

Primjena GnRH i PGF za indukciju estrusa i sinkronizaciju ovulacije u mliječnih krava

Meglić, Patrik

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:570644>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Patrik Meglič

**Primjena GnRH i PGF za indukciju estrusa i sinkronizaciju ovulacije u
mliječnih krava**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

KLINIKA ZA PORODNIŠTVO I REPRODUKCIJU

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom mentora doc. dr. sc. Branimire Špoljarić i izv. prof. dr. sc. Silvija Vince.

Klinika za porodništvo i reprodukciju

Predstojnik: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori rada:

doc. dr. sc. Branimira Špoljarić

izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Ivan Folnožić

2. izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince

3. doc. dr. sc. Branimira Špoljarić

4. prof. dr. sc. Marko Samardžija (zamjena)

ZAHVALA

Srdačno zahvaljujem svojim mentorima doc. dr. sc. Branimiri Špoljarić i izv. prof. dr. sc. Silviju Vince na strpljenju, pomoći, podršci i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala svim kolegama, a posebno prijateljima na dobrom društvu. Zbog njih će mi studij uvijek ostati u lijepom sjećanju.

Veliko hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci tijekom studiranja.

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

CIDR- *controlled internal drug release*

eCG- konjski korionski gonadotropin (*equine chorionic gonadotropin*)

FSH- folikulostimulirajući hormon

FTAI- umjetno osjemenjivanje u točno određeno vrijeme (*fixed timed artificial insemination*)

GnRH- gonadotropin releasing hormone

hCG- humani korionski gonadotropin (*human chorionic gonadotropin*)

HSP90- protein toplinskog stresa 90 (*heat shock protein 90*)

IGF- inzulinu nalik čimbenik rasta (*insulin-like growth factor*)

IGFBP 2- vezujući protein inzulinu nalik čimbenika rasta 2 (*insulin-like growth factor binding protein 2*)

LH- luteinizirajući hormon

PGF2 α - prostaglandin F2 α

PRID- *progesterone releasing intravaginal device*

TAI- vremenski planirano umjetno osjemenjivanje (*timed artificial insemination*)

TGF2- transformirajući čimbenik rasta 2 (*transforming growth factor*)

UO- umjetno osjemenjivanje

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. SPOLNI CIKLUS KRAVA.....	2
2.1. Faze spolnog ciklusa.....	2
2.2. Pubertet.....	4
2.3. Folikularna dinamika.....	4
2.4. Hormonalna regulacija.....	7
3. METODE OTKRIVANJA ESTRUSA KOD KRAVA I UMJETNO OSJEMENJIVANJE	12
4. INDUKCIJA ESTRUSA I SINKRONIZACIJA OVULACIJE	14
4.1. Hormoni.....	14
4.2. Sinkronizacija ovulacije.....	18
5. RASPRAVA	26
5.1. Upotreba u junica i krava.....	26
5.2. Liječenje neplodnosti.....	28
6. ZAKLJUČAK.....	31
7. LITERATURA	32
8. SAŽETAK	36
9. SUMMARY	37
10. ŽIVOTOPIS.....	38

1. UVOD

Dobra plodnost preduvjet je uspješnog mliječnog govedarstva. Dugogodišnja selekcija krava na visoku mliječnost rezultirala je osjetnim padom plodnosti. Nadalje, intenzifikacija proizvodnje onemogućava jednostavnu i pravovremenu detekciju estrusa, što povećava ionako negativan učinak na plodnost. Razumijevanjem fiziologije spolnog ciklusa krava, uz kontrolu dinamike folikula na jajnicima pomoću ultrazvuka, omogućeno je korištenje hormonalnih sinkronizacijskih protokola koji imaju za cilj inducirati i sinkronizirati estrus i sinkronizirati ovulaciju. Najčešće korišteni pripravci su sintetski analozi gonadotropnog releasing hormona (GnRH) u kombinaciji s prirodnim ili sintetskim analogima prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Ukratko, GnRH ima ulogu potaknuti rast i razvoj folikula, dok $PGF_{2\alpha}$, djelujući luteolitički, omogućava razvoj novog spolnog ciklusa. Upravo se ova dva hormona najčešće koriste u raznim protokolima sinkronizacije koji omogućuju umjetno osjemenjivanje u točno određeno vrijeme, minimizirajući i eliminirajući potrebu za detekcijom estrusa, ali i u programima resinkronizacija, nakon rane detekcije negravidnih krava. Navedeni postupci u konačnici imaju za cilj povećati plodnost, skraćanjem servis perioda i međutelidbenog razdoblja, unatoč reproduktivnim problemima koji su prateća pojava mliječnog govedarstva. Također, njihova primjena je našla i mjesto u liječenju određenih stanja neplodnosti u mliječnih krava.

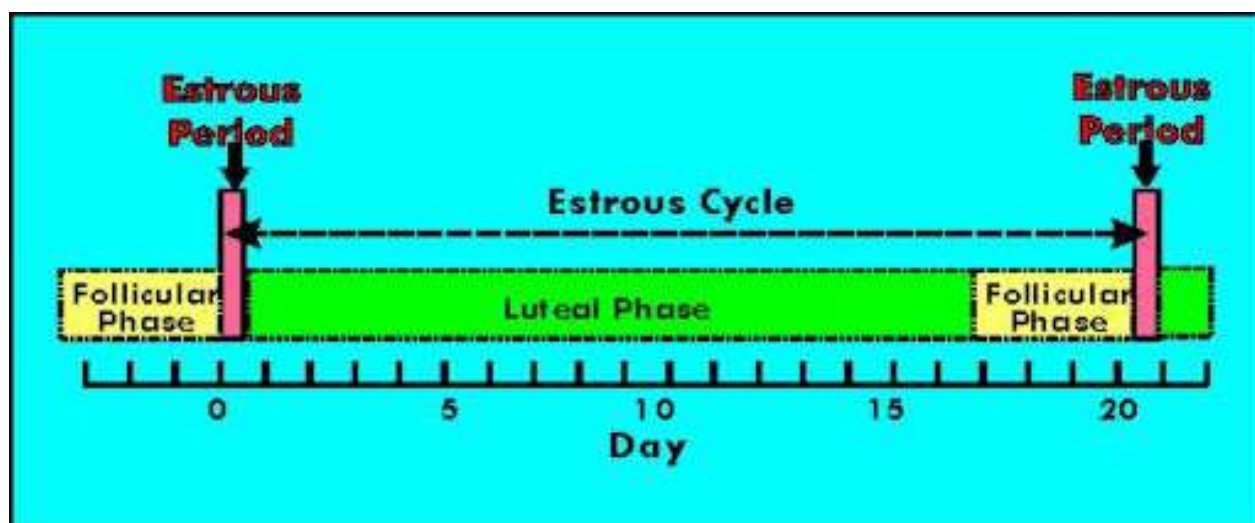
Cilj ovog rada je dati pregled dostupne literature o primjeni GnRH i $PGF_{2\alpha}$ za indukciju estrusa i sinkronizaciju ovulacije u mliječnih krava.

2. SPOLNI CIKLUS KRAVA

2.1. FAZE SPOLNOG CIKLUSA

Spolni ciklus je razdoblje od početka jednog do početka drugog estrusa (ROBINSON i NOAKES, 2019). U normalnim uvjetima krave su poliestrične životinje kroz cijelu godinu. Poslije puberteta ciklička aktivnost će se kontinuirano odvijati osim za vrijeme graviditeta, 3 do 6 tjedana poslije poroda, tijekom perioda ozbiljnog negativnog energetskeg balansa (vidljivo tijekom vrhunca proizvodnje mlijeka) i kod određenih patoloških poremećaja (ROBINSON i NOAKES, 2019). Junice ulaze u pubertet za vrijeme prvog estrusa kojem zatim slijedi normalna lutealna faza ciklusa. Poznato je da se početak puberteta i prva ovulacija ne moraju dogoditi istovremeno kod većine junica. Nakon prve ovulacije često se javljaju kratki ciklusi i estrusi bez ovulacije prije nego što reproduktivni sustav postane potpuno funkcionalan (JAINUDEEN i HAFEZ, 2000). Vrijeme kada junice ulaze u pubertet pod utjecajem je čimbenika kao što su: tjelesna masa i kondicija, pasmina, prehrana, genetika i doba godine (ESTILL, 2015). Kod junica mliječnih pasmina hranjenih preporučenim količinama hrane pubertet u prosjeku započinje s 10 do 12 mjeseci (JAINUDEEN i HAFEZ, 2000). Spolni ciklus krava u prosjeku traje 20 dana (može trajati u rasponu od 18-22 dana), dok kod junica spolni ciklus prosječno traje 21 dan (može trajati u rasponu od 18-24 dana) (ROBINSON i NOAKES, 2019). Estrus je razdoblje spolnog ciklusa koje se periodički javlja kod krava koje nisu steone. To je razdoblje karakterizirano pojačanom spolnom aktivnošću i u tom vremenu krave i junice prihvaćaju skokove bikova (VANN, 2015). Dugo se godina smatralo da je prosječna duljina trajanja estrusa oko 15 sati s varijacijama od 2 do 30 sati. Međutim danas postoje dokazi da je vrijeme estrusa kod modernih Holstein krava mnogo kraće te se vjeruje da je kod njih prosječna duljina estrusa oko 8 sati (ROBINSON i NOAKES, 2019). Mnogo je čimbenika koji utječu na duljinu trajanja estrusa. Neki od njih su: pasmina, doba godine, prisutnost bika, prehrana, mliječnost, način držanja te broj drugih krava u estrusu (ROBINSON i NOAKES, 2019). Krave su jedinstvene u usporedbi s drugim farmskih životinja zato što ovulacija kod njih nastupa 10 do 12 sati nakon prestanka znakova estrusa, odnosno u prosjeku 30 sati nakon prvih znakova estrusa (JAINUDEEN i HAFEZ, 2000). Spolni se ciklus tradicionalno dijeli u nekoliko faza. Folikularna faza ciklusa obuhvaća proestrus i estrus. U toj se fazi na jajnicima odvija rast folikula uz odsutnost žutog tijela. Glavni hormon ove faze spolnog ciklusa je estrogen (ROBINSON i NOAKES, 2019). U folikularnoj fazi ciklusa predovulatorni folikul pojačano raste

i za to vrijeme proizvodi velike količine estrogena koji je odgovoran za estrusno vladanje i pulzatorni val luteinizirajućeg hormona. U jednom trenutku količina estrogena dosegne dovoljnu koncentraciju što onda potakne pulzatorni val luteinizirajućeg hormona (LH) nakon kojeg slijedi ovulacija za 24 do 32 sata (WILTBANK i sur., 2002). Folikularna faza ciklusa kod krava najčešće traje 3 do 6 dana (HAFEZ i HAFEZ, 2000). Nakon ovulacije iz preostalih folikularnih stanica razvija se žuto tijelo te dolazi do porasta koncentracije progesterona u krvi kako žuto tijelo postupno raste. Povećana koncentracija progesterona prisutna za vrijeme života žutog tijela ključna je za embrionalni razvoj i čuvanje graviditeta. Visoka koncentracija progesterona također blokira pulzatorni LH val i ovulaciju (WILTBANK i sur., 2002). Faza ciklusa u kojoj postoji funkcionalno žuto tijelo naziva se lutealna faza ciklusa i kod krava traje najčešće između 16 do 17 dana (HAFEZ i HAFEZ, 2000). Do regresije žutog tijela dolazi kada maternica ne gravidnih krava počinje izlučivati $PGF_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (WILTBANK i sur., 2002). Nakon luteolize razina folikulostimulirajućeg hormona iz hipofize počinje rasti te započinje novi ciklus (LOJKIĆ, 2016). Budući da je kod većine naših domaćih životinja estrus jedina vidljiva faza ciklusa postoji tendencija da se ciklus podjeli na estrus i interestrus (ROBINSON i NOAKES, 2019).



Slika 1. Spolni ciklus krave (izvor: animalbiosciences.uoguelph.ca)

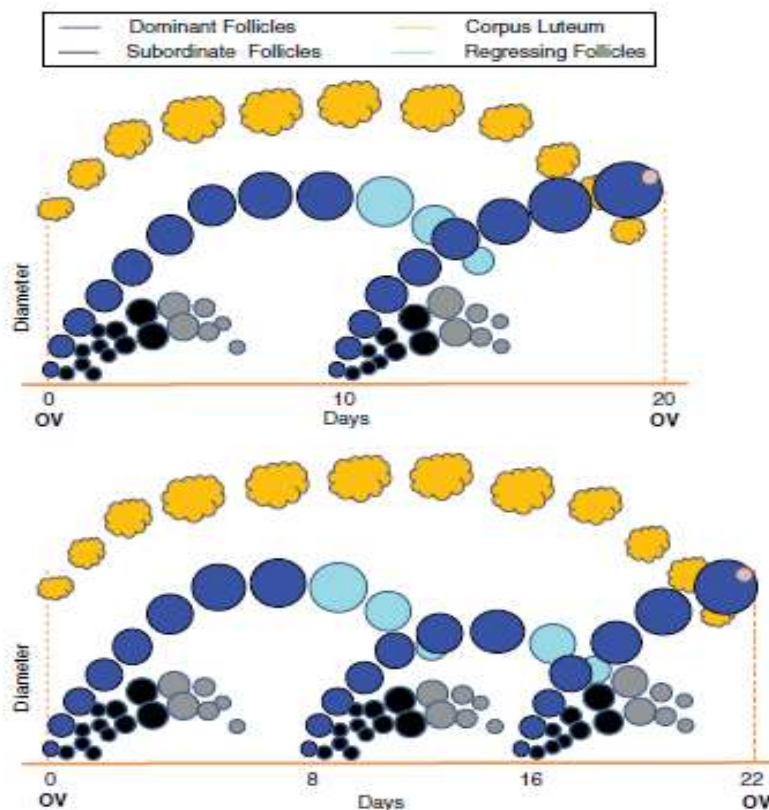
2.2. PUBERTET

Pubertet je proces kroz koji jedinke postaju spolno zrele. Uključuje promjene u ponašanju te fiziološke promjene koje su uzrokovane aktivacijom gonada (AMSTALDEN i WILLIAMS, 2015). Za vrijeme puberteta koncentracija progesterona u krvi ukazuje na cikličku aktivnost jajnika prije pojave prvog vidljivog estrusa. Zbog toga pubertet možemo definirati kao prvi dan kada koncentracija serumskog progesterona pređe 1 ng/mL. Smatra se da je kod junice pubertet započeo nakon prvog estrusa poslije kojeg je uslijedila normalna lutealna faza. Kod junica pubertet započinje kada osovina hipotalamus-hipofiza-jajnici izgubi senzitivnost na negativnu povratnu spregu estrogena što onda omogućava pulzatorni val luteinizirajućeg hormona (ESTILL, 2015). Kada ženka uđe u pubertet genitalni organi postaju veći. U vrijeme razvoja prije puberteta rast genitalnih organa sličan je rastu svih ostalih organa u tijelu. Za vrijeme puberteta rast genitalnih organa se ubrza te maternica i jajnici povećaju svoju masu u prosjeku za 72% odnosno 32%. Krave u pubertet najčešće ulaze između sedmog i osamnaestog mjeseca starosti (LEA i ENGLAND, 2019). Folikularni valovi ne javljaju se samo kod cikličkih krava (WILTBANK i sur., 2002). Prihvaćena je spoznaja da se pubertet i prva ovulacija ne moraju dogoditi u isto vrijeme. Kod većine junica uobičajene su "tihe" ovulacije s kratkim lutealnim fazama koje se događaju u vremenu prije puberteta (ESTILL, 2015). Ponavljana ultrazvučna snimanja jajnika ženske teladi i junica starih između 2 i 36 tjedana pokazali su folikularni razvoj u obliku folikularnih valova od kojih svaki traje između 7-9 dana. Kako životinje rastu tako raste promjer dominantnog folikula te raste razlika između dominantnog folikula i najvećeg subordinantnog folikula (DRIANCOURT, 2000).

2.3. FOLIKULARNA DINAMIKA

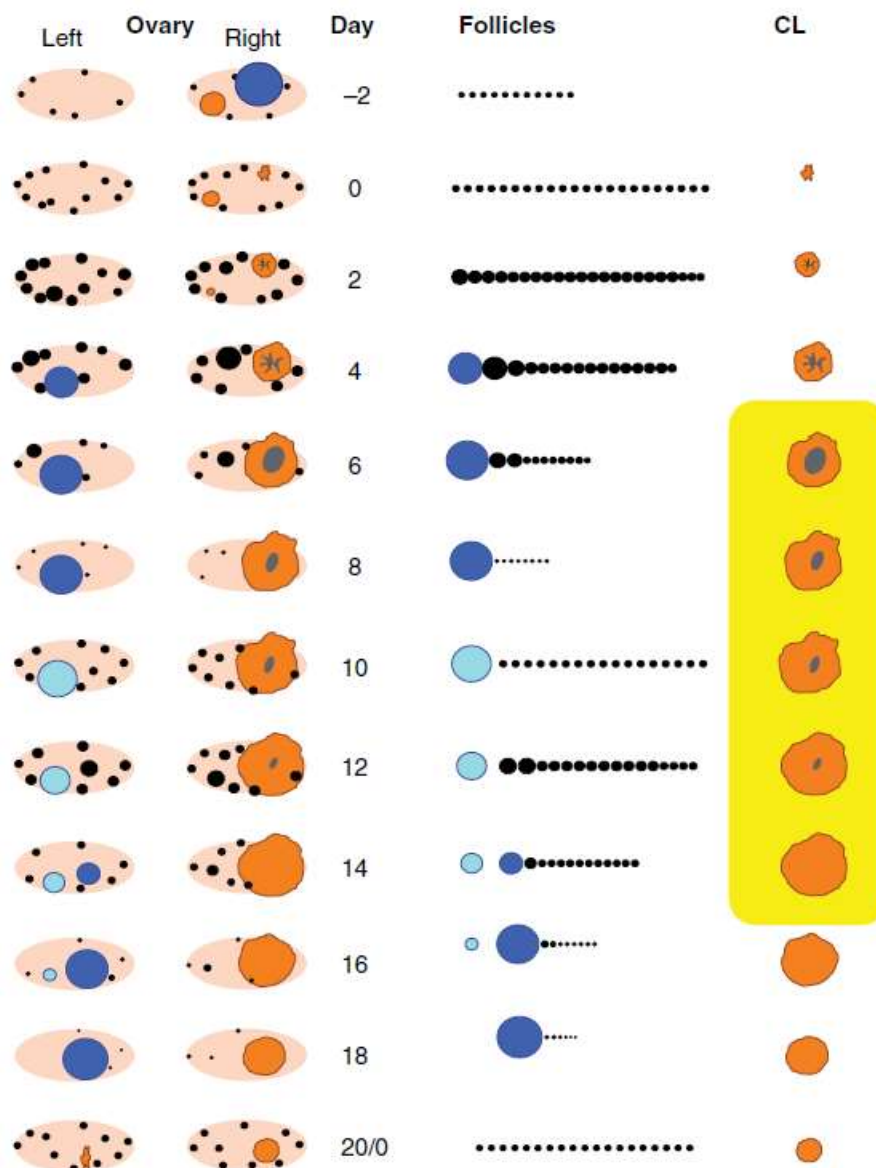
Bez obzira na fiziološko stanje u kojem se nalaze, jajnici svih vrsta životinja posjeduju veliku zalihu primordijalnih folikula, nešto manju populaciju preantralnih folikula (100-1000) te oko 50-300 antralnih folikula (DRIANCOURT, 2000). Tkiva ženskog reproduktivnog sustava poput jajnika i žutog tijela neka su od najbrže rastućih tkiva u odraslih ženskih životinja te su također jedna od rijetkih tkiva koja se odlikuju periodičkim rastom i regresijom (FRICKE, 2001). U zadnjih tridesetak godina ultrazvučna je dijagnostika uvelike pomogla u istraživanju razvoja folikularnih valova te sazrijevanja folikula do predovulatorne veličine (DRIANCOURT, 2000).

Transrektalna ultrazvučna dijagnostika omogućava neinvazivno proučavanje i mjerenje folikula veličine od 3 mm neovisno o njihovoj poziciji na jajniku (FRICKE, 2001). Istraživanja su pokazala da postoje životinje koje pokazuju cikluse s dva folikularna vala kao i s tri folikularna vala. Kod životinja s dva folikularna vala prvi val započinje prvog dana ciklusa dok se drugi javlja devetog ili desetog dana ciklusa. Kod životinja s tri folikularna vala valovi se javljaju prvog, osmog i šesnaestog dana ciklusa (ROBINSON i NOAKES, 2019). Kod životinja čiji ciklus ima dva folikularna vala do luteolize dolazi ranije (16. dana) za razliku od životinja s tri folikularna vala (19. dana). Regresija žutog tijela direktno utječe na duljinu ciklusa pa tako životinje s dva vala imaju ciklus koji traje 20 dana dok one s tri vala imaju ciklus koji traje 23 dana. Zbog toga se uzima da uobičajeni ciklus kod krava traje 21 dan, to je zapravo prosjek duljine trajanja ciklusa životinja koje imaju dva ili tri folikularna vala (ADAMS i SINGH, 2015).



Slika 2. Spolni ciklus s dva folikularna vala vs. spolni ciklus s tri folikularna vala (izvor: ADAMS i SINGH, 2015)

Ubrzo nakon ovulacije grupa malih folikula započinje svoj rast na jajniku i to označavamo kao početak folikularnog vala. Iz te grupe folikula izabire se jedan, dominantni folikul koji nastavlja rasti dok ostali folikuli iz te grupe podliježu regresiji. Međutim u to vrijeme ciklusa prisutno je funkcionalno žuto tijelo te visoka koncentracija progesterona što onemogućava pulzatorni LH val, estrusno ponašanje te ovulaciju. Prvi dominantni folikul postat će nefunkcionalan i oko sredine ciklusa započet će drugi folikularni val. Dominantni folikul iz drugog folikularnog vala doseže ovulatornu veličinu za vrijeme regresije žutog tijela što omogućava njegovu ovulaciju (WILTBANK i sur., 2002). Faza folikularnog vala u kojem započinje rast kohorte folikula naziva se faza regrutacije. Kod goveda je to najčešće skupina od 5 do 10 folikula. Regrutiraju se samo folikuli ovisni o gonadotropnim hormonima, odnosno oni čiji je promjer veći od 2 mm. Svi folikuli odabrani u ovoj fazi potencijalno mogu biti ovulatorni folikuli (DRIANCOURT, 2000). U vrijeme faze selekcije odabire se dominantni folikul. Ostali folikuli iz kohorte postaju subordinatni folikuli i podliježu atreziji što se očituje kao prestanak rasta i postojano smanjenje njihove veličine. Parametri koji utječu na preživljavanje odabranog folikula opsežno se istražuju. Pretpostavlja se da najveći folikul iz kohorte ima najveću vjerojatnost da bude odabran te da ovulira, ali proces je ipak mnogo kompleksniji. Vrlo je značajno to što kod velikog broja domaćih životinja pa tako i kod krava, folikul koji prvi razvije receptore za luteinizirajući hormon bude odabrani folikul u fazi selekcije (DRIANCOURT, 2000). Za vrijeme faze dominacije odvija se maturacija i rast preovulatornog folikula. U ovoj fazi ostali folikuli iz kohorte potpuno atreziraju te nema regrutacije nove kohorte folikula. Postoji direktna veza između prisutnosti dominantnog folikula i prestanka regrutacije zato što je dokazano da kauterizacijom dominantnog folikula odmah započinje novi val regrutacije (DRIANCOURT, 2000). Pod utjecajem progesterona (za vrijeme diestrusa ili graviditeta) dominantni folikuli prvog ili prvog i drugog folikularnog vala kod životinja s tri folikularna vala podliježu atreziji. Dominantni folikul koji je prisutan u vrijeme luteolize postaje ovulatorni folikul i početak novog folikularnog vala odgođen je sve do njegove ovulacije (ADAMS i SINGH, 2015).



Slika 3. Folikularna dinamika na jajnicima. Tamno plava točka-dominantni folikul koji raste, svijetlo plava točka-dominantni folikul koji atrezira, crne točke-subordinarni folikuli, narančasti oblik-žuto tijelo (izvor: ADAMS i SINGH, 2015)

2.4. HORMONALNA REGULACIJA

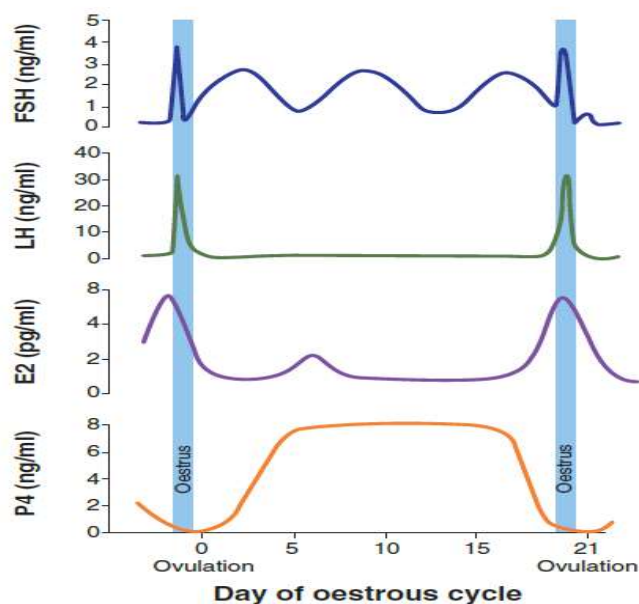
Neuroendokrina kontrola spolnog ciklusa uključuje integraciju mnogih regulatornih signala. Ti signali tvore kompleksnu mrežu koja omogućava preciznu kontrolu izlučivanja hormona potrebnih za razvoj folikula, steroidogenezu i ovulaciju. Izlučivanje gonadotropnog

releasing hormona (GnRH) u portalni krvotok osovine hipotalamus-hipofiza (adenohipofiza) smatra se primarnim endokrinološkim mehanizmom koji regulira sintezu i otpuštanje gonadotropina. Unutarnji čimbenici poput metaboličkih hormona te hormona gonada, faktori rasta te signalne molekule i vanjski čimbenici poput okolišnih kemikalija, fotoperiod i stresori percipiraju se u središnjem živčanom sustavu te direktno ili češće indirektno kontroliraju izlučivanje GnRH. Zbog stimulacije GnRH hipofiza izlučuje i otpušta folikulostimulirajući hormon (FSH) i LH (AMSTALDEN i WILLIAMS, 2015). Nastanak folikularnih valova potaknut je blagim porastom cirkulirajućeg FSH. Ako do tog porasta ne dođe ili porast FSH bude odgođen, folikularni val neće započeti ili će biti odgođen (ROBINSON i NOAKES, 2019). Veličina folikula koji ulaze u fazu regrutacije usko je povezana s trenutkom kada je kod njih prvi puta moguće detektirati aromatazu. Kod goveda je to najčešće veličina između 3-4 mm. To je ključan korak u sazrijevanju folikula zato što aromataza omogućava da folikuli stvaraju estradiol iz androgenih prekursora iz theca stanica (DRIANCOURT, 2000). Općenito je prihvaćeno da je FSH glavni hormon zadužen za regulaciju regrutacije kod većine životinja (DRIANCOURT, 2000). Glavni učinci FSH su induciranje aktivnosti aromataze u granulosa stanicama, što objašnjava zašto folikuli postaju sposobni proizvoditi estradiol, stimulirati proizvodnju inhibina i folistatina te započeti sprječavanje genskog kodiranja za vezajući protein inzulinu nalik čimbenika rasta 2 (eng. *insulin-like growth factor-binding protein 2*, IGFBP2) (DRIANCOURT, 2000). Promjena koncentracije FSH za vrijeme ciklusa ima bitnu ulogu u određivanju uzorka rasta folikula. Svim folikularnim valovima prethodi porast koncentracije FSH (WILTBANK i sur., 2002). Porast koncentracije FSH ubrzo nakon ovulacije povezan je s pojavom prvog folikularnog vala i u vrijeme kada folikuli dosegnu veličinu od 4 mm koncentracija FSH je na vrhuncu. Nakon što folikularni val započne, folikuli počinju rasti, a koncentracija cirkulirajućeg FSH počinje padati te doseže najniže koncentracije u vrijeme selekcije dominantnog folikula (WILTBANK i sur., 2002). Luteinizirajući hormon ima minimalnu ulogu u fazi regrutacije (DRIANCOURT, 2000). Dva lokalno proizvedena spoja također imaju ulogu u procesu regrutacija: inzulinu nalik čimbenici rasta (*insulin-like growth factors*, IGF) i folistatin (DRIANCOURT, 2000). Selekcija se može definirati kao proces u kojem postoji najveća razlika u stopi rasta između najvećeg folikula i drugog najvećeg folikula u folikularnom valu (WILTBANK i sur., 2002). U procesu selekcije dominantnog folikula postoje dvije teorije koje objašnjavaju uključene mehanizme. Prva teorija tvrdi da je mehanizam selekcije kontroliran jedino endokrinim mehanizmima (smanjenje

raspoloživosti FSH) dok druga teorija tvrdi da najveći folikul stvara spojeve koji direktno inhibiraju razvoj ostalih folikula u kohorti. Budući da te dvije teorije ne isključuju jedna drugu smatra se da kod krava oba mehanizma imaju ulogu u procesu selekcije. Teorija koja govori da je pad koncentracije FSH, koji se događa 2 do 3 dana nakon regrutacije, ključni mehanizam u procesu selekcije poduprta je opservacijom da postoji čvrsta veza između pada koncentracije FSH i početka selekcije. Pad koncentracije FSH uzrokovan je kombiniranim učinkom inhibina i estradiola koje proizvode folikuli veći od 5 mm te negativnom povratnom spregom djeluju na hipofizu (DRIANCOURT, 2000). Folikuli izlučuju dva spoja koji imaju inhibitorni učinak na FSH, inhibin i estradiol. Smatra se da inhibin izlučuju folikuli svih veličina, dok estradiol izlučuje samo dominantni folikul. FSH doseže svoju maksimalnu koncentraciju u vrijeme regrutacije zato što je tada prisutna mala količina inhibina i estradiola. Kako folikularni val napreduje, veći folikuli počinju proizvoditi inhibin koji ima inhibitorni učinak na izlučivanje FSH, a svoju najnižu razinu FSH doseže u vrijeme selekcije dominantnog folikula, kada je on velik oko 8.5 mm. Razina estradiola također raste u vrijeme selekcije i to je zaslužno za dodatnu inhibiciju izlučivanja FSH. Estradiol je sam vrlo slab inhibitor izlučivanja FSH, međutim u sinergiji s inhibinom ima vrlo jak učinak (WILTBANK i sur., 2002). Međutim postoje podaci da FSH nije jedini čimbenik u mehanizmu selekcije. Dokazan je smanjen učinak egzogeno apliciranih gonadotropnih hormona na subordinantne folikule kod krava koje imaju dominantni folikul, što pokazuje da dominantni folikul posjeduje mehanizam da smanji osjetljivost manjih folikula prema apliciranim hormonima. Direktan inhibitorni učinak folikularne tekućine na rast i sazrijevanje folikula dokazan je u *in vivo* i *in vitro* pokusima što dokazuje prisutnost bio-aktivnih tvari u folikularnoj tekućini. Neke tvari koje bi mogle stvarati opisane efekte su transformirajući čimbenik rasta α (*transforming growth factor α* , TGF α), inhibin, superoksid dizmutaza ili protein toplinskog šoka 90 (*heat shock protein 90*, HSP 90). Sve navedene tvari imaju sposobnost smanjiti aktivnost aromataze. Potrebno je dodatno istražiti izlučuju li dominantni folikuli sve navedene tvari u dovoljnoj količini da utječu na proces selekcije (DRIANCOURT, 2000). Opće je prihvaćena teorija da je luteinizirajući hormon ključni hormon uključen u završni rast dominantnog folikula za vrijeme dok ostali folikuli iz kohorte podliježu atreziji. Postoje brojna istraživanja koja podupiru ovu teoriju (DRIANCOURT, 2000). Kod pothranjenih krava, niska frekvencija pulseva LH bila je povezana sa smanjenom veličinom dominantnog folikula. Nadalje, tretiranje krava s GnRH agonistima, koji suprimiraju LH pulseve, blokira rast folikula u fazi kada on postaje dominantan, odnosno kada

doseže 8-9 mm. Kod GnRH imuniziranih krava kojima je suplementiran režim gonadotropnih hormona, aplikacija LH bila je potrebna tek kada folikul dosegne veličinu od 8 mm kako bi mogao narasti do ovulatorne veličine. Ovo posljednje istraživanje potvrđuje podatke da folikuli koji dosegnu 8 mm, u svojim granulozama stanicama, posjeduju poruku u mRNA za kodiranje LH receptora ili LH receptore same. Ovi podaci dokazuju da je razvoj LH receptora u granulozama stanicama usko povezan s nastankom folikularne dominacije (DRIANCOURT, 2000). Da je razvoj LH receptora vrlo usko povezan s nastankom folikularne dominacije potkrepljuje istraživanje koje je dokazalo da je razliku u ekspresiji mRNA za kodiranje LH receptora moguće dokazati u dva najveća folikula 8 sati prije nego se može uočiti razlika u veličini ili detektirati razlika u koncentraciji estradiola između ta dva folikula (WILTBANK i sur., 2002). Pokazalo se da neke promjene u dominantnom folikulu, osim stvaranja LH receptora u granulozama stanicama, omogućavaju da izlučuje veće količine estradiola i da napreduje brže od subordinantnih folikula. Dominantni folikul stvara dominaciju tako što negativnom povratnom spregom smanjuje količinu cirkulirajućeg FSH, ali u isto vrijeme mora razviti mehanizme za nastavak rasta u uvjetima smanjene koncentracije FSH. Povećava se broj dokaza koji ukazuju da IGF vjerojatno igra ulogu u selekciji dominantnog folikula. Vjeruje se da IGF igraju bitnu ulogu u rastu folikula stimulirajući proliferaciju stanica granuloze i djelujući sinergistički s gonadotropinima da promoviraju diferencijaciju folikularnih stanica (FORTUNE i sur., 2001). Dominantni folikuli izrazito su osjetljivi na LH, stoga promjene u pulzatornoj sekreciji LH utječu na njihov razvoj odnosno prestanak dominacije. Prestanak dominacije moguće je inducirati udvostručenjem koncentracije cirkulirajućeg progesterona što uzrokuje smanjene frekvencije pulseva luteinizirajućeg hormona za 50%. Takvi uvjeti podudaraju se s vremenom prestanka dominacije u prvom folikularnom valu, kada je između sedmog i desetog dana koncentracija progesterona na vrhuncu, a frekvencija LH pulseva je minimalna (DRIANCOURT, 2000). Dominantni folikul završnog folikularnog vala (drugog ili trećeg) odgovara na smanjenu koncentraciju progesterona zbog luteolize i posljedično povećanje frekvencije LH pulseva tako što pojačano luči estrogen. Pojačano lučenje estrogena uzrokuje završni pulzatorni val luteinizirajućeg hormona što dovodi do ovulacije dominantnog folikula (FORTUNE i sur., 2001). Folikuli ovuliraju kada dosegnu veličinu između 12 i 20 mm (ROBINSON i NOAKES, 2019). Žuto se tijelo stvara ubrzo nakon ovulacije, a formira se iz granulozu i theca stanicu Graafovog folikula koji je ovulirao. Intenzivna angiogeneza omogućava da se za 10 do 12 dana, masa žutog tijela poveća do dvadeset puta (ROBINSON i NOAKES,

2019). Hormoni koji su vjerojatno najzaslužniji za formiranje žutog tijela su prolaktin i luteinizirajući hormon međutim, stimulans za formiranje i održavanje žutog tijela varira od vrste do vrste (ROBINSON i NOAKES, 2019). Prisutstvo funkcionalnog žutog tijela i njegova proizvodnja progesterona inhibira pojavu estrusa pomoću negativne povratne sprege progesterona na hipotalamus. To je prvenstveno vidljivo za vrijeme graviditeta. Kod negravidnih životinja, estrus i ovulacija događaju se u prilično regularnim intervalima i glavnu kontrolu u toj cikličkoj aktivnosti ima žuto tijelo (ROBINSON I NOAKES, 2019). Ranih sedamdesetih godina prošlog stoljeća otkriveno je da $PGF_{2\alpha}$ prirodni luteolizirajući hormon kod krava (ADAMS i SINGH, 2015). Pulzatorno ispuštanje $PGF_{2\alpha}$ iz maternice koje započinje luteolizu dešava se 4 do 6 dana prije ovulacije. Studije su pokazale da prvih 5 do 6 dana nakon ovulacije egzogeni $PGF_{2\alpha}$ neće uzrokovati luteolizu. S druge strane, egzogeno aplicirani $PGF_{2\alpha}$ nakon šestog dana uzrokuje luteolizu kod većine žutih tijela. Smatralo se da žuto tijelo prvih 5 do 6 dana ne odgovara na $PGF_{2\alpha}$ zato što nezrela žuta tijela nemaju receptore za $PGF_{2\alpha}$. Ta teorija je pobijena zato što je otkriveno da nezrela žuta tijela posjeduju receptore za $PGF_{2\alpha}$ već s 2 dana starosti. Razlozi otpornosti nezrelog žutog tijela ostaju nerazjašnjeni, ali neki znanstvenici pretpostavljaju da zrelo žuto tijelo pozitivnom povratnom spregom pomoću lutealnog oksitocina utječe na oslobađanje $PGF_{2\alpha}$ iz endometrija što onda uzrokuje luteolizu (ADAMS i SINGH, 2015).



Slika 4. Prikaz koncentracije FSH, LH, estrogena i progesterona u ciklusu s tri folikularna vala (izvor: ROBINSON I NOAKES, 2019)

3. METODE OTKRIVANJA ESTRUSA KOD KRAVA I UMJETNO OSJEMENJIVANJE

Mnogi uzgajivači goveda svake godine u svojim stadima koriste umjetno osjemenjivanje (UO). Međutim jedan nedostatak takve tehnologije proizvodnje je potreba za otkrivanjem estrusa (VANN, 2015). Tradicionalna metoda detekcije estrusa promatranjem vremenski je vrlo neučinkovita metoda (NOWICKI i sur., 2017). Još jedan nedostatak ovakvog načina proizvodnje je taj što se kod krava može javiti tiho gonjenje ili neke životinje mogu vrlo slabo iskazivati znakove estrusa (VANN, 2015). Mnogi faktori skraćuju trajanje i smanjuju znakove iskazivanja estrusa. Povećana mliječnost, nekvalitetna prehrana, stres koji može nastati zbog visokih temperatura i smanjene dobrobiti su neki od najbitnijih čimbenika slabijeg iskazivanja znakova estrusa. U svijetu postoji tendencija da farme povećavaju broj grla, što dodatno stvara poteškoće za radnike koji otkrivaju životinje u estrusu (NOWICKI i sur., 2017). Postoje brojne metode kojima se može poboljšati i olakšati detekcija estrusa. To su pomoćne metode otkrivanja s kojima se radnicima pokušava olakšati detekcija životinja u estrusu (PARKINSON, 2019). Te metode uključuju: detektore opasivanja, oznake na korijenu repa i sakralnom dijelu leđa (boja, kreda i druge), bikove probače s markerima vezanim oko vrata i neke sofisticiranije metode koje se koriste elektroničkim uređajima za detekciju estrusa (VANN, 2015). Uz sve navedene pomoćne metode i dalje nije moguće jamčiti da će svaka krava u estrusu biti pronađena i osjemenjena. Posljednjih desetljeća uspješnost otkrivanja krava u estrusu pala je na 60% (NOWICKI i sur., 2017).



Slika 5. Metoda bojenja korijena repa i sakralnog dijela leđa. Kravama koje su u stojećem estrusu boju pobrišu krave koje ih naskakuju (izvor: PARKINSON, 2019)

Kako se mogućnost otkrivanja estrusa sve više komplicira sve se više počinju koristiti metode koje sinkroniziraju cijelo stado i zaobilaze potrebu za vizualnom detekcijom estrusa (PARKINSON, 2019). Kako bi otkrivanje estrusa postalo učinkovitije i zahtijevalo manje vremena za radnike, u reproduktivnom menadžmentu su se počeli koristiti hormonalni protokoli. Implementacija takvih protokola istodobno olakšava posao farmera i minimalizira troškove umjetnog osjemenjivanja. Hormonalni programi omogućavaju sinkronizaciju estrusa i ovulacije te uz korištenje vremenski planiranog umjetnog osjemenjivanja (*timed artificial insemination*, TAI) uklanjaju potrebu za otkrivanjem estrusa (NOWICKI i sur., 2017). Međutim potrebno je spomenuti da je postotak graviditeta kod raznih sinkronizacijskih protokola redovito niži, nego kod otkrivanja prirodnog estrusa i osjemenjivanja. Mnoga istraživanja izvještavaju o poboljšanim reproduktivnim performansama kod sinkroniziranih stada, ali to poboljšanje nastaje zbog lakšeg otkrivanja estrusa, a ne bolje plodnosti stada. Cilj svih hormonalnih protokola je izjednačiti stopu gravidnosti s onom koja se postiže osjemenjivanjem i otkrivanjem prirodnog estrusa (XU, 2002). Također razni protokoli vrlo su ovisni o tome koliko folikularnih valova u jednom ciklusu iskazuju pojedine životinje. Životinje koje iskazuju dva folikularna vala (primipare i multipare) sinkroniziraju se mnogo bolje nego one koje iskazuju tri folikularna vala (nulipare) i zbog toga velik broj protokola s TAI daje bolje rezultate kod visoko produktivnih mliječnih krava nego kod junica mliječnih pasmina (FRICKE, 2001).

4. INDUKCIJA ESTRUSA I SINKRONIZACIJA OVULACIJE

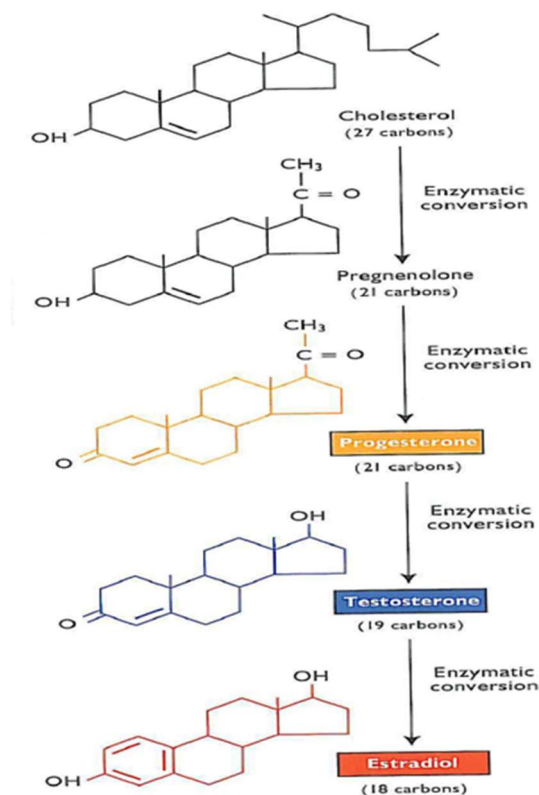
4.1. HORMONI

GnRH, kojeg sintetiziraju stanice hipotalamusa je neurohormon odgovoran za kontrolu izlučivanja hormona adenohipofize (LAVEN, 2019). Hipotalamični hormoni su hormoni koje proizvode neuroni u hipotalamusu. Njihova je uloga potaknuti izlučivanje hormona iz adenohipofize. Primarni otpuštajući hormon reproduktivnog sustava je GnRH. Neuropeptidi hipotalamičnog podrijetla su vrlo male molekule koje se sastoje od manje od dvadeset aminokiselina (SENGER, 2012). Sedamdesetih godina prošlog stoljeća započela je proizvodnja sintetičkih analoga GnRH te su provedena mnoga istraživanja o učinku GnRH i njegovih analoga na kontrolu reprodukcije (LAVEN, 2019). Aplikacija GnRH inducira brz porast koncentracije FSH i LH neovisno o koncentraciji progesterona ili faze folikularnog vala. Učinak GnRH na postojeći folikularni val ovisan je o prisutnosti dominantnog folikula. GnRH apliciran nakon selekcije dominantnog folikula uzrokovat će njegovu ovulaciju i početak novog vala 1.5 do 2 dana kasnije. Međutim ako se GnRH aplicira prije selekcije dominantnog folikula neće biti učinka na postojeći folikularni val vjerojatno zato što u to vrijeme folikuli još ne posjeduju LH receptore u granulosa stanicama (KASIMANICKAM, 2015). Kod krava su se GnRH i njegovi analozi koristili za tretiranje cistične bolesti jajnika, odgodu luteolize i stimulaciju ovulacije. Danas se GnRH koristi kao neizostavni dio hormonalnih programa koji kontroliraju vrijeme ovulacije kao što je Ovsynch (LAVEN, 2019).

Prostaglandini su lipidi koji se sastoje od 20 ugljičnih hidroksi nezasićenih masnih kiselina te nastaju iz arahidonske kiseline. Postoji najmanje šest prostaglandina i velik broj različitih metabolita koji imaju široki spektar metaboličkih aktivnosti. Na primjer prostaglandin E₂ (PGE₂) snizuje krvni tlak, dok PGF_{2α} povišuje krvni tlak. Prostaglandini još stimuliraju glatke mišiće maternice, sudjeluju u metabolizmu lipida i posreduju u procesu upale. Što se reproduktivnog sustava tiče, dva najbitnija prostaglandina su PGF_{2α} i PGE₂ (SENGER, 2012). Prostaglandini odnosno egzogeni PGF_{2α} i njegovi analozi mogu se koristiti za indukciju luteolize i manipulaciju cikličke aktivnosti jajnika (LAVEN, 2019). Jednokratna aplikacija prostaglandina uzrokuje regresiju žutog tijela starog između 7 i 18 dana. Regresija žutog tijela uzrokovat će pad koncentracije cirkulirajućeg progesterona. Pad koncentracije progesterona omogućava niz fizioloških i endokrinoloških promjena koji će na posljeticu uzrokovati pojavu estrusa i ovulaciju.

Međutim prostaglandini nisu učinkoviti u svim fazama spolnog ciklusa. Njihova aplikacija nema učinka ako je već započela prirodna luteoliza. Također, mlada žuta tijela, starosti od 1 do 5 dana nisu osjetljiva na prostaglandine te njihova aplikacija neće uzrokovati luteolizu u tom periodu spolnog ciklusa (XU, 2002). Potrebno je još naglasiti da prostaglandini uzrokuju pobačaj. Zbog toga se ne smiju koristiti kod životinja koje bi mogle biti gravidne. Ako postoji bilo kakva sumnja, uvijek je potrebno provesti dijagnostiku graviditeta prije aplikacije prostaglandina (LAVEN, 2019). Budući da je dokazano da neće sve krave iz stada odgovoriti na jednu aplikaciju prostaglandina razvijeno je nekoliko pristupa kako bi se zaobišao taj problem. Najčešći je pristup aplikacija dvije doze prostaglandina s razmakom od 11 do 14 dana. Takav pristup osigurava da su sve životinje sposobne odreagirati na drugu aplikaciju prostaglandina neovisno o tome jesu li odgovorile na prvu aplikaciju (XU, 2002). Većina će krava ući u estrus za 3 do 5 dana nakon druge aplikacije prostaglandina (LAVEN, 2019). Kada se koriste zasebno prostaglandini ne uspijevaju stvoriti usku sinkronizaciju stada. Razlog tome je taj što je vrijeme između aplikacije prostaglandina i pojave ovulacije ovisno o fazi razvoja dominantnog folikula. Učinak dominantnog folikula na program sinkronizacije prostaglandinima je vjerojatno glavni razlog zbog čega dodavanje progesterona poboljšava rezultate sinkronizacije. Progesteron u ovom slučaju kontrolira razvoj folikula. Razvoj Ovsynch programa je također potaknut ovisnošću sinkronizacijskih protokola s prostaglandinima o fazi razvoja dominantnog folikula (LAVEN, 2019).

Steroidni hormoni imaju zajednički molekularni nukleus koji se zove ciklopentanoperhidropbenantbren. Ta je molekula sastavljena od četiri prstena (A, B, C i D). Steroidi se sintetiziraju iz kolesterola kroz niz kompleksnih puteva koji uključuju mnoge enzimske pretvorbe. Steroidne molekule su seksualni promotori i uzrokuju promjene u muškom i ženskom reproduktivnom sustavu (SENGER, 2012).



Slika 6. Proces stvaranja steroidnih hormona iz kolesterola (izvor: SENGER, 2012)

Progesteron i sintetički progestageni mogu se koristiti za kontrolu spolnog ciklusa, posebno za sinkronizaciju estrusa unutar grupe životinja. Egzogeni progestageni oponašaju ulogu žutog tijela, odnosno pomoću negativne povratne sprege prema adenohipofizi suprimiraju cikličku aktivnost supresijom izlučivanja gonadotropina. Kada se egzogeni progestageni uklone, inhibicija nestaje i ponovno se vraća uobičajena ciklička aktivnost (LAVEN, 2019). Kod skupine krava u različitim fazama spolnog ciklusa, tretman progestagenima koji traje više od 14 dana, uzrokovat će pojavu estrusa unutar 2 do 3 dana nakon što se prekine davanje progestagena. Korištenje progestagena sprječava pojavu estrusnog ponašanja kod krava čija će žuta tijela proći kroz proces luteolize za vrijeme trajanja sinkronizacije sve do prestanka tretmana. Kod životinja koje se nalaze u ranoj fazi ciklusa tretman progestagenima sprječava stvaranje žutog tijela ili skraćuje životni vijek novo stvorenog žutog tijela (XU, 2002). Upotreba progestagena za sinkronizaciju estrusa kod mliječnih krava unaprijeđena je razvojem naprava za aplikaciju progestagena koje uključuju implantante norgestometa za uho, PRID (*progesterone-releasing intravaginal device*) i CIDR (*controlled*

internal drug release) spirala (XU, 2002). PRID spirale se umeću u vaginu pomoću aplikatora od kuda se progesteron otpušta i apsorbira u krvotok stvarajući koncentraciju od 3 do 5 ng/mL u perifernoj krvi (LAVEN, 2019). Najčešća negativna posljedica sinkronizacije krava s progestagenima je smanjenje uspjeha koncepcije. Što je duže vrijeme trajanja procesa sinkronizacije to će životinja biti bolje sinkronizirane, ali postotak koncepcije bit će sve niži. Istraživanja su pokazala da do smanjenja stope koncepcije dolazi zbog stvaranja perzistentnih dominantnih folikula. Doze progestagena koje se koriste u programima sinkronizacije dovoljno su visoke za supresiju estrusa i ovulacije, ali nisu efikasne za supresiju razvoja perzistentnih dominantnih folikula koji nastaju zbog nedostatka funkcionalnog žutog tijela (XU, 2002). Budući da je ovulacija inhibirana najčešće 14 dana, folikuli koji ovuliraju su stari i zbog toga su smanjene plodnosti (KASIMANICKAM, 2015). Problemi smanjene plodnosti su riješeni kombiniranjem progestagena s nekim dodatnim hormonima (LAVEN 2019). U današnje vrijeme najčešće se koristi kombinacija progestagena i $PGF_{2\alpha}$ pogotovo nakon zabrane korištenja estrogena u Europskoj Uniji (LAVEN, 2019)

Estrogeni aplicirani u vrijeme kada je prisutan folikul ovisan o FSH uzrokuju regresiju tog folikula zbog negativne povratne sprege (DRIANCOURT, 2000) prema hipofizi i hipotalamusu (KASIMANICKAM, 2015). Novi folikularni val pojavit će se kada koncentracija estrogena padne na bazalnu razinu i dođe do pojave novog vala FSH. Estrogeni aplicirani u vrijeme kada je prisutan folikul ovisan o LH ne uzrokuju regresiju folikula, ali sprječavaju pojavu novog folikularnog vala sve dok njihova koncentracija ne padne na bazalnu razinu. Estrogeni su se pokazali najuspješniji u kombinaciji s progestagenima. Estrogeni uzrokuju regresiju folikula ovisnih o FSH dok progestini uzrokuju regresiju folikula ovisnih o LH. To znači da će neovisno o fazi ciklusa u kojoj je tretman započeo, kombinacija ovih hormona uzrokovati pojavu novog folikularnog vala otprilike 4 dana nakon aplikacije (DRIANCOURT, 2000). Hormonalni tretman estrogenima pokazao se kao najbolji izbor prilikom sinkronizacije folikularnih valova kod krava. Međutim, upotreba estrogena sve je češće zabranjena u velikom broju država i zbog toga je potrebno potražiti alternativne načine sinkronizacije (KASIMANICKAM, 2015). Europska Unija je 1999. godine donijela odluku kojom zabranjuju korištenje estrogena kao promotora rasta jer je dokazano da posjeduju kancerogena svojstva. Sedam godina kasnije zabranjeno je korištenje estrogena kod svih životinja namijenjenih za proizvodnju hrane. Zabrana je potaknula velik broj ostalih država da

zabrane korištenje estrogena kod životinja namijenjenih za proizvodnju hrane, međutim u SAD-u, Kanadi i nekim južnoameričkim državama estrogeni se koriste još i danas (LAVEN, 2019).

Spojevi koji zamjenjuju hipofizne gonadotropine. Proizvodi bazirani na pročišćenim ekstraktima hipofize koji sadrže FSH i LH dostupni su na tržištu, međutim relativno su skupi. Iz tog se razloga u većini slučajeva koriste alternativni hormoni sa sličnim svojstvima. Kod domaćih se životinja najčešće koriste konjski korionski gonadotropin (*equine chorionic gonadotropin*, eCG) i humani korionski gonadotropin (*human chorionic gonadotropin*, hCG). Dobiven iz seruma gravidnih kobila, eCG većim djelom posjeduje učinak sličan kao FSH, a u manjem djelu posjeduje učinke slične onima LH. S druge strane hCG, dobiven iz urina trudnih žena posjeduje učinak sličan kao LH, a u manjem dijelu učinak sličan FSH (LAVEN, 2019). Kod krava se eCG koristi za stimulaciju razvoja folikula i stimulaciju ovulacije. Veće se doze koriste u embriotransfer programima kako bi se potaknula superovulacija, a manje se doze koriste u multi hormonalnim programima sinkronizacije kako bi se povećala veličina folikula i njegova vitalnost tijekom osjemenjivanja. Humani korionski gonadotropin (hCG) se najčešće koristi kao alternativa za GnRH (LAVEN, 2019).

4.2. SINKRONIZACIJA OVULACIJE

Najpoznatiji sinkronizacijski protocol koji se bazira na apliciranju GnRH i PGF_{2α} je svakako Ovsynch (PURSLEY i sur., 1995). Ovsynch protocol razvijen je s ciljem da omogući sinkronizaciju folikularnih valova kako bi se ovulacija dogodila u dovoljno kratkom periodu da se omogući jedno TAI s prihvatljivim postotkom koncepcije (LAVEN, 2019). Protocol uključuje injekciju GnRH u nasumičnoj fazi ciklusa nakon koje slijedi injekcija PGF_{2α} sedam dana kasnije. Druga injekcija GnRH daje se dva dana nakon injekcije PGF_{2α}. Ova metoda je dizajnirana da se uz nju koristi UO u točno vremenski određeno vrijeme (*fixed timed artificial insemination*, FTAI) koje slijedi 16 (8-24) sata nakon posljednje injekcije GnRH (KASIMANICKAM, 2015).



Slika 7. Ovsynch protokol (izvor: KASIMANICKAM, 2015)

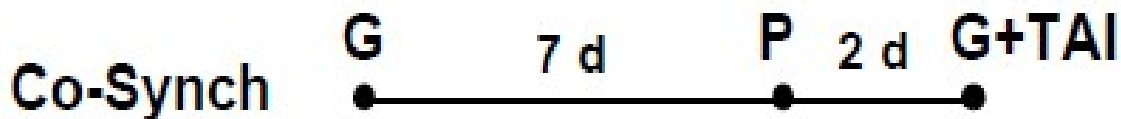
Ovaj program predviđa da prva injekcija GnRH inducira ovulaciju folikula prisutnog na jajniku što dovodi do razvoja žutog tijela. Učinkovitost indukcije ovulacije prve injekcije GnRH varira između 66% i 85% i ovisi o tome u kojoj su fazi razvitka folikuli u vrijeme aplikacije. Ultrazvukom je moguće vidjeti prve folikule u razvoju dva dana nakon prve injekcije GnRH. Jedan od tih folikula iskoristit će se za umjetno osjemenjivanje na kraju Ovsynch protokola. Sedmog dana protokola aplicira se PGF_{2α}. Njegova je uloga da inducira luteolizu i omogući daljnji razvoj dominantnog folikula novog folikularnog vala. Devetog dana protokola aplicira se druga doza GnRH (NOWICKI i sur., 2017) koja sinkronizira vrijeme ovulacije dominantnog folikula koji je započeo rast nakon prve aplikacije GnRH (FRICKE, 2001). Osjemenjivanje se izvodi 16-24 sata nakon druge aplikacije GnRH (NOWICKI i sur., 2017). Ovaj program najučinkovitiji je kod krava u laktaciji, manje je uspješan kod krava u anestrusu te je još manje uspješan kod nulipara odnosno junica (LAVEN, 2019). Najvažnija prednost Ovsynch programa je vrlo uska sinkroniziranost estrusa kod krava što omogućava osjemenjivanje bez prethodnog otkrivanja estrusa (KASIMANICKAM, 2015). Manjak znakova estrusa sve je veći problem na farmama mliječnih krava i u današnje vrijeme taj problem pogađa 10-40% farmi. Razlog tihog gonjenja može biti slaba detekcija estrusa, ali s druge strane, skraćivanje estrusa i slabljenje znakova estrusa potvrđeno je kod visoko produktivnih mliječnih krava. Pretpostavlja se da su glavni razlozi tihog gonjenja negativni energetske balans i s njime povezani endokrini poremećaji poput nižih koncentracija LH i estrogena. Kao rješenje tih problema nameću se sinkronizacijski protokoli poput Ovsynch-a. Takvi protokoli omogućavaju precizno FTAI bez potrebe za detekcijom estrusa (NOWICKI i sur., 2017). Toplinski stres još je jedan uzrok smanjenog reproduktivnog učinka na nekim farmama i takve bi farme rješenje mogle pronaći u Ovsynch protokolu (NOWICKI i sur., 2017). Toplinski stres uzrokuje smetnje u cikličkoj aktivnosti jajnika, smanjuje koncentraciju progesterona u krvi, može uzrokovati nastanak cisti i smanjuje izlučivanje LH u predovulatornom periodu za pola. Također je uočena smanjena kvaliteta oocita ovuliranih za vrijeme toplinskog stresa. Reproductivne smetnje i smanjena plodnost nastale zbog toplinskog stresa mogu biti

prisutne i do nekoliko mjeseci nakon prestanka vrućih dana. Pretpostavlja se da dugo razdoblje uzastopnih vrućih dana ostavlja trajne posljedice na antralne folikule koji se kasnije razvijaju u dominantne folikule. Kako bi se smanjio negativan učinak vrućine na izlučivanje hormona i sazrijevanje oocita predlaže se upotreba hormonalnih protokola (NOWICKI i sur., 2017). U jednom se istraživanju uspoređivala učinkovitost inseminacije krava tretiranih s GnRH i krava koje nisu primile nikakav tretman za vrijeme visokih temperatura. Kod grupe koja je primila GnRH, 28.6% krava bilo je gravidno dok je u grupi bez tretmana zabilježen graviditet kod 17.7% krava (ULLAH i sur., 1996.). Druga su istraživanja također potvrdila hipotezu da aplikacija GnRH za vrijeme toplinskog stresa ima pozitivne učinke na razvoj folikula i kvalitetu oocita (NOWICKI i sur., 2017). Međutim ovaj program pokazuje neke nedostatke čak i kod krava u laktaciji gdje oko 40% životinja ne odgovara na program. Ključni problemi su nedovoljna sinkronizacija folikularnih valova i neuspjela luteoliza. U prvom slučaju problem su krave čiji dominantni folikuli ne odgovore na prvu dozu GnRH, to su najčešće folikuli stari 3-4 dana u vrijeme aplikacije. Takvi dominantni folikuli mogu podlijeći atreziji prije aplikacije PGF_{2α} i ako se to dogodi, novi dominantni folikul neće biti dovoljno zreo da odgovori na drugu aplikaciju GnRH. Rješenje ovog problema je presinkronizacija kako bi sve krave bile između 5. i 9. dana ciklusa u vrijeme početka Ovsynch programa. (LAVEN, 2019). Drugi problem koji može smanjiti učinkovitost Ovsynch programa je izostanak luteolize nakon aplikacije PGF_{2α}. Kao posljedica izostanka luteolize doći će do supresije drugog folikularnog vala što će sinkronizaciju ovulacije i učiniti FTAI nemogućim (NOWICKI i sur., 2017). Postotak krava kod kojih se ne javlja luteoliza je između 10% i 11% i taj se broj može značajno smanjiti ako se u protokol uključi druga injekcija PGF_{2α} koja slijedi 24 sata nakon prve (LAVEN, 2019). Ovsynch daje najbolje rezultate kada se koristi za cijelo stado. Takva strategija omogućava istovremeno osjemenjivanje velikog broja krava postpartum i poboljšava postotak gravidnosti u cijelom stadu. Naprotiv, Ovsynch ne poboljšava postotak graviditeta u stadu kada se koristi samo za problematične krave (NOWICKI i sur., 2017). Još jedan nedostatak Ovsynch protokola je taj što takav program sinkronizacije značajno smanjuje uspjeh koncepcije kod junica, ako to usporedimo s osjemenjivanjem nakon uočenog estrusa. Zbog toga se za osjemenjivanje junica koriste izmijenjeni programi (LAVEN, 2019).

Tablica 1. Prednosti i nedostaci Ovsynch protokola (izvor: NOWICKI i sur., 2017)

Prednosti	Nedostaci
Moguća primjena kod svih krava	Moguće umjetno osjemenjivanje krava s reproduktivnim poremećajima
Smanjena potreba za detekcijom estrusa i ginekološkim pregledima	Za najbolju učinkovitost, protokol bi trebao započeti između 5. i 9. dana ciklusa
Skraćeno međutelidbeno razdoblje i razdoblje uvođenja	Povećana embrionalna smrtnost
Sinkronizacija posla u stadu	Cijena hormona
Mogući terapijski učinci	Različit odgovor na hormonalni tretman
Plodnost je usporediva s drugim metodama	Loša plodnost kod junica

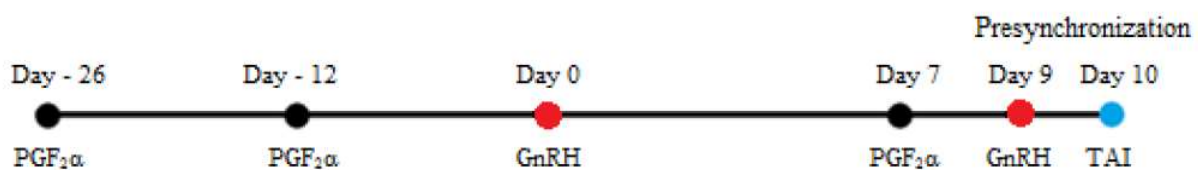
Jedna modifikacija Ovsynch protokola naziva se Cosynch. Jedina razlika između Ovsynch i Cosynch protokola je ta što krave nakon aplikacije druge doze GnRH budu odmah umjetno osjemenjene. Upotreba Cosynch protokola omogućava farmerima jednu manipulaciju sa životinjama manje u usporedbi s originalnim Ovsynch protokolom. Iako je jedna manipulacija manje vrlo značajna s gledišta menadžmenta treba napomenuti da se Cosynch protokolom ne ostvaruju optimalan postotak koncepcije kod mliječnih krava (FRICKE, 2001).



Slika 8. Cosynch protokol (izvor: FRICKE, 2001)

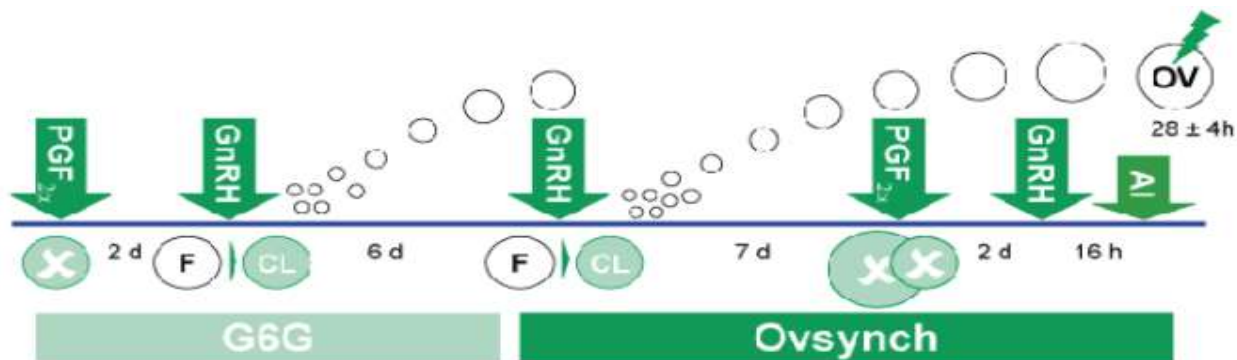
Presinkronizacijski protokoli su razvijeni kao modifikacija originalnog Ovsynch protokola zato što je dokazano da faza ciklusa u kojoj se započne sa sinkronizacijom utječe na uspješnost protokola (FRICKE, 2001). Ovsynch protokoli koji započinju prerano (1 do 4 dana nakon

ovulacije) ili prekasno (13 do 20 dana nakon ovulacije) imaju smanjen uspjeh sinkronizacije. Nadalje, ako se prva injekcija GnRH aplicira kada je dominantni folikul u fazi prije početka dominacije ili u fazi poslije dominacije može se dogoditi da ne dođe do ovulacije i zbog toga neće doći do sinkronizirane pojave novog folikularnog vala. Taj problem se nastoji riješiti tako da životinje posjeduju dominantni folikul odgovarajuće starosti prilikom aplikacije prve doze GnRH. Krave će najbolje odgovoriti na program sinkronizacije ako se prva doza GnRH aplicira između 5 i 12 dana ciklusa. Iz ovog je razloga razvijeno nekoliko protokola koji osiguravaju da se krave nalaze između 5. i 12. dana spolnog ciklusa u vrijeme početka Ovsynch protokola (KASIMANICKAM, 2015). Jedan od presinkronizacijskih protokola zasniva se na aplikaciji $PGF_{2\alpha}$ kako bi se ujednačili ciklusi za početak Ovsynch protokola. Presynch protokol započinje davanjem injekcije $PGF_{2\alpha}$ 12 dana prije početka Ovsynch protokola što uzrokuje sinkronizaciju cikličke aktivnosti jajnika. Zbog toga postoji veća vjerojatnost da će za vrijeme prve aplikacije GnRH, u Ovsynch protokolu, na jajniku postojati folikuli drugog folikularnog vala koji će se moći razviti. Druga istraživanja predlažu da se presinkronizacija pomoću $PGF_{2\alpha}$ treba sastojati od dvije injekcije $PGF_{2\alpha}$ u razmaku od 14 dana i da Ovsynch protokol treba započeti 11 do 12 dana nakon druge injekcije (EL-ZARKOUNY i sur., 2008; NAVANUKRAW i sur., 2004). Također postoji mišljenje da bi se s Ovsynch protokolom moglo započeti 7 dana nakon druge aplikacije $PGF_{2\alpha}$ (DIRANDEH i sur., 2015). U istraživanju EL-ZARKOUNY i sur. (2008) koristili Presynch prije Ovsynch programa te su zabilježili porast postotka graviditeta od 48.8% nakon prvog osjemenjivanja dok su koristeći samo Ovsynch zabilježili postotak graviditeta od 37.5%. U još jednom sličnom istraživanju zabilježen je porast uspješnosti osjemenjivanja za 8% prilikom korištenja Presynch protokola (GUMEN i sur., 2012).



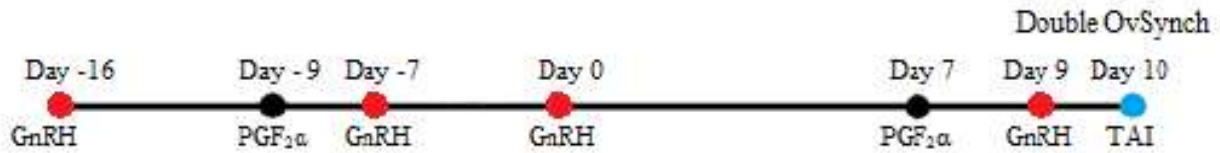
Slika 9. Shema Presynch protokola (izvor: NOWICKI i sur., 2017)

G6G protokol započinje s aplikacijom $PGF_{2\alpha}$ čija je zadaća da inducira luteolizu funkcionalnog žutog tijela. Dva dana nakon aplikacije $PGF_{2\alpha}$, aplicira se GnRH čija je zadaća inducirati ovulaciju. Zajedno, te dvije injekcije G6G protokola imaju ulogu su da započnu novi spolni ciklus. Ovsynch protokol započinje 6 dana nakon aplikacije GnRH zato što se krava tada nalazi u 6 danu ciklusa i postoji velika mogućnost da ima razvijeni dominantni folikul koji je sposoban ovulirati nakon prve aplikacije GnRH u Ovsynch protokolu (KASIMANICKAM, 2015).



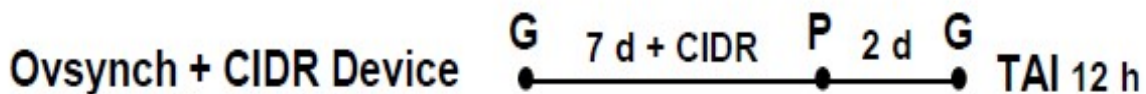
Slika 10. Shema G6G protokola (izvor: semanticscholar.org)

Još jedna modifikacija osnovnog Ovsynch programa naziva se Double Ovsynch. Ovaj protokol sastoji se od dva Ovsynch protokola između kojih postoji sedam dana pauze. Nakon drugog Ovsynch protokola slijedi FTAI. Rezultati su pokazali da Double Ovsynch postiže veći postotak graviditeta u usporedbi s Presynch protokolom (49.7% u usporedbi s 41%). Razlog tome može biti taj da krave s neaktivnim jajnicima poslije poroda ne odgovaraju na aplikaciju $PGF_{2\alpha}$ tijekom Presynch protokola. S druge strane dvije dodatne doze GnRH u Double Ovsynch protokolu stimuliraju jajnike da povrate cikličku aktivnost. Double Ovsynch protokol nije pokazao negativne posljedice kod krava s aktivnim jajnicima. Zanimljivo je primijetiti da Double Ovsynch ima veći učinak kod junica nego kod krava (65.2% u usporedbi s 37.5%). Zbog toga se Double Ovsynch protokol preporučuje za upotrebu kod junica dok se Presynch protokol ili drugi protokoli s $PGF_{2\alpha}$ preporučuju za upotrebu kod krava (NOWICKI i sur., 2017).



Slika 11. Shema Double Ovsynch protokola (izvor: NOWICKI i sur., 2017)

Suplementacija progesterona u trajanju od sedam dana između prve aplikacije GnRH i prve aplikacije PGF_{2α} u Ovsynch protokolu može potaknuti estrus i sinkronizaciju ovulacije kod krava i junica. Takvi se protokoli najčešće koriste kod anestričnih krava i junica i kod krava s cističnim jajnicima (KASIMANICKAM, 2015). Kada se apliciraju u vaginu CIDr ili PRID spirale otpuštaju određenu količinu progesterona što onda inhibira pojavu estrusa kod krava (FRICKE, 2001). U jednom istraživanju napravljenom na 2000 krava velik broj krava nije pokazivao znakove estrusa na početku proljetne sezone i 73% krava nije imalo detektibilno žuto tijelo na početku programa. Dokazano je da Ovsynch i Ovsynch program uz dodatak progesterona skraćuju vrijeme potrebno za koncepciju. Međutim Ovsynch program uz dodatak progesterona skraćuje vrijeme potrebno za koncepciju dodatnih 6 dana u usporedbi s bazičnim Ovsynch programom. Tako je dokazano da je Ovsynch program uz dodatak progesterona vrlo dobro rješenje za stada u kojima je anestrus značajan problem (LAVEN, 2019).



Slika 12. Shema Ovsynch protokola s dodatkom progesterona (izvor: FRICKE, 2001)

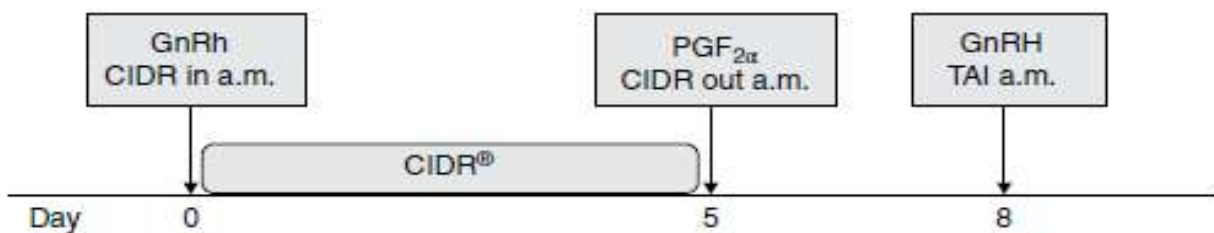
Resinkronizacijski protokoli mogu se koristiti kod krava koje nisu postale gravidne nakon prethodnog umjetnog osjemenjivanja (PARKINSON, 2019). Identifikacija krava koje nisu ostale gravidne nakon umjetnog osjemenjivanja igra ključnu ulogu u reproduktivnom menadžmentu komercijalne mliječne farme. Prilikom rane dijagnostike graviditeta naglasak se treba staviti na krave koje nisu ostale gravidne. Odluka da se ne gravidna krava brzo podvrgne ponovnom postupku umjetnog osjemenjivanja pospješuje reproduktivnu učinkovitost i stopu graviditeta. Na taj se način uspješno smanjuje vrijeme između dva umjetna osjemenjivanja (FRICKE, 2001). Osim

presinkronizacije, postoji mogućnost da se Ovsynch iskoristi kao metoda resinkronizacije krava. Protokol podrazumijeva brzo osjemenjivanje nakon što je krava dijagnosticirana kao ne gravidna između 30 i 32 dana nakon prvog umjetnog osjemenjivanja. Novi Ovsynch protokol može započeti odmah nakon što je dokazano da životinja nije gravidna. Međutim, moguće je skratiti vrijeme između dva umjetna osjemenjivanja ako se injekcija GnRH aplicira sedam dana prije dijagnostike graviditeta. Na taj se način omogućava aplikacija PGF_{2α} na dan dijagnostike graviditeta ako životinja nije gravidna što omogućava ponovno osjemenjivanje životinja tri dana kasnije. Učinkovitost resinkronizacije započete između 23. i 25. dana nakon osjemenjivanja varira između 23% i 50% dok kod resinkronizacije započete između 30. i 32. dana učinkovitost pada na 25.2% do 33.6% (NOWICKI i sur., 2017). PRID i CIDR spirale također se mogu koristiti za sinkronizaciju estrusa kod krava koje nisu ostale gravidne nakon prvog osjemenjivanja. U Fastback protokolu spirale se apliciraju 14 dana nakon osjemenjivanja, uklanjaju se 21. dan i tretirane krave se između 22. i 25. dana promatraju pokazuju li znakove estrusa. Takav program povećava broj negravidnih krava koje se osjemenjuju u prvom estrusu nakon neuspjelog prvog umjetnog osjemenjivanja (LAVEN, 2019). Kako bi se unaprijedila učinkovitost resinkronizacijskih programa predlaže se kombinacija Ovsynch programa, CIDR i PRID spirala, dodatnih injekcija GnRH. Razmatraju se i kraći hormonalni protokoli. Međutim treba napomenuti da su rezultati istraživanja koja su koristila gore navedene kombinacije nekonzistentni (NOWICKI i sur., 2017).

5. RASPRAVA

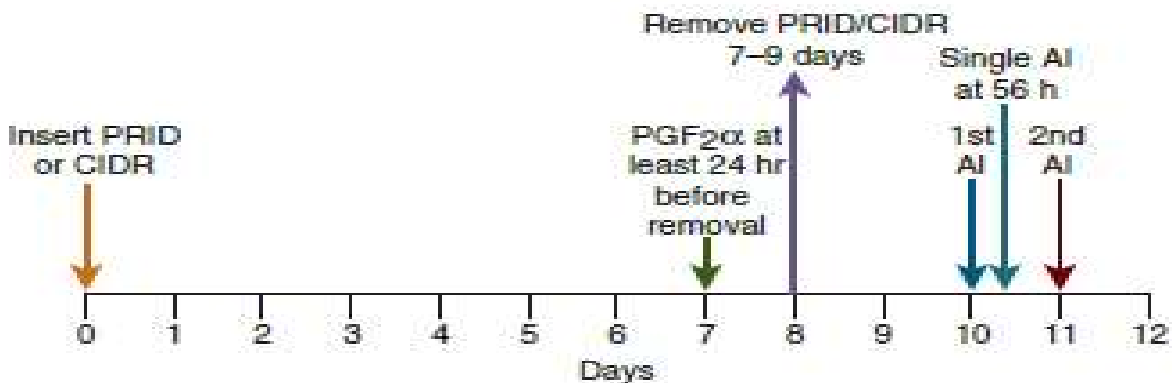
5.1. PRIMJENA U JUNICA I KRAVA

Ovsynch program značajno smanjuje stopu koncepcije kod junica koje nisu u laktaciji u usporedbi s osjemenjivanjem nakon uočenog estrusa. Zbog toga su za sinkronizaciju junica potrebni izmijenjeni programi (LAVEN, 2019). Mali broj farmera koristi FTAI kod junica. Razlog tome je taj što je vidljiva smanjena stopa gravidnosti (30-40%) kada se koristi standardni Ovsynch protokol u usporedbi s osjemenjivanjem nakon uočenog estrusa (50-60%). Zbog razlika u folikularnoj dinamici između krava i junica događa se da junice pokazuju estrus ubrzo nakon aplikacije $\text{PGF}_{2\alpha}$ što dovodi do asinkroniciteta u vrijeme vremenski tempiranog umjetnog osjemenjivanja (RISCO, 2015). Jedno je istraživanje usporedilo postotak gravidnih krava i junica nakon protokola koji koriste tempirano umjetno osjemenjivanje. Uočena je velika razlika između junica koje su bile sinkronizirane s Ovsynch protokolom i kontrolne grupe kod koje se koristio $\text{PGF}_{2\alpha}$ (35.1% u usporedbi s 74.4%). S druge strane kod krava nije uočena značajnija razlika između Ovsynch grupe i kontrolne grupa (37.8% naspram 38.9%). Ove razlike događaju se zato što se kod junica javlja smanjen postotak ovulacije nakon prve aplikacije GnRH. Ovaj nalaz se podudara s utvrđenom smanjenom koncentracijom progesterona u krvi na dan aplikacije $\text{PGF}_{2\alpha}$ kod junica u usporedbi s kravama. Koncentracija progesterona je kod 86.2% krava bila uobičajena za lutealnu fazu ciklusa ($> 1\text{ng/mL}$) dok je samo 59.5% junica doseglo tu koncentraciju. Ovaj nalaz sugerira da bi se za bolju reproduktivnu učinkovitost kod junica treba koristiti neki drugi program, na primjer Double Ovsynch (NOWICKI i sur., 2017). Pokazalo se da kombinacija PRID ili CIDR spirala s modifikacijom Ovsynch programa rezultira s većim postotkom graviditeta nego umjetno osjemenjivanje nakon uočenog estrusa koji je sinkroniziran s $\text{PGF}_{2\alpha}$ (57% naspram 48%). Takav je učinak postignut nakon osjemenjivanja junica devetog dana programa uz istovremenu aplikaciju GnRH (LAVEN, 2019). Modificirani Cosynch protokol u kojem se prilikom prve aplikacije GnRH stavlja CIDR spirala koja se vadi petog dana protokola prilikom aplikacije $\text{PGF}_{2\alpha}$ ostvario je postotak graviditeta kod junica između 50 i 60%. Sedamdesetidva (72) sata nakon aplikacije $\text{PGF}_{2\alpha}$ vrši se UO uz drugu aplikaciju GnRH (RISCO, 2015).



Slika 13. Shema modificiranog Cosynch protokola (izvor: RISCO, 2015)

Standardni protokol koji kombinira PRID ili CIDR spirale i $\text{PGF}_{2\alpha}$ također se koristi za sinkronizaciju junica i krava. PRID ili CIDR spirala stavlja se na početku protokola. Nakon toga, $\text{PGF}_{2\alpha}$ se aplicira šestog dana protokola, a spirala se uklanja jedan dan kasnije. Osjemenjivanje može biti pojedinačno, 56 sati nakon uklanjanja spirale ili dvostruko, 48 i 72 sata nakon uklanjanja spirale (LAVEN, 2019).



Slika 14. Shema protokola koji kombinira progesteron i $\text{PGF}_{2\alpha}$ (izvor: LAVEN, 2019)

Jedno je istraživanje usporedilo gore spomenute Cosynch i progesteron- $\text{PGF}_{2\alpha}$ programe. Velika razlika u postotku graviditeta između ta dva programa nije pronađena (52.4% u usporedbi s 54.8%). Potrebno je napomenuti da je progesteron- $\text{PGF}_{2\alpha}$ program znatno jeftiniji od Cosynch programa. Međutim progesteron- $\text{PGF}_{2\alpha}$ program zahtjeva da se sa životinjom rukuje minimalno četiri puta dok s druge strane Cosynch program zahtjeva samo tri rukovanja sa životinjom. Zbog

toga je odabir programa potrebno donijeti za svaku farmu zasebno uzimajući u obzir cijenu rada i cijenu hormona (LAVEN, 2019).

5.2. LIJEČENJE NEPLODNOSTI

Spolni ciklus i znakovi estrusa prestaju za vrijeme graviditeta i ne javljaju se odmah nakon poroda. Visoka koncentracija progesterona koja je prisutna za vrijeme graviditeta negativnom povratnom spregom suprimira os hipotalamus-hipofiza što uzrokuje minimalnu aktivnost jajnika kod gravidnih krava. Ponovna uspostava sekrecije gonadotropina i cikličke aktivnosti jajnika javlja se u postpartalnom periodu nakon čega se spolni ciklus vraća u normalu. Kada se javi nakon poroda, anovulatorni anestrus je uobičajeno stanje u reprodukciji krava. Međutim anestrus postaje problem ako potraje do vremena kada životinja ponovno treba biti osjemenjena. U tom se slučaju anestrus smatra patološkim stanjem i zahtjeva terapiju (PARKINSON, 2019). Prilikom hormonalnog liječenja anestričnih životinja pokušava se postići takozvani “rebound” učinak na hipofizu kako bi se spolni ciklus ponovno pokrenuo te se za postizanje tog efekta najčešće koriste progestageni. Za ponovnu uspostavu spolnog ciklusa još se mogu koristiti hormoni koji uzrokuju sekreciju gonadotropina ili hormoni koji sami imaju gonadotropni učinak (PARKINSON, 2019). Ovsynch program je manje učinkovit kod anestričnih krava, nego kod krava s fiziološkom funkcijom jajnika. Razlog tome je taj što folikuli ne reagiraju na prvu aplikaciju GnRH, smanjena je koncentracija progesterona (djelomično zbog toga što izostaje reakcija na prvu aplikaciju GnRH, ali i zbog toga što anestrične krave nemaju endogeno žuto tijelo) i postoji rizik od vrlo kratke lutealne faze čak i ako je ovulacija sinkronizirana. Neki presinkronizacijski programi poput G6G su pokazali bolji odgovor anestričnih životinja na Ovsynch program koji je uslijedio. Najčešće korišteni program koji se primjenjuje kod anestričnih krava je Ovsynch program s dodatkom progesteronskih implantanata u obliku spirala ili umetaka između nultog i sedmog dana programa. U jednom se istraživanju usporedio učinka Ovsynch programa s Ovsynch programom uz dodatak progesterona kod pašno držanih krava koje nisu pokazivale znakove estrusa 10 dana prije početka proljetne rasplodne sezone. Utvrđeno je da oba protokola skraćuju vrijeme potrebno za koncepciju u usporedbi s netretiranim životinjama. Dokazano je da Ovsynch protokol s dodatkom progesterona skraćuje vrijeme potrebno za koncepciju dodatnih 6 dana u usporedbi s bazičnim Ovsynch protokolom. U tom istraživanju 73% krava nije imalo detektibilno žuto tijelo na početku

sinkronizacije. Istraživanje je obavljeno na više od 2000 krava te je potvrđeno da upotreba Ovsynch programa s dodatkom progesterona u stadima u kojima je anestrus značajan problem može biti vrlo dobro rješenje. Upotreba eCG u isto vrijeme kada se aplicira PGF_{2α} stimulira rast dominantnog folikula. Taj učinak, usporedno sa sinkronizacijom životinja pomoću Ovsynch programa s dodatkom progesterona, pokazao se vrlo učinkovitim kod anestričnih životinja koje nemaju optimalnu tjelesnu kondiciju (LAVEN, 2019).

Jajničke ciste su folikularne strukture koje su nastale zbog izostanka ovulacije i najčešće su veće i na jajniku se zadržavaju dulje od normalnih folikula što uzrokuje smanjenu reproduktivnu funkciju (PARKINSON, 2019). Ciste na jajnicima su tekućinom ispunjene strukture koje ne ovuliraju i čiji je promjer veći od 25 mm ili se na jajniku nalaze duže od deset dana bez prisustva žutog tijela (NOWICKI i sur., 2017). Cistična bolest jajnika je bolest koja se manifestira izostankom ovulacije dominantnog folikula. Ciste na jajnicima mogu se pojaviti zbog različitih smetnji u funkciji jajnika koje se mogu očitovati kao niz anovulatornih folikularnih valova normalnog trajanja, stvaranja privremenih cističnih struktura koje se razvijaju i nestaju u ciklusima ili razvoj anovulatornih cisti koje ostaju na jajnicima dulje vrijeme. Velik broj krava može razviti velike, tekućinom ispunjene strukture na jajnicima tijekom postpartalnog perioda, međutim one najčešće spontano nestaju. Međutim kada ciste uzrokuju promjene i poremetnje u spolnom ciklusu smatraju se kliničkim problemom (PARKINSON, 2019). Potrebno je napomenuti da je uočeno kako se krave spontano mogu oporaviti od folikularnih cisti i do danas nije potpuno jasan mehanizam oporavka. U jednom je istraživanju dokazano da se gotovo polovica krava (48%) oporavila od folikularnih cisti bez prethodne terapije (WILTBANK i sur., 2002). Kod krava s cističnom bolešću jajnika predovulatorni LH val je oslabljen ili odsutan što onda uzrokuje izostanak ovulacije dominantnog folikula. Posljedica neuspjele ovulacije najčešće je cistična struktura koja zadržava granulosa stanice i nastaje folikularna cista ili struktura u kojoj se zbog neuspjele ovulacije odvila luteinizacija *in situ* te je nastala lutealna cista (PARKINSON, 2019). Folikularne ciste su fluktuirajuće strukture tanke stijenke koje se nalaze pojedinačno ili u grupama. Luteinske ciste su strukture s debelom stijenkom koje najčešće dolaze pojedinačno (PARKINSON, 2019). Aplikacija GnRH uzrokuje povećanu sekreciju LH iz hipofize što dovodi do luteinizacije cističnih folikula ili potiče ostale folikule da ovuliraju. Ponekad se može dogoditi i ruptura ciste. Sljedeći korak u ovoj hormonalnoj terapiji je aplikacija PGF_{2α} koja će uzrokovati luteolizu lutealnog tkiva. Druga aplikacija GnRH trebala bi stimulirati folikule drugog folikularnog vala na

ovulaciju što onda omogućava umjetno osjemenjivanje tretirane životinje. Budući da ovaj klasični protokol za tretman cisti i Ovsynch protokol koriste iste hormone, Ovsynch protokol može se koristiti za liječenje cisti na jajnicima zbog sličnih hormonalnih promjena koje uzrokuje (NOWICKI i sur., 2017). U jednom je istraživanju uspoređen učinak standardnog Ovsynch protokola s modificiranim Ovsynch protokolom. U tom modificiranom protokolu nulti su dan aplicirani GnRH i $\text{PGF}_{2\alpha}$, zatim je četrnaesti dan apliciran $\text{PGF}_{2\alpha}$ i onda šesnaesti dan ponovno GnRH. Zaključeno je da krave tretirane modificiranim protokolom u usporedbi sa zdravim kontrolnim životinjama pokazuju slične rezultate u detekciji estrusa, postotku koncepcije na prvo UO i ukupnom postotku graviditeta. Standardni Ovsynch protokol pokazao je lošije rezultate u svim gore navedenim parametrima. Izračunato je da je ekonomski benefit prilikom korištenja modificiranog Ovsynch protokola 132 eura u usporedbi sa standardnim protokolom. U još je jednom istraživanju dokazano da samo 19% krava s cističnom bolešću jajnika ostaje gravidno nakon standardnog Ovsynch protokola, dok gravidno ostaje 35% krava kada se koristi modificirani protokol (PARKINSON, 2019). U standardnom Ovsynch protokolu postoji mogućnost zamjene druge injekcije GnRH s injekcijom hCG. U istraživanju provedenom na mliječnim kravama, kod krava koje su primile hCG umjesto druge aplikacije GnRH (DE RENSIS i sur., 2008) zabilježeno je da ciste na jajnicima nestaju brže. Slični rezultati zabilježeni su i u nekim drugim istraživanjima što znači da bi zamjena druge injekcije GnRH s hCG mogao biti način kako unaprijediti učinak Ovsynch protokola prilikom tretmana jajničkih cisti kod mlijećnih krava. Bolji rezultatu prilikom korištenja hCG vjerojatno su vidljivi zato što hCG djeluje duže i uzrokuje bolji klinički učinak u usporedbi s GnRH (KINSER i sur., 1983). Najlogičniji način liječenja luteinskih cista je pomoću $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PARKINSON, 2019). U istraživanju provedenom u nekoliko država zabilježeno je da kod preko 80% krava dolazi do nestanka cista i pojave estrusa za 3 do 5 dana nakon aplikacije $\text{PGF}_{2\alpha}$. Zabilježeno je da najmanje 60% krava ostane gravidno, a u većini slučajeva taj se broj penje do 90%. Postoji velik broj istraživanja koji potvrđuje navedene podatke. Najčešće se kod životinja koje ne odgovore na tretman s $\text{PGF}_{2\alpha}$, a pretpostavlja se da imaju lutealnu cistu ustanovi da je dijagnoza lutealne ciste bila pogrešna (PARKINSON, 2019).

6. ZAKLJUČAK

Implementacija hormonalnih protokola koji omogućavaju sinkronizaciju estrusa otvara mnogo prilika za reproduktivni menadžment. Najveća prednost nekih protokola je mogućnost korištenja umjetnog osjemenjivanja u unaprijed definirano vrijeme, što omogućava rjeđe rukovanje sa životinjama što je vremenski vrlo učinkovito. Dodatna prednost takvih protokola je smanjenje problema koji nastaju prilikom nezapažanja estrusa. Ovsynch je jedan od najpopularnijih hormonalnih protokola koji se bazira na primjeni GnRH i PGF_{2α}. Ova je metoda mnogo učinkovitija kada se koristi kod krava nego kod junica. Kako bi se unaprijedio postotak graviditeta poslije Ovsynch protokola istražuju se neke modifikacije bazičnog protokola. Takve modifikacije trebale bi riješiti probleme koji nastaju kada folikuli u razvoju ili žuto tijelo ne odgovaraju na aplikaciju GnRH ili PGF_{2α}. Još jedna mana protokola koja se treba istaknuti je slab učinak na žuto tijelo, no tome bi se moglo doskočiti korištenjem progesteronskih implantanata u obliku spirala ili umetaka (NOWICKI i sur., 2017). Osim za rutinsku sinkronizaciju ciklusa, protokol se može koristiti i u liječenju cistične bolesti jajnika, tihog gonjenja i toplinskog stresa.

7. LITERATURA

ANNON. http://animalbiosciences.uoguelph.ca/~gking/Ag_2350/estrus.htm [01. lipnja 2020.]

ANNON. <https://www.semanticscholar.org/paper/G-6-G-%2F-Ovsynch-to-Increase-Reproductive-Bello-Pursley/77afa730710efbb9ecc90dfca8b9d90d544183ac> [15. svibnja 2020.]

ADAMS, G. P., J. SINGH (2015): Ovarian Follicular and Luteal dynamics in Cattle. U: Bovine Reproduction (Hopper, R.M., ur.). John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, SAD. str. 219-244.

AMSTALDEN, M., G. L. WILLIAMS (2015): Neuroendocrine Control of Estrus and Ovulation. U: Bovine Reproduction (Hopper, R.M., ur.). John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, SAD. str. 203-218.

DE RENSIS, F., E. BOTTARELLI, F. BATTIONI, T. CAPELLI, M. TECHAKUMPHU, I. GARCÍA-ISPIERTO, F. LÓPEZ-GATIUS (2008): Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after synchronizing ovulation using GnRH or hCG during the warm or cool period of the year. *Theriogenology* 69, 481–484.

DIRANDEH, E., A. REZAEI ROODBARI, M. G. COLAZO (2015): Double-Ovsynch, compared with presynch with or without GnRH, improves fertility in heat-stressed lactating dairy cows. *Theriogenology* 83, 438–443.

DRIANCOURT, M. A. (2000): Regulation of Ovarian Follicular Dynamics in Farm Animals. Implications for Manipulation of Reproduction. *Theriogenology*. 55, 1211-1239.

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

ESTILL, C. T. (2015): Initiation of Puberty in Heifers. U: Bovine Reproduction (Hopper, R.M., ur.). John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, SAD. str. 195-202.

FORTUNE, J. E., G. M. RIVERA, A. C. O. EVANS, A. M. TURZILLO (2001): Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biol. Reprod.* 65, 648-654.

FRICKE, P. M. (2001): Ovsynch, Pre-synch, the Kitchen-Synch: What's up with synchronization protocols? Proceedings of the Midwest Dairy Herd Health Conference, 13-14 November. Eau Claire, Wisconsin, SAD. str. 91-102.

GUMEN, A., A. KESKIN, G. YILMAZBAS-MECITOGLU, E. KARAKAYA, A. ALKAN, H. OKUT, M. C. WILTBANK (2012): Effect of presynchronization strategy before Ovsynch on fertility at first service in lactating dairy cows. *Theriogenology* 78, 1830–1838.

HAFEZ, E. S. E., B. HAFEZ (2000): Reproductive Cycles. U: *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed., (Hafez, B., E. S. E. Hafez, ur.). Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, SAD. str. 55-67.

JAINUDEEN, M. R., E. S. E. HAFEZ (2000): Cattle and Buffalo. U: *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed., (Hafez, B., E. S. E. Hafez, ur.). Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, SAD. str. 159-171.

KASIMANICKAM, R. (2015): Pharmacological Intervention of Estrous Cycles. U: *Bovine Reproduction* (Hopper, R. M., ur.). John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, SAD. str. 304-313.

KINSER, A. R., M. F. GIBSON, D. L. VINCENT, N. S. SCHEFFRAHN, D. J. KESLER (1983): Ovarian responses of seasonally anestrous ewes administered progesterone, PMSG, hCG and(or) GnRH. *Theriogenology* 19, 449–464.

LAVEN, R. (2019): Pharmacological Agents in the Control of Reproduction. U: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 10th ed., (Noakes, D.E., T.J. Parkinson, G.C.W. England, ur.). Elsevier, Ltd. New York, New York, SAD. str. 157-166.

LEA, R., G. C. W. ENGLAND (2019): Puberty and Seasonality. U: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 10th ed., (Noakes, D. E., T. J. Parkinson, G. C. W. England, ur.). Elsevier, Ltd. New York, New York, SAD. str. 54-62.

LOJKIĆ, M. (2016): Oogeneza, folikulogeneza, oplodnja i rani embrionalni razvoj. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

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.

NOWICKI, A., W. BARAŃSKI, A. BARYCZKA, T. JANOWSKI (2017): OvSynch Protocol and its Modifications in the Reproduction Management of Dairy Cattle Herds – an Update. *J. Vet. Res.* 61, 329-336.

PARKINSON, T. J. (2019): Infertility in the Cow Due to Functional and Management Deficiencies. U: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 10th ed., (Noakes, D. E., T. J. Parkinson, G. C. W. England, ur.). Elsevier, Ltd. New York, New York, SAD. str. 361-407.

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.

RISCO, C. A. (2015): Dairy Herd Health for Optimal Reproduction. U: *Bovine Reproduction* (Hopper, R. M., ur.). John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, SAD. str. 353-358.

ROBINSON, B., D. E. NOAKES (2019): Reproductive Physiology of the Female. U: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 10th ed., (Noakes, D. E., T. J. Parkinson, G. C. W. England, ur.). Elsevier, Ltd. New York, New York, SAD. str. 2-34.

SENGER, P. L. (2012): Regulation of Reproduction, Nerves, Hormones & Target Tissues. U: *Pathways to Pregnancy & Parturition*, 3rd ed., (Senger, P. L., ur.). Current Conceptions, Inc. Redmond, Oregon, SAD. str. 100-125.

ULLAH, G., J. W. FUQUAY, T. KEAWKHONG, B. L. CLARK, D. E. POGUE, E. J. MURPHEY (1996): Effect of Gonadotropin-releasing Hormone at Estrus on Subsequent Luteal Function and Fertility in Lactating Holsteins During Heat Stress. *J. of Dairy Sci.* 79, 1950-1953.

VANN, R. C. (2015): Estrus Detection. U: Bovine Reproduction (Hopper, R. M., ur.). John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, SAD. str. 290-294.

WILTBANK, M. C., A. GÜMEN, R. SARTORI (2002): Physiological Classification of Anovulatory Conditions in Cattle. *Theriogenology*. 57, 21-52.

XU, Z. Z. (2011): Reproduction, Events and Management. Control of Estrous Cycles: Synchronization of Estrus. U: Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd ed., (Fuquay, J. W., ur.) Elsevier, Ltd. New York, New York, SAD. str. 448-453.

8. SAŽETAK

Uzgajivači mliječnih goveda u svojim krdima redovito koriste postupak umjetnog osjemenjivanja. U današnje se vrijeme tradicionalna metoda detekcije estrusa promatranjem pokazala vremenski vrlo neučinkovito zato što se javlja tendencija za povećanjem broja životinja u stadu, kod krava se sve češće javlja tiho gonjenje ili znakovi estrusa budu slabo izraženi. Kako bi se smanjila potreba za vizualnom detekcijom estrusa sve se češće koriste hormonalni protokoli koji omogućavaju sinkronizaciju velikog broja životinja i vremenski tempirano umjetno osjemenjivanje. Najčešći korišteni hormonalni protokol koji koristi GnRH i PGF_{2α} naziva se Ovsynch. U tom se protokolu u bilo kojoj fazi ciklusa aplicira GnRH, sedam dana nakon toga slijedi aplikacija PGF_{2α}, dva dana kasnije druga aplikacija GnRH te vremenski tempirano umjetno osjemenjivanje uslijedi 8-24 sata nakon posljednje aplikacije GnRH. Nedostatak ovog protokola je taj što životinje različito mogu odgovoriti na hormonalni tretman. Tako na primjer Ovsynch protokol pokazuje lošije rezultate kod junica i kod krava s tri folikularna vala. Ovom se problemu pokušava doskočiti različitim modifikacijama originalnog Ovsynch protokola. Tako je na primjer razvijen Double Ovsynch protokol koji pokazuje bolje rezultate kod junica ili Ovsynch protokol uz suplementaciju progesterona koji se češće koristi kod anestričnih krava ili krava s cističnim jajnicima. Kako bi se povećala stopa sinkronizacije unutar stada koriste se presinkronizacijski protokoli koji zbog duljeg trajanja homogenije sinkroniziraju stado. Resinkronizacijski protokoli koriste se kod krava koje nisu postale gravidne nakon prethodnog osjemenjivanja. Takvi protokoli omogućavaju brzo ponovno osjemenjivanje ne gravidnih krava. Nadalje, primjena navedenih hormona uspješno se koristi i u liječenju određenih stanja neplodnosti u mliječnim krava.

Ključne riječi: mliječne krave, GnRH, PGF, Ovsynch, neplodnost

9. SUMMARY

MEGLIĆ, P.: Application of GnRH and PGF for estrus induction and synchronization of ovulation in dairy cows

Dairy cattle breeders regularly use the process of artificial insemination in their herds. Nowadays, the process of visual heat detection has proven to be very time consuming because there is tendency to increase the number of animals in herds. Furthermore, silent estrus is more often observed and signs of estrus are becoming weaker. In order to reduce the need for visual detection of estrus, hormonal protocols are increasingly used, which enable the synchronization of a large number of animals and timed artificial insemination. Most commonly used hormonal protocol that uses GnRH and PGF_{2α} is called Ovsynch. In this protocol, GnRH is applied at any stage of the cycle, followed by PGF_{2α} application seven days after, and another GnRH application two days after the application of second GnRH. Timed artificial insemination is performed 8-24 hours after the second GnRH application. The disadvantage of this protocol is that animals respond differently to hormonal treatment. Thus, for example, the Ovsynch protocol shows poorer results in heifers and in cows with cycles with three follicular waves. Various modifications of the original Ovsynch protocol are attempted to resolve this problem. For example, the Double Ovsynch protocol was developed, which shows better results in heifers. Another modification is supplementation of Ovsynch protocol with progesterone, which is more commonly used in anestrous cows or cows with cystic ovaries. In order to increase the synchronization rate within the herd, presynchronization protocols are used, which, due to their longer duration, synchronize the herd more homogeneously. Resynchronization protocols are used in cows that have not become pregnant after previous insemination. Such protocols allow rapid reinsemination of non-pregnant cows. Furthermore, these hormones are effective in treatment of some fertility-related problems in dairy cows.

Key words: dairy cow, GnRH, PGF, Ovsynch, infertility

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 30.03.1995. godine u Zagrebu. Odrastao sam u gradu Samoboru, a trenutno živim u naselju Orešje pokraj grada Svete Nedelje. Školovanje sam započeo 2001. godine u osnovnoj školi Bogumila Tonija u Samoboru. Kroz sve razrede osnovne škole bio sam odličan učenik. Godine 2001. upisao sam gimnaziju Antuna Gustava Matoša u Samoboru. Sve razrede srednje škole prošao sam s vrlo dobrim uspjehom. Državnu sam maturu položio 2013. godine te sam iste godine upisao Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja dvije sam godine nastupao za košarkašku momčad veterinarskog fakulteta i s kolegicom Valentinom Margić napisao sam znanstveni rad (Provjera učinkovitosti bioloških i kemijskih pripravaka na inhibiciju rasta gljive *Macrorhabdus ornithogaster in vitro*) za koji smo 2019. godine dobili rektorovu nagradu.