacije sintetskog analoga GnRH u Ovsynch protokolu duboko smrznutim sjemenom bika odabranog od strane upravitelja farme.

Dvadesettri dana potom (33. dan istraživanja) sve su krave primile sintetski analog GnRH. Sedam dana kasnije (40. dan istraživanja) plotkinje su transrektalnom ultrazvučnom metodom (UZV) pregledane na graviditet. Za krave za koje se ustvrdilo da nisu gravidne nastavio se protokol resinkronizacije Ovsynch protokolom: 40. dana istraživanja aplikacija sintetskog analoga $PGF2\alpha$, a za 2 dana ponovno (42. dan istraživanja) sintetskog analoga GnRH te U.O. za 6 i 24 h potom (Grafikon 1). Umjetno osjemenjivanje bimanualnom metodom sa fiksacijom cerviksa je provodio jedan doktor veterinarske medicine, a korišteno je duboko smrznuto sjeme bikova po odabiru voditelja farme. Trideset dana po umjetnom osjemenjivanju je i kravama iz resinkronizacije napravljena ultrazvučna dijagnostika graviditeta, a krave kojima je potvrđena gravidnost su još 30 dana kasnije bile podvrgnute dijagnostici gravidnosti rektalnom i ultrazvučnom pretragom.



Slika 3. Umjetno osjemenjivanje krava u stojnicama



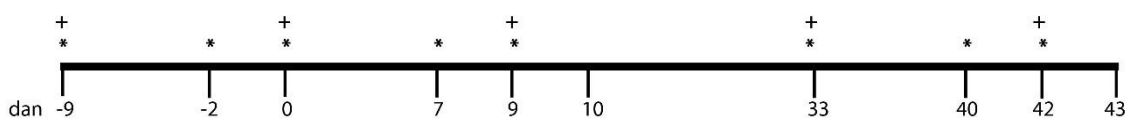
Slika 4. Shematski prikaz aplikacije hormona po grupama (A i B- presinkronizacijske grupe, C- kontrolna grupa).

Unutar svake skupine je slučajnim odabirom izdvojeno pet krava kojima se nakon aplikacije drugog GnRH u Ovsynchu krv vadila svaka 4 sata u narednih 32 sata za analizu koncentracije luteinizirajućeg hormona (LH), i jajnici su se gledali ultrazvučno 12, 24 i 28 h po aplikaciji GnRH, sve do ustanovljavanja ovulacije, te je mjeran promjer dominantnog folikula i strana ovulacije.

U svrhu upravljanja ciklusom su korišteni hormonski preparati gonadorelin, sintetski analog gonadotropnog releasing hormona (Gonavet Veyx®, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Njemačka, 1 mL i/m po životinji) i kloprostenol, sintetski analog prostaglandina F2 α (PGF Veyx®, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Njemačka, 0,5 mg/životinji i/m).

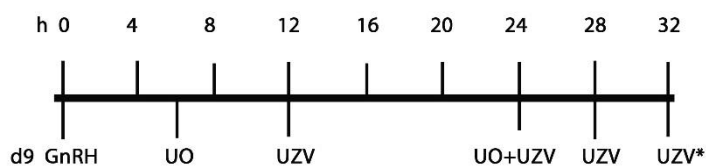
4.3. Uzorkovanje krvi

Svim kravama je na dane aplikacije hormona, bez obzira na grupu, počevši s danom početka protokola u skupini A, bila vađena krv za naknadnu analizu steroidnih hormona progesterona (P4) i estradiola (E2), dok je slučajnim izborom odabrano po 10 životinja po grupi za analizu biokemijskih parametara (Slika 5.). Krv za analizu LH je vađena u razmacima od 4 sata odabranim životinjama, pet krava po svakom protokolu, počevši od druge aplikacije sintetskog analoga GnRH u sinkronizacijskom dijelu protokola pa kroz narednih 32 h, tj. sve dok nastanak ovulacije nije bio potvrđen ultrazvučnom pretragom jajnika (Slika 6.).



Slika 5. Uzorkovanje krvi za steroidne hormone (*) i biokemijske parametre (+).

Krv je vađena venepunkcijom repne vene u biokemijske epruvete sa dodatkom aktivatora ugruška (Venosafe® plastic tube: Serum VF- 076SP, 7mL, Terumo Europe N. V., Belgija), uvijek u isto vrijeme po završetku mužnje. Nakon vađenja, krv je neko vrijeme (do 3 sata) stajala na sobnoj temperaturi i potom je centrifugirana 10 minuta na 3500 okretaja. Potom je serum odliven i spremljen u ependorf kivete na -20°C do daljnje analize.



Slika 6. Uzorkovanje krvi za LH i ultrazvučno praćenje ovulatornog odgovora po satima (*- na 32. sat UZV se pratila samo jedna krava jer je svima na 28h ultrazvučno potvrđena ovulacija pa se prestalo i sa uzorkovanjem krvi za LH)

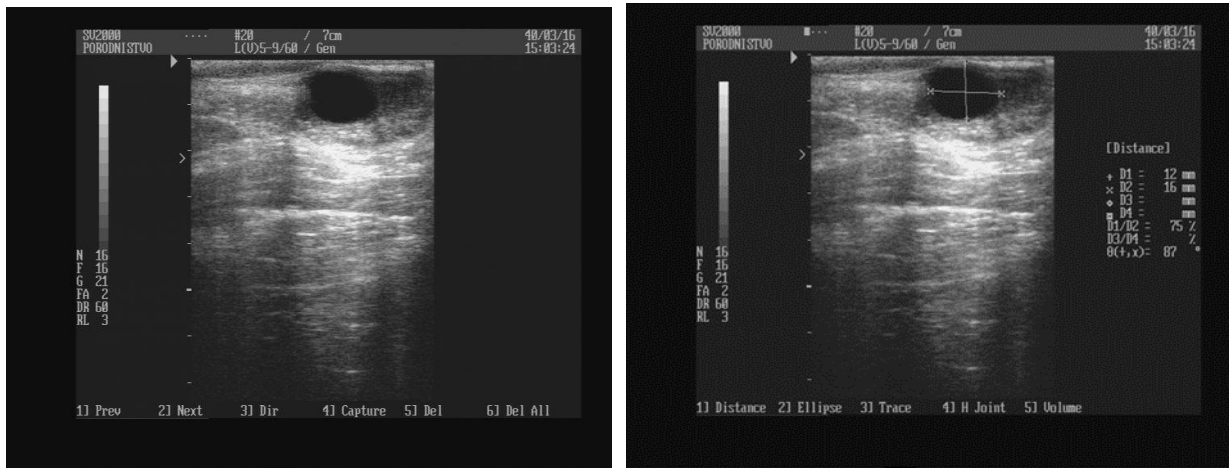
4.4. Ultrazvučna dijagnostika

Ultrazvučna dijagnostika je provedena aparatom Medison SonoVet 2000 sa transrektalnom linearnom sondom frekvencije 5MHz (Slika 7.), a mjerenje promjera folikula je obavljeno njegovim kaliperom.



Slika 7. Oprema za ultrazvučnu dijagnostiku (Medison SonoVet 2000 sa transrektalnom linearnom sondom od 5 MHz)

Folikularna dinamika je ultrazvučno praćena na kravama kojima se uzimala krv za analizu LH, i to 12, 24 a po potrebi i 28 h od aplikacije drugog GnRH u sinkronizacijskom dijelu protokola. Nakon fiksacije jajnika za vrijeme rektalne pretrage, sonda se uvodila transrektalno i polagala nad jajnik te se, na temelju anehogenog područja tražio folikul ili žuto tijelo na temelju ograničenog hipoehogenog područja. Po pronalasku folikula, slika bi se smrznula i ugrađenim kaliperom se mjerio promjer folikula preko mjerenja dvaju najširih polova folikularne šupljine (Slika 8.). Kao rezultat je uzet promjer veće širine.



Slika 8. Ultrazvučni prikaz folikula bez (lijevo) i sa mjerenjem promjera (desno)

Dijagnostika graviditeta se provodila 30 dana nakon UO, a nalaz graviditeta se temeljio na pronalasku ploda unutar anehogene šupljine u lumenu maternice, po postavljanju sonde nad maternicu za vrijeme rektalne pretrage. Dijagnostika gravidnosti rektalnom palpacijom 60 dana po UO se temeljila na pronalasku asimetričnosti rogova maternice.

4.5. Ocjena tjelesne kondicije

Na dan početka istraživanja, svim kravama je određena je tjelesna kondicija (BCS) u skladu sa sustavom osjenjivanja od 1 od 5 bodova i porastom od 0,25. Ocjena 1 predstavlja izrazito mršave a ocjena 5 predebele krave. BCS je određivan prema EDMONSON i sur., (1989.) inspekcijom i palpacijom područja korijena repa, zdjelice, sjednih i bočnih kvrga, ispunjenosti slabinskog dijela kralješnice, izraženosti trnastih i poprečnih kralješaka te izraženosti rebara. Inspekcija se obavlja sa stražnje i desne strane plotkinje, a palpacija po mogućnosti uvijek istom rukom. Polazišne točke za ocjenjivanje kondicije su masne nakupine repnih jama te zamašćenost i mišićni sloj sjednih kvrga, a potom masno i mišićno tkivo na bočnim kvrgama i pobočnim nastavcima slabinskih kralježaka. Konačna ocjena ovisi o te dvije: ukoliko su iste, to je ujedno i konačna ocjena, a ukoliko se druga ocjena razlikuje od prve, onda se konačna ocjena umanjuje ili uvećava za 0,5 od prve ocjene, ovisno o razlici. Za potrebe analize podataka, krave su podijeljene u dvije skupine: visoki BCS ukoliko je bio iznad 2,5, a niski ukoliko je bio ispod

ili jednak 2,5. Ocjena 2,5 je odabrana kao granična jer predstavlja minimalnu potrebnu kondiciju za krave na vrhuncu laktacije, 30 do 100 dana postpartalno, koja je preduvjet za uspješan fertilitet (CARVALHO I SUR., 2014.).

4.6. Određivanje koncentracije hormona (luteinizirajući hormon, progesteron i estradiol)

Analiza luteinizirajućeg hormona (LH) je izrađena metodom ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) s dvostrukim antitijelima (sandwich tehnika), a korišten je kit LH Detect Bovine (ReproPharm SAS, INRA centre de Tours- PRC, Nouzilly, Francuska). Riječ je o imunoenzimatskoj metodi gdje se enzimatska aktivnost otkriva uz pomoć kromogenog substrata, a intenzitet reakcije je proporcionalan koncentraciji LH u ispitivanom uzorku. Po diluciji ispitivanog seruma u omjeru 1:10, inkubaciji i dodatku antitijela, dodan je kromogeni substrat tetrametilbenzidin (TMB) i reakcija je zaustavljena nakon 15 min. Intenzitet reakcije se mjeri spektrofotometrijski na čitaču mikrotitarskih pločica (BioTek Instruments, Vermont, USA) na 450 nm. Koncentracija LH u uzorcima određena je pomoću kalibracijske krivulje izrađene pomoću programa CurveExpert 1.4. Analiza je izrađena na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Koncentracija progesterona u serumu je određena standardnim komercijanim paketom reagensa (Access Progesterone, Beckman Coluter Inc., Ireland) na analizatoru UniCel DxI 600 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan). Access Progesterone je imunokemijska analiza za kvantitativno određivanje koncentracije progesterona u serumu. To je kemiluminiscentna imunokemijska analiza kompetitivnog vezanja. Uzorak se dodaje u reakcijsku posudu sa zečjim antitijelima na progesteron, konjugatom progesteron-alkalna-fosfataza i paramagnetskim česticama obloženim sa kozjim antitijelima protiv zečjih antitijela. Progesteron se natječe s konjugatom progesteron-alkalna-fosfataza za vezna mjesta na ograničenoj količini specifičnih antitijela anti-progesteron. Dobiveni antigen:antitijelo kompleksi se vežu na vezana antitijela na krutoj fazi. Nakon inkubacije u reakcijskoj posudi, materijali vezani uz krutu fazu se drže u magnetskom polju dok se nevezani materijali ispiru. Zatim se dodaje kemiluminiscentni supstrat Lumi-Phos 530 u reakcijsku posudu, a zbog reakcije nastalo svjetlo se mjeri luminometrom. Proizvodnja svjetla je obrnuto proporcionalna koncentraciji progesterona u uzorku. Koncentracija analita u uzorku se određuje iz pohranjene, kalibracijske krivulje koja se

sastoji od šest točaka. Minimalna koncentracija koje se može odrediti ovim testom je 0,08 ng/mL (0,25nmol/L).

Koncentracija estradiola u serumu je određena standardnim komercijanim paketom reagensa (Access Estradiol, Beckman Coluter Inc., Ireland) na analizatoru UniCel DxI 600 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan). Access Estradiol je imunokemijska analiza za kvantitativno određivanje koncentracije estradiola u serumu. To je kemiluminiscentna imunokemijska analiza kompetitivnog vezanja. Uzorak se dodaje u reakcijsku posudu zajedno s paramagnetskim česticama obloženim s kozjim antitijelima protiv zečjih., zečja antitijela na estradiol i TRIS- puferirana otopina proteina. Nakon 20 minuta dodaje se konjugat estradiol-alkalna-fosfataza. Estradiol se u uzroku natječe s konjugatom estradiol-alkalna-fosfataza za vezna mjesta na ograničenoj količini specifičnih antitijela na estradiol. Dobiveni antigen:antitijelo kompleksi se vežu na vezana antitijela na krutoj fazi. Nakon inkubacije u reakcijskoj posudi, materijali vezani uz krutu fazu se drže u magnetskom polju dok se nevezani materijali ispiru. Zatim se dodaje kemiluminiscentni supstrat Lumi-Phos 530 u reakcijsku posudu, a zbog reakcije nastalo svjetlo se mjeri luminometrom. Proizvodnja svjetla je obrnuto proporcionalna koncentraciji estradiola u uzorku. Koncentracija analita u uzorku se određuje iz pohranjene, kalibracijske krivulje koja se sastoji od šest točaka. Minimalna koncentracija koje se može odrediti ovim testom je 20 pg/mL (73 pmol/L)

Koncentracije progesterona i estradiola su izmjerene u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu.

4.7. Određivanje biokemijskih parametara

Biokemijski parametri (koncentracija ukupnog kolesterola, glukoze, ureje, kreatinina, bilirubina, totalnih proteina, albumina, Na, K i Cl, te aktivnosti AST, ALT i GGT) određivani su standardnim komercijalnim paketima reagensa (Beckman Coulterd., Irska) na bikemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 680 u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu.

Aktivnost paraoksonaze (PON1) određena je spektrofotometrijskom metodom hidrolize paraoksona (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat., Sigma Chemical Co, London, UK) kontinuiranim mjerenjem oslobađanja p-nitrofenola. Apsorbanciju nastalog p-nitrofenola se mjerilo

bikromatski na 410/480nm pri 37°C na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU 680 u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu. Aktivnost PON1 izražena je u internacionalnim jedinicama (U/L), a predstavlja aktivnost enzima koja hidrolizira 1 μ mol supstrata u jednoj minuti u jednoj litri seruma (μ molmin⁻¹/L).

4.8. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka načinjena je pomoću programskog paketa SAS (Statistical Analysis Software) 9.3. (2002-2008 by SAS Institute Inc., Cary, SAD).

Deskriptivna statistika (broj podataka, minimalne i maksimalne vrijednosti, srednja vrijednost, standardna devijacija) načinjena je pomoću SAS modula PROC MEANS i PROC FREQ.

Normalna distribucija podataka testirana je pomoću modula PROC UNIVARIATE, a homogenost/heterogenost varijanci podataka između skupina analizirana je Levene testom pomoću GLM modula (PROC GLM) i opcije HOVTEST. Ponekad je distribucija podataka i homogenost/heterogenost varijanci testirana statističkom aplikacijom SAS-a „Interactive Data Analysis“. Kada su pretpostavke normalne distribucije analiziranih zavisnih varijabli bile narušene te kod heterogenosti varijanci različitih grupa načinjena je transformacija varijabli. Od transformacija koristili smo logaritamsku transformaciju na bazi 10. Zaključci dobiveni testiranjem hipoteze na transformiranim podacima u ovoj disertaciji odnose se i na originalne podatke.

Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti i 95 %-tni interval pouzdanosti, a izračunati su metodom najmanjih kvadrata (eng. LSM, least squares means) korištenjem LSMEANS naredbe i opcija PDIFF i CL. Za usporedbu srednjih vrijednosti korištena je Tukey-Kramer-ova metoda višestrukih usporedbi na razini statističke signifikantnosti $P < 0,05$. Ponekad je u modelu usporedbe srednjih vrijednosti najmanjih kvadrata korištena opcija SLICE kada je bilo potrebno specificirati interakcije pojedinih fiksnih efeketa.

Generalni linearni mješoviti model (PROC GLIMMIX) se koristio za analizu uspjeha koncepcije u ovisnosti o koncentracijama progesterona i metaboličkih parametara. Statistički model je uključivao fiksne efekte protokola, tjelesne kondicije, dana postpartalno i mliječnosti,

te njihovih međusobnih križanja. U model je uključen i identifikacijski broj (ID) krave sa ponavljajućim mjerenjima tokom vremena pomoću naredbe RANDOM i opcije RESIDUAL. Odluka o tome koji tip strukture varijanca-kovarijanca će biti upotrijebljen u analizi donesena je na osnovu SAS-ovih kriterija za evaluaciju najboljeg modela (AIC i BIC). Rezultati su nakon analize, ukoliko su podaci bili transformirani, obrnutom transformacijom vraćeni na originalne vrijednosti (srednja vrijednost i 95 %-tni interval pouzdanosti) i kao takve prikazane u tekstu ili tablicama.

Neke binarne varijable, poput uspjeha koncepcije i finalne stope steonosti između grupa su analizirane GENMODE procedurom s funkcijom log link i binomijalnom distribucijom kako bi se izračunao relativni rizik (RR).

Pearson-ov koeficijent korelacije izračunat je između različitih parametara (progesteron, estradiol, tjelesna kondicija, laktacija, mliječnost) korištenjem CORR modula SAS-a (PROC CORR). Koeficijent korelacije smo interpretirali prema PETZ (2004.), aproksimacija visine povezanosti – koeficijenta korelacije: od $\pm 0,00$ do $\pm 0,20$ nikakva ili neznatna povezanost, od $\pm 0,20$ do $\pm 0,40$ laka povezanost, od $\pm 0,40$ do $\pm 0,70$ značajna povezanost i od $\pm 0,70$ do $\pm 1,00$ visoka ili vrlo visoka povezanost.

Grafikoni su izrađeni pomoću modula SAS/GRAPH, postupkom PROC GPLOT. Izlazni format grafikona bio je jpeg (Joint Photographic Experts Group) u rezoluciji od 600 dpi (Dots Per Inch).

5. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo 55 krava holstein- frizijske pasmine, podijeljeno u tri skupine za primjenu presinkronizacijskih protokola: grupa A (n=17), B (n=19) i C (n=19). Na samom početku istraživanja je bilo 20 životinja po svakoj grupi, no zbog pokazivanja znakova tjeranja i umjetnog osjemenjivanja van predviđenog protokola pet životinja je izašlo iz pokusa.

5.1. Servis-period

Krave u istraživanju su bile minimalno 55, a maksimalno 190 dana po porodu. Grupa A je imala najveću disperziju u postpartalnim danima te je većina krava već prije bile osjemenjivana, no bez uspjeha. Za te krave je od vremena zadnjeg osjemenjavanja pa do ulaska u protokol prošlo najmanje 40 dana.

Tablica 3. Dani postpartalno do ulaska u protokol

Protokol	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum
A	113.65	45.56	65	190
B	64.49	6.7	55	81
C	64.44	4.64	55	71

Za potrebe statističke obrade smo krave podijelili u dvije grupe, ovisno o tome je li im prva aplikacija GnRH u sinkronizacijskom dijelu protokola (dan 0) bila prije ili poslije 65 dana postpartalno.

Tablica 4. Broj i postotak krava manje ili više od 65 dana postpartalno na dan početka sinkronizacijskog dijela protokola

	A (n=17)	B (n=19)	C (n=19)	ukupno (n=55)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
≤65d pp	2 (11,76)	11 (57,89)	10 (52,63)	23 (41,28)
>65d pp	15 (88,24)	8 (42,11)	9 (47,37)	32 58,18)

5.2. Ocjena tjelesne kondicije (BCS)

Sve su krave bile u dobroj tjelesnoj kondiciji za rasplodivanje, a ocjena se kretala od najnižih 2,5 pa do 3,25.

Tablica 5. Ocjena tjelesne kondicije (BCS)

Protokol	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum
A	2.69	0.2	2.5	3
B	2.76	0.19	2.5	3
C	2.86	0.22	2.5	3.25

Zbog procjene utjecaja BCS na uspješnost koncepcije, krave smo ovisno o ocjeni tjelesne kondicije podijelili na one sa niskim BCS-om ($BCS \leq 2,5$) i na one sa visokim BCS-om ($BCS > 2,5$).

Tablica 6. Ocjena tjelesne kondicije (niska $BCS \leq 2,5$ i visoka $BCS > 2,5$)

Tjelesna kondicija	A (n=17) n (%)	B (n=19) n (%)	C (n=19) n (%)	ukupno (n=55) n (%)
Niska	8 (47,06)	5 (26,32)	3 (15,79)	16 (29,09)
Visoka	9 (52,94)	14 (73,68)	16 (84,21)	39 (70,91)

5.3. Laktacija

Većini krava u istraživanju je ovo bila prva laktacija (61,82%), a jednoj kravi je ovo bila četvrta laktacija, što je ujedno i maksimalan broj telenja kravama obuhvaćenim istraživanjem.

Tablica 7. Prikaz životinja po laktaciji

laktacija	A (n=17) n (%)	B (n=19) n (%)	C (n=19) n (%)	ukupno (n=55) n (%)
1	14 (82,35)	8 (42,11)	12 (63,16)	34 (61,82)
2	0 (0)	9 (47,37)	6 (31,58)	15 (27,27)
3	3 (17,65)	1 (5,26)	1 (5,26)	5 (9,09)
4	0 (0)	1 (5,26)	0 (0)	1 (1,82)

Za potrebe statističke obrade, krave smo, obzirom na redni broj laktacije, podijelili na primipare (prva laktacija) i multipare (više od jedne laktacije).

Tablica 8. Podjela krava prema paritetu

	A (n=17)	B (n=19)	C (n=19)	ukupno (n=55)
paritet	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
primipare	14 (82,35)	8 (42,11)	12 (63,16)	34 (61,82)
multipare	3 (17,65)	11 (57,89)	7 (36,84)	21 (38,18)

5.4. Mliječnost

Za sve krave u protokolu smo iz programa “DairyPlan C21” provjerili podatke o mliječnosti (L) u prvih 100 dana laktacije (Tablica 9.) te u punih 305 dana laktacije (Tablica 10.).

Tablica 9. Mliječnost (L) u prvih 100 dana laktacija

protokol	Srednja	Standardna	Minimum	Maksimum
	vrijednost	devijacija		
A	2796.49	357.23	2042	3558
B	3017.04	548.22	1801	3988
C	2755.91	535.54	1972	4193

Tablica 10. Mliječnost (L) u punih 305 dana laktacije

protokol	Srednja	Standardna	Minimum	Maksimum
	vrijednost	devijacija		
A	7837.3	941.93	6281	9479
B	8201.63	1235.29	6930	10913
C	7351.85	1424.25	5558	10925

5.5. Uspjeh koncepcije

Tablica 11. pokazuje uspjeh koncepcije u sinkronizacijskom (CR1) i resinkronizacijskom (CR2) dijelu protokola, ustanovljen ultrazvučnom pretragom 30 dana po osjemenjivanju.

Iz tablice je vidljivo da je postotak koncepcije najveći za protokol B i iznosi 47,37%, slijedi protokol A sa 29,41% dok je nešto slabiji kontrolni protokol C sa 21,05%. Sukladno tome, postoji tendencija statistički značajnoj razlici ($p=0,0941$) u postotcima koncepcije u sinkronizacijskom dijelu protokola između grupa B i C, te krave iz protokola B imaju 3,37 puta bolju koncepciju od krava u protokolu C. Međutim, iako između protokola A i B te A i C nema signifikantne razlike, krave iz protokola B imaju 2,16 puta bolju koncepciju od krava iz protokola A, a krave iz protokola A imaju 1,56 puta bolju koncepciju od krava iz protokola C.

Tablica 11. Uspjeh koncepcije u sinkronizacijskom (CR1) i resinkronizacijskom (CR2) dijelu protokola (postotci obilježeni istim slovima pokazuju tendenciju značajnoj razlici, $p=0,0941$)

		A (n=17)	B (n=19)	C (n=19)	ukupno (n=55)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
CR1	0	12 (70,59)	10 (52,63)	15 (78,95)	37 (67,27)
	1	5 (29,41)	9 (47,37) ^a	4 (21,05) ^a	18 (32,73)
		A (n=12)	B (n=10)	C (n=15)	ukupno (n=37)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
CR2	0	8 (66,67)	7 (70,00)	10 (66,67)	25 (67,57)
	1	4 (33,33)	3 (30,00)	5 (33,33)	12 (32,43)

U resinkronizacijskom dijelu protokola postotak koncepcije između različitih protokola je dosta ujednačen i iznosi oko 30% (33,33% za protokole A i C, te 30% za protokol B). Sukladno

tome, krave iz protokola A i C imaju međusobno jednaku koncepciju, dok im je, u odnosu na protokol B, koncepcija 1,67 puta bolja.

5.6. Embrionalna smrtnost

U tablici 12. su prikazani podaci o embrionalnoj smrtnosti poslije koncepcije u sinkronizacijskom (ES1) i resinkronizacijskom (ES2) dijelu protokola.

Najviše životinja sa embrionalnom smrtnošću je bilo u protokolu B (33,33% poslije koncepcije i u sinkronizacijskom i u resinkronizacijskom dijelu protokola). Slijedi protokol C sa smrtnošću od 25% samo u sinkronizacijskom dijelu protokola, dok kod životinja iz protokola A embrionalna smrtnost nije zabilježena.

Tablica 12. Postotak embrionalne smrtnosti poslije koncepcije u sinkronizacijskom (ES1) i resinkronizacijskom (ES2) dijelu protokola

		A (n=5)	B (n=9)	C (n=4)	ukupno (n=18)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
ES1	0	5 (100)	6 (66,67)	3 (75,00)	14 (77,78)
	1	0 (0)	3 (33,33)	1 (25,00)	4 (22,22)
		A (n=4)	B (n=3)	C (n=5)	ukupno (n=12)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
ES2	0	4 (100)	2 (66,67)	5 (100)	11 (91,67)
	1	0 (0)	1 (33,33)	0 (0)	1 (8,33)

5.7. Konačni postotak gravidnih životinja

Obzirom da su sve plotkinje dva puta pregledane na gravidnost, prvi put ultrazvučnom dijagnostikom 30 dana po umjetnom osjemenjivanju i drugi put 60 dana poslije UO-a ultrazvukom i rektalnom palpacijom genitalnih organa, konačni postotak gravidnih životinja je prikazan u tablici 13. Konačni postotak je dobiven na način da se od broja životinja gravidnih nakon 30 dana oduzeo broj onih koje su nakon 60. dana dijagnosticirane kao negravidne i sumnja se da su imale embrionalnu smrtnost, te su tako dobivene one plotkinje koje su bile pozitivne na obe dijagnostike gravidnosti.

Uspjeh koncepcije u prvoj, sinkronizacijskoj fazi pokusa, za protokol A iznosi 29,41 %, za protokol B 31,58 % i za protokol C 15,79 %. Iako između protokola nema statistički značajne razlike u postotku, krave iz protokola B imaju 1,10 puta bolju koncepciju od krava iz protokola A i 2,46 puta bolju od krava iz protokola C, dok je koncepcija kod krava iz protokola A 2,22 puta bolja nego kod krava iz protokola C.

Dok je postotak gravidnih krava u drugoj resinkronizacijskoj fazi pokusa jednak za krave protokola A i C i iznosi 33,33 %, nešto je niži u krava iz protokola B i iznosi 20 %. Iako nema statistički značajne razlike između protokola, krave iz protokola A i C imaju 2 puta bolju koncepciju nego krave iz protokola B.

Tablica 13. Konačni postotak gravidnih krava

	A	B	C
N (ukupno)	17	19	19
CR1 (n)	5	9	4
ES1 (n)	0	3	1
PR1 (n, (%))	5 (29,41)	6 (31,58)	3 (15,79)
	A	B	C
N (ukupno)	12	10	15
CR2 (n)	4	3	5
ES2 (n)	0	1	0
PR2 (n, (%))	4 (33,33)	2 (20)	5 (33,33)

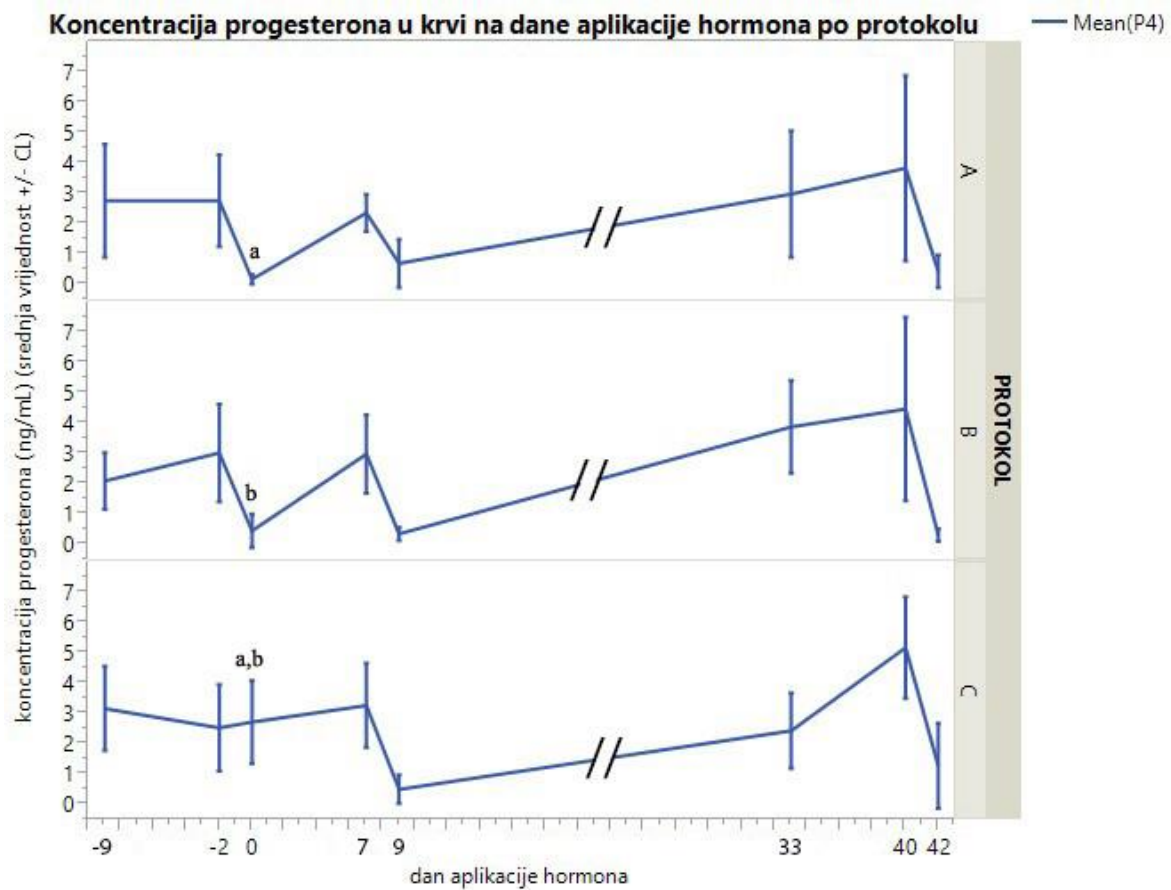
5.8. Koncentracija progesterona

U Tablici 14. i na Slici 9. vidimo koncentraciju progesterona u krvi (ng/mL) na dane analize, prikazanu po protokolu. Iz Tablice se vidi da je koncentracija progesterona ujednačena i bez razlik po ispitivanim protokolima, osim na nulti dan.

Na dan 0, koncentracija progesterona je najviša kod krava u protokolu C (2,73 ng/mL) te se statistički značajno razlikuje ($p=0,0002$) od krava protokola A (0,19 ng/mL), ali i od krava u protokolu B (0,47 ng/mL, $p=0,0008$).

Tablica 14. Koncentracija progesterona u ng/mL na dane vađenja krvi, izražena kao srednja vrijednost (Mean), standardna devijacija (Sd), najniža (Min) i najviša (Max) vrijednost (srednje vrijednosti obilježene istim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju, a=0,0002, b=0,0008)

Progesteron	-9	-2	0	7	9	33	40	42
A Mean	2.77	2.78	0.19 ^a	2.38	0.71	2.99	3.85	0.49
Sd	3.75	3.04	0.31	1.18	1.49	3.76	4.27	0.73
Min	0.08	0.08	0.08	0.98	0.08	0.08	0.08	0.08
Max	12.86	10.64	1.41	5.54	6.17	12.82	14.23	2.24
B Mean	2.11	3.03	0.47 ^b	2.99	0.37	3.63	4.48	0.33
Sd	1.94	3.13	1.14	2.67	0.44	2.94	3.61	0.27
Min	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.1
Max	6.25	9.39	5.05	12.09	1.66	7.3	11.56	0.82
C Mean	3.17	2.67	2.73 ^{ab}	3.27	0.51	2.44	5.33	1.29
Sd	2.87	2.97	2.83	2.87	0.97	2.58	2.95	2.43
Min	0.08	0.08	0.08	0.24	0.08	0.08	0.26	0.08
Max	8.44	9.1	7.85	10.39	4.38	8.29	10.53	7.2



Slika 9. Kretanje koncentracije progesterona u krvi na dane aplikacije hormona po protokolu (vrijednosti obilježene istim slovima se značajno razlikuju, a $p=0,0002$., b $p=0,0008$)

5.9. Koncentracija estradiola

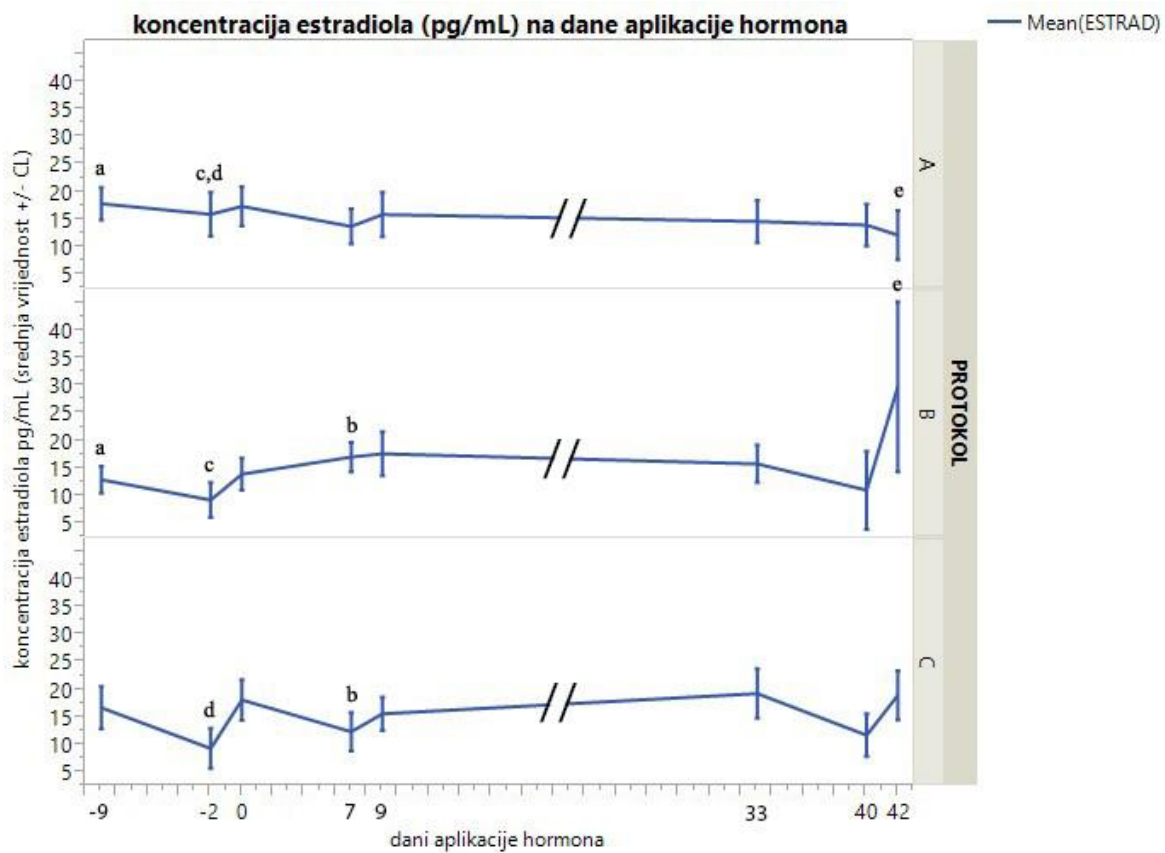
Tablica 15. i slika 10. prikazuju koncentraciju estradiola (pg/mL) u krvi na dane analize, po ispitivanim protokolima.

Tablica 15. Koncentracija estradiola u pg/mL na dane vađenja krvi, izražena kao srednja vrijednost (Mean), standardna devijacija (Sd), najniža (Min) i najviša (Max) vrijednost (vrijednosti obilježene istim slovima imaju tendenciju (a, b) ili se statistički značajno razlikuju (c, d, e)., a=0,0603., b=0,0695., c=0,022., d=0,0220., e=0,0181)

Estradiol	-9	-2	0	7	9	33	40	42
A Mean	17.92 ^a	15.99 ^{cd}	17.43	13.78	15.95	14.69	14.02	11.92 ^e
Sd	5.96	8	7.15	6.24	7.57	6.92	5.32	6.12
Min	8.72	2.72	5.99	4.36	5.72	5.17	4.36	2.18
Max	32.96	31.59	32.42	23.97	28.6	26.69	22.06	19.61
B Mean	12.97 ^a	9.27 ^d	13.99	17.1 ^b	17.7	15.86	11.06	31.63 ^e
Sd	4.99	6.15	5.99	5.59	8.31	6.62	8.48	11.18
Min	5.72	0	6.54	5.17	4.35	2.45	0.82	0
Max	26.42	20.97	24.24	25.33	35.14	27.24	25.87	61.29
C Mean	16.76	9.35 ^c	18.18	12.4 ^b	15.65	19.34	11.75	19.03
Sd	8	7.37	7.71	7.23	6.26	9.34	6.45	7.74
Min	3.81	0.82	4.36	1.63	4.63	2.45	0.27	1.91
Max	31.05	32.14	38.95	26.97	30.51	42.22	22.06	33.23

Za dan -9 postoji tendencija statističkoj značajnosti za vrijednost koncentracije estradiola između protokola A i B (p=0,0603), i njegova vrijednost u protokolu A je 17,92 pg/mL, a u protokolu B je niža i iznosi 12,92 pg/mL. Na dan -2 u protokolu A je njegova koncentracija

značajno viša nego u protokolu B (15,99 vs. 9,27 pg/mL, $p=0,0225$) i u protokolu C (15,99 vs. 9,35 pg/mL $p=0,0220$). Za dan 7 postoji tendencija statističkoj značajnosti za vrijednost koncentracije estradiola između protokola B i C (17,1 vs. 12,4 pg/mL, $p=0,0695$). Na dan 42 protokol A se značajno razlikuje od protokola B (11,92 vs. 31,63 pg/mL, $p=0,0181$).



Slika 10. Kretanje koncentracije estradiola (pg/mL) u krvi na dane aplikacije hormona, prikazana po ispitivanim protokolima (vrijednosti obilježene istim slovima imaju tendenciju (a, b) ili se statistički značajno razlikuju (c, d, e), $a=0,0603$., $b=0,0695$., $c=0,022$., $d=0,0220$., $e=0,0181$)

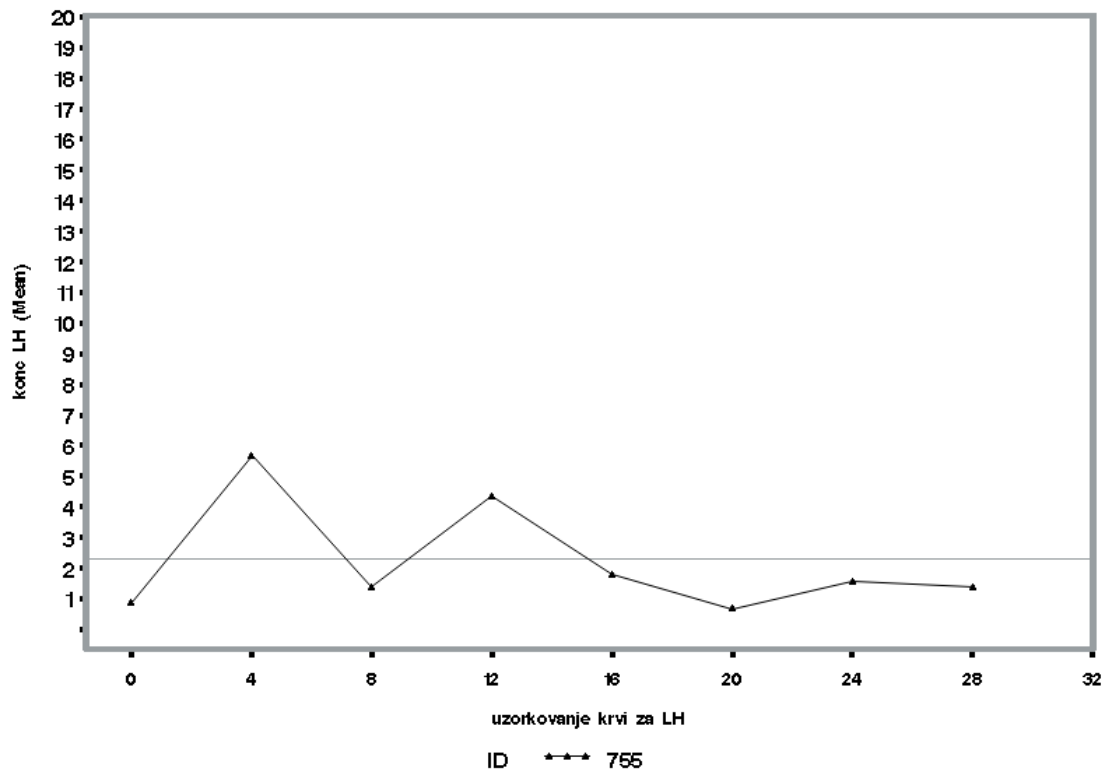
5.10. Koncentracija LH

U svakoj grupi smo nasumičnim odabirom odabrali pet krava kojima se vadila krv svaka 4 sata unutar razdoblja od 32h, počevši sa drugom aplikacijom GnRH (0h). Slijedeći grafovi prikazuju kretanje koncentracija LH vala i trenutak LH vrhunca. Ravna linija prikazuje referentnu liniju za dokaz vrhunca LH vala (izračunata kao bazalna razina LH plus dvije standardne devijacije, prema ROELOFS i sur., 2004). Iz grafova je vidljivo kako je kod većine krava LH vrhunac nastupio 4 h po aplikaciji GnRH. Kod pet krava (id= 716, 724, 809, 810 i 952) je već na nulti sat vađenja krvi koncentracija LH nadmašivala bazalnu za više od dvije SD, upućujući na vrhunac. Međutim, kod krava 716, 756, 757, 796 i 810 LH koncentracija pokazuje bifazičan peak.

Krivulje LH kod krave u protokolu B pokazuju najveću pravilnost, dok je u protokolu A najveći broj krava sa dvostrukim peakovima, u pravilu 4 i 12 sati po aplikaciji GnRH.

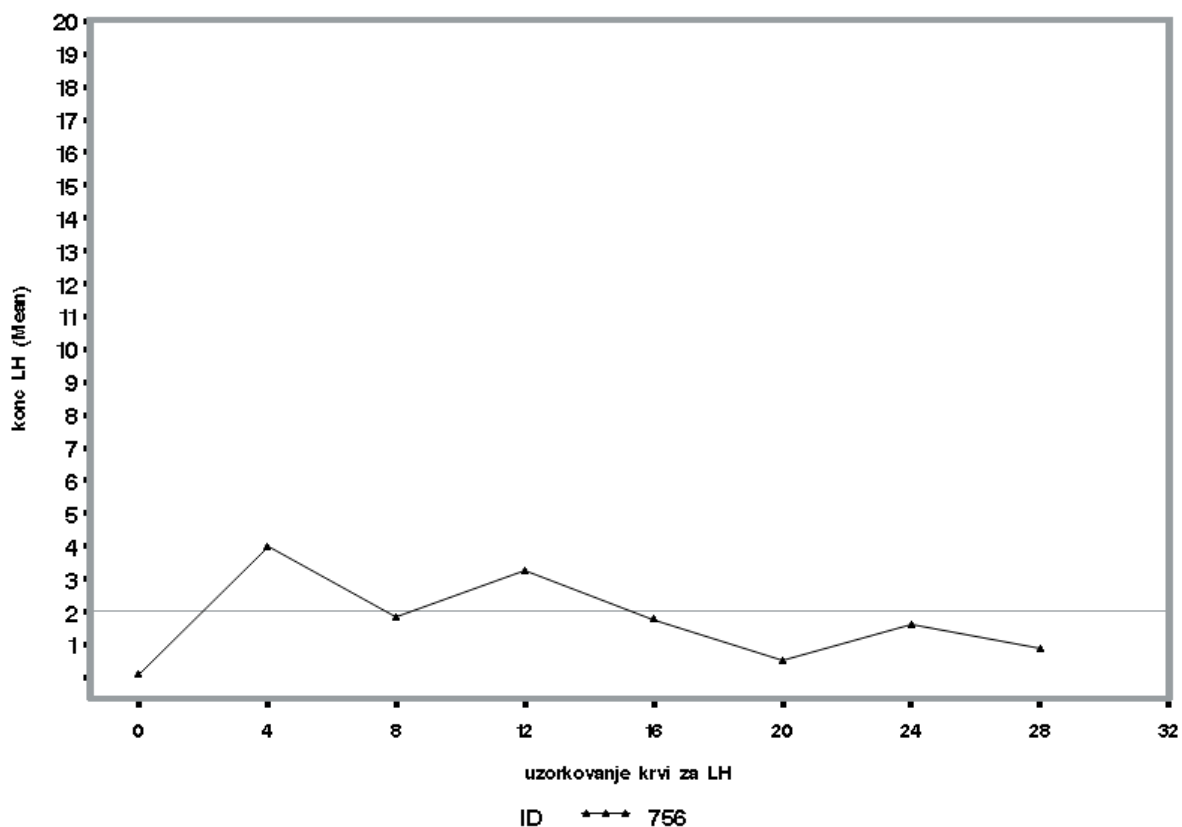
Analiza korelacije između najviše vrijednosti LH i promjera dominantnog folikula nije pokazala statističku značajnost, jednako kao ni korelacija promjera dominantnog folikula i koncentracija estradiola u krvi, dok je koncentracija progesterona u krvi granično znatno povezana ($r=0,40$) sa promjerom dominantnog folikula, ali samo sa tendencijom signifikantnosti ($p=0,0839$).

5.10.1. Protokol A



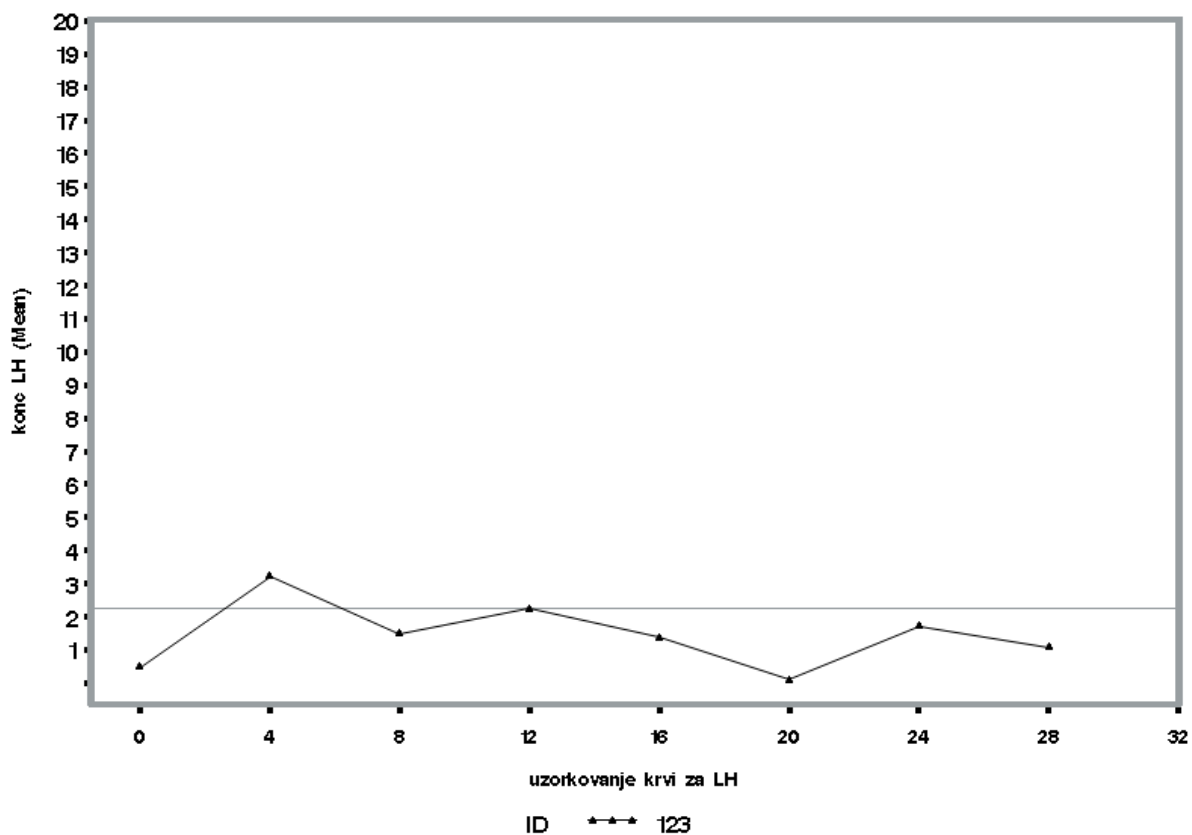
Slika 11. Kretanje koncentracije LH za kravu 755 (A)

Iz Slike 11. je vidljivo kako je kod krave 755 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH, da bi poslije 8 sati pao ispod bazalne vrijednosti i zatim ju ponovno prešao na 12 sati po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 17 mm na desnom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



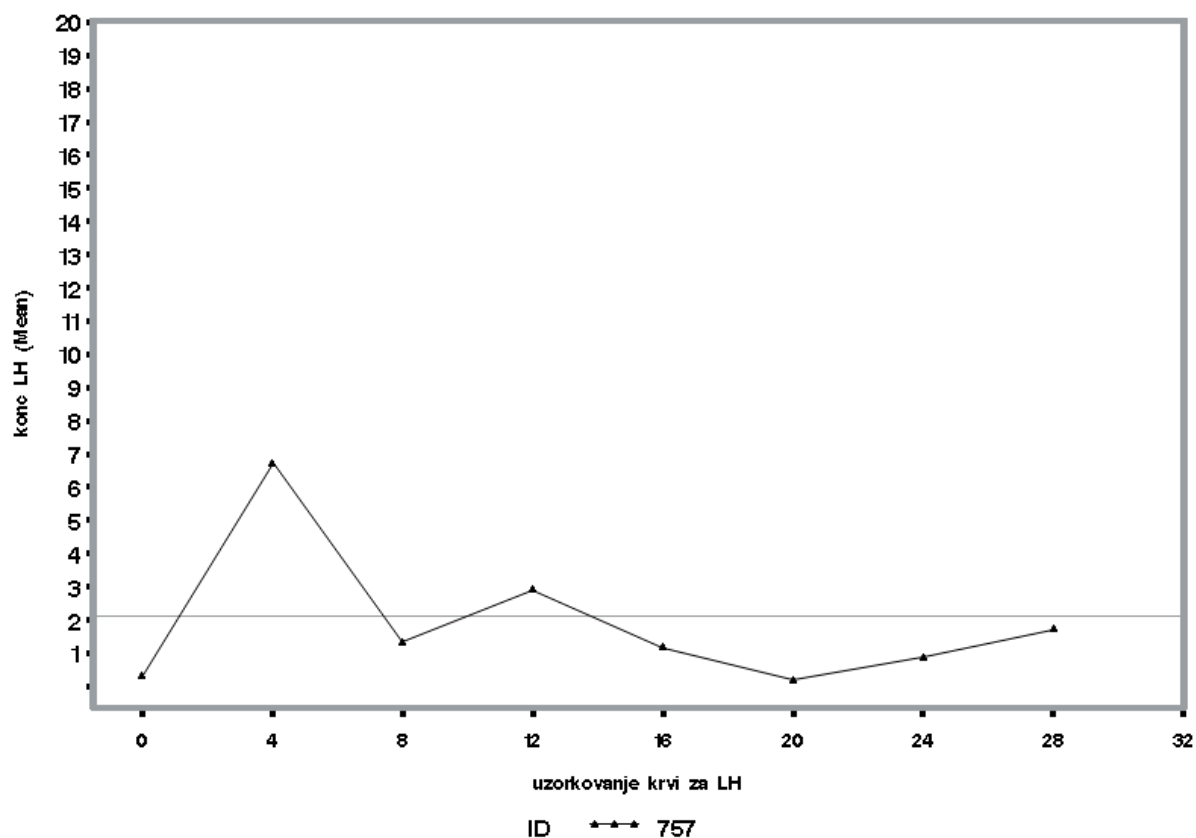
Slika 12. Kretanje koncentracije LH za kravu 756 (A)

Iz Slike 12. je vidljivo kako kod krave 756 koncentracija LH ima sličan porast kao i u prethodne krave, sa povišenjima iznad minimalne vrijednosti za vrhunac LH vala 4 i 12 sati po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 21 mm na lijevom jajniku, koji je 12 sati kasnije povećao promjer na 23 mm, te je 4 sata kasnije, ukupno 28 sati po aplikaciji GnRH ovulirao..



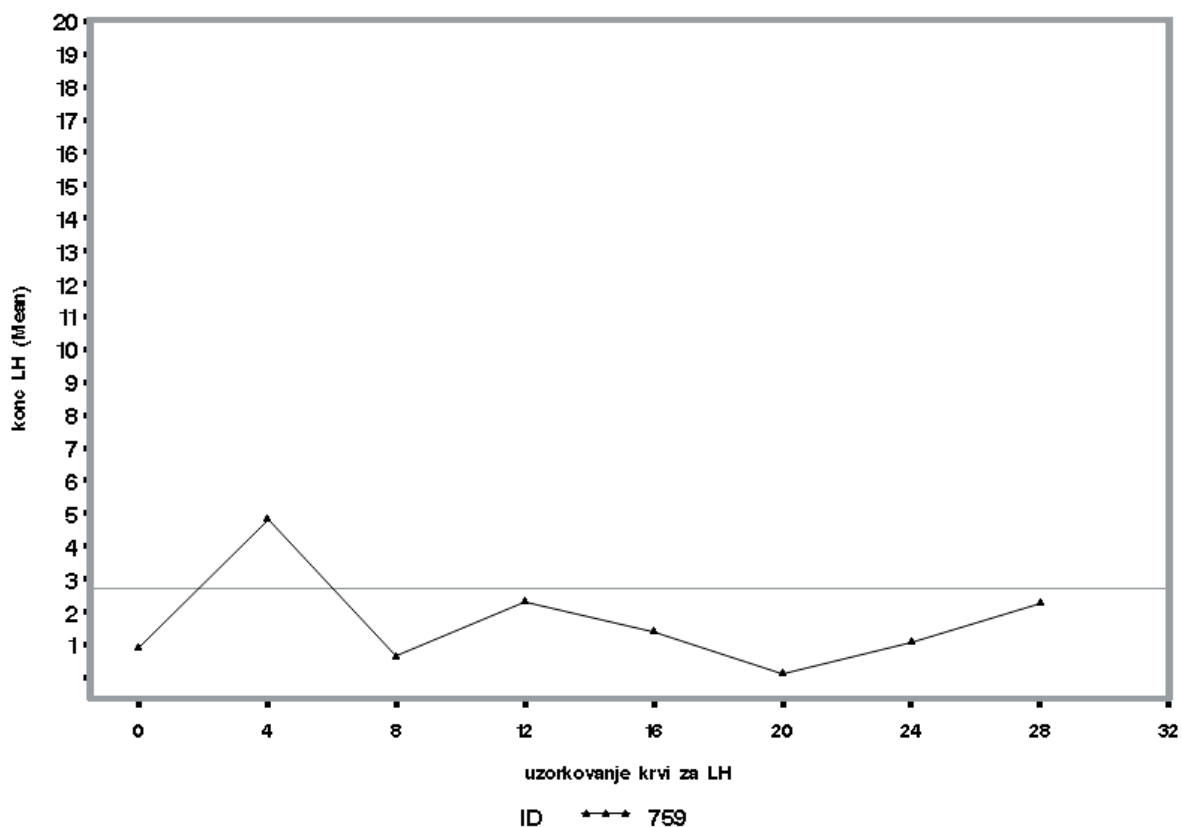
Slika 13. Kretanje koncentracije LH za kravu 123 (A)

Na slici 13. vidimo kako je kod krave 123 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH, ali je još na 12 sati po aplikaciji dosegao granicu koncentracije koja obilježava vrhunac lučenja. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 19 mm na desnom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



Slika 14. Kretanje koncentracije LH za kravu 757 (A)

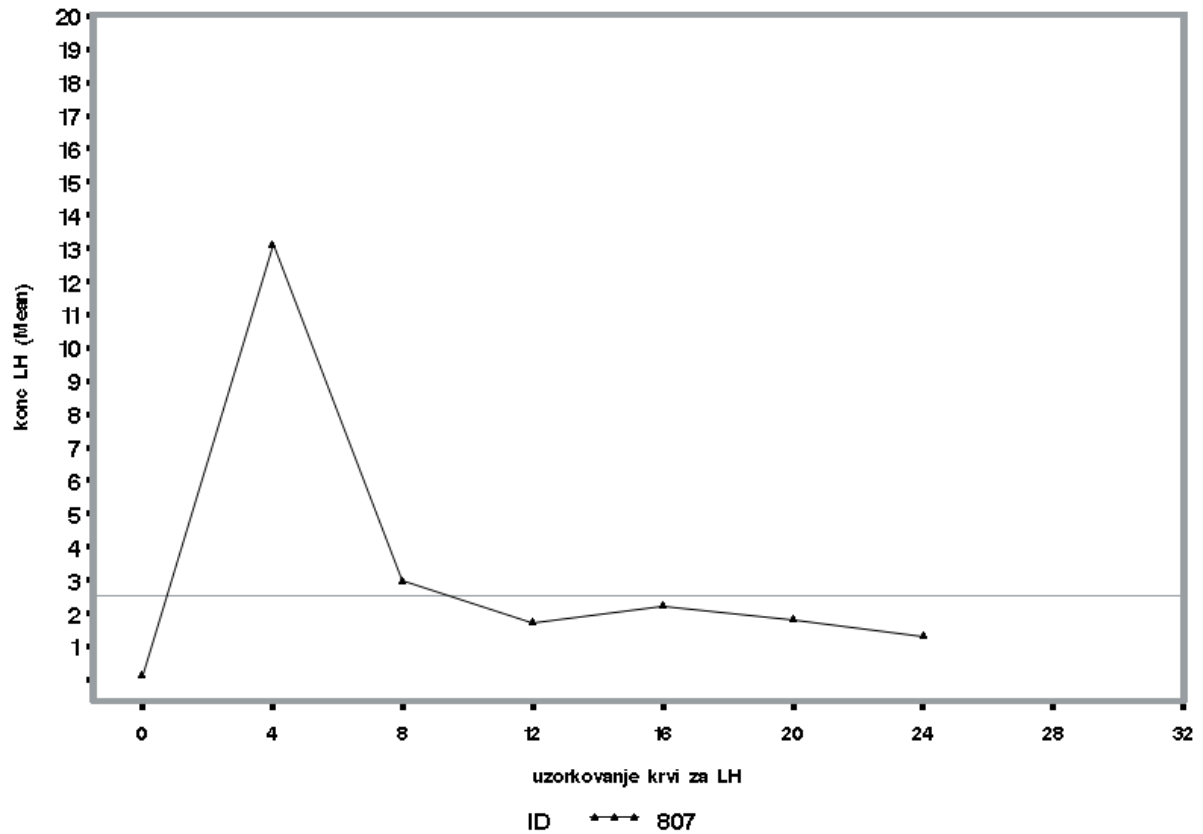
Na slici 14. vidimo kretanje koncentracije LH kod krave 757. jednako kao i kod druge dvije krave iz ove skupine (755 i 756), LH pokazuje bifazičan vrhunac, 4 i 12 sati po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 16 mm na lijevom jajniku, koji je 12 sati kasnije ovulirao..



Slika 15. Kretanje koncentracije LH za kravu 759 (A)

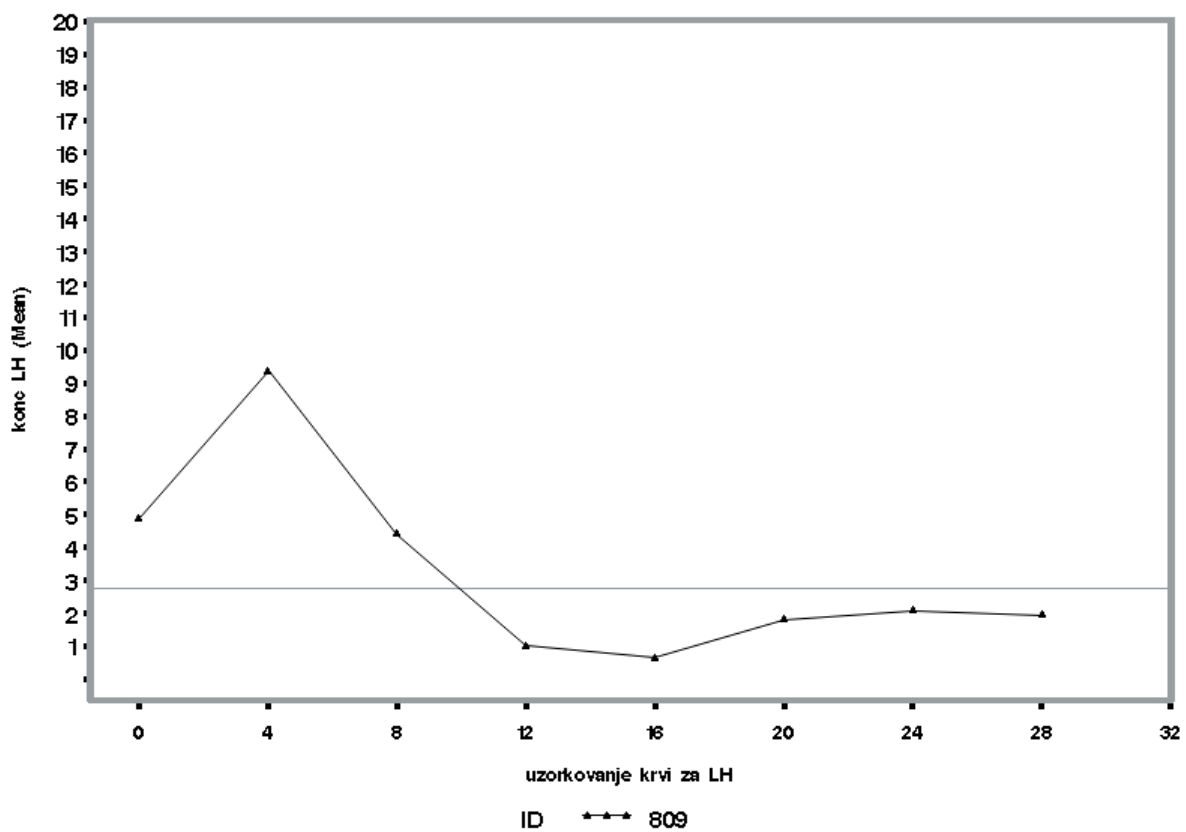
Iz Slike 15. je vidljivo kako je kod krave 759 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen folikul promjera 15 mm na desnom jajniku, a 12 sati potom na lijevom jajniku folikul promjera 18 mm: ultrazvučnom kontrolom za 4 sata (28 sati po aplikaciji GnRH) smo utvrdili kako je ovulirao folikul na lijevom jajniku.

5.10.2. Protokol B



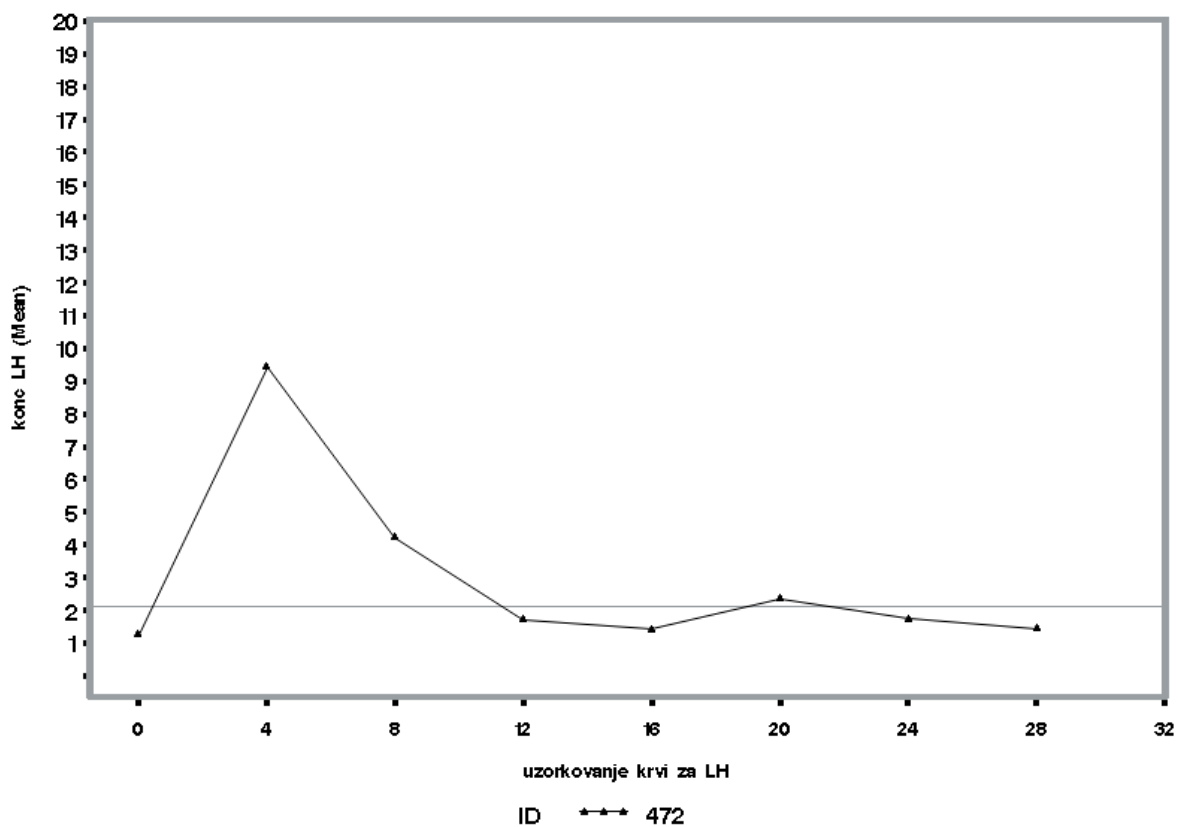
Slika 16. Kretanje koncentracije LH za kravu 807 (B)

Iz Slike 16. je vidljivo kako je kod krave 807 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 25 mm na lijevom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



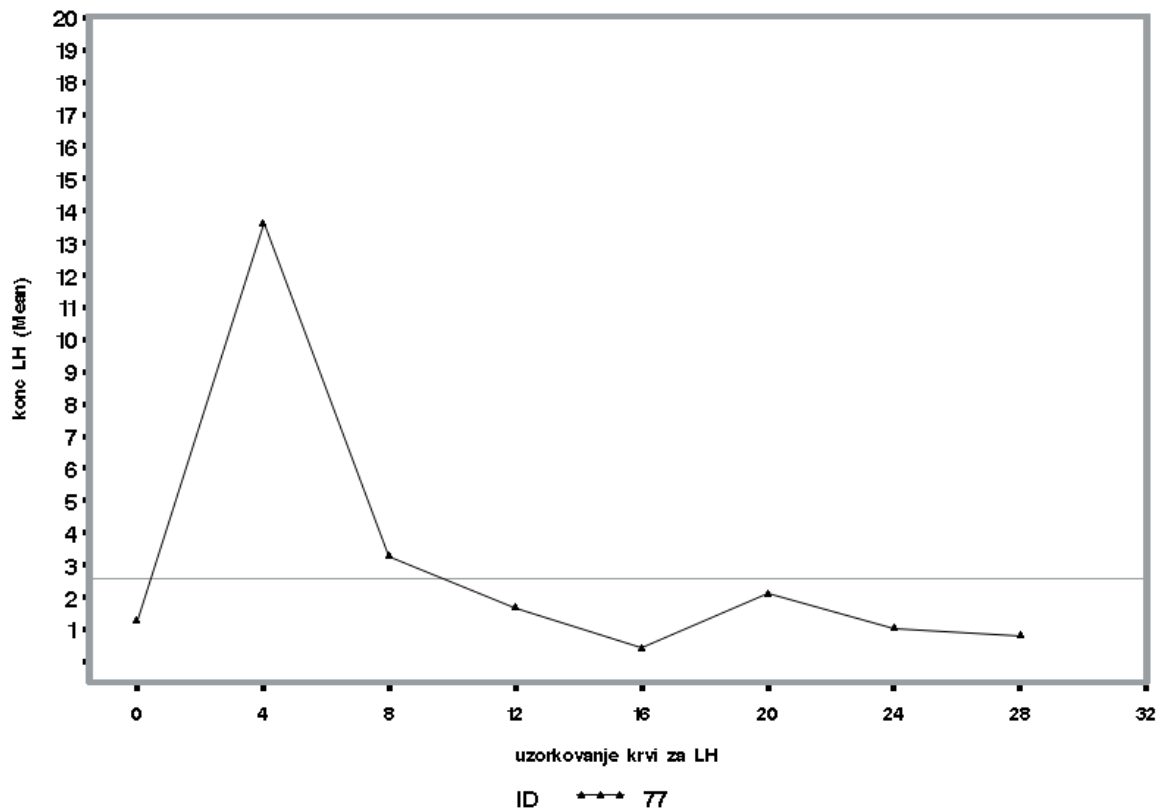
Slika 17. Kretanje koncentracije LH za kravu 809 (B)

Na Slici 17. vidimo da je kod krave 809 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 27 mm na lijevom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



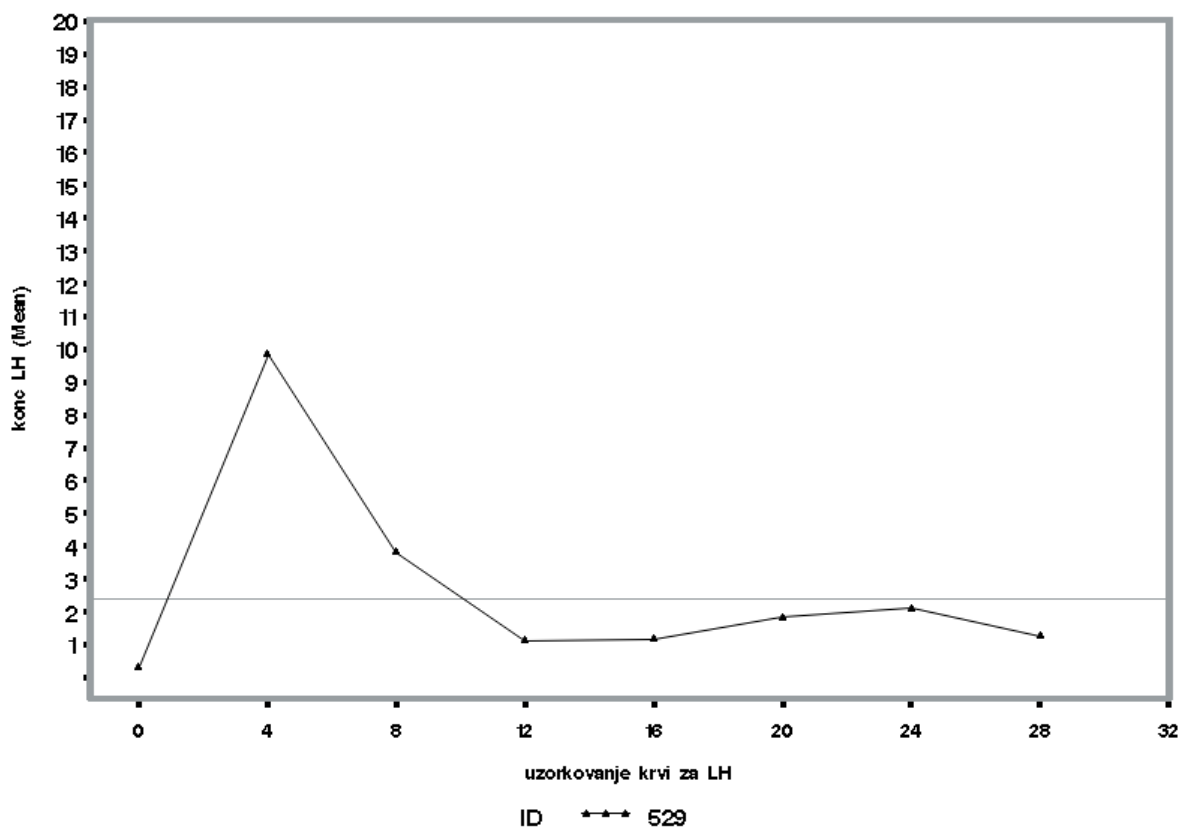
Slika 18. Kretanje koncentracije LH za kravu 472 (B)

Iz Slike 18. se vidi kako je kod krave 472 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH, ali je još na 20 sati po aplikaciji dosegao donju granicu koncentracije za vrhunac lučenja. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 27 mm na desnom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



Slika 19. Kretanje koncentracije LH za kravu 77 (B)

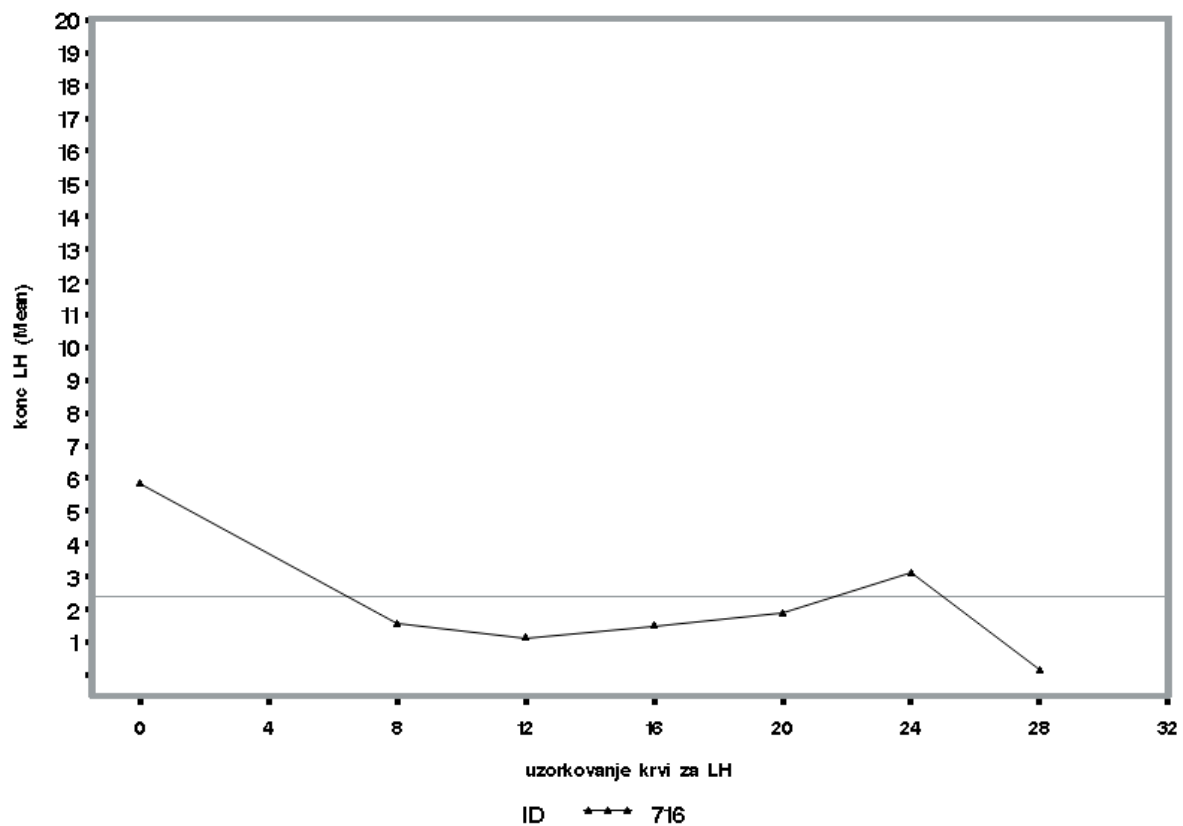
Na Slici 19. je vidljivo kako je kod krave 77 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 33 mm na lijevom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



Slika 20. Kretanje koncentracije LH za kravu 529 (B)

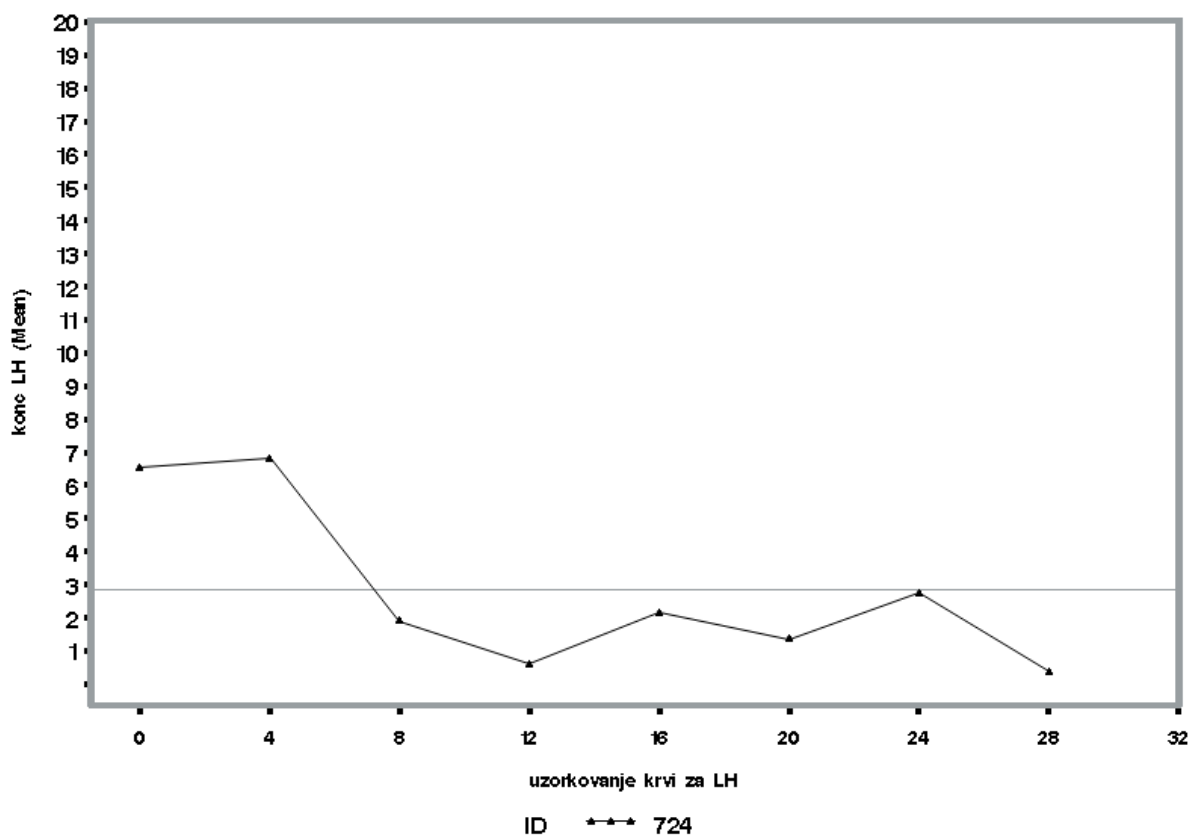
Iz Slike 20. je vidljivo kako je kod krave 529 vrhunac LH vala također nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 25 mm na desnom jajniku, koji je 12 sati kasnije već bio ovulirao.

5.10.3. Protokol C



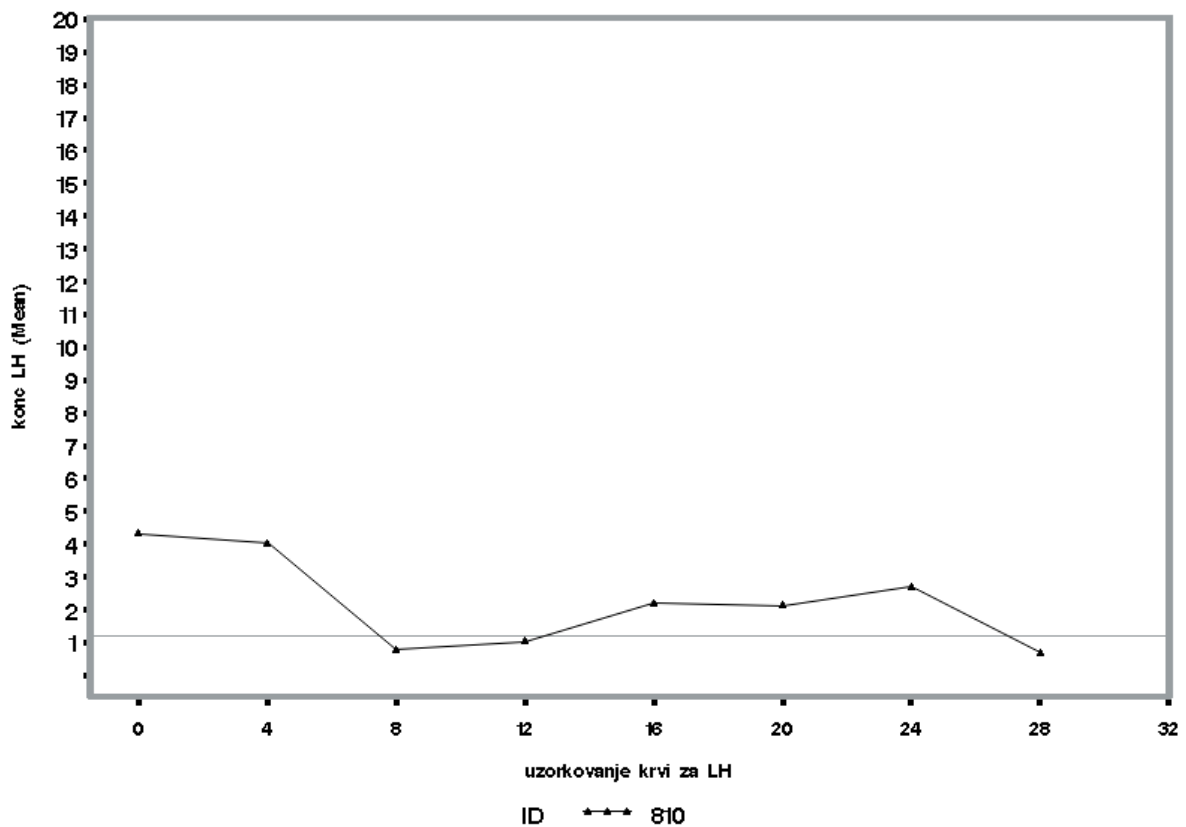
Slika 21. Kretanje koncentracije LH za kravu 716 (C)

Iz slike 21. je vidljivo kako je kod krave 716 koncentracija LH već na nulti sat upućivala na vrhunac lučenja, no na 24 sata po aplikaciji GnRH LH ponovno prelazi izračunatu referentnu vrijednost za vrhunac lučenja. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen folikul promjera 39 mm na desnom jajniku, koji je 12 sati kasnije bio nepromijenjen, te je najvjerojatnije riječ o cisti.



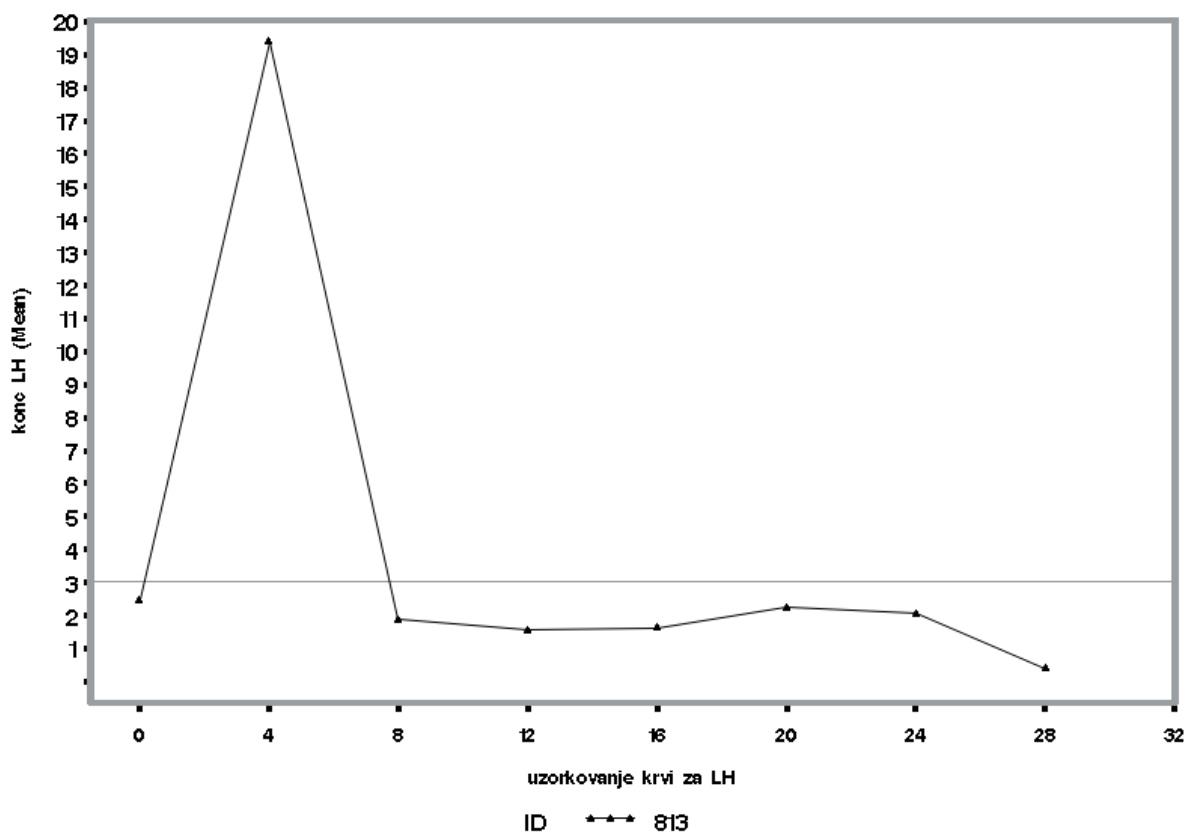
Slika 22. Kretanje koncentracije LH za kravu 724 (C)

Na Slici 22. kod krave 724 val lučenja LH koji će rezultirati peakom bio prisutan već nulti sat aplikacije GnRH i rastao je do 4 sata po aplikaciji, nakon čega pada na bazalnu koncentraciju. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 31 mm na desnom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



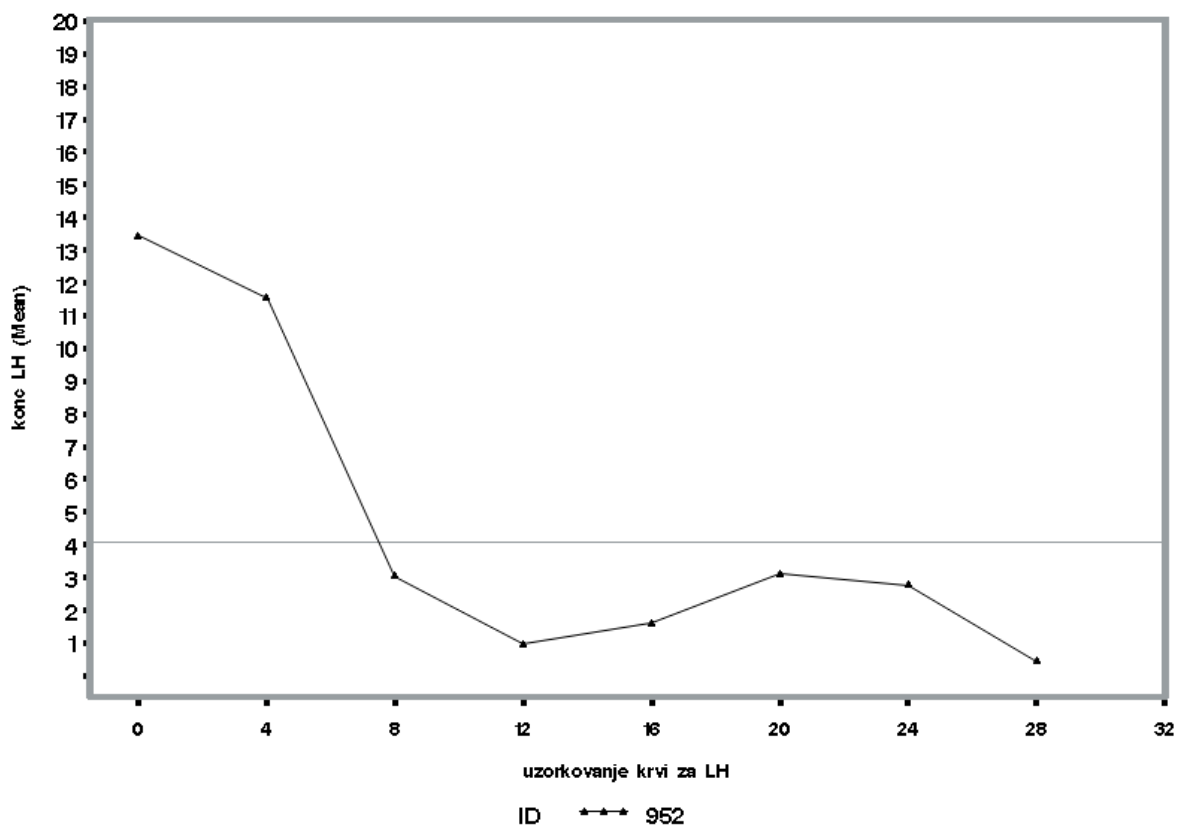
Slika 23. Kretanje koncentracije LH za kravu 810 (C)

Iz Slike 23. vidimo da je kod krave 810 vrhunac LH vala bio prisutan već pri aplikaciji GnRH. Osam sati poslije aplikacije pada ispod referentne vrijednosti, te ju ponovno prelazi nakon osam sati (16h poslije GnRH) i to povišenje traje do 12 sati, tj. do 28 sati po aplikaciji GnRH kad se LH ponovno spušta na bazalne vrijednosti. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 20 mm na desnom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



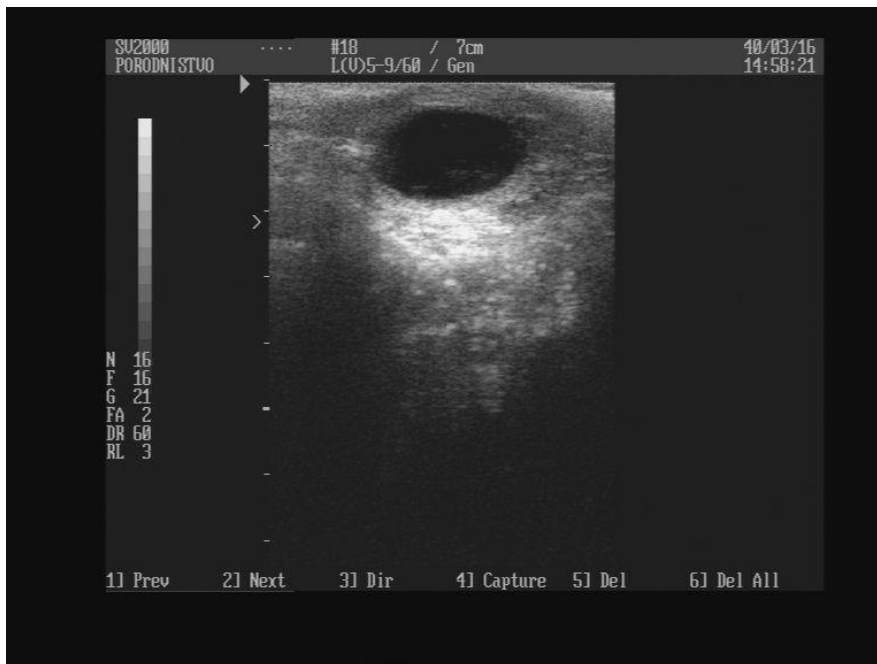
Slika 24. Kretanje koncentracije LH za kravu 813 (C)

Iz slike 24. je vidljivo kako je kod krave 813 vrhunac LH vala nastupio 4 sata po aplikaciji GnRH. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 22 mm na desnom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.

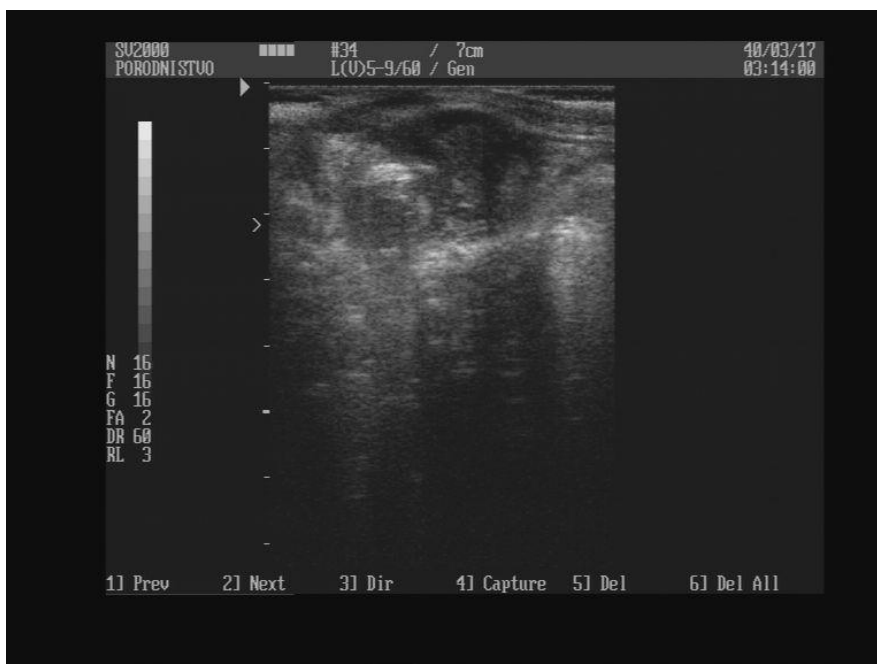


Slika 25. Kretanje koncentracije LH za kravu 952 (C)

Iz Slike 25. je vidljivo kako je kod krave 952 vrhunac LH vala nastupio prije aplikacije GnRH, te je osam sati po aplikaciji pao ispod referentne vrijednosti. Ultrazvučnom pretragom jajnika je 12 sati po aplikaciji GnRH pronađen dominantni folikul promjera 29 mm na desnom jajniku, koji je 12 kasnije već bio ovulirao.



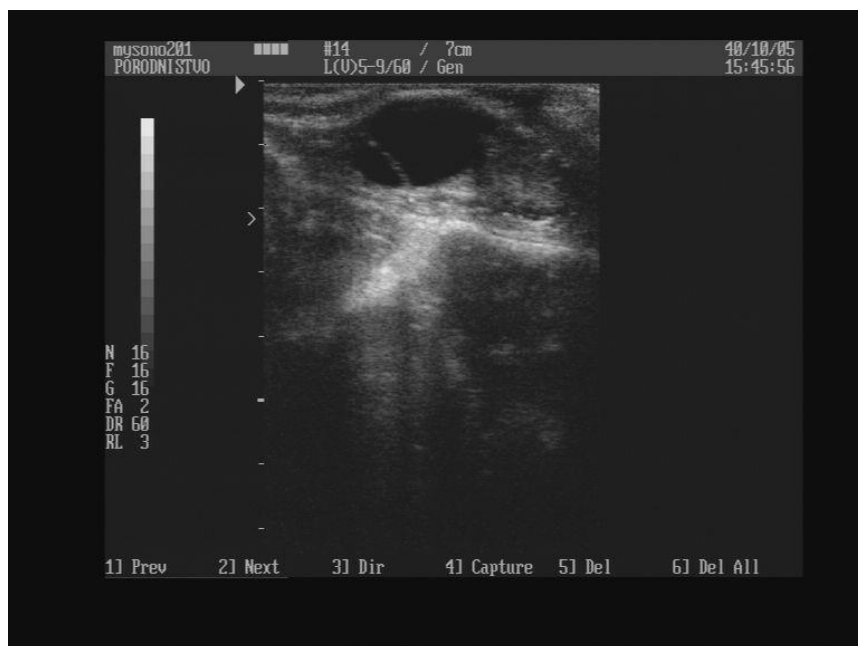
(a)



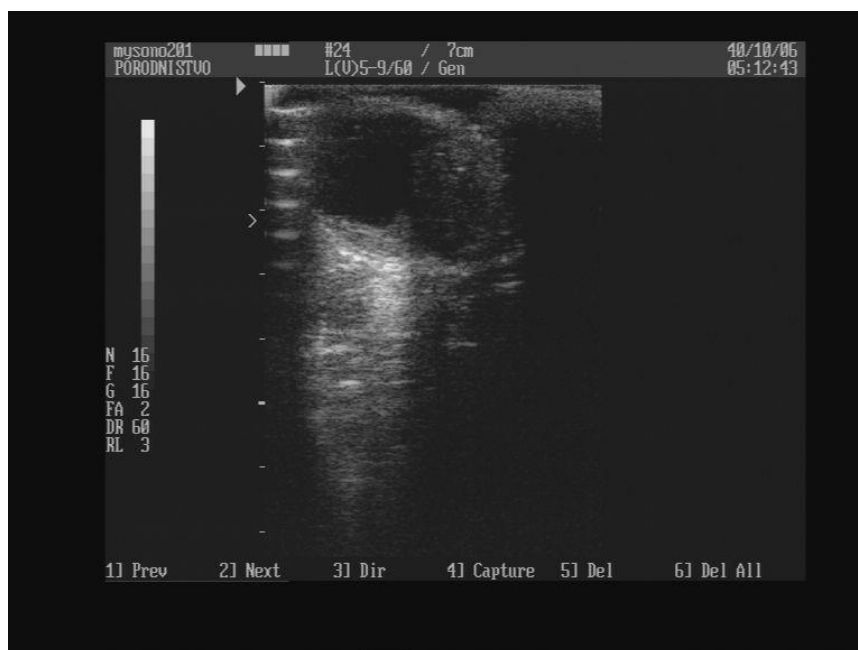
(b)

Slika 26. Ultrazvučna snimka folikula kod krave 755 (protokol A) 12sati (a) i 24 sata (b) po drugoj aplikaciji GnRH

Na Slici26a je vidljiv dominantni folikul 17 mm u promjeru, dok ista slika pod b prikazuje isti jajnik 12sati poslije. Uočljiva je luteinizacija ovuliranog folikula.



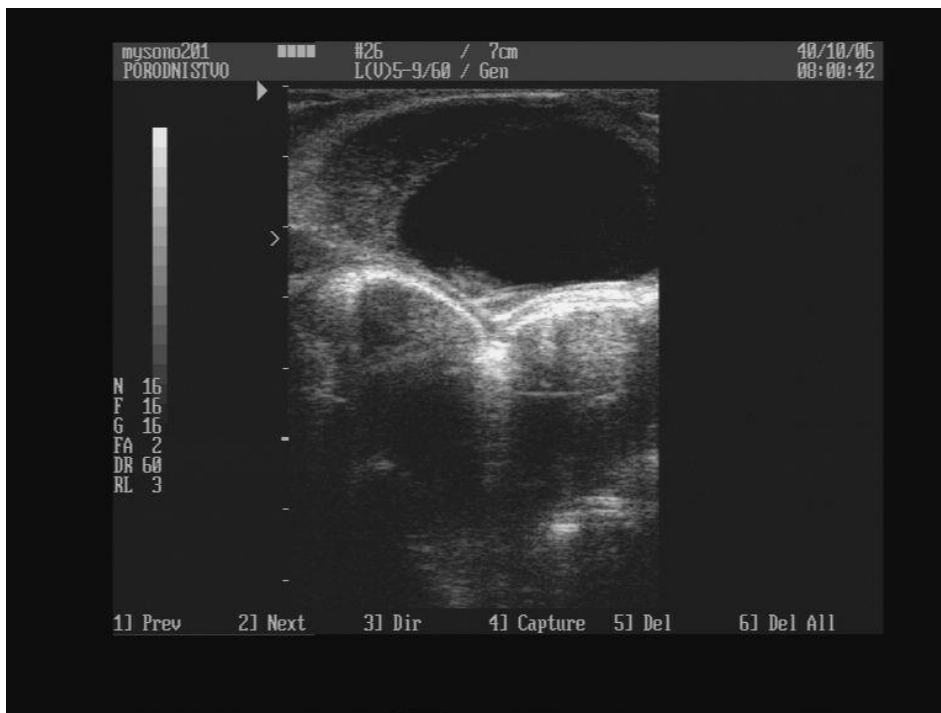
(a)



(b)

Slika 27. Ultrazvučna snimka folikula krave 529, 12 i 24 sata po drugoj aplikaciji GnRH

Na Slici 27a je vidljiv dominantni folikul 25 mm u promjeru, dok Slika 27b prikazuje isti jajnik 12 sati poslije. Uočljiv je početak luteinizacije ovuliranog folikula.



Slika 28. Ultrazvučni snimka folikula kod krave 716, 32 sata po drugoj aplikaciji GnRH (sumnja na cistu)

Na Slici 28 je vidljiv snimak folikula kod krave 716, 32 sata poslije druge aplikacije GnRH. Veličina folikula se nije mijenjala tokom četiri uzastopna ultrazvučna pregleda unutar 32 sata.

5.11. Korelacijski odnosi

5.11.1. Korelacijski odnosi između tjelesne kondicije, laktacije i mliječnosti u prvih 100 dana laktacije za krave u istraživanju

Tablica 16. Pearson-ov koeficijent korelacije i statistička značajnost između varijabli tjelesne kondicije, laktacije i mliječnosti u prvih 100 dana laktacije za krave u istraživanju

	BCS	Laktacija	Mliječnost
BCS		0,349 <0,0001	0,247 0,0032
Laktacija	0,349 <0,0001		0,434 <0,0001
Mliječnost	0,247 0,0032	0,434 <0,0001	

Iz tablice 16. je vidljivo kako su korelacije između sve tri varijable statistički značajne: tjelesna kondicija i redni broj laktacije su međusobno lako povezane ($r=0,349$) sa visokom statističkom značajnošću ($p<0,0001$). Također, redni broj laktacije je značajno povezan ($r=0,434$) sa mliječnošću u prvih 100 dana laktacije, također sa visokom statističkom značajnošću ($p<0,0001$). Mliječnost u prvih 100 dana laktacije je lako povezana sa tjelesnom kondicijom ($r=0,247$), sa visokom statističkom značajnošću ($p=0,0032$). Dakle, krave u drugoj i trećoj laktaciji imaju bolju tjelesnu kondiciju i veću mliječnost.

5.11.2. Korelacijski odnosi između vrijednosti koncentracija progesterona i estradiola u krvi po danima pokusa

Tablica 17. Pearson-ov koeficijent korelacije i statistička značajnost između vrijednosti koncentracija progesterona i estradiola u krvi po danima pokusa

	-9	-2	0	7	9	33	40	42
A	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
B	r	0.58	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.64	n.s.
	p	0.0084					0.0869	
C	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Iz Tablice 17. se vidi kako je koncentracija estradiola i progesterona značajno povezana ($r=0,58$) na dan -9 u skupini B sa visokom statističkom značajnošću, ($p=0,0084$), dok je jaka negativna poveznost ($r=-0,64$) za istu grupu izražena na dan 40 ali sa tendencijom statističke značajnosti ($p=0,0869$).

Tablica 18. prikazuje korelacijske odnose tjelesne kondicije, rednog broja laktacije i mliječnosti sa koncentracijama progesterona i estradiola na dane pokusa za protokol A. Iz tablice 18. se vidi kako tjelesna kondicija i laktacija nisu značajno korelirane sa koncentracijom progesterona i estradiola. Međutim, mliječnost je na dan 0 značajno negativno povezana sa koncentracijom progesterona ($r=-0,56$) u skupini A sa visokom statističkom značajnošću, ($p=0,0156$), dok je jaka negativna poveznost ($r=-0,74$) za istu grupu izražena na dan 42, sa statističkom značajnošću ($p=0,0375$). Mliječnost je pozitivno značajno povezana ($r=0,46$) sa estradiolom na dan 9 pokusa u protokolu A, sa tendencijom statističke značajnosti ($p=0,0692$).

Tablica 18. Pearson-ov koeficijent korelacije i statistička značajnost između vrijednosti koncentracija progesterona i estradiola u krvi te tjelesne kondicije, laktacije i mliječnosti u prvih 100 dana laktacije po danima pokusa za protokol A

dan	-9		0		9		42	
hormon	P4	E2	P4	E2	P4	E2	P4	E2
BCS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Laktacija	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
mliječnost	n.s.	n.s.	-0,56	n.s.	n.s.	0,46	-0,74	n.s.
			0,0156			0,0692	0,0375	

Tablica 19. prikazuje korelacijske odnose tjelesne kondicije, rednog broja laktacije i mliječnosti sa koncentracijama progesterona i estradiola na dane pokusa za protokol B. Iz Tablice 19. vidimo kako je tjelesna kondicija na dan -9 značajno povezana ($r=0,49$) sa koncentracijom progesterona i to sa statističkom značajnošću ($p=0,0319$), dok značajna povezanost sa estradiolom ($r=0,42$) ima tendenciju značajnosti ($p=0,0756$). Značajna poveznost ($r=0,49$) sa statistički značajnom vrijednosti ($p=0,0339$) postoji između estradiola i tjelesne kondicije na dan 0, dok je korelacija sa mliječnošću također signifikantna ($p=0,0438$) i negativno značajno povezana ($r=0,47$). Laktacija je pozitivno lako povezana ($r=0,38$) sa progesteronom na dan 9 pokusa u protokolu B, sa tendencijom statističke značajnosti ($p=0,0923$).

Tablica 19. Pearson-ov koeficijent korelacije i statistička značajnost između vrijednosti koncentracija progesterona i estradiola u krvi te tjelesne kondicije, laktacije i mliječnosti u prvih 100 dana laktacije po danima pokusa za protokol B

dan	-9		0		9		42	
hormon	P4	E2	P4	E2	P4	E2	P4	E2
BCS	0,49	0,42	n.s.	0,49	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	0,0319	0,0756		0,0339				
Laktacija	n.s.	n.s.	n.s.		0,38	n.s.	n.s.	n.s.
					0,0923			
Mliječnost	n.s.	n.s.	n.s.	-0,47	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
				0,0438				

Tablica 20. Pearson-ov koeficijent korelacije i statistička značajnost između vrijednosti koncentracija progesterona i estradiola u krvi te tjelesne kondicije, laktacije i mliječnosti u prvih 100 dana laktacije po danima pokusa za protokol C

dan	-9		0		9		42	
hormon	P4	E2	P4	E2	P4	E2	P4	E2
BCS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,41	n.s.	n.s.	n.s.
					0,0776			
Laktacija	n.s.	n.s.	0,57	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
			0,0104					
Mliječnost	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,67	n.s.
							0,0091	

Tablica 20. prikazuje korelacijske odnose tjelesne kondicije, rednog broja laktacije i mliječnosti sa koncentracijama progesterona i estradiola na dane pokusa za protokol C. Iz Tablice 20. vidimo da je koncentracija progesterona na dan 0 značajno povezana ($r=0,57$) u skupini C sa laktacijom i to sa statističkom značajnošću ($p=0,0104$). Na dan 9 postoji značajna povezanost progesterona i tjelesne kondicije ($r=0,41$) sa tendencijom značajnosti ($p=0,0776$). Značajno jaka poveznost ($r=0,67$) sa statistički značajnom vrijednosti ($p=0,0091$) postoji između progesterona i mliječnosti na dan 42.

5.12. Utjecaj vrijednosti progesterona na dane pokusa na uspješnost koncepcije između protokola

5.12.1. CR1

U Tablici 21. je prikazana procijenjena vrijednost koncentracije progesterona prikazana kao srednja vrijednost najmanjih kvadrata (*least square means*, LSM) i 95 % intervali pouzdanosti (*confidence limits*, CL) na dan 0 pokusa po protokolu ovisno o uspjehu koncepcije.

Tablica 21. Procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 0 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije (vrijednosti obilježene istim slovima se statistički značajno razlikuju., $a=0,0004$., $b=0,0530$, $c=0,0063$., $d=0,0372$)

Protokol	CR1	P4 (LSM)	95% CL	
A	0	0,1709 ^a	-0,8884	1,2301
B	0	0,6642 ^c	-0,4962	1,8245
C	0	2,7623 ^{ac}	1,8148	3,7097
A	1	0,09434 ^b	-1,5466	1,7353
B	1	0,1789 ^d	-1,0442	1,4020
C	1	2,5244 ^{bd}	0,6897	4,3590

Iz Tablice 21. je vidljivo kako je na dan 0 pokusa opažena statistički značajna razlika u koncentraciji progesterona kod krava koje nisu koncipirale u protokolu A i u protokolu C ($p=0,0004$), te u protokolu B i protokolu C ($p=0,0063$). Kod krava koje su koncipirale između protokola B i C postoji statistički značajna razlika ($p=0,0372$) dok između protokola A i C postoji velika tendencija statistički značajnoj razlici ($p=0,0530$). Vrijednost progesterona je viša kod krava koje nisu koncipirale od vrijednosti u krava koje su koncipirale, neovisno o ispitivanom protokolu. Međutim, od tri ispitivana protokola, protokol C ima najvišu vrijednost progesterona, neovisno o koncepciji.

Tablica 22. Procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 7 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije (vrijednosti obilježene istim slovima se statistički značajno razlikuju ili pokazuju tendenciju., $a=0,0573$., $b=0,0701$, $c=0,0513$)

Protokol	CR1	P4 (LSM)	95% CL	
A	0	2,6523	1,3196	3,9849
B	0	3,9192 ^b	2,4593	5,3790
C	0	2,8910	1,6990	4,0829
A	1	1,7157 ^a	-0,3488	3,7803
B	1	1,9602 ^{bc}	0,4214	3,4990
C	1	4,7186 ^{ac}	2,4103	7,0268

U Tablici 22. je prikazana procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 7 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije. Kod krava u protokolu B je koncentracija progesterona značajno viša kod krava koje nisu koncipirale (3,992 vs. 1,9602 ng/mL., $p=0,0701$). Između krave koje su koncipirale u protokolu B i C postoji velika tendencija statističkoj značajnosti ($p=0,0513$), jednako kao i između krava u protokolima A i C ($p=0,0573$), te je ponovno vrijednost progesterona najviša kod krava u protokolu C (4,7186 ng/mL), a vrlo slična u protokolima A i B (1,7157 i 1,9602 ng/mL).

Sukladno podacima iz Tablice 23, na dan pokusa 9, razlika u koncentraciji progesterona između krava u protokolu C, obzirom na uspjeh koncepcije, je značajna ($p=0,0485$) i viši je u krava koje su koncipirale (1,3915 vs. 0,2650 ng/mL). Također, značajno se razlikuje koncentracija progesterona kod krava koje su koncipirale u protokolu B od onih u protokolu C (0,1426 vs. 1,3915 ng/mL., $p=0,0406$). Međutim, krave iz protokola A imaju tendenciju razlikovati se od krava u protokolu C po koncentraciji progesterona bez obzira na koncepciju. Tako je kod krava koje jesu koncipirale vrijednost progesterona u protokolu A manja nego u protokolu C (0,1415 vs. 1,3915 ng/mL., $p=0,0661$), dok je u skupini koje nisu koncipirale odnos obrnut, te je koncentracija progesterona niža u protokolu C (0,9685 vs. 0,2650., $p=0,0802$).

Na dane pokusa -9 i -2 nije opažena statistički značajna razlika u vrijednosti progesterona po protokolu ovisno o uspjehu koncepcije

Tablica 23. Procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 9 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije (vrijednosti obilježene istim slovima se statistički značajno razlikuju ili pokazuju tendenciju., $a=0,0802$, $b=0,0661$., $c=0,0406$, $d=0,0485$)

Protokol	CR1	P4 (LSM)	95% CL	
A	0	0,9685 ^a	0,3694	1,5675
B	0	0,5415	-0,0873	1,1703
C	0	0,2650 ^{ad}	-0,2485	0,7784
A	1	0,1415 ^b	-0,7478	1,0308
B	1	0,1426 ^c	-0,5203	0,8054
C	1	1,3915 ^{bcd}	0,3972	2,3858

5.12.2. CR2

U Tablici 24. je prikazana procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 33 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije.

Iz Tablice 24. je vidljivo kako je na dan 33 pokusa opažena statistički značajna razlika u koncentraciji progesterona kod krava koje nisu koncipirale između protokola A i B ($p=0,0079$), te B i C ($p=0,0071$). Krave protokola B imaju najviše vrijednosti progesterona (A 0,2034., B 3,3799 i C 0,4626 ng/mL). Kod krava koje su koncipirale vrijednost progesterona je najniža u protokolu A (1,7461 ng/mL) i postoji tendencija statistički značajnoj razlici ($p=0,075$) od protokola C (4,0572 ng/mL). Koncentracija progesterona u protokolu C se značajno razlikuje ($p=0,0011$) ovisno o uspjehu koncepcije. Tako kod onih koje nisu koncipirale iznosi 0,4626 ng/mL, dok je kod krava koje su koncipirale koncentracija viša, 4,0572 ng/mL.

Tablica 24. Procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 33 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije (vrijednosti obilježene istim slovima se statistički značajno razlikuju., $a=0,0079$, $b=0,0071$, $c=0,075$, $d=0,0011$)

Protokol	CR2	P4 (LSM)	95% CL	
A	0	0,2034 ^a	-1,3506	1,7573
B	0	3,3799 ^{ab}	1,6776	5,0821
C	0	0,4626 ^{bd}	-0,7411	1,6663
A	1	1,7461 ^c	-0,1571	3,6492
B	1	3,0115	0,8139	5,2091
C	1	4,0572 ^{cd}	2,3550	5,7595

Tablica 25. Procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 40 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije (vrijednosti obilježene istim slovima se statistički značajno razlikuju., a=0,0188, b=0,0180)

Protokol	CR2	P4 (LSM)	95% CL	
A	0	1,8181 ^{ab}	-0,8273	4,4636
B	0	2,7914	-0,4375	6,0204
C	0	5,9760 ^b	3,8196	8,1323
A	1	6,8774 ^a	3,6373	10,1174
B	1	6,8375	3,0963	10,5788
C	1	3,9648	1,0668	6,8628

Iz Tablice 25. je vidljivo kako je na dan 40 pokusa opažena statistički značajna razlika u koncentraciji progesterona kod krava koje nisu koncipirale u protokolu A i u protokolu C ($p=0,0188$), gdje krave protokola A imaju znatno nižu koncentraciju (1,8181 vs. 5,9760 ng/mL). Također, u protokolu A, ovisno o uspjehu koncepcije postoji statistički značajna razlika ($p=0,018$) u vrijednostima koncentracije progesterona, koja kod krava koje nisu koncipirale iznosi 1,8181 ng/mL dok je kod krava koje su koncipirale viša, 6,8774 ng/mL.

Tablica 26. Procijenjena vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm CL) na dan 42 pokusa po protokolu i uspjehu koncepcije (vrijednosti obilježene istim slovima se statistički značajno razlikuju., $\alpha=0,0715$)

Protokol	CR2	P4 (LSM)	95% CL	
A	0	0,6220	-0,9273	2,1714
B	0	0,3327	-1,2211	1,8865
C	0	1,9238 ^a	0,7676	3,0799
A	1	0,0764	-1,9209	2,0737
B	1	0,3522	-1,6537	2,3581
C	1	0,1484 ^a	-1,4053	1,7022

Tablica 26. prikazuje koncentraciju progesterona na 42 dan pokusa po protokolu. Vidljiva je tendencija statistički značajne razlike u vrijednosti progesterona kod krava u protokolu C ovisno o uspjehu koncepcije ($p=0,0715$), te je ona niža u krava koje su koncipirale (1,9238 vs. 0,1484 ng/mL).

5.13. Uspjeh koncepcije ovisno o vrijednosti koncentracije progesterona na dane početka protokola (-9, 33) i dane osjemenjivanja (9, 42) u pre- i resinkronizacijskom dijelu pokusa

5.13.1. CR1

Na prvi dan pokusa, dan -9, krave smo podijelili u dvije skupine, ovisno o koncentraciji progesterona u krvi: skupina sa nižom razinom ispod 0,5 ng/mL i skupina sa višom razinom iznad 0,5 ng/mL. Uspjeh koncepcije se nije razlikovao između skupina krava sa koncentracijom progesterona manjom ili većom od 0,5 ng/mL na dan -9 pokusa.

Vrijednost progesterona u krvi na dan 9 u prvom, sinkronizacijskom dijelu protokola smo podijelili u dvije grupe: grupa sa niskom razinom progesterona (ispod 1ng/mL u krvi), te grupa sa visokom razinom progesterona u krvi (iznad 1ng/mL). Iako su na uspjeh koncepcije značajno utjecali mliječnost u 100 dana ($p=0,054$), BCS ($p=0,053$) te interakcija protokola i grupe P4 ($p=0,04$), nije bilo značajne razlike u koncepciji između grupa. Međutim, postoji razlika između krava sa niskim i visokim progesteronom za protokol C, gdje su krave u skupini sa visokim progesteronom imale bolju koncepciju ($p=0,0456$). Nadalje, kod krava sa visokim progesteronom postoji značajna razlika u koncepciji između protokola B i C ($p=0,033$), u korist protokola C.

5.13.2. CR2

Vrijednost progesterona u krvi na dan 33 u drugom, resinkronizacijskom dijelu protokola smo podijelili u tri grupe: grupa sa niskom razinom progesterona (ispod 1ng/mL u krvi), grupa sa srednjom razinom progesterona u krvi ($1\text{ng/mL} < p4 < 4\text{ng/mL}$) te grupa sa visokom razinom progesterona u krvi (iznad 4ng/mL). Tako prikazana razina progesterona je značajno utjecala na uspjeh koncepcije ($p=0,003$). Tendencija značajnoj razlici u koncepciji postoji između grupa A i B ($p=0,08$), dok je značajna razlika u uspjehu koncepcije pronađena u krava iz protokola A sa visokom i niskom razinom progesterona ($p=0,0469$), u korist krava sa visokom razinom. Također, u protokolu C između krava sa visokom i niskom razinom progesterona postoji značajna razlika u uspjehu koncepcije ($p=0,010$), u korist krava sa visokom razinom.

Obzirom da je u protokolu B kod svih krava na dan 42 koncentracije progesterona bila manja od 1ng/mL, nije moguće na gore prikazani način ispitati utjecaj koncentracije na uspjeh koncepcije. Međutim, promatrajući progesteron kao kontinuiranu varijablu i uspoređujući vrijednosti na dan 33 i dan 42 između protokola, ovisno o koncepciji (Tablica 27.), vidljiva je statistički značajna razlika kod krava iz protokola C koje su koncipirale ($p=0,0005$) te je progesteron izrazito viši na dan 33 (16,080 vs. 0,011 ng/mL). U protokolu B kod krava koje nisu koncipirale postoji tendencija statističkoj značajnosti ($p=0,0610$) te je također progesteron viši na dan 33 (1,610 vs. 0,038 ng/mL).

Tablica 27. Vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm 95% CL) na dane 33 i 42 (vrijednosti obilježene istim slovima pokazuju statistički značajne razlike, $a=0,0005$., ili pak tendenciju značajnosti., $b=0,0610$)

Protokol	Dan pokusa	CR2	P4 (LSM)	CL	
A	33	0	0,012	0,001	0,2114
A	33	1	0,861	0,0331	22,3357
A	42	0	0,068	0,0045	1,0314
A	42	1	0,017	0,0005	0,5706
B	33	0	1,610 ^b	0,0875	29,635
B	33	1	1,794	0,04177	77,037
B	42	0	0,038 ^b	0,0025	0,5705
B	42	1	0,049	0,0015	1,652
C	33	0	0,027	0,0034	0,2077
C	33	1	16,080 ^a	0,87439	296,074
C	42	0	0,174	0,0228	0,757
C	42	1	0,011 ^a	0,0007	0,1626

5.14. Usporedba vrijednosti koncentracije progesterona u dane po aplikaciji GnRH i analoga PGF, ovisno o uspjehu koncepcije

Kako bismo i na hormonalnoj razini provjerili uspjeh sinkronizacije, analizirali smo moguće razlike u koncentraciji progesterona na dane -2 i 7, tjedan dana nakon aplikacije GnRH hormona, te na dane 0 i 9, dva dana poslije aplikacije analoga PGF. Progesteron je prikazan kao LSM \pm CL vrijednosti varijable koja je bila transformirana i potom odlogaritmirana na bazi 10 (log10).

Iz Tablice 28. je vidljivo kako u skupini C postoji tendencija statističkoj značajnosti u koncentraciji progesterona između -2 i 7 dana pokusa kod krava koje nisu ($p=0,0643$) i kod krava koje jesu koncipirale ($p=0,0645$). U oba slučaja vrijednost progesterona je viša na dan 7 (0,549 vs. 4,209 ng/mL za dane -2 i 7 kod krava koje nisu, te 0,518 vs. 26,70 ng/mL za krave koje jesu koncipirale). Razlika nije iznenađujuća, obzirom da su krave u protokolu C tek na dan 0 primile prvu aplikaciju GnRH, bez prethodne presinkronizacije.

Tablica 28. Vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm 95% CL) na dane -2 i 7, sedam dana poslije aplikacije GnRH (vrijednosti obilježene istim slovima pokazuju tendenciju statistički značajne razlike., $a=0,0643$., $b=0,0645$)

Protokol	Dan pokusa	CR1	P4 (LSM)	CL	
A	-2	0	1,075	0,02	11,452
A	-2	1	5,139	0,131	200,86
A	7	0	7,374	2,269	23,949
A	7	1	3,406	0,549	21,13
B	-2	0	1,231	0,081	18,646
B	-2	1	0,774	0,043	13,807
B	7	0	9,943	2,735	36,132
B	7	1	1,999	0,513	7,791
C	-2	0	0,549 ^a	0,066	4,556
C	-2	1	0,518 ^b	0,008	31,225
C	7	0	4,209 ^a	1,468	12,072
C	7	1	26,700 ^b	3,471	205,494

Tablica 29. prikazuje vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm 95% CL) dva dana poslije aplikacije analoga PGF, na dane 0 i 9. Statistički značajna razlika je opažena kod krava

koje nisu koncipirale u protokolu A i u protokolu C. Kad je riječ o protokolu A, vrijednost progesterona je značajno viša ($p=0,0073$) na dan 9, poslije druge aplikacije PGF, nego na dan 0, poslije prve (0,007 vs. 0,137 ng/mL). U protokolu C, sukladno očekivanjima, na dan 9 je progesteron značajno niži ($p=0,0002$) nego na dan 0 (0,775 vs. 0,022 ng/mL).

Tablica 29. Vrijednost koncentracije progesterona (LSM \pm 95% CL) na dane 0 i 9, dva dana poslije aplikacije PGF (vrijednosti obilježene istim slovima pokazuju tendenciju statistički značajne razlike., $a=0,0073$., $b=0,0002$)

protokol	Dan pokusa	CR1	P4 (LSM)	CL	
A	0	0	0,007 ^a	0,001	0,0487
A	0	1	0,005	0,0002	0,09
A	9	0	0,137 ^a	0,033	0,575
A	9	1	0,009	0,001	0,083
B	0	0	0,032	0,004	0,242
B	0	1	0,007	0,001	0,066
B	9	0	0,078	0,017	0,351
B	9	1	0,011	0,002	0,052
C	0	0	0,775 ^b	0,148	4,062
C	0	1	0,560	0,023	13,867
C	9	0	0,022 ^b	0,006	0,076
C	9	1	0,300	0,027	3,258

5.15. Razlika u koncentraciji progesterona na dan osjemenjivanja kod krava koje su koncipirale u pre- i resinkronizacijskom dijelu pokusa

Statistička analiza usporedbe vrijednosti progesterona na dan 9 kod krava koje su koncipirale u presinkronizacijskom dijelu pokusa sa vrijednošću progesterona na dan 42 kod krava koje su koncipirale u resinkronizacijskom dijelu pokusa nije pokazala značajnost po protokolu.

Tablica 30. Srednja vrijednost ispitivanih parametara prikazana kao LSM i 95 % CL, uz referentne vrijednosti ispitivanih parametara (vrijednosti obilježene istim slovima se statistički značajno razlikuju., a=0,0306., b=0,0065., c=0,0371)

PARAMETAR	PROTOKOL	LSM	95 % pouzdansti	interval	referentne vrijednosti	jedinica	
BILIRUBIN	A	4.68	2.59	6.76	8.60	μmol/L	
	B	2.86	0.66	5.06	8.60	μmol/L	
	C	3.69	1.49	5.88	8.60	μmol/L	
KOLESTEROL	A	4.27 ^a	3.27	5.27	2.30	4.70	mmol/L
	B	3.40 ^b	2.27	4.52	2.30	4.70	mmol/L
	C	6.03 ^{ab}	5.00	7.05	2.30	4.70	mmol/L
GLUKOZA	A	3.51	3.20	3.81	2.50	4.20	mmol/L
	B	3.52	3.18	3.86	2.50	4.20	mmol/L
	C	3.58	3.27	3.89	2.50	4.20	mmol/L
UREJA	A	5.64	4.70	6.59	4.10	5.80	mmol/L
	B	5.61	4.52	6.70	4.10	5.80	mmol/L
	C	6.66	5.67	7.64	4.10	5.80	mmol/L
KREATININ	A	82.34	62.79	101.88		133.00	μmol/L
	B	64.23	42.33	86.13		133.00	μmol/L
	C	73.29	52.82	93.76		133.00	μmol/L
TP	A	84.16	77.32	91.00	60.00	80.00	g/L
	B	79.31	71.62	87.00	60.00	80.00	g/L
	C	84.66	77.61	91.70	60.00	80.00	g/L
ALBUMINI	A	34.93	31.71	38.16	30.00	36.00	g/L
	B	33.68	30.09	37.27	30.00	36.00	g/L
	C	34.77	31.43	38.10	30.00	36.00	g/L
AST	A	108.14	78.29	137.99		123.00	U/L
	B	107.09	73.40	140.77		123.00	U/L
	C	139.13	108.57	169.69		123.00	U/L
ALT	A	35.79 ^c	28.12	43.47		25.00	U/L
	B	41.54	33.01	50.07		25.00	U/L
	C	48.49 ^c	40.66	56.32		25.00	U/L
GGT	A	30.58	16.56	44.60		38.00	U/L
	B	30.17	14.18	46.16		38.00	U/L
	C	38.65	24.18	53.13		38.00	U/L

5.16. Analiza biokemijskih parametara

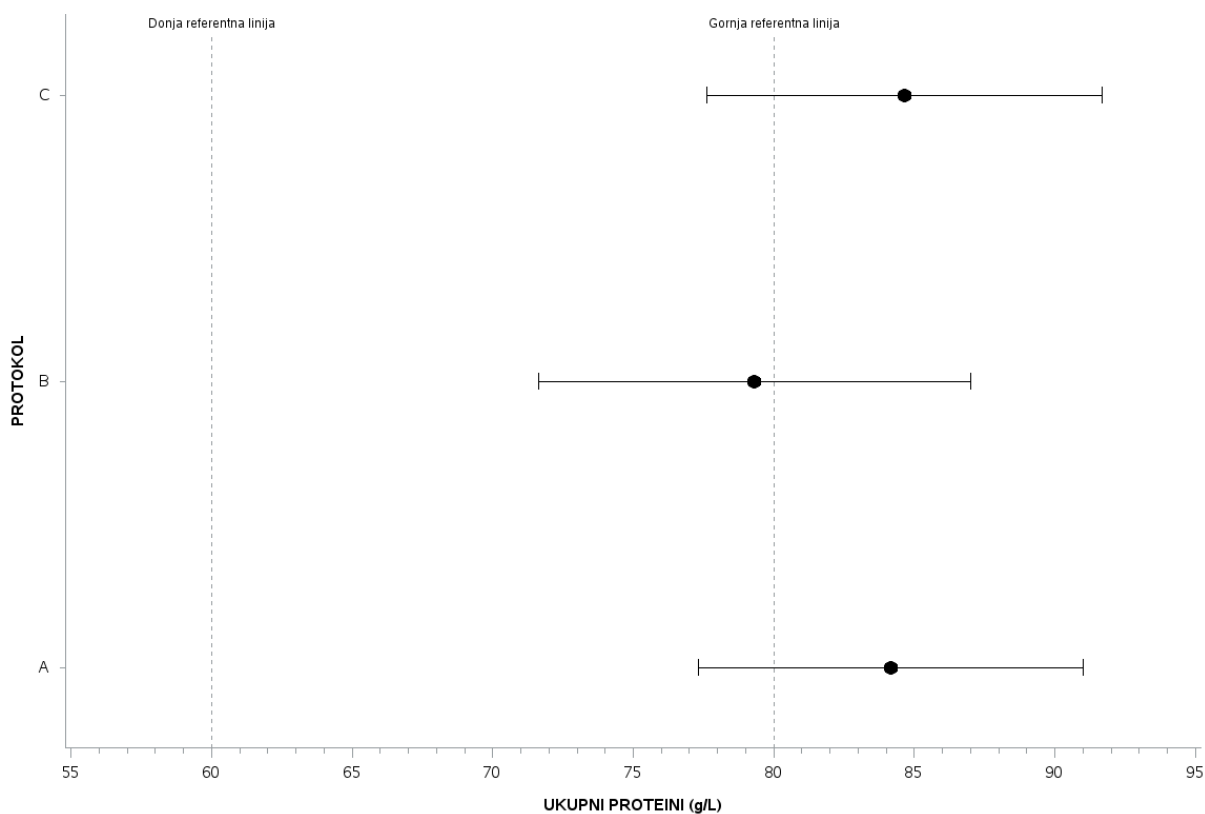
U Tablici 30. su prikazane srednje vrijednosti ispitivanih parametara (kao LSM i 95 % interval pouzdanosti) za svaki protokol, uz referentne vrijednosti sukladno Laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

5.16.1. Parametri energetskeg i metabolizma bjelančevina (ukupne bjelančevine, albumini, ureja, kreatinin i glukoza)

Vrijednosti koncentracija pokazatelja energetskeg i metabolizma bjelančevina u krvi krava nisu međusobno statistički značajno različite između protokola. Tablica 31. prikazuje koncentraciju ukupnih bjelančevina i albumina u krvi (izraženu kao LSM uz 95% intervale pouzdanosti). Iz Tablice 31. je vidljivo kako je statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih bjelančevina između krava sa tjelesnom kondicijom ispod 2,5 od onih sa iznad 2,5 ($p=0,0492$), te kako krave čija je tjelesna kondicija ispod 2,5 imaju povišenu vrijednost ukupnih bjelančevina (>80 g/L). Isto vrijedi i za multipare u odnosu na primipare, s napomenom da razlika u koncentraciji ima tendenciju statističke značajnosti ($p=0,0656$). Multiparnim kravama koncentracija ukupnih bjelančevina također prelazi referentnu gornju vrijednost od 80 g/L.

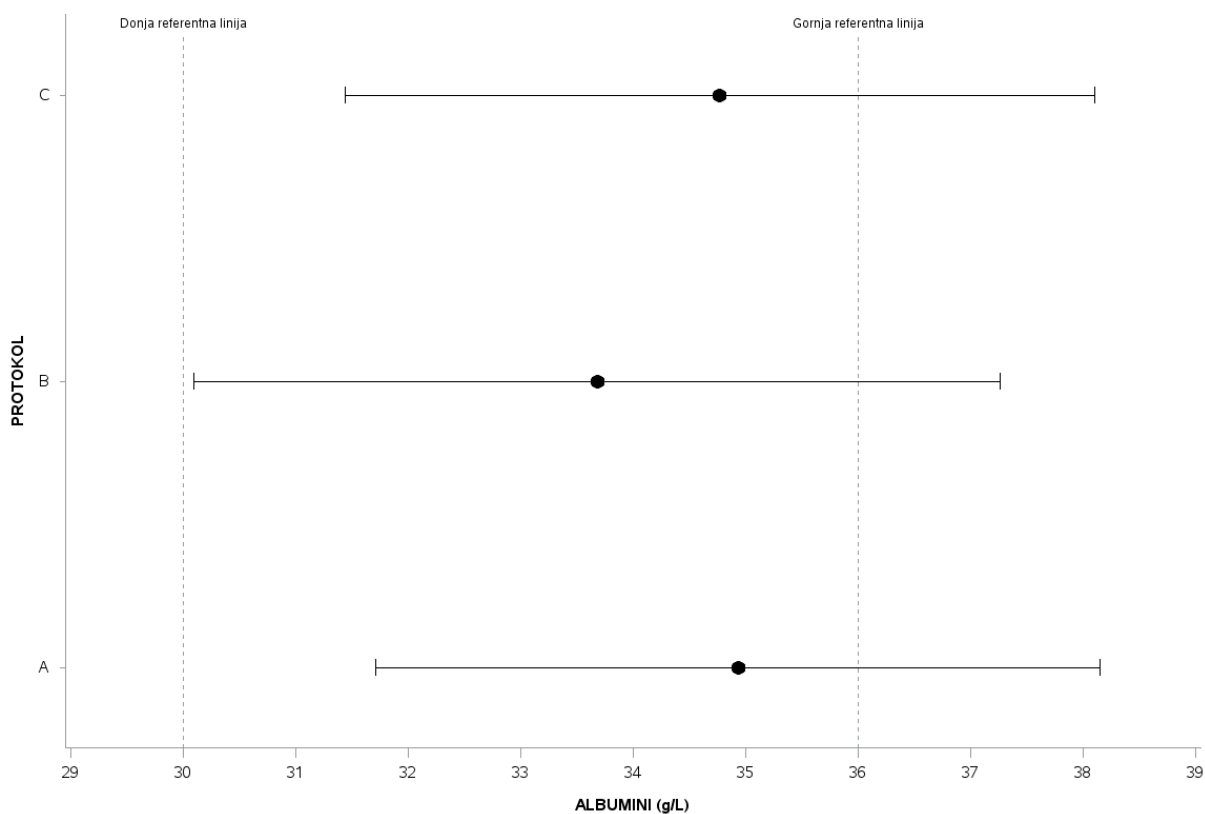
Tablica 31. Koncentracija ukupnih bjelančevina i albumina u krvi (g/L) krava prikazana kao LSM i 95% CL (vrijednosti označene istim slovima se statistički značajno razlikuju., $a=0,0492$., $b=0,0656$., $c=0,0005$., $d=0,0170$)

	UKUPNE BJELANČEVINE		ALBUMINI	
	LSM	CL	LSM	CL
BCS \leq 2,5	85,03 ^a	79,94-90,30	33,00 ^c	30,81-35,19
BCS $>$ 2,5	80,39 ^a	76,94-83,83	35,92 ^c	34,10-37,74
Multipare	84,94 ^b	79,76-90,11	33,54 ^d	31,37-35-72
Primipare	80,48 ^b	76,78-84,17	35,37 ^d	33,51-37,24



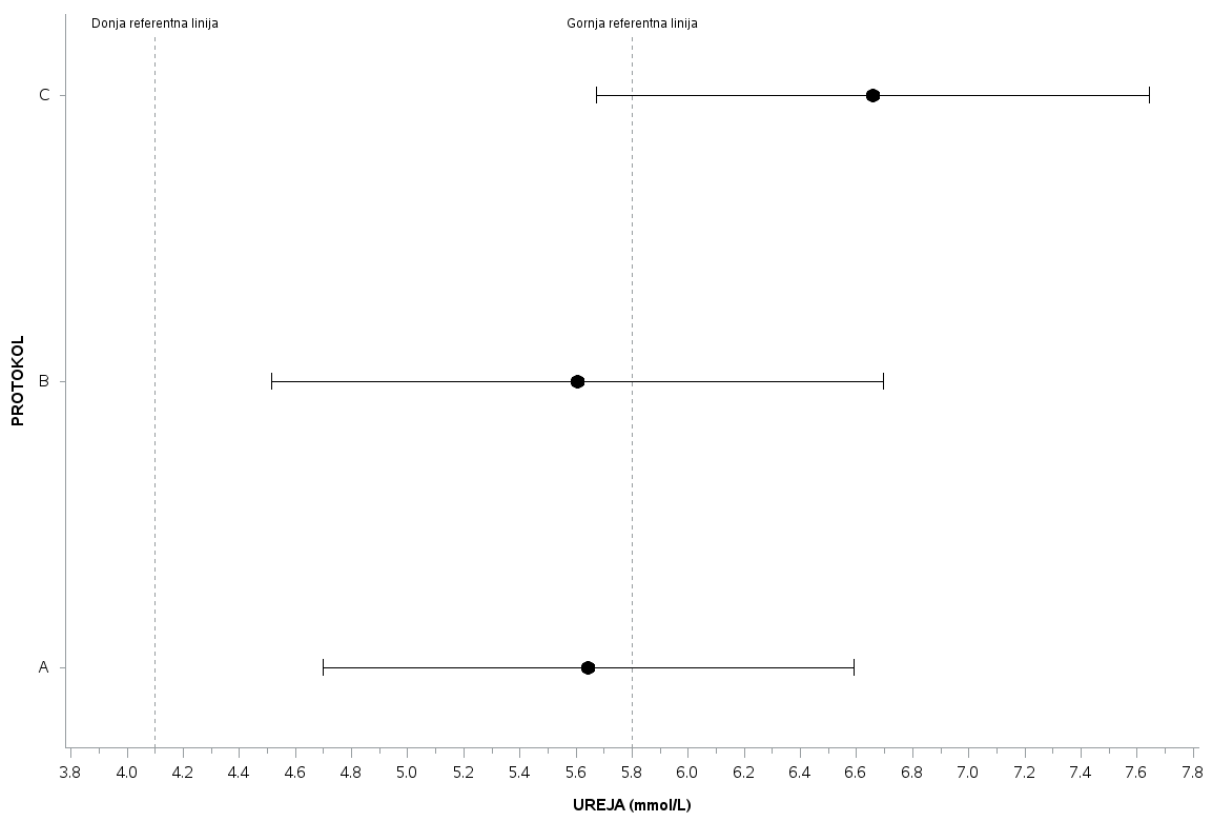
Slika 29. Koncentracija ukupnih bjelančevina u krvi (g/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti.

Iz slike 29. je vidljivo kako kod krava u protokolima A i C vrijednost ukupnih bjelančevina u krvi prelazi gornju granicu fizioloških vrijednosti, dok se kod krava u protokolu B ta vrijednost nalazi u fiziološkim okvirima ali neposredno ispod gornje granice.



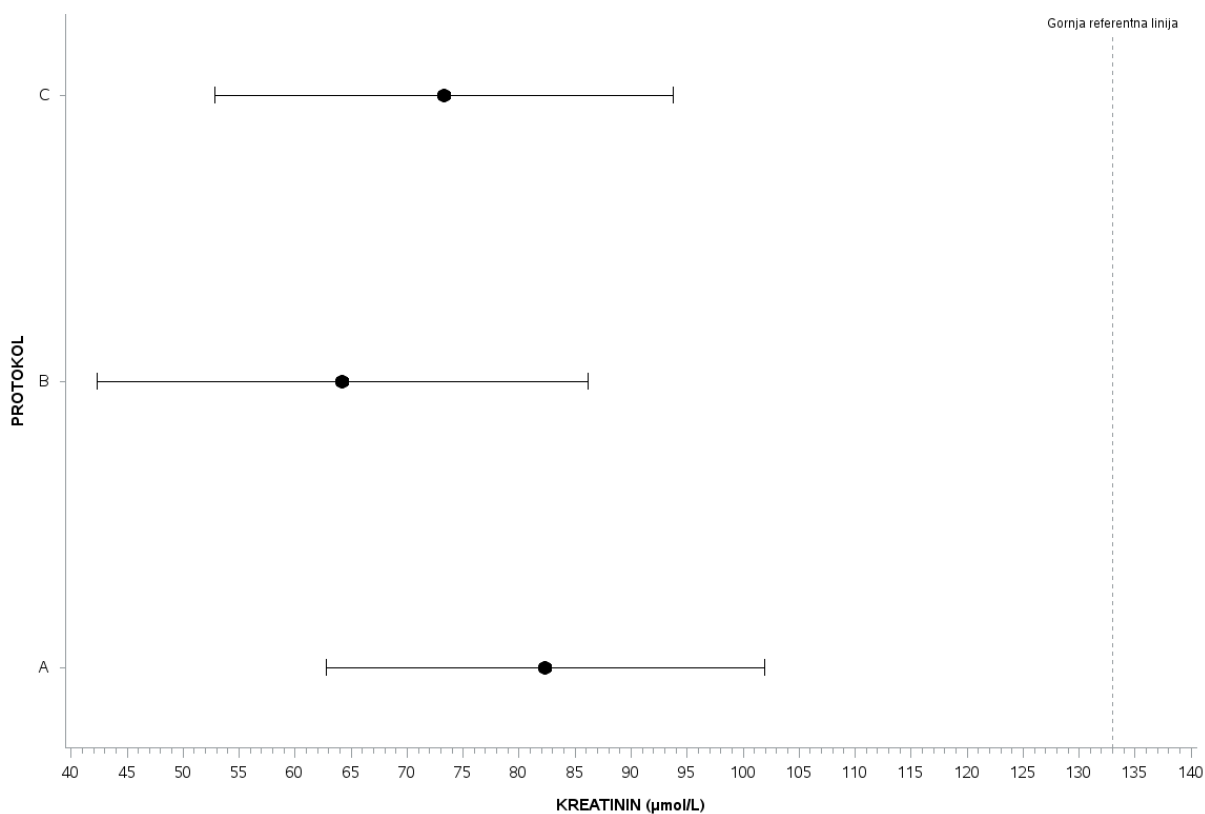
Slika 30. Koncentracija albumina u krvi (g/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti.

Slika 30. prikazuje koncentraciju albumina u krvi. Vrijednosti albumina u svim grupama su unutar fizioloških granica.



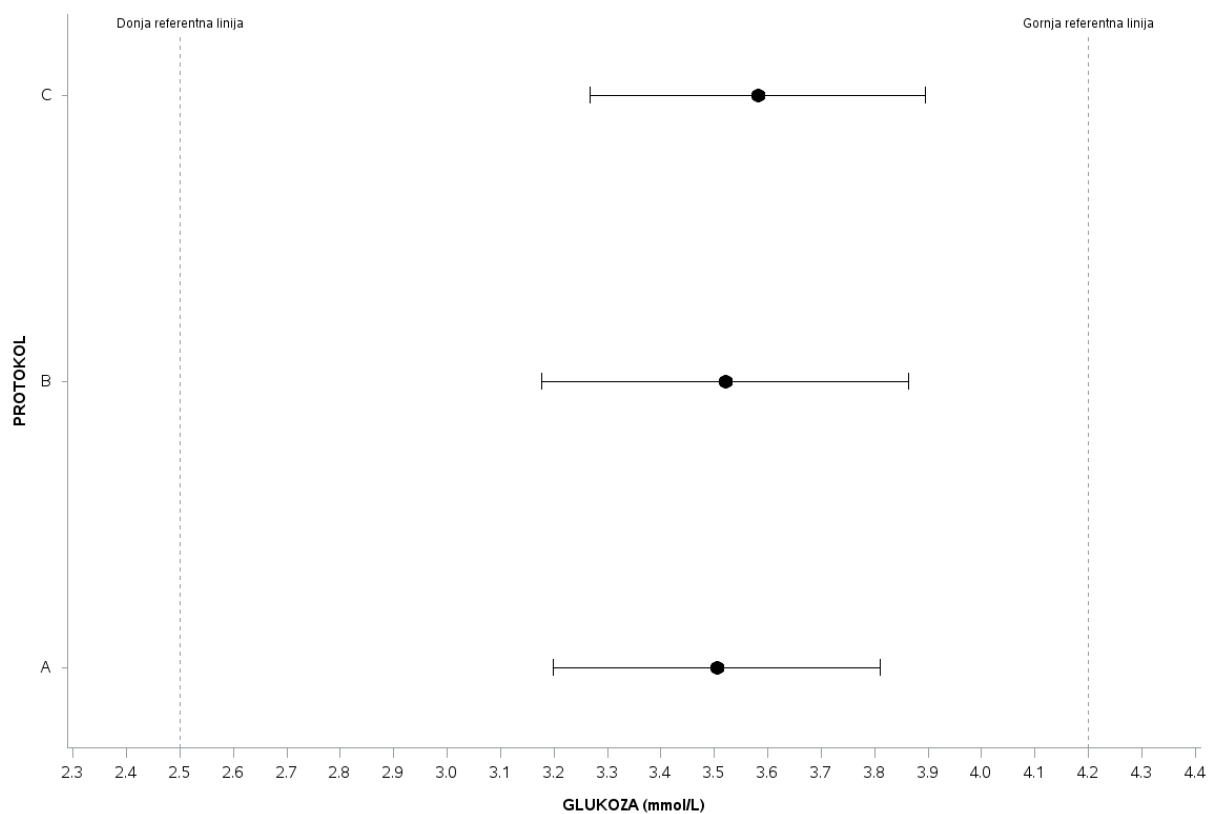
Slika 31. Koncentracija ureje u krvi (mmol/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti.

Na Slici 31. je prikazana koncentracija ureje u krvi (mmol/L). Iako vrijednost ureje u protokolu C premašuje gornju fiziološku granicu, nema značajne razlike među grupama.



Slika 32. Koncentracija kreatinina u krvi ($\mu\text{mol/L}$) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti.

Na Slici 32. vidimo srednju vrijednost koncentracije kreatinina ($\mu\text{mol/L}$) u krvi. Vrijednost se za sve tri skupine krava kreće unutar fiziološkog raspona.



Slika 33. Koncentracija glukoze u krvi (mmol/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti.

Slika 33. prikazuje koncentraciju glukoze u krvi. Vrijednosti glukoze je unutar fizioloških granica u sve tri skupine krava.

Kad je riječ o koncentraciji albumina u krvi (Tablica 311.) razlika koncentracije ispitivanog parametra je statistički značajno niža u krava sa tjelesnom kondicijom manjo od 2,5 (33,00 vs. 35,92 g/L., $p=0,0005$) te u multiparih krava (33,54 vs. 35,37 g/L., $p=0,0170$). Iako je koncentracija albumina u krvi viša kod krava sa boljom tjelesnom kondicijom i u primiparih krava, nalazi se u fiziološkom rasponu vrijedosti koncentracije albumina za krave (30 do 36 g/L).

Tablica 32. prikazuje koncentraciju glukoze u krvi (mmol/L), prikazanu kao LSM i 95% interval pouzdanosti (CL). Koncentracija se ne razlikuje značajno između krava sa tjelesnom kondicijom manjom i većom od 2,5, te ovisno o paritetu. Kod svih skupina krava se kreće u fiziološkim granicama od 2,5 do 4,2 mmol/L.

Tablica 32. Koncentracija glukoze u krvi (mmol/L) prikazana kao LSM i 95% CL

GLUKOZA		
	LSM	CL
BCS \leq 2,5	3.49	3,24-3,74
BCS $>$ 2,5	3.58	3,43-3,72
Multipare	3.56	3,32-3,80
Primipare	3.5	3,34-3,66

Tablica 33. prikazuje koncentraciju ureje i kreatinina u krvi (izraženu kao LSM uz 95% intervale pouzdanosti). Iz tablice je vidljivo kako nema statistički značajne razlike kod koncentracija ureje, međutim kod krava sa tjelesnom kondicijom ispod 2,5 te multiparih krava vrijednost ureje je povišena (iznad 5,80 mmol/L). Nadalje, Tablica 31. pokazuje kako je koncentracija kreatinina značajno niža kod krava sa slabijom tjelesnom kondicijom (69,22 vs. 77,36 $\mu\text{mol/L}$., $p=0,0196$). Međutim, vrijednost koncentracije je unutar fizioloških granica (do 133 $\mu\text{mol/L}$).

Tablica 33. Koncentracija ureje (mmol/L) i kreatinina u krvi ($\mu\text{mol/L}$) krava prikazana kao LSM i 95% CL (vrijednosti označene istim slovima se statistički značajno razlikuju., $\alpha=0,0196$)

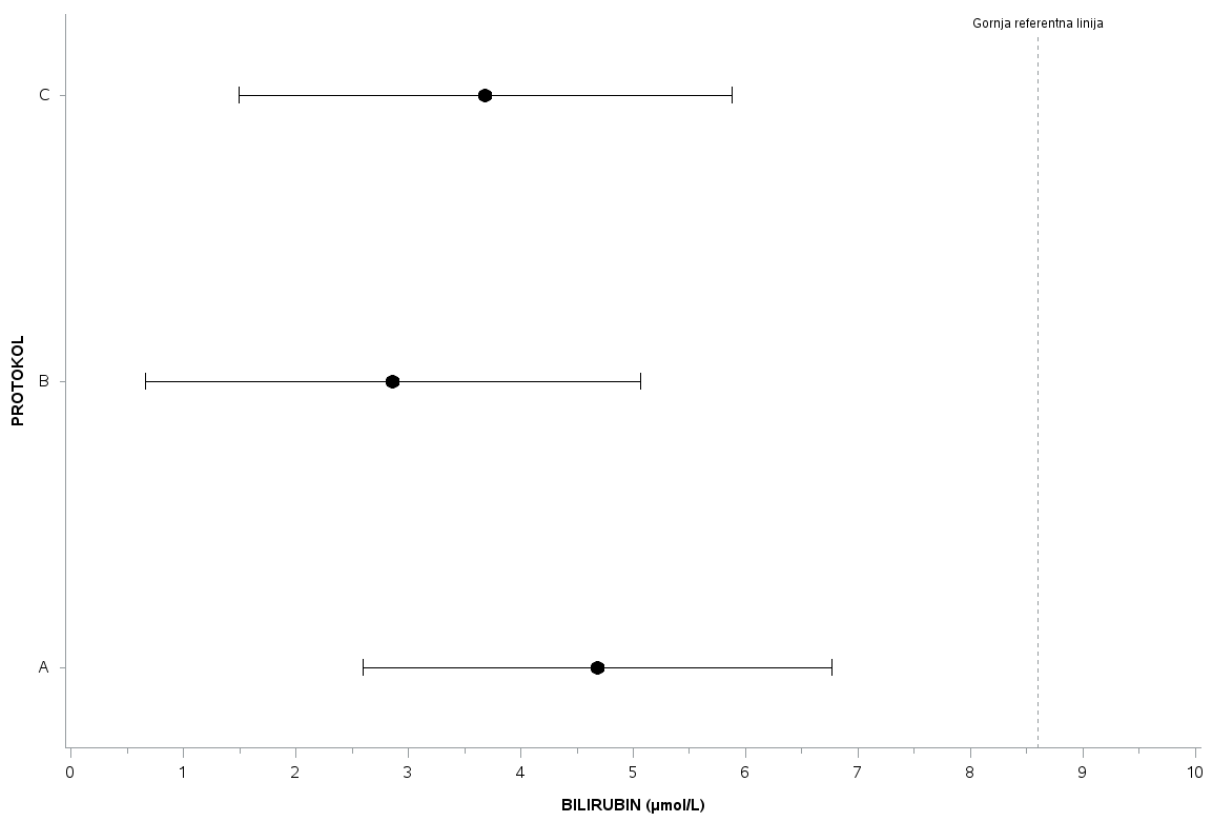
	UREJA		KREATININ	
	LSM	CL	LSM	CL
BCS \leq 2,5	6.26	5,46-7,07	69,22 ^a	56,40-82,04
BCS $>$ 2,5	5.67	5,24-6,09	77,36 ^a	65,90-88,81
Multipare	6.29	5,50-7,07	74.52	61,78-87,26
Primipare	5.64	5,16-6,13	72.05	60,44-83,66

5.16.2. Enzimi i jetreni markeri (bilirubin, kolesterol, ALT, AST i GGT)

Rezultati dobiveni analizom kolesterola iz krvi krava pokazuju kako se koncentracija kolesterola kod krava (Tablica 30.) iz protokola C se značajno razlikuje od krava u protokolu B ($p=0,0065$) i protokolu A ($p=0,0306$) (A 4,27 mmol/L., B 3,40 mmol/L., C 6,03 mmol/L.). Nadalje, kolesterol je značajno viši u primiparih nego multiparih krava (5,17 vs. 3,96 mmol/L., $p=0,004$), kao što je vidljivo u Tablici 34. Kod primiparih krava je koncentracija kolesterola povišena i prelazi gornju fiziološku granicu od 4,7 mmol/L. Koncentracija bilirubina je unutar fiziološkog raspona za krave i nema razlike u vrijednosti između protokola, a značajno je viši kod krava sa slabijom od krava sa boljom tjelesnom kondicijom (3,95 vs. 3,53 $\mu\text{mol/L.}$, $p=0,0199$).

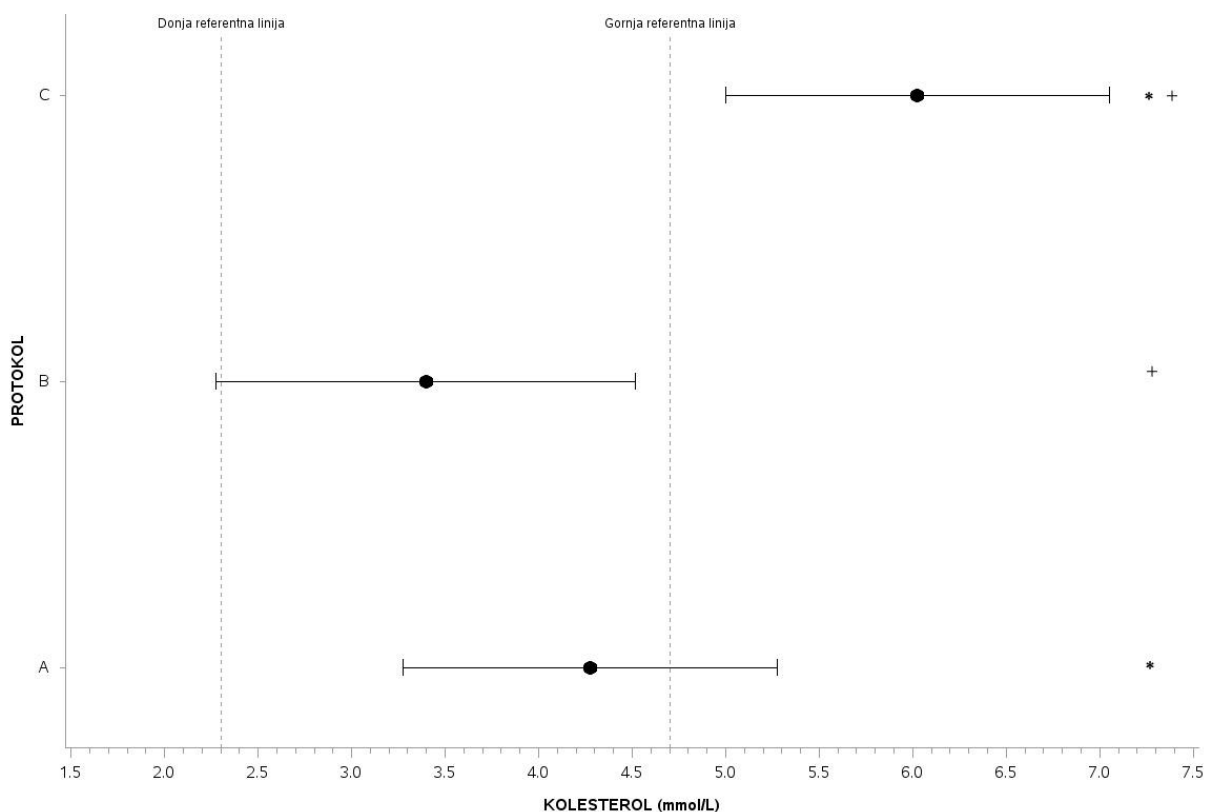
Tablica 34. Koncentracija kolesterola (mmol/L) i bilirubina u krvi ($\mu\text{mol/L}$) krava prikazana kao LSM i 95% CL (vrijednosti označene istim slovima se statistički značajno razlikuju., $a=0,004$., $b=0,0199$)

	KOLESTEROL		BILIRUBIN	
	LSM	CL	LSM	CL
BCS \leq 2,5	4.48	3,69-5,28	3,95 ^b	2,68-5,23
BCS $>$ 2,5	4.65	4,16-5,13	3,53 ^b	2,29-4,76
Multipare	3,96 ^a	3,18-4,74	3.64	2,37-4,90
Primipare	5,17 ^a	4,64-5,70	3.88	2,60-5,09



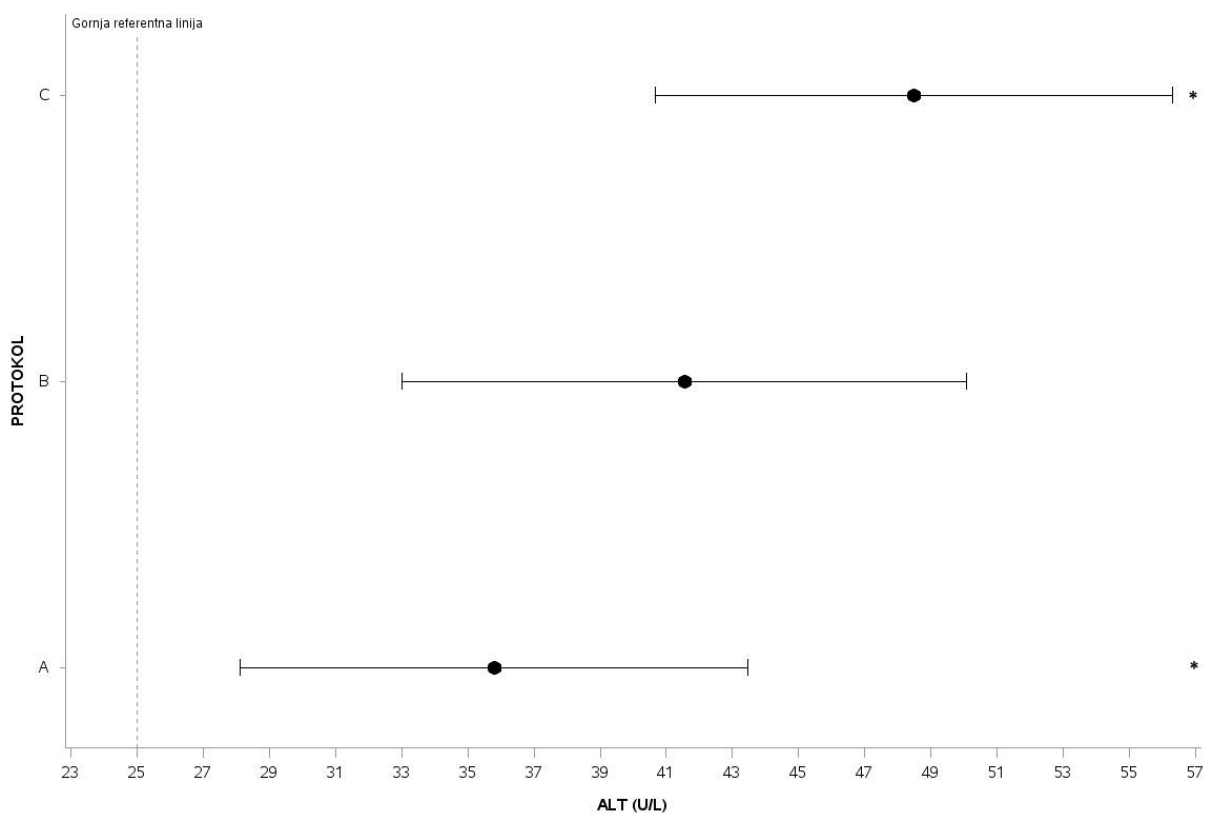
Slika 34. Koncentracija bilirubina u krvi ($\mu\text{mol/L}$) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti.

Na slici 34. je prikazana koncentracija bilirubina u krvi, i vidljivo je kako je kod svih skupina ta vrijednost unutar fiziološkog raspona.



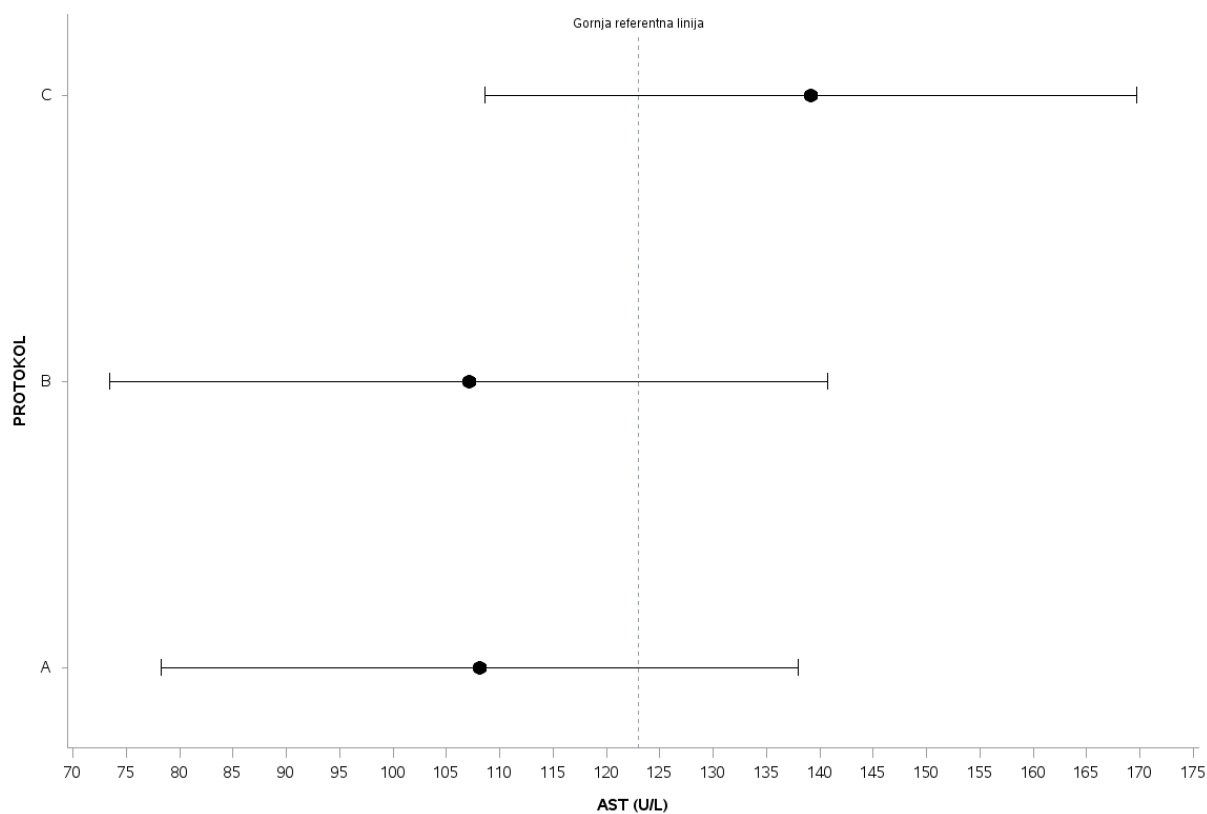
Slika 35. Koncentracija kolesterola u krvi (nmol/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti (grupe obilježene istim simbolima se statistički međusobno razlikuju, * $p=0,0306$., + $p=0,0065$)

Na slici 35. je prikazana vrijednost kolesterola u krvi. Kravama iz protokola C koncentracija kolesterola prelazi gornju fiziološku granicu, te se značajno razlikuje od koncentracije kolesterola u krava u skupini A ($p=0,0306$) te od krava u skupini B ($p=0,0065$). Između krava u skupinama A i B nema razlike.



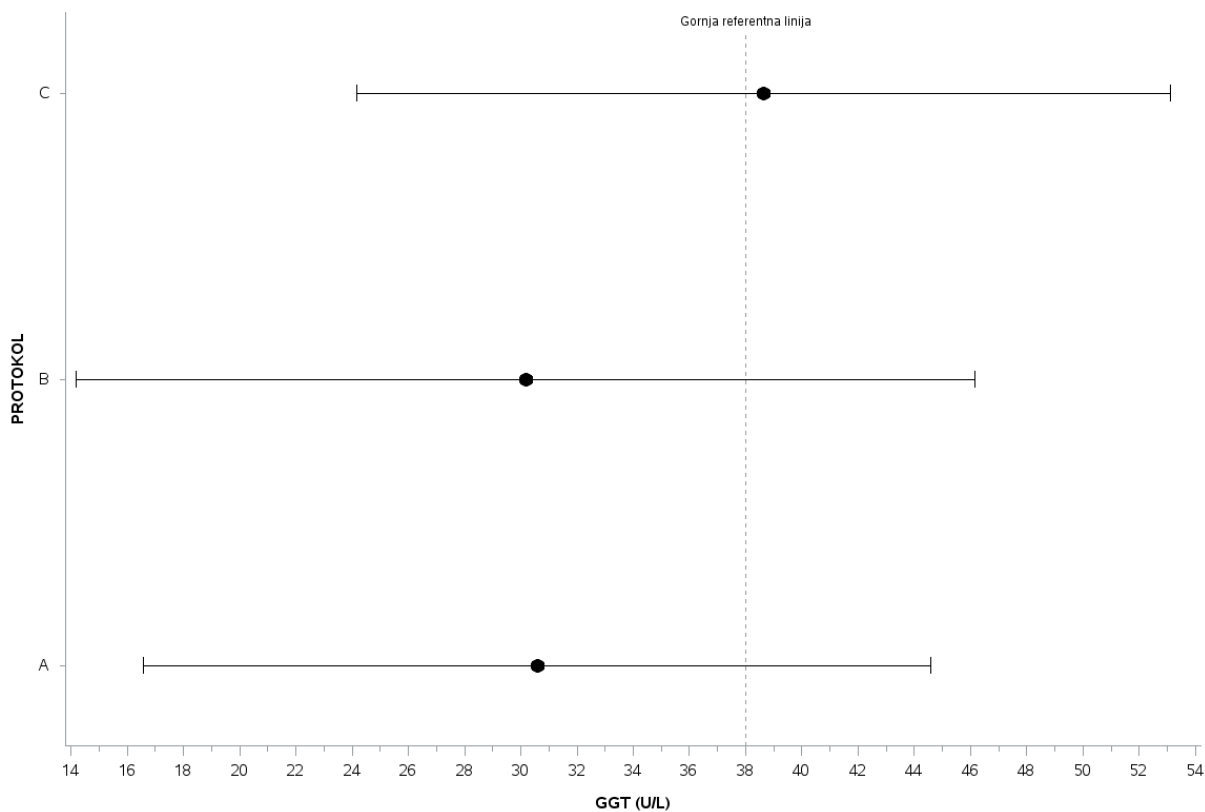
Slika 36. Koncentracija ALT u krvi (U/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti (* označava grupe koje se statistički značajno razlikuju, $p=0,0371$)

Na slici 36. je vidljivo kako je koncentracija enzima alanin aminotransferaze povišena u sve tri skupine životinja. Nadalje, skupina C se značajno razlikuje od skupine A ($p=0,0371$).



Slika 37. Koncentracija AST u krvi (U/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti

Slika 37. prikazuje vrijednosti enzima aspartat aminotransferaze u krvi. Na slici je vidljivo kako je u skupinama A i B ta vrijednost unutar fiziološkog raspona, dok kod krava u skupini C vrijednost prelazi fiziološku granicu.



Slika 38. Koncentracija GGT u krvi (U/L) prikazana kao LSM i 95% interval pouzdanosti.

Iz slike 38. je vidljivo kako je koncentracija gama-glutamil transferaze kod krava u protokolika A i B unutar fizioloških granica, dok je kod protokola C samo blago povišena. Nema značajne razlike u njoj koncentraciji između ispitivanih skupina krava.

Kad je riječ o vrijednosti ispitivanih jetrenih enzima, dobiveni podaci ne pokazuju razliku u koncentraciji AST i GGT u krvi između protokola, dok se koncentracija ALT u krvi kod krava iz protokola C značajno razlikuje od krava u protokolu A ($p=0,0371$ (A 35,79 U/L, B 41,54 U/L, C 48,49 U/L).

Tablica 35. prikazuje vrijednosti enzima AST, ALT i GGT u krvi (LSM i 95% interval pouzdanosti). Iz tablice 35. je vidljivo kako se vrijednost AST i GGT ne razlikuju ovisno o paritetu ili tjelesnoj kondiciji, te su unutar fizioloških granica (Tablica 30.), dok je vrijednost ALT povišena i kod svih prelazi 25 U/L. Nadalje, koncentracija ALT je viša u krava sa tjelesnom kondicijom iznad 2,5 i pokazuje tendenciju statistički značajne razlike u odnosu na krave čija je tjelesna kondicija ispod 2,5 (44,17 vs. 39,72 U/L., $p=0,0893$).

Tablica 35. Koncentracija enzima AST, ALT i GGT (U/L) u krvi krava prikazana kao LSM i 95% CL (vrijednosti označene istim slovima pokazuju tendenciju statistički značajne razlike., $a=0,0893$)

	AST		ALT		GGT	
	LSM	CL	LSM	CL	LSM	CL
BCS \leq 2,5	113.48	88,91-138,05	39,72 ^a	33,84-45,62	31.76	20,01-43,52
BCS $>$ 2,5	122.76	109,11-136,41	44,17 ^a	40,34-47,97	34.5	28,17-40,83
Multipare	115.36	91,38-139,33	41.08	35,32-46,86	34.43	22,97-45,90
Primipare	120.88	105,55-136,22	42.79	38,68-46,90	31.83	24,65-39,01

6. RASPRAVA

Povijesno gledano, niski postotak koncepcije rezultirale su velikim pomacima u reprodukcijskom menadžmentu u mliječnom govedarstvu na cjelokupnoj svjetskoj razini. Sva nastojanja poboljšanja reprodukcijskih rezultata dovela su do efikasnijih postupaka sinkroniziranog rasplodivanja, sa inseminacijom nakon detekcije estrusa, ali i još modernijih, sa fiksnim vremenom osjemenjavanja (LUCY i sur., 1986.; ARCHIBALD i sur., 1992.; GEREŠ, 2001., 2003.). Reprodukcijska predstavlja najvažniji aspekt uspješnog mliječnog govedarstva. Sve je usmjereno povećanju proizvodnje kao najvažnijoj komponenti profita, pri čemu se nerijetko zaboravlja da upravo reprodukcija najdirektnije utječe na mliječnost. Logično da je cilj što ranije postići novu steonost jer će to povećati ukupno trajanje laktacije ali ne i međutelidbenog razdoblja. Skratiti razdoblje prije početka rasplodivanja osnovni je preduvjet profitabilnosti. Kako bi se to postiglo neophodna je primjena sinkronizacijskih programa. Prosječna vrijednost nove steonosti je 278 USA\$ (DE VRIES, 2006.). Optimalno međutelidbeno razdoblje je 13 mjeseci i u obrnutoj je korelaciji sa prosječnim trajanjem laktacije. Spolni ciklus predstavlja niz zbivanja koja prethode gestaciji, pa je tako i kontrolirano rasplodivanje složen niz postupaka kojima se mora voditi računa o svim fazama i interakcijama. Iako je puno protokola u sinkronizaciji estrusa i ovulacije izbor najboljega nije uvijek jednostavan (GEREŠ i sur., 2012; ŠPOLJARIĆ i sur., 2013.). Sinkronizaciju estrusa valja shvatiti kao manipulaciju procesima reprodukcije kako bi krave bile fertile, u prihvatljivom terminu i u planiranom razdoblju. Time se ujedno reducira rad potreban za detekciju estrusa i djeluje po rasporedu. Ukoliko glavnina stada može uspješno biti inducirana farmer može planirati umjetno osjemenjivanje u fiksno vrijeme. Naravno ti protokoli nisu za svakog farmera već za školovanog i u bliskoj suradnji sa veterinarom, stručnjakom za reprodukciju (GEREŠ, 2004., ZOBEL i sur., 2008., 2013., GEREŠ i sur., 2014.).

Zbog sve nezadovoljavajućih reprodukcijskih rezultata kontrolirano rasplodivanje se nametnulo kao nezaobilazni dio reprodukcijskog i uzgojnog menadžmenta. Kako bi se reprodukcijska učinkovitost unaprijedila, sve više se primjenjuju protokoli kojima se sinkronizira folikularna dinamika, regresija žutog tijela, ovulacija i fiksno vrijeme inseminacije jer je sve manje krava sa detektabilnim estrusima (COLAZO i AMBROSE, 2013.). Reproductivna učinkovitost je ključ uspjeha budući sustavi menadžmenta dulji od 13-14 mjeseci nisu profitabilni (LARSON i BALL, 1992.; NEBEL i JOBST, 1998.; GEREŠ, 2004.). Produljeno vrijeme uspostave poslijeporodne cikličke aktivnosti, loša detekcija estrusa,

nemanifestni estrusi, pogrešno vrijeme osjemenjavanja kao i premećaji tijekom poslijeporodnog razdoblja, nesumnjivo snižavaju učinkovitost (LUCY, 2001.). I zbog fiziologije, a posebice zbog nabrojanih kolateralnih razloga, prilično su košmarni uvjeti u razdoblju od telenja do naredne koncepcije (THATCHER i sur., 2002.; WILTBANK i sur., 2002.). Reproductivne performace uvjetuju profitabilnost mliječnog govedarstva jer najdirektnije uvjetuju proizvodnju mlijeka, izlučenja, međutelidbenog razdoblja, budući je proizvodni kapacitet (proizvodnja) mliječne krave zadovoljavajući pod uvjetom da su im uvjeti dobri. Veza između menadžmenta i reprodukcije je izravna jer su reproduktivni rezultati i profit samo pozitivan odgovor na kvalitetno poslijeporodno razdoblje, a tome doprinse i postupci kontroliranog rasplodivanja, tj. rutinske primjene farmakoloških procedura u pojedinačnih, a posebice u skupina plotkinja (BRITT, 1985.).

Istraživanje predstavlja, u našim uvjetima najsloženiji pristup indukcijskim (sinkronizacijskim) protokolima. Presinkronizacijski protokoli još nisu općeprihvaćena metoda. Upravo stoga bilo je izazovno provjeriti i usporediti rezultate našeg istraživanja sa podacima iz literature. Svakako, valja naglasiti i u našem okruženju dokazati kako postoje efikasniji sustavi od temeljnog Ovsyncha. Opravdanje je nesumnjivo ne samo u rezultatima nego i činjenici da se predprotokolima, koji prethode Ovsynchu, puno efikasnije, točnije i uz manju pogrešku sinkroniziraju faze spolnog ciklusa čime se, naravno, poboljšava plodnost. Intencija je dokazati kako su složeni protokoli efikasniji te kako postoji potreba njihovog uvođenja (MOREIRA i sur., 2001.; GEREŠ i sur., 2014.). Istraživanje je izvedeno na komercijalnoj farmi gdje su se učinci dva modificirana složena (presinkronizacijska) protokola komparirali sa učinkom standardnog Ovsyncha (PURSLEY i sur., 1995.). Skupine A i B su bile podvrgnute presinkronizacijskim protokolima, dok je skupina C bila kontrolna, i tretirana standardnim sinkronizacijskim protokolom Ovsynch. Ovsynch protokol ima sljedeće faze: a) aplikacija sintetskog analoga GnRH dana 0., sintetskog analoga PGF2 α dana 7., sintetskog analoga GnRH dana 9., te dvokratnog umjetnog osjemenjivanja u fiksno vrijeme, 6 i 24 h po zadnjoj aplikaciji GnRH. Većina protokola koji koriste umjetno osjemenjivane u fiksno vrijeme rezultiraju slabijim postotkom koncepcije. Stoga autori sugeriraju dvokratno umjetno osjemenjanje što je i prakticirano u recentnom istraživanju (CHEBEL i sur., 2003.; FRICKE i sur., 2003.; NOAKES, 2009.; ŠPOLJARIĆ i sur., 2013.). U prvoj skupini (A) se primjenjivala presinkronizacija aplikacijom sintetskog analoga GnRH -9. dana (nulti dan se smatra dan kada počinje Ovsynch protokol), potom sintetskog analoga PGF2 α -2. dan i 0. dan se počelo sa standardnim Ovsynch protokolom. U drugoj skupini (B) se koristila presinkronizacija

jednokratnom aplikacijom sintetskog analoga PGF2 α -2. dan i 0 dan se počeo standardnim Ovsynch protokolom. Sve krave su bile osjemenjene dvokratno, 6 i 24 h nakon druge aplikacije sintetskog analoga GnRH u Ovsynch protokolu duboko smrznutim sjemenom bika odabranog od strane upravitelja farme. Prema GALVÃO i sur. (2007.) kraći složeni protokoli su efikasniji od duljih. U recentnom istraživanju to je potvrđeno jer je iz Tablice 11. vidljivo da je postotak koncepcije viši kod primjene protokola B (47,37 %), nego protokola A (29,41 %), što teži statistički značajnoj razlici ($p=0,0941$), ali koncepcija je u oba protokola viša nego kod Ovsynch protokola (C, 21,05 %) što je očit dokaz da su složeni protokoli efikasniji (NAVANUKRAW i sur., 2004.). U našem istraživanju krave iz skupine A su imale 1,56 puta bolju koncepciju od krava u skupini C, dok je koncepcija u krava skupine B bila čak 3,37 puta veća.

Istraživanje GUMEN i sur. (2005.) dokazalo je da se u složenim protokolima u kojima se krave tretiraju sa GnRH sedam dana nakon posljednje injekcije prostaglandina postiže jako stimulirajuće djelovanje u smislu indukcije ovulacije. To je ujedno dokaz i da je fertilitet (postotak koncepcije) kod Ovsyncha niži jer se jednokratnim postupkom puno neujednačenije sinkronizira ovulacija nego u postupcima gdje se faze indukcije repetiraju, pa je rezultat viša homogenizacija stupnja folikulogeneze, odnosno sinkronizacije ovulacije. To je logično jer krave koje ovuliraju nakon prve injekcije u Ovsynchu imaju viši postotak koncepcije nego one koje nisu ovulirale. Logično je prema tome da će krave u složenim protokolima imati bolji postotak koncepcije jer postoji dodatna prilika, odnosno dodatna aplikacija (GnRH) kojom se folikulogeneza uspješnije homogenizira (VASCONCELOS i sur., 1999.; CERRI i sur., 2005.; BELLO i sur., 2006.; CHEBEL i sur., 2006.). U prilog tome govori i statistički značajna razlika koncentracije progesterona u krvi nultog dana između Ovsyncha i protokola A ($p=0,0002$) te Ovsyncha i protokola B ($p=0,0008$). Upravo 1,56 puta veći postotak koncepcije u skupini A i 3,37 puta u skupini B u odnosu na krave iz skupine C ukazuje da su lošiji rezultati skupine C posljedica terapije započete u različitim, znači i u neadekvatnim razdobljima folikulogeneze odnosno spolnog ciklusa (SOUZA i sur., 2008.; CHEBEL i sur., 2003).. U prilog tome govore i Tablica 21. gdje se vidi značajna razlika u koncentraciji progesterona nultog dana između presinkroniziranih skupina A i B te kontrolne skupine C. Iako smo, sukladno navedenom, inicijalno očekivali bolji uspjeh koncepcije u skupini A, postoji nekoliko razloga za dobiveni rezultat. Naime, skupinu A čine najviše krave u prvoj laktaciji (>80 %) i to od 65 do 190 dana postpartalno. Očigledno je da su neke od njih već bile izložene nekom vidu sinkronizacije, ali bez uspješne koncepcije. Također, naša analiza LH i praćenje vrhunca njegovog izlučivanja je u skupini A pokazalo karakterističnu bifazičnu krivulju. Riječ je o krivulji sa dva prelažanja

referentne granice za vrhunac lučenja, četiri i 12 sati po aplikaciji drugog GnRH u Ovsynchu. Moguće je da je i vrijeme umjetnog osjemenjivanja 6 i 24 sata poslije GnRH trebalo, za ovu skupinu, pomaknuti osam sati kasnije. Tim više, što je u ostalim skupinama predovulatorni vrhunac lučenja LH bio zabilježen četiri (skupina B), a u nekih krava već i nulti sat (skupina C) po aplikaciji GnRH.

Aplikacija GnRH uzrokuje otpuštanje LH iz hipofize. Porast koncentracije LH rezultira ovulacijom ili luteinizacijom dominantnog folikula. Novi „sinkronizirani“ folikularni val nastupa 2-3 dana kasnije. Budući GnRH stimulira razvoj lutealnog tkiva na mjestu dominantnog folikula, većina krava ima dovoljno lutealnog tkiva za odgovor na primjenu prostaglandina sedam dana kasnije. Ta injekcija sinkronizira lutealnu regresiju. Ukoliko aplicirani GnRH ne uzrokuje luteinizaciju folikula, injekcija prostaglandina će ujedno spriječiti manifestaciju estrusa koji bi se fiziološki dogodio. U 5-10 % krava javit će se u tom slučaju manifestni estrus 6-7 dana kasnije (FERNANDEZ i sur., 1996.; GEARY i sur., 1998.), a takve krave u kojih se javio spontani estrus valja osjemeniti.

Posebna pažnja posvećena je učinku progesterona tijekom protokola sa fiksnim vremenom osjemenjavanja u mliječnim krava. Razina cirkulirajućeg progesterona uvjetovana je ravnotežom produkcije progesterona primarno od žutog tijela ali i metabolizmom progesterona iz jetre. Kapacitet lutealnog tkiva u mliječnim krava prvenstveno je odgovoran za sintezu progesterona, ali nedostatna razina može biti posljedica pojačanog jetrenog metabolizma progesterona, npr. u vrijeme negativnog energetskeg balansa. Za vrijeme protokola sa fiksnim vremenom osjemenjavanja porast progesterona načelno je rezultat ovulacije. Snažni porast razine progesterona prije umjetnog osjemenjivanja, u tijeku presinkronizacije povisuje fertilitet, dok slabša koncentracija može dramatično sniziti plodnost, uz neadekvatnu luteolizu unatoč injekciji prostaglandina. U našem istraživanju je koncentracija progesterona na dane 0, 7 i 9 uvijek viša kod krava koje kasnije nisu koncipirale, nego kod krava koje su koncipirale (Tablice 21., 22. i 23.). Cirkulirajući progesteron je nakon osjemenjavanja odlučujući za opstanak graviditeta (WILTBANK i sur., 2011c.). Nedostatna razina progesterona nakon umjetnog osjemenjivanja ozbiljno može reducirati plodnost i velik je problem ne samo kontrolirane reprodukcije u sustavima sa fiksnim vremenom osjemenjavanja već i kod detektiranih estrusa (SOUZA i sur., 2007.). To je naročito izraženo kod Ovsynch protokola gdje je izuzetno visok postotak krava koje nemaju kompletnu regresiju žutog tijela nakon aplikacije prostaglandina (GUMEN i sur., 2003.; SOUZA i sur.; 2007., BRUSVEEN i sur., 2009.; MARTINS i sur., 2011.).

Iako u 90 % tretiranih plotkinja ovulacija nastupi nakon druge injekcije GnRH, nemala je mogućnost da će to rezultirati nastankom slabije potentnog žutog tijela nego nakon spontane ovulacije. Naime, aplicirani GnRH inducira otpuštanje LH ali je trajanje njegovog vrhunca svega 4-5 sati, dakle, nekoliko sati kraće nego kod spontane ovulacije (CHENAULT i sur., 1975.; COLAZO i sur., 2008.). Razlog je u niskoj koncentraciji progesterona. Autori su aplicirali estradiol jer on inducira otpuštanje LH kroz deset sati, što je kompatibilno trajanju otpuštanja endogenog LH (CHENAULT i sur., 1975.; BO i sur., 1994.). Zbog propisa EU i etičkih razloga, ovu modifikaciju Ovsyncha nismo koristili. Niska koncentracija estradiola prije UO (dakle, slaba ekspresija estrusa) naglašena je kod primjene Ovsyncha. To je donekle uspješno prevenirano injekcijama estradiola (SOUZA i sur., 2007.).

Pokušaji povišenja koncentracije LH prije ovulacije sa svinjskim LH donekle su pospješili postotak ovulacija nakon prve aplikacije GnRH, ali, suprotno očekivanjima nisu uzrokovali povišenje razine progesterona (COLAZO i sur., 2009.) što ukazuje na činjenicu da je za lutealnu funkciju odgovoran i neki drugi mehanizam. Reducirana veličina folikula, snižena koncentracija estradiola u plazmi i snižena lutealna funkcija nesumnjivo su razlozi subfertilnosti (AMBROSE i sur., 2008.).

Visoka koncentracija progesterona sedmog dana (posebice razina viša od 3 ng/ml) u vrijeme aplikacije prostaglandina bila je u korelaciji sa višom homogenizacijom (učinkovitijom sinkronizacijom) na prvu aplikaciju GnRH u Ovsynchu. Slično, DENICOL i sur. (2012.) zaključuju da sinkronizacija estrusa i ovulacije mora rezultirati rastom folikula uz koncentraciju progesterona višu od 2 ng/ml. Viši postotak koncepcije pri protokolu A i B može se objasniti upravo činjenicom da je Ovsynch njihov sastavni dio. Dakle upravo Ovsynch nakon pripreme faze povećava broj krava koje ovuliraju u optimalno vrijeme, osigurava povišen postotak plodnosti ali i ujednačeniju disperzivnost razine progesterona nultog dana (BELLO i sur., 2006.; SOUZA i sur., 2007.), a što je u suglasju sa istraživanjem CHEBEL i sur. (2006.), koji također tvrde da je razina progesterona u korelaciji sa plodnošću jer krave sa žutim tijelom na jajniku 0. dana su imale bolju plodnost od onih koje nisu imale žuto tijelo. Isto tako, rezultati istraživanja u podudarnosti su sa istraživanjem BELLO i sur. (2006.) koji su ustanovili da razina progesterona u vrijeme injekcije prostaglandina u sva tri protokola osjetno raste i da je to prognostički dobar pokazatelj plodnosti. Sveukupno to je podudarno i sa zaključkom SOUZA i sur. (2008.) koji tvrde da je fertilitet u svih protokola koji se baziraju na Ovsynchu i/ili na kompleksnim protokolima u mliječnih krava uvjetovan primarnom razinom progesterona prije sinkronizirane ovulacije uz fiksno vrijeme osjemenjavanja, postotkom ovulacije nakon

aplikacije GnRH te povišenom razinom progesterona za vrijeme protokola. Upravo je perzistencija sublutealnih razina progesterona (manjih od 2 ng/ml) razlog smanjenoj plodnosti jer uzrokuje perzistenciju dominantnog folikula (produljen život) i takav folikul teže ovulira u odnosu na mlađi, aktivniji, moćniji. Pretpostavka je da se to događa zbog hormonskog okruženja koje pogoduje perzistenciji (ADAMS i sur., 1992.; MIHM i sur., 1994.; REVAH i BUTLER, 1996.; BRIDGES i FORTUNE, 2003.). Takav folikul protražiranog životnog vijeka, održava visoku produkciju estradiola koja utječe na hormonsko okruženje u jajovodima, folikulima i maternici i ugrožava preživljavanje i razvoj embrija. Zbog toga je produljeno vrijeme ubrzane pulzacije ali i otežan nastup povišene razine LH (KOJIMA i sur., 2003.). Takva stara oocita je prezrela, što rezultira sniženim postotkom fertilizacije i/ili visokim postotkom ranih embrionalnih uginuća (SAVIO i sur., 1993.; CUPP i sur., 1993.; AHMAD i sur., 1995.; MIHM i sur., 1999.). Upravo tim fenomenom objašnjavamo visok postotak koncepcije u skupini B. Nadalje, time se može objasniti i najveća stopa embrionalne smrtnosti u protokolu B (Tablica 12.), koja u prvom dijelu pokusa iznosi 33 %, dok je kod krava sinkroniziranih Ovsynchom u skupini C taj postotak niži, 25 %. Kod krava u skupini A embrionalna uginuća nisu zabilježena. Osim toga, na snimci ultrazvučnog pregleda jajnika (Slika 28) je dobro uočena opisana situacija. Kod krave 716, čak 32 sata nakon druge aplikacije GnRH (u Ovsynchu) veličina folikula ostala je nepromijenjena. Već ovdje uočava se glavni ograničavajući čimbenik Ovsyncha, a to je varijabilnost, neujednačenost sinkronizacijskih faza, zbog čega u više od 30 % tretiranih krava sinkronizacija ne uspijeva, što je učinak sličan onome kada se osjemenjuju krave u neodgovarajuće vrijeme. To se vidi i u Tablici 14., gdje je odstupanje od srednje vrijednosti progesterona (standardna devijacija) kod skupine C nultog dana pokusa veće nego kod skupina A i B, koje su primjenama presinkronizacijskih protokola (GnRH i prostaglandini) dovedene u ujednačenije hormonalno okruženje.

Najvažnija je faza estrusa u kojoj postupak započinje, budući je vjerojatnost koncepcije puno viša u krava u kojih je postupak započeo sredinom ciklusa zbog prisutnosti funkcionalnog žutog tijela koje takvo ostaje kroz sedmodnevni period između prve injekcije GnRH i prostaglandina (DE JARNETTE i sur., 2001.; PETERS i PURSLEY, 2003.). Ovulacija dominantnog folikula nakon prvog GnRH producira novi folikularni val, a dominantni folikul iz tog vala postaje ovulatorni folikul. Nazočnost funkcionalnog žutog tijela pri injekciji prostaglandina reducira pojavu spontane ovulacije prije druge injekcije GnRH (VASCONCELOS i sur., 1999.).

Zbog limitiranosti Ovsynch protokola stvorene su proširene strategije, presinkronizacijski protokoli, koji kontroliraju jajničku funkciju prije primjene samog Ovsyncha (PETERS i PURSLEY, 2003.; DE JARNETTE i MARSHALL, 2003.; LEBLANC i LESLIE, 2003.; EL-ZARKOUNY i sur., 2004.; NAVANUKRAW i sur., 2004.). Najčešće su u svijetu postupci bazirani na aplikaciji prostaglandina kao presinkronizacijskih postupaka. Najveća im je mana što se ne može precizno odrediti vrijeme ovulacijskog odgovora, a frekvencija primjene ograničena je vijekom žutog tijela. Drugi postupci, temeljeni na prethodnoj aplikaciji GnRH doživjeli su brojne modifikacije. Tako su i protokoli u našem istraživanju modifikacija klasičnog Presynch protokola i Double Ovsynch protokola u kojem, de facto Ovsynch prethodi Ovsynchu (MOREIRA i sur., 2001.; SOUZA i sur., 2008.).

Međutim, u resinkronizacijskom dijelu protokola postotak koncepcije između različitih protokola je dosta ujednačen te nije statistički značajno različit i iznosi oko 30 % (33,33 % za protokole A i C, te 30 % za protokol B) (Tablica 11.). To je lakše objasniti jer je u početku sinkronizacijskog protokola homogenizirana folikulogeneza (PURSLEY i sur., 1997.; CHEBEL i sur., 2003.). Od ukupno 60 krava u pokusu, 55 ih je završilo cijeli postupak. Postupku resinkronizacije prethodila je aplikacija GnRH 23. dana poslije umjetnog osjemenjivanja, kao prva faza potencijalnog resinkronizacijskog protokola za koji se odlučilo temeljem ginekološke i ultrazvučne dijagnostike steonosti. Injekcija GnRH 23. dana poslije umjetnog osjemenjivanja nije mogla utjecati na postotak gravidnosti. Nakon prve injekcije, postupak je nastavljen i kompletni Ovsynch protokol je dovršen 43. dana nakon prvog umjetnog osjemenjivanja. Resinkronizacijski postupak polučio je po skupinama podjednak rezultat. To se u potpunosti slaže sa rezultatima istraživanja CHEBELA i sur. (2003.) te BARTOLOME i sur. (2005a., 2005b., 2005c.) i vrlo očigledno dokazuje homogeniziranost folikularnih valova.

Snižena razina progesterona tijekom sinkronizacije utječe na koncentraciju estradiola i folikularnu dinamiku i rezultira eventualno sniženom fertilizacijom te manjom kvalitetom embrija (CERRI i sur., 2011a., 2011b.). Razina cirkulirajućeg progesterona je u našem istraživanju na dane 0., 7. i 9. bila niža kod krava koje nisu koncipirale nego kod onih koje jesu (Tablica 21., 22. i 23.). Stoga i ne čudi da postotak koncepcije poslije sinkronizacije bio ispod 30 % (Tablica 11.) u protokolima A i C. Što se tiče postotka koncepcije u skupini B, ideja nije bila ovim protokolom postići dobar rezultat. Naime, metode sa jednokratnom aplikacijom prostaglandina smatraju se anakronima i praktički ne koriste jer je protokol učinkovit samo ako je u vrijeme aplikacije prostaglandina žuto tijelo funkcionalno (RIBEIRO i sur., 2012.). Ova skupina je stoga trebala poslužiti kao drugi pol u istraživanju, kontraargument tezi. To ipak nije

dostatno uvjerljiva činjenica u odnosu na zaključke CORDOBA i FRICKE (2001.). Oni su istraživali rezultate primjene dva protokola: Ovsyncha i protokola u kojem jednokratna aplikacija prostaglandina prethodi Ovsynchu 12 dana. Metoda sa prethodnom aplikacijom prostaglandina, u postotku koncepcije, sinkronizacije ili steonosti polučila je podjednake rezultate kao klasični Ovsynch protokol. Efikasnost dvostrukog ili jednostrukog prostaglandinskog protokola uz fiksno vrijeme inseminacije rezultira slabijim rezultatom u odnosu na isti protokol sa inseminacijom pri detektiranom estrusu, a što je objašnjivo lošijom ili neučinkovitom indukcijom luteolize ali i prisutstvom niske razine progesterona (STEVENSON i sur., 1987.). To sugerira zaključak da je snižen postotak koncepcije nakon injekcije prostaglandina uz fiksno vrijeme umjetnog osjemenjavanja vjerojatnije primarno uzrokovan pogrešnim vremenom inseminacije obzirom na fazu estrusa. Da niske koncentracije progesterona mogu reducirati sposobnost estrogena (endogenog i egzogenog) u indukciji predovulatornog porasta LH i ovulacije, dokazali su HATLER i sur. (2008.) koji su cikličkim kravama u laktaciji, tijekom lutealne faze suplementirali niske, sublutealne doze progesterona (CIDR) s namjerom da blokiraju porast LH i ovulaciju. Dan nakon uklanjanja vaginalnih umetaka inducirana je luteoliza dvjema injekcijama prostaglandina u razmaku od 12 sati i dva dana kasnije aplicirali su estradiol cipionat kako bi potaknuli porast LH. Nakon luteolize, opstale su sublutealne koncentracije, nešto više u krava u kojih je implantat bio dulje u vagini, a porast LH nakon aplikacije estradiola nije bio potpun i, naravno slabiji u krava u kojih je postupak dulje trajao. Poneki dobri rezultati sa jednokratnom aplikacijom prostaglandina potječu uglavnom iz starijih vremena, kada je i opseg subfertilnosti bio manji. Tako primjerice LUCY i sur. (1986.) opisuju prilično dobre rezultate jednokratne primjene prostaglandina u skraćanju prvog servisa i međutelidbenog razdoblja. Estrus su sinkronizirali sa prostaglandinima i potom krave osjemenjivali 80 sati kasnije. Prvi servis je skraćen za šest dana, ali je postotak koncepcije bio niži zbog fiksnog vremena inseminacije. Čak 13 % krava nije reagiralo i u serumu je opstala relativno visoka razina progesterona (1 ng/ml), a 15 % krava nije reagiralo zbog preniske razine progesterona. Istraživanje je u biti potvrdilo da je postotak krava koje reagiraju luteolizom visok, međutim zadovoljavajuća koncepcija je potignuta samo u krava koje su osjemenjene nakon detektiranog estrusa, iz čega autori zaključuju da je jednokratna aplikacija luteolitika rezultirala isključivo skraćanjem prvog servisa, ali ne i boljom koncepcijom. Mnogi autori (LUCY i sur., 1986.; STEVENSON i sur., 1987.; ARCHIBALD i sur., 1992.) su vrlo kritični prema jednostrukom prostaglandinskom protokolu. Tvrde da on drastično reducira postotak koncepcije, posebice uz fiksno vrijeme osjemenjavanja jer potrebna

je preciznija sinkronizacija estrusa sa fiksnim vremenom inseminacije za zadovoljavajući postotak koncepcije.

Međutim prednosti dvokratne aplikacije prostaglandina valja također promatrati uz oprez. Naime rezultati protokola sa fiksnim vremenom inseminacije nakon injekcija prostaglandina su problematični zbog nepreciznog trenutka inseminacije u odnosu na fazu estrusa, ali i zbog izostanka anticipirane lutealne funkcije u vrijeme druge injekcije prostaglandina, uz posljedičnu anestriju i anovulciju (STEVENSON i sur., 1987.). U prilog tome govori istraživanje BRITT i GASKA (1998.) koji su u istraživanju usporedili učinke dva sinkronizacijska protokola. Analizirali su postotak steonosti, sezonski učinak, ekonomski učinak u krava tretiranih Ovsynchom i Presynchom. Krave u Ovsynchu tretirane su bez obzira na fazu ciklusa, a krave tretirane dvostrukim prostaglandinskim protokolom izabrane su temeljem nalaza žutog tijela. Krave iz Ovsyncha su osjemenjene u fiksno vrijeme, a krave iz prostaglandinske skupine nakon detekcije estrusa. Postotci koncepcije i steonosti su bili bolji u skupine inducirane Ovsynchom, čak i onih osjemenjenih u fiksno vrijeme.

Reprodukcijски programi sa sinkronizacijama ovulacije imaju cilj skratiti servis period nakon početka rasplodivanja, pa je reinseminacija nakon resinkronizacije izuzetno važna, posebice u uvjetima mliječnog govedarstva gdje je koncepcija zabrinjavajuće niska. U našem radu postupak resinkronizacije započet je 23. dana, što je u skladu s preporukama da prva injekcija GnRH u prvoj fazi resinkronizacijskog Ovsyncha započne 22. ili 23. dana, dakle kada bi se trebali pojaviti novi estrusi, a s druge strane, termin ultrazvučne dijagnostike gravidnosti bit će u spektru 100%-tne točnosti (CHEBEL i sur., 2003.; SANTOS i sur., 2003.). Istraživanje dokazuje da inicijalna injekcija GnRH prije ultrazvučne detekcije steonosti nije naškodila plodnosti. S druge strane, injekcija GnRH stimulira jaku sekreciju LH, i utječe na prolazni porast estradiola. Ta zbivanja mogla bi stimulirati sekreciju prostaglandina što bi rezultiralo luteolizom i prekidom graviditeta, ali rezultati istraživanja pokazuju da primjena injekcije GnRH 21.-28. dana nakon umjetnog osjemenjavanja ne ugrožava steonost (STEVENSON i sur., 1993.).

Činjenica da je bio visok je postotak krava sa visokom koncentracijom progesterona ($> 2,5$ ng/ml) 33. dana, premda je kasnija ultrazvučna detekcija (40. dana) pokazala da je koncepcija bila svega oko 30 %, sugerira da je razina progesterona u te dvije faze nepouzdan pokazatelj, odnosno da razina progesterona ima nisku specifičnost (pouzdanost) kao prediktor gestacije. To nije u opreci sa činjenicom da aplikacija GnRH 5. i 12. dan nakon umjetnog osjemenjavanja povisuje postotak steonosti (VASCONCELOS i sur., 1999.). Prema MOREIRI i sur., (2000a.)

visoka razina progesterona u plazmi u vrijeme prostaglandina rezultira višim postotkom steonosti, ali isto vrijedi i za krave pri prvoj injekciji Ovsyncha (GnRH) koje su ovulirale, a u odnosu na one koje nisu ovulirale (VASCONCELOS i sur., 1999.), a to je vjerojatno u korelaciji sa stanjem folikula na dan osjemenjavanja. Naime, kada krava reagira na prvu injekciju GnRH u Ovsynchu, budi se novi folikularni val sa novim dominantnim folikulom koji sazrijeva u vrijeme drugog GnRH. U suprotnom dominantni folikul će biti prestar što ugrožava plodnost (AUSTIN i sur., 1999.).

Dakle, kao rezime, aplikacija GnRH 23. dana nakon umjetnog osjemenjavanja u krava sa nepoznatim graviditetnim statusom rezultirala je solidnim postotkom steonih krava, što je u skladu sa rezultatima iz recentne literature. Resinkronizacija sa početkom Ovsyncha 23. dana nakon umjetnog osjemenjavanja i prije detekcije steonosti, ne ugrožava plodnost krava u laktaciji i skraćuje interval između negativne ultrazvučne dijagnoze i sljedećeg osjemenjavanja sukladno istraživanjima brojnih autora (FRICKE i sur., 2003.; CHEBEL i sur., 2003.; BARTOLOME i sur., 2005a., 2005b., 2005c.).

Nesumnjivo je da protokoli koji se baziraju na Ovsynchu (i jednokratni, i modificirani, ali i složeni) predstavljaju velik korak u shvaćanju i mogućnostima manipulacije u reprodukciji mliječnih krava. Filozofija tog vida kontrolirane reprodukcije jest indukcija novog folikularnog vala i indukcija sinkronizacije ovulacije, no bez bitnog utjecaja na razvoj i kvalitetu folikula (PURSLEY i BELLO, 2007.). Naime, folikulogeneza, tj. razvoj folikula, posebice u mliječnih krava ima dinamiku sekvenci u formi nadolazećih valova, upravljano neurohormonalnom regulacijom. Svaki val je sinkronizirani razvoj kohorte folikula promjera 4-5 mm, od kojih opstaje dominantni folikul. Kako ciklus podrazumijeva dva ili tri folikularna vala, to znači da će u slučaju ciklusa sa tri vala, prvi započeti 0. dana ciklusa, drugi 9. i treći 16. dana. Kako su velike varijacije u odnosima tipova ciklusa, bitne su varijacije i u vremenu nastupa novog vala, što podrazumijeva da brojni čimbenici, posebice nasljedni i okolišni mogu utjecati na svaku pojedinačnu folikularnu dinamiku, što bitno otežava dobar rezultat postupaka kontrolirane reprodukcije (TAYLOR i RAJAMEHENDRAN, 1991.; WOLFENSON i sur., 1994.; BEAM i BUTLER, 1998.). Poseban su problem poslijeporodne krave u kojih nastup prvog ovulatornog ciklusa može varirati između 15-100 dana poslijeporodno, kako zbog rastezljivog perioda od regresije gravidnog žutog tijela do prve ovulacije, tako i zbog brojnih drugih uzroka smještenih u razdoblje negativnog energetskeg balansa i van njega (kondicija, hranidba, pasmina, proizvodnja, dob, sezona, patološka i fiziološka stanja maternice, kronične bolesti (MURUGAVEL i sur., 2003.; YÁÑIZ i sur., 2004.; LOPEZ-GATIUS i sur., 2004.). To je tek

faza istraživanja čiji je jedan od ciljeva kontrola rasta, funkcije i trajanja dominantnog folikula kako bi se poboljšala plodnost, čime bi se stimulirala i mliječnost, smanjio postotak pobola i izlučenja i stvarao dovoljan broj zamjenskih junica. U konačnici, valja voditi računa i o tome da će konačni ishod sinkronizacije biti rezultat dva različita pristupa koja se temelje na prolongaciji lutealne faze (arteficijalni progesteron) ili skraćanju ciklusa primjenom prostaglandina, pri čemu je primjena hormona samo alat u vrlo sofisticiranom procesu (WOLFENSON i sur., 1994.; DISKIN i SREENAN, 2000.).

7. ZAKLJUČCI

Istraživanje je u slučaju presinkronizacijskog protokola PGF-Ovsynch dokazalo signifikantnu prednost složenog protokola u odnosu na jednostruki (Ovsynch). Presinkronizacijski protokol GnRH-PGF-Ovsynch nije bio značajno bolji, ali je ipak bolji od Ovsyncha, što u oba slučaja dokazuje da su složeni sustavi kontrolirane reprodukcije bolji od jednostrukih i sugeriraju potrebu njihove veće prihvaćenosti. Međutim, u resinkronizacijskom dijelu protokola postotak koncepcije između različitih protokola je dosta ujednačen, bez značajnih razlika, u zanemarivom rasponu. Rezultat je logičan. Naime, nakon uvodnog postupka i UO u točno određeno vrijeme, u svih krava postupak resinkronizacije započet je istog, 23. dana nakon inseminacije pa su rezultati potvrda očekivanja, tj. ujednačene folikularne dinamike u svih plotkinja, bez obzira koji je presinkronizacijski protokol primijenjen. Važnost primjene resinkronizacije jednaka je važnosti primjene složenih protokola i sugerira njenu neophodnost jer je to možda i najvažniji način poboljšanja reproduksijskih rezultata.

Istraživanje je snažno potvrdilo opravdanost kontrolirane reprodukcije. U krava iz skupine B gdje je primijenjena presinkronizacija GnRH-PGF vrhunac LH hormona nastupio je u očekivano vrijeme, nakon četiri sata od aplikacije, što znači da je protokol optimalno slijedio fiziološki reproduksijski ritam. U skupini A javljala se bifazičnost peaka što ukazuje i na bifazičnost folikulskog vala, a što se očitovalo slabijim rezultatom koncepcije.

Analiza korelacije između najviše vrijednosti LH i promjera dominantnog folikula nije pokazala statističku značajnost. Ujednačena veličina folikula dokaz je ujednačenosti hormonskog statusa. Registrirano dulje trajanje života folikula dokaz je zakašnjele ovulacije ili anovulacije i tipično je za krave iz skupine C u kojih postupak nije započeo na vrijeme, točnije injekcija GnRH aplicirana je u preranoj fazi ciklusa, prije 4-5 dana, uslijed čega je nastupilo zastarijevanje folikula i neuspješne koncepcije ili koncepcije sa embrionalnim uginućem.

Na kraju valja naglasiti da su u istraživanju oba sinkronizacijska složena protokola bila originalna, do sada neprimijenjena u praksi i nezabilježena u stručnoj i znanstvenoj literaturi. Zbog dobrog rezultata ovaj model valjalo bi istraživati u neposrednoj budućnosti, i budu li rezultati potvrđeni valjalo bi razmisliti o etabliranju ovog sustava.

8. POPIS LITERATURE

ADAMS, G. P. (1994): Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*. 41, 19-24.

ADAMS, G. P., R. L. MATTERI, O. J. GINTHER (1992): Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Repr. Fert.* 95, 627-640.

AHMAD, N., F. N. SCHRICK, R. L. BUTCHER, E. K. INSKEEP (1995): Effects of persistent follicles early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52, 1129-1135.

AMBROSE, D. J., D. G. V. EMMANUEL, M. G. COLAZO, J. P. KASTELIC (2008): Pregnancy rates to timed-AI in Holstein heifers given prostaglandin F₂ concurrent with, or 24 Hours prior to, removal of an intravaginal progesterone-releasing insert. *J. Dairy Sci.* 91, 2678-2683.

ARCHIBALD, L. F., T. TRAN, R. MASSEY, E. KLAPSTEIN (1992): Conception rates in dairy cows after timed-insemination and simultaneous treatment with gonadotropin-releasing hormone and/or prostaglandin F_{2α}. *Theriogenology* 37, 723-731.

AUSTIN, E. J., M. MIHN, M. P. RYAN, D. H. WILLIAMS, J. F. ROCHE (1999): Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J. Anim. Sci.* 77, 2219-2226.

BARTOLOME J. A., F. T. SILVESTRE, S. KAMIMURA, A. C. M. ARTECHE, P. MELENDEZ, D. KELBERT, J. MCHALE, K. SWIFT, L. F. ARCHIBALD, W. W. THATCHER (2005a): Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows I: use of the Ovsynch and Heatsynch protocols after non-pregnancy diagnosis by ultrasonography. *Theriogenology* 63, 1617–1627.

BARTOLOME, J. A., A. SOZZI, J. MCHALE, P. MELENDEZ, A. C. M. ARTECHE, F. T. SILVESTRE, D. KELBERT, K. SWIFT, L. F. ARCHIBALD, W. W. THATCHER (2005b): Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology* 63, 1628-1642.

BARTOLOME, J. A., A. SOZZI, J. MCHALE, K. SWIFT, D. KELBERT, L. F. ARCHBALD, W. W. THATCHER (2005c): Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, III: Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis od day 30. *Theriogenology* 63, 1643-58.

BARTOLOME, J. A., P. MELENDEZ, D. KELBERT, K. SWIFT, J. McHALE, J. HERNANDEZ, F. SILVESTRE, C. A. RISCO, A. C. M. ARTECHE, W. W. THATCHER, L. F. ARCHIBALD (2005d): Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology*, 63, 1026–1037.

BARTOLOME J. A., N. P. SHEERI, S. LUZGAR, P. MELENDEZ, D. KELBERT, C. A. RISCO, W. W. THATCHER (2002):. Conception rate in lactating dairy cows using Ovsynch after presynchronization with prostaglandin F2a (PGF2a) or gonadotropin releasing hormone (GnRH). *The Bovine Practitioner* 36, 35–9.

BEAM, S. W., W. R. BUTLER (1998): Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.* 81, 121–131.

BELLO, N. M. , J. P. STREIBEL, R. J. PURSLEY (2006): Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 3413-3424.

BERTONI, G., E. TREVISI, A. R. FERRARI, A. GUBBIOTTI (2006): The dairy cow performnces can be affected by inlammations occuring around calving. 57th EAAP Meeting, Antalya, Turkey, p. 325

BISINOTTO, R. S., R. C. CHEBEL, J. E. P. SANTOS (2010): Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 3578-87.

BO, G. A., G. P. ADAMS, R. A. PIERSON, M. CACCIA, H. TRIBULO, R. J. MAPLETOFT (1994): Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41, 1555-1569.

BODENSTAINER, K. J., K. KOT, M. C. WILTBANK, O. J. GINTHER (1996): Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 45, 1115-28.

BORMAN, J. M., R. P. RADCLIFF, B. L. MCCORMACK, F. N. KOJIMA, D. J. PATTERSON, K. L. MACMILLAN, M. C. LUCY (2003): Synchronisation of oestrus in dairy

cows using prostaglandin F₂α, gonadotrophin-releasing hormone, and oestradiol cypionate. *Anim. Reprod. Sci.* 76, 163-76.

BRIDGES, P. J., J. E. FORTUNE (2003): Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest. Anim. Endocr.* 25, 199-214.

BRITT, J. S., J. GASKA (1998): Comparison of two estrus synchronization programs in a large, confinement-housed dairy herd. *JAVMA* 212, 210-212.

BRITT, J. H. (1985): Enhanced reproduction and its economic implications. *J. Dairy Sci.* 68, 1585–1592.

BRUSVEEN, D. J., A. H. SOUZA, M. C. WILTBANK (2009): Effects of additional prostaglandin F₂α and estradiol-17β during Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 1412-1422.

BUTLER, S. T., S. H. PELTON, W. R. BUTLER (2006): Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J. Dairy Sci.* 89, 2938-51.

CARTMILL, J. A., S. Z. EL-ZARKOUNY, B. A. HENSLEY, G. C. LAMB, J. J. STEVENSON (2001): Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rate in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J. Dairy Sci.* 84, 1051-1059.

CARVALHO, P. D., A. H. SOUZA, M. C. ADMUNDSON, K. S. HACKBART, M. J. FUENZALIDA, M. M. HERLIHY, H. AYRES, A. R. DRESCH, L. M. VIEIRA, J. N. GUENHER, R. R. GRUMMER, P. M. FRICKE (2014): Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 3666-3683.

CERRI, R. L. A., R. C. CHEBE, F. A. RIVERA, C. D. NARCISO, R. A. OLIVEIRA, W. W. THATCHER, J. E. P. SANTOS (2011a): Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *J. Dairy Sci.* 94, 3342-3351.

CERRI, R. L. A., R. C. CHEBEL, F. A. RIVERA, C. D. NARCISO, R. A. OLIVEIRA, M. AMSTALDEN, G. M. BAEZ-SANDOVAL, L. J. OLIVEIRA, W. W. THATCHER, J. E. P. SANTOS (2011b): Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J. Dairy Sci.* 94, 3352-3365.

CERRI, R. L. A., H. M. RUTIGLIANO, R. C. CHEBEL, J. E. P. SANTOS (2009): Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 137, 813-23.

CERRI, R. L. A., H. M. RUTIGLIANO, R. G. S. BRUNO, R. C. CHEBEL, J. E. P. SANTOS (2005): Effect of artificial insemination (AI) protocol on fertilisation and embryo quality in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 86-86.

CHAGAS, L. M., J. J. BASS, D. BLACHE, C. R. BURKE, J. K. KAY, D. R. LINDSAY, M. C. LUCY, G. B. MARTIN, S. MEIER, F. M. RHODES, J. R. ROCHE, W. W. THATCHER, R. WEBB (2007): Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4022-4032.

CHEBEL, R. C. (2008): Voluntary waiting period: How soon is too soon, and how late is too late. *Western Dairy News* 8, 89-90.

CHEBEL, R. C., J. E. P. SANTOS, R. L. A. CERRI, H. M. RUTIGLIANO, R. G. S. BRUNO (2006): Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J. Dairy Sci.* 89, 4205-4219.

CHEBEL, R. C., J. E. P. SANTOS, R. L. A. CERRI, K. N. GALVA, S. O. JUCHEM, W. W. THATCHER (2003): Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60, 1389-1399.

CHENAULT, J. R., J. F. BOUCHER, K. J. DAME, J. A. MEYER, S. L. WOOD-FOLLIS (2003): Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 2039-2049.

CHENAULT, J. R., W. W. THATCHER, P. S. KALRA, R. M. ABRAMS (1975): Transitory changes in plasma progestins, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. *J. Dairy Sci.* 58, 709-717.

COLAZO, M. G., R. J. MAPLETOFT (2014): A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can. Vet. J.* 55, 772-780.

COLAZO, M. G., D. J. AMBROSE (2013): New research in controlled breeding programs for dairy cattle. *WCDS Advances in Dairy Technology* 25,75-95.

COLAZO, M. G., M. B. GORDON, R. RAJAMAHENDRAN, R. J. MAPLETOFT, D. J. AMBROSE (2009): Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 72, 262-270.

COLAZO, M. G., J. P. KASTELIC, H. DAVIS, M. D. RUTLEDGE, M. F. MARTINEZ, J. A. SMALL, R. J. MAPLETOFT (2008): Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 109-117.

CORDOBA, M. C., P. M. FRICKE (2001): evaluation of two hormonal protocols for synchronization of ovulation and timed artificial insemination in dairy cows managed in grazing-based dairies. *J. Dairy Sci.* 84, 2700–2708.

COZZI, G., L. RAVAROTTO, F. GOTTARDO, A.L. STEFANI, B. CONTIERO, L. MORO, M. BRSCIC, P. DALVIT (2011): Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *J. Dairy Sci.* 94, 3895-3901.

CROWE, M. A. (2008): Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 20-28.

CROWE, M. A. (2002): Oestrus cycles, characteristics. In: *Encyclopedia of dairy sciences* (Fuquay J. W., P. F. FOX, Eds.). Elsevier Ltd. Pp. 2152-2157.

CUPP, A., M. GARCIA-WINDER, A. ZAMUDIO, V. MARISCAL, M. WEHRMANN, N. KOJIMA, K. PETERS, E. BERGFELD, P. HERNANDEZ, T. SANCHEZ, R. KITOK, J. KINDER (1993): Concentrations of progesterone in circulation have a differential effect on biochemical characteristics of dominant follicles in cows. *J. Anim. Sci.* 71, 1211 (abstract)

DAY, M. L., L. H. ANDERSON (1998): Current concepts on the control of puberty of cattle. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl.3), 1-15.

DE JARNETTE, J. M., C. E. MARSHALL (2003): Effects of pre-synchronization using combinations PGF(2alpha) and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 77, 51-60.

DE JARNETTE, J. M., R. R. SALVERSON, C. E. MARSHALL (2001): Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF2alpha. *Anim. Reprod. Sci.* 67, 27-35.

DENICOL, G. LOPES Jr., L. G. D. MENDONCA, F. A. RIVERA, F. GUAGNINI, R. V. PEREZ, J. R. LIMA, R. G. S. BRUNO, J. E. P. SANTOS, R. C. CHEBEL (2012): Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1794–1806.

DE VRIES, A. (2006): Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 3876-3885.

DISKIN, M. G., J. M. SREENAN (2000): Expression and detection of oestrus in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 40, 481-491.

DOBSON, H., S. L. WALKER, M. J. MORRIS, J. E. ROUTLY, R. F. SMITH (2008): Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal*, 1104-1111.

EDMONSON, A. J., I. J. LEAN, L. D. WEAVER, T. FARVER, G. WEBSTER (1989): A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci* 72, 68-78.

EL- ZARKOUNY, S. Z., M. M. SHAABAN, J. J. STEVENSON (2011): Blood metabolites and hormone-based programmed breeding treatments in anovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 6001-6010.

EL- ZARKOUNY, S. Z., J. A. CARTMILL, B. A. HENSLEY, J. J. STEVESNON (2004): Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J. Dairy Sci.* 87, 1024-1037.

ELROD, C. C., M. VAN AMBURGH, W. R. BUTLER (1993a): Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J. Anim. Sci.* 71, 702-706.

ELROD, C. C., W. R. BUTLER (1993b): Reduction of fertility and alteration of pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 71, 694-701.

ERB, H. N. (1984): High milk production as a cause of cystic ovaries in dairy cows: Evidence to the contrary. *Comp. Cont. Educ.* 6, 215–219.

ESPEY, L. L. (1994): Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.* 50, 3–23

FERGUSON, J. D. (1991): Nutrition and reproduction in dairy cows. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 7, 483-507.

FERNANDEZ, D. L., J. G. BERARDINELLI, R. E. SHORT, R. ADAIR (1996): Acute and chronic changes in luteinizing hormone secretion and postpartum interval to estrus in first-calf suckled beef cows exposed continuously or intermittently to mature bulls. *J. Anim. Sci.* 74, 1098-1103.

FETROW, J., T. BLANCHARD (1987) Economic impact of the use of prostaglandin to induce estrus in dairy cows. *JAVMA* 190, 163-169.

FOGWELL, R. L., J. L. COWLEY, A. WORTMAN, N. K. AMES, J. J. IRELAND (1985): Luteal function in cows following destruction of ovarian follicles at midcycle. *Theriogenology* 23, 389-398.

FONSECA, F. A., J. H. BRITT, B. T. MCDANIEL, J. C. WILK, A. H. RAKES (1983): Reproductive traits of Holstein and Jerseys- Effects of age, milk-yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J. Dairy Sci.* 66, 1128-47.

FORTUNE, J. E. (1994): Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50, 225-232.

FORTUNE, J. E., J. SIROIS, S. M. QUIRK (1988): The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29, 95-110.

FRICKE, P. M., D. Z. CARAVIELLO, K. A. WEIGEL, M. L. WELLE (2003): Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J. Dairy Sci.* 86, 3941-50.

GALVÃO, K. N., J. E. SANTOS (2010): Factors affecting synchronization and conception rate after the Ovsynch protocol in lactating Holstein cows. *Reprod. Domestic. Anim.* 45, 439-446.

GALVÃO, K. N., M. F. S.Á. FILHO, J.E.P. SANTOS (2007): Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4212-4218.

GARVERICK, H. A., M. C. LUCY (2002): Oestrus cycles, postpartum cyclicity. In: *Encyclopedia of dairy sciences* (Fuquay J. W., P. F. FOX, Eds.). Elsevier Ltd. Pp. 2157-2163.

GARVERICK, H. A., M. F. SMITH (1993): Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 9, 223-247.

- GEARY, T. W., J. C. WHITTIER, E. R. DOWNING, D. G. LeFEVER, R. W. SILCOX, M. D. HOLLAND, T. M. NETT, G. D. NISWENDER (1998): Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B or the Ovsynch protocol. *J. Anim. Sci.* 76,1523-1527.
- GEREŠ, D., B. ŠPOLJARIĆ, G. ŠTIBRIĆ (2014): Transrektalna ultrazvučna dijagnostika u svim fazama spolnog ciklusa kao efikasna mjera prevencija i suzbijanja subfertilnosti mliječnih krava. Zbornik predavanja Lazarević, M. (ur.). Beograd : Naučna KMD, Beograd, pp. 3-21.
- GEREŠ, D., B. ŽEVRNJA, G. ŠTIBRIĆ (2012): Smanjena plodnost mliječnih krava. Zbornik predavanja (Lazarević, M. (ur.). Beograd: Naučna KMD, Beograd, pp.37-48.
- GEREŠ, D. (2004): Hoće li hrvatske krave u EU biti plodnije? Zbornik, 3. Hrvatski veterinarski kongres. Balenović, T. (ur.). Zagreb, Hrvatska veterinarska komora, pp. 93-100.
- GEREŠ, D. (2003): Programme of prevention and control of the state of reduced fertility in dairy cattle. *Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatsko veterinarsko društvo. Special number*, pp. 13-15.
- GEREŠ, D. (2001): Liječenje jalovosti mliječnih goveda- bez nas se ne može. *Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatsko veterinarsko društvo.* 24, 1-2; 20-21.
- GINTHER, O. J., M. A. BEG, D. R. BERGFELT, F. X. DONADEU, K. KOT (2001): Follicle selection in monoovular species. *Biol. Reprod.* 65, 638-47.
- GINTHER, O. J. (2000): Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60, 61-79.
- GINTHER, O. J., M. C. WILTBANK, P. M. FRICKE, J. R. GIBBONS, K. KOT (1996a): Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187-94.
- GINTHER, O. J., K. KOT, L. J. KULICK, S. MARTIN, M. C. WILTBANK (1996b): Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 108, 271-9.
- GLENCROSS, R. G., I. B. MUNRO, B. E. SENIOR, G. S. POPE (1973): Concentration of estradiol-17 β , oestrus, and progesterone in jugular venous plasma of cows during the estrous cycle and in early pregnancy. *Acta endocrinol.* 73, 374-384.

GUMEN, A., M. C. WILTBANK (2005): Follicular cysts occur after a normal estradiol-induced GnRH/LH surge if the corpus haemorrhagicum is removed. *Reproduction* 129, 737-45.

GUMEN, A., A. H. SOUZA, A. P. CUNHA, E. B. P. C. SILVA, J. N. GUENTHER, M. C. WILTBANK (2005): Effect of GnRH between pre-synch injections and estradiol-17beta during the Ovsynch protocol on conception rates in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 170-171.

GUMEN, A., J. N. GUENTHER, M. C. WILTBANK (2003): Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3184-3194.

GUMEN, A., M. C. WILTBANK (2002): An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol. Reprod.* 66, 1689-95.

HAFEZ, E. S. E., B. HAFEZ (2008): *Reproduction in farm animals* 7th ed. (Hafez, E. S. E., B. Hafez, Eds.), Blackwell Publishing, pp. 33-81.

HANSEL, W., E. M. CONVEY (1983): Physiology of the estrus cycle. *J. Anim. Sci.* 57, 404-424.

HANSEN, P. J. (1985): Seasonal modulation of puberty and the postpartum anestrus in cattle: A review. *Livestock. Prod. Sci.* 12, 309-327.

HARESING, W. (1981): Body condition, milk yield and reproduction. U: *Recent developments in Ruminant Nutrition*. (Haresing, W., D. J. A. Cole, ed.) Butterworths, London, UK. p. 1-16.

HATLER, T. B., S. H. HAYES, D. L. RAY, P. S. REAME, W. J. SILVIA (2008): Effect of sublethal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet. J.* 177, 360–368.

HATLER, T. B., S. H. HAYES, L. F. L. DA FONSECA, W. J. SILVIA (2003): Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol. Reprod.* 69, 218-23.

HERDT, T. H. (2000): Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 387–403.

HERLIHY, M. M., J. O. GIORDANO, A. H. SOUZA, H. AYRES, R. M. FERREIRA, A. KESKIN, A. B. NASCIMENTO, J. N. GUENTHER, J. M. GASKA, S. J. KACUBA, M. A. CROWE, S. T. BUTLER, M. C. WILTBANK (2012): Presynchronization with Double Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 7003-7014.

HUGHES, T. L., A. VILLA-GODOY, J. S. KESNER, R. L. FOGWELL (1987): Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F₂ α -induced luteal regression. *Biol. Reprod.* 36, 523-529.

INCHAISRI, C., R. JORRITSMA, P. L. A. M. VOS, G. C. VAN DER WEIJDEN, H. HOGEVEEN (2008): Analysis of the economically optimal voluntary waiting period for first insemination. *J. Dairy Sci.* 94, 3811-3823.

KARSCH, F. J., E. L. BITTMAN, D. L. FOSTER, R. L. GOODMAN, S. J. LEGAN, J. E. ROBINSON (1984): Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec. Prog. Horm. Res.* 40, 185-232.

KASTELIC, J. P., S. CURRAN, R. A. PIERSON, O. J. GINTHER (1988): Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology* 29, 39-54.

KOJIMA, F. N., E. G. M. BERGFELD, M. E. WEHRMAN, A. S. CUPP, K. E. FIKE, D. V. MARISCAL-AGUAYO, T. SANCHEZ-TORRES, M. GARCIA-WINDER, D. T. CLOPTON, A. J. ROBERTS, J. E. KINDER (2003): Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim. Reprod. Sci.* 77, 187-211.

LABEN, R. L., R. D. SHANKS, P. J. BERGER, A. E. FREEMAN (1982): Factors affecting milk yield and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 65, 1004-1015.

LARSON, L. L., P. J. H. BALL (1992): Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 38, 255-267.

LEBLANC, S. J., K. E. LESLIE (2003): Short communication: presynchronization using a single injection of PGF₂ α before synchronized ovulation and first timed artificial insemination in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3215-3217.

LEBLANC, S. J., K. E. LESLIE, H. J. CEELLEN, D. F. KELTON, G. P. KEEFE (1998): measures of estrus detection and pregnancy in dairy cows after administration of gonadotropin-releasing hormone within an estrus synchronization program based on prostaglandin F_{2α}. *J. Dairy Sci.* 81, 375–381.

LOPEZ, H., D. Z. CARAVIELLO, L. D. SATTER, P. M. FRICKE, M. C. WILTBANK (2005): Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 2783-93.

LOPEZ H., L. D. SATTER, M. C. WILTBANK (2004): Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 209–23.

LOPEZ-GATIUS, F., K. MURUGAVEL, P. SANTOLARIA, M. LÓPEZ-BÉJAR, J. L. YÁÑIZ (2004): Pregnancy rate after timed artificial insemination in early post-partum dairy cows after ovsynch or specific synchronization protocols. *J. Vet. Med.* 50,1-6.

LUCY, M. C. (2001): Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84, 1277–1293.

LUCY, M. C., J. D. SAVIO, L. BADINGA, R.L. DE LA SOTA, W. W. THATCHER (1992): Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 3615-3626.

LUCY, M. C., J. S. STEVENSON, E. P. CALL (1986): Controlling first service and calving interval by prostaglandin f_{2α}, gonadotropin-releasing hormone, and timed insemination. *J. Dairy Sci.* 69, 2186–2194.

MACMILLAN, K. L., B. V. E. SEGWAGWE, C. S. PINO (2003): Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 327–344.

MACMILLAN, K. L., A. J. PETERSON (1993): A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 1–25.

MARTINS, J. P. N., R. K. POLICELLI, L. M. NEUDER, W. RAPHAEL, J. R. PURSLEY (2011): Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin f_{2α} of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 2815-2824.

MIHM, M., M. A. CROWE, P. G. KNIGHT, E. J. AUSTIN (2002): Follicle wave growth in cattle. *Reprod. Domestic. Anim.* 37, 191-200.

MIHM, M., N. CURRAN, P. HYTTEL, P. G. KNIGHT, M. P. BOLAND, J. F. ROCHE (1999): Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 116, 293-304.

MIHM, M., A. BAGUISI, M. P. BOLAND, J. F. ROCHE (1994): Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102, 123-130.

MOORE, F. (1997) Interpreting serum chemistry profiles in dairy cows. *Vet. Med.* 92, 903–912.

MOREIRA, F., C. ORLANDI, C.A. RISCO, R. MATTOS, F. LOPES, W.W. THATCHER (2001): Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84, 1646-1659.

MOREIRA, F., R. L. DE LA SOTA, T. DIAZ, W. W. THATCHER (2000a): Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 78, 1568-76.

MOREIRA, F., C. RISCO, M. F. A. PIRES, J. D. AMBROSE, M. DROST, M. DELORENZO, W. W. THATCHER (2000b): Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology* 53, 1305-1319.

MURUGAVEL, K., J. L. YÁÑIZ, P. SANTOLARIA, M. LÓPEZ-BÉJAR, F. LÓPEZ-GATIUS (2003): Prostaglandin based estrus synchronization in postpartum dairy cows: an update. *Int. J. Appl. Res. Vet. M.* 1, 51-65.

NAVANUKRAW, C., D. A. REDMER, L. P. REYNOLDS, J. D. KIRSCH, A. T. GRAZUL-BILSKA, P. M. FRICKE (2004): A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 1551-1557.

NEBEL R. L., S. M. JOBST (1998): Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: a review. *J. Dairy Sci.* 81, 1169-74.

NISWENDER, G. D., J. L. JUENGEL, P. J. SILVA, M. K. ROLLYSON, E. W. McITUSH (2000): Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80, 1-29.

NOAKES, D. (2009): Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. U: Veterinary reproduction and obstetrics 9th ed. (Noakes, D. E., T. J. Parkinson, G. C. W. Ewingland, eds.). Saunders, Elsevier. pp. 3-58.

ORIHUELA, A. (2000): Some factors affecting the behavioral manifestation of oestrus in cattle. A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 70, 1-16.

PANCARCI, S. M., E. R. JORDAN, C. A. RISCO, M. J. SCHOUTEN, F. L. LOPES, F. MOREIRA, W. W. THATCHER (2002). Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 122-131.

PETERS, M. W., J. R. PURSLEY (2003): Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology* 60, 1197-1204.

PETERS, M. W., J. R. PURSLEY (2002): Fertility of lactating dairy cows treated with ovsynch after presynchronization injections of PGF₂ α and GnRH. *J. Dairy Sci.* 85, 2403–2406.

PIERSON, R. A., O. J. GINTHER (1984): Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 29, 495-504.

PTASZYNSKA, M. (2009): Compendium of animal reproduction. 10th ed., Intervet Schering-plough Animal Health, pp. 19-90.

PURSLEY, J. R., N. M. BELLO (2007): Ovulation Synchronisation Strategies in Dairy Cattle Using PGF₂ α and GnRH. U: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Youngquist, R.S., W.R. Threlfall, eds.). Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 2nd Ed., 286-293).

PURSLEY, J. R., R. W. SILCOX, M. C. WILTBANK (1998): Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81, 2139-2144.

PURSLEY, J. R., M. R. KOSOROK, M. C. WILTBANK (1997): Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.* 80, 301-306.

PURSLEY, J. R., M. O. MEE, M. C. WILTBANK (1995): Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923.

RABIEE, A. R., I. J. LEAN, M. A. STEVENSON (2005): Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: A metaanalysis. *J. Dairy Sci.* 88, 2754-70.

RAPHAEL, B. C., P. S. DIMICK, D. L. PUPPIONE (1973): Lipid characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. *J. Dairy Sci.* 56, 1025–1032.

REVAH, I., W. R. BUTLER (1996): Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 106, 39-47.

RIBEIRO, E. S., R. S. BISINOTTO, M. G. FAVORETO, L. T. MARTINS, R. L. A. CERRI, F. T. SILVESTRE, L. F. GRECO, W. W. THATCHER, J. E. P. SANTOS (2012): Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78, 273-284.

RIBEIRO, E. S., R. L. A. CERRI, R. S. BISINOTTO, F. S. LIMA, F. T. SILVESTRE, M. G. FAVORETO, L. F. GRECO, W. W. THATCHER, J. E. P. SANTOS (2011): Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronization and resynchronization protocols. *J. Dairy Sci.* 94, 4984–4996.

ROCHE, J. R., N. C. FRIGGENS, J. K. KAY, M. W. FISHER, K. J. STAFFORD, D. P. BERRY (2009): Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* 92, 5769-5801.

ROCHE, J. F., D. MACKEY, M. D. DISKIN (2000): Reproductive management of postpartum cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 703-712.

RODRIGUES, R. O., C. TREVISANUTO, R. F. COOKE, J. L. M VASCONCELOS (2011): Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. *Theriogenology* 75, 131-7.

RONCHI, B., U. BERNABUCCI, N. LACETERA, A. VERINI SUPPLIZI, A. NARDONE (1999): Distinct and common effects of heat stress and restricted feeding on metabolic status of Holstein heifers. *Zoot. Nutr. Anim.* 25, 11–20.

SANGSRITAVONG, S., D. K. COMBS, R. SARTORI, L. E. ARMENATO, M. C. WILTBANK (2002): High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 2831-42.

SANTOS J. E. P., C. D. NARCISO, F. RIVERA, W. W. THATCHER, R. C. CHEBEL (2010): Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 2976-88.

SANTOS, J. E. P., S. O. JUCHEM, R. L. A. CERRI, C. DEI, R. CHEBEL, W. W. THATCHER (2003): Effect of bST and reproductive management on reproductive and lactational performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3138-3147.

SAVIO, J. D., W. W. THATCHER, G. R. MORRIS, K. ENTWISTLE, M. DROST, M. R. MATTIACCI (1993): Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98, 77-84.

SAVIO, J. D., M. P. BOLAND, J. F. ROCHE (1990): Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 88, 581-91.

SAVIO, J. D., L. KEENAN, M. P. BOLAND, J. F. ROCHE (1988): Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83, 663-671.

SENGER P. L. (1994): The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J. Dairy Sci.* 77, 2745-53.

SILVA, E., R. A. STERRY, P. M. FRICKE (2007): Assessment of a practical method for identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 90, 3255-3262.

SOUZA, A. H., H. AYRES, R. M. FERREIRA, M. C. WILTBANK (2008): A new presynchronization system (Double- Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 70, 208-215.

SOUZA, A. H., A. GUMEN, E. P. B. SILVA, A. P. CUNHA, J. N. GUENTHER, C. M. PETO, D. Z. CARAVIELLO, M. C. WILTBANK (2007): Supplementation with estradiol-17 beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4623-4634.

SOUZA A. H., A. P. CUNHA, D. Z. CARAVIELLO, M. C. WILTBANK (2005): Profiles of circulating estradiol-17 β after different estrogen treatments in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* 2, 224-232.

STENGARDE, L., K. HOLTENIUS, M. TRAVEN, J. HULTGREN, R. NISKANEN, U. EMANUELSON (2010): Blood profile sin dairy cows with displaced abomasum. *J. Dairy Sci.* 93, 4691-4699.

STERRY, R. A., M. L. WELLE, P. M. FRICKE (2006): Treatment with GnRH after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 4237-4245.

STEVENSON, J. S. (2007): Clinical reproductive physiology of the cow. U: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Youngquist, R.S., W.R. Threlfall, eds.). Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 2nd Ed., 258-264.

STEVENSON, J. S., J. R. PURSLEY, H. A. GARVERICK, P. M. FRICKE, D. J. KESLER, J. S. OTTOBRE, M. C. WILTBANK (2006): treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during ovsynch. *J. Dairy Sci.* 89, 2567–2578.

STEVENSON, J. S., J. A. CARTMILL, B. A. HENSLEY, S. Z. EL-ZARKOUNY (2003): Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. *Theriogenology* 60,475–83.

STEVENSON J. S., Y. KOBAYASHI, K. E. THOMPSON (1999): Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including OvSynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F₂ alpha. *J. Dairy Sci.* 82, 506-15.

STEVENSON, J. S., G. C. LAMB, D. P. HOFFMAN, J. E. MINTON (1997): Interrelationships of lactation and postpartum anovulation in suckled and milked cows. *Livest. Prod. Sci.* 50, 57-84.

STEVENSON, J. S., A. P. PHATAK, I. RETTMER, R. E. STEWART (1993): Postinsemination administration of Receptal: follicular dynamics, duration of cycle, hormonal responses, and pregnancy rates. *J. Dairy Sci.* 76, 2536-2547.

STEVENSON, J. S., M. C. LUCY, E. P. CALL (1987) Failure of timed inseminations and associated luteal function in dairy cattle after two injections of prostaglandin F₂α. *Theriogenology* 28, 937-946.

STUMPF, T. T., M. S. ROBERSON, M. W. WOLFE, D. L. HAMERNIK, R. J. KITOK, J. E. KINDER (1993): Progesterone, 17-beta-estradiol, and opioid neuropeptides modulate pattern of luteinizing-hormone in circulation of the cow. *Biol. Reprod.* 49, 1096-101.

ŠPOLJARIĆ, B., G. ŠTIBRIĆ, D. GEREŠ (2013): Comparison of two protocols for synchronization of ovulation on dairy farm in Croatia. Congress proceedings (Gvozdić, D. ; Petrujkiš, Branko (ur.). Beograd: Serbian Buiatric's Association, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, pp. 136-145.

TAYA, K., H. KANEKO, T. TAKEDOMI, H. KISHI, G. WATANABE (1996): Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cow. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 563-570.

TAYLOR, C., R. RAJAMAHENDRAN (1991): follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74, 115–123.

THATCHER, W. W., T. R. BILBY, J. A. BARTOLOME, F. SILVESTRE, C. R. STAPLES, J. E. SANTOS (2006): Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30-44.

THATCHER, W. W., F. MOREIRA, S. M. PANCARCI, J. A. BARTOLOME, J. E. P. SANTOS (2002): Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrin.* 23, 243-54.

THATCHER, W. W., K. L. MACMILLAN, P. J. HANSEN, M. DROST (1989): Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31, 149-165.

TREVISI, E., M. AMADORI, S. COGROSSI, E. RAZZUOLI, G. BERTONI (2012): Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 93,985-704.

VAN EERDENBURG, F. J. C. M., D. KARTHAUS, M. A. M. TAVERNE, I. MERCIS, O. SZENCI (2002): The relationship between estrous behavioral score and time of ovulation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 1150–1156.

VASCONCELOS, J. L. M., R. W. SILCOX, G. J. M. ROSA, J. R. PURSLEY, M. C. WILTBANK (1999): Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52, 1067-1078.

WALKER, W. L., R. L. NEBEL, M. L. MCGILLARD (1996): Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 79, 1555-1561.

- WASHBURN, S.P., W. J. SILVIA, C. H. BROWN, B. T. MCDANIEL, A. J. MCALLISTER (2002): Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.* 85, 244–251.
- WILLIAMS, G. L., O. S. GAZAL, G. A. GUZMAN-VEGA, R. L. STANLO (1996). Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 289-297.
- WILTBANK, M. C., P. D. CARVALHO, A. KESKIN, K. S. HACKBART, M. A. MESCHIATTI, M. R. BASTOS, J. N. GUENTHER, A. B. NASCIMENTO, M. M. HERLIHY, M. C. AMUNDSON, A. H. SOUZA (2011a): Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows. Abstract no. 685 in Proc. 44th Annu. Mtg. Soc. Study Reprod., Portland, Oregon. Society for the study of Reproduction, Madison, WI.
- WILTBANK, M. C., R. SARTORI, M. M. HERLIHY, J. L. M. VASCONCELOS, A. B. NASCIMENTO, A. H. SOUZA, H. AYRES, A. P. CUNHA, A. KESKIN, J. N. GUENTHER, A. GUMEN (2011b): Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 76, 1568-1582.
- WILTBANK, M. C., A. H. SOUZA, P. D. CARVALHO, R. W. BENDER, A. B. NASCIMENTO (2011c): Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle *Reprod. Fert. Develop.* 24, 238-243.
- WILTBANK, M., H. LOPEZ, R. SARTORI, R. SANGSRIVATONG, A. GUMEN (2006): Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17-29.
- WILTBANK, M. C., A. GÜMEN, R. SARTORI (2002): Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57, 21-52.
- WOLFENSON, D., W. W. THATCHER, J. D. SAVIO, L. BADINGA, M. C. LUCY (1994): The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. *Theriogenology.* 42, 633–644.
- WOOD, C. E. (1999): Control of parturition in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 115-126.

XU, Z. Z. (2002): Oestrus cycles, control. In: Encyclopedia of dairy sciences (Fuquay J. W., P. F. FOX, Eds.). Elsevier Ltd. Pp. 2172-2184.

XU, Z. Z., L. J. BURTON, K. L. MACMILLAN (1997): Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF₂alpha and progesterone. *Theriogenology* 47, 687-701.

YAMADA, K., T. NAKAO, K. NAKADA, G. MATSUDA (2002): Influence of GnRH analogue (fertiirelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 74, 27-34.

YÁNIZ, J. L, K. MURUGAVEL, F. LÓPEZ-GATIUS (2004): Recent developments in oestrous synchronization of postpartum dairy cows with and without ovarian disorders. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 86-93.

ZOBEL, R., I. ŽERJAVIĆ, O. SMOLEC, I. ŠKET, D. GEREŠ (2013): Vrijeme ovulacije u simentalskih krava nakon primjene modificiranog dvostrukog Ovsynch protokola. *Proceedings of the 6th Croatian Veterinary Congress*. Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, pp.212-214.

ZOBEL, R., D. GEREŠ, R. TURK, D. GRAČNER, D. ŽUBČIĆ (2008): Analiza vremena nastupa ovulacije u mliječnim plotkinja. *Zbornik radova* (Harapin, I., Kos, J. (ur.). Zagreb: Veterinarski fakutet, pp. 267-274.

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Branimira Špoljarić (djevojački Ževrnja) rođena je 26. lipnja 1981. godine u Splitu. Maturirala je u Prvoj gimnaziji u Splitu 1999. godine. Iste godine upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirala 2006. godine. U studenom 2008. godine zaposlena je u svojstvu znanstvene novakinje na projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta “Smanjena plodnost mliječnih goveda”, na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta. Akademske godine 2009/2010 upisuje doktorski studij “Veterinarske znanosti” na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U srpnju 2014. postaje asistenticom na istoj Klinici. Suradnica je u nastavi na nekoliko kolegija, te je u svojstvu partnera sudjelovala u izvedbi projekata, od kojih su najvažniji već spomenuti o reprodukciji mliječnih goveda, te međunarodni projekti FP7 o reprodukciji koza i SEEERA o reprodukciji ovaca. Autor i koautor je desetak znanstvenih i stručnih radova objavljenih u domaćim i stranim časopisima. Sudjelovala je na nekoliko domaćih i međunarodnih kongresa. Govori engleski i talijanski jezik. Udata je i majka jednog djeteta.

Popis objavljenih radova autora

LOJKIĆ, M., I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, M. MATKOVIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, N. MAČEŠIĆ, I. FOLNOŽIĆ, **B. ŠPOLJARIĆ** (2012): Effect of cysteamine supplementation during in vitro culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. *Acta veterinaria (Brno)* 81, 229-234.

KOZAČINSKI, L., G. MRŠIĆ, S. SREČEC, J. GRIZELJ, S. VINCE, B. ŠPOLJARIĆ, L. PAJURIN, J. SIGURNJAK, V. SIROČIĆ, A. ČUK, Ž. CVRTILA FLECK, M. ŽIVKOVIĆ, K. ŠPIRANEC, D. ŠPOLJARIĆ, M. J. ČOP, I. ŠPOLJARIĆ, D. MIHELIĆ, M. POPOVIĆ (2014): Kemijska ocjena kakvoće mlijeka podrijetlom od ovaca hranjenih s dodatkom pripravka plemenite pečurke *Agaricus bisporus*. *Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis* 45, 239-248.

GRIZELJ, J., S. VINCE, M. SAMARDŽIJA, A. GONZALEZ DE BULNES, T. DOVENSKI, L. TURMALAJ, **B. ŽEVRNJA** (2013): Use of ultrasonography to detect ovarian response in goats submitted to multiple ovulation and embryo transfer program. Veterinarski arhiv 83, 125-134.

ŠPOLJARIĆ, B., G. ŠTIBRIĆ, D. GEREŠ (2013): Comparison of two protocols for synchronization of ovulation on dairy farm in Croatia. Zbornik predavanja Naučnog simpozijuma „Reprodukcija domaćih životinja“, 10.-13. Listopada, Divčibare, Srbija, pp. 136-145.

GRIZELJ, J., S. VINCE, **B. ŽEVRNJA**, T. DOVENSKI, L. KOZAČINSKI, M. LAZAREVIĆ, E. THEODOSIADOU, F. SAMARTZI (2012): INDI_SHEEP TRADI_CHEESE, europski istraživački projekt: održiva proizvodnja tradicionalnih sireva od mlijeka lokalnih pasmina ovaca u regiji: 1. poboljšanje reproduktivnog managementa populacija autohtonih pasmina ovaca, 2. osiguranje higijene i kakvoće sira. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 43, 183-187.

GEREŠ, D., **B. ŽEVRNJA**, D. ŽUBČIĆ, R. ZOBEL, B. VULIĆ, N. STAKLAREVIĆ, K. GRACIN (2011): Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows. Veterinarski arhiv 81, 187-198.

VUČKOVIĆ, T., N. PRVANOVIĆ, J. GRIZELJ, T. DOBRANIĆ, I. GETZ, **B. ŽEVRNJA**, M. SAMARDŽIJA (2010): Plodnost u ždrebećem estrusu na državnoj ergeli lipicanske pasmine “Đakovo”. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 41, 47-56.

GEREŠ, D., R. TURK, D. ŽUBČIĆ, B. VULIĆ, N. STAKLAREVIĆ, **B. ŽEVRNJA** (2009): Influence of nutrition in the postparturient period on the fertility of dairy cows. Veterinarski arhiv 79, 119-130.

VINCE, S., **B. ŽEVRNJA**, A. BECK, I. FOLNOŽIĆ, D. GEREŠ, M. SAMARDŽIJA, J. GRIZELJ, T. DOBRANIĆ (2011): Unilateral segmental aplasia of the uterine horn in a gravid bitch- a case report. Veterinarski arhiv 81, 691-698.

ĐURIČIĆ, D., T. DOBRANIĆ, J. GRIZELJ, I. GETZ, S. VINCE, I. FOLNOŽIĆ, **B. ŽEVRNJA**, M. LIPAR, M. SAMARDŽIJA (2010): Retencija mekonija u ždrjebadi. Veterinarska stanica 41, 363-367.