

Usporedba karakteristika LH valova u mliječnim krava podvrgnutih trima sinkronizacijskim protokolima

Comparison of the LH wave characteristics in dairy cows subjected to three synchronization protocols

Bem, A.^{1*}, D. Jelenčić^{1*}, G. Štibrić², J. Kuleš³, R. Barić Rafaj⁴, J. Grizelj⁵, D. Špoljarić⁶, S. Vince⁵, B. Špoljarić⁵

Sažetak

Primjenom metoda kontrolirane reprodukcije, početkom rasplodivanja, poboljšava se plodnost visokoproizvodnih mliječnih krava. Unatoč preciznoj tehnologiji i dugotrajnom iskustvu u primjeni indukcijsko-sinkronizacijskih protokola, malo se zna o osobinama LH pulsacijskih valova. Cilj istraživanja bio je ustanoviti svojstva predovulacijskih LH valova u krava podvrgnutih različitim protokolima s umjetnim osjemenjivanjem u točno određeno vrijeme (UO). Korišteni su arhivski podaci iz istraživanja provedenog na 60 krava holštajnsko-frizijske pasmine, u ranoj laktaciji, podijeljenih u tri skupine: skupina A podvrgnuta je modificiranom Double Ovsynch (DO), skupina B modificiranom Presynch (PS), dok je skupina C podvrgnuta Ovsynch (OV) protokolu. Životinjama su uzimani uzorci krvi za određivanje LH (n = 15) i progesterona (n = 60). Sve krave umjetno su osjemenjene 6 i 24 sata nakon druge injekcije GnRH. U krava skupine B postotak steonih krava 30 dana poslije umjetnog osjemenjivanja (UO) bio je viši (p < 0,10) u odnosu na krave iz drugih dviju skupina (B : A : C = 47,37 % : 29,41 % : 21,05 %). Pad postotka steonih krava 60. dan poslije UO-a bio je izrazitiji u krava skupine B (47,36 % : 31,58 %), a blaži u skupine C (21,05 % : 15,79 %), što sugerira da je prevalencija kasnih embrionalnih i fetalnih uginuća možda viša u PS i OV protokolu u odnosu na DO. Samo su krave iz skupine A (p < 0,001) imale dominantni folikul optimalne veličine, dok je u ostale dvije skupine promjer znatno premašio tu vrijednost. Kod primjene svih triju protokola snažno je izražena grupiranost koncentracije progesterona nakon aplikacije PGF_{2α} (vrijednosti ispod 0,5 ng/mL u više od 50 % krava). Signifikantna (p < 0,01) bila je razlika razine LH nulti sat između skupine C (6,12 ± 1,16 ng/mL) i B (1,84 ± 1,16 ng/mL). Četiri sata poslije, razina skupine A značajno odstupa u odnosu na skupine B i C (p < 0,01), s tim da krave iz skupine C i dalje imaju najvišu koncentraciju LH. Ovulacija je ultrazvučno potvrđena kod svih krava, osim kod jedne iz skupine C, koja je kasnije i izlučena iz rasploda.

Abstract

The fertility of high-yielding dairy cows may be improved by use of controlled reproduction methods at the beginning of breeding. Despite the precise technology and long-term experience in induction-synchronization protocols, little is known about the characteristics of LH pulse waves. The goal of this research was to determine the characteristics of LH waves in cows subjected to different synchronization protocols with timed artificial insemination (TAI). The archive data were used from research on 60 Holstein-Friesian breeds, in early lactation. The cows were divided into three groups:



¹ studentice, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
² dr. sc. Goran Štibrić, farma mliječnih krava „Veliki Zdenci“, Veliki Zdenci, Hrvatska
³ dr. sc. Josipa Kuleš, FP7 ERA Chair projekt VetMedZg; Klinika za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
⁴ prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj, Zavod za kemiju i biokemiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
⁵ prof. dr. sc. Juraj Grizelj; izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince, doc. dr. sc. Branimira Špoljarić, Klinika za porodništvo i reprodukciju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
⁶ doc. dr. sc. Daniel Špoljarić, Zavod za veterinarsku biologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

*e-mail:
 antonia.bem@gmail.com,
 dina.jelencic@gmail.com

Ključne riječi: mliječe krave, sinkronizacija, ovulacija, LH, progesteron

Key words: dairy cows, synchronization, ovulation, LH, progesterone

group A was subjected to a modified Double Ovsynch (DO) protocol, group B modified Presynch (PS), while group C was subjected to Ovsynch (OV). Blood samples were taken from the animals to determine LH (n=15) and progesterone (n=60). All cows were artificially inseminated at 6 and 24 hours after the second injection of GnRH. In group B, the percentage of pregnant cows 30 days after TAI was higher ($P < 0.10$) than in cows from the other two groups (B: A: C = 47.37% : 29.41% : 21.05%). The decrease in the percentage of pregnant cows 60 days after TAI was more pronounced in group B (47.36% : 31.58%) and milder in group C (21.05% : 15.79%), suggesting that the prevalence of late embryonic and foetal mortality may be higher in the PS and OV protocols, compared to the DO protocol. Only cows from group A ($P < 0.001$) had a dominant follicle of optimal size, while in the other two groups the diameter significantly exceeded that value. Progesterone concentration was strongly grouped after PGF 2α application in all three protocols, with values below the 0.5 ng/mL in more than 50 % of animals. There was a significant ($P < 0.01$) difference between LH at zero hour between groups C (6.12 ± 1.16 ng/mL) and B (1.84 ± 1.16 ng/mL). Four hours later, the level of LH in group A significantly deviated in relation to groups B and C ($P < 0.01$), whereas cows from group C still had the highest concentration of LH. Ovulation was ultrasonically confirmed in all cows, except for one from group C, which was later culled.

UVOD

Primjenom odgovarajućeg sinkronizacijskog programa stimulira se plodnost visokoproduktivnih mliječih krava u ranom i kasnijem puerperiju (Wiltbank i Pursley, 2014.). Sredinom 1990. godine, nakon primjene Ovsyncha u mliječnom, ali i u mesnom govedarstvu, uvedeni su brojni novi protokoli s umjetnim osjemenjivanjem (UO) u točno određeno vrijeme. Neznatne, ali i bitnije preinake originalnog Ovsynch protokola dovele su do konfuzije među farmerima i stručnjacima u vezi s izborom najboljeg postupka. U visokomliječnih krava reprodukcijski su rezultati vrlo loši u više aspekata: postotku plodnosti, detekciji estrusa, anestriji, produljenom međutelidbenom razdoblju. Mnoge su farme zbog loših rezultata detekcije estrusa uvele sustave s UO-om neposredno nakon perioda počeka (Washburn i sur., 2002.; Lopez i sur., 2005.; Meadows i sur., 2005.; Wiltbank i sur., 2006.; Pulley i sur., 2015; Gereš, 2016.). Jedan od zadataka je u fazi rasplodivanja optimizirati veličinu maturiranog folikula, što je u korelaciji s vremenom pojave i karakteristikama LH pulsacije neposredno prije UO-a, vezano uz indukciju luteolize, kao i vrijeme aplikacije druge injekcije GnRH neposredno prije UO-a (Lucy, 2007.). Neposredno pred ovulaciju raste LH koji uzrokuje ovulaciju (Rajamahendran i sur., 1989.).

Koncentracija progesterona snižava se prije UO-a, tj. u vrijeme selekcije folikula, zbog porasta koncentracije FSH (Wiltbank i sur., 2000.;

Lopez i sur., 2005). Premda porast koncentracije progesterona prije UO-a pozitivno utječe na koncepciju, u odnosu na krave s niskom razinom progesterona ($p < 0,001$), utječe i na porast postotka blizanaštva, što nije poželjno, kao i na porast postotka embrionalno-fetalnih uginuća (Fonseca i sur., 1983.). Koncentracija progesterona nakon UO-a može biti viša u krava koje su prije UO-a imale nisku razinu (2,9 ng/mL : 2,5 ng/mL) i upravo je ta elevacija poželjna (Bisinotto i sur., 2010.) jer sugerira važnost porasta progesterona u vrijeme završnice folikularnog vala.

Cilj je ovog rada utvrditi svojstva predovulacijskih LH valova u krava uključenih u tri ispitivana sinkronizacijska protokola s UO-om u točno određeno vrijeme. U tu se svrhu pratila incidenca spontanah i GnRH-induciranih LH valova, koncentracija LH na vrhuncu vala te vrijeme do nastanka vrhunca vala. Uz to, analizirat će se i uspjeh koncepcije, koncentracija progesterona, te promjer dominantnog folikula kao dodatne metode usporedbe učinka ispitivanih protokola.

MATERIJALI I METODE

U radu su korišteni arhivski pohranjeni podaci, dobiveni iz istraživanja provedenog tijekom 2013. godine na 60 krava holštajnsko-frizijske pasmine. Krave su bile podijeljene slučajnim izborom u tri skupine po 20 životinja u fazi rasplodivanja. Prva GnRH aplikacija u Ovsynch protokolu (u sva tri istraživana modela) u po-

četku rasplodivanja bila je $66 \pm 5,7$ dana nakon porođaja, uz prosječan indeks tjelesne kondicije $2,83 \pm 0,22$, prema Ferguson i sur. (1994.). U skupini A i C većina krava bila je u prvoj laktaciji (80, odnosno 60 %), dok su u skupini B većinu činile multiparne krave (80 %, prosječan broj laktacije 2,5). Skupine A i B bile su podvrgnute presinkronizacijskim protokolima, dok je skupina C bila kontrolna, podvrgnuta standardnom sinkronizacijskom protokolu Ovsynch.

Standardni Ovsynch protokol počinjao je aplikacijom GnRH nulti dan, PGF 2α 7. dan, GnRH 9. dan (GnRH-2), te su krave dvokratno umjetno osjemenjivane 6 i 24 h nakon aplikacije GnRH-2. U skupini A primjenjivala se presinkronizacija modificiranim Double Ovsynch protokolom, koji se sastojao od aplikacije GnRH -9. dan (nultim danom smatrao se dan kada počinje Ovsynch protokol), potom PGF 2α - 2. dan i 0. dan je počeo Ovsynch protokol. Krave iz skupine B presinkronizirane su modificiranim Presynch protokolom, jednokratnom aplikacijom PGF 2α na -2. dan, a početak Ovsynch protokola bio je dva dana nakon toga. Sve su krave osjemenjene dvokratno, 6 i 24 h nakon GnRH-2 u Ovsynch protokolu, duboko zamrznutim sjemenom bika kojeg je odabrao upravitelj farme.

Svim su kravama uzimani uzorci krvi venske punkcijom repne ili jugularne vene prilikom svake aplikacije hormona, za analizu koncentracije progesterona, počevši s danom početka protokola u skupini A (-9. dan). Steonost se utvrđivala dvokratno, 30 dana nakon UO-a ultrazvučnim transrektalnim pregledom (PR $_{30}$) i 60 dana nakon UO-a (PR $_{60}$), gdje se potvrđuje steonosti radila ultrazvučno i rektalnim pregledom.

Iz svake je skupine slučajnim odabirom odabrano po 5 krava kojima je uzorkovana krv za određivanje razine LH, svaka 4 sata, počevši od termina aplikacije GnRH-2 sve do ultrazvučne potvrde ovulacije. Uzorci krvi centrifugirani su odmah na farmi, a serumu zamrznuti do analiza u laboratoriju. Istim je kravama ultrazvučnim pregledom jajnika praćena ovulacija te se mjerio promjer dominantnog folikula mjerenjem dvaju najširih polova folikularne šupljine. Kao rezultat uzet je promjer veće širine.

Analiza LH izrađena je metodom ELISA s dvostrukim protutijelima (*sandwich*-tehnika), a korišten je kit LH Detect Bovine (ReproPharm SAS, INRA centre de Tours – PRC, Nouzilly, Fran-

cuska). Analiza je izrađena na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Referentna linija za vrhunac LH vala izračunata je tako da su bazalnoj vrijednosti LH pribrojene dvije standardne devijacije, a prva koncentracija LH koja je prešla tako dobivenu vrijednost smatra se početkom vrhunca lučenja LH (Roelofs i sur., 2004.).

Koncentracija progesterona u serumu određena je standardnim komercijalnim paketom reagensa (Access Progesterone, Beckman Coulter Inc., Ireland) na analizatoru UniCel DxI 600 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan), u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu.

Arhivirani podaci obrađeni su statističkim programom SAS 9.4. (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD), uz pomoć modula PROC MEANS, PROC UNIVARIATE i PROC FREQ za deskriptivnu statistiku te PROC GLIMMIX za analizu vjerojatnosti razlika koncentracije hormona progesterona i LH. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost najmanjih kvadrata (engl. *least square means*, LSM) i standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. *standard error mean*, SEM). Razlika uspjeha koncepcije i nastanka inducirano u odnosu na spontani LH val obrađena je s PROC FREQ uz pomoć hi-kvadrat i Fisherova testa.

REZULTATI

Tablica 1. prikazuje postotak steonih krava 30 dana (PR $_{30}$) i 60 dana (PR $_{60}$) nakon umjetnog osjemenjivanja. Pri prvoj dijagnostici 30. dana poslije UO, najviši pototak steonosti bio je u krava iz skupine B, te postoji tendencija k statistički značajnoj razlici u odnosu na krave iz skupine C. No, unutar skupine B bio je i najveći postotak embrionalnih uginuća, iako u krava iz svih triju skupina prilikom detekcije 60. dana nije bilo značajnih razlika u postotku steonosti.

U tablici 2. prikazana je koncentracija progesterona u krava odabranih za analizu LH na sve dane aplikacije hormona. Razina progesterona bitno se ne razlikuje među skupinama. Tablica 3. prikazuje koncentraciju progesterona kod svih krava u pokusu. Signifikantna razlika je uočljiva nulti (0.) dan između krava iz skupina A i B u odnosu na skupinu C ($p < 0,01$), gdje je početna koncentracija progesterona u skupini A $0,15 \pm$

Tablica 1. Postotak gravidnih krava 30 (PR_{30}) i 60 (PR_{60}) dana nakon umjetnog osjemenjivanja

Grupa/ % gravidnih krava	PR_{30}	PR_{60}
A	29,41 ^{ab}	29,41
B	47,37 ^a	31,58
C	21,05 ^b	15,79

^{a,b} Vrijednosti obilježene različitim slovima pokazuju tendenciju k statistički značajnoj razlici ($p < 0,10$).

Tablica 2. Koncentracija progesterona (ng/mL) kod krava odabranih za analizu LH (srednja vrijednost najmanjih kvadrata \pm standardna pogreška srednje vrijednosti)

Grupa/dan	-9	-2	0	7	9
A	1,28 \pm 0,90	2,68 \pm 0,90	0,07 \pm 0,90	2,49 \pm 0,90	0,50 \pm 0,90
B	2,62 \pm 0,90	4,57 \pm 0,90	0,14 \pm 0,90	2,56 \pm 0,90	0,53 \pm 0,90
C	2,56 \pm 0,90	3,13 \pm 0,90	1,99 \pm 0,90	2,14 \pm 0,90	1,05 \pm 0,90

Tablica 3. Koncentracija progesterona (ng/mL) kod svih krava u pokusu (srednja vrijednost najmanjih kvadrata \pm standardna pogreška srednje vrijednosti)

Grupa/dan	-9	-2	0	7	9
A	2,76 \pm 0,56	2,77 \pm 0,56	0,15 \pm 0,56 ^a	2,38 \pm 0,57	0,69 \pm 0,59
B	2,10 \pm 0,54	3,01 \pm 0,57	0,43 \pm 0,54 ^a	2,99 \pm 0,54	0,35 \pm 0,54
C	3,15 \pm 0,54	2,52 \pm 0,54	2,71 \pm 0,54 ^b	3,27 \pm 0,54	0,50 \pm 0,54

^{a,b} Vrijednosti obilježene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,01$).

Tablica 4. Koncentracija LH (ng/mL) po satima vađenja krvi nakon druge aplikacije GnRH, prema ispitivanim protokolima (srednja vrijednost najmanjih kvadrata \pm standardna pogreška srednje vrijednosti)

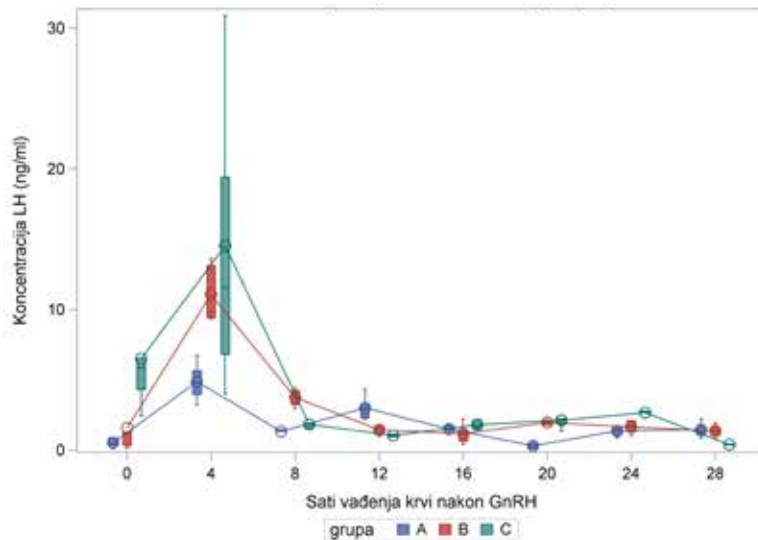
Grupa/sat vađenja	0	4	8	12	16	20	24	28
A	0,71 \pm 1,20 ^a	5,05 \pm 1,20 ^a	1,50 \pm 1,20	3,17 \pm 1,20	1,67 \pm 1,20	0,48 \pm 1,20	1,53 \pm 1,20	1,63 \pm 1,20
B	1,84 \pm 1,16 ^a	11,32 \pm 1,17 ^b	3,98 \pm 1,17	1,69 \pm 1,17	1,41 \pm 1,16	2,23 \pm 1,17	1,90 \pm 1,17	1,48 \pm 1,32
C	6,12 \pm 1,16 ^b	14,14 \pm 1,16 ^b	1,44 \pm 1,16	0,66 \pm 1,16	1,41 \pm 1,16	1,75 \pm 1,16	1,48 \pm 1,32	0,01 \pm 1,16

^{a,b} Vrijednosti obilježene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,01$).

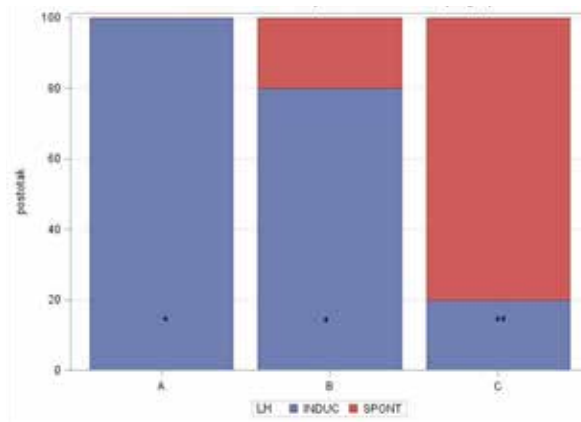
0,56 ng/mL i B 0,43 \pm 0,54 ng/mL niža nego u skupini C gdje je iznosila 2,71 \pm 0,54 ng/mL.

U tablici 4 prikazana je koncentracija LH (ng/mL) po satima venepunkcije poslije GnRH-2, po skupinama. Na koncentraciju LH po skupinama i

vremenu venepunkcije značajno utječe promjer dominantnog folikula ($p < 0,001$) te termin venepunkcije nakon aplikacije GnRH-2 u Ovsynchu ($p < 0,001$). Statistički je značajna razlika koncentracije LH nulti sat uzorkovanja krvi, između



Slika 1. Koncentracija LH (ng/mL) po satima vađenja po skupini.



Slika 2. Postotak krava sa spontanom i/ili induciranim LH valom.

*,** Vrijednosti obilježene različito se međusobno značajno razlikuju ($p < 0,05$)

skupina A i B u odnosu na skupinu C ($p < 0,01$), gdje je u skupini C bila najviša i u prosjeku iznosila $6,12 \pm 1,16$ ng/mL. Četiri sata poslije GnRH-2 koncentracija LH u skupini A značajno je niža u odnosu na krave iz skupina B i C ($p < 0,01$), uz napomenu da je skupina C bila s najvišom razinom LH. Nakon toga, koncentracije se ujednačavaju i više nema statistički značajne razlike.

Slika 1. prikazuje kretanje koncentracije LH nakon aplikacije GnRH-2 za sve tri ispitivane skupine. U skupini C porast LH vala zabilježen je već u vrijeme aplikacije GnRH-2, dok je kod krava skupina A i B vrhunac zabilježen 4 h nakon aplikacije GnRH-2. U skupini A 12 h poslije opet se pojavljuje rast koji prelazi referentnu liniju za određivanje vrhunca lučenja.

Na slici 2 prikazan je postotak krava s induciranim, odnosno spontanom LH valom. Kod krava

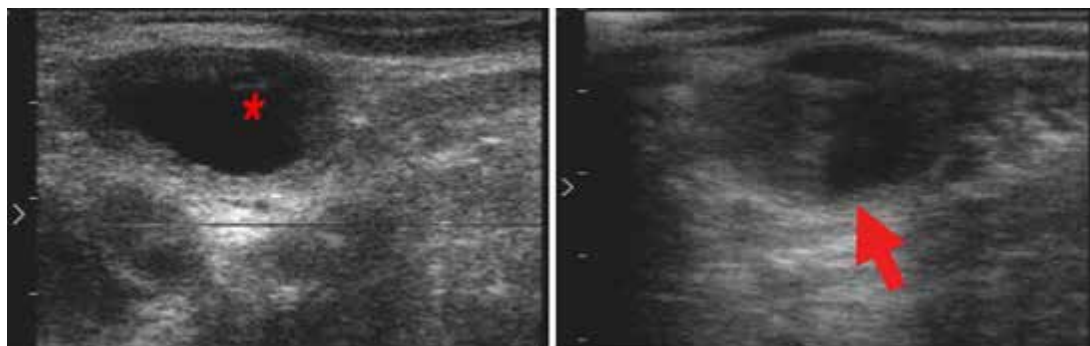
skupine C ovulacija se pojavila prije aplikacije GnRH-2 u Ovsynchu ($p < 0,05$), što je dokaz da je LH val u 80 % krava skupine C počeo spontano.

U tablici 5 prikazani su promatrani čimbenici za usporedbu primijenjenih presinkronizacijskih i kontrolnog protokola. Više od 50 % krava iz svake skupine imalo je nakon aplikacije PGF2 α koncentraciju progesterona nižu od 0,5 ng/mL. Samo su krave skupine A imale dominantni folikul optimalne veličine, dok je u ostale dvije skupine bio značajno većeg promjera ($p < 0,001$). Najviše izmjerene koncentracije LH pulsacijskog vala statistički su se značajno razlikovale između skupine A u odnosu na krave iz skupina B i C ($p < 0,01$). Ovulacija je ultrazvučno detektirana u svih (slika 3), osim jedne krave iz skupine C, koja je ionako kasnije izlučena.

Tablica 5. Promatrani čimbenici za usporedbu ispitivanih protokola

Čimbenici/skupina	A	B	C	P
Progesteron (ng/mL) (na D9)	0,07	0,14	1,99	
Progesteron < 0,5 ng/mL na D9 (% krava)	60	60	60	
Veličina folikula (mm)	17,6	27,4	28,2	<0,001
LH val (n krava)	5	5	5	
GnRH-inducirani LH (n krava)	5	4	1	<0,05
Najviša koncentracija LH (ng/mL)	5,05	11,32	14,14	<0,01
Vrijeme pojave (od GnRH-2)	4	4	0	
Ovulacija (n krava)	5	5	4	

Slika 3. Ultrazvučna potvrda ovulacije dominantnog folikula na jajniku 18 sati (lijevo) i 24 sata (desno) nakon GnRH-2 (* označava dominantni folikul, a strelica CL u nastajanju)



RASPRAVA

Cilj rada bio je ustanoviti osobine predovulacijskih LH valova kod krava tretiranih dvama presinkronizacijskim protokolima (skupina A: modifikacija Double Ovsyncha, skupina B: modifikacija Presyncha) u odnosu na kontrolnu skupinu C, u kojoj su krave tretirane standardnim Ovsynch protokolom, i to usporedbom incidencije induciranih u odnosu na spontane LH valove, praćenjem koncentracije LH vala i vremenom pojave vrhunca pulsacije. U postupku su registrirani postotak steonosti, promjer dominantnog folikula, razina i distribucija koncentracije progesterona tijekom faza sinkronizacijskih protokola (Špoljarić, 2015., Štibrić, 2017.).

Sukladno Pulley i suradnicima (2015.), GnRH inducirani LH val pojavljuje se u više od 90 % krava kojima je progesteron nakon aplikacije PGF2 α bio nizak (< 1 ng/mL), što je u skladu s našim rezultatima istraživanja, gdje je kod svih krava skupine A i većine krava skupine B došlo

do inducirane pojave LH vala, a koncentracija progesterona bila je ispod 0,5 ng/mL, uz visoku distribuciju, što je u skladu s istraživanjem Štibrića (2017.). Spontani LH val pojavio se u skupini C i samo kod jedne krave skupine B. Incidencija spontanog LH valova veća je u krava presinkroniziranih s dvije aplikacije PGF2 α u razmaku od 10 dana, nego kod krava koje su primile GnRH u presinkronizaciji. Te su krave pokazivale tendenciju ranijoj pojavi LH vala ($p = 0,114$) (Stevenson i sur., 1987.; Stevenson i sur., 2006.). Naši su podaci u skladu s navedenima jer je u skupini B, koja je presinkronizirana modificiranim Presynch protokolom (jedna aplikacija PGF2 α), došlo do pojave spontanog LH vala u jedne krave. No, krave koje su u presinkronizaciji primile dodatni GnRH imale su više koncentracije LH nego krave bez GnRH (Pulley i sur., 2015.). U našem istraživanju krave skupine C, koje su imale spontanu pojavu LH vala, imale su i najviše koncentracije LH, za razliku od Pulley i suradnika (2015.) gdje su krave presinkronizirane s PGF2 α i sa spon-

tanom pojavom LH imale niže koncentracije LH vrhunca u usporedbi s induciranim LH. S obzirom na to da se u skupini C nalazi jedina krava koja u pokusu nije ovulirala, a koja ima najviše koncentracije LH, vjerojatno je riječ o folikularnoj cisti, jer krave s folikularnim cistama imaju više koncentracije pri vrhuncu LH vala (Kittok i sur., 1973.). Lucy i Stevenson (1986.) opisuju pojavu LH vala u svih tretiranih junica i krava nakon pre-sinkronizacije s PGF2 α u razmaku od 11 dana te aplikacijom GnRH 72 h nakon drugog PGF2 α , ali sa 61 % spontanih LH valova.

U literaturi su opisani rasponi razina LH, od 2,19 do 5,24 ng/mL (Pulley i sur., 2015.); 0,6 – 6,7 ng/mL (Lucy i Stevenson, 1986.); 9,6 ng/mL nakon 50 μ g GnRH odnosno 21,6 ng/mL nakon 100 μ g GnRH (Souza i sur., 2009.), a razlike su vjerojatno posljedica različitih LH standarda, korištenih GnRH analoga i učestalosti uzorkovanja krvi. Frekvencija LH pulseva povećana je u krava s rastućim folikulom u odnosu na krave s perzistentnim folikulom (Ahmad i sur., 1996.). Nadalje, učinak u stimuliranju ovulacije i otpuštanju LH vala slabiji je u tovnih u odnosu na mliječna goveda (Martinez i sur., 2003.).

Do ovulacije dolazi u kratkom periodu između 24 i 32 sata nakon aplikacije GnRH, što je ustanovljeno ultrazvučnim pregledom jajnika svaka dva sata (Wiltbank i Pursley, 2014.). U kontrolnih skupina LH val se pojavljivao 52 do 104 h poslije aplikacije PGF2 α (Pulley i sur., 2015.), dok se najraniji LH val poslije PGF2 α opaža 36 do 48 h (Twagiramungu i sur., 1992.; Walkeri sur., 1996., Špoljarić, 2015.). Navedeno je u skladu i s našim rezultatima, gdje je do spontane pojave LH vala došlo unutar 48 h od aplikacije PGF2 α . Kod krava kojima je LH val bio induciran aplikacijom GnRH-2, vrhunac se pojavio 4 sata nakon spomenute aplikacije.

Postotak steonih krava bio je najveći u skupini B, dok u skupini A odgovara klasičnom postotku poslije Ovsyncha. Što se tiče skupine B, inicijalni se uspjeh može usporediti s uspjehom koncepcije poslije UO-a na detektirani estrus (Rabiee i sur., 2005.). U skupini C je postotak gravidnih životinja uvjerljivo najniži, zbog preuranjenih ovulacija i početka sinkronizacije u neodgovarajućoj fazi ciklusa. Naime, u svrhu kontrole pojave LH vala i ovulacije, posljednja doza GnRH trebala bi biti aplicirana kravama

prije spontane pojave LH vala, kako bi UO rezultirao sličnim postotkom steonih krava kao kod osjemenjivanja pri opaženom estrusu (Peters i Pursley, 2002.). Snižena je plodnost opažena i u krava s malim porastom koncentracije progesterona prije UO-a, vjerojatno zbog nekompletne razgradnje CL-a, koja je opažena u 10 do 25 % krava tretiranih Ovsynchom (Martins i sur., 2011.; Giordano i sur., 2012a). U našem istraživanju krave skupine C imaju višu koncentraciju progesterona prije UO-a u odnosu na krave skupina A i B, iako ne statistički značajno. Cirkulirajuće razine progesterona mogu tijekom Ovsynch protokola biti preniske za optimalnu plodnost, pogotovo u anovulacijskih mliječih krava, u krava blizu estrusa, u ranoj lutealnoj fazi, ali čak i u kasnoj lutelanoj fazi ako dođe do regresije CL-a prije aplikacije PGF2 α (Štibrić, 2017.). Kod anovulacijskih krava ili krava kojima je Ovsynch započinjan u vrijeme niske koncentracije progesterona opažena je slabija plodnost (Bisnatto i sur., 2010.). Nadalje, vrhunac LH vala uvelike je smanjen ako se GnRH daje u prisutnosti povišenog progesterona (Giordano i sur., 2012b.).

Souza i suradnici (2007.) dokazali su da krave kod kojih dolazi do ovulacije dominantnog folikula najvećeg promjera 15 – 19 mm imaju veći postotak steonosti (47,4 %) u odnosu na krave kod kojih dolazi do ovulacije dominantnog folikula promjera manjeg od 14 mm (36,2 %) ili većeg od 20 mm (38,2 %), ali da ukupno manje od 50 % krava ovulira iz dominantnih folikula optimalne veličine. Naši podaci nisu u skladu s navedenim jer su krave skupine A, s dominantnim folikulom optimalne veličine, imale manji postotak steonosti od krava čiji su folikuli premašivali promjer od 20 mm (skupina B). Produljen rast i životni vijek dominantnog folikula za trajanja nižih koncentracija progesterona posljedica je povećane stimulacije od strane LH (Ahmad i sur., 1996.). S obzirom na koncentracije LH vala u skupini A, koje su preko referentne vrijednosti prelazile dva puta, vjerojatno je riječ o produljenoj pulsaciji LH vala (Špoljarić, 2015.), a postoji rastući broj dokaza o kompromitiranoj sposobnosti oocite unutar perzistentnog folikula, najvjerojatnije zbog njezine izloženosti produljenom periodu LH pulseva od 1 pulsa svaka 1 – 2 sata, i zbog abnormalno visoke intrafolikularne koncentracije estradiola (Austin i sur., 1999.).

ZAKLJUČCI

Modificirani Presynch protokol rezultirao je najvišim postotkom steonih krava, međutim pad postotka steonosti 60. dana sugerira da je prevalencija kasnih embrionalnih i fetalnih uginuća viša u modificiranom Presynch i Ovsynch protokolu u odnosu na modificirani Double Ovsynch. Sva su tri ispitivana protokola bila učinkovita u indukciji ovulacije u mliječih krava. Rezultati skupine C dokazuju da je preduvjet dobre učinkovitosti Ovsynch protokola početak postupka u srednjoj fazi ciklusa i da se time najbolje prevenira spontana LH pulsacija, čime je povišen rizik ovulacije bez koncepcije. Presinkronizirajući, složeni protokoli učinkovitije sinkroniziraju ovulaciju prevenirajući pogrešku. Razlike u veličini dominantnog folikula dokazuju da DO najbolje sinkronizira vrijeme ovulacije i UO. Koncentracija LH u negativnoj je korelaciji s veličinom folikula, a varijabilna u odnosu na vrijeme venepunkcije. Mali broj uzoraka i rezultati sugeriraju potrebu sveobuhvatnijeg istraživanja.

LITERATURA

- AHMAD, N., S. W. BEAM, W. R. BUTLER, D. R. DEEVER, R. T. DUBY, D. R. ELDER, J. E. FORTUNE, L. C. GRIEL Jr., L. S. JONES, R. A. MILVAE, J. L. PATE, I. REVAH, D. T. SCHREIBER Jr., D. H. TOWNSON, P. C. W. TSANG, E. K. INSKEEP (1996): Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profile in dairy cows and heifers. *J. Anim. Sci.* 74, 1943-1952.
- AUSTIN, E. J., M. MIHM, 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.
- 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, 3578-3587.
- FERGUSON, J. D., D. T. GALLIGAN, N. THOMSEN (1994): Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2695-2703.
- FONSECA, F. A., J. H. BRITT, B. T. McDANIEL, J. C. WILK, A. H. RAKES (1983): Reproductive traits of holsteins and jersey 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, 1128-1147.
- GEREŠ, D. (2016): Snižena plodnost mliječih krava. Savjetovanje o govedarstvu. Ivaničgrad. HPA, 28.-29. siječnja 2016.
- GIORDANO, J. O., M. C. WILTBANK, J. N. GUENTHER, R. PAWLISCH, S. BAS, A. P. CUNHA (2012a): Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 95, 639-653.
- GIORDANO, J. O., P. M. FRICKE, J. N. GUENTHER, G. LOPES JR, M. M. HERLIHY, A. B. NASCIMENTO, M. C. WILTBANK (2012b): Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 3781-3793.
- KITTOCK R. J., J. H. BRITT, E. M. CONVEY (1973): Endocrine response after GnRH in luteal phase cows and cows with ovarian follicular cysts. *J. Anim. Sci.* 37, 985-989.
- 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, 2783-2793.
- LUCY, M. C., J. S. STEVENSON (1986): Gonadotropin-releasing hormone at estrus: Luteinizing hormone, estradiol, and progesterone during the periestrus and postinsemination periods in dairy cattle. *Biol. Reprod.* 35, 300-311.
- LUCY, M. L. (2007): The bovine dominant ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 85, 89-99.
- MARTINEZ, M. F., R. J. MAPLETOFT, J. P. KASTELIC, T. CARRUTHERS (2003): The effects of 3 gonadorelin products on luteinizing hormone release, ovulation, and follicular wave emergence in cattle. *Can. Vet. J.* 44, 125-131.
- MARTINS, J. P., R. K. POLICELLI, L. M. NEUDER, W. RAPHAEL, J. R. PURSLEY (2011): Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F₂α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 2815-2824.
- MEADOWS, C., P. J. RAJALA-SCHULTZ, G. S. FRAZ-

- ER (2005): A spreadsheet-based model demonstrating the non-uniform economic effects of varying reproductive performance in Ohio dairy herds. *J. Dairy Sci.* 88, 1244-1254.
- PETERS, M. W., J. R. PURSLEY (2002): Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF 2α and GnRH. *J. Dairy Sci.* 85, 2403-2406.
 - PULLEY, S. L., D. H. KEISLER, J. S. STEVENSON (2015): Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 98, 1-14.
 - RABIEE, A. R., I. J. LEAN, M. A. STEVENSON (2005): Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 88, 2754-2770.
 - RAJAMAHENDRAN, R., J. ROBINSON, S. DESBOTTES, J. S. WALTON (1989): Temporal relationships among estrus, body temperature, milk yield, progesterone and luteinizing hormone levels, and ovulation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 31, 1173-1182.
 - ROELOFS, J. B., E. G. BOUWMAN, S. J. DIELEMAN, F. J. C. M. VAN EERDENBURG, L. M. T. E. KAALLANSBERGEN, N. M. SOEDE, B. KEMP (2004): Influence of repeated rectal ultrasound examinations on hormone profiles and behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 62, 1337-1352.
 - SOUZA A. H., A. GUMEN, E. P. 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, E. P. B. SILVA, A. GUMEN, H. AYRES, J. N. GUENTHER, M. C. WILTBANK (2009): Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows: Efficacy based on induced ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. *Theriogenology* 72, 271-279.
 - STEVENSON, J. R., 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., M. C. LUCY, E. P. CALL (1987): Failure of timed inseminations and associated luteal function in dairy cattle after two injections of prostaglandin F 2α . *Theriogenology* 28, 937-946.
 - ŠPOLJARIĆ B. (2015): Usporedba učinka različitih indukcijskih postupaka na rasplodivanje mliječih krava. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
 - ŠPOLJARIĆ, B., G. ŠTIBRIĆ, D. GERESŠ (2013): Comparison of two protocols for synchronisation of ovulation on dairy farm in Croatia. Proceedings of the XIII Middle European Buiatric's Congress, Beograd, Srbija, pp. 136-146.
 - ŠTIBRIĆ G. (2017): Učinkovitost različitih sinkronizacijskih protokola sukladno fazi spolnog ciklusa u mliječih krava. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
 - TWAGIRAMUNGU, H., L. A. GUILBAULT, J. PROULX, P. VILLENEUVE, J. J. DUFOUR (1992): Influence of an agonist of gonadotropin-releasing hormone (buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.* 70, 1904-1910.
 - WALKER, W. L., R. L. NEBEL, M. L. MCGILLIARD (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.
 - WILTBANK, M. C., J. R. PURSLEY (2014): The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 81, 170-185.
 - WILTBANK, M. C., P. M. FRICKE, S. SANGSRITAVONG, R. SARTORI, O. J. GINTHER (2000): Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83, 2998-3007.
 - WILTBANK, M., H. LOPEZ, R. SARTORI, S. SANGSRITAVONG, A. GUMEN (2006): Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17-29.