

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA PATOLOŠKU FIZIOLOGIJU

Adam V. Šuluburić

**Ispitivanje parametara efikasnosti
reprodukcije visokomlečnih krava nakon
sinhronizacije estrusa i stimulacije lutealne
funkcije**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2019

MENTOR

Dr Dragan Gvozdić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu

Fakultet veterinarske medicine

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Dragan Gvozdić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu

Fakultet veterinarske medicine

Dr Slobodanka Vakanjac, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu

Fakultet veterinarske medicine

Dr Miloš Pavlović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu

Fakultet veterinarske medicine

Dr Aleksandar Božić, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu

Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Ispitivanje parametara efikasnosti reprodukcije visokomlečnih krava nakon sinhronizacije estrusa i stimulacije lutealne funkcije

Rezime

Rani embrionalni razvoj kod krava može biti negativno pogođen nedovoljnom lutealnom proizvodnjom progesterona (P4). Cilj našeg istraživanja bio je da ispitamo mogući uticaj tretmana gonadotropnim oslobađajućim hormonom (GnRH) i/ili humanim horionskim gonadotropinom (hCG), nakon indukcije estrusa tretmanom prostaglandinom F2 α , na povišeno lučenje P4 i rezultate steonosti krava. Ogled je sproveden na kravama Simentalske rase (n = 110), između 3-5 laktacije, sa prosečnom proizvodnjom mleka od 6500L/305 dana, 40-80 dana posle partusa i to na četiri ogledne grupe: 1) krave sa spontanom estrusom (C: kontrolna grupa), 2) GnRH tretman u vreme veštačkog osemenjavanja (VO) (grupa O), 3) GnRH + hCG tretman 7 dana nakon VO (OP grupa), i 4) hCG tretman 7. dana posle VO (P grupa). Sve životinje su dvostruko osemenjene (u vreme otkrivanja estrusa i posle 12 \pm 2h). Uzorci seruma i mleka krvi sakupljeni su u estrusu, 14, 21. i 28. dana nakon VO. Serumski P4 i estradiol-17 β (E2) su određivani komercijalnim radioimunološkim testom (RIA), a nivo P4 u mleku je određivan pomoću enzimoimunološkog testa (EIA). Dijagnostika steonosti je vršena ultrazvukom između 28. i 35. dana nakon VO. Statistička značajnost razlike vrednosti P4 i E2 u serumu, kao i P4 u mleku, kao i procentu steonih krava utvrđene su pomoću Dunn's Multiple Comparison test i Z testa za poređenje proporcija.

Koncentracija P4 u krvnom serumu bila je statistički značajno povišena 14, 21. i 28. dana nakon VO kod životinja tretiranih sa hCG-om (14 dan, P:C, P:O, p<0.001; OP:C, p<0.05; 21 dan, P:C, P:O, p<0.001; P:OP, p<0.05; 28 dan, P:C, P:O, p<0.001; P:OP, p<0.05) što ukazuje na povećanu aktivnost lutealnog tkiva, sa sličnom tendencijom u vrednostima P4 u mleku. Vrednosti E2 u krvnom serumu nisu dale jasne podatke za procenu funkcije jajnika. Tretman sa hCG-om tokom rane lutealne faze takođe je doveo do povećanja procenta steonih krava Simentalske rase (P:C i (P+OP+P):C, p<0.05).

Ključne reči: progesteron, estradiol, efikasnost reprodukcije, sinhronizacija estrusa, lutealna funkcija, visokomlečne krave.

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Patološka fiziologija, Fiziologija reprodukcije

UDK: 591.16 : 636.2 : 612.63.03

Reproduction efficiency in high-yielding dairy cows after estrus synchronization and luteal function stimulation

Summary

Early embryonic development may be negatively affected by insufficient progesterone (P4) production therefore the aim of our study was to increase it by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and/or human chorionic gonadotropin (hCG) treatments after inducing of oestrus by prostaglandin treatment. Lactating Simmental dairy cows (n=110), between 3 to 5 lactations, with average milk production of 6500L/305 days, at 40-80 days postpartum were used and grouped as follows: 1) spontaneous oestrus (C: control group), 2) GnRH treatment at AI (O group), 3) GnRH at AI + hCG treatment at Day 7 after AI (OP group), and 4) hCG treatment at Day 7 after AI (P group). All animals were double inseminated (at the time of oestrus detection and after 12±2h). Blood serum and milk samples were collected at oestrus, 14, 21. and 28. days after AI. Serum P4 and estradiol-17β (E2) were determined using a commercial radioimmunoassay (RIA) test, and milk P4 was determined using enzyme-linked immunoassay (EIA) test. Pregnancy status was confirmed by means of ultrasonography between Days 28. and 35. after AI. Differences of serum or milk P4 and E2 medians, and pregnancy rate were determined using Dunn's Multiple Comparison Tests and Z test, respectively.

Serum P4 medians were significantly higher at Days 14, 21. and 28. after AI in the hCG treated animals (Day 14, P:C, P:O, p<0.001; OP:C, p<0.05; Day 21, P:C, P:O, p<0.001; P:OP, p<0.05; Day 28, P:C, P:O, p<0.001; P:OP, p<0.05), indicating increased luteal activity, with the similar tendency in whole milk P4 values. Blood serum E2 values were inconclusive for the ovarian function estimation. Treatment with hCG during the early luteal phase also induced increased pregnancy rate in the Simmental dairy cows (P:C and (P+OP+P):C, p<0.05).

Key words: Progesterone, estradiol, oestrus synchronization, pregnancy rate, Simmental dairy cows.

Scientific field: Veterinary medicine

Narrower scientific field: Pathophysiology, Reproduction physiology

UDC: 591.16 : 636.2 : 612.63.03

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature	5
2.1. Reproductivni ciklus visoko-mlečnih krava	5
2.1.1. Folikularna faza ciklusa.....	6
2.1.2. Lutealna faza ciklusa	9
2.1.3. Neuroendokrina regulacija estrusnog ciklusa.....	11
2.2. Parametri reprodukcije u intenzivnom uzgoju	13
2.2.1. Efikasnost reprodukcije visoko-mlečnih krava	14
2.3. Postpartalna anestrija.....	15
2.3.1. Bilans energije i reprodukcija u postpartalnom periodu.....	18
2.3.2. Tipovi postpartalne anestrije	18
2.4. Metode za kontrolu reprodukcije visokomlečnih krava	21
2.4.1. Primena prostaglandina	21
2.4.2. Prostaglandini i GnRH	24
2.4.3. Progestageni	27
2.4.4. hCG.....	29
2.5 Progesteron i uloga u detekciji estrusa.....	31
2.6 Estradiol i uloga u estrusu	32
3. Ciljevi i zadaci istraživanja	34
4. Materijal i metode rada	36
4.1. Ogledne grupe i tretmani.....	36
4.2. Prikupljanje uzoraka krvnog seruma i mleka	38
4.3. Određivanje koncentracije progesterona u krvnom serumu.....	38
4.4. Određivanje koncentracije progesterona u mleku.....	38
4.5. Određivanje koncentracije estradiola u krvnom serumu.....	39
4.6. Ultrazvučna dijagnostika graviditeta.....	39
4.7. Statistička analiza rezultata	39
5. Rezultati istraživanja	41
5.1. Uticaj tretmana na steonost krava	41
5.2. Koncentracija progesterona.....	43
5.2.1. Koncentracija progesterona i detekcija estrusa	43

5.2.2. Koncentracija progesterona u krvnom serumu nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja	45
5.2.3. Koncentracija progesterona u mleku nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja	49
5.2.4. Korelacija koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja	52
5.2.5. Koncentracija progesterona u krvnom serumu nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja kod steonih krava.....	54
5.2.6. Koncentracija progesterona u krvnom serumu nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja kod nesteonih krava.....	58
5.3. Koncentracija estradiola	61
5.3.1. Koncentracija estradiola u krvnom serumu svih oglednih grupa krava .	61
5.3.2. Koncentracija estradiola u krvnom serumu steonih krava.....	63
5.3.3. Koncentracija estradiola u krvnom serumu nesteonih krava.....	65
5.3.4. Koncentracija estradiola u krvnom serumu nesteonih i steonih krava ...	67
6. Diskusija.....	69
6.1. Uticaj tretmana na steonost krava	69
6.2. Koncentracija progesterona i detekcija estrusa	69
6.3. Koncentracija progesterona u krvnom serumu i mleku posle estrusa.....	71
6.4. Korelacija koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku.....	73
6.5. Koncentracija progesterona i dijagnostika graviditeta	74
6.6. Koncentracija estradiola u krvnom serumu.....	74
7. Zaključci.....	77
8. Literatura	78

1. UVOD

Optimalna reprodukcija predstavlja jedan od osnovnih uslova za efikasnu intenzivnu govedarsku proizvodnju. U klasičnoj postavci o uspešnosti reprodukcije visokomlečnih krava najčešće se polazi od zahteva “jedno tele godišnje”, ali savremeni uzgoj koji se bazira na ekonomskim pokazateljima dovodi u pitanje njegovu održivost. Idealan slučaj je da visokoproduktivna mlečna krava ostaje steona u vremenskom intervalu tako da se maksimalno koriste njene proizvodne sposobnosti. U stvarnosti se dešava da se većina mlečnih krava osemenjava u određeno vreme nakon partusa, a trajanje perioda “čekanja” zavisi od ekonomskih zahteva sistema uzgoja. U većini sistema uzgoja se krave osemenjavaju po isteku fiksnog vremenskog perioda posle partusa (“voluntary waiting period”, eng.) i to u spontanom estrusu. Ukoliko nakon tog perioda estrus izostane (ili izostane njegovo blagovremeno detektovanje i praćenje) krave se proglašavaju anestričnim, što ih kvalifikuje za sprovođenje nekog od programa kontrole reprodukcije.

Agresivniji pristup problemu reprodukcije na farmi podrazumeva da se programom kontrole obuhvataju sve životinje na farmi. Programi kontrole reprodukcije bazirani su na primeni hormona i imaju za cilj da se kontroliše vreme prvog osemenjavanja, vreme osemenjavanja krava koje nisu ostale steone, kao i da se vrši tretman anestričnih krava. Potpuna optimizacija reprodukcije trebalo bi da bude 100% efikasna. Pобољшanje postojeće efikasnosti može se postići optimizacijom primenjenog sistema sinhronizacije estrusa, ili alternativno dodatnim tretmanima koji pobošljavaju rezultate osemenjavanja nakon sinhronizacije (primena sintetskog prostaglandina $F2\alpha$, $PGF2\alpha$; gonadotropnog rilizing hormona, GnRH; progesterona i sl.).

Program kontrole reprodukcije na farmi visokomlečnih krava ima za cilj da se reproduktivni parametri stada usklade sa proizvodnjom a da se pri tome očuvaju svi standardi dobrobiti kad je reč o pojedinačnim životinjama. Definisane metode za sprovođenje programa kontrole reprodukcije i njihovo sistematsko sprovođenje je jedan od ključnih zahteva koji se mora ispuniti u rukovođenju na farmi mlečnih krava.

Reproduktivna biotehnologija ili asistirana reprodukcija, kako se u novije vreme naziva, je oblast koja se u veterinarskoj medicini intenzivno razvijala u prošlom veku i koja još uvek napreduje. Ona je u stvari najbolji dokaz kako se bazična naučna istraživanja mogu preneti u rutinsku veterinarsku praksu. Postoje više metoda reproduktivne

biotehnologije koje se danas upotrebljavaju i sve se mogu hronološki podeliti u 4 generacije. Prva i najstarija metoda asistirane reprodukcije je svakako veštačko osemenjavanje, sledeća se razvila generacija metoda embriotransfera („*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*“, MOET), treća generacija predstavlja metode *In vitro* fertilizacije, a kao najnovija je prisutna generacija *Transgeneze* – kloniranje, upotreba embrionalnih STEM i GERM ćelija, kao i genetskih markera u selekciji („*marker-assisted selection*“; Thibier, 2005; Bertolini i sar., 2009).

Posle veštačkog osemenjavanja, koja pored toga što je najstarija metoda asistirane reprodukcije, ujedno predstavlja i najmasovniju biotehničku metodu u govedarstvu (više od 100 miliona godišnje), druga po masovnosti primene je sinhronizacija estrusa kod krava. Postoji veći broj protokola koje se danas upotrebljavaju u tu svrhu, ali su svi bazirani na dva osnovna principa: skraćivanje estrusnog ciklusa (lutealne faze) ili njegovo produžavanje. Uglavnom se primenjuju hormonski preparati: prirodni ili sintetski analozi prostaglandina, progestagena, gonadotropnih i gonadorilizing hormona, samostalno ili u odgovarajućoj kombinaciji (Moore i Thatcher, 2006). Pored hormonalnih postoje i nehormonalne metode, koje su najčešće upotrebljavale kod vrsta sa sezonskim karakterom razmnožavanja (mali preživari, ekvidi) i to na osnovu manipulacije svetlosnim režimom.

Primena prostaglandina (PGF_{2α}) je osnovni metod za sinhronizaciju estrusa krava i bazirao se inicijalno na veštini veterinaru da rektalnim putem palpira žuto telo (CL). Osetljivost žutog tela na prostaglandinski (PG) nadražaj/stimulus traje 11-12 dana (od 5-6 do 17-18 dana ciklusa) i zavisi od postojanja receptora za njegovo vezivanje. Refraktarnost CL na aplikaciju PG je prisutna od 17. dana prethodnog do 5. dana narednog ciklusa. Vrlo važan preduslov je da životinja ima redovan estrusni ciklus t.j. funkcionalno žuto telo i da je negravidna. Njen nedostatak je što je obavezna detekcija estrusa koji se pojavljuje u širokom intervalu od 2 do 5 dana od tretmana prostaglandinima, u zavisnosti od faze rasta folikulinskih talasa (regrutacija, selekcija, dominacija, regresija).

Postoje više metoda koji su zasnovani na produživanju progestagenske faze estrusnog ciklusa, odnosno održavanje visokog nivoa progesterona čak i posle regresije žutog tela. Estrus se javlja 2-5 dana posle prestanka tretmana koji može da traje od 7-14 dana. Administracija progestagena može biti peroralna primenom sintetskog progesterona (Melengesterol Acetate, MGA), intravaginalnom aplikacijom progestagena (*Controlled Internal Drug Release*, CIDR, Zoetis; *Progesterone-Releasing Intravaginal Device*, PRID-Delta, Ceva Animal Health) ili aplikacijom putem subkutanog implantata (ušni implant,

Synchro-Mate B, Crestar metod). Peroralna aplikacija progestagena (0.5 mg MGA/dan) traje po pravilu 14 dana i može se kombinovati sa primenom PG i GnRH (Brown i sar., 1988). Metode koje se baziraju na intravaginalnoj i subkutanoj aplikaciji progestagenskih implantanta traju kraće (7-11 dana) i podrazumevaju primenu estrogenih hormona na početku i ekvinog horionskog gonadotropina (eCG) na kraju tretmana. Upotreba estrogena je neophodna zbog prekida funkcionalnosti dominantnog folikula i iniciranje novog talasa folikulinskog rasta.

U veterinarskoj praksi se takođe primenjivala subkutana aplikacija sintetskog progestagena (norgestomet, ranije bio poznat kao Synchro-Mate B ili Crestar metod). Silikonski implant impregniran norgestomet-om aplikuje se subkutano sa spoljašnje strane uha krave, a istovremeno se daje i/m injekcija estradiola. Visoka doza progestagena koja se 9-10 dana kontinuirano oslobađa u krv pacijenta imitira lutealnu fazu estrusnog ciklusa. Na dan vađenja implanta aplikuje se 400-600 IJ eCG-a, da bi izvršili osemenjavanje 48-56 sati kasnije. Kod mlečnih krava neophodna je i aplikacija prostaglandina 48 sati pre završetka progestagenskog tretmana.

Prve rezultate primene takozvanog GPG programa (GnRH-PG-GnRH) saopštili su Pursley i sar. (1995). Kasnije je ovaj program poznat kao OvSynch, primenjen sa brojnim modifikacijama i poznat je pod nazivom PreSynch, COSynch, Select Synch, Hybrid Synch, Heat Synch. Suština protokola je da se na početku aplicira inicijalna doza GnRH koja dovodi do luteinizacije ili atrezije dominantnog folikula. U tom trenutku počinje novi talas folikulinskog rasta, tj. regrutacije novih folikula, a istovremeno se stvara i žuto telo, odnosno ovaj hormon pojačava njegovu funkciju. Sedam do osam dana kasnije aplicira se jedna doza prostaglandina koji dovodi do luteolize i prekida funkcije žutog tela, u trenutku kada je na jajniku prisutan dominantni folikul koji luči estradiol i brzo finalizira svoj rast u predovulatorni folikul. Dopunska injekcija GnRH-a daje se 48 sati nakon aplikacije prostaglandina da bi se osigurala ovulacija i izvršili veštačko osemenjavanje u toku sledećih 8-20 sati, s najboljim rezultatima koncepcije oko 16 sati nakon poslednje injekcije gonarilizing hormona.

Progesteron je steroidni hormon koga proizvodi žuto telo (CL) i neophodan je za normalno uspostavljanje graviditeta i ono što je u reproduktivnoj biologiji poznato kao materinsko prepoznavanje graviditeta ("*maternal recognition of pregnancy*", engl.) (Spencer i sar., 2004). Visoka proizvodnja mleka i povišen metabolički klirens je povezan sa sniženim nivoom progesterona u krvnoj plazmi krava (Sangsritavong i sar., 2002), sa mogućim negativnim efektom na rezultate oplodnje. Nadoknađivanje progesterona tokom

perioda ranog embrionalnog razvoja dovodi do sniženja stepena embrionalnog uginuća kod visokomlečnih krava (Lopez-Gatius i sar., 2004). Prisustvo dodatnih žutih tela može delovati preventivno na pojavu ranog fetalnog mortaliteta (Lopez-Gatius i sar., 2002; Lopez-Gatius i sar., 2004; Garcia-Ispuerto i sar., 2006). Štaviše, uspešna gestacija može se dovesti u pozitivnu korelaciju sa koncentracijom progesterona u krvnoj plazmi krava tokom prvih pet nedelja graviditeta (Starbuck i sar., 2004). Suplementacija progesterona tokom ranog postinseminacionog perioda dovodi do četverostrukog porasta dužine trofoblasta i šestostrukog porasta koncentracije interferona tau u uterusu krava (Mann i sar., 2006). Jedna od mogućih strategija koja bi dovela do porasta koncentracije progesterona je primena humanog horionskog gonadotropina (hCG) nakon veštačkog osemenjavanja krava. Horionski gonadotropin ima aktivnost sličnu luteinizirajućem hormonu i nakon njegovog vezivanja za receptore za LH dovodi do povišene proizvodnje progesterona iz malih lutealnih ćelija (Stevenson i sar., 2007). Postoje podaci da su GnRH i hCG podjednako efikasni u izazivanju pojave akcesornih žutih tela, što je praćeno povišenom koncentracijom progesterona u krvnoj plazmi tretiranih životinja (Schmitt i sar., 1996).

U uslovima proizvodnje zastupljenim na farmama visokomlečnih krava na našem prostoru, efikasna reprodukcija predstavlja jedan od ključnih faktora koji utiče na optimalne proizvodne rezultate. Smatramo da je potrebno definisati program kontrole reprodukcije kojim se može obuhvatiti veliki broj životinja i koji se može uskladiti sa potrebom održavanja standarda dobrobiti na farmama visokomlečnih krava.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Reproductivni ciklus visoko-mlečnih krava

Životni ciklus krava sastoji se od četiri glavna perioda: fetalni, prepubertetski, reproduktivni i senilni period (Stančić i sar., 2002). Polazeći od osnovnog razloga držanja krava svakako je najznačajniji reproduktivni period. Nakon završetka puberteta junice ulaze u reproduktivni period života pojavom prvih estrusnih ciklusa. Nakon prvog uspešnog osemenjavanja dolazi do graviditeta, teljenja i prve laktacije. Cilj uzgajivača jeste da svaka reproduktivno sposobna krava daje što veću količinu mleka i da se od krave dobije jedno tele godišnje. Efikasnost reprodukcije krava je maksimalna u početku reproduktivnog perioda i obično se zadržava na visokom nivou tokom nekoliko godina života, da bi došlo do njenog postepenog pada sve do potpunog gubitka reproduktivne funkcije. Tako je vek iskorištavanja visokomlečnih krava u uslovima intenzivnog uzgoja prosečno 5 godina, dok su glavni razlozi njihovog isključivanja iz stada nedovoljna proizvodnja mleka, neplodnost, mastitis i bolesti lokomotornog sistema (<http://www.epa.gov/agriculture/ag101/dairyphases.html>, 2015).

Krave su poliestrične životinje i najveći deo reproduktivnog perioda plodnih polno zrelih ženki protiče u fazi anestrije, koja je u fiziološkim uslovima prouzrokovana graviditetom (gestaciona anestrija) ili puerperijumom (involucija uterusu, laktaciona anestrija). I pored toga, najviše pažnje se posvećuje onim jedinkama koje se nalaze u estrusu, koji predstavlja najkraći deo estrusnog ciklusa. Razlog za to leži u činjenici da se u tom relativno kratkom periodu postupcima držalaca i stručnih lica može značajno uticati na reprodukciju životinja. Estrusni ciklus kod krava se sastoji od folikularne i lutealne faze. Za vreme folikularne faze estrusnog ciklusa na jajnicima dolazi do završnih etapa razvoja zrelih folikula i njihove ovulacije. U toku lutealne faze dominantna struktura na jajnicima je žuto telo (*corpus luteum*), koje se formira na mestu ovuliranog folikula. U tabeli 2.1. su prikazani dužina estrusnog ciklusa, trajanje estrusa i vreme nastanka ovulacije.

Tabela 2.1. Dužina estrusnog ciklusa, trajanje njegovih faza i vreme nastanka ovulacije kod krava (Hafez, 1987)

Vrsta (rasa)	Dužina ciklusa	Trajanje estrusa	Vreme ovulacije
Krava	21-22 dana	18-19 sati	35-45 sati od početka estrusa

2.1.1. Folikularna faza ciklusa

Folikularna faza estrusnog ciklusa se deli na period *proestrusa* i *estrusa*. Naglo sniženje koncentracije progesterona (P4) koje nastaje nakon luteolize uklanja njegov inhibitorni uticaj na "pulsni generator sekrecije GnRH" u hipotalamusu (Clarke i sar., 2005) i tako omogućava porast učestalosti sekrecije gonadotropnog oslobađajućeg hormona (GnRH), a time i luteinizirajućeg hormona (LH) iz adenohipofize. Porast periodične sekrecije LH stimuliše razvoj folikula i sekreciju 17 β -estradiola (E2), koji pozitivnom povratnom spregom izaziva i preovulatorni maksimum sekrecije LH. Preovulatorni maksimum sekrecije LH, sa svoje strane, dovodi do finalnog porasta sekreciju estradiola i indukuje ovulaciju zrelih folikula koji podležu luteinizaciji, tako da započinje sledeći ciklus (Hafez, 1987; Sanger, 2005; Noakes i sar., 2008; Reames i sar., 2011).

Mada folikularna faza obuhvata tek oko 20% ciklusa proces folikularnog rasta i degeneracije (tzv. „folikularna dinamika“) odvija se kontinuirano tokom čitavog perioda estrusnog ciklusa (Senger, 2005). Folikulostimulirajući hormon (FSH) tokom ciklusa stimuliše razvoj folikula, tako da na jajnicima uvek postoje folikuli spremni da uđu u završnu etapu razvoja ukoliko dođe do porasta sekrecije LH, što se javlja u folikularnoj fazi ciklusa (Gomez-León i sar., 2019). Ovakav odnos je zasnovan na negativnoj povratnoj sprezi između folikula i hipofize, čiju osnovu čini proteinski hormon inhibin, kojeg proizvode ćelije granuloznog sloja rastućih folikula. Ukoliko se uklone preantralni folikuli nivo FSH raste i stimuliše razvoj novih folikula sve dok njegova sekrecija ponovo ne bude smanjena lučenjem inhibina iz velikih folikula (Ireland i sar., 2000). Kod mlečnih krava se u toku estrusnog ciklusa pojavljuje između 2-3 tzv. „talasa“ razvoja i regresije folikula (Roche i sar., 1998; Adams, 1999; Ginther, 2000; Ireland i sar., 2000; Fortune i sar., 2001). Folikularni talasi se pojavljuju oko 2-og i 11-og dana, ako se radi o ciklusu sa dva talasa, ili oko 2-og, 9-og i 16-og dana kod jedinki sa tri talasa razvoja folikula tokom estrusnog ciklusa (Sirois i sar., 1988).

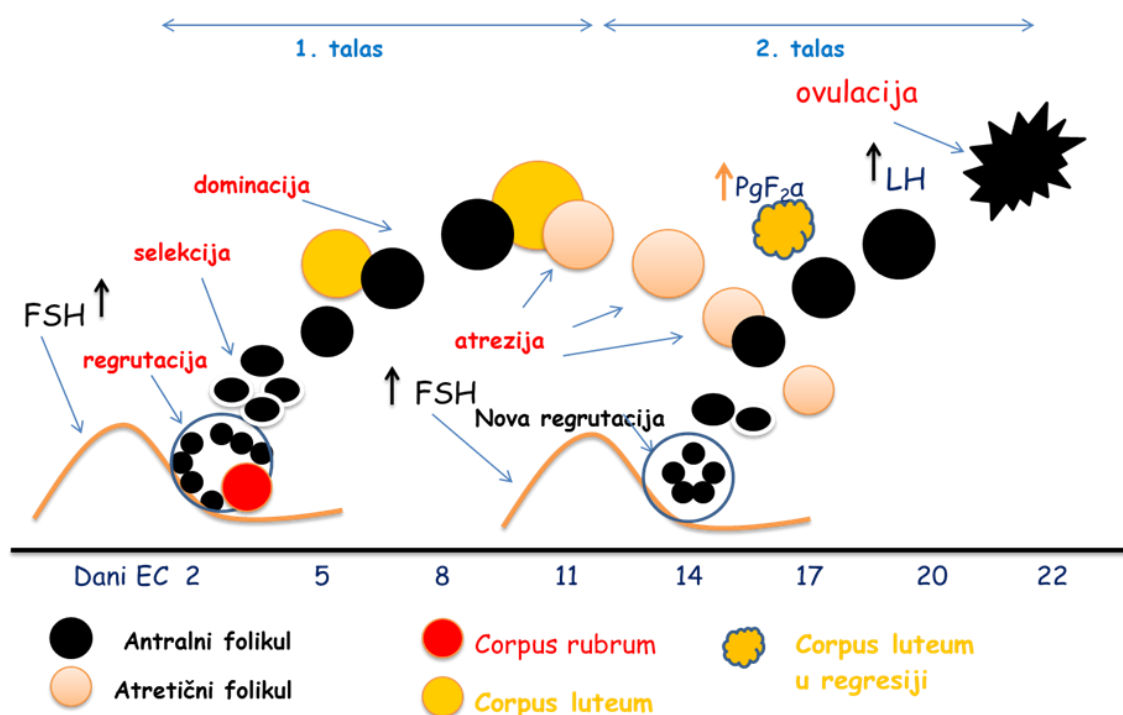
Izgleda da nema jasne povezanosti između rasne pripadnosti i starosti (pariteta) krava na jednoj i broja folikularnih talasa na drugoj strani. Međutim, pojedina istraživanja ukazala su da krave Holštajn rase tokom laktacije imaju tendenciju ka pojavi dva folikularna talasa tokom estrusnog ciklusa (Taylor i sar., 1991; Townson i sar., 2002), dok junice mlečnih i tovnih rasa krava imaju bilo dva ili tri talasa po jednom estrusnom ciklusu (Savio i sar., 1988; Sirois i sar., 1988; Ginther i sar., 1989c). Postoje indikacije da jedinke

koje imaju dva folikularna talasa po estrusnom ciklusu imaju tendenciju ka pojavi kraćih ciklusa, ovuliraju veće i starije folikule i da su manje plodne u odnosu na jedinke sa tri folikularna talasa po jednom estrusnom ciklusu (Townson i sar., 2002).

Ključni događaj tokom estrusnog ciklusa mlečnih krava je ovulacija dominantnog folikula (DF), praćena dobro izraženim kliničkim znacima estrusa, što omogućava uspešno osemenjavanje i graviditet. Da bi smo bolje razumeli hormonalne metode manipulacije estrusnog ciklusa i kontrole reprodukcije potrebno je dobro poznavanje razvoja folikula kod mlečnih krava. Proces razvoja folikula koji prethodi njihovom odabiru, selekciji i dominaciji koje se odigravaju tokom folikularne faze estrusnog ciklusa, traje oko 30 dana. Ispitivanja Lussier i sar., (1987) pokazala su da je potrebno oko 40 dana za razvoj antralnog folikula do njegove faze dominantnog folikula u estrusnom ciklusu. Ekstrapolacijom ovih podataka dolazi se do saznanja da je za razvoj folikula od početka njegove preantralne faze (pul primordijalnih folikula) do faze DF potrebno najmanje 60-80 dana (Britt, 1992). Period preantralnog rasta folikula je nezavistan od dejstva gonadotropnih hormona, dok se rast antralnih folikula odigrava pod dejstvom gonadotropina (FSH i LH) odigrava brzinom od 1-2 mm/dan (Adams, 1999; Ginther, 2000). U fazi rasta i razvoja folikula koja je pod kontrolom gonadotropnih hormona moguće je primeniti tehniku ultrasonografije kako bi se pratile promene na jajnicima i rezultati različitih metoda za manipulaciju estrusnog ciklusa i kontrolu reprodukcije.

Već je istaknuto da visoko mlečne krave tokom jednog estrusnog ciklusa obično imaju 2-3 tzv. "folikularna talasa" (Roche i sar.,1998; Adams, 1999; Ginther, 2000; Ireland i sar., 2000; Fortune i sar., 2001). Jedan folikularni talas sastoji se od tri faze: 1) odabir antralnih folikula (tzv. "regrutacija"), sa pojavom 4-8 folikula čiji je prečnik manji od 5 mm, 2) selekcija folikula kada samo jedan od odabranih folikula nastavlja da raste i razvija se, dok ostali odabrani folikuli podležu procesu tzv. "atrezije" i postepeno iščezavaju, i 3) faza dominantnog folikula (DF), praćena inhibicijom procesa odabira i selekcije. Jedino DF poreklom iz poslednjeg folikularnog talasa dostiže finalnu fazu razvoja sa potencijalom da dođe do njegove ovulacije i oslobađanja zrele jajne ćelije. Dominantni folikuli poreklom iz prvog (ili iz prvog i drugog folikularnog talasa, ukoliko ih ima tri tokom jednog ciklusa) podleći će procesu atrezije pre nego što dostignu finalnu fazu rasta i razvoja. Atrezija DF utiče na porast sekrecije FSH, budući da rastući folikuli luče tkivni hormon inhibin koji ima ulogu da vrši supresiju sekrecije FSH. Okidač za finalni razvoj i maturaciju DF je regresija CL i naglo sniženje koncentracije P4 u cirkulaciji. Porast i maturacija DF dovodi do povećanja sekrecije E2 što predstavlja signal

za pojavu preovulatornog maksimuma sekrecije LH, indukujući istovremeno klinički manifestne znakove estrusa i dovodeći do ovulacije (Grafikon 2.1; Lucy i sar., 2004; Sanger, 2005; Ptaszynska, 2006).



Grafikon 2.1. Folikularni talasi, razvoj i regresija žutog tela; EC – estrusni ciklus; FSH – folikulostimulirajući hormon; LH – Luteinizirajući hormon; PGF₂α – prostaglandin F₂α (Modifikovano prema Ptaszynska, 2006).

Estrus je period u kome ženka ispoljava želju za parenjem i u kome je sposobna za oplodnju. Jedna od osnovnih spoljašnjih i vidljivih karakteristika estrusa je promena ponašanja krava tako da ženka dozvoljava parenje ukoliko postoji mogućnost tzv. „prirodnog” pripusta, što danas predstavlja pravu retkost (slobodni način držanja goveda sa prisutnim plodnim bikovima). U uslovima intenzivne govedarske proizvodnje kada se krave drže grupisane i imaju mogućnost slobodnog kretanja kao karakteristika ponašanja krava u estrusu ona dozvoljava da bude zaskočena od strane druge životinje (ili čak ona sama skače na druge krave iz grupe). Ova promena ponašanja naziva se „refleks stajanja” („*standing estrus*”, engl.). U spoljašnje i vidljive znakove estrusa kod krava spadaju takođe pojava edema i hiperemije vulve, prisustvo sluzavog prozirnog iscetka iz vagine, uznemirenost, povišenje telesne temperature, pad apetita, češće oglašavanje i smanjenje mlečnosti (Hafez, 1987; Peters i sar., 1987; Stančić i sar., 2002; Noakes i sar., 2008).

Trajanje estrusa kod krava varira od 3-28h i zavisi od niza faktora kao što su starost i rasa goveda, ishrana, uslovi držanja, ali se kod većine rasa krava kao podatak o trajanju estrusa uzima vreme od 12-16h (Allrich, 1994). Ovulacija zrelih folikula se odigrava od 10-12h posle završetka perioda estrusa, tj. nakon prestanka znakova tzv. "standing" estrusa. Različiti stresni faktori mogu dovesti do odlaganja estrusa, njegovog skraćanja i potpune inhibicije pojave estrusa, čak i ako u telesnoj cirkulaciji postoje visoke koncentracije estrogena. Stres kod krave može izazvati povećanje koncentracije progesterona u telesnoj cirkulaciji, koji je poreklom iz kore nadbubrega, što ima za posledicu supresiju manifestacije znakova estrusa (Nanda i sar., 1990).

2.1.2. Lutealna faza ciklusa

Žuto telo (*corpus luteum*, lat., CL) je neka vrsta "biološkog časovnika" ("zeitgeber" ili "pelvic clock") koji kontroliše ne samo dužinu estrusnog ciklusa, već i razvoj folikula u folikularnoj fazi ciklusa, a ključna uloga progesterona je istaknuta i u tom prvom modelu kontrole estrusa i ovulacije kod ovaca. Ovaj model, iznet od strane Robinson-a (1959), pre otkrića radioimunološke metode (*radioimmunoassay*, engl., RIA), za određivanje koncentracije hormona precizno je predvideo da je ključni događaj u nastanku ovulacije i estrusa iščezavanje žutog tela.

Lutealna faza estrusnog ciklusa se deli na period *metestrusa* (početni period razvoja žutog tela) i *diestrusa* (vreme maksimalne lutealne aktivnosti). Žuto telo tokom lutealne faze luči progesteron koji ima veći broj značajnih dejstava u toku estrusnog ciklusa. On priprema centre u mozgu koji regulišu ponašanje tako da može doći do manifestacije znakova estrusa nakon porasta E2 u toku folikularne faze. Prvi postpartalni estrus je najčešće tzv. "tih estrus", sa učestanošću do 94%. Teorija o pojavi prvog "tihog" estrusa ukazuje da je hipotalamus postao refraktan na visoke koncentracije estrogena na kraju prethodne laktacije (King i sar., 1974; Stellflug, 1978; Kyle i sar., 1992). Tokom prve lutealne faze, pod dejstvom progesterone dolazi do eliminacije refraktarnosti i naredni estrus je najčešće praćen sa izraženim estrusnim znacima (Carrick i sar., 1996; Kyle i sar., 1992).

Progesteron takođe modulira razvoj folikula tako da sledeći maksimum sekrecije LH dovodi do nastanka normalnog žutog tela. Porast koncentracije progesterona u prvoj trećini lutealne faze "programira" uterus za oslobađanje prostaglandina F2 α , koji deluje kao lokalni luteolitik pred kraj lutealne faze (Silvia i sar., 1991). Na kraju, progesteron

inhibira periodičnu sekreciju LH vršeći supresiju lučenja GnRH iz hipotalamusa, tako da je nivo LH nizak tokom lutealne faze. Ako nije došlo do oplodnje pred kraj lutealne faze nastaje porast sekrecije PG iz endometrijuma što izaziva luteolizu i pad koncentracije progesterona (Hafez, 1987; Allrich, 1994; Stančić i sar., 2002; Noakes i sar., 2008;).

Žuto telo sintetiše tokom prvih 5-7 dana ciklusa sve više progesterona da bi se oko 15-17 dana ciklusa dostigao maksimum u sintezi progesterona (Diaz i sar., 1986; Nyman i sar., 2014). U toku lutealne faze progesteron ima ulogu da blokira lučenja LH, dok se sinteza i sekrecija FSH odvija gotovo neometano, izuzimajući inhibirno dejstvo hormona inhibina. Na taj način se stvaraju uslovi da tokom lutealne faze estrusnog ciklusa dođe do pojave selekcije i rasta folikula, ali izostaje njihovo sazrevanje i većina folikula podleže procesu atrezije (Sanger, 2005). Ako ne dođe do graviditeta, vezivanjem lutealnog oksitocina za receptore na endometrijumu, pokreće se luteolitički hormon PG i razgrađuje se žuto telo. Tada nastupa nova faza u sintezi FSH i LH, dolazi do završne faze sazrevanja folikula koji će u toku sledećeg estrusa ovulirati. Ako dođe do graviditeta, trofoblast nastalog embriona počinje da produkuje interferon- τ (INF- τ), koji inhibira transkripciju i sintezu estrogenih receptora na ćelijama endometrijuma. Interferon- τ se sintetiše već od sedmog dana razvića embriona, kada je on u fazi blastule (blastocista) i blokira sintezu PG, tako da žuta tela koja sintetišu progesteron ostaju aktivna (Spencer i sar., 1996; Szenci i sar., 1998; Sanger, 2005; Wiltbank i sar., 2014).

Ako životinja ostane gravidna, proizvodnja PG u materici je blokirana dejstvom INF- τ na materici. Kod krava, oksitocinski receptori u endometrijumu inhibirani su sekrecijom INF- τ od strane trofodektoderma od 12. do 25. dana (Farin i sar., 1990). Kod krava se CL povećava tokom 2 do 3 meseca gestacije, onda regresira tokom narednih 4 do 6 meseci. Nakon toga, ono ostaje relativno konstantne veličine do teljenja, kada se degeneriše tokom prve nedelje post partum (Sanger, 2005).

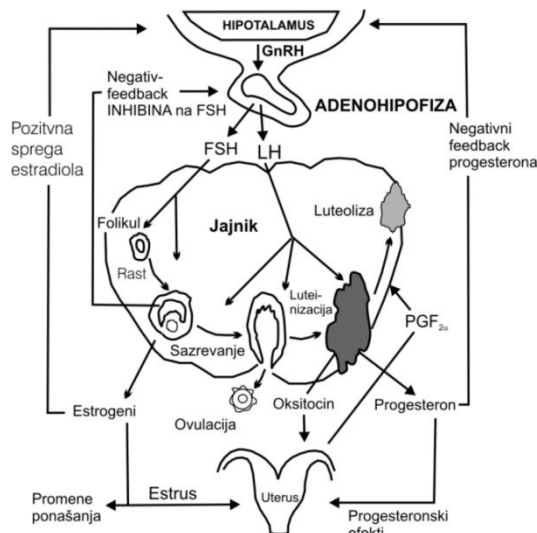
Žuto telo je privremena endokrina struktura na jnicima koja se formira na mestu ovuliranog DF. Primenom ultrazvučne tehnologije moguće je razlikovati CL of ostatka tkiva jajnika kao ehogene sferične ili elipsoidne strukture. U početnoj fazi razvoja CL je ispunjeno krvnim koagulumom i nosi naziv *corpus luteum hemorrhagicum seu rubrum*. Uloga CL je sinteza i lučenje P4, čija koncentracija u krvi raste preko 1 ng/mL počevši od približno 5-og dana nakon ovulacije. CL nastavlja dalje da raste i razvija se, i može dostići prečnik od preko 25 mm, sa maksimalnim lučenjem P4 oko 12 dana od ovulacije. Luteoliza je proces u toku koga dolazi do relativno brze razgradnje periodičnog CL (*corpus luteum periodicum*) i ona nastupa između 17-19 dana estrusnog ciklusa ukoliko u

prethodnom estrusu nije došlo do uspešnog osemenjavanja i koncepcije. Ključni faktor koji je odgovoran za pojavu luteolize je povišena sekrecija lokalno aktivnog luteolitičkog hormona prostaglandina poreklom iz endometrijuma ipsilateralnog materičnog roga. Istovremeno je ovaj hormona najčešće korišćen aktivni princip u različitim protokolima kontrole reprodukcije visoko mlečnih krava (Lucy i sar., 2004; Sanger, 2005; Ptaszynska, 2006; Dovenski i sar., 2013).

Sniženje koncentracije P4 nakon početka luteolize kod negravidnih krava odvija se brže u odnosu na morfološke promene u samom CL, što može dovesti do grešaka kod ultrazvučnog pregleda jajnika. Određivanje koncentracije P4 u krvi/mleku ukazalo je da između 23-39% krava koje su rektalnim pregledom klasifikovane da imaju CL imaju veoma niske vrednosti P4 u krvi. Šta više, između 15-21% krava klasifikovanih da imaju nefunkcionalno CL mogu imati relativno visoke koncentracije P4 u krvi (Senger, 2005). Ultrazvučnim pregledom jajnika ne retko se može pronaći CL sa centralnom šupljinom ispunjenom tečnošću, koja se pogrešno naziva "cistično" CL. Istraživanja su potvrdila da se ne radi ni o kakvoj patološkoj strukturi, već se radi o potpuno normalnom CL koje se može naći i kod gravidnih krava (Kastelic i sar., 1990; Grygar i sar., 1997; Dovenski, 1997).

2.1.3. Neuroendokrina regulacija estrusnog ciklusa

Promene koje nastaju u toku estrusnog ciklusa su posledica složene interakcije nervnog i endokrinog sistema, određenih tkivnih hormona i njihovih ciljnih tkiva. Centralno mesto u regulaciji estrusnog ciklusa ima osovina hipotalamus-adenohipofizagonade (Sanger, 2005; Clarke i sar., 2005; Noakes i sar., 2008). Hipotalamus i adenohipofiza nisu samo mesta gde se sintetišu i sekretuju brojni regulatorni faktori (hormoni), već predstavljaju i ciljne organe za različite nervne i humoralne signale sa perifernih tkiva. Različiti delovi ove osovine su međusobno povezani mehanizmom povratne sprege, koja je u većini slučajeva negativna, tako da hormoni ovim putem regulišu intenzitet sopstvene sekrecije. Na slici 2.1. je predstavljen relativno pojednostavljen mehanizam regulacije estrusnog ciklusa sa elementima i međusobnim vezama.



Slika 2.1. Mehanizam neuroendokrine kontrole estrusnog ciklusa krava (Modifikovno prema Ptaszynska, 2006).

Hipotalamus je mesto gde se nervni impulsi registrovani putem različitih receptora sa perifernih tkiva i obrađeni u CNS-u konvertuju u hormonalni signal koji se dalje prosleđuje ka adenohipofizi. Osnovni hormon hipotalamusa koji pokreće funkciju gonada je GnRH, koji stimuliše oslobađanje FSH i LH iz adenohipofize, da bi se krajnji efekat gonadostimulina ostvario na nivou jajnika (Clarke i sar., 2005). Delovanjem na rast i razvoj preovulatornog folikula, FSH i posebno LH, dovode do porasta sekrecije estradiola i promena u ponašanju životinje i genitalnom traktu koje su karakteristične za estrus. Porast sekrecije estradiola iz zrelog folikula dovešće, međutim, putem pozitivne povratne sprege do izrazitog porasta sekrecije GnRH, a zatim do preovulatornog maksimuma sekrecije LH. U isto vreme se javlja inhibicija lučenja FSH zbog dejstva hormona inhibina, koji se sintetiše u granulosa ćelijama rastućih folikula i putem krvi dospeva do adenohipofize. Ovulacija nastaje pod uticajem maksimalne sekrecije LH, a na mestu ovuliranog folikula se formira žuto telo, koje luči progesteron. On deluje na smanjenje lučenja GnRH (a time i LH), inhibira kontrakcije miometrijuma i priprema endometrijum za nidaciju oplodene jajne ćelije (ukoliko je u estrusu došlo do parenja/V.O. i oplodnje). Ako u toku estrusa nije došlo do oplodnje iz endometrijuma se, pred kraj lutealne faze, oslobađa lokalno aktivni luteolitik (PG) dovodeći do regresije i lize žutog tela. Time se stvaraju uslovi za novi porast sekrecije GnRH, lučenje FSH i LH, i životinja ulazi u novi ciklus (Stančić i sar., 2002; Evans, 2003; Sanger, 2005; Clarke i sar., 2005; Noakes i sar., 2008).

2.2. Parametri reprodukcije u intenzivnom uzgoju

Uspešna reprodukcija značajno utiče na nivo proizvodnje u zaptima krava sa intenzivnom proizvodnjom mleka, kako u naturalnom, tako i u ekonomskom pogledu (Stančić i sar., 2007; Gvozdić i sar., 2011). Ocena efikasnosti reprodukcije na našim farmama mlečnih krava vrši se često na osnovu vrednosti parametara kao što su: interval teljenja (broj dana/meseci između dva uzastopna partusa) i servis period (broj dana od partusa do uspešnog osemenjavanja), indeks osemenjavanja (broj osemenjavanja po gravidnoj kravi), kao i interval od partusa do prvog osemenjavanja, i tzv. „*non-return rate*” (procenat životinja koje nakon osemenjavanja nisu zahtevale reinseminaciju – izostanak povadjanja, obično se računa vreme do 56. dana nakon v.o.) (Gvozdić i sar., 2011b). Maksimalna produkcija mleka i teladi po kravi godišnje se postiže ako je međutelidbeni interval od 12-13 meseci (Stevenson i sar., 1977). Međutim, u praksi intenzivne proizvodnja farmama mlečnih krava međutelidbeni interval često traje i preko 14 meseci. Budući da je trajanje graviditeta biološka konstanta (275-295 dana kod goveda, prosečno 285 dana), to na ovaj period značajno utiče trajanje perioda od teljenja do uspostavljanja sledeće uspešne koncepcije, odnosno trajanje servis perioda. Važniji parametri, kojima se meri efikasnost reprodukcije visoko mlečnih krava, prikazani su u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Najčešći parametri efikasnosti reprodukcije u zaptima visokomlečnih krava i njihove preporučene vrednosti za efikasnu reprodukciju (Ptazynska, 2006).

Parametar	Preporučena vrednost
Servis period (vreme od teljenja do uspešne koncepcije)	< 90 dana
Period od teljenja do 1-og v.o.	< 70 dana
Međutelidbeni interval	12-13 meseci
Procenat uspešnosti 1-og v.o.	> 60%
Indeks osemenjavanja (broj v.o. potreban za uspešnu koncepciju)	< 1,5
Procenat abortusa (gubitak ploda u periodu od 45-265 dana gestacije)	< 3%
Isključenje krava iz zapata zbog reproduktivnih problema	< 5%
Starost junica na teljenju	24 meseca

2.2.1. Efikasnost reprodukcije visoko-mlečnih krava

U stadima visoko-mlečnih krava tokom poslednjih nekoliko decenija može se jasno uočiti postepeni pad efikasnosti reprodukcije (Roche, 2000; Lucy, 2001; Dobson i sar., 2007; Royal i sar., 2008). Opadanje reproduktivne efikasnosti se ogleda u produženoj postpartalnoj anestriji (Thacher i sar., 2006), koja se javlja kao posledica većeg broja faktora kao što su: odložena luteoliza u prvom ili sledećim estrusnim ciklusima post partum (Royal i sar., 2000), povećanje broja krava sa tihim estrusom i/ili nepravilnim trajanjem estrusnog ciklusa posle teljenja (Darwash i sar., 1997), smanjenje broja uspešnih koncepcija posle prvog osemenjavanja (Lucy, 2001), kao i povećanje broja krava sa abnormalnim ranim embrionalnim razvojem, različitim oboljenjima materice, embriona i fetusa, te povećanim stepenom intrauterinog mortaliteta embriona i fetusa (Diskin, 1987; Fourchon i sar., 2000; Bousquet i sar., 2004; Lucy, 2007). Krajnji rezultat je smanjenje reproduktivne efikasnosti, sa povećanjem indeksa osemenjavanja tj. broja inseminacija potrebnih za uspešnu koncepciju (Sheldon i sar., 2003). U periodu između 1990-2000 godine, stepen uspešne koncepcije posle prvog osemenjavanja, u većini evropskih zemalja je smanjen sa 55% na 45% (Bousquet i sar., 2004). Drugi autori izveštavaju da je trend ušpesne koncepcije posle prvog osemenjavanja od 65% u 1951godini pao na 40% u 1996, što je za oko 0,5% godišnje (Butler, 1998). Istorijski gledano, konzumiranje hrane i laktacioni stres su se povećavali kao rezultat potrebe za većom proizvodnjom mleka, što se negativno odrazilo na reproduktivnu fiziologiju (Lucy, 2001).

Ovakva situacija je imala direktan uticaj na povećanje indeksa osemenjavanja. Tako je sredinom prošlog veka ovaj indeks iznosio prosečno 1,75 inseminacija, dok je u poslednjih nekoliko godina porastao na više od 3 (Lucy, 2001). Ovo je važan parametar reproduktivne efikasnosti, jer direktno utiče na produžavanje trajanja servis perioda (Esslemont i sar., 2000).

Istraživanja sprovedena u novije vreme u Republici Srbiji takođe pokazuju da su parametri reproduktivne performanse dosta niski i u našim zaptima visoko mlečnih krava. Tako su ispitivanja u našim zaptima visoko mlečnih krava ukazala na značajno pogoršanje vrednosti parametara reproduktivne efikasnosti, kako kod krava bez evidentiranih zdravstvenih problema u toku i nakon partusa tako i kod onih sa dijagnostikovanim poremećajima zdravlja (tabela 2.3; Savović, 2010).

Tabela 2.3. Reproductivni parametri visoko mlečnih krava u jednom vojvođanskom zapatu (Savović i sar., 2011).

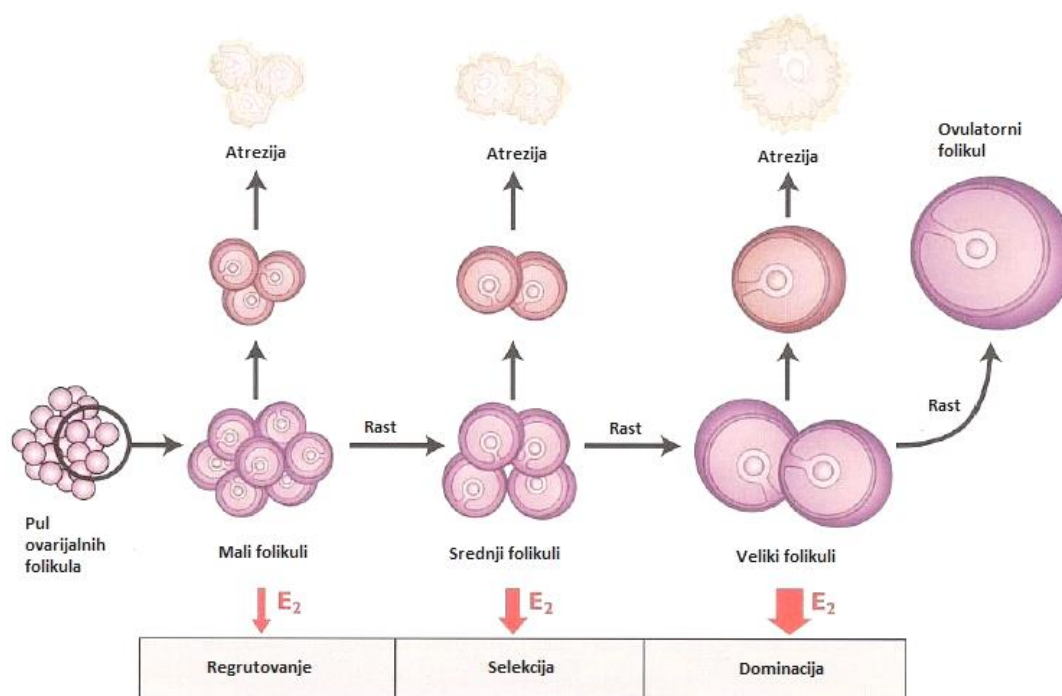
Parametar efikasnosti reprodukcije	Kategorija krava	
	Sa poremećajem zdravlja	Bez poremećaja zdravlja
Broj krava (n / %)	1.252/59,4	583/41,6
Krave sa estrusom otkrivenim unutar prvih 60 dana post partum (%)	21.0	32.0
Krave sa estrusom otkrivenim unutar prvih 90 dana post partum (%)	54.0	72.0
Prosečan interval od prvog VO - fertilnog VO (dani)	106	52
Prosečano trajanje servis perioda (dani)	195	142
Prosečan indeks osemenjavanja	3.6	2.7

2.3. Postpartalna anestrija

Smanjenje efikasnosti reprodukcije visokomlečnih krava ima veliki uticaj na profitabilnost proizvodnje mleka. Postoji veliki broj etioloških faktora koji dovode do smanjenja efikasnosti reprodukcije visoko mlečnih krava. Maksimalna proizvodnja mleka kod visoko mlečnih krava postiže se u periodu između 40 i 75 dana laktacije (Stančić i sar., 2002). Šta više, gotovo polovina ukupne količine mleka koja se proizvede u toku prosečne laktacije u trajanju od 305 dana, proizvede se u toku prvih sto dana laktacije. Budući da je kod visokomlečnih krava osnovni proizvodni cilj maksimalna proizvodnja mleka, a pri tome je ustanovljeno da je proizvodnja najveća ukoliko laktacija prosečno traje 305 dana, proizilazi da bi međutelidbeni interval trebalo da iznosi oko 12 meseci. Ovakva situacija nameće potrebu osemenjavanja krava u periodu koji se poklapa sa periodom najviše mlečnosti, što znači da optimalan servis period treba da bude između 55-85 dana. Verovatno da najozbiljniji problem za postizanje ovog proizvodnog zahteva u uslovima intenzivnog uzgoja mlečnih krava predstavlja negativni energetske bilans (NEB) koji je najizraženiji toku rane laktacije (Jorritsma, 2003). Postpartalna anestrija je najuočljivija klinička manifestacija hipofunkcije jajnika visokomlečnih krava, i po pravilu se pojavljuje kod većeg broja grla (oko 30%) do 55. dana posle teljenja (Noakes i sar., 2008; Peter i sar., 2009).

Anestrus je stanje kada se kod krava ne javljaju klinički znaci estrusa i može da se klasifikuje kao fiziološki ili patološki proces (Gvozdić i sar., 2004). Fiziološka anestrija postoji kod prepubertetnih životinja, kao i kod gravidnih krava. Junice pre puberteta tek treba da prođu kroz period polnog sazrevanja, dok je kod gravidnih krava visok nivo

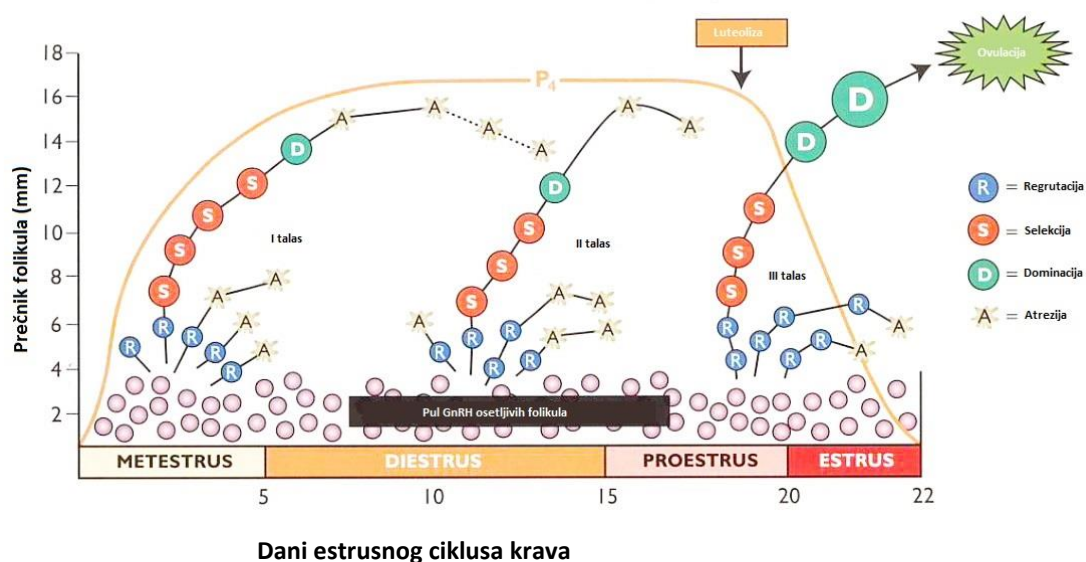
progesterona taj koji blokira pojavu estrusa. Patološki anestrus može imati jednu ili više bitnih karakteristika: a) jajnici su često neaktivni (minimalni razvoj folikula, anovulacija i/ili nepostojanje žutog tela), b) obično je praćen tzv. “tihom” ovulacijom (ovulacija bez ispoljavanja klinički uočljivih znakova estrusa), c) javlja se hipofunkcija jajnika (perzistentni dominantni folikul); d) javlja se cistična degeneracija jajnika (folikularna ili luteinizirana folikularna cista) i e) postoji tzv. “perzistentno” žuto telo (izostanak lize žutog tela) (Mwaanga i sar., 2000). U novije vreme anestrus se sve češće klasifikuje na osnovu dinamike razvoja folikula i žutog tela (Wiltbank i sar., 2002). Razvoj folikularnog talasa obuhvata tri glavna događaja: regrutovanje, selekciju tj. odabir folikula i dominaciju, što na kraju može dovesti do ovulacije (slika 2.2, Sanger, 2005).



Slika 2.2. Ključni procesi u razvoju i sazrevanju folikula (E₂ – estradiol-17β; modifikovano prema Sanger, 2005).

Već u toku prve nedelje posle teljenja dolazi do povišenog lučenja FSH u trajanju od 2 do 3 dana, što rezultira pojavom prvog folikularnog talasa (sa 3 do 5 folikula) već tokom 14 dana posle partusa (Rajamahendran i sar., 1990). Sa daljim opadanjem koncentracije FSH jedan folikul se odabira, tj. od njega nastaje dominantni folikul. Pretpostavlja se da dominantni folikul (lučenjem inhibina i estradiola) koči lučenje FSH, a time i stvaranje novog folikularnog talasa. Rast i sposobnost ovulacije dominantnog folikula zavisi od dostupnosti brojnih faktora rasta unutar samog folikula (insulinu slični

faktori rasta - IGF-1 i njihovi transportni proteini, npr.) (Beam i sar., 1999). Dominantni folikul koji ne ovulira podleže atreziji ili prerasta u cistu. Kod krava kod kojih dominantni folikul atrezira dolazi do razvoja novih folikularnih talasa i selekcije i rasta novih dominantnih folikula (grafikon 2.3, Sanger 2005).



Grafikon 2.3. Talasi razvoja folukula na jajnicima kod krava; P4 – progesteron, (Modifikovano prema Sanger, 2005).

Tokom puerperijuma dolazi do involucije uterusa i postepenog ponovnog uspostavljanja ciklične aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-jajnici. U normalnom puerperijumu ovi se procesi odigraju unutar 6 nedelja od teljenja, i do 90 posto krava (sa normalnom tokom purperijuma) ovulira unutar ovog perioda (Peter i sar., 1986), mada ima mišljenja da pojava prve ovulacije unutar 9 nedelja posle teljenja može smatrati fiziološkom (Ambrose i sar., 2007).

Supklinička i klinička oboljenja uterusa imaju veliki uticaj na aktivnost jajnika. Postpartalna kontaminacija lumena uterusa gotovo je neizbežna, a prisustvo patogenih bakterija dovodi do nastanka klinički manifestnog oblika oboljenja u najvećem broju slučajeva. Pretpostavlja se da oboljenja uterusa suprimiraju uspostavljanje ciklične aktivnosti jajnika. Negativni uticaj infekcija uterusa na reproduktivni trakt obuhvata inflamatorni odgovor. Naime, visoka koncentracija PG u cirkulaciji, u prve tri nedelje posle partusa služi kao signal uterusu i koči prerano uspostavljanje ciklične ovarijalne aktivnosti sve dok se infekcija (makar u većem delu) ne eliminiše (Sheldon i sar., 2002; Mateus i sar., 2003). U tom pogledu od velikog je značaja za uteruz krava, da bude

slobodan od infekcije kako bi se omogućilo nesmetano funkcionisanje jajnika. Stoga je jasno da produženo lučenje PG od strane uterusa obolelih krava ima za posledicu produženje trajanja postpartalnog anestrusa (LeBlanc, 2012).

2.3.1. Bilans energije i reprodukcija u postpartalnom periodu

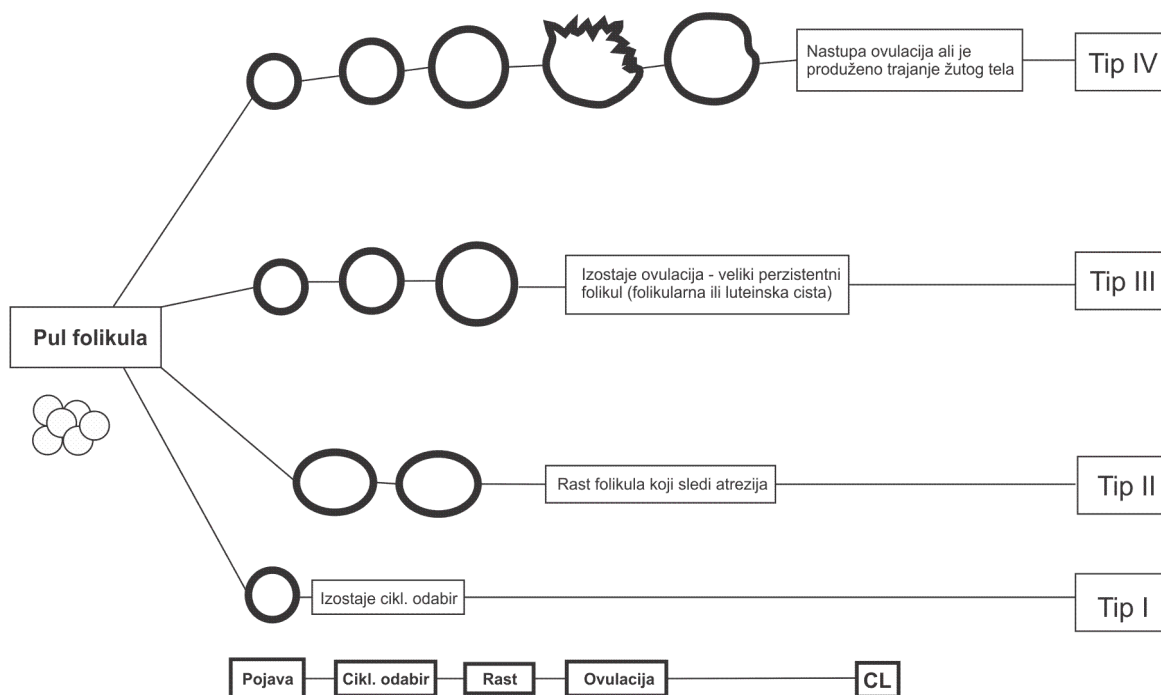
Energetski bilans predstavlja razliku između količine energije unete obrokom i energije koja je utrošena za održavanje normalnog funkcionisanja organizma i za proizvodnju mleka. Pod uobičajenim uslovima ishrane u prepartalnom periodu visokomlečne krave vrlo retko ulaze u stanje negativnog bilansa energije (NEB) pre teljenja. Posle teljenja potrebe u hranljivim materijama se vrlo brzo povećavaju (početak proizvodnje mleka) i tada sve visoko mlečne krave ulaze u stanje NEB. Krave u NEB preusmeravaju najveći deo potrošnje energije u proizvodnju mleka, zbog čega dolazi do ograničavanja pojave folikularnih talasa, poremećaja razvoja dominantnog folikula i slabo manifestnog estrusa. Kod krava u NEB ovulacija je odložena inhibicijom lučenja LH, a uz to i znatno nižim koncentracijama glukoze, insulina i IGF-1 koji dovode do smanjene proizvodnje estrogena u dominantnom folikulu (Butler, 2000). Pored deficita energije, na ovo stanje nadovezuje se povećani unos hrane koji koči reprodukciju pojačavanjem metabolizma steroidnih hormona. Povećani unos hrane dovodi do povećanja perfuzije krvi kroz jetru i značajnog odstranjivanja estradiola i progesterona, što može dovesti do anovulacije, slabljenja funkcije žutog tela i odlaganja regresije žutog tela i to najverovatnije posredstvom razvoja estrogen inaktivnih dominantnih folikula (Sangsritavong i sar., 2002). Ovo za rezultat može imati nedovoljnu proizvodnju PGF2 α od strane endometrijuma. Šta više, hraniva koja sadrže preko 16 posto proteina ispoljavaju pozitivan uticaj na mlečnost, ali negativan na reproduktivne performanse, zbog povišenih koncentracija ureje u krvi, a time i u uterusu, što rezultira promenom pH i izmenom materičnog miljea (Tamminga, 2006).

2.3.2. Tipovi postpartalne anestrije

Anestrus je relativno uopšten termin koji se koristi za opisivanje izostanka uočljivih estrusnih znakova i pored efikasne detekcije estrusa. Visokomlečne krave se karakterišu nasledno slabijim ispoljavanjem spoljašnjih manifestacija estrusa, a to je najizraženije u toku ranog postpartalnog perioda (Lucy, 2007). Zbog toga ne iznenađuje činjenica da vrlo često ovulaciji ne prethode jasni znaci estrusa, a pojava postpartalne

anestrije se se dodatno komplikuje problemom efikasnosti detekcije estrusa na modernim farmama visokomlečnih krava koja može biti veoma niska (Ambrose i sar., 2007). Jasno uočljiv estrus se detektuje kod 37% krava, ali se detekcija estrusa može povećati do 75% ako se krave observiraju dva puta dnevno u trajanju po 30 minuta (Van Viliet and Van Erdenburg, 1996). Tihi estrusi i neuočeni estrusi (tzv. “organizacioni” sterilitet) mogu u velikoj meri doprineti lošoj plodnosti stada.

Procena rasta ovarijalnih folikula transrektalnom ultrasonografijom u kombinaciji sa određivanjem koncentracije reproduktivnih hormona je omogućila definisanje tri funkcionalno kritična dijametra u rastu folikula: odabir (~4mm), selekcija (~9 mm) i dominacija (10-20 mm). Klasifikovanje anestrusa na osnovu ove tri napred pomenute kritične tačke je logično, tako Peter i sar. (2009) danas navode četiri tipa anestrusa čiji je šematski pregled dat u slici 2.3.



Slika 2.3. Tipovi postpartalne anestrije definisani na osnovu razvoja folikula i aktivnosti žutog tela (modifikovano prema Peter i sar. 2009).

Tip I postpartalne anestrije. Karakteristično za ovaj tip anestrije jeste da se rast folikula zaustavlja na početnom stadijumu (~4mm) bez daljeg rasta ili razvoja dominantnog folikula. Patofiziologija ovog tipa anestrusa nije do kraja razjašnjena ali se pretpostavlja da je ovo stanje posledica pothranjenosti krava tj. velikog deficita energije. Usled ovog stanja dolazi do smanjenja frekvencije pulseva lučenja luteinizujućeg hormona

(LH) koji treba da pomogne razvoj dominantnog folikula (Jolly i sar., 1995). Jajnici krava koje se svrstavaju u ovaj tip anestrusa mogu se najbolje opisati terminom "glatki jajnici". Dva ultrazvučna pregleda krava u razmaku od 7 dana koja ne utvrde da je došlo do značajnih strukturnih promena na jajnicima, koje uz to prati i odsustvo žutog tela (*corpus luteum*, CL) ili cističnih ovarijalnih struktura, jasno ukazuju na ovaj tip poremećaja (Markusfeld, 1987). Ovaj tip anestrusa se u normalnim uslovima javlja kod <10 posto krava u postpartalnom periodu.

Tip II postpartalne anestrije. U toku ovog tipa anestrije dolazi do razvoja folikula većih od početnog stadijuma (veći od 4 mm) ali je njihova dalja sudbina atrezija ili regresija. U pojedinim slučajevima atrezija i regresija mogu nastati i kod folikula koji ulaze u fazu dominancije. Ukoliko dođe do regresije ovog folikula to će rezultirati u pojavi novog folikularnog talasa u roku od 2-3 dana. Kod ovog tipa anestrusa ne postoje kontinuirani folikularni talasi pre prve ovulacije, koja može biti odložena za duži vremenski period. Neki od folikula rastu i podležu regresiji pre ovulacije (McDougall i sar., 1995). Ove krave imaju vrlo nisku frekvenciju LH pulseva (<1 puls LH na svakih 3 do 4 časa). Dominantni folikuli krava kod ovog tipa anestrusa proizvode vrlo niske koncentracije estradiola. Sledeći folikularni talasi nastaju za 1 do 2 dana po regresiji dominantnog folikula. Šta više, čak i do 9 talasa folikularnog rasta može nastati pre nego što nastupi prva ovulacija (McDougall i sar., 1995).

Tip III postpartalne anestrije. Treći tip anestrije se odlikuje pojavom selekcije, rasta i razvoja dominantnog folikula, ali on ne uspeva da ovulira i postaje perzistentna struktura – *folikularna cista*. Ovo stanje može nastati usled neosetljivosti hipotalamusa na pozitivan feed-back efekat estradiola ili usled izmenjenog odgovora na gonadotropin koji se odvija preko medijatora (insulinu slični faktor rasta i insulin) (Beam i sar., 1999). Perzistentna folikularna struktura može prerasti u folikularnu cistu ili može da luteinizira (*luteinska cista*). Do luteinizacije ciste obično dolazi kod 10-13 posto slučajeva (Peter, 2004). Folikularne ciste mogu regresirati ili ostati prisutne kao perzistentne anovulatorne strukture u vremenu nekoliko ciklusa. Zavisno od strukturno/funkcionalnog statusa ove strukture mogu ali i ne moraju suprimirati razvoj folikularnih talasa za određeni vremenski period (Sakaguchi i sar., 2006).

Tip IV postpartalne anestrije. Ovaj tip postpartalne anestrije nastaje usled produžene lutealne faze. Krave kod kojih dolazi do ovog tipa anestrije imaju normalan estrus, ovulaciju i formiranje CL sa produženom lutealnom funkcijom zbog izostanka regresije žutog tela. Faktor koji može još više doprineti ovakvom stanju je i nedostatak

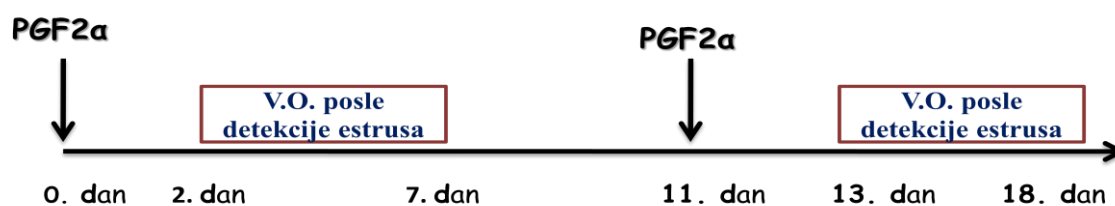
estrogena poreklom iz dominantnog folikula u vreme regresije žutog tela (Wiltbank i sar., 2002). Brojni faktori povećavaju rizik od nastajanja ovog tipa anestrusa tj. od produženja lutealne faze (Opsomer i sar., 2000) a neki od njih su: paritet teljenja, teško teljenje, zdravstveni problemi u prvom mesecu laktacije, toplotni stres i vrlo rana ovulacija (koja nastupa vrlo rano posle teljenja do 20. dana). Postojanje infekcije uterusa ili piometre takođe može produžiti trajanje žutog tela (Mateus i sar., 2002).

2.4. Metode za kontrolu reprodukcije visokomlečnih krava

Estrusni ciklus kod mlečnih krava ima dve jasno odvojive faze – lutealnu i folikularnu fazu, sa vrlo različitim privremenim endokrinim strukturama koje dominiraju u funkciji jajnika. Polazeći od ovih privremenih dominantnih endokrinih struktura mogu se definisati dva opšta principa u postupcima za kontrolu reprodukcije visoko mlečnih krava: 1) manipulacija/imitiranje prisistva i funkcije CL-a, i 2) manipulacija razvoja folikulai njihove ovulacije (Gvozdić i sar., 2013). Najraniji metod manipulacije estrusim ciklusom (razvijen još 1960-ih) zasnivao se na primeni egzogenih progestagena, što je podrazumevalo veštačko produženje lutealne faze, čime se blokira i odlaže ovulacija (Robinson, 1959). Međutim, ova metoda je vrlo brzo napuštena jer je ustanovljeno da dovodi do značajnog smanjenja koncepcije. Tokom 70-ih godina prošlog veka došlo je do otkrića da prostaglandin $F_2\alpha$ deluje kao lokalno aktivni luteolitički hormon koji izaziva regresiju i iščezavanje CL, tako da je ovaj hormon primenjen u kombinaciji sa progestagenima za manipulaciju estrusnog ciklusa. I pored značajnog poboljšanja još uvek je postojao problem sniženja stepena koncepcije. Tek nakon tehnološkog napretka koji je tokom 1980-ih donela primena ultrazvuka u dijagnostici poremećaja funkcije reproduktivnih organa, značajan progres je napravljen otkrićem da smanjenje plodnosti izaziva pojava perzistentnog dominantnog folikula (Lucy i sar., 2004).

2.4.1. Primena prostaglandina

Smatra se da je $PGF_2\alpha$ koga sekretuju endometrijalne ćelije glavni endogeni luteolitički hormon kod preživara (McCracken i sar., 1988). Pulzatorna sekrecija PG od strane uterusa pokreće mehanizam pozitivne povratne sprege u kojoj se javlja porast lučenja oksitocina od strane CL, koji se veže za receptore na endometrijalnim ćelijama i stimuliše sekreciju PG u intervalima od oko 6 časova tokom procesa luteolize (Flint i sar., 1992; Silvia i sar., 1991). Primena prostaglandina ($PGF_2\alpha$; PG) i njegovih sintetičkih



Grafikon 2.4. Protokol za sinhronizaciju estrusa primenom PG u razmaku od 11 dana; V.O. – veštačko osemenjavanje (Modifikovano prema Dovenski i sar., 2013).

Nešto složeniji ali principijelno jednostavan protokol za kontrolu reprodukcije krava u laktaciji koje imaju estrusni ciklus poznat je kao „Targeted BreedingTM Program (Pharmacia & Upjohn), i zasniva se isključivo na primeni PG za sinhronizaciju estrusa prikazan je na slici 2.4.

Sedmica 1	PO	U SR Č PE SU NE
	PGF	← BEZ VO →
2	PO	U SR Č PE SU NE
		← BEZ VO →
3	PO	U SR Č PE SU NE
	PGF	DETEKCIJA ESTRUSA +VO
4	PO	U SR Č PE SU NE
		← BEZ VO →
5	PO	U SR Č PE SU NE
	PGF	DETEKCIJA ESTRUSA
		← 80h - Fiksno VO →

Slika 2.4. Protokol za kontrolu reprodukcije krava u laktaciji koje imaju estrusni ciklus poznat je kao „Targeted BreedingTM Program“ (Pharmacia & Upjohn), PGF – prostaglandin $F_{2\alpha}$; V.O. – veštačko osemenjavanje (Modifikovano prema: Stevenson, 2001; Nebel i sar., 1998).

Protokol prikazan na slici 2.4, koji se u praksi još jednostavnije naziva „ponedeljak ujutro“ je takav da se svaki drugi ponedeljak aplikuju injekcija PG životinjama koje nusu osemenjavane (krave koje su sigurno negravidne). U toku prve nedelje nakon PG tretmana krave se ne osemenjavaju već se VO sprovodi tek posle uspešne detekcije estrusa nakon druge injekcije PG. Ukoliko se nakon druge injekcije PG ne detektuje estrus provodi se još jedan tretman PG nakon 14 dana i tada se može primeniti TAI nakon 80 sati od PG tretmana.

Jedan od faktora koji mogu uticati negativno na rezultate primene programa kontrole reprodukcije zasnovanih isključivo na PG jeste potreba da se izvrši detekcija estrusa. Problem nastaje onda kada se kod krava javljaju vrlo slabo uočljivi znaci estrusa, ili postoji organizacioni sterilitet (nedovoljno efikasna detekcija estrusa) (Ambrose i sar., 2007). Ima podataka da primena PG kod cikličnih krava koje su klasifikovane kao da „nije detektovan estrus“ nije dovela do poboljšanja u efikasnosti reprodukcije (McDougall, 2003). Još jedan problem koji utiče na lošije rezultate primene PG u kontroli reprodukcije može biti različita dužina lutealne faze kod visoko mlečnih krava (Lucy, 2003).

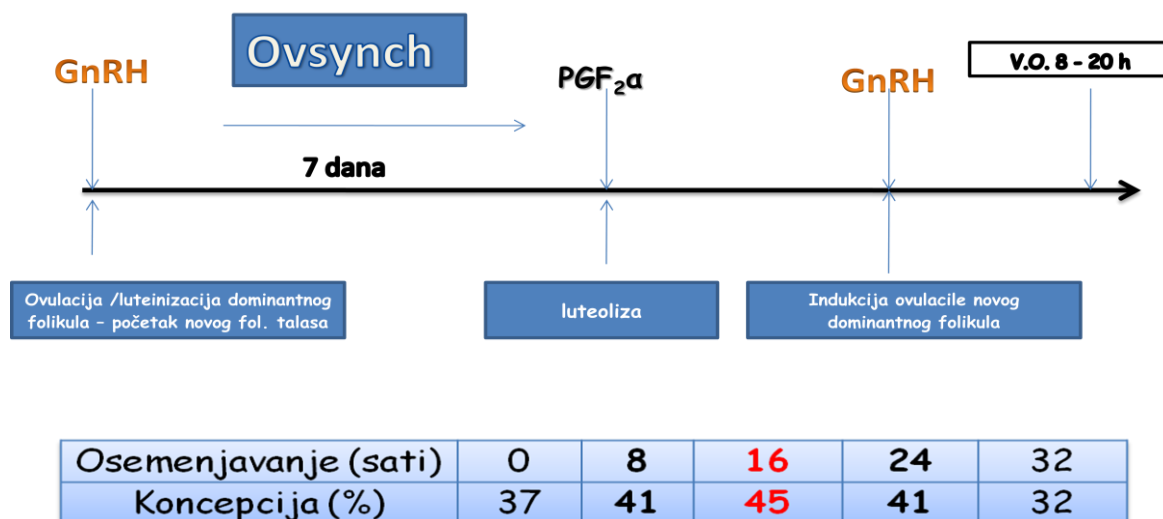
2.4.2. Prostaglandini i GnRH

Primenom prostaglandina u kombinaciji sa GnRH se može postići sinhronizacija kako razvoja folikularnog talasa tako i pojave estrusa, na taj način što se prvo aplikuje GnRH a nakon 7 dana krave se tretiraju sa PG (Diskin i sar., 2002; Thatcher i sar., 2002; Macmillan i sar., 2003). Aplikacija GnRH ima za cilj da stimuliše talas razvoja folikula dok PG dovodi do regresije lutealnog tkiva. Estrus sa ovulacijom novoformiranog DF nastaje 2-3 dana nakon injekcije PG. U praksi se događa da se kod oko 10% krava estrus javlja pre injekcije PG, najverovatnije zato što izostaje reakcija na tretman sa GnRH, dok istovremeno u periodu između dva tretmana (GnRH i PG) dolazi do oslobađanja endogenog PG i regresije postojećeg CL. Jednostavnije rečeno, tih 10% krava nalaze se u kasnijoj fazi estrusnog ciklusa i već imaju DF na početku samog tretmana, ali imaju i CL koje je prijemčivo za luteolitičko dejstvo PG (endogenog porekla) (Gvozdić i sar., 2011).

Jedan od našire prihvaćenih protokola za sinhronizaciju ovulacije kod visoko mlečnih krava je tzv. “GPG” protokol, uveden od strane Pursley i sar. (1995), koji je kasnije preimenovan i poznat pod nazivom “Ovsynch” (grafikon 2.4; Pursley i sar., 1997). Radi se o metodi za indukciju i sinhronizaciju ovulacije koji se sastoji od aplikacije GnRH na početku tretmana, nakon 7 dana aplikuje se PG, a nakon 2 dana ponovo se daje GnRH,

kako bi se sinhronizovala ovulacija. Veštačko osemenjavanje krava se može sprovesti u trenutku aplikacije druge injekcije GnRH (tzv. “COsynch” protokol; grafikon 2.4), ili nakon 16-24 sata od poslednjeg tretmana sa GnRH. Kao alternativa drugoj aplikaciji GnRH može se koristiti injekcija estradiol-ciprocinata i to 24 sata nakon aplikacije PG; ovaj protokol sinhronizacije ovulacije je poznat i kao “Heatsynch” (grafikon 2.4) i ima slične rezultate kao Ovsynch u pogledu stepena koncepcije (Pancarci i sar., 2002).

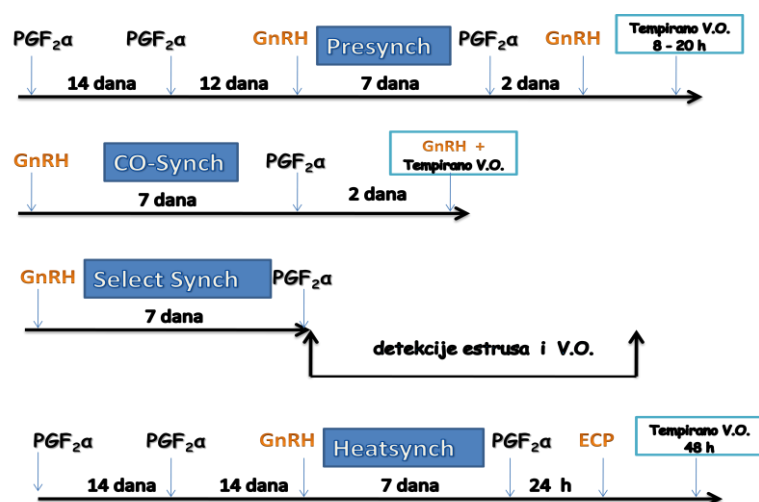
Sušтина Ovsynch protokola je da se na početku cikličnim kravama, za koje ne moramo znati u kojoj su fazi estrusnog ciklusa, aplikuje inicijalna doza GnRH, koja treba da dovede do luteinizacije ili atrezije DF. U tom trenutku se otvara prostor za početak razvoja novog folikularnog talasa, tj. regrutaciju novih folikula, ali se istovremeno stvara i CL, čija je aktivnost stimulisana aplikacijom GnRH. Sedam do osam dana kasnije aplikuje se jedna doza PG koji dovodi do luteolize i prekida funkcije CL, i očekuje se da tom trenutku na jajniku postoji DF koji je sposoban brzo dostigne fazu preovulatornog folikula. Dopunska injekcija GnRH koja se daje nakon 48. sati od PG tretmana treba da osigura dovoljan nivo LH da bi došlo do ovulacije, kako bi VO sprovedeno u sledećih 8-20 sati bilo uspešno (najbolji rezultatima koncepcije su ako je VO oko 16 sati nakon GnRH) (Pursley i sar., 1995).



Grafikon 2.4. Kombinovana primena prostaglandina i GnRH (Ovsynch) u indukciji ovulacije kod visoko mlečnih krava i rezultati koncepcije (Modifikovano prema Pursley i sar., 1995).

Postoji veliki broj modifikacija Ovsynch protokola koje su poznate pod nazivima: Pre Synch, CO-Synch, Select Synch, Hybrid Synch, Heat Synch (grafikon 2.5). Dopunski protokoli su razvijeni da bi se otklonili nedostaci osnovnog Ovsynch protokola, tj. da bi se

ostvarila bolja sinhronizacija pojave folikularnog talasa i ovulacije. S obzirom da osnovni protokol (Ovsynch) počinjemo aplikacijom GnRH u nepoznatoj fazi estrusnog ciklusa, može se dogoditi da prvu dozu GnRH damo kravama koje su u metestrusu, u trenutku kada na jajnicima nema folikula koji bi odgovorili na GnRH-tretman luteinizacijom ili ovulacijom. Kao rešenje za ovaj problem se nametnula ideja „presinhronizacije“, kako bi se što veći broj krava nalazio u istoj fazi estrusnog ciklusa na početku sprovođenja Ovsynch protokola (Diskin i sar., 2002; Lucy i sar., 2004; Dovenski i sar., 2013). Zato je razvijen PreSynch protokol, koji predviđa 2 injekcije PG u razmaku od 14 dana, da bi se 12 dana kasnije sproveo standardni OvSynch protokol. Protokol pod nazivom COSynch je još jednostavniji i koristi se za masovnu sinhronizaciju estrusa kod krava koje su najmanje 30 dana posle partusa. Razlika između Ovsynch-a i COSynch-a je u tome što se u vreme druge aplikacije GnRH istovremeno vrši veštačko osemenjavanja. Kod protokola pod nazivom SelectSynch izostavlja se druga aplikacija GnRH, već se nakon tretmana PG mora sprovesti detekcija estrusa i shodno tim rezultatima izvršiti VO krava. Varijacija na tu temu je protokol HybridSynch, s tim razlikom da se krave koje ne pokazuju znakove estrusa do 3. dana posle PG osemenjavaju upravo tog istog dana (72 sata od PG tretmana) uz dodatnu aplikaciju GnRH. Takođe je razvijen i HeatSynch protokol, koji je sličan PreSynch-u, samo što se umesto druge doze GnRH, 24 sati posle treće aplikacije PG daje estradiol-ciprocinat (ECP), koji predstavlja esterifikovani oblik estradiola-17 β . Dokazano je da ovaj preparat uspešno indukuje ovulaciju kod krava, dovodeći do oslobađanje predovulatornog maksimuma sekrecije LH (Lopes i sar., 2000).



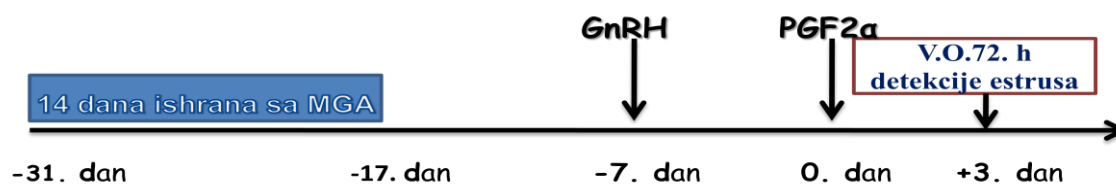
Grafikon 2.5. Protokoli za “presinhronizaciju” kod krava (Modifikovano prema Dovenski i sar., 2013)

2.4.3. Progestageni

Najranije metode kontrole reproduktivnog ciklusa kod preživara (ovaca) bile su zasnovane na primeni sintetskih progestagena. Tri ključne činjenice su uticala na razvoj hormonalnih tretmana koji obuhvataju primenu progestagenskih preparata u cilju kontrole estrusa i ovulacije. Prva je da dnevne injekcije progesterona date ovcama u sezoni parenja efikasno inhibiraju pojavu estrusa i ovulacije (Dutt i sar., 1948). Drugi značajan napredak je ostvaren kada je ustanovljeno da injekcija seruma ždrebkih kobilica (SŽK, “*pregnant mare serum gonadotropin*”, PMSG) neposredno posle progesteronskog tretmana dovodi do ovulatornog estrusa kod ovaca u toku sezonske anestrije (Dutt, 1953; Robinson, 1954). I treće, Robinson (1965) je pokazao da se umesto progesterona, koji se morao davati u velikim dozama, mogu koristiti sintetski analozi progesterona (fluorogeston acetat - FGA ili medroksiaceta progesteron - MAP), koji se efikasno aplikuju putem intravaginalnih sundera (pesarija) impregniranih odgovarajućom dozom ovih progestagena.

Progestageni deluju tako što inhibiraju sekreciju LH i time indirektno vrše supresiju lučenja estradiola (Echternkamp i sar., 1976). Oni takođe direktno utiču na odgovor folikula na dejstvo LH (Goodman i sar., 1981), ali deluju i na CNS pripremajući nervni sistem za odgovor na porast sekrecije estradiola i pojavu znakova estrusa.

Postoje više metoda kontrole reprodukcije kod krava koji su zasnovani na produživanju progestagenske faze estralnog ciklusa, odnosno održavanje visokog nivoa progesterona čak i posle regresije žutog tela. Estrus se javlja 2-5 dana posle prestanka tretmana koji može da traje od 7-14 dana. Administracija progestagena može biti peroralna, kada se u hrani junicama daje preparat melengesterol acetate (MGA[®] 200, Zoetis, USA & Canada) (Mallory i sar., 2010), koji blokira estrus sve dok traje unos progestagena. Peroralna aplikacija progestagena (0.5mg MGA/dan) traje obično 14 dana i može se kombinovati sa primenom PG i GnRH (grafikon 2.6; Brown i sar. 1988). Treba imati na umu da se ovaj metod koristi isključivo u SAD-u i Kanadi, za kontrolu pojave estrusa pre svega kod junica tovnih rasa goveda.



Grafikon 2.6. Modifikovani protokol za sinhronizaciju estrusa kod junica tovnih rasa primenom MGA uz dodatke PG i GnRH (Brown i sar., 1988).

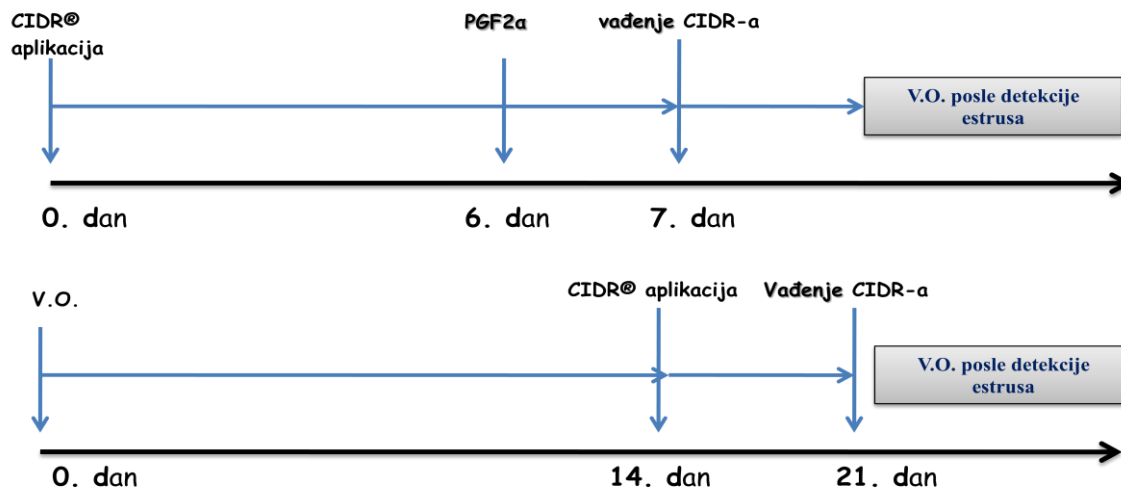
U novije vreme se kao metoda izbora u načinu aplikacije progestagena nametnula aplikacija putem intravaginalnih umetaka koji postepeno oslobađaju progesteron, kao što su CIDR („Controlled Internal Drug Release“) ili PRID („Progesterone-Releasing Intravaginal Device“) (van Werven i sar., 2013; Doit i sar., 2016; de Graaff i sar., 2018). Aplikacija progestagena je moguća i putem podkožnih implantata. Na svetskom tržištu veterinarskih lekova možemo naći još uvek preparat Crestar® (MSD Animal Health), koji je ranije bio poznat pod nazivom „Synchro-Mate B“. Preparat se sastojao od silikonskog implanta koji je impregniran s Norgestomet-om (17 α -acetoxy-11 β -methyl-19-norpregna-4-en-2.20-dione), i aplikuje se supkutano sa spoljašnje strane uha krave, a istovremeno se daje i/m injekcija estradiol valerata. Silikonski implant postepeno i kontinuirano otpušta progestagen, čime se 9 -10 dana imitira lutealna faza estrusnog ciklusa. Na dan vađenja implanta kravama se aplikuje 400-600 IJ ekvinog horionskog gonadotropina (eCG; tabela 2.4), da bi veštačko osemenjavanje sprovedo 48-56 sati kasnije. Kod mlečnih krava neophodna je i aplikacija prostaglandina 48 sati pre završetka progestagenskog tretmana. Postoje podaci da se Crestar® metod može upotrebljavati i kod krava i junica koje nemaju redovan estralni ciklus, tj. kod jedinki s neaktivnim jajnicima (Dovenski i sar. 2006). Metode koje se baziraju na intravaginalnoj i supkutanoj aplikaciji progestagenskih implantata traju 7-11 dana i podrazumevaju primenu estrogenih hormona na početak i eCG na kraju tretmana. Upotreba estrogena je neophodna zbog prekida funkcionalnost dominantnog folikula i iniciranje novog talasa folikulinskog rasta.

Tabela 2.4. Generalna šema primene progestagenskih tretmana prikazana.

Aplikacija implanta	Aplikacija PG	Vađenje implanta i aplikacija eCG	TAI* 56h
0. dan	7-8 dan	9-10 dan	12-13 dan

*TAI – „*timed artificial insemination*“, vremenski fiksirano veštačko osemenjavanje

Progesteronski tretman intravaginalnom aplikacijom CIDR u principu može da traje 7 dana i može se upotrebiti za sinhronizaciju estrusa neosemenjenih krava ili resinhronizaciju estrusa kod krava koje su povadale (grafikon 2.7).



Grafikon 2.7. Protokol za primenu CIDR tretmana u sinhronizaciji i resinhronizaciji estrusa kod krava

2.4.4. hCG

Davne 1927 godine Ascheim i Zondek prvi su ukazali da se u krvi i urinu gravidnih žena nalazi supstanca koja može da stimulise aktivnost jajnika, i ona je kasnije nazvana humani horionski gonadotropin (hCG, Lunenfeld, 2004). Humani horionski gonadotropin u početku se sintetiše od strane embriona u periodu između 2-8 dana nakon oplodnje, dok ga kasnije u toku gestacije proizvode ćelije placentalnog sinciciotrofoblasta (de Medeiros i sar., 2009). Budući da je nivo hCG u urinu relativno visok, on se koristio u kliničke svrhe. Ekstrakt hCG-a koji se na tržištu nalazi još od 1931 godine, koristi se i dan danas. Humani horionski gonadotropin pripada familiji glikoproteinskih hormona, u koju spadaju još i LH, FSH i tireoistimulirajući hormon (TSH) (Stenman i sar., 2006). Kao i svi hormoni glikoproteinske strukture i hCG se sastoji od dve različite subjedinice – α i β subjedinica. Aminokiselinski sastav α -subjedinice je zajednički za sve glikoproteinske hormone, dok je građa β -subjedinice specifična i značajna za ispoljavanje biološke aktivnosti hormona. Upravo zahvaljujući značajnom strukturnom poklapanju u građi β -subjedinice između LH i hCG (80% homologije) moguće je iskoristiti hCG za indukciju ovulacije kod žena. Vreme poluživota kod hCG pokazuje dve faze u njegovoj eliminaciji iz organizma, gde je prva faza brzog “čišćenja” iz krvotoka i traje između 5-9 sati da bi potom usledila faza sporije razgradnje koja traje između 24-33 sata (Rizkallah i sar., 1969; Stenman i sar., 2006). Intramuskularna aplikacija hCG-a dovodi do nešto dužeg vremena poluživota u odnosu na intravensku aplikaciju (Rizkallah i sar., 1969). hCG se koristi kod domaćih životinja jer je njegova LH-aktivnost dugotrajnija u odnosu na sam preparat LH.

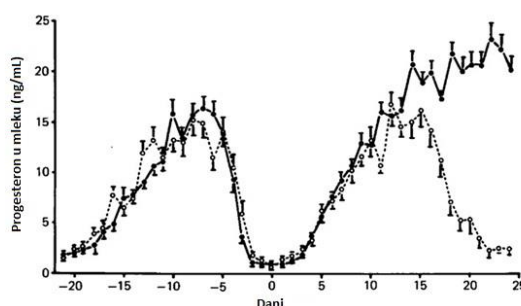
Kod mlečnih krava nivo LH u plazmi se značajno povećava do 30 sati nakon aplikacije hCG i ne opada na bazalni nivo sve do 66 sati nakon aplikacije (Schmitt i sar., 1996). Međutim, ponovljena primena hCG kod goveda može da dovede do imunskog odgovora i sinteze antitela koja mogu da neutrališu hCG i značajno umanje njegovo vezivanje za receptore (Sundby i sar., 1978). Isto tako je uočeno kod mačaka imunski odgovor na hCG može značajno da varira pa je preporučeno da interval između dva uzastopna tretmana ne treba da bude kraći od 4 meseca (Sanson i sar., 1995).

Humani horionski gonadotropin se može primeniti kao luteinizirajući faktor kod većeg broja vrsta sisara (de Rensis i sar., 2010). Kod goveda tretman sa hCG-om može imati snažan efekat nalik na dejstvo LH koji utiče na sledeće procese: 1) produžava aktivnost i životni vek CL, stimulišući sintezu P4 (Sianangama i sar., 1992); 2) indukuje ovulaciju u toku estrusnog ciklusa (Price i sar., 1986; Santos i sar., 2001); 3) stimuliše formiranje akcesornih CL kada se aplikuje u toku lutealne faze (Rajamahendran i sar., 1992); 4) modifikuje dinamiku folikularnih talasa čime povećava broj cestrusnih ciklusa sa tri talasa razvoja folikula (Diaz i sar., 1998).

hCG izaziva ovulaciju DF i stimuliše diferentovanje teka i granulosa ćelija u male i velike lutealne ćelije, kao i transformaciju malih u velike lutealne ćelije (Sianangama i sar., 1992; Farin i sar., 1988). Ovi efekti sa svoje strane dovode do povećanog kapaciteta za steroidogenezu primarnog CL (Schmitt i sar., 1996a; Diaz i sar., 1998; Veenhuizen i sar., 1972; Schmitt i sar., 1996a; Fricke i sar., 1993; Machado i sar., 2008; Bruel i sar., 1990). Folikuli takođe mogu da se pretvore u akcesorna CL nakon tretmana sa hCG-om. Luteinizacija folikula pod dejstvom hCG je zabeležena kod 70% krava tovnih rasa kod kojih primarno CL uklonjeno 28 dana graviditeta (Bridges i sar., 2000) kao i kod 70% mlečnih krava koje su stretirane sa hCG između 4-9 dana od osemenjavanja (Santos i sar., 2011; Stevenson i sar., 2007). Aplikovanje 1000 IU hCG kod postpartalnih krava tovnih rasa je dovoljno da dovede do luteinizacije bez obzira na veličinu folikula ili njegovu dominantnost u vreme sprovođenja tretmana (Cooper i sar., 1991). Šta više, čak i folikuli koji su manji od 10 mm u prečniku mogli su biti pretvoreni u lutealno tkivo pod dejstvom hCG (Sheffel i sar., 1982). Efikasnost hCG u luteinizaciji folikula može da varira u zavisnosti od faze estrusnog ciklusa. Tako je sposobnost hCG da dovede do luteinizacije folikula i pojave akcesornih CL veća u ranoj lutealnoj fazi estrusnog ciklusa (od 4-7 dana ciklusa), a manja je između 0-3 dana i u sredini lutealne faze estrusnog ciklusa (od 8-12 dana; Price i sar., 1989; Helmer i sar., 1986).

2.5 Progesteron i uloga u detekciji estrusa

Progesteron je steroidni hormon koji proizvodi žuto telo (*corpus luteum*, lat.), privremena endokrina struktura na jajnicima sisara. Osnovna uloga progesterona je odžavanje graviditeta. Posle estrusa i formiranja žutog tela visoka koncentracija progesterona se održava prosečno do 16-18 dana posle estrusa u slučaju kada nije došlo do uspostavljanja gaviditeta. Progesterone se detektuje u krvi, gde je 98% progesterona vezano za proteine. Takođe je prisutan u mleku, gde je zbog svoje steroidne strukture i hidrofobnosti najvećim delom vezan za mlečnu mast (Wadmann i sar., 1999). Relativno niska koncentracija progesterona u serumu (4.9 ± 0.8 ng/mL) je detektovana sa radioimunoesejom (RIA) 18. dana od početka estrusa i opala je do 21. dana nakon estrusa (Rajamahendran i sar., 1992). U studiji izvedenoj na 200 krava sa primeno RIA testa za određivanje koncentracije progesterona u mleku kod gravidnih krava je utvrđeno da 1-og dana od estrusa koncentracija progesterone iznosi 1.5 ± 0.3 ng/mL, 11-og dana od estrusa 11.1 ± 0.5 ng/mL, 22-og dana 12 ± 0.4 ng/mL i 28. dana 12.5 ± 0.5 ng/mL. Kod neseonih krava koncentracija progesterona je u istim vremenskim intervalima bila 1.2 ± 0.2 , 10.3 ± 0.4 , 3.0 ± 0.4 i 6.8 ± 0.6 ng/ml (Zaied i sar., 1979). Merenjem progesterone u plazmi i mleku primenom enzimo-immunoeseja (enzyme-linked immunoassay, ELISA), i ovulacijom potvrđenom sa ultrazvukom, detektovana je koncentracija progesterona u mleku niža od 15 ng/mL na 97 ± 17.8 h pre ovulacije, <5 ng/mL na 79.7 ± 11.2 h pre ovulacije i <2 ng/mL na 70.7 ± 16.8 h pre ovulacije. U krvnoj plazmi je koncentracija progesterona pala ispod 4 ng/mL na 90 ± 19.6 h pre ovulacije, do <2 ng/mL na 75 ± 12.2 h pre ovulacije (Roelofs i sar., 2006). Koncentracija progesterona u mleku tokom estrusnog ciklusa prikazana je na slici 2.5.

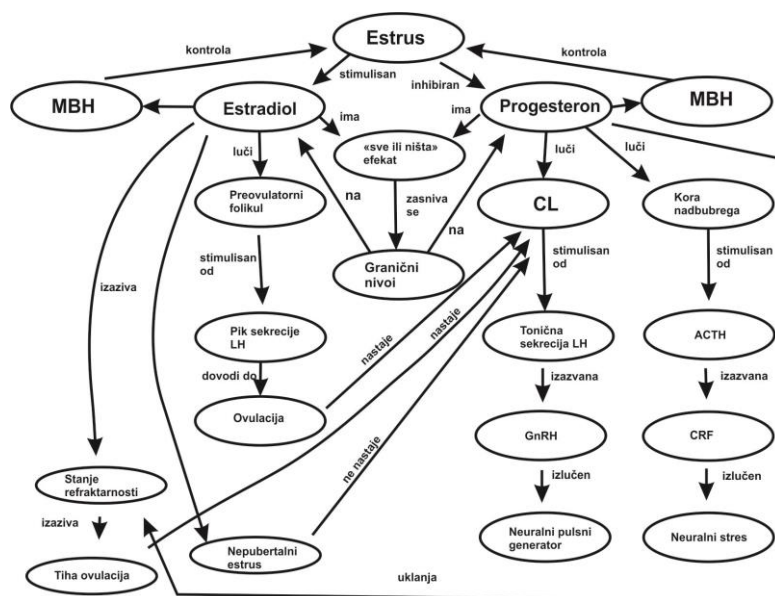


Slika 2.5. Koncentracija progesterona u mleku tokom estrusnog ciklusa bez VO i posle VO; dan 0 predstavlja dan estrusa i dan VO; potencijalno gravidna krava (●) ima visoku koncentraciju progesterone 20 i više dana posle osemenjavanja (modifikovano prema Bulman i sar., 1978).

Progesteron nije specifičan za graviditet, jer se visoka koncentracija detektuje i kod gravidnih i negravidnih krava (slika 2.5). Sa druge strane, progesteron je specifičan za određivanje estrusa sa niskim koncentracijama koje se detektuju počevši od 2 do 3 dana pre estrusa. Mleko je posebno interesantno za detektovanje progesterona, jer je koncentracija progesterone u mleku 4 do 5 puta veća u poredjenju sa njegovom koncentracijom u krvi (Batra i sar., 1979; Kamboj i sar., 1993).

2.6 Estradiol i uloga u estrusu

Estradiol (17 β -estradiol, E2) je steroidni hormon koji se luči iz rastućih folikula i on pokreće pojavu znakova estrusa, a time igra važnu ulogu u otkrivanju pravog vremena za osemenjavanje (Adams, 1999; Singh i sar., 1999). Estradiol (E2) deluje na hipotalamus tokom relativnog nedostatka progesterona, funkcionišući po principu “sve ili ništa”. Odnosi pojedinih činilaca značajnih u ispoljavanju znakova estrusa prikazani su na slici 2.6.



Slika 2.6. Odnosi pojedinih činilaca značajnih u ispoljavanju znakova estrusa i koncept regulacije estrusa kod mlečnih krava; MBH - medijalni bazalni hipotalamus, CL - corpus luteum, CRF – kortikotropni oslobađajući hormon (modifikovano prema Alrich, 1999).

Kada se dostigne prag u koncentraciji estradiola, dalje produženje izloženosti estradiolu i povećavanje koncentracije estradiola neće uticati na intenzitet estrusnog ponašanja (Coe i sar, 1989; Allrich, 1998). Bitno je naglasiti da progesterone ima uticaj na

umanjenje dejstva estradiola tj. izražavanja znakova estrusa (Davidge i sar., 1987; Valies i sar., 1992). Tokom proestrusa i estrusa koncentracija progesterone mora biti niska zbog inhibitirnog efekta na estrusno ponasanje. Teorija o inhibitornoj ulozi progesterona tj. utišavanju znakova estrusa ukazuje da koncentracija progesterone treba dostići prag nakon čega će efekat “ sve ili ništa ” biti pokrenut i estrusni znaci će biti utišani. Ovakvo delovanje progesterone na hipotalamus ukazuje da progesteron ima prioritet u kontroli pojave estrusa u odnosu na estradiol.

3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu navedene literaturne podatke postavili smo sledeće ciljeve i zadatke:

1. Da se utvrdi da li aplikacija GnRH u periodu indukovano estrusa detektovanog između 40-80 dana od partusa može dovesti do poboljšanja naknadne lutealne aktivnosti i efikasnosti reprodukcije visoko-mlečnih krava u intenzivnom uzgoju.
2. Da se utvrdi da li aplikacija GnRH u periodu indukovano estrusa detektovanog između 40-80 dana od partusa i hCG u periodu očekivanog porasta aktivnosti žutog tela može dovesti do poboljšanja naknadne lutealne aktivnosti i efikasnosti reprodukcije visoko-mlečni krava u intenzivnom uzgoju.
3. Da se utvrdi da li aplikacija hCG u periodu očekivanog porasta aktivnosti žutog tela nakon indukovano estrusa može dovesti do poboljšanja naknadne lutealne aktivnosti i efikasnosti reprodukcije visoko-mlečni krava u intenzivnom uzgoju.

Da bi se postigli napred definisani ciljevi određeni su sledeći zadaci:

1. Da se na farmi visoko-mlečnih krava izvrši odabir oglednih životinja koje su imale fiziološki tok partusa i bile bez postpartalnih reproduktivnih poremećaja, sa utvrđenim postojanjem funkcionalnog žutog tela putem anamneze, rektalnog pregleda i primenom ultrazvučne dijagnostike reproduktivnog trakta.
2. Da se metodom slučajnog izbora izvrši njihovo grupisanje u 4 ogledne grupe.
3. Da se u kontrolnoj grupi krava u periodu između 40-80 dana nakon partusa izvrši detekcija estrusa i veštačko osemenjavanje.
4. Da se u drugoj oglednoj grupi krava izvrši indukcija i sinhronizacija estrusa primenom sintetskog prostaglandina, sa detekcijom estrusa, aplikacijom preparata GnRH i veštačkim osemenjavanjem.
5. Da se u trećoj oglednoj grupi krava izvrši indukcija i sinhronizacija estrusa primenom sintetskog prostaglandina, sa detekcijom estrusa, aplikacijom preparata GnRH i veštačkim osemenjavanjem, uz naknadnu stimulaciju lutealne aktivnosti primenom preparata hCG-a.

6. Da se u četvrtoj ogleđnoj grupi krava izvrši indukcija i sinhronizacija estrusa primenom sintetskog prostaglandina, sa detekcijom estrusa, uz naknadnu stimulaciju lutealne aktivnosti primenom preparata hCG-a.
7. Da se prikupe uzorci mleka i krvnog seruma u periodu estrusa, 14, 21 i 28 dana od estrusa i veštačkog osemenjavanja.
8. Da se između 28-35 dana izvrši pregled na steonost kod svih ogleđnih životinja primenom ultrazvučne dijagnostike.
9. Da se odredi koncentracija progesterona u uzorcima mleka i krvnog seruma, kao i koncentracija estradiola u uzorcima krvnog seruma ogleđnih životinja.
10. Da se izvrši statistička obrada prikupljenih rezultata ispitivanja, njihova analiza i donesu odgovarajući zaključci.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Ogledne grupe i tretmani

Ekperiment je sproveden na farmi mlečnih krava “Lazar – Blace”, u Blacama, Republika Srbija, koja je obuhvatala ukupno 1500 krava u slobodnom načinu uzgoja. Ogleđom je obuhvaćeno 110 zdravih krava Simentalske rase, sa prosečnim brojem od 3-5 laktacija, i prosečnom proizvodnjom mleka od 6400L u toku 305 dana laktacije, nakon 40 dana od partusa. Parametri efikasnosti reprodukcije koji su zabeleženi na farmi prikazani su na tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Parametri efikasnosti reprodukcije na farmi eksperimentalnih životinja.

Laktacija (prosečan broj laktacija)	3±2
Starost kod prve koncepcije (meseci)	17±1.5
Starost na prvom partusu (meseci)	26±1.5
Međutelidbeni interval (meseci)	14±3
Prvi postpartalni estrus (dani)	34±8
Prvo VO nakon partusa (dani)	62±16
Indeks osemenjavanja (prethodna laktacija)	2±3
Interestrusni period (dani; prethodna laktacija)	21±1
Servis period (prethodna laktacija)	133±74

Sadržaj dnevnog obroka koji su dobijale ogledne životinje prikazan je u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Sadržaj dnevnog obroka koji su dobijale ogledne životinje.

Suva materija (SM), kg	23.05
Neto energija laktacije (NEL), MJ	169.89
Sirovih proteina (SP), %SM	16.89
Rumen-nerazradivi protein (<i>rumen-undigestible protein</i> , RUP), %SP	35.69
Mast, %SM	6.69
Vlakna, %SM	22.99
Vlakna nerastvorljiva u kiselim deterđentima (<i>acid-deterđent fibre</i> , ADF), %SM	31.06
Vlakna nerastvorljiva u neutralnim deterđentima (<i>neutral-deterđent fibre</i> , NDF), %SM	50.08

Sve životinje koje su obuhvaćene ogleđom su bile klinički zdrave, između 40-80 dana nakon partusa, bez zabeleženih puerperalnih poremećaja zdravlja. Krave su uključivane u deo ogleđa sa sinhronizacijom estrusa na osnovu sledećeg kriterijuma: 1) rektalnim pregledom je ustanovljeno postojanje žutog tela na jajnicima, i 2) rektalnim

pregledom nije ustanovljen graviditet, niti je u prethodnom estrusu sprovedeno veštačko osemenjavanje. Kod krava kod kojih je vršena sinhronizacija estrusa sprovede je tretman sa prostaglandinom - PG (ESTRUMATE®, Vet Pharma Friesoythe GmbH, Friesoythe, Germany). Kontrolnu grupu krava predstavljale su životinje koje su osemenjavane u spontanom estrusu. Krave koje su tretirane PG i koje su manifestovale kliničke znakove estrusa su dalje metodom slučajnog izbora uključene u sledeće ogledne grupe: 1) tretman sa GnRH (RECEPTAL®, Intervet International GmbH, Unterschleissheim, Germany) u vreme VO, 2) tretman sa hCG (PREGNYL®, Organon, Oss, The Netherlands) 7. dana nakon VO, 3) tretman sa GnRH u vreme VO, praćen tretmanom sa hCG 7. dana nakon VO. Sve ogledne životinje su pregledane na steonost primenom ultrazvučne tehnologije između 28-35 nakon VO (Easi-Scan™, BCF technology, Bellshill, UK), i prema rezultatima ultrazvučnog pregleda su klasifikovane kao: gravidne (+) ili negravidne (-) životinje. Za pozitivnu dijagnozu steonosti kriterijum je bio pronalazak u lumenu materice embrionalne vezikule (tzv. “meška”) - anehogene ograničene tamne zone u lumenu uterusa, koja predstavlja alantoisnu tečnost. Grupisanje krava po ovom kriterijumu je služilo za kasniju statističku analizu mogućih efekata sprovedenih tretmana na stepen koncepcije i razlike u koncentraciji hormona. Protokoli za tretman eksperimentalnih životinja su prikazani šematski na tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Šematski prikaz protokola za tretman eksperimentalnih životinja.

Grupa	n	TRETMAN
Kontrolna grupa (grupa C)	26	Bez tretmana + detekcija spontanog estrusa + dvostruko VO (prvoVO u trenutku detekcije estrusa i drugo VO nakon 12±2 sati)
GnRH (grupa O)	26	PGF _{2α} , 0.25 mg/mL, 2 mL/kravi, i.m. + detekcija estrusa nakon 2-5 + GnRH, 0.05 mg/mL, 2 ml/kravi, i.m. u vreme detekcije estrusa + dvostruko VO
hCG (grupa P)	30	PGF _{2α} , 0.25 mg/mL, 2 mL/kravi, i.m. + detekcija estrusa nakon 2 -5 dana + dvostruko VO + hCG, 1500 IU/kravi, i.m., 7 dana nakon drugog VO
GnRH/hCG (grupa OP)	28	PGF _{2α} , 0.25 mg/mL, 2 mL/kravi, i.m. + detekcija estrusa nakon 2-5 dana + GnRH, 0.05 mg/mL, 2 ml/kravi, i.m. u vreme detekcije estrusa + dvostruko VO + hCG, 1500 IU/kravi, i.m., 7 dana nakon drugog VO

Da bi se izbegle moguće greške u detekciji estrusa ili kasnoj ovulaciji sve krave su u vreme detekcije estrusa i VO pregledane od strane iskusnog veterinara putem rektalne palpacije, i isključivo krave sa prisutnim dominantnim folikulom na jajnicima su dvokratno veštački osemenjavane.

4.2. Prikupljanje uzoraka krvnog seruma i mleka

Uzorci krvnog seruma i mleka prikupljeni su od oglednih krava u sledećim vremenskim intervalima: na dan VO, 14, 21. i 28. dana nakon VO. Uzorci krvi uzimani su punkcijom repne vene (*v. coccygea*) uz korišćenje vakutajnera (BD Vacutainer® serum tubes, Demophorius, Cambridge, UK), i u najkraćem mogućem roku transportovani su do laboratorije. Krvni serum je dobijan nakon spontane koagulacije uzoraka krvi na sobnoj temperaturi, nakon čega je adekvatno obeležavan, pakovan i čuvan na -18°C do izvođenja analiza.

Uzorci mleka svih oglednih krava prikupljeni su istim vremenskim intervalima kao i uzorci krvnog seruma, za vreme jutarnje muže u količini od približno 8 mL u sterilne plastične posude (10 mL, Spectar, Čačak, Srbija). Kao sredstvo za konzervisanje uzoraka mleka radi transporta i čuvanja služio je kalijum dihromat u tabletama od 3.3 mg ((Merck, Darmstadt, Germany), koji je dodavan u svaku posudu sa mlekom. Uzorci mleka su u najkraćem mogućem vremenu dostavljani u laboratoriju, gde su čuvani na temperaturi od +4°C do trenutka određivanja koncentracije P4.

4.3. Određivanje koncentracije progesterona u krvnom serumu

Određivanje koncentracije progesterona u krvnom serumu oglednih životinja je sprovedeno korišćenjem komercijalnog radioimunološkog testa (RIA PROGESTERON (PEG) test, Institut za primenu nuklearne energije - INEP, Zemun, Republika Srbija), prema uputstvu proizvođača. Maksimalne vrednosti za koeficijent varijacije unutar testa i između testova bile su 7.52% i 9.37%.

4.4. Određivanje koncentracije progesterona u mleku

Određivanje koncentracije progesterona u mleku oglednih životinja izvršeno je primenom enzimo-imunoeseja (EIA) u laboratoriji Naučnog instituta za Veterinarstvo Novi Sad, Republika Srbija. Anti-progesteronska antitela, protokol za izvođenje testa i proizvodnju obeleženog hormona ("horse-redish progesterone", HRP-P4) su dobijeni od

“Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan. Substrat za EIA test je proizveden u INEP-Zemun. Optička gustina (ekstinkcija) je očitavana na čitaču (Rayto Life and Analytical Science Co., Ltd, PRC), na talasnoj dužini od 450 nm.

4.5. Određivanje koncentracije estradiola u krvnom serumu

Određivanje koncentracije estradiola u krvnom serumu oglednih životinja je sprovedeno korišćenjem komercijalnog radioimunološkog testa (RIA ESTRADIOL (CT) test, Institut za primenu nuklearne energije - INEP, Zemun, Republika Srbija), prema uputstvu proizvođača. Maksimalne vrednosti za koeficijent varijacije unutar testa i između testova bile su 9.72% i 10.25%.

4.6. Ultrazvučna dijagnostika graviditeta

Sve ogledne životinje su pregledane na steonost primenom ultrazvučne tehnologije između 28-35 nakon VO, korišćenjem ultrazvučnog aparata Easi-ScanTM (BCF technology, Bellshill, UK) korišćenjem linearne sonde (4.0-8.5 MHz) sa frekvencom od 5.0 MHz. Za pozitivnu dijagnozu steonosti kriterijum je bio nalaz u lumenu materice embrionalne vezikule (tzv. “embrionalnog meška”) - pronalazak ograničene anehogene tamne zone u lumenu uterusa, koja predstavlja alantoisnu tečnost. Prema rezultatima ultrazvučnog pregleda su klasifikovane kao: gravidne (S) ili negravidne (N) životinje, i ovaj kriterijum je dalje služio za statističku analizu.

4.7. Statistička analiza rezultata

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije P4 i E2 između oglednih grupa određivana je metodom analize varijanse (ANOVA), Kruskal-Wallis i Dunn’s Multiple Comparison Tests za nivo značajnosti od $p < 0.05$ koji je smatran signifikantnim. Za statističku analizu je korišćen statistički paket GraphPad Prism 5.

Procena kliničke valjanosti progesteronskog testa u krvnom serumu i mleku za određivanje steonosti kod krava vršen je po modelu 2x2 faktora (tabela 4.4; Smith, 1991).

Tabela 4.4. Osnovi podaci za procenu kliničke valjanosti progesteronskog testa u krvnom serumu i mleku za određivanje steonosti kod krava (Smith, 1991)

Dijagnoza	Gravidne (P4 u serumu/mleku)	Negravidne (P4 u serumu/mleku)
Gravidne (UZ dijagnoza)	a (tačna pozitivna)	b (netačna pozitivna)
Negravidne (UZ dijagnoza)	d (netačna negativna)	c (tačna negativna)

Legenda: UZ – ultrazvučna dijagnostika graviditeta 28-35 dana nakon VO; P4 – koncentracija progesterona u krvnom serumu/mleku.

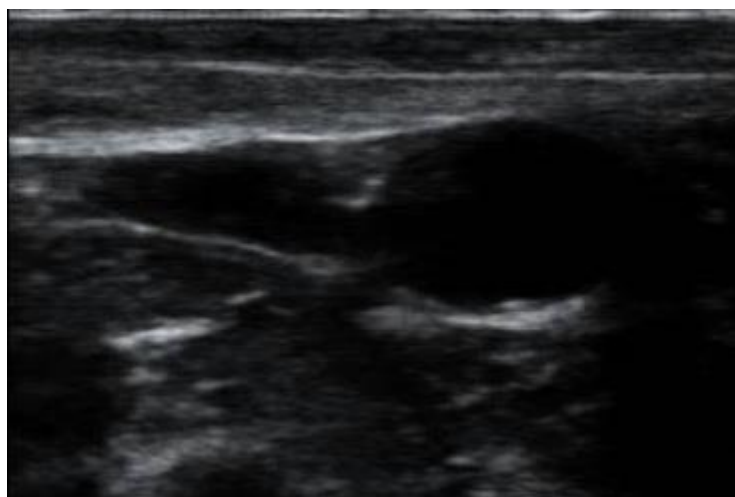
Osetljivost testa (“sensitivity”, Se) je definisana kao procenat pozitivno dijagnostikovanih krava u odnosu na broj oteljenih krava (stvarno pozitivnih). Jednačina kojom se izračunava osetljivost testa glasi: $\{a/(a+d)\} \times 100$. Specifičnost testa (“specificity”, Sp) se definiše kao procenat krava koje su dijagnostikovane kao negativne, a da su stvarno bile negravidne; jednačina za ovaj parametar testa je $\{c/(c+b)\} \times 100$. Pored osetljivosti i specifičnosti progesteronskog testa izračunati su još dva dodatna parametra njegove valjanosti koja su za veterinare praktičare možda značajniji u odnosu na vrednosti osetljivosti i specifičnosti, a radi se o sledećim pokazateljima: 1) pozitivna prediktivna vrednost (PV+), koja predstavlja verovatnoću da su krave koje su dijagnostički ocenjene kao gravidne zaista u graviditetu (jednačina glasi: $\{a/(a+b)\} \times 100$), i 2) negativna prediktivna vrednost (PV-), koja predstavlja verovatnoću da su krave ocenjene kao negravidne zaista nisteone (jednačina glasi: $\{c/(c+d)\} \times 100$) (Hanzen i sar., 2000).

Statistička značajnost razlika između proporcija gravidnih krava u oglednim grupama je izračunavana primenom Z testa na nivou značajnosti od $p < 0.05$ (<http://www.socscistatistics.com/tests/ztest/>).

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Uticaj tretmana na steonost krava

Steonost oglednih životinja je potvrđivana ultrazvučnim pregledom između 28-35 dana nakon VO, kada je pozitivan nalaz predstavljala dijagnoza embrionalne vezikule u lumenu materice. Prema rezultatima ovog pregleda sve ogledne životinje su klasifikovane kao steone (S) ili nesteone (N) krave, i ovaj kriterijum je služio za dalju analizu razlika između oglednih grupa. Primer ultrazvučnog nalaza kod steone jedinke prikazan je na slici N.



Slika 5.1. Ultrazvučni nalaz pri pregledu materice kod steone krave iz ogledne grupe PS između 28-35 dana od VO.

Rezultati uticaja primenjenih tretmana nakon indukcije i sinhronizacije estrusa na steonost krava prikazani su u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Proporcija steonih (S) i nesteonih (N) krava u sve četiri ogledne grupe i statistička značajnost razlika.

Grupa	S	N	Broj krava	¹ Sig.
C	8 (31%)	18 (69%)	26	-
O	14 (54%)	12 (46%)	26	NS
OP	16 (62%)	12 (38%)	28	NS
P	19 (63%)	11 (37%)	30	*
Ukupno tretiranih krava (O+OP+P)	49 (52%)	35 (48%)	84	*

Legenda: ¹Z test statističke značajnosti između proporcija kontrolne grupe u odnosu na druge tretmane i ukupan broj tretiranih krava (<http://www.socscistatistics.com/tests/ztest/>); *-p<0.05.

Podaci prikazani u tabeli 5.1. ukazuju da je statistički značajno veći procenat uspešne koncepcije zabeležen kod krava iz ogledne grupe P (63%) u odnosu na kontrolnu grupu krava (C; 31%). Istovremeno je zabeležena statistički značajna razlika u procentu koncepcije između zbirno prikazanih tretiranih grupa krava (O, P i OP; 52%) u odnosu na kontrolnu grupu krava (C; 31%).

5.2. Koncentracija progesterona

5.2.1. Koncentracija progesterona i detekcija estrusa

Rezultati određivanja koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku u periodu estrusa i VO kod steonih (S) i nesteonih (N) krava sve četiri ogledne grupe su prikazani u tabeli 5.2.

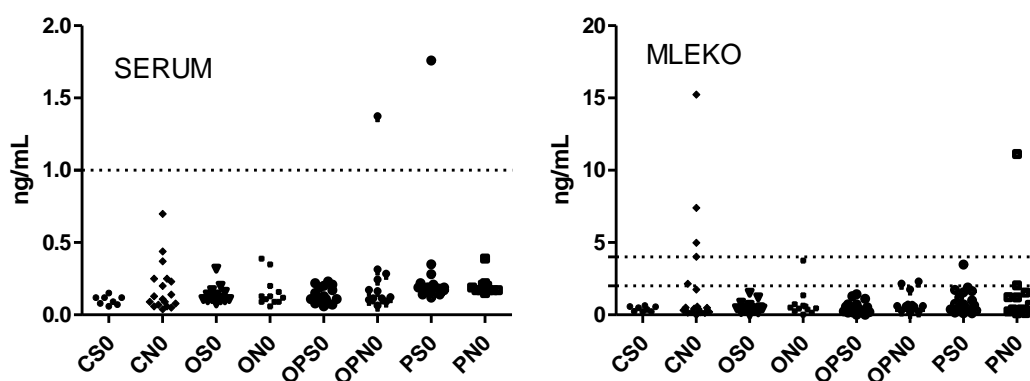
Tabela 5.2. Koncentracija progesterona u krvnom serumu i mleku u periodu estrusa kod steonih (S) i nesteonih (N) krava sve četiri ogledne grupe (C, O, OP, P).

Grupa S/N	Br. krava	Krvni serum		Mleko		
		≤1.00 ng/mL	>1.00 ng/mL	≤1.99 ng/mL	2.00-3.99 ng/ml	≥4.00 ng/mL
CS	8	8	-	8	-	-
CN	18	18	-	13	1	4
OS	14	14	-	14	-	-
ON	12	12	-	11	1	-
OPS	16	16	-	16	-	-
OPN	12	11	1	10	2	-
PS	19	18	1	18	1	-
PN	11	11	-	9	1	1
Ukupan br. (%)	110 (100%)	108 (98%)	2 (2%)	99 (90%)	6 (6%)	5 (4%)

Legenda: S – steone, N – nesteone; nivo progesterona u mleku ≤1.99 ng/mL je primenjen kao granična vrednost za tačnu detekciju estrusa, nivo između 2.00-3.99 ng/mL smatran je kao suprabazalna (sumnjiva) vrednost, nivo progesterona ≥4.00 ng/mL je smatran za netačnu detekciju estrusa; nivo progesterona u krvnom serumu preko 1 ng/mL je primenjen kao granična vrednost za netačnu detekciju estrusa.

Podaci prikazani u tabeli 5.2. ukazuju da se kod 98% krava na dan detekcije estrusa može ustanoviti koncentracija progesterona u krvnom serumu niža od 1 ng/mL, dok je koncentracija progesterona u mleku kod 90% krava niža od 1.99 ng/mL. Istovremeno se može uočiti da je kod 10% krava zabeležena sumnjivo visoka vrednost koncentracije progesterona u mleku, gde je kod 6% krava opseg izmerenih vrednosti bio između 2.00-3.99 ng/ml, dok je kod 4% krava zabeležena vrednost koncentracije progesterona od preko 4 ng/mL.

Distribucija individualnih vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku kod steonih i nesteonih krava sve četiri ogledne grupe prikazana je na grafikonu 5.1.



Grafikon 5.1. Distribucija individualnih vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku kod steonih (S) i nesteonih (N) krava sve četiri ogledne grupe (C, O, OP i P); isprekidane linije označavaju unapred definisane granične vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu (1 ng/mL) i mleku (2-4 ng/mL).

Podaci prikazani na grafikonu 5.1. ukazuju da je veoma mali broj steonih i nesteonih jedinki u sve četiri ogledne grupe imao relativno visoku koncentraciju progesterona u krvnom serumu/mleku na dan detekcije estrusa i VO.

Prosečne vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku i broj životinja sa netačnom detekcijom estrusa prikazan je u tabeli 5.3.

Tabela 5.3. Prosečne vrednosti koncentracije progesterona (ng/mL) u krvnom serumu i mleku i broj životinja sa netačnom detekcijom estrusa prema unapred izabranim graničnim koncentracijama progesterona.

Krvni serum	≥ 1.00 ng/mL	-	-
Broj krava	2	-	-
Prosečna koncentracija progesterona	1.6	0.2*	0.3*
Mleko	≤ 1.99 ng/mL	2.00-3.99 ng/ml	≥ 4.00 ng/mL
Broj krava	-	6	5
Prosečna koncentracija progesterona	0.4	2.6	8.6

Legenda: *-vrednost koncentracije progesterona u krvnom serumu krava sa suprabazalnim nivoom progesterona (6 krava) i ≥ 4.00 ng/mL u mleku (5 krava).

Podaci prikazani u tabeli 5.3. pokazuju da je postojalo neslaganje između koncentracije progesterona u mleku i krvnom serumu kod krava sa suprabazalnom ili visokom koncentracijom progesterona u mleku. Tako je kod 6 krava koje su imale prosečnu koncentraciju progesterona u mleku 2.6 ng/mL istovremeno zabeležena veoma niska koncentracija progesterona u krvnom serumu (svega 0.2 ng/mL), dok je kod 5 krava sa povišenom koncentracijom progesterona u mleku (prosečno 8.6 ng/mL) zabeleženo prosečno svega 0.3 ng/mL progesterona u krvnom serumu.

5.2.2. Koncentracija progesterona u krvnom serumu nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja

Srednje vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu kod krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije prikazane su na tabeli 5.4.

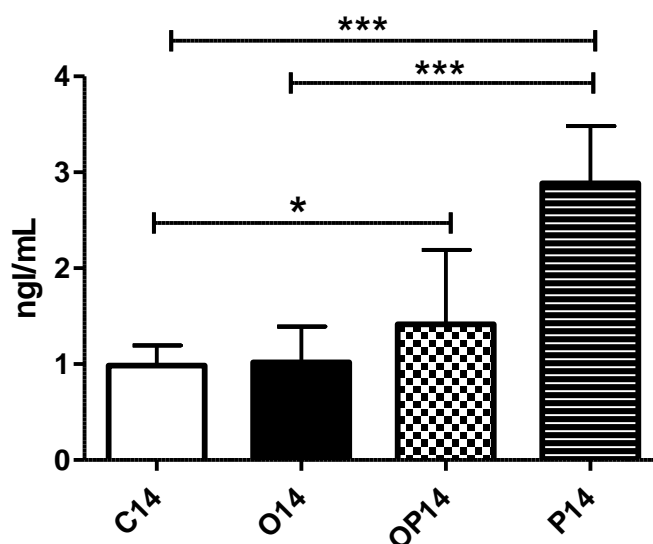
Tabela 5.4. Srednje vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu (ng/mL) kod krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije.

Statistički parametri	Dani nakon estrusa	Grupa (broj krava)			
		C (26)	O (26)	OP (28)	P (30)
\bar{x}	14	1.10	1.10	1.70	2.80
	21	0.56	0.69	1.30	2.50
	28	0.63	0.78	1.20	2.80
SD	14	0.84	0.47	1.10	1.60
	21	0.53	0.54	1.00	1.40
	28	0.54	0.43	1.00	2.10
SE	14	0.16	0.09	0.21	0.28
	21	0.10	0.11	0.19	0.25
	28	0.11	0.09	0.20	0.39
CV(%)	14	80	44	66	56
	21	94	79	77	56
	28	86	56	86	76
IV	14	0.07-3.60	0.30-2.10	0.12-5.30	0.18-7.30
	21	0.05-1.50	0.08-2.10	0.05-3.80	0.17-5.00
	28	0.04-1.60	0.10-1.50	0.07-5.30	0.17-8.20

Najviša srednja vrednost koncentracije progesterona u krvnom serumu je zabeležena 14. i 28. dana od estrusa kod krava ogledne grupe P (2.80 ± 1.60 i 2.80 ± 2.10 ng/mL). Najniže srednje vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu nakon estrusa su zabeležene kod krava kontrolne grupe, i to 21. i 28 dana nakon estrusa (0.56 ± 0.53 i 0.63 ± 0.54 ng/mL). Naviše apsolutne vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu su ustanovljene 28. dana kod krava iz ogledne grupe P (IV=0.17-8.20

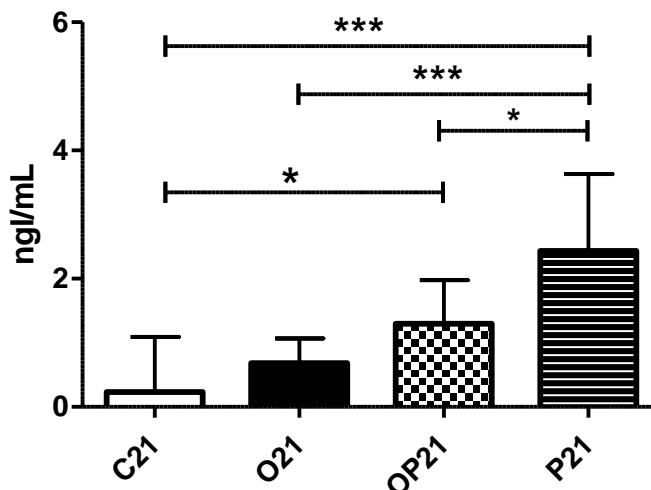
ng/mL), dok su najniže apsolutne vrednosti ustanovljene takođe 28 dana kod kontrolne grupe krava (IV=0.04-1.60 ng/mL).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije progesterona u krvnom serumu kod sve četiri ogledne grupe krava 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.2.



Grafikon 5.2. Vrednosti medijana i statistička značajnost razlika koncentracije progesterona u krvnom serumu (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod sve četiri ogledne grupe krava 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; *- $p < 0.05$, ***- $p < 0.001$.

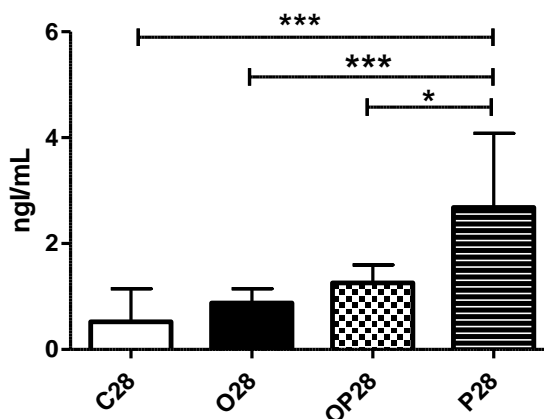
Podaci prikazani na grafikonu 5.2. ukazuju da je statistički značajno viša vrednost koncentracije progesterona ustanovljena kod krava ogledne grupe P u odnosu na krave ogledne grupe C i O (P:C i P:O; $p < 0.001$) kao i da je statistički značajno viša koncentracija ustanovljena kod ogledne grupe OP u odnosu na kontrolnu grupu krava (OP:C, $p < 0.05$). Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u krvnom serumu kod sve četiri ogledne grupe krava 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.3.



Grafikon 5.3. Vrednosti medijana i statistička značajnost razlika koncentracije progesterona u krvnom serumu (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod sve četiri ogledne grupe krava 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; *- p<0.05, ***- p<0.001.

Podaci prikazani na grafikonu 5.3. pokazuju da je koncentracija progesterona 21. dana od estrusa kod krava ogledne grupe P statistički značajno viša u odnosu na preostale tri ogledne grupe krava (P:C i P:O, p<0.001; P:OP, p<0.05). Istovremeno je ustanovljeno da je koncentracija progesterona kod krava ogledne grupe OP statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu krava (OP:C, p<0.05).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u krvnom serumu kod sve četiri ogledne grupe krava 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.4.



Grafikon 5.4. Vrednosti medijana i statistička značajnost razlika koncentracije progesterona u krvnom serumu (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod sve četiri ogledne grupe krava 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; *- p<0.05, ***- p<0.001.

Podaci prikazani na grafikonu 5.4. pokazuju da je koncentracija progesterona 28. dana od estrusa kod krava ogledne grupe P statistički značajno viša u odnosu na preostale tri ogledne grupe krava (P:C i P:O, $p < 0.001$; P:OP, $p < 0.05$).

5.2.3. Koncentracija progesterona u mleku nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja

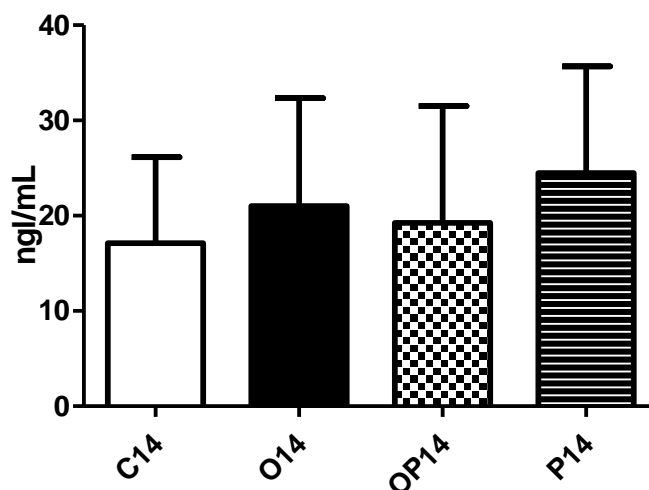
Srednje vrednosti koncentracije progesterona u mleku kod krava sve četiri ogledne grupe nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja i osnovne statističke mere varijacije prikazane su na tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Srednje vrednosti koncentracije progesterona u mleku (ng/mL) kod krava sve četiri nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja i osnovne statističke mere varijacije.

Statistički parametri	Dani nakon estrusa	Grupa (broj krava)			
		C (26)	O (26)	OP (28)	P (30)
\bar{x}	14	17.00	21.00	19.00	24.00
	21	7.80	13.00	16.00	18.00
	28	11.00	18.00	21.00	19.00
SD	14	9.0	11.0	12.0	11.0
	21	9.0	11.0	12.0	11.0
	28	7.9	12.0	14.0	12.0
SE	14	1.8	2.2	2.3	2.0
	21	1.8	2.1	2.6	1.9
	28	1.6	2.3	3.4	2.2
CV(%)	14	53	54	64	46
	21	115	83	83	59
	28	75	65	81	61
IV	14	1.30-34.00	3.30-50.00	1.20-49.00	5.80-45.00
	21	0.08-27.00	0.01-38.00	0.24-44.00	0.52-45.00
	28	0.03-27.00	0.42-42.00	0.33-49.00	0.35-36.00

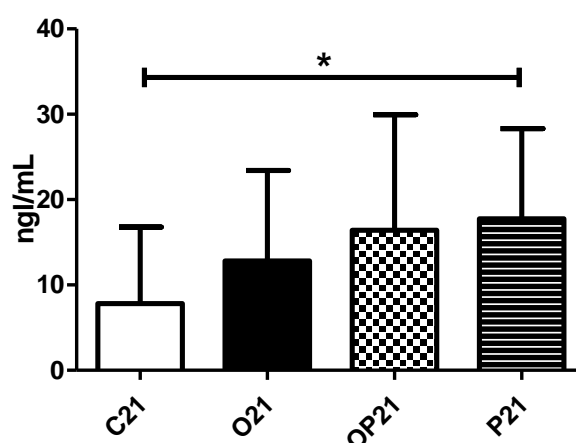
Podaci prikazani u tabeli 5.5. pokazuju da je najviša srednja vrednost koncentracije progesterona u mleku zabeležena 14.dana kod krava ogledne grupe P (24 ± 11 ng/mL). Najniža srednja vrednost koncentracije progesterona u mleku je zabeležena 21. dana kod krava kontrolne grupe (7.80 ± 9.0 ng/mL). Najviše apsolutne vrednosti koncentracije progesterona u mleku su zabeležene 14. dana kod krava ogledne grupe O (IV=3.30-50.00 ng/mL). Najveća vrednost koeficijenta varijacije za vrednosti koncentracije progesterona u mleku utvrđena je 21. dana za krave kontrolne grupe (115%), dok je najniža vrednost utvrđena 14. dana kod krava ogledne grupe P (46%)

Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u mleku kod sve četiri ogledne grupe krava 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.5.



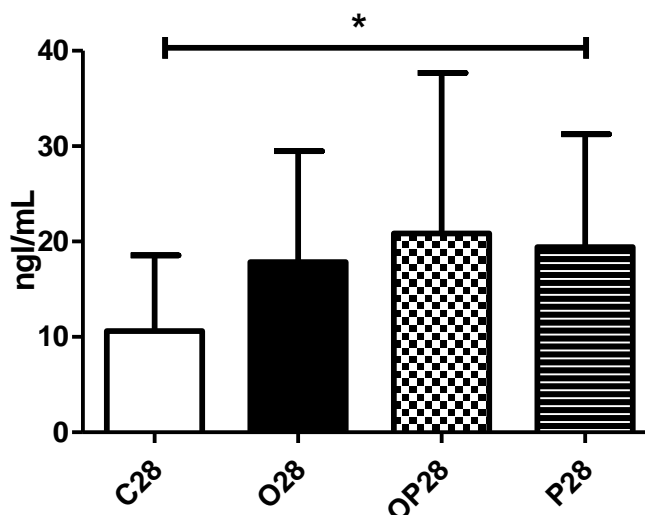
Grafikon 5.5. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u mleku (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod sve četiri ogledne grupe krava 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja.

Podaci prikazani na grafikonu 5.5. ukazuju da nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji progesterona 14. dana od estrusa između oglednih grupa krava. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u mleku kod sve četiri ogledne grupe krava 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.6.



Grafikon 5.6. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u mleku (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod sve četiri ogledne grupe krava 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; ; * - $p < 0.05$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.6. ukazuju da je koncentracija progesterona u mleku statistički značajno viša 21. dana kod krava ogleadne grupe P u odnosu na kontrolnu grupu krava (P:C, $p < 0.05$). Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u mleku kod sve četiri ogleadne grupe krava 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.7.

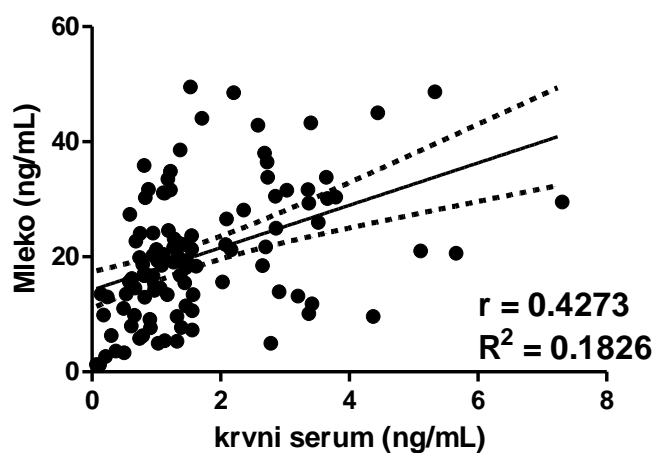


Grafikon 5.7. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona u mleku (\tilde{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod sve četiri ogleadne grupe krava 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; *- $p < 0.05$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.7. ukazuju da je koncentracija progesterona u mleku statistički značajno viša 28. dana kod krava ogleadne grupe P u odnosu na kontrolnu grupu krava (P:C, $p < 0.05$).

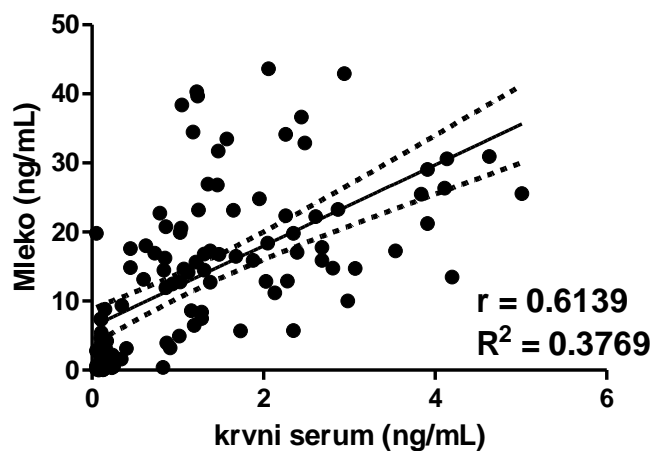
5.2.4. Korelacija koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja

Rezultati statističke analize stepena korelacije između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazani su na grafikonu 5.8.



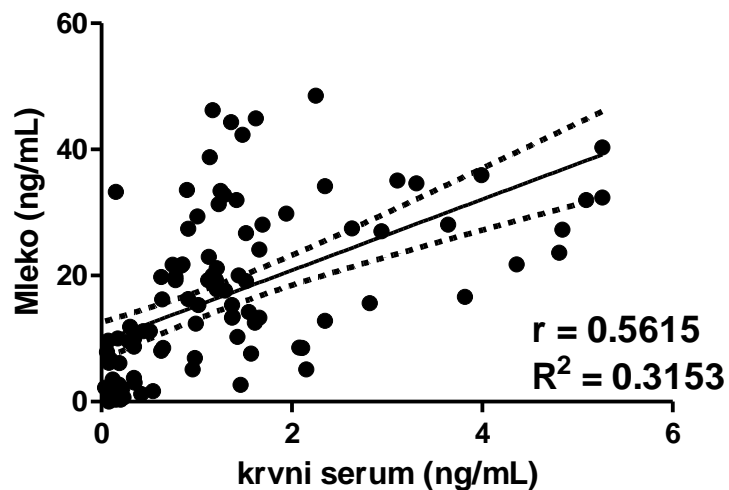
Grafikon 5.8. Korelacija između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja.

Podaci prikazani na grafikonu 5.8. pokazuju da je 14. dana od estrusa ustanovljena pozitivna linearna korelacija srednjeg stepena između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku ispitivanih životinja ($r=0.4273$). Rezultati statističke analize stepena korelacije između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazani su na grafikonu 5.9.



Grafikon 5.9. Korelacija između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja.

Podaci prikazani na grafikonu 5.9. pokazuju da je 21. dana od estrusa ustanovljena pozitivna linearna korelacija srednjeg stepena između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku ispitivanih životinja ($r=0.6139$). Rezultati statističke analize stepena korelacije između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazani su na grafikonu 5.10.



Grafikon 5.10. Korelacija između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja.

Podaci prikazani na grafikonu 5.10. pokazuju da je 28. dana od estrusa ustanovljena pozitivna linearna korelacija srednjeg stepena između koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku ispitivanih životinja ($r=0.5615$).

5.2.5. Koncentracija progesterona u krvnom serumu nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja kod steonih krava

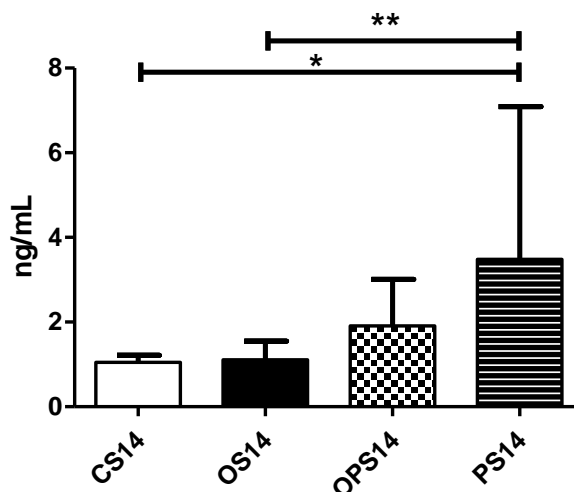
Srednje vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu kod steonih krava sve četiri ogledne grupe nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja i osnovne statističke mere varijacije prikazane su na tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Srednje vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu (ng/mL) kod steonih (S) krava sve četiri nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja i osnovne statističke mere varijacije.

Statistički parametri	Dani nakon estrusa	Grupa (broj krava)			
		CS (8)	OS (14)	OPS (16)	PS (19)
\bar{x}	14	1.05	1.11	1.92	3.49
	21	1.16	0.98	1.90	3.02
	28	1.15	1.08	1.77	3.64
SD	14	0.16	0.44	1.10	3.61
	21	0.21	0.39	0.76	1.00
	28	0.28	0.26	0.99	1.99
SE	14	0.06	0.12	0.28	0.83
	21	0.07	0.11	0.19	0.23
	28	0.09	0.07	0.25	0.46
CV(%)	14	15	40	57	103
	21	18	40	40	33
	28	24	24	56	55
IV	14	0.81-1.34	0.49-2.03	0.95-5.33	0.18-16.57
	21	0.86-1.46	0.45-2.05	1.03-3.84	1.88-5.01
	28	0.75-1.55	0.63-1.48	1.01-5.26	0.19-8.15

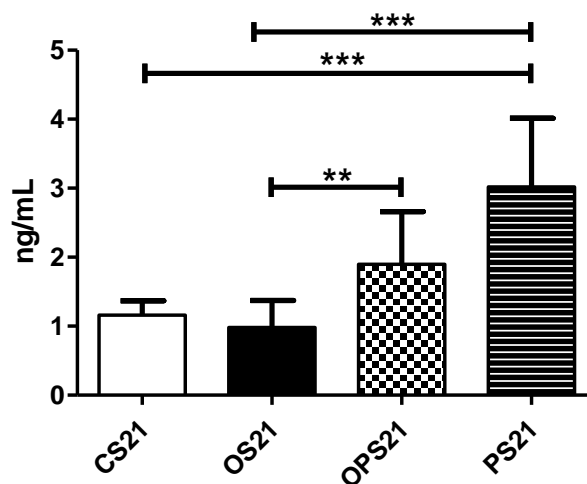
Podaci prikazani u tabeli 5.6. pokazuju da je najviša srednja vrednost koncentracije progesterona u krvnom serumu zabeležena 28. dana kod steonih krava ogledne grupe PS (3.64 ± 1.99 ng/mL). Najniža srednja vrednost koncentracije progesterona u krvnom serumu je zabeležena 21. dana kod steonih krava ogledne grupe OS (0.98 ± 0.39 ng/mL). Najviše apsolutne vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu su zabeležene 14. dana kod steonih krava ogledne grupe PS (IV=0.18-16.57 ng/mL). Najveća vrednost koeficijenta varijacije za vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu utvrđena je 14. dana za krave ogledne grupe PS (103%), dok je najniža vrednost utvrđena 14. dana kod krava kontrolne grupe (CS; 15%).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije progesterona u krvnom serumu kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.11.



Grafikon 5.11. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; *- p<0.05, ** - p<0.01.

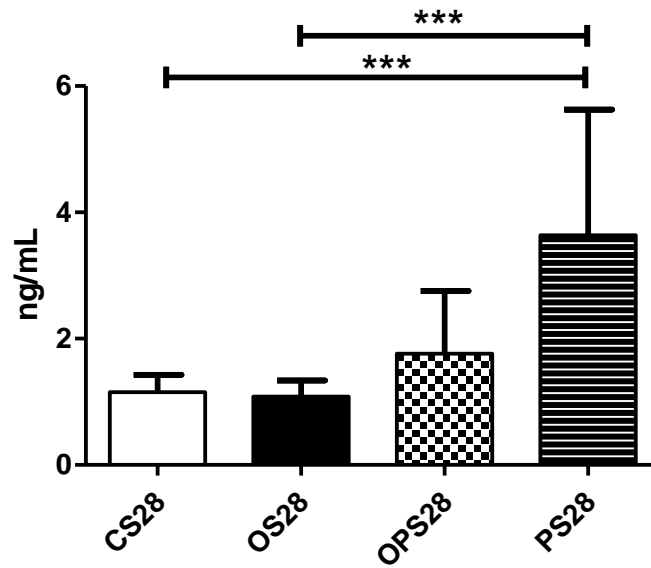
Podaci prikazani na grafikonu 5.11. ukazuju da je vrednost koncentracije progesterona utvrđena 14. dana kod steonih krava ogledne grupe PS statistički značajno viša u odnosu na ogledne grupe CS i OPS (PS:CS, p<0.01; PS:OPS, p<0.05). Rezultati koncentracije progesterona u krvnom serumu i statistička značajnost razlika vrednosti medijane kod steonih krava 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazani su na grafikonu 5.12.



Grafikon 5.12. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; **- $p < 0.01$, ***- $p < 0.001$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.12. pokazuju da je koncentracija progesterona u krvnom serumu steonih krava 21. dana grupe PS statistički značajno viša u odnosu na vrednosti utvrđene kod steonih krava oglednih grupa CS i OS (PS:CS i PS:OS, $p < 0.001$). Takođe se na grafikonu 5.12. može primetiti da je koncentracija progesterona kod steonih krava grupe OPS statistički značajno viša u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe krava (OPS:CS, $p < 0.01$).

Rezultati koncentracije progesterona u krvnom serumu i statistička značajnost razlika vrednosti medijane kod steonih krava 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazani su na grafikonu 5.13.



Grafikon 5.13. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; ***- p<0.001.

Podaci prikazani na grafikonu 5.13. pokazuju da je koncentracija progesterona u krvnom serumu steonih krava 28. dana grupe PS statistički značajno viša u odnosu na vrednosti utvrđene kod steonih krava oglednih grupa CS i OS (PS:CS i PS:OS, p<0.001).

5.2.6. Koncentracija progesterona u krvnom serumu nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja kod nesteonih krava

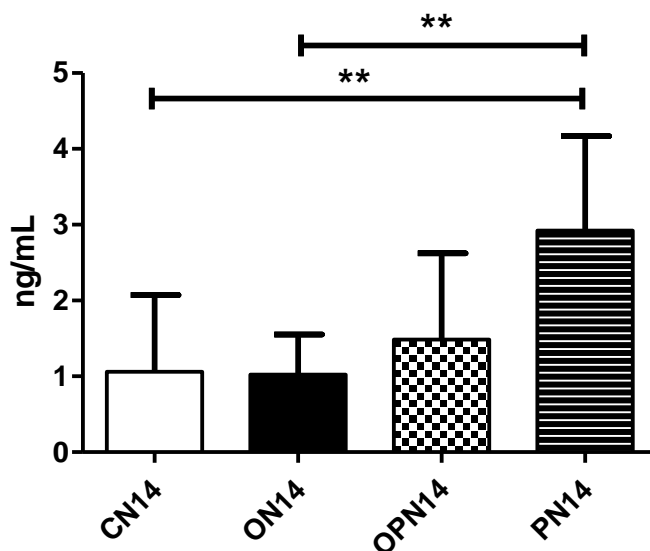
Srednje vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja i osnovne statističke mere varijacije prikazane su na tabeli 5.7.

Tabela 5.7. Srednje vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu (ng/mL) kod nesteonih krava sve četiri nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja i osnovne statističke mere varijacije.

Statistički parametri	Dani nakon estrusa	Grupa (broj krava)			
		CN (18)	ON (12)	OPN (12)	PN (11)
\bar{x}	14	1.06	1.03	1.49	2.92
	21	0.29	0.36	0.51	1.50
	28	0.40	0.43	0.46	1.37
SD	14	1.01	0.53	1.14	1.25
	21	0.38	0.51	0.68	1.45
	28	0.46	0.32	0.51	1.60
SE	14	0.24	0.15	0.33	0.38
	21	0.09	0.15	0.20	0.44
	28	0.11	0.09	0.15	0.48
CV(%)	14	95	51	77	43
	21	131	142	133	97
	28	115	74	111	117
IV	14	0.07-3.64	0.30-2.10	0.12-4.37	0.74-5.66
	21	0.05-1.31	0.08-1.65	0.05-2.35	0.17-4.11
	28	0.04-1.57	0.10-0.98	0.07-1.43	0.17-5.09

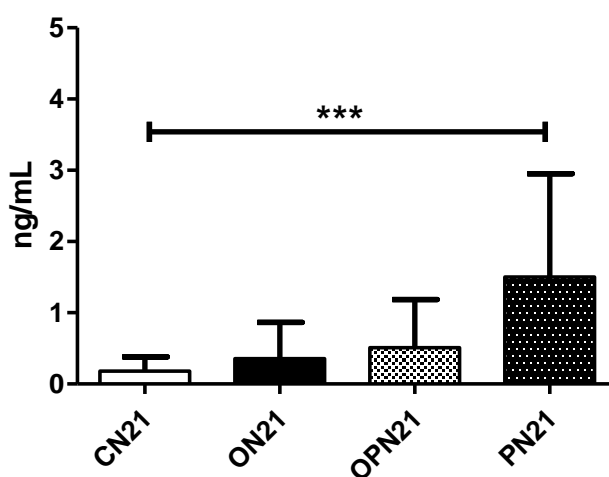
Podaci prikazani u tabeli 5.7. pokazuju da je najviša srednja vrednost koncentracije progesterona u krvnom serumu zabeležena 14. dana kod nesteonih krava ogledne grupe PN (2.92 ± 1.25 ng/mL). Najniža srednja vrednost koncentracije progesterona u krvnom serumu je zabeležena 21. dana kod nesteonih krava kontrolne grupe (CN; 0.29 ± 0.38 ng/mL). Najviše apsolutne vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu su zabeležene 14. dana kod nesteonih krava ogledne grupe PN (IV=0.74-5.66ng/mL). Najveća vrednost koeficijenta varijacije za vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu utvrđena je 21. dana za krave ogledne grupe ON (142%), dok je najniža vrednost utvrđena 14. dana kod krava ogledne grupe PN (43%).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije progesterona u krvnom serumu kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazane su na grafikonu 5.14.



Grafikon 5.14. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe 14. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; **- $p < 0.01$.

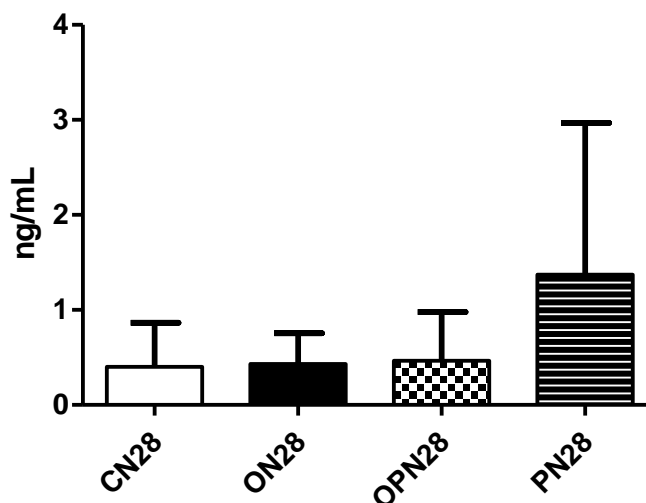
Podaci prikazani na grafikonu 5.14. ukazuju da je vrednost koncentracije progesterona utvrđena 14. dana kod nesteonih krava ogledne grupe PN statistički značajno viša u odnosu na ogledne grupe CN i ON (PN:CN i PN:ON, $p < 0.01$). Rezultati koncentracije progesterona u krvnom serumu i statistička značajnost razlika vrednosti medijane kod nesteonih krava 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazani su na grafikonu 5.15.



Grafikon 5.15. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja; ***- $p < 0.001$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.15. ukazuju da je vrednost koncentracije progesterona utvrđena 21. dana kod nesteonih krava ogleadne grupe PN statistički značajno viša u odnosu na krave kontrolne grupe (PN:CN, $p < 0.001$).

Rezultati koncentracije progesterona u krvnom serumu i statistička značajnost razlika vrednosti medijane kod nesteonih krava 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja prikazani su na grafikonu 5.16.



Grafikon 5.16. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije progesterona (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod nesteonih krava sve četiri ogleadne grupe 28. dana nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja.

Podaci prikazani na grafikonu 5.16. ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika vrednosti koncentracije progesterona utvrđena 28. dana kod nesteonih krava u sve četiri ogleadne grupe.

5.3. Koncentracija estradiola

5.3.1. Koncentracija estradiola u krvnom serumu svih oglednih grupa krava

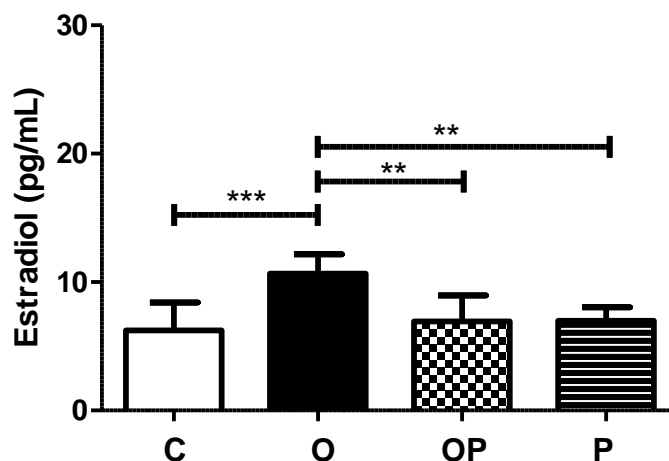
Srednje vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu kod krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije prikazane su na tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Srednje vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu (ng/mL) kod krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije.

Statistički parametri	Dani	Grupa (broj krava)			
		C (26)	O (26)	OP (28)	P (30)
\bar{x}	0	6.90	10.68	8.35	7.03
	21	8.11	11.17	9.74	6.88
SD	0	2.60	3.20	4.00	1.55
	21	3.47	3.07	5.07	1.88
SE	0	0.51	0.63	0.76	0.33
	21	0.68	0.60	0.97	0.40
CV(%)	0	38	30	48	22
	21	43	27	52	27
IV	0	4.00-13.71	6.43-19.83	4.18-20.33	4.41-10.31
	21	4.54-17.76	5.89-15.62	1.85-21.26	4.44-11.99

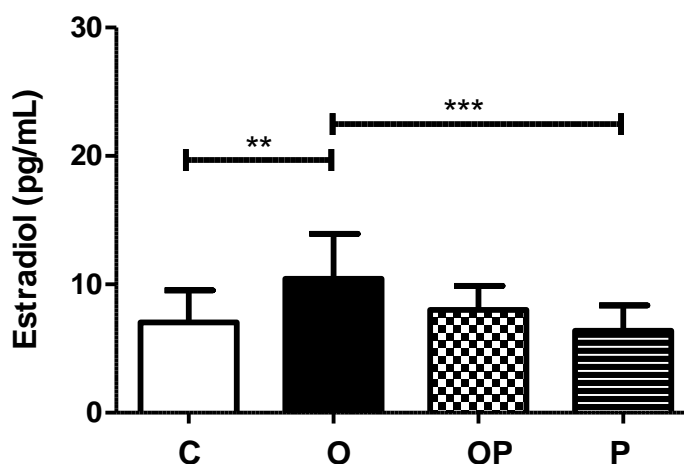
Podaci prikazani u tabeli 5.8. pokazuju da je najviša srednja vrednost koncentracije estradiola u krvnom serumu zabeležena 21. dana kod krava ogledne grupe O (11.17 ± 3.07 ng/mL). Najniža srednja vrednost koncentracije estradiola u krvnom serumu je zabeležena 0. dana kod krava kontrolne grupe (C; 6.90 ± 2.60 ng/mL). Najviše apsolutne vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu su zabeležene 21. dana kod krava ogledne grupe OP ($IV=1.85-21.26$ ng/mL). Najveća vrednost koeficijenta varijacije za vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu utvrđena je 21. dana za krave ogledne grupe OP (52%), dok je najniža vrednost utvrđena 0. dana kod krava ogledne grupe OP (22%).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu kod sve četiri ogledne grupe krava 0. dana prikazane su na grafikonu 5.17.



Grafikon 5.17. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije estradiola (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod krava sve četiri ogledne grupe 0.dana ispitivanja; **- $p < 0.01$, ***- $p < 0.001$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.17. ukazuju da je vrednost koncentracije estradiola utvrđena 0. dana kod krava ogledne grupe O statistički značajno viša u odnosu na vrednosti koncentracije estradiola kod krava sve tri preostale ogledne grupe (O:C, $p < 0.001$; O:OP i O:P, $p < 0.01$). Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu kod sve četiri ogledne grupe krava 21. dana ispitivanja prikazane su na grafikonu 5.18.



Grafikon 5.18. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije estradiola (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod krava sve četiri ogledne grupe 21. dana ispitivanja; **- $p < 0.01$, ***- $p < 0.001$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.18. ukazuju da je vrednost koncentracije estradiola utvrđena 21. dana kod krava ogledne grupe O statistički značajno viša u odnosu na

vrednosti koncentracije estradiola kod krava oglednih grupa C i P (O:C, $p<0.01$; O:P, $p<0.001$).

5.3.2. Koncentracija estradiola u krvnom serumu steonih krava

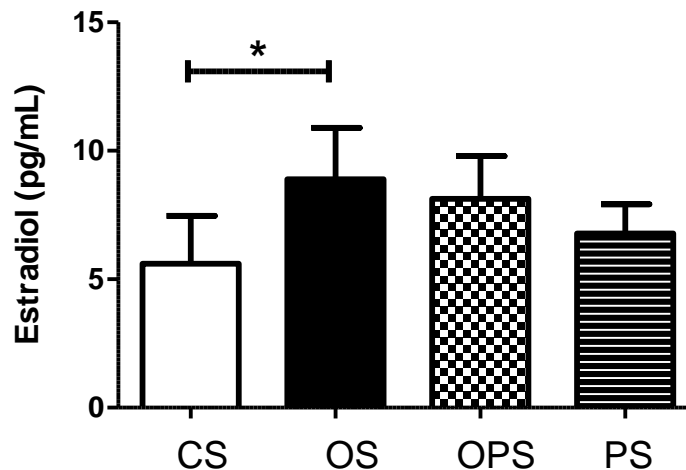
Srednje vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu kod steonih krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije prikazane su na tabeli 5.9.

Tabela 5.9. Srednje vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu (ng/mL) kod steonih krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije.

Statistički parametri	Dani	Grupa (broj krava)			
		CS (8)	OS (14)	OPS (16)	PS (19)
\bar{x}	0	6.44	9.64	8.90	6.86
	21	7.71	11.25	9.91	6.71
SD	0	2.32	2.91	4.24	1.47
	21	3.00	3.23	5.33	1.59
SE	0	0.82	0.77	1.06	0.37
	21	1.06	0.86	1.33	0.41
CV (%)	0	36	30	48	21
	21	39	29	54	24
IV	0	4.39-11.41	6.43-17.54	4.17-20.33	4.73-9.45
	21	5.04-12.29	5.89-15.34	1.85-21.26	4.44-9.59

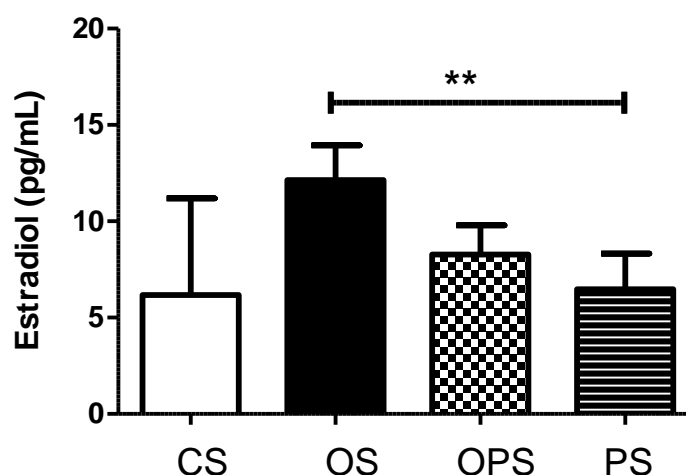
Podaci prikazani u tabeli 5.9. pokazuju da je najviša srednja vrednost koncentracije estradiola u krvnom serumu zabeležena 21. dana kod steonih krava ogledne grupe OS (11.25 ± 3.23 ng/mL). Najniža srednja vrednost koncentracije estradiola u krvnom serumu je zabeležena 0. dana kod steonih krava kontrolne grupe (CS; 6.44 ± 2.32 ng/mL). Najviše apsolutne vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu su zabeležene 21. dana kod steonih krava ogledne grupe OPS (IV=1.85-21.26 ng/mL). Najveća vrednost koeficijenta varijacije za vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu utvrđena je 21. dana za steonih krava ogledne grupe OPS (54%), dok je najniža vrednost utvrđena 0. dana kod steonih krava ogledne grupe PS (21%).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 0. dana prikazane su na grafikonu 5.19.



Grafikon 5.19. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije estradiola (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 0. dana ispitivanja; *- $p < 0.05$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.19. ukazuju da je vrednost koncentracije estradiola utvrđena 0. dana kod steonih krava ogledne grupe OS statistički značajno viša u odnosu na vrednosti medijane koncentracije estradiola kod krava ogledne grupe CS (OS:CS, $p < 0.05$). Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana prikazane su na grafikonu 5.20.



Grafikon 5.20. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije estradiola (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod steonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana ispitivanja; **- $p < 0.01$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.20. ukazuju da je vrednost koncentracije estradiola utvrđena 21. dana kod steonih krava ogledne grupe OS statistički značajno viša u odnosu na vrednosti medijane koncentracije estradiola kod krava ogledne grupe PS (OS:PS, $p < 0.01$).

5.3.3. Koncentracija estradiola u krvnom serumu nesteonih krava

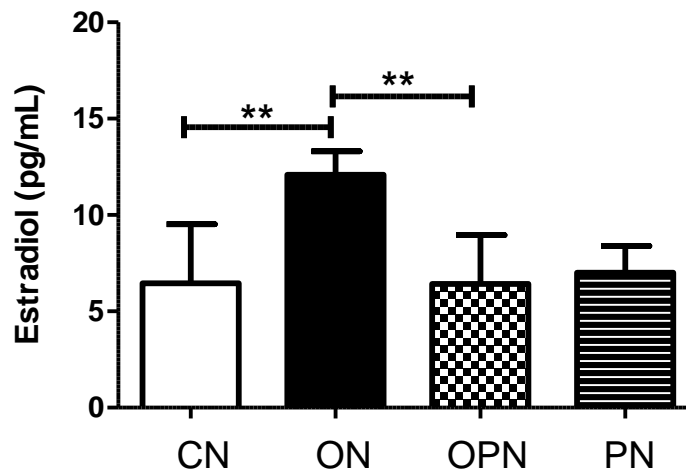
Srednje vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije prikazane su na tabeli 5.10.

Tabela 5.10. Srednje vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu (ng/mL) kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe i osnovne statističke mere varijacije.

Statistički parametri	Dani	Grupa (broj krava)			
		CN (18)	ON (12)	OPN (12)	PN (11)
\bar{x}	0	7.64	11.9	7.57	7.35
	21	8.29	11.1	9.49	7.21
SD	0	2.67	3.21	3.55	1.78
	21	3.74	3.01	4.90	2.50
SE	0	0.63	0.93	1.07	0.67
	21	0.88	0.87	1.48	0.95
CV(%)	0	35	27	47	24
	21	45	27	52	35
IV	0	4.01-12.30	8.10-19.80	4.39-17.10	4.41-10.30
	21	4.54-17.80	7.90-15.60	5.53-21.20	4.69-12.00

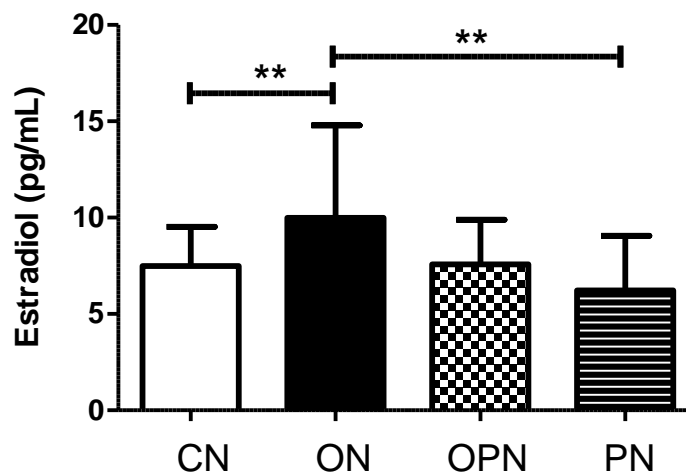
Podaci prikazani u tabeli 5.10. pokazuju da je najviša srednja vrednost koncentracije estradiola u krvnom serumu zabeležena 0. dana kod nesteonih krava ogledne grupe ON (11.9 ± 3.21 ng/mL). Najniža srednja vrednost koncentracije estradiola u krvnom serumu je zabeležena 21. dana kod nesteonih krava ogledne grupe PN (7.21 ± 2.50 ng/mL). Najviše apsolutne vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu su zabeležene 21. dana kod nesteonih krava ogledne grupe OPN (IV=5.53-21.20ng/mL). Najveća vrednost koeficijenta varijacije za vrednosti koncentracije estradiola u krvnom serumu utvrđena je 21. dana kod nesteonih krava ogledne grupe OPN (52%), dok je najniža vrednost utvrđena 0. dana kod steonih krava ogledne grupe PN (24%).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe 0. dana prikazane su na grafikonu 5.21.



Grafikon 5.21. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije estradiola (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe 0. dana ispitivanja; **- $p < 0.01$.

Podaci prikazani na grafikonu 21. ukazuju da je vrednost koncentracije estradiola utvrđena 0. dana kod nesteonih krava ogledne grupe ON statistički značajno viša u odnosu na vrednosti medijane koncentracije estradiola kod nesteonih krava ogledne grupe CN i OPN (ON:CN i ON:OPN, $p < 0.01$). Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana prikazane su na grafikonu 5.22.

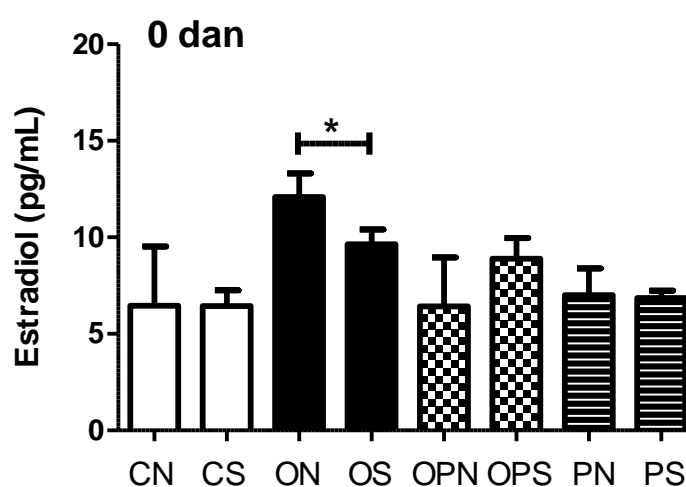


Grafikon 5.22. Statistička značajnost razlika vrednosti medijane koncentracije estradiola (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) kod nesteonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana ispitivanja; **- $p < 0.01$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.22. ukazuju da je vrednost koncentracije estradiola utvrđena 21. dana kod nesteonih krava ogledne grupe ON statistički značajno viša u odnosu na vrednosti medijane koncentracije estradiola kod nesteonih krava ogledne grupe CN i PN (ON:CN i ON:PN, $p < 0.01$).

5.3.4. Koncentracija estradiola u krvnom serumu nesteonih i steonih krava

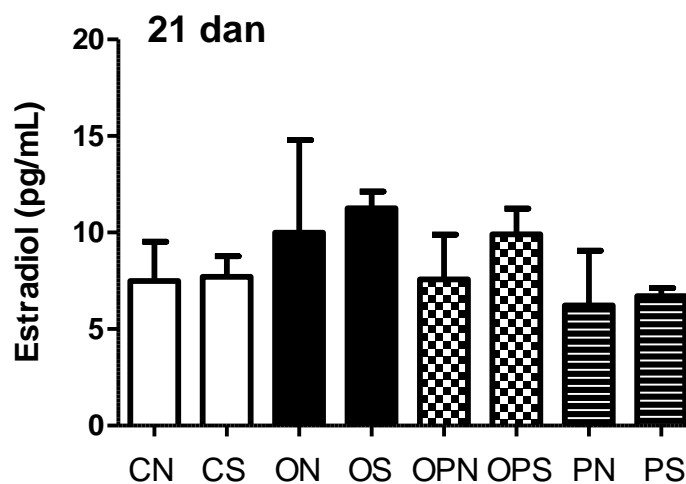
Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu nesteonih i steonih krava sve četiri ogledne grupe 0. dana prikazane su na grafikonu 5.23.



Grafikon 5.23. Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) nesteonih i steonih krava sve četiri ogledne grupe 0. dana ispitivanja; *- $p < 0.05$.

Podaci prikazani na grafikonu 5.23. ukazuju da je vrednost koncentracije estradiola utvrđena 0. dana kod nesteonih krava ogledne grupe ON statistički značajno viša u odnosu na vrednosti medijane koncentracije estradiola kod steonih krava iste ogledne grupe (ON:OS, $p < 0.05$).

Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu nesteonih i steonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana prikazane su na grafikonu 5.24.



Grafikon 5.24. Statistička značajnost razlika vrednosti medijana koncentracije estradiola u krvnom serumu (\bar{X} +interkvartilna razlika, ng/mL) nesteonih i steonih krava sve četiri ogledne grupe 21. dana ispitivanja.

Podaci prikazani na grafikonu 5.24. ukazuju da se vrednost koncentracije estradiola utvrđene 21. dana kod nesteonih i steonih krava unutar svake ogledne grupe nisu statistički značajno razlikovale.

6. DISKUSIJA

6.1. Uticaj tretmana na steonost krava

Rezultati naših ispitivanja pokazali su da tretman koji uključuje korišćenje hCG dovodi do statistički značajnog povišenja procenta gravidnih krava u odnosu na kontrolnu grupu životinja (63%: 31%, P:C, $p < 0.05$). Ovaj rezultat ukazuje da jedan od mogućih razloga za izostanak uspešne gestacije kod krava Simentalske rase može biti nedovoljno lučenje progesterona od strane žutog tela tokom rane faze embrionalnog razvoja. Tako su King i sar., (2013) ustanovili da povišena koncentracija progesterona kod junica između 4-6 dana nakon osemenjavanja može imati pozitivan efekat na procenat uspešne koncepcije nakon prvog veštačkog osemenjavanja. Rezultati njihovih istraživanja ukazali su da postoji statistički značajno veći procenat gravidnih junica ako je koncentracija progesterona ≥ 2 ng/mL (PR=56-73%), u odnosu na junice čija je koncentracija progesterona bila između 0-2 ng/mL (PR=43%). Međutim, zanimljivo je da u njihovom ogledu kod junica kod kojih je sproveden tretman sa hCG-om i kod kojih je nivo progesterona bio preko >2 ng/mL nije ustanovljen povišen procenat gravidnih životinja već je on, štaviše, bio niži u odnosu kontrolnu grupu junica (51% vs. 64%; King i sar., 2013). Očigledno je da na procenat steonosti može da utiče veliki broj faktora, pa tako King i sar., (2013) navode mogući uticaj starosti, kvaliteta semena i prisustva funkcionalnog žutog tela. U našem protokolu za izvođenje oglada mi smo pokušali da što je više moguće isključimo uticaj faktora poput neadekvatne detekcije estrusa, izostanka pojave funkcionalnog žutog tela i grešaka u pogledu vremena VO. Naši rezultati ukazuju da tretman hCG-om sproveden 7-og dana nakon VO može imati pozitivan efekat na procenat steonosti kod krava Simentalske rase.

6.2. Koncentracija progesterona i detekcija estrusa

Praćenje koncentracije P4 u krvi ili mleku može biti korisna metoda za određivanje tačnosti metode otkrivanja estrusa na farmama mlečnih krava, budući da je nekoliko istraživanja pokazalo da u više od 50% svih perioda estrusa ne postoji izražen refleks stajanja (Heres i sar., 2000; Roelofs i sar., 2005). Tako se zbog grešaka u otkrivanju estrusa može čak do 20% krava osemeniti tokom lutealne faze estrusnog ciklusa (Szenci i sar., 2013), što direktno ukazuje da je identifikovanje muznih krava koje su u lutealnoj fazi

estrusnog ciklusa merenjem koncentracije progesterona pre nego što se sprovede VO od velikog značaja (Szenci i sar., 2010). Međutim, oslanjanje jedino na nisku koncentraciju progesterona ne znači nužno da je krava u estrusu. Rektalna palpacija kod krava tokom estrusa treba da potvrdi prisustvo tvrde, uvijene materice, i treba da postoji i vaginalni iscedak sa bistrom sluzi (Arthur i sar., 1996). Koristeći koncentraciju P4 u krvnom serumu i/ili punom mleku iznad graničnih vrednosti, dobili smo u našim istraživanjima 2-10% ukupne netačnosti u detekciji estrusa tokom eksperimenta (serum: 2%; mleko, 10%; tabela 5.2), što predstavlja podatak na granici za prihvatljiv nivo grešaka u otkrivanju estrusa. Tačnost dijagnostike estrusa pomoću određivanja nivoa progesterona u mleku može biti čak 96% (Shemesh i sar., 1978), ali treba imati na umu da postoje velike individualne varijacije u vremenu smanjenja koncentracije P4 u odnosu na ovulaciju (Roelofs i sar., 2006). Sa razvojem automatizovanih mernih sistema u realnom vremenu za praćenje koncentracija progesterona na dnevnoj bazi u postrojenjima za mužu (Delviche i sar., 2001; Kappel i sar., 2007), moguće je napraviti preciznu kontrolu mlečnih krava u estrusu na bazi refleksa stajanja i dijagnostikovati supfertilne krave nakon partusa (Szenci i sar., 2013).

Procena tačnosti detekcije estrusa je važan parametar upravljanja reprodukcijom na farmi mlečnih krava. Podaci o greškama u detekciji estrusa u SAD-u pokazuju da u velikom broju stada procenat grešaka može biti 10%, dok u nekim stadima taj broj dostiže i do 60% (O'Connor, 2014). To jednostavno znači da su krave osemenjene kada su koncentracije progesterona visoke. Postoji nekoliko situacija kada je informacija o nivou progesterona u mleku ili krvi važna za donošenje ispravnih odluka u vezi sa pojedinačnim životinjama ili upravljanjem reprodukcijom celokupnog stada. Osnovna ideja je da se proceni uspeh detekcije estrusa i u tu svrsu potrebno je da ispita 15-20 krava na dan osemenjavanja. Prema navodu Roelofs i sar., (2010) ako više od 5% uzoraka ima visok progesteron, greška detekcije grejanja je previsoka. Veći broj istraživanja je pokazalo da 5-30% osemenjenih životinja nije stvarno u estrusu (Nebel i sar., 1987; Sturman i sar., 2000; Cavestani i sar., 1985; Reimers i sar., 1985; Heersche i sar., 1994). Takođe postoji mogućnost da gravidne krave pokazuju znakove estrusa, a procenat takvih životinja može biti oko 6% (Erb i sar., 1958; Williamson i sar., 1972). Naši rezultati predstavljeni u tabeli 5.2 i 5.3. ukazuju da 2-10% mlečnih krava mogu biti osemenjene u vreme kada je koncentracija progesterona relativno visoka.

Distribucija individualnih vrednosti koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku tokom estrusa kod gravidnih i negravidnih životinja svih eksperimentalnih grupa

prikazana je na grafikonu 5.1. Nizak nivo koncentracije progesterona u mleku ili krvnoj plazmi korišćen je za potvrdu estrusa od strane mnogih autora (Plotka i sar., 1967; King i sar., 1976; Valton i sar., 1986). Praćenjem vremenskih intervala od početka smanjenja progesterona u mleku ili krvnoj plazmi do ovulacije Roelofs i sar. (2010) su koristili <2 ng/mL za prag progesterona i našli da je vreme do ovulacije između 70-75 sati. Ovaj prag nivoa progesterona u mleku i plazmi je mnogo veći u odnosu na nivoe koji se koriste za tačnu detekciju estrusa u našoj studiji. Međutim, maksimalne koncentracije progesterona kod estrusa mogu biti mnogo niže i varirati u zavisnosti od broja ciklusa nakon partusa (Rajamahendran i sar., 1990). Nivo progesterona može biti viši u drugom ciklusu u odnosu na prvi (3.1 ± 1.2 prema 4.7 ± 0.8 ng/mL, srednja vrednost \pm SD, prvi u odnosu na drugi ciklus, Rajamahendran i sar., 1990). Osim toga, koncentracije progesterona u mleku mogu biti niže od 1 ng/mL na -2 do +5 dana oko estrusa (dan 0) (King i sar., 1976; Valton i sar., 1986). U našem prethodnom istraživanju pokazali smo da 22,3% problematičnih krava u estrusu ima koncentraciju progesterona u mlijevu iznad 2 ng/mL (Gvozdić i sar., 2013). Međutim, u istoj studiji znatno manji procenat eksperimentalnih životinja na dan estrusa (5,6%) imao je progesteron u mleku iznad vrednosti za netačnu detekciju estrusa (> 4 ng / mL). Naši dosadašnji rezultati pokazuju da bi pogrešna detekcija estrusa mogla biti važan uzrok smanjenja efikasnosti reprodukcije, doprinoseći ukupnoj stopi neuspelih gestacija. Otkrili smo relativno visok procenat neispravne detekcije estrusa koristeći suprabazalne i povišene nivoe progesterona u mleku (10%) i nizak procenat krava sa visokom koncentracijom progesterona u krvi (2%). Ovi podaci ukazuju na najmanje dve važne stavke: 1) procenat pogrešne detekcije estrusa na našim farmama mogao bi biti iznad 5%, i 2) životinje osemenjene estrusom sa suprabazalnom koncentracijom progesterona u mleku (2-3.99 ng/mL) treba pažljivo posmatrati 19-22 dana nakon VO radi ponovne detekcije mogućeg estrusa.

6.3. Koncentracija progesterona u krvnom serumu i mleku posle estrusa

Ideja da sekrecija P4 iz lutealnog tkiva kod visoko mlečnih krava može biti nedovoljna da uspešno podrži rani graviditet nije nova i ovaj potencijalni problem je bio predmet većeg broja studija (Rizos i sar., 2012; Binversie i sar., 2012; Nascimento i sar., 2013). Međutim, postoji nedostatak informacija o koncentracijama progesterona u krvnom serumu i mleku tokom estrusnog ciklusa mliječnih krava simentalske rase i njegove uloge u ranom graviditetu, posebno nakon sinhronizacije estrusa. Nadalje, postoji ponovno

interesovanje za upotrebu hCG u protokolima sinhronizacije estrusa, sa inkorporacijom hCG u modifikovani dvostruki Ovsinch protokol (Binversie i sar., 2012).

Posle meta-analize 17 radova Mann i sar. (1999) su zaključili da je suplementacija P4 tokom prve sedmice graviditeta rezultirala povećanjem procenta steonosti (PR), dok tretman u drugoj i trećoj sedmici graviditeta nema efekta na PR. Koncentracija progesterona na dan 5 nakon estrusa je pozitivno povezana sa embrionalnim razvojem (Green i sar., 2005). Ovi nalazi sugerišu da suplementacija progesterona između 5-9 dana nakon VO ima pozitivniji efekat na materinsko prepoznavanje graviditeta u odnosu na tretmane u kasnijem periodu (Mann i sar., 2006). Postoji nekoliko metoda za suplementaciju progesterona tokom ranog graviditeta kod mlečnih krava, a tretman sa hCG je posebno interesantan (Szenci, 2016). Nekoliko autora je prijavilo povećanje koncentracija endogenog progesterona nakon tretmana hCG-om (Schmitt i sar., 1996; Santos i sar., 2001; Stevenson i sar., 2007 i 2012). Postoji i nekoliko izveštaja o pozitivnom efektu hCG tretmana na stopu koncepcije (Bruel i sar., 1989; Rajamahendran i sar., 1992). Međutim, Stevenson i sar. (2007) nisu naišli na pozitivan efekat hCG tretmana na ishod gestacije kod prvog osemenjavanja, a nekoliko prethodnih izveštaja je takođe potvrdilo ovaj zaključak (Valton i sar., 1990; Hanlon i sar., 2005). Naš dosadašnji rad pokazao je da bi tretman hCG-om kod krava sa reproduktivnim problemima u srednjoj lutealnoj fazi mogao povećati koncentraciju progesterona u plazmi i poboljšati efikasnost reprodukcije (Gvozdić i sar., 2013). Ova razlika u rezultatima istraživanja o efektima hCG tretmana na stepen koncepcije dovela nas je do ponovnog razmatranja ovog problema, posebno u situaciji da je simentalaska rasa najčešća na malim mlečnim farmama u ruralnim delovima Srbije. Osim toga, mnogi veterinari na terenu ili farmi koriste jednostavni protokol za sinhronizaciju estrusa zasnovan na jednoj injekciji PGF2a kod životinja sa palpabilnim CL (sa evidencijom o izostanku prethodnih VO), očekujući estrus praćen uspešnom gestacijom nakon osemenjavanja.

Naši rezultati koncentracije progesterona u krvnom serumu su niži u odnosu na nivo koji je pronađen kod Holštajn životinja stimulisanih hCG-om (Stevenson i sar., 2012), ali su uporedive sa nalazima nivoa progesterona kod Holštajn-Frizijskih mlečnih krava koje su podvrgnute Ovsinch tretmanu (Vuković i sar. 2016). Stevenson i sar. (2012) izvestili su da tretman hCG-om (1000 IU) sedam dana nakon VO indukuje nove lutealne strukture u oko 70% tretiranih životinja i povećava nivo progesterona u krvi. Naši rezultati takođe ukazuju na povećanu aktivnost lutealnog tkiva kod životinja tretiranih sa hCG-om (tabela 5.4-5.5; grafikon 5.2-5.7), ali je nivo progesterona bio niži u poređenju sa

životinjama koje su tretirane sa hCG-om koje su prijavili Stevenson i sar. (2012), uprkos činjenici da smo koristili 1500 IU hCG. Ova razlika može poticati u metodologiji za određivanje progesterona (razlike u RIA testu i proceduri), ili razlika u prirodnoj proizvodnji progesterona i njegovom nivou u krvnom serumu kod krava simentalske rase. Pošto je naše određivanje koncentracije P4 u krvnom serumu kod Holštajn-Frizijskih krava (Vuković i sar., 2016) sprovedeno koristeći istu metodologiju (RIA test), dalo rezultate uporedive sa sadašnjim nalazima, razliku koju su objavili Stevenson i sar. (2012) verovatno potiče iz metodologije RIA procedure. Nadalje, Valton i dr. (1989) su našli nivoe progesterona kod krava rase Holštajn koje su tretirane hCG-om sličnije našim. Međutim, i pored moguće razlike u nivou progesterona koja potiče od metodologiji njegovog određivanja, u našim rezultatima pokazali smo jasno statistički značajno višu koncentraciju progesterona u krvnom serumu životinja koje su tretiran hCG-om nakon osemenjavanja.

6.4. Korelacija koncentracije progesterona u krvnom serumu i mleku

Koncentracija progesterona u serumu i mleku u našem eksperimentu pokazala je relativno nisku korelaciju na dan 14 ($r = 0.4273$, graf.5.8), sa mnogo većom korelacijom u kasnijim danima ispitivanja ($r = 0.6139$ i $r = 0.5165$, 21 i 28 dana, graf.5.9-10). Pažljivim odabirom i manjim brojem eksperimentalnih životinja moguće je postići viši nivo korelacije između vrednosti progesterona krvi i mleka, jer su Dobson i sar. (1975) dobili koeficijent regresije od $r = 0,88$ sa samo 4 eksperimentalne životinje. Štaviše, isti autor je izvestio da je jedna od eksperimentalnih životinja imala visoku koncentraciju P4 mleka na dan estrusa, što se nije odrazilo na odgovarajući uzorak plazme. Testiranje odmah po uzorkovanju (tzv. "on-site" ili "side-cow" testovi) verovatno daje bolju korelaciju zbog toga što se uzorak mleka testira na progesteron neposredno nakon uzimanja, čime se izbegavaju transport i konzerviranje uzoraka. Sa tim se takođe izbegava negativan uticaj separacije mlečne masti i sličnih posledica zbog odlaganja analize uzoraka, a koji mogu imati uticaj na kvantifikovanje progesterona u uzorku. Poređenje dva tipa enzimoimunoeseja (enzim sa čvrstom fazom EIA - SDEIA i Direct EIA - DEIA) i radioimunoeseja (RIA) za merenje koncentracija progesterona u goveđoj plazmi, obranom mleku i punom mleku Colazo i sar. (2008) su dobili značajnu korelaciju između RIA i SPEIA ($r = 0,60$, $p < 001$) za uzorke za koje se očekuje da imaju visoku koncentraciju progesterona, što je usporedivo s našim rezultatima za 21 dan nakon VO. Međutim, u istraživanju Colazo i sar.

(2008) je bilo i relativno mali broj životinja, tj. samo 6 krava u diestrusu i 6 krava u estrusu. Imajući u vidu da je ukupan broj eksperimentalnih životinja u našoj studiji bio 110, i da je naše istraživanje sprovedeno na terenu, naš je mišljenje da smo dobili dobru korelaciju između dve metode određivanja P4 koje smo koristili u našem istraživanju.

6.5. Koncentracija progesterona i dijagnostika graviditeta

Određivanje koncentracije progesterona u plazmi ili mleku može da dostigne tačnost između 75% do 85% u identifikaciji gravidnih krava (Arthur i sar., 1996), sa gotovo 100% tačnosti u identifikaciji negravidnih krava (Ioungkuist, 1997). Upoređivanjem osam različitih komercijalnih progesteronskih test kitova na farmi Nebel i sar. (1989) su izvestili da je osjetljivost testova između 75% - 86%, dok se specifičnost testova kretala između 89% - 99%, respektivno. Za razliku od ovih nalaza, Pieterse i sar. (1990) je ukazao na relativno visoku tačnosti (osetljivost, 93.1%) za dijagnostikovanje gravidnih krava, i veoma nisku tačnost (specifičnost, 39.3%) za dijagnostikovanje negravidnih primenom test paketa za određivanje progesterona u mleku Ovucheck EIA.

Relativno skoro poređenje četiri test sistema za određivanje nivoa progesterona u mleku (Karen at al., 2012) je ukazalo na činjenicu da se relativno visoka osetljivost može dobiti korišćenjem različitih testova (79.2% - 100%). Međutim, postojala je i niska specifičnost različitih sistema za testiranje progesterona u mleku (46.3% - 66.6%). Koristeći Ovucheck® Milk progesteron test u ranoj dijagnozi graviditeta, takođe smo dobili vrlo visoku osetljivost i relativno nisku specifičnost testa za mleko (100% i 63%, Se i Sp, Gvozdić i sar., 2011). Specifičnost Ovucheck® Milk progesteron testa za ranu dijagnozu graviditeta je takođe bila relativno niska (63%), kao i prediktivna vrednost pozitivnih dijagnoza (53%), jer veliki broj muznih krava koje su identifikovane kao steone 21 dana posle VO nisu potvrđeni 35. dana (Gvozdić i sar., 2011). Na rezultate testa određivanja progesterona u mleku u ranoj dijagnozi graviditeta može uticati koncentracija masti u mleku ili interakcija mlečne masti i dana estrusnog ciklusa (Szenci i sar., 2013).

6.6. Koncentracija estradiola u krvnom serumu

Estrogeni imaju ključnu ulogu u endokrinoj regulaciji estrusa i promenama ponašanja kod krava u toku estrusa. Estradiol-17 β (E2) ima ulogu da indukuje pojavu preovulatornog maksimuma sekrecije LH (tzv. „pik“ LH) po principu dešavanja „sve ili ništa“ (Lymo i sar., 2000). Nakon što koncentracija estradiola u krvi pređe određeni

„prag“ dolazi do pojave pika sekrecije LH koji će dovesti do ovulacije. Na drugoj strani, ukoliko pik LH izostane ne dolazi do ovulacije sa svim posledicama koje iz toga proizilaze (izostanak koncepcije, povraćanje itd.). Iako je po pitanju nivoa estradiola i ovulacije situacija veoma jasna, postoji veoma velika varijabilnost kada se radi o ispoljavanju znakova estrusa, koji takođe zavise od koncentracije estradiola. Prema nalazima Van Eerdenburg i sar. (2002), koji je dao tabelarni prikaz sa skorom promena koje karakterišu estrus, pokazalo se da postoje izuzetno velike varijacije koje zavise od samih jedinki kao i razlike u odnosu na stado kome pripadaju (Van Vliet i sar., 1996). Veći broj istraživača koji su se bavili koncentracijom estradiola kod krava su sugerisali da je koncentracija E2 u mleka u pozitivnoj korelaciji sa nivoom E2 u krvnoj plazmi i izneli mišljenje da je nivo E2 u krvnoj plazmi dobar pokazatelj njegove koncentracije u mleku (Batra i sar., 1980; Abeiavardene i sar., 1984).

Drugi izveštaji su jasno pokazali povećanje koncentracije estradiola u toku graviditeta kod krava. Hoffmann i sar. (1997) izvestili su da koncentracije estradiola u plazmi počinje da se povećava oko 120 dana graviditeta kod krava; koncentracije estrogena nastavile su da rastu kako je gestacija napredovala. Patel i sar. (1999) koristili su ekstrakciju organskim rastvaračima, tečnu hromatografiju i RIA da bi kvantifikovali nivo slobodnih estrogena u krvnoj plazmi, i ustanovili da se koncentracija estrogena značajno raste tokom svakog trimestra.

Istovremeno su više istraživača u svojim studijama kvantifikovali nivo estrogena (estron, E1; 17 β -estradiol, E2) u mleku tokom graviditeta kod krava (Monk i sar., 1975; Malekinejad i sar., 2006). Tako Monk i sar. (1975) navode da je koncentracija E2 u prvom trimestru 85 pg/mL, dok se kasnije javljaju niže koncentracije E2, tako da je u drugom trimestru zabeležen nivo od 52 pg/mL, i 49 pg/mL u trećem trimestru gestacije. Malekinejad i sar. (2006) su u svojoj studiji izvestili da su, korišćenjem tečne hromatografske masene spektrometrije za detekciju E1 i E2 u mleku od 5 gravidnih krava, zabeležene koncentracije E1 bile u proseku 9, 57 i 118 pg/mL, a koncentracije E2 u proseku 10, 20, i 21 pg/mL u 1-om, 2-om i 3-em trimestru. Ključni problem ovih studija jeste da su za svaki trimestar bile korišćene različite životinje, dok je u našim ispitivanjima nivo estradiola određivan kod istih jedinki kao na dan detekcije estrusa tako i 21 dana nakon estrusa. Rezultati naših istraživanja su pokazali da smo zabeležili vrednosti koncentracije estradiola koje su u skladu sa podacima koje navode Malekinejad i sar. (2006), ali i nešto više vrednosti u odnosu na navode Pepe-Zambito i sar., (2008).

Rezultati naših istraživanja su pokazali da je koncentracija estradiola u krvnom serumu statistički značajno viša kod krava ogledne grupe O, kako 0. dana (u odnosu na sve ostale grupe; grafikon 5.17) tako 21. dana ispitivanja (u odnosu na ogledne grupe C i P; grafikon 5.18). Kada je izvršena podela unutar grupa na steone i nesteone krave može se primetiti da se obim statistički značajnih razlika smanjuje kod steonih krava (grafikon 5.19 i 5.20), dok je nesteonih krava statistički značajno viša vrednost estradiola utvrđena kod krava grupe O u odnosu na grupu C i OPN (grafikon 5.21) i to 0. dana ispitivanja, kao i kod iste grupe krava u odnosu na grupe CN i PN (grafikon 5.22). Ovakav nalaz ukazuje na mogućnost da je u oglednoj grupi O sinhronizacija estrusa bila nešto efikasnija u pogledu razvijenosti folikula i stimulacije ovulacije. Ako se posmatra krajnji efekat programa kontrole reprodukcije, a to je procenat steonosti kod krava, može se zapaziti da je ovaj tretman takođe imao uspeha, podižući stepen koncepcije za 22% u odnosu na kontrolnu grupu krava (31% u grupi C, 54% u grupi O; tabela 5.1).

Analizirajući vrednosti koncentracije estradiola kod steonih i nesteonih krava 0. i 21. dana ispitivanja uočava se da nije bilo statistički značajnih razlika u grupama C, OP i P (grafikoni 5.23 i 5.24). Zanimljivo je, međutim, da se u oglednoj grupi O pojavljuje statistički značajno viša koncentracija estradiola kod nesteonih krava 0. dana ispitivanja, što nije bio očekivani rezultat. Naime, očekivali smo da se vrednosti koncentracije estradiola 0. dana ispitivanja generalno neće razlikovati između grupa, ali smo isto tako imali pretpostavku da može doći do pojave statističkih razlika u vrednostima koncentracije estradiola u odnosu na kasnije rezultate steonosti. U tom smislu je bilo očekivano da vrednosti koncentracije estradiola budu više kod krava koje će kasnije biti dijagnostikovane kao steone. Međutim, rezultati naših istraživanja nisu opravdali naša očekivanja, što otvara prostor za dalji rad na proveru određenih nejasnoća u vezi sa variranjem koncentracije estradiola kod mlečnih krava.

7. ZAKLJUČCI

1. *Procenat steonosti je statistički značajno povišen kod zbirno prikazanih tretiranih grupa krava (grupe O, P i OP zbirno; 52%) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (C; 31%). Povećanje procenta steonosti kod tretiranih krava u odnosu na kontrolnu grupu životinja kretalo se između 22-32%.*
2. *Najveće povećanje procenta steonosti je zabeleženo kod krava koje su sedmog dana nakon veštačkog osemenjavanja u indukovanom estrusu tretirane hCG-om (grupa P, 63%; grupa C, 31%; $p < 0.05$).*
3. *Određivanje progesterona u krvnom serumu i mleku u toku indukovanog estrusa pokazalo je da između 2-10% krava može biti osemenjavano sa relativno visokim vrednostima koncentracije progesterona.*
4. *Najviše vrednosti koncentracije progesterona nakon estrusa i veštačkog osemenjavanja su utvrđene u svim vremenskim intervalima ispitivanja (14, 21, 28. dana) kod ogledne grupe koja je tretirana isključivo hCG-om (grupa P), i bile su statistički značajno više u odnosu na ostale ogledne grupe.*
5. *Vrednosti koncentracije progesterona kod ogledne grupe tretirane kombinacijom gonadotropina i hCG-a (grupa OP) su bile statistički značajno povišene 14. i 21 dana od estrusa i veštačkog osemenjavanja u odnosu na kontrolnu grupu životinja.*
6. *Vrednosti koncentracije progesterona u mleku su bile statistički značajno povišene 21. i 28. dana od indukovanog estrusa i veštačkog osemenjavanja kod krava ogledne grupe tretirane isključivo hCG-om (grupa P) u odnosu na kontrolnu grupu krava.*
7. *Tretman hCG-om sedmog dana nakon indukovanog estrusa dovodi do povećane lutealne aktivnosti i većeg procenta steonosti kod krava simentalske rase.*
8. *Određivanje koncentracije estradiola u krvnom serumu krava simentalske rase u toku indukovanog estrusa i 21. dana od estrusa nije se pokazalo kao pouzdan parametar za procenu funkcionalnog stanja jajnika.*

8. LITERATURA

- Abeyawardene SA, Hathorn DJ, Glencross RG, 1984, Concentrations of oestradiol-17 β and progesterone in bovine plasma and defatted milk during the post-partum anovulatory period, during oestrous cycles and following ovariectomy, *Br Vet J*, 140, 458–67.
- Adams GP, 1999, Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil. Supp*, 54, 17-32.
- Allrich RD, 1994, Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci*, 77(9), 2738-44.
- Ambrose DJ, Colazo MG, 2007, Reproductive status of dairy herds in Alberta: a closer look, *Proceedings of the 2007 Western Canadian Dairy Seminar, Adv Dairy Technol*, 19, 227-44.
- Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics, 2008, Editors: DE Noakes, TJ Parkinson, GCV England, WB SAUNDERS, ISBN 9780702025563.
- Batra SK, Arora RC, Bachlaus NK, Pahwa GS, Pandey RS, 1980, Quantitative relationships between oestradiol-17 β in the milk and blood of lactating buffaloes, *J Endocrinol*, 84, 205–9.
- Batra SK, Arora RC, Bachlaus NK, Pandey RS, 1979, Blood and milk progesterone in pregnant and nonpregnant buffalo, *J Dairy Sci*, 62(9), 1390-93.
- Beam SW, Butler WR, 1999, Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows, *J Reprod Fertil Suppl* 54, 411-24.
- Bertolini M, Bertolini LR, 2009, Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning, *Rev Med Vet Zoot*, 56, 184-94
- Bjersing L, Hay MF, Kann G, Moor RM, Naftolin F, Scaramuzzi RJ, Short RV, Yunglai EV, 1972, Changes in gonadotrophins ovarian steroids and follicular morphology in sheep at oestrous, *J Endocrinol*, 52, 465-79.
- Bousquet D, Bouchard E, Du Tremblay D, 2004, Decreasing Fertility in Dairy Cows: Myth or Reality? *Proc 23 WBC Congress, Quebec, Canada*, 1-7.
- Breuel KF, Spitzer JC, Thompson CE, Breuel GF, 1990; First service pregnancy rate in beef heifers as influenced by human chorionic gonadotropin administration before and/or after breeding, *Theriogenology*, 34, 139–45.

- Bridges PJ, Wright DJ, Buford WI, Ahmad N, Hernandez-Fonseca H, McCormick ML, 2000, Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows, *J Anim Sci*, 78, 2942–9.
- Britt JH, 1992, Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility, *Proceedings of the Annual Convention of the AABP*, 39–43.
- Brown LH, Odde KG, King ME, LeFever DG, Neubauer CJ, 1988, Comparison of MGA-Prostaglandin F₂ α to Syncromate B for estrus synchronization in beef heifers, *Theriogenology*, 30, 1-12.
- Bulman DC, Lamming GE, 1978, Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod Fertil*, 54(2), 447-58.
- Butler WR, 1998, Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 81(9), 2533-39.
- Butler WR, 2000, Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle, *Anim Reprod Sci*, 60-61, 449-57.
- Carrick MJ, Shelton JN, 1969, Oestrogen-progesterone relationships in the induction of oestrus in spayed heifers, *J Endocrinol*, 45(1), 99-109.
- Clarke JI, Pompolo S, 2005, Synthesis and secretion of GnRH, *Anim Repro Sci*, 88, 1–2, 29-55.
- Coe BL, Allrich RD, 1989, Relationship between endogenous estradiol-17 β and estrous behavior in heifers, *J Anim Sci*, 67(6), 1546-51.
- Cooper DA, Carver DA, Villeneuve P, Silvia WJ, Inskip EK, 1991, Effects of progestagen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows, *J Reprod Fertil*, 91, 411–21.
- Darwash AO, Lamming GE, Woolliams JA, 1997, The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle, *J Anim Sci*, 65, 9–16.
- Davidge ST, Wiebold JL, Senger PL, Hillers JK, 1987, Influence of varying levels of blood progesterone upon estrous behavior in cattle. *J Anim Sci*, 64(1), 126-32.
- de Graaff W, Grimard B, 2018, Progesterone-releasing devices for cattle estrus induction and synchronization: Device optimization to anticipate shorter treatment durations and new device developments, *Theriogenology*, 112, 34-43.

- de Medeiros SF, Norman RJ, 2009, Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights, *Hum Reprod Update*, 15, 69–95.
- De Rensis F, López-Gatius F, Garcia-Ispuerto I, Techakumpu M, 2010, Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update, *Theriogenology*, 73, 1001–8.
- Diaz T, Schmitt EJP, de la Sota RL, Thatcher MJ, Thatcher WW, 1998, Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers, *J Anim Sci*, 76, 1929–36.
- Díaz T, Manzo M, Trocóniz J, Benacchio N, Verde O, 1986, Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows, Carora type and cross-bred heifers, *Theriogenology*, 26, 4, 419-32.
- Diskin MG, 1987, Studies related to embryonic mortality in the cow. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF, 2002, Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle, *Domest Anim Endocrinol*, 23, 211–28.
- Dobson H, Smith R, Royal M, Knight Ch, Sheldon I, 2007, The high-producing dairy cow and its reproductive performance, *Reprod Dom Anim*, 42, 2, 17-23.
- Dovenski T, 1997, Usporedba ehograma jajnika s razinom progesterona i estradiola u krvi krava tijekom spolnog ciklusa, u puerperiju i u jalovih krava, Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Dovenski T, Trojčanec P, Kocoski Lj, Popovski K, Petkov V, Atanasov B, 2006; Effect of norgestomet on successful resumption of ovarian activity in postpartum non-cyclic dairy cows, *Reprod Domes Anim*, 41, 4, 353.
- Dovenski T, Trojačanec P, Petkov V, Atanasov B, 2013, Manipulation of bovine estrus cycle using different synchronization methods, *Proceedings, Scinetific symposium Reproduction of domestic animals, Divčibare, Republic of Serbia*, 113-24.
- Dutt RH, 1953, Inducion of estrus and ovulaion in anestrual ewes by use of progesterone and pregnant mare serum, *J Anim Sci*, 12, 515-23.
- Dutt RH, Casida LE, 1948, Alteration of the estrusal cycle in sheep by use of progesterone and itseffect upon subsequent ovulation and fertility, *Endocrinology*, 43, 208-17.
- Echternkamp SE, Bolt DJ, Hawk HW, 1976, Ovarian and pituitary hormone in blood of progesterone-treated ewes, *J Anim Sci*, 42, 893-900.

- Esslemont SW, Kossaibati MA, 2000, The use of databases to manage fertility, *Anim Reprod Sci*, 60, 61, 725-71.
- Evans ACO, 2003, Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals, *Reprod Dom Anim*, 38, 240–46.
- Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM, 1990, Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod* 43, 210-18.
- Farin CE, Moeller CL, Mayan H, Gamboni F, Sawyer HR, Niswender GD, 1988, Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum, *Biol Reprod*, 38, 413–21.
- Flint APF, Stewart HJ, Lamming GE, Payne JH, 1992, Role of oxytocin receptor in choice between cyclicity and gestation inuminants, *J Reprod Fertil (Suppl)*, 45, 53-8.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM, 2001, Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle, *Biol Reprod*, 65, 648–54.
- Fourchon C, Seegers H, Malher X, 2000, Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis, *Theriogenology*, 53, 9, 1-2.
- Fricke PM, Reynolds LP, Redmer DA, 1993, Effect of human chorionic gonadotrophin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteum function in cows, *J Anim Sci*, 71, 1242–6.
- Garcia A, Salaheddine M, 2001, Effect of oestrous synchronization with estradiol 17beta and progesterone on follicular wave dynamics in dairy heifers, *Reprod Domest Anim*, 36, 6, 301-7.
- García-Ispierto I, López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, López- Béjar M, 2006, Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle, *Theriogenology*, 65, 799–807.
- Ginther OJ, 2000, Selection of the dominant follicle in cattle and horses, *Anim Reprod Sci*, 60–61, 61–79.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP, 1989c, Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves, *J Reprod Fertil*, 87, 223–30.
- Gomez-León VE, Ginther OJ, Araujo ER, Guimarães JD, Wiltbank MC, 2019, Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics I: Comparison of follicle growth profiles under different physiological conditions in heifers, *Theriogenology*, 123, 194-201.

- Goodman RL, Legan SJ, Ryan KD, Foster DL, Karsch FJ, 1981, Importance of variations in behavioural feedback actions of oestradiol to the control of seasonal breeding in the ewe, *J Endocrinol*, 89, 229-40.
- Grygar I, Kudlac E, Dolezel R, Nedbalkova J, 1997, Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity, *Anim Reprod Sci*, 49, 77-82.
- Gvozdić D, Dovenski T, Stančić I, Stančić B, Božić A, Jovanović I, Atanasov B, Šuluburić A, 2013, Hormonal methods for estrous cycle manipulation in dairy cows, *Contemporary Agriculture*, 62, 319-32.
- Gvozdić D, Jovanović I, Milanović S, Fratrić N, 2011, Efikasnost reprodukcije mlečnih krava, *Zbornik predavanja, 2 Naučni simpozijum „Reprodukcija domaćih životinja“*.
- Gvozdić D, Stančić I, Savović M, Stančić B, Božić A, Jovanović I, Barna T, 2011b, Reproductive efficiency in high-milking dairy cows after calving, *Contemporary Agriculture*, 60, 12, 86-97.
- Gvozdić D, Stojić V, Pavlović V, 2004, Fiziologija i patologija puerperijuma krava, XXV Seminar za inovacije znanja veterinarara, *Zbornik predavanja*, 25-45.
- Hafez ESE, 1987, *Reproduction in farm animals*, 5th Edition, Lea&Fabiger, Philadelphia, ISBN 0-8121-1013-7.
- Helmer SD, Britt JH, 1986, Fertility of dairy cattle treated with human chorionic gonadotrophin (hCG) to stimulate progesterone secretion, *Theriogenology*, 26, 683-95.
- Hoffmann B, Goes de Pinho T, Schuler G, 1997, Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 105, 296-303.
- <http://www.epa.gov/agriculture/ag101/dairyphases.html>, 2015.
- Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF, 2000, Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms, *J Dairy Sci*, 83, 7, 1648-58.
- Jolly PD, McDougall S, Fitzpatrick LA, KL, Entwistle KW, 1995, Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrous cows, *J Reprod Fertil*, 49, 477-92.
- Jorritsma R, 2003, Negative energy balance in dairy cows as related to fertility, PhD Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Holland.

- Kamboj M, Prakash BS, 1993, Relationship of progesterone in plasma and whole milk of buffaloes during cyclicity and early pregnancy, *Tropical animal health and production*, 25(3), 185-92.
- Karsch FJ, Foster DL, Legan SJ, Peter GK, 1979, Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: Interrelationship of estradiol, progesterone and luteinizing hormone, *Endocrinology*, 105(2), 421-26.
- Kastelic JP, Pierson RA, Ginther OJ, 1990, Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers, *Theriogenology*, 34, 3, 487-98.
- King GJ, Hurnik JF, Robertson HA, 1976, Ovarian function and estrus in dairy cows during early lactation, *J Anim Sci*, 42(3), 688-92.
- Kyle SD, Callahan CJ, Allrich RD, 1992, Effect of progesterone on the expression of estrus at the first postpartum ovulation in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 75(6), 1456-60.
- Larson LL, Ball PJH, 1992, Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review, *Theriogenology*, 38, 255-67.
- LeBlanc S, 2012, Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle, *Reprod Dom Anim*, 47, 18-30.
- Lopes FL, Arnold DR, Williams J, Pancarci SM, Thatcher MJ, Drost M, Thatcher WW, 2000, Use of estradiol cypionate for timed insemination, *J Anim Sci*, 78, Suppl 1, 216.
- López-Gatiús F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, López-Béjar M, 2002, Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd, *Theriogenology*, 57, 1251–61.
- López-Gatiús F, Santolaria P, Yániz JL, Hunter RHF, 2004, Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle, *Theriogenology*, 62, 1529–35.
- Lucy CM, 2007, Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement, *Soc Reprod Fert*, 64, 237-54.
- Lucy MC, 2001, Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci*, 84, 1277–93.
- Lucy MC, 2003, Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows, *Reprod Suppl*, 61, 415–27.

- Lucy MC, McDougall S, Nation DP, 2004, The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems, *Anim Reprod Sci*, 82–83, 495–512.
- Lunenfeld B, 2004, Historical perspectives in gonadotrophin therapy, *Hum Reprod Update*, 10, 453–67.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ, 1987, Growth rates of follicles in the ovary of the cow, *J Reprod Fertil*, 81, 2, 301-7.
- Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TA, van Eerdenburg FJ, 2000, Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle, *Theriogenology*, 53, 9, 1783-95.
- Machado R, Bergamaschi MACM, Barbosa RT, de Oliveira CA, Binelli M, 2008, Ovarian function in Nelore (*Bos Taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatment, *Theriogenology*, 69, 798–804.
- Macmillan KL, Day AM, 1982, Prostaglandin F₂ α - a fertility drug in dairy cattle, *Theriogenology*, 18, 245-53.
- Macmillan KL, Segwagwe BV, Pino CS, 2003, Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle, *Anim Reprod Sci*, 78, 327–44.
- Malekinejad H, Scherpenisse P, Bergwerff AA, 2006, Naturally occurring estrogens in processed milk and in raw milk (from gestated cows), *J Agric Food Chem*, 54, 9785–91.
- Mallory DA, Wilson DJ, Busch DC, Eilersieck MR, Smith MF, Patterson DJ, 2010, Comparison of long-term progestin-based estrus synchronization protocols in beef heifers, *J Anim Sci*, 88, 11, 3568–78.
- Mann GE, Fray MD, Lamming GE, 2006, Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-t production in the cow, *The Veterinary Journal*, 171, 500–3.
- Markusfeld O, 1987, Inactive ovaries in high-yielding dairy cows before service: aetiology and effect on conception, *Vet Rec*, 121, 149-53.
- Mateus L, da Costa LL, Bernardo F, Silva JR, 2002, Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows, *Reprod Domest Anim*, 37, 31-5.

- Mateus L, Lopes da Costa L, Diniz P, Ziecik AJ, 2003, Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE₂ and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis, *Anim Reprod Sci*, 76, 3–4, 143-54.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC, 1990, Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event, *Physiol Rev*, 79, 263-323.
- McCracken JA, Schramm W, 1988, Prostaglandins and luteal regression. Prostaglandins: Biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids, Curtis-Prior PB (ed.), Churchill Livingstone, 425-62.
- McDougall S, 2003, Resynchrony of previously anoestrous cows and treatment of cows not detected in oestrus that had a palpable corpus luteum with prostaglandin F_{2a}, *NZ Vet J*, 51, 117–24.
- McDougall S, Burke CR, Mcmillan KL, Williamson NB, 1995, Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving, *Res Vet Sci*, 58, 212-16.
- Monk EL, Erb RE, Mollett TA, 1975, Relationships between immunoreactive estrone and estradiol in milk, blood, and urine of dairy cows, *J. Dairy Sci*, 58, 34–40.
- Moore K, Thatcher WW, 2006, Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle, *J Dairy Sci*, 81, 1254–66.
- Mwaanga ES, Janowski T, 2000, Anoestrus in dairy cows: causes, prevalence and clinical forms, *Reprod Domest Anim*, 35, 193-200.
- Nanda AS, Dobson H, Ward WR, 1990, Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinising hormone surge in dairy cows, *Res Vet Sci*, 49, 1, 25-8.
- Nebel RL, Jobst SM, 1998, Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: a review, *J Dairy Sci*, 81, 1169-74.
- Noakes D, Perkinson JT, England CVG, 2008, *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, WB Saunders, ISBN 978-0-7020-2556-3.
- Nyman S, Johansson K, de Koning DJ, Berry DP, Veerkamp RF, Wall E, Berglund B, 2014, Genetic analysis of atypical progesterone profiles in Holstein-Friesian cows from experimental research herds, *J Dairy Sci*, 97, 11, 7230-39.
- Odde KG, 1990, A review of synchronization of estrus in postpartum cattle, *J Anim Sci*, 68, 817-30.

- Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A, 2000, Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study, *Theriogenol*, 53, 841-57.
- Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes FL, Moreira F, Thatcher WW, 2002, Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle, *J Dairy Sci*, 85, 122–31.
- Pape-Zambito DA, Magliaro AL, Kensinger RS, 2008, 17β -estradiol and estrone concentrations in plasma and milk, during bovine pregnancy, *J Dairy Sci*, 91, 127–35.
- Patel OV, Takenouchi N, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I, 1999, Plasma oestrone and oestradiol concentrations throughout gestation in cattle: Relationship to stage of gestation and fetal number, *Res Vet Sci*, 66, 129–33.
- Peter AT, 2004, An update on cystic ovarian degeneration in cattle, *Reprod Domest Anim*, 39, 1-7.
- Peter AT, Bosu WTK, 1986, Postpartum ovarian activity in dairy cows: correlation between behavioral estrus; pedometer measurements and ovulations, *Theriogenology*, 26, 111-15.
- Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ, 2009, Postpartum anestrus in dairy cattle, *Theriogenology*, 71, 1333-42.
- Peters KE, Bergfeld EG, Cupp AS, 1994, Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers, *Biol Reprod*, 51, 1248-54.
- Price CA, Webb R, 1986, Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers, *J Reprod Fertil*, 86, 303–8.
- Ptaszynska M, 2006, *Compendium of Animal Reproduction*, Intervet International, ISBN 90-801886-6-2.
- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC, 1997, Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation, *J Dairy Sci*, 80, 301–6.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC, 1995, Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH, *Theriogenology*; 44, 915-23.
- Rajamahendran R, Sianangama PC, 1992, Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates, *J Reprod Fertil*, 95, 577–84.

- Rajamahendran R, Taylor C, 1990, Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles, *Anim Reprod Sci*, 22, 171-80.
- Reames PS, Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Silvia WJ, 2011, Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 β in ovariectomized dairy cows, *Theriogenology*, 75, 2, 233-40.
- Rizkallah T, Gurdip E, Van deWiele RL, 1969, Metabolism of hCG in man, *J Clin Endocrinol Metab*, 29, 92-100.
- Robinson J, 1954, Relationship of oestrogen and progesterone in oestrus behavior of the ewe, *Nature*, 173, 870.
- Robinson TJ, 1959, The estrous cycle of the ewe and doe, *Reproduction in Domestic Animals*, Edd. Cole HH i Cupps PT, Academic Press, ISBN 0-12-196575-9, 291-333.
- Robinson TJ, 1965, Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep, *Nature*, 206, 39-41.
- Roche JF, Mackey D, Diskin MD, 2000, Reproductive management of postpartum cows, *Anim Reprod Sci*, 60-61, 703-12.
- Roche JF, Mihm M, Diskin MG, Ireland JJ, 1998, A review of regulation of follicle growth in cattle. *J Anim Sci*, 76, Supplement 3, 16-29.
- Roelofs JB, Van Eerdenburg FJCM, Hazeleger W, Soede NM, Kemp B, 2006, Relationship between progesterone concentrations in milk and blood and time of ovulation in dairy cattle, *Anim Reprod Sci*, 91(3), 337-43.
- Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE, 2000, Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility, *Anim Sci*, 70, 487-502.
- Royal MD, Smith RF, Friggens NC, 2008, Fertility in dairy cows: bridging the gaps, *Animal*, 2, 8, 1101-03.
- Sakaguchi M, Sasamoto Y, Suzuki T, Takahashi Y, Yamada Y, 2006, Fate of cystic ovarian follicles and the subsequent fertility of early postpartum dairy cows, *VetRec*, 159, 197-201.
- Sangsrivong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC, 2002, High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 85, 2831-42.

- Sanson WF, Rith TL, Gramm K, Horohv DV, Godke RA, 1995, Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotrophin and relation to ovarian responsiveness in domestic cats, *J Reprod Fertil*, 105, 35–41.
- Santos JE, Thatcher WW, Pool L, Overton MW, 2001, Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows, *J Anim Sci*, 79, 2881–94.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF, 1988, Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers, *J Reprod Fertil*, 83, 663–71.
- Savović M, 2010, Reproaktivna efikasnost krava sa različitim poremećajima postpartum, magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Schmitt EJ, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Thorner R, Thatcher WW, 1996, Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone, *J Anim Sci*, 74, 1074–83.
- Schmitt EJP, Barros CM, Fields PA, Fields MJ, Diaz T, Kluge JM, Thatcher WW, 1996, A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day 5 of the estrous cycle, *J Anim Sci*, 74, 1915–29.
- Schmitt EJ-P, Diaz T, Drost M, Fredriksson EW, Thatcher WW, 1996a, Use of a gonadotropin-releasing hormone or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle, *J Anim Sci*, 74, 1084–91.
- Senger PL, 2005, Pathways to pregnancy and parturition, 2nd Ed, ISBN 0-9657648-2-6.
- Sheffel CE, Pratt BR, Ferrell WL, Inskeep EK, 1982, Induced corpora-lutea in the postpartum beef cow. 2. Effects of treatment with progestogen and gonadotropins, *J Anim Sci*, 54, 830–6.
- Sheldon IM, Dobson H, 2003, Reproductive challenges facing the cattle industry at the beginning of the 21st century, *Reprod Suppl*, 61, 1-13.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H, 2002, Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle, *Reprod*, 123, 837-45.

- Sianangama PC, Rajamahendran R, 1992, Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogenology*, 38, 85–96.
- Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson JrL, 1991, Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants, *Biol Reprod*, 45, 655-63.
- Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson L Jr, 1991, Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants. *Biol Reprod*, 45(5), 655-63.
- Singh J, Brogliattil GM, Christensen CR, Adams GP, 1999, Active immunization against follistatin and its effect on FSH, follicle development and superovulation in heifers. *Theriogenology*, 52(1), 49-66.
- Sirois J, Fortune JE, 1988, Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography, *Biol Reprod*, 39, 308–17.
- Spencer TE, Bazer FW, 1996, Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium, *Endocrinology*, 137, 1144-47.
- Spencer TE, Johnson GA, Burghart RC, Bazer FW, 2004, Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals, *Biol Reprod*, 71, 2–10.
- Stančić B, Košarčić D, 2007, Reprodukcijska goveda (monografija), Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2007.
- Stančić B, Veselinović S, 2002, Reprodukcijska domaćih životinja (drugo dopunjeno izdanje), Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, ISBN 86-499-0104-2.
- Starbuck MJ, Dailey RA, Inskeep EK, 2004, Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle, *Anim Reprod Sci*, 84, 27–39.
- Stellflug JN, Han DK, Randel RD, Moody EL, 1978, Plasma estrogens in the periparturient cow, *Theriogenology*, 10(4), 269-73.
- Stenman UH, Tiitinen A, Alfthan H, Valmu L, 2006, The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG, *Hum Reprod Update*, 12, 769–84.
- Stevenson JS, Portaluppi MA, Tenhouse DE, Lloyd A, Eborn DR, Kacuba S, DeJarnette JM, 2007, Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy

- survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone, *J Dairy Sci*, 90, 331–40.
- Stevenson JS, Tenhouse DE, Portaluppi MA, Eborn DR, Kacuba S, De Jarnette JM, 2007, Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone, *J Dairy Sci*, 90, 331–40.
- Stevenson SJ, 2001, Synchronization of estrus and ovulation in dairy cows, *Ad Dairy Tech*, 13, 379-92.
- Stevenson SJ, Britt HJ, 1977, Detection of estrus by three methods, *J Dairy Sci*, 60, 1994-98.
- Sundby A, Torjesen PA, 1978, Plasma levels of testosterone in bulls. Response to repeated hCG injections, *Acta Endocrinol*, 88, 787–92.
- Szenci O, Beckers JF, Sulon J, Sasser RG, Taverne MAM, Varga J, Baltusen R, Schekk Gy, 1998, Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy specific protein B and bovine pregnancy associated glycoprotein test for pregnancy detection in dairy cows, *Theriogenology*, 50, 1, 77-88.
- Tamminga S, 2006, The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negative energy balance and fertility in dairy cows, *Anim. Reprod. Sci*, 96, 227-39.
- Taylor CC, Rajamahendran R, 1991, Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle, *Can J Anim Sci*, 71, 61–8.
- Thacher WW, Bilby RT, Bartolome AJ, Silvestre F, Staples RC, Santos PEJ, 2006, Strategies for improving fertility in the modern dairy cow, *Theriogenology*, 65, 30-44.
- Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JE, 2002, Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function, *Domest Anim Endocrinol*, 23, 243–54.
- Thibier M, 2005, The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives, *Reprod Nutr Dev*, 45, 235–42
- Townson DH, Tsang PC, Butler WR, Frajblat M, Griel LC Jr, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM, Pate JL, 2002, Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows, *J Anim Sci*, 80, 1053–8.

- Vailes LD, Washburn SP, Britt JH, 1992, Effects of various steroid milieus or physiological states on sexual behavior of Holstein cows. *J Anim Sci*, 70(7), 2094-2103.
- Van Eerdenburg FJCM, Loeffler HSH, Van Vliet JH, 1996, Detection of oestrous in dairy cows: A new approach to an old problem, *Vet Quart*, 18, 52-4.
- Van Vliet JH, Van Eerdenburg FJCM, 1996, Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows, *App Anim Behav Sci*, 50(1), 57-69.
- Van Werven T, Waldeck F, Souza AH, Floch S, Englebienne M, 2013, Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility, *Anim Reprod Sci*, 138, 3-4, 143-49.
- Van Eerdenburg FJ, Karthaus D, Taverne MA, Merics I, Szenci O, 2002, The relationship between estrous behavioral score and time of ovulation in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 85(5), 1150-6.
- Veenhuizen EL, Wagner FJ, Tonkinson LV, 1972, Corpus luteum response to 6-chloro-17acetoxprogesterone and hCG in the cow, *Biol Reprod*, 6, 270-6.
- Waldmann A, Ropstad E, Landsverk K, Sørensen K, Sølverød L, Dahl E, 1999, Level and distribution of progesterone in bovine milk in relation to storage in the mammary gland, *Anim Reprod Sci*, 56(2), 79-91.
- Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK, 2002, Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: a multivariate description, *J Dairy Sci*, 85, 3225-37.
- Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R, 2002, Physiological classification of anovulatory conditions in cattle, *Theriogenology*, 57, 21-52.
- WiltbankM, Souza A, Carvalho P, Cunha A, Giordano J, Fricke P, Baez GM, Diskin M, 2014, Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle, *Animal*, 8(S1), 70-81.
- Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL, 1997, Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF_{2α} and progesterone *Theriogenology* 47, 667-701.
- Zaied AA, Bierschwal CJ, Elmore RG, Youngquist RS, Sharp AJ, Garverick HA, 1979, Concentrations of progesterone in milk as a monitor of early pregnancy diagnosis in dairy cows, *Theriogenology*, 12(1), 3-11.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Адам В. Шулубурић

Потписани-а _____

број уписа 2010/5020

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Испитивање параметара ефикасности репродукције високомлечних крава
након синхронизације еструса и стимулације лутеалне функције**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

22.05.2019.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Адам В. Шулубурић

Број уписа 2010/5020

Студијски програм ДАС09

Наслов рада Испитивање параметара ефикасности репродукције високомлечних крава након синхронизације еструса и стимулације лутеалне функције

Ментор Проф. др Драган Гвоздић

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 22.05.2019.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање параметара ефикасности репродукције високомлечних крава након синхронизације еструса и стимулације лутеалне функције

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 22.05.2019.
