

*Originalni naučni rad***USPJEŠNOST PROTOKOLA SINHRONIZACIJE ESTRUSA I OVULACIJE KOD
MLIJEČNIH KRAVA U LJETNOM PERIODU******Benjamin ČENGIĆ^{1*}, Nazif VARATANOVIĆ¹, Tarik MUTEVELIĆ², Amel ĆUTUK³, Lejla
VELIĆ⁴, Muamer DERVIŠEVIĆ⁵**¹ Veterinarski Fakultet, Katedra za porodiljstvo i bolesti vimena, Sarajevo, Bosna i Hercegovina² Veterinarski Fakultet, Katedra za fiziologiju i patologiju razmnažanja, Sarajevo, Bosna i Hercegovina³ Veterinarski Fakultet, Katedra za ambulatnu kliniku, Sarajevo, Bosna i Hercegovina⁴ Veterinarski Fakultet, Katedra za mikrobiologiju sa imunologijom i zarazne bolesti životinja sa epizootologijom, Sarajevo, Bosna i Hercegovina⁵ Veterinarska stanica DI-VET, Ilijaš, Bosna i Hercegovina

* Korespondentni autor: Benjamin Čengić, e-mail: benjamin.cengic@vfs.unsa.ba

Kratak sadržaj: Govedarstvo kao jedna od najznačajnijih grana stočarske proizvodnje se dugo suočava sa hroničnim problemom pada reproduktivnih performansi. U 2005 godini broj goveda širom svijeta je iznosio oko 1.370.000.000 grla, dok je u 2012 taj broj iznosio tek nešto iznad milijarde, što govori o važnosti primjene različitih reproduktivnih protokola u cilju povećanja brojnosti proizvodnih jedinki. Toplotni stres dovodi do poremećaja fizioloških i reproduktivnih procesa, jer rast tjelesne temperature uzrokovan toplotnim stresom ima direktne negativne posljedice na brojne ćelijske funkcije. U istraživanje je bilo uključeno ukupno 54 krave Holštajn-Frizijske pasmine, 28 eksperimentalnih i 26 kontrolnih krava, uzgojenih na PD Butmir sa prosječnom iskoristljivošću od 5. laktacija. Hormonalni protokoli sinhronizacije estrusa i ovulacije su korišteni u mjesecima juni i juli 2013. godine. Krave u eksperimentalnoj grupi su podvrgavane presynch+5dCoS2 hormonalnom protokolu. Krave koje nisu ostale gravidne nakon ovog protokola odmah su podvrgnute resinhronizaciji sa hormonalnim protokolom Cosynch 72. Uspješnost presynch+5dCoS2 hormonalnog protokola je bila 19%, dok je u slučaju Cosynch 72 ona iznosila 33%, a što je bilo statistički signifikantno ($p < 0,05$). Prvi presinhronizacijski i sinhronizacijski protokol (5dCoS2) nisu značajnije pomogli u poboljšanju koncepcije nakon prvog osjemenjavanja postpartum, ali na osnovu rezultata evidentno je da su imali pozitivan efekt na drugi protokol (COS72) u vidu smanjenja embrionalnog mortaliteta u ljetnim mjesecima, kada je on najizražajniji. Protokol COS72, daje zadovoljavajuće rezultate u ljetnom periodu, ali preduvjeti za uspješan program sinhronizacije estrusa i ovulacije uoči vještačkih osjemenjavanja su dobra kondicija i zdravstveni menadžment, kao i smanjenje toplotnog stresa u skladu s lokacijom i dizajnom farme.

KLjučne riječi: mliječne krave, toplotni stres, hormonalni protokol, reprodukcija

UVOD

Govedarstvo kao jedna od najznačajnijih grana stočarske proizvodnje se suočava sa hroničnim problemom pada reproduktivnih performansi. U 2005 godini broj goveda širom svijeta je iznosio

** Rad je prezentovan na 23. Godišnjem savjetovanju doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH) sa međunarodnim učešćem, Teslić 2018.

oko 1.370.000.000 grla, dok je u 2012 taj broj iznosio tek nešto iznad milijarde, što govori o važnosti primjene različitih reproduktivnih protokola u cilju povećanja brojnosti proizvodnih jedinki. Za uspješnu reprodukciju, potrebno je nekoliko preduvjeta kao što su razviće vitalnih oocita u folikulima, izraženost estralnog ponašanja i usklađene ovulacije, optimalna unutrašnjost uterusu za razvoj embrija, kao i efikasan reproduktivni menadžment.

Starost reproduktivnih grla je također veoma bitna za reproduktivnu efikasnost. Prvotelke sa 700-750 dana starosti imaju servis period od 118 dana, prvo vještačko osjemenjavanje sa 66 dana, koncepciju nakon prvog osjemenjavanja 36.4% i sa indeksom vještačkog osjemenjavanja od 2.85 (Ettema et al., 2004). Plodnost počinje da opada sa starošću, prvotelke imaju višu koncepciju nakon prvog osjemenjavanja postpartum u poređenju s višetelkama, dok krave sa ≥ 5 laktacija imaju najnižu koncepciju (Pursley et al., 1993).

Nasljednost pozitivnih reproduktivnih parametara je $\leq 3\%$ (Hansen, 2000), a Holštajn-Frizijska pasmina ima niži uspjeh prvog osjemenjavanja postpartum u odnosu na druge pasmine mliječnih krava i križance, kao i veću sklonost metaboličkim poremećajima (Pursley et al., 1993, Hansen, 2000). Reprodukcijska je efikasnija kod križanaca, jer imaju bolju koncepciju nakon prvog osjemenjavanja postpartum (51-56% Križanci; 40% Holštajni) i manje embrionalnih uginuća (7.5-10.1% Križanci; 12.8% Holštajni) (Rabiee et al., 2005). Veće metaboličko i nutritivno opterećenje radi veće proizvodnje mlijeka može biti odgovorno za opadanje reproduktivnih performansi, jer Holštajn-Frizijska goveda proizvode najveću količinu mlijeka sa najviše masti i proteina, ali imaju i najkraći vijek iskorištavanja u odnosu na druga mliječna goveda kao npr. Norveško Crveno govedo (koje ima najduži vijek iskorištavanja) (Walch et al., 2008). Visoka mlječnost može imati antagonistički efekt na izražajnost estrusa, ali ne na reaktivaciju

ovarijalne funkcije (Harrison et al., 1990). Krave koje proizvode najviše mlijeka imaju najduži interval do prve ovulacije i ispoljavanje estrusa, a estrusi su nižeg intenziteta, dok prema drugim autorima mliječnije krave radi boljeg opšteg zdravstvenog statusa i više dvostrukih ovulacija imaju veće šanse za koncepciju (Peters and Pursley, 2002, Santos et al., 2004). Visoka mlječnost može dovesti do antagonizma sa reprodukcijom i odgađanja ovulacije radi povećanog katabolizma u takvih goveda, ali i da postoji mogućnost prevazilaženja ovog problema efikasnim menadžmentom (Santschi et al., 2011).

Pri višim ambijentalnim temperaturama i toplotnom stresu folikularni rast je ugrožen, a smanjuju se i koncentracije hormona, koji su povezani sa ranijom cikličnošću (Reist et al., 2003). Toplotni stres može poremetiti fiziološke i reproduktivne procese (Hansen and Arechiga, 1999). Rast tjelesne temperature uzrokovan toplotnim stresom ima direktne negativne posljedice na ćelijske funkcije. Pri višim temperaturama i toplotnom stresu folikularni rast je ugrožen, a smanjuju se koncentracije progesterona, trijodtironina i tiroksina (E2, T3, T4) (Reist et al., 2003, Sota et al., 1998). Toplotni stres ljeti smanjuje dužinu i intenzitet estrusa i zbog toga 76 - 82% krava ne bude primjećeno u estrusu, dok je zimi to 44 - 65% (Pursley et al., 1998). Toplotni stres može izazivati i pojačano lučenje kortizola (ACTH odgovor) koji blokira estradiolom izazvano seksualno ponašanje (Pursley et al., 1998). Stres izazvan povišenjem temperature vazduha smanjuje libido, plodnost, izaziva rast tjelesne temperature i povećava se embrionalna smrtnost (Santos et al., 2009). Negativni efekti toplotnog stresa se odražavaju već od 42 dana prije i 40 dana poslije osjemenjavanja (Jordan, 2003). Toplotni stres se dešava kada su temperature vazduha $>20^{\circ}\text{C}$, dok je gornja kritična temperatura kada počinje toplotni stres je između $25-26^{\circ}\text{C}$ (Al-katanani et al., 1999).

Rast temperature i vlažnosti smanjuju apetit i unos suhe materije, smanjuje se izražajnost i

trajanje estrusa, kvalitet kolostruma, endokrini status, koncepcija, rani embrionski razvoj i rast fetusa, te produžava se partus-koncepcija interval radi produženja stanja negativnog energetskog balansa (NEB) (*Pursley et al.*, 1998, *Jordan*, 2003, *Hansen and Arechiga*, 1999). Radi toplotnog stresa remeti se sazrijevanje oocita u dominantnim folikulima (*Wolfenson et al.*, 1997), čime nastaju manje vitalni embriji. U toplim mjesecima (maj-avgust) kada su temperature vazduha i vlaga visoki, pokazalo se da *Bos taurus* goveda imaju slabiji kvalitet oocita ($41 \pm 9,5\%$), kao i slabiji kvalitet embrija u odnosu na hladniji dio godine ($75,9 \pm 8\%$) (januar-mart) (*Rocha et al.*, 1998). Hipertermija je s reproduktivne tačke gledišta najštetnija na dan estrusa ili dan poslije (*Sota et al.*, 1998). Adaptivan odgovor na toplotni stres je u preusmjeravanju krvi iz unutrašnjosti ka periferiji, što smanjuje perfuziju u uterusu i placenti (*Hansen and Arechiga*, 1999), te radi slabijeg protoka krvi i perfuzije tkiva, funkcija endometrija i ovidukta je poremećena, kao i koncentracije steroidnih hormona, moguć je početak sekrecije prostaglandina $F2\alpha$, što sve zajedno izaziva embrionalna uginuća (*Pursley et al.*, 1998, *Xu and Burton*, 2000).

Uzimanje suhe materije u hrani i mlječnost su često stimulisani povećanim uzimanjem proteina u hranivu, međutim ova nutritivna strategija dovodi i do smanjene plodnosti, jer višak rumenalno razgradivog i nerazgradivog proteina, doprinose smanjenoj plodnosti krava u

laktaciji (*Butler*, 1998). Kako bi se stimulisala mlječnost, obroci imaju $>17\%$ sirovog proteina (SP) što ima za posljedicu smanjenje reproduktivnih performansi. Višak proteina u obroku visokoproduktivnih krava smanjuje reproduktivnu efikasnost, više ne povećava mlječnost, a u slučajevima NEB nedostaje energije za detoksikaciju amonijaka koji dolazi iz rumena u jetru, nastaju promjene u koncentraciji ureje u krvi i mlijeku iznad 19 mg/dl, koje mogu biti štetne za koncepciju i razvoj embrija. Čelije endometrija na ovo reaguju pojačanim lučenjem prostaglandina, padaju koncentracije progesterona i smanjuju se šanse za preživljavanje embrija (*Butler*, 1998). Stanje tjelesne kondicije odražava dostupnost tjelesnih rezervi za metabolizam, rast, laktaciju i ovarijalnu aktivnost (*Montiel and Ahuja*, 2005), što skupa sa prisutnošću šepavosti govori o dobrobiti životinja na farmi, a što je od značaja za reproduktivne i produktivne performanse. Pojava i trajanje NEB je povezano sa intervalom do prve ovulacije PP, a pretpostavlja se da NEB u ranoj laktaciji negativno utiče na kvalitet oocita 80 do 100 dana kasnije i time smanjujući koncepciju u prvih nekoliko osjemenjavanja (*Patton et al.*, 2006). Adipozno tkivo je glavno skladište β -karotena koji djeluje na ovulaciju, lutealnu funkciju i nivo progesterona (P4) i prilikom pada tjelesne kondicije, dolazi do snižavanja njegovih nivoa u plazmi (*Kawashima et al.*, 2009).

MATERIJAL I METODE

U istraživanje je uključeno ukupno 54 krave Holštajn-Frizijske pasmine, 28 eksperimentalnih i 26 kontrolnih krava, uzgojenih na PD Butmir (Kanton Sarajevo). Prosječna mlječnost krava na ovoj farmi se kreće oko 6.000 litara mlijeka po kravi godišnje i prosječna iskoristljivost je 5 laktacija. Detekcija estrusa se vrši trokratno u toku dana, vizuelno na osnovu vanjskih znakova, a po potrebi vaginalno i transrektalno. Dobrovoljni period čekanja na ovoj farmi je 60

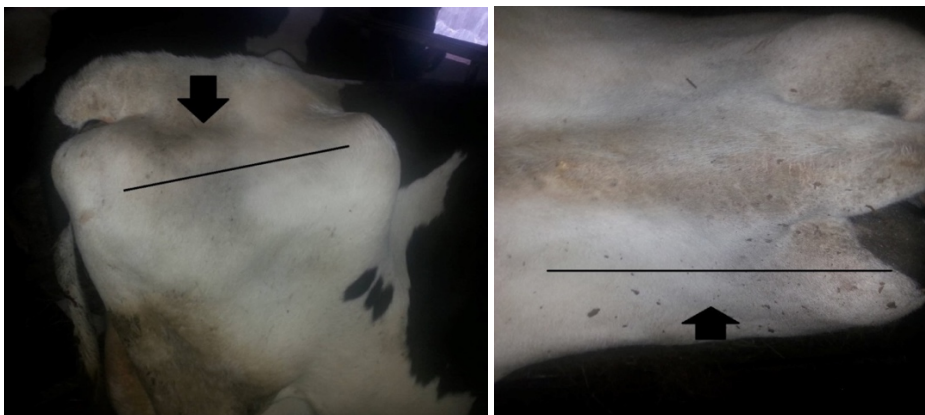
dana, nakon čega se radi klinički pregled jajnika i maternice i donosi se odluka da li ih liječiti ili uvesti u program vještačkog osjemenjavanja. Istraživanje je rađeno od februara 2013 do marta 2014 godine. Životinje uključene u istraživanje su boravile u štali, u ograđenim ležištima i sistemu na vezu. Podaci o starosti krava, proizvodnji, načinu ishrane, zdravstvenom stanju, reproduktivnim abnormalnostima i izlučenjima su dobijeni iz protokola farme ili za

servis perioda i ukupan broj gravidnih i negravidnih grla.

Sonografsko određivanje statusa tjelesne kondicije – Body Condition Status (BCS)

Uz prvo vještačko osjemenjavanje postpartum, određen je i status tjelesne kondicije u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi, sonografski na osnovu debljine potkožnog masnog tkiva. U pitanju je brza, neinvazivna metoda, gdje se ultrazvučna sonda postavlja u oblasti sakruma i

korjena repa, jer su tu najveće naslage adipoznog tkiva na leđima. Dlaku nije potrebno šišati za pregled, a kao kontaktno sredstvo između sonde i kože je upotrijebljeno biljno ulje. Sonda se postavlja vertikalno i ne pritišće se prejako uz kožu, radi kompresije adipoznog tkiva. Adipozno tkivo se oslikava kao tamna (hipoehogena) uža ili deblja linija, dok su koža i fascia profunda svijetle boje (hiperehogeni). Debljina kože se uvijek računa, a debljina potkožnog adipoznog tkiva se izražava u milimetrima.



Slike 1 i 2. Lokacija za postavljanje ultrazvučne sonde prilikom mjerenja adipoznog tkiva.

Određivanje šepavosti

Ocjenjivanje šepavosti je bilo bazirano na posmatranju krava koje stoje, sa naglaskom na stanje ekstremiteta i položaju leđa u trenutku pregleda. Primjenjivana je “ZINPRO LOCOMOTION SCORE” (ZLS) metoda ocjene šepavosti, koja se primjenjuje za rano uočavanje poremećaja na papcima, praćenje prevalencije šepavosti i uočavanju pojedinačnih krava ili grupe krava koje imaju potrebu za funkcionalnim obrezivanjem papaka. Metoda je subjektivne prirode. Uoči početka protokola sinhronizacije i osjemenjavanja, ukupno je pregledano 353 krave na farmi, kako bi se imao uvid u prisutnost i izražajnost šepavosti u

uzgojnom objektu, uključujući i životinje u ogledu.

Svi dobijeni podaci su obrađeni i prikazani pomoću softverskog paketa Microsoft Excel 2010. Sve uočene statističke značajne razlike su ocijenjene prema “p” vrijednostima i to za $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$. Primarna obrada rezultata od ispitivanih krava je obavljena pomoću metode deskriptivne statistike, a sekundarna obrada tako dobijenih rezultata izvršena je dvosmjernim “t” testom. Klasifikacija uočenih statističkih značajnosti između eksperimentalne i kontrolne grupe je označavana sa zvjezdicama *, ** i *** ovisno o nivou “p” vrijednosti.

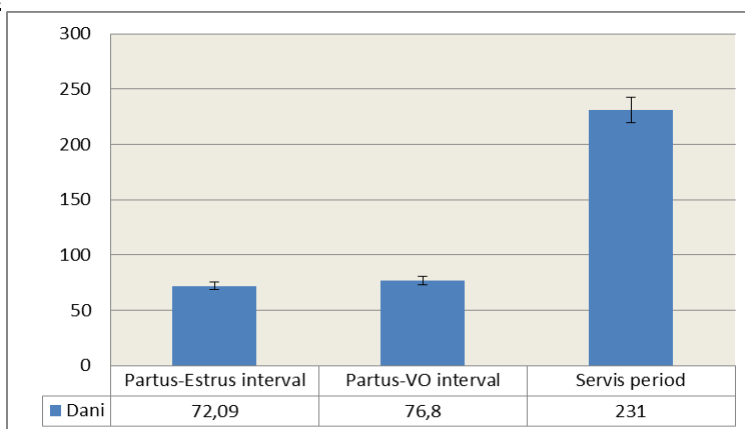
REZULTATI

Tabela 1. Odnos kategorija krava u istraživanju

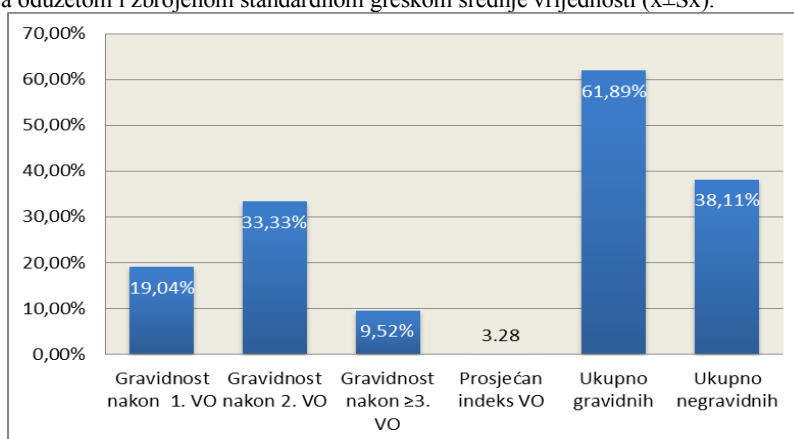
	Ukupno
Prvotelke	n=25
Višetelke	n=29
Normalan puerperium	n=33
Abnormalan puerperium	n=21

REPRODUKTIVNI PARAMETRI

Експеримент

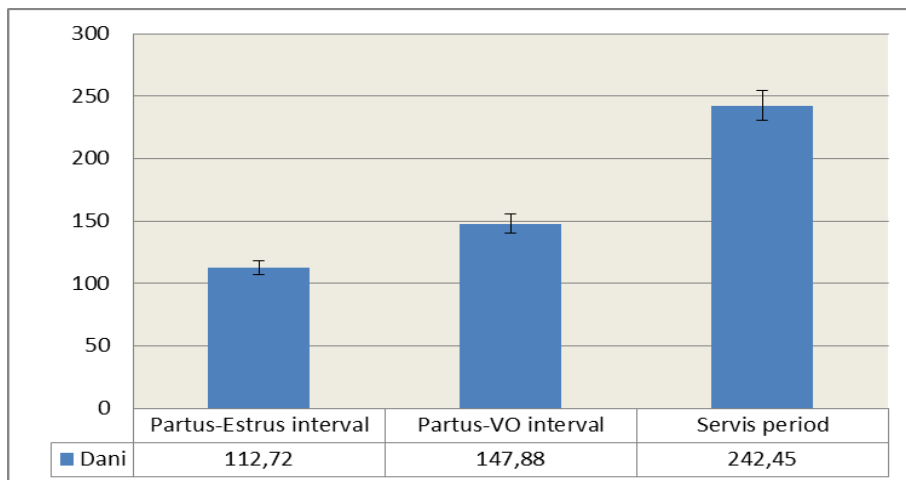


Grafikon 1. Vremenski interval u danima do prvog otkrivenog estrusa, vještačkog osjemenjavanja i dužine servis perioda dobijenih za sve krave unutar eksperimentalne grupe, kao i srednju vrijednost predstavljenih parametara sa oduzetom i zbrojenom standardnom greškom srednje vrijednosti ($\bar{x} \pm S_x$).

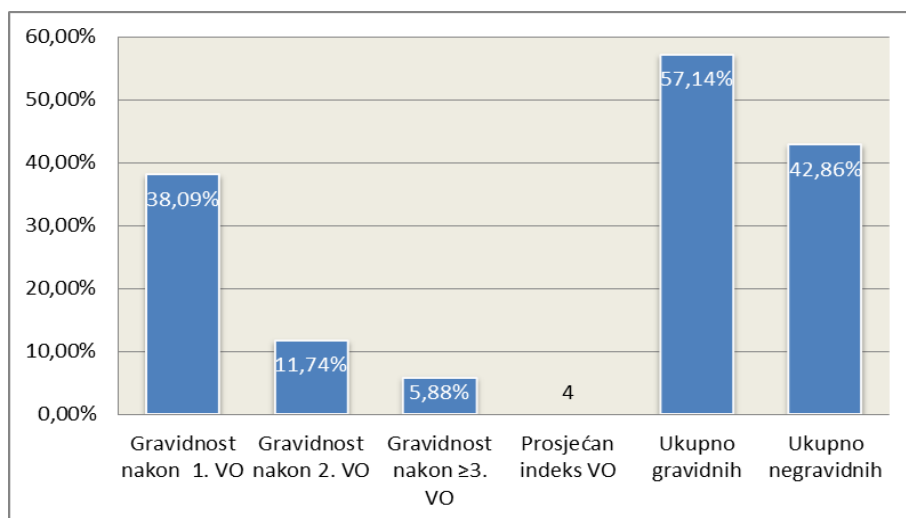


Grafikon 2. Procentualno zabilježena uspješnost 1., 2., $\geq 3.$ vještačkih osjemenjavanja koji se odnose na sve krave iz eksperimentalne grupe, sa prosječnim indeksom osjemenjavanja i procentom gravidnih i negravidnih krava do isteka istraživanja.

Kontrola



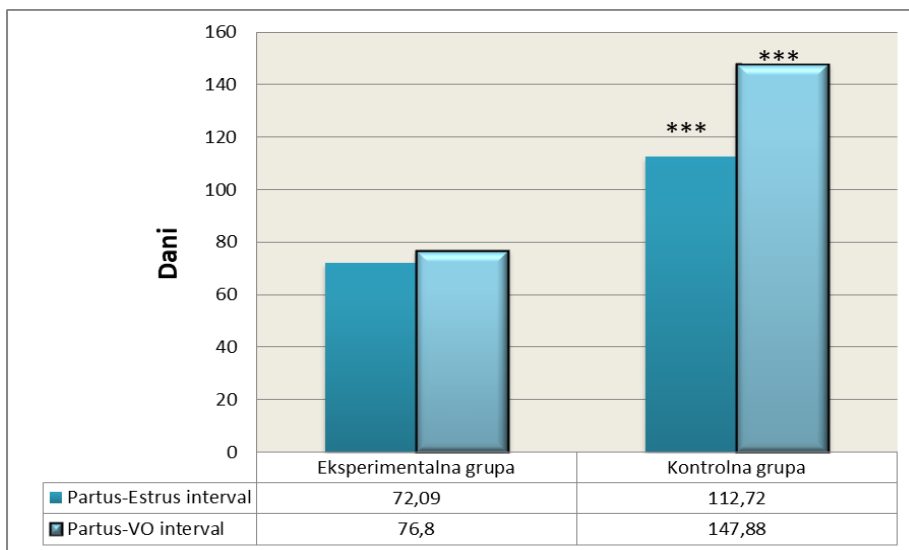
Grafikon 3. Vremenski interval u danima do prvog otkrivenog estrusa, vještačkog osjemenjavanja i dužine servis perioda za sve krave unutar kontrolne grupe, kao i srednju vrijednost predstavljenih parametara sa oduzetom i zbrojenom standardnom greškom srednje vrijednosti ($\bar{x} \pm Sx$).



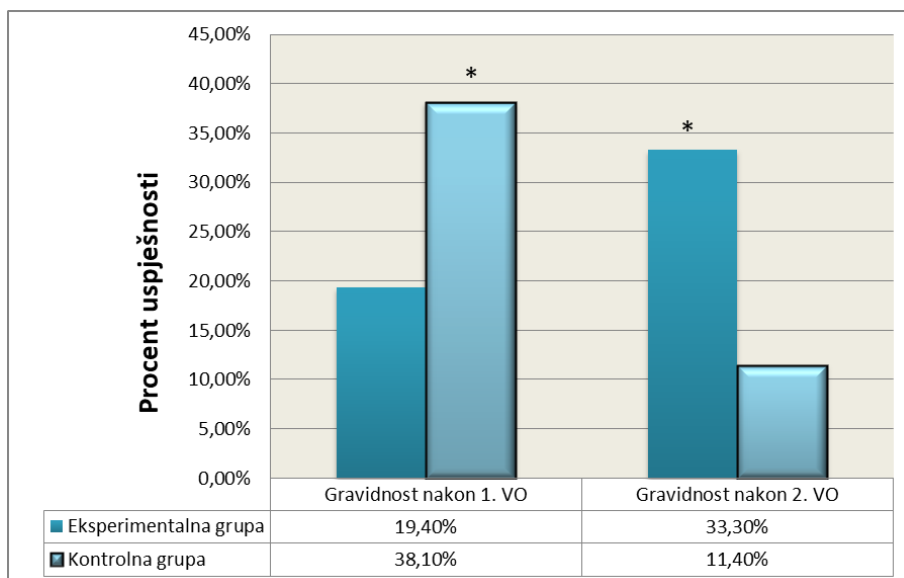
Grafikon 4. Procentualno zabilježena uspješnost 1., 2., $\geq 3.$ vještačkih osjemenjavanja koji se odnose na sve krave iz kontrolne grupe, sa prosječnim indeksom osjemenjavanja i procentom gravidnih i negravidnih krava do isteka istraživanja.

Čengić i sar:

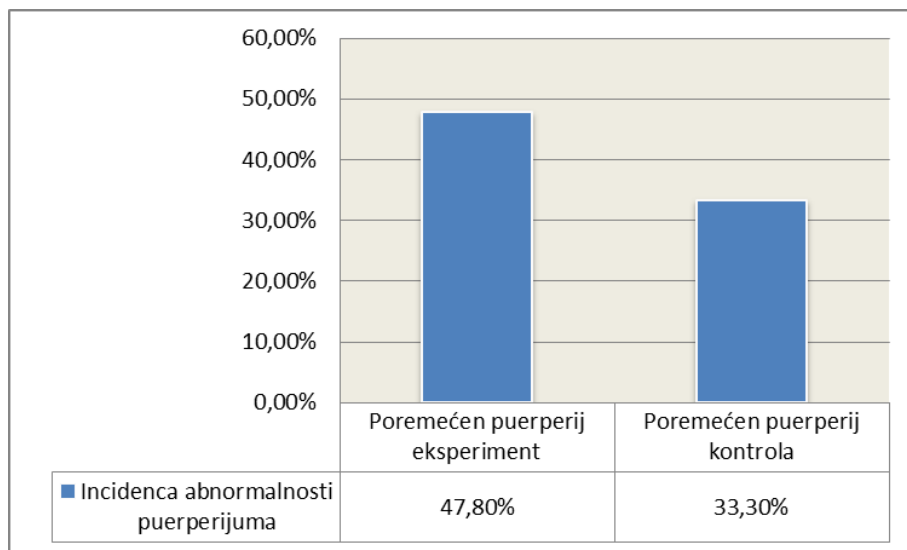
Uspješnost protokola sinhronizacije estrusa i ovulacije kod mliječnih krava u ljetnom periodu



Grafikon 5. Stubičasti grafikon predstavlja odnos dužine prvog uočenog vremenskog intervala partus-estrus i dužine intervala partus – vještačko osjemenjavanje između eksperimentalne i kontrolne grupe. Stupci sa *** ($p < 0,001$) su statistički izrazito visoko signifikantni



Grafikon 6. Procentualni odnos uspješnosti 1. i 2. vještačkog osjemenjavanja sa signifikantnom razlikom između njih. Stupci sa * ($p < 0,05$) su statistički signifikantni.



Grafikon 7. Stubičasti grafikon predstavlja procentualni međuodnos u zbirnoj pojavi abnormalnosti puerperijuma, različite etiologije između istraživanih grupa krava.

OCJENA TJELESNE KONDICIJE

Tabela 2. Prikaz statusa tjelesne kondicije u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi u periodu prvog osjemenjavanja postpartum

Grupa	Dani	Debljina (mm)	BCS
Eksperimentalna	77	19,9	3
Kontrolna	148	23,8	3,5

Izražajnost šepavosti na farmi

Tabela 3. Procentualni odnos prisutnosti šepavosti krava na cijeloj farmi, obavljenog na početku istraživanja, pomoću „Zinpro Locomotion Score“ metode. Najviše slučajeva je bilo kategoriji 2 i 3, kao i u samim oglednim grupama

Prisustvo šepavosti prema „ZLS“ ocjeni	1	2	3	4	5
%	1,13	59,2	36,26	3,11	0,28
Brojčano	4	210	128	11	1

Tabela 4. Prikaz procentualnog odnosa graviditeta između grupa na kraju perioda istraživanja

	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa
Gravidnost prvotelki	63,6 %	71,4 %
Gravidnost višetelki	60 %	50 %

DISKUSIJA

Holštajn-Frizijska pasmina goveda generalno ima niži uspjeh prvog vještačkog osjemenjavanja u odnosu na križance i druge pasmine mliječnih krava (*Inchaisry et al.*, 2010). Koncepcija nakon prvog VO sa 60-67 dana postpartum je dvostruko veća u hladnim mjesecima nego u toplim (45% zimi i 22% ljeti) (*Benmrad and Stevenson*, 1986)

Krave koje su osjemenjene u estrusu nakon 75 dana postpartum imaju bolju koncepciju od onih osjemenjenih 60-75 dana ili ranije (*Jordan et al.*, 2002)), što je vjerovatno rezultat normalne uspostave cikličnih događaja, eliminacije kontaminanata i infekcije u uterusu, završetak vrhunca laktacije i postizanja poželjnog BCS. Sinhronizacijom osjemenjavanja postpartum broj gravidnih životinja je moguće podizati slijedećim redoslijedom: do 81 dan 26.1%, do 102 dana 39.8%, do 123 dana 50.1% i do 144 dana 59.2% (*Jordan*, 2002). Uzimajući u obzir da su eksperimentalne krave osjemenjivane sa prosječno 77 dana postpartum sa uspješnošću od 19%, drugi put sa 128±1 dana sa uspješnošću od 33%, a dok je uspjeh prvog osjemenjavanja u kontrolnoj grupi bio sa 148 dana 38%, govori o sličnom šablonu rasta koncepcije. Krave koje se osjemenjavaju u uočenom estrusu, bolje je osjemenjavati što kasnije u laktaciji radi bolje koncepcije i ekonomičnosti osjemenjavanja, dok ako se to želi otpočeti ranije, bolje je primijeniti protokol sinhronizacije estrusa i ovulacije (*Jobst et al.*, 2000, *Tenhagen et al.*, 2004).

U dobrom menadžmentu gdje se uzima u obzir dobrobit životinja reflektirana kroz pojavu šepavosti i status tjelesne kondicije, moguće je postići da uspješnost osjemenjavanja do 100 dana postpartum kod prvotelke bude do 69%, a višetelke do 63%, a do 180 dana prvotelke do 88% i višetelke do 92% (*Sakaguchy et al.*, 2004), sa čim se slažu i neki drugi istraživači (*Stevenson et al.*, 1996). U našem slučaju postoje određena podudaranja sa Sakaguchijem u pogledu prvotelke koje su u obje grupe imale

višu koncepciju u odnosu na višetelke, a koja je u kontrolnoj grupi bila znatno izražajnije. U nekim istraživanjima pokazalo se da je koncepcija najbolja kada se krave osjemenjavaju sa 90-110 dana postpartum (*Waters et al.*, 2009) što predstavlja vrijeme kada su krave van perioda vrhunca laktacije, ali i period kada su trebale postići zadovoljavajući BCS, jer česta je pretpostavka da NEB u ranoj laktaciji negativno utiče na kvalitet oocita čak i do prvih 80-100 dana laktacije i time smanjujući koncepciju u prvih nekoliko osjemenjavanja (*Patton et al.*, 2006). U načelu, VO u estrusu u odnosu na vremenski fiksno osjemenjavanje daje bolju koncepciju ali i nastaje i više embrionalnih uginuća (*Stevenson et al.*, 1999).

U periodu do 120 dana laktacije, koncepcija je do 40% i na tom se nivou dalje i zadržava (*Thatcher et al.*, 2000). Sa rezultatima Thatchera se podudaraju i naši rezultati u slučaju kontrolne grupe, gdje je koncepcija nakon prvog osjemenjavanja poslije 120 dana bila 38%. Krave koje u momentu osjemenjavanja imaju BCS ≥ 2.75 ostaju gravidne u većem procentu (*Lima et al.*, 2009), što se primjećuje u kontrolnoj grupi koja je prilikom prve inseminacije imala BCS 3,5 i uspješnost koncepcije od 38%, što govori o izraženosti potrebe za uspostavom protokola procjene BCS prije programa inseminacije.

Za očekivati je da koncepcija nakon prvog osjemenjavanja bude u granicama 43-45% za krave koje su imale normalan puerperij i 15-24% za krave sa poremećajima puerperija (*Stevenson et al.*, 1989). Uzimajući u obzir da je praćenjem zdravstvenog stanja, utvrđeno da su poremećaji puerperija bili dosta učestali u obje grupe, razumljiva je niža koncepcija, naročito u nakon prvog osjemenjavanja u eksperimentalnoj grupi. Holštajn-Frizijska goveda imaju nižu uspješnost nakon prvog osjemenjavanja (*Inchaisry et al.*, 2010), naročito u mjesecima jun i jul, ali i da prvotelke imaju veću šansu da ostanu gravidne.

U mjesecima jun i jul je potrebno naglasiti da se kod *bos taurus* krava u stadij morule razvija se samo $6\pm 14,8\%$ embrija, a u hladnom $46,6\pm 12,5\%$ (Rocha et al., 1998). Sa ovim se slažu i drugi istraživači (Stevenson et al., 1996), a u konačnici bez obzira što je nakon prvog osjemenjavanja koncepcija bila bolja u višetelki, najviše gravidnih krava na kraju istraživanja su bile prvotelke, što se podudara sa njegovim tvrdnjama (Stevenson et al., 2012). Bolji rezultati presinhronizacije i sinhronizacije estrusa i ovulacije i manje embrionalnih uginuća se uočava ako je *corpus luteum* bio prisutan na ovarijama na početku hormonalnog tretmana (Sterry et al., 2006), što u našem istraživanju nije ustanovljavano. Anestrične krave podvrgnute hormonalnom protokolu i dalje imaju povećan embrionski mortalitet (15%) (Gumen et al., 2003, McDougal, 2010, Santos et al., 2009). Ove činjenice govore o važnosti potrebe za ustanovljavanjem ovarijalnog statusa uoči početka sinhronizacijskih protokola, zbog čega je i korišten protokol COS72, jer osjemenjavanje neposredno nakon zadnje GnRH aplikacije ima najnižu embrionalnu smrtnost (Pursley et al., 1998).

Sa prethodno navedenim se vjerovatno moramo složiti, jer u COS72 protokolu kojim je obavljeno drugo fiksno osjemenjavanje, bilo je najviše gravidnih krava, gdje bi razlog mogao biti smanjenje embrionalne smrtnosti, ali treba imati u vidu da je tad osjemenjavanje rađeno resinhronizacijom i to u periodu 128 ± 1 dana postpartum. Ovaj je protokol rađen u julu, gdje bi zbog visokih temperatura trebalo očekivati višu embrionalnu smrtnost, međutim koncepcija je bila zadovoljavajuća. Kada je rektalna temperatura 40°C kao rezultat izloženosti višim dnevnim vrućinama od $\geq 32^{\circ}\text{C}$, koncepcija pada na 0%, u poređenju sa koncepcijom od 48% kada je dnevna temperatura do 21°C , a rektalna $38,5^{\circ}\text{C}$ (Jordan, 2003). Uprkos hormonalnim aplikacijama i drugi istraživači (Pursley et al., 1998) su u periodu maj do septembar imali nisku koncepciju koja je bila prosječno od 4,5% do 20% ili prosječno 13,9%, dok su im kontrolne

grupe imale dosta slabije rezultate od 4,8%, gdje je do 120 dana postpartum ostalo gravidno oko 27%, a u kontrolama 16,7% krava. Ovakvi padovi koncepcije na povišenim temperaturama čini se da su imali znatnog uticaja na nižu koncepciju krava osjemenjanih u junu i julu mjesecu, jer i toplotni stres danima prije osjemenjavanja negativno utiče na plodnost, a kasnije kroz embriogenezu i to najviše u prvih 7 dana, ali i kasnije (6-14), dok se štetni efekti toplotnog stresa smanjuju kako se embrij dalje razvija (Hansen and Arechiga, 1999). Krave u kontrolnoj grupi su imale znatno veći uspjeh u koncepciji nakon prvog osjemenjavanja postpartum, ali se ono desilo znatno kasnije u nešto hladnijim mjesecima, tako da je procenat gravidnih i negravidnih krava u konačnici bio sličan u obje grupe.

Presinhronizacija estrusa sa dvije aplikacije prostaglandina u razmaku od 14 dana i početak protokola fiksnog osjemenjavanja 12-14 dana kasnije je razvijen da se poveća broj gravidnih krava nakon osjemenjavanja (Galvao et al., 2007). Krave na kraju sinhronizacijskih protokola trebalo bi da ovuliraju do 92%, ako su reagovale na prvi GnRH i 79% ako nisu reagovale (Vasconelos et al., 1999). Skraćanjem vremena presinhronizacije prostaglandinima sa 14 na 11 dana i perioda od prve GnRH injekcije do prve aplikacije prostaglandina sa 7 na 5 dana i njenim ponavljanjem 6. dana protokola pojačava se luteolitički efekt (Ricarda et al., 2009). Jači luteolitički efekt se očitovao i u našem radu, jer su u svih eksperimentalnih životinja dan fiksnog VO uočeni znaci estrusa. Sinhronizacijom estrusa i ovulacije rezultati prikazuju višu koncepciju kod krava koje su u vrijeme osjemenjavanja ispoljavale znakove estrusa (45.8%) u odnosu na krave bez znakova estrusa (35.4%) (Jordan et al., 2002).

Postupkom presinhronizacije sa prostaglandinima i modifikacijama ovsyncha (synchronisation of ovulation), radi prvog osjemenjavanja postpartum moguće je dobiti cikličnost od 80-90% (Rocha et al., 1998) i 43.3-45.1% gravidnih krava (Galvao et al., 2007,

Navanukraw et al., 2004, *Ribeiro et al.*, 2011), što se i pokazalo u protokolu COS72 koji je rezultirao sa više gravidnih krava. Upotreba presynch + Ovsynch protokola je vjerovatno najjeftiniji i najefikasniji način da se veliki broj krava pripremi za prvo osjemenjavanje postpartum i koncipira (*Stevenson et al.*, 2001), ali na osnovu uvida u zdravstveni status krava u vlastitim rezultatima mišljenja smo da treba ispuniti i brojne preduslove iz reproduktivnog ali i zdravstvenog menadžmenta.

Sinhronizacija estrusa i ovulacije bi trebala da ima uočljive pozitivne efekte na reproduktivne performanse mliječnih krava (*Stevenson*, 2001), ali u našem slučaju presinhronizacijski i sinhronizacijski protokol (5dCOS2) nisu značajnije pomogli u poboljšanju koncepcije nakon prvog osjemenjavanja postpartum, ali se

čini da je bilo pozitivnog efekta nakon drugog fiksnog osjemenjavanja (COS72) u vidu smanjenja embrionalnog mortaliteta u ljetnom mjesecu, kada je on izražajniiji. U analizi uspješnosti, treba uzeti u obzir da je COS72 protokol rađen nakon više od 4 mjeseca postpartum, da je u pitanju bila resinhronizacija i da je prethodni protokol vjerovatno imao uticaja u dizanju nivoa P4 koji su pozitivno djelovali na dominantne folikule, te je posljedično došlo do bolje koncepcije i manje embrionalnih uginuća. Nema ni izraženih razlika u ukupnom broju gravidnih krava između dvije ispitivane grupe, što govori o negativnom uticaju svih drugih faktora menadžmenta na proizvodnju svih krava u uzgoju, bez obzira na broj i stadij laktacije.

ZAKLJUČCI

U problematičnim stadima ne započinjati programe vještačkog osjemenjavanja prije isteka 90 dana laktacije, radi eliminacije većine negativnih faktora, koji im smanjuju uspješnost. Presinhronizacija uoči sinhronizacije je poželjna prilikom uvođenja velikog broja krava u program prve postpartum inseminacije, dok kod krava koje ne ostanu gravidne nakon prvog vještačkog osjemenjavanja, dovoljna je resinhronizacija odabranim protokolom, a upotrebom ovsynch i modificiranih ovsynch protokola dolazi do izjednačavanja omjera gravidnih prvotelki i višetelki.

Nakon vještačkog osjemenjavanja više ostaje

gravidno prvotelki, međutim one imaju i duži servis period radi čestih poremećaje puerperija, te upotreba protokola sinhronizacije estrusa i ovulacije poput COS72, daje zadovoljavajuće rezultate u ljetnom periodu, kod krava sa ≥ 120 dana postpartum.

Preduvjeti za uspješan program vještačkih osjemenjavanja su dobar BCS, opšti zdravstveni status, smanjenje šepavosti, eliminacija toplotnog stresa u skladu s lokacijom i dizajnom farme, jer negativni uticaji okoliša i propusti u menadžmentu značajno snižavaju uspjeh prvog, ali i kasnijih vještačkih osjemenjavanja i dovode do rasta servis perioda.

LITERATURA

1. Benmrad J. M. and Stevenson J.S. (1986): Gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 α to postpartum dairy cows: estrus, ovulation and fertility traits. *Journal of Dairy Sciences* Vol. 69, No. 3.
2. Benzaquen M.E., Risco C.A., Archbald L.F., Melendez P., Thatcher M.J., Thatcher W.W. (2007): Rectal temperature, calving-related factors and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 2804-2814.
3. Butler W.R. (1998): Symposium: Optimizing protein nutrition for reproduction and lactation; Review: Effects of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal*

- of Dairy Science Vol. 81, No. 9.
4. Cordoba M.C., Fricke P.M. (2001): Evaluation of two hormonal protocols for synchronisation of ovulation and timed artificial insemination in dairy cows managed in grazing-based dairies. *J. Dairy Sci.* 84: 2700-2708.
 5. D. Wolfenson, B.J. Lew, W.W. Thatcher, Y. Graber, R. Meidan. (1997): Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows *Animal Reproduction Science* 47, 9-19.
 6. Ettema J.F., Santos J.E.P. (2004): Impact of age at calving on lactation, reproduction, health and income in first parity Holsteins in commercial herds. *J. Dairy Sci.* 87.
 7. Galvao K.N., Filho M.S., Santos J.E.P. (2007): Reducing the interval from presynchronisation to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J. dairy Sci.* 90: 4212-4218.
 8. Gumen A., Guenther J.N., Wiltbank M.C. (2003): Follicular size and response to ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating cows. *J. Dairy Sci.* 86: 3184-3194.
 9. Harrison R.O., Ford S.P., Young J.W., Conley A.J., Freeman A.E. (1990): Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. *Journal of dairy Science* Vol. 73, No. 10.
 10. Inchaistry C., Hogeveen H., Vos P.L.A.M., Weijden G.C., Jorritsma R. (2010): Effect of milk yield characteristics, breed and parity on success of the first insemination in Dutch dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93.
 11. Jobst S.M., Nebel R.L., McGilliard M.L., Pelcer K.D. (2000): Evaluation of reproductive performance in lactating dairy cows with prostaglandin F_{2α}, Gonadotropin-releasing hormone and timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science* Vol. 83, No. 10.
 12. Jordan E.R. (2003): Effects of heat stress on reproduction. *J. Dairy Sci* 86.
 13. Jordan E.R., Schouten M.J., Quast J.W., Belschner A.P., Tomaszewski M.A. (2002): Comparison of Two Timed Artificial Insemination (TAI) Protocols for Management of First Insemination Postpartum. *J. Dairy Sci.* 85:1002–1008.
 14. J. Richard Pursley, Jeffrey Stevenson, Ernest Minton. (1993): Ovarian follicular waves in dairy cows after administration of gonadotropin releasing hormone at estrus *J. Dairy Sci.* 76, 2548-2560.
 15. Kawashima C., Kida K., Schweigert F.J., Miyamoto A. (2009): Relationship between plasma β-carotene concentrations during the peripartum period and ovulation in the first follicular wave postpartum in dairy cows. *Animal Reproduction science* 111, 105-111.
 16. L.B. Hansen. (2000): Symposium: Selection for milk yield. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. *J. Dairy Sci.* 83, 1145-1150.
 17. Lima F.S., Risco C.A., Thatcher M.J., Benzaquen M.E., Archbald L.F., Santos J.E.P. (2009): Comparison of reproductive performance in lactating dairy cows bred by natural service or timed artificial insemination. *J. dairy Sci.* 92: 5456-5466.
 18. McDougall S. (2010): Effects of treatment of anestrus dairy cows with gonadotropin -releasing hormone, prostaglandin and progesterone. *J. Dairy Sci.* 93: 1944-1959.
 19. Montiel F., Ahuja C. (2005): Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. *Animal Reproduction Science* 85, 1-26.
 20. Navanukraw C., Redmer D.A., Reynolds L.P., Kirsch J.D., Grazul-Bilska A.T., Fricke P.M. (2004): A modified presynchronisation protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 1551-1557.
 21. Patton J., Kenny D.A., Mee J.F., O'Mara F.P., Wathes D.C., Cook M., Murphy J.J. (2006): Effect
-

- of milking frequency and diet on milk production, energy balance and reproduction in dairy cows. *J. dairy Sci.* 89: 1478-1487.
22. Peters M.W., Pursley J.R. (2002): Fertility of lactating dairy cows treated with ovsynch after presynchronisation injections of PGF 2α and GnRH. *J. Dairy Sci.* 85: 2403-2406.
 23. P.J. Hansen, C.F. Arechiga. (1999): Strategies for managing reproduction in the heat stressed dairy cow *Journal of Animal Science* 77.
 24. Pursley J.R., Silcox R.W., Wiltbank M.C. (1998): Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss and gender ratio after synchronization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* Vol. 81, No. 8.
 25. Rabiee A.R., Lean I.J., Stevenson M.A. (2005): Efficacy of ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: A meta-analysis. *J. dairy Sci.* 88: 2754-2770.
 26. Reist M., Erdin D.K., Von Euv D., Tschümperlin K.M., Leuenberger H., Hammon H.M., Morel C., Philipona C., Zbiden Y., Künci N., Blum J.W. (2003): Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. *Theriogenology* 59, 1707-1723.
 27. Ribeiro E.S., Cerri R.L.A., Bisinotto R.S., Lima F.S., Silvestre F.T., Greco L.F., Thatcher W.W., Santos J.E.P. (2011): Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronisation and resynchronisation protocols. *Journal of Dairy Science* Vol. 94, No. 10.
 28. Ricarda Maria dos Santos, Marcelo Demarchi Goissis, David Augusto Fantini, Claudia maria Bertan, Jose luis Moraes Vasconcelos, Mario Binelli. (2009): Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F 2α synthesis in dairy cows. *Animal Reproduction science* 114, 62-71.
 29. Richard Pursley J., Silcox R.W., Wiltbank M.C. (1998): Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss and gender ratio after synchronisation of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* Vol. 81, No. 8.
 30. R.I. de la Sota, J.M. Burke, C.A. Risco, F. Moreira, M.A. DeLorenzo, W.W. Thatcher. (1998): Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle *Theriogenology* 49, 761-770.
 31. Rocha A., R.D. Randel, J.R. Broussard, J.M. Lim, R.M. Blair, J.D. Rousel, R.A. Godke, W. Hansel. (1998): High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows *Theriogenology* 49, 657-665.
 32. Santos J.E.P., Juchem S.O., Cerri R.L.A., Galvao K.N., Chebel R.C., Thatcher W.W., Dei C.S., Bilby C.R. (2004): Effects of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 868-881.
 33. Santschi D.E., Lefebvre D.M., Cue R.I., Girard C.L., Pellerin D. (2011): Incidence of metabolic disorders and reproductive performance following a short (35-d) or conventional (60-d) dry period management in commercial Holstein herds. *J. Dairy Sci.* 94: 3322-3330.
 34. Sakaguchi M., Sasamoto Y., Suzuki T., Takahashi Y., Yamada Y. (2004): Postpartum ovarian follicular dynamics and estrus activity in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 2114-2121.
 35. Stevenson J.S., Y. Kobayashi, K.E. Thompson. (1999): Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including ovsynch and combinations of gonadotropin releasing hormone and prostaglandin F 2α . *J. Dairy Sci.* 82.
 36. Stevenson J.S., Mee M.O., Stewart R.E. (1989): Conception rates and calving intervals after Prostaglandin F 2α or prebreeding progesterone in dairy cows. *Journal of dairy science* Vol. 72, No. 1.
 37. Stevenson J.S., Yasuhiro Kobayashi, Milan P. Shipka, Kevin C. Raucholz. (1996): Altering
-

- conception of dairy cattle by gonadotropin releasing hormone preceding luteolysis induced by prostaglandin F2 α . *J. Dairy Sci.* 79.
38. Stevenson J.S., Pulley S.L., Mellieon H.I. (2012): Prostaglandin F2 α and gonadotropin-releasing hormone administration improve progesterone status, luteal number and proportion of ovular and anovular dairy cows with corpora lutea before a timed artificial insemination program. *Journal of Dairy Sciences* Volume 95, Issue 4, 1831-1844.
 39. Sterry R.A., Welle M.L., Fricke P.M. (2006): Treatment with Gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 4237-4245.
 40. Santos J.E.P., Rutigliano H.M., Filho M.F. (2009): Risk factors for resumption of postpartum estrus cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 110, 207-221.
 41. Stevenson J.S. (2001): Reproductive management of dairy cows in high milk-producing herds. *J. Dairy Sci* 84.
 42. Tenhagen B.A., Drillich M., Surholt R., Heuwieser W. (2004): Comparison of timed AI after synchronised ovulation to AI at estrus: Reproductive and economic consideration. *J. Dairy Sci.* 87:85-94.
 43. Thatcher W.W., C. Risco, M.F.A. Pires, J.D. Ambrose, M. Drost, M. DeLorenzo. (2000): Effect of body condition on reproductive efficiency on lactating dairy cows receiving timed insemination. *Theriogenology* 53.
 44. Vasconelos J.L.M., Silcox R.W., Rosa G.J.M., Pursley J.R., Wiltbank M.C. (1999): Synchronisation rate, size of ovulatory follicle and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrus cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52.
 45. Walch S., Buckley F., Pierce K., Byrne N., Patton J., Dillon P. (2008): Effects of breed and feeding system on milk production, body weight, body condition score, reproductive performance and postpartum ovarian function. *J. Dairy Sci.* 91: 4401-4413.
 46. Watters R.D., Wiltbank M.C., Guenther J.N., Brickner A.E., Rastani R.R., Fricke P.M., Grummer R.R. (2009): Effects of dry period length on reproduction during the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 92: 3081-3090.
 47. Xu Z.Z. And Burton L.J. (2000): Estrus synchronisation of lactating dairy cows with GnRH, progesterone and Prostaglandin F2 α . *Journal of Dairy Science* Vol. 83, No. 3.
 48. Yaser M. Al-Katanani, D.W. Webb, P.J. Hansen. (1999): Factors affecting seasonal variation in 90 day nonreturn rate to first service in lactating holstein cows in hot climate. *J Dairy Sci* 82, 2611-2616.

Rad primljen: 07.10.2018.

Rad prihvaćen: 08.1.2019.
