

Проф. др Тони Довенски
Проф. др Бранко Атанасов

Проф. др Милан Малетиќ
Науч. сор. Др Љупчо Мицков

СИНХРОНИЗАЦИСКИ ПРОТОКОЛИ ВО МЛЕЧНОТО ГОВЕДАРСТВО

Скопје, 2024.

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ - СКОПЈЕ
ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА - СКОПЈЕ



проф. д-р ТОНИ ДОВЕНСКИ
проф. д-р БРАНКО АТАНАСОВ
проф. д-р МИЛАН МАЛЕТИЌ
науч. сор. ЉУПЧО МИЦКОВ

СИНХРОНИЗАЦИСКИ ПРОТОКОЛИ ВО МЛЕЧНОТО
ГОВЕДАРСТВО

Учебно помагало

Скопје, 2024

Наслов

СИНХРОНИЗАЦИСКИ ПРОТОКОЛИ ВО МЛЕЧНОТО ГОВЕДАРСТВО

Автори

д-р Тони Довенски, редовен професор, Катедра за репродукција, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
д-р Бранко Атанасов, вонреден професор, Катедра за репродукција, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
д-р Милан Малетиќ, вонреден професор, Катедра за породилство, стерилитет и вештачко осеменување, Факултет за ветеринарна медицина - Белград, Универзитет во Белград, Р Србија
д-р Љупчо Мицков, виш научен соработник, Катедра за репродукција, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Рецензенти

д-р Слободанка Вакањац, редовен професор, Катедра за породилство, стерилитет и вештачко осеменување, Факултет за ветеринарна медицина - Белград, Универзитет во Белград, Р Србија
д-р Владимир Петков, редовен професор, Катедра за Функционална морфологија, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Издавач

Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Уредник

д-р Бранко Атанасов, вонреден професор, Катедра за репродукција, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Лектор

Дијана Ристова

Илустратор

Игор Улчар

Печатница:

Графопром ДООЕЛ Битола

CIP - Каталогизација во публикација
Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје
636.2.082.4(076)

СИНХРОНИЗАЦИСКИ протоколи во млечното говедарство: учебно помагало / Тони Довенски ... [и др.] ; [илустратор Игор Улчар]. - Скопје: Универзитет "Св. Кирил и Методиј" во Скопје, Факултет за ветеринарна медицина, 2024. - 48 стр.: илустр.; 29 см

Други автори: Бранко Атанасов, Милан Малетиќ, Љупчо Мицков. - Библиографија: стр. 44-48

ISBN 978-9989-774-44-7

1. Довенски, Тони [автор] 2. Атанасов, Бранко [автор] 3. Малетиќ, Милан [автор] 4. Мицков, Љупчо [автор]

а) Крави -- Репродуктивна ефикасност -- Синхронизациски протоколи --
Прирачници

COBISS.MK-ID 64880133

Тираж: 30 примероци

СОДРЖИНА

1. Вовед.....	4
2. Синхронизација на еструсот.....	6
2.1 Концепт на развој на фоликулински бранови.....	6
3. Методи на контрола на естралниот циклус.....	16
3.1 Скратување на естралниот циклус со употреба на простагландини PGF2α.....	16
3.1.1 Простагландини F2α (PGF2α).....	16
3.1.2 Употребата на простагландините во синхронизацијата на еструсот.....	17
3.1.3 Синхронизација на еструсот со еднакратна апликација на PGF2α.....	18
3.1.4 Синхронизација на еструсот со двократна апликација на PGF2α.....	20
3.1.5 Фактори кои го лимитираат успехот на синхронизацијата на еструсот со употреба на PGF2α.....	22
4. Продолжување на естралниот циклус преку употребата на прогестагенски импланти	24
4.1 Употребата на прогестагените во синхронизација на еструсот.....	25
4.2 Предности и недостатоци на прогестагените при синхронизацијата на еструсот.....	25
5. Синхронизација на еструсот и овулација со комбинација на синтетски гонадодропен рилизинг хормон (GnRH) и простагландини F2α.....	28
5.1 Предности и недостатоци при имплементацијата на OV-synch протоколот при синхронизација на овулацијата.....	31
6. Ресинхронизација на еструсот и овулацијата.....	40
7. Литература.....	44

1. ВОВЕД

Профитабилноста и економската оправданост на краварски фарми за производство на млеко, првенствено зависат од репродуктивната ефикасност на кравите. Максималната репродуктивна ефикасност, на фармерите би им овозможила зголемување на бројот на кравите во стадото, продолжување на нивниот продуктивен и профитабилен животен век со истовремена зголемена продукција на млеко, зголемен број на новородени телиња годишно, а со тоа разбирливо и намалено несакано присилно колење.

Индивидуално, секоја крава *post partum*, со цел достигнување на максималната продуктивност и профитабилност, треба да биде вклучена во едно совршено смислено сценарио: да започне со циклична активност во раниот постпартален (постпородилен) период, да биде осеменета и да остане gravidна во период од 85 до 90 дена по отелувањето, што последователно неминовно ќе доведе до достигнување на препорачаниот едногодишен меѓутелидбен период. Меѓутоа, во последниве години, многубројните истражувања сведочат за намалена репродуктивна ефикасност кај високопродуктивните крави како резултат на намалената концепција. Причините поврзани со намалувањето на плодноста (концепцијата) кај овие крави се насочени првенствено кон интензивната генетска селекција на кравите за зголемена продукција на млеко. Показано е постоење на многу неповолна корелација помеѓу зголеменото производство на млеко и плодноста, иако треба да се напомене дека и други одредени фактори во склоп со зголеменото производство на млеко се инволвирани во репродуктивната психологија на млечните крави. Така на пример, намалената експресија на видливите знаци на еструс и намалениот степен на негова детекција, зголемениот метаболизам на стероидните хормони, зголемената близност, раната ембрионална смртност се вбројуваат како причини кои влијаат и доведуваат до намалена плодност кај високопродуктивните грла.

Без разлика на причината, намалената концепција доведува до продолжен сервис период (интервал од денот на отелување до денот на повторна концепција), што пак од своја страна доведува до зголемен меѓутелидбен интервал. Зголемениот меѓутелидбен период го намалува процентот на крави кои се во врвот на продукцискиот период, го намалува вкупното количество на млеко во стадото и бројот на живодобиени телиња на годишно ниво, што севкупно резултира во намален профит на фармерот.

Токму затоа, економската корист од високопродуктивните крави треба да биде базирана врз скратување на меѓутелидбениот интервал преку имплементација на ефективни хормонски методи кои го регулираат/контролираат естралниот циклус, го зголемуваат степенот на детекција на еструсот, го максимализираат бројот на вештачко осеменети крави, што последователно би требало да резултира со зголемена концепција.

Потребите за имплементирање на нови методи за зголемување на економската оправданост на млечните фарми ги предизвика повеќето научни работници, во последниве години, да се фокусираат на развој на разни модерни технологии, сè со цел достигнување на висока репродуктивна ефикасност и подобрување на генетската вредност на стадата. Некои од овие технологии вклучуваат: ултрасонографија, синхронизација на еструсот и овулацијата, вештачко осеменување, производство на сексирано семе, ин витро производство на ембриони и ембрио трансфер. Меѓу нив, синхронизацијата на еструсот и овулацијата, ултрасонографијата, вештачкото осеменување и ембриотрансферот се најшироко и најпотребувани биотехнологии, не само кај млечните туку и кај товните раси на говеда.

2. СИНХРОНИЗАЦИЈА НА ЕСТРУСОТ

Под синхронизација на еструсот се подразбира манипулација на естралниот циклус или индукција на еструс, со цел поголем процент на женски животни да се воведат во еструс во пред одредено време, со што би се овозможило подобрување на продуктивната ефикасност на животните и поголема економска корист на фармерите. Генерално, синхронизациските протоколи кај цикличните животни се употребуваат за временска контрола на почетокот на еструсот преку контрола на должината на естралниот циклус.

Естралниот циклус кај кравите може:

1. *да се скрати*, преку регресија на жолтото тело (CL) со употреба на простагландини $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) пред да настапи спонтана лутеолиза, или
2. *да се продолжи*, со администрација на прогестерон или синтетски прогестагени, со што привремено се супресира оваријалната активност и се спречува овулацијата.

Без разлика кој синхронизациски протокол ќе се имплементира, со цел подетален увид на механизмот на нивното делување потребно е познавање на физиолошките механизми кои ја регулираат фоликуларната динамика за контрола на репродуктивниот циклус кај кравите. Еден од главните физиолошки механизми за регулирање на фоликуларната динамика претставува концептот на развој на фоликулинските бранови.

2.1 Концепт на развој на фоликулински бранови

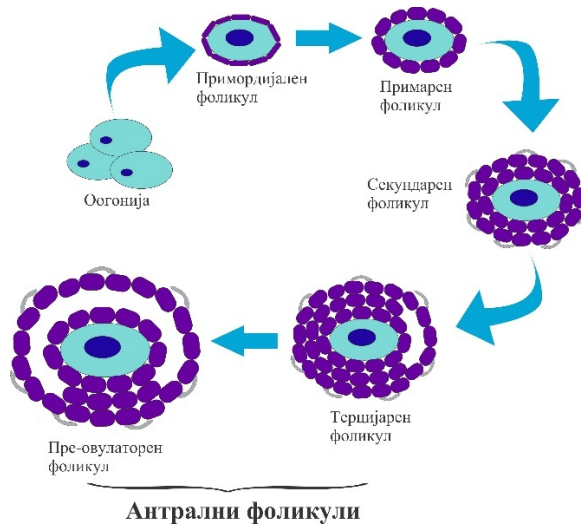
Растот и развојот на фоликулите (*фоликулогенеза*) претставува сложен и синхронизиран процес, каде активиран приморидијален фоликул се развива во предовулаторна големина, следен со раст и диференцирање на ооцитот и неговите опкружувачки кумулусни клетки. Јајниците содржат голем број на фоликули во различни фази на развој, а

всушност претставуваат мали меурести вреќички во кои се наоѓаат ооцитите (женските гамети т.е. јајце-клетките). Популацијата (резервоарот) на фоликули присутни на јајниците може да се подели на *нерастечка* и *растечка* популација на фоликули.

Нерастечката популација ја сочинуваат приморидијалните фоликули (ооцит опкружен со еден слој на предгранулоза клетки) присутни во текот на целиот репродуктивен живот.

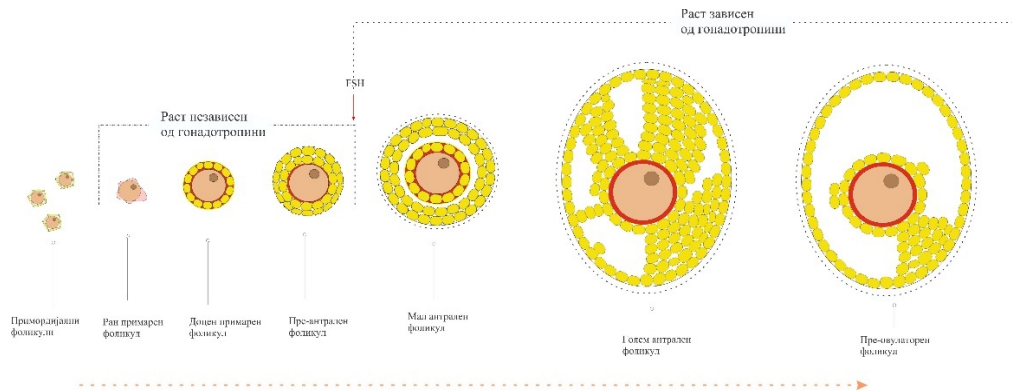
Растечката популација ја сочинуваат примарните, секундарните (предантрални) и терцијарните (антрални) фоликули и претставуваат лимитирана популација.

Со диферцирање на предгранулоза клетките во гранулоза клетки настанува трансформација на приморидијалниот фоликул во примарен фоликул кој се карактеризира со ооцит опкружен со 10 до 40 гранулоза клетки (слика 1). По неговата формација, примарниот фоликул преминува од *нерастечка* во *растечка* фаза на развој. Понатамошната пролиферацијата на гранулоза клетките овозможува зголемување на бројот на обвивки околу ооцитот што води кон формирање на секундарен фоликул. Во оваа фаза на развој, зона пелуцида сè уште не е формирана, но почнува диференцијација на клетките од тека интерна. Околу секундарниот фоликул гранулоза клетките продолжуваат со пролиферација што води кон комплетно формирање на зона пелуцида, со истовремена тотална диференцијација на тека интерна формирајќи го предантралниот фоликул. Следува формирање на антрум (шуплина) и диференцијација на тека екстерна и формирање на терцијарен-антрален фоликул. Завршно, антралниот фоликул, наречен уште *de Graaf*-ов фоликул (предовулаторен) е изграден од добро изразен антрум, внатрешен аваскулизиран слој на гранулоза клетки опкружен со базална мембрана, слој на тека интерна и надворешен слој на тека екстерна. За време на сите овие фази на развој, растот и на фоликулот и на ооцитот се одвиваат истовремено.



СЛИКА 1. Развојни стадиуми на фоликулите – фоликулогенеза

Кај говедата растот на антралните оваријални фоликули се одвива во две фази: бавна и брза растечка фаза. Бавната (првата) фаза трае > 30 дена, со раст на фоликулите од приближно 300 μm до достигнување на големина од 3 до 5 mm, кога фоликулите можат да се детектираат со ултразвук и е наречена независна фаза, бидејќи растот на фоликулите е независен од дејството на гонадотропните хормони FSH (фоликуло-стимулирачки хормон) и LH (лутеинизирачки хормон). Втората или брзата фаза која обично трае околу 7-10 дена, вклучува раст на фоликулите, селекција на доминантен фоликул, следена со негова овулација или регресија наречена зависна FSH и LH-фаза. Во оваа фаза антралниот фоликул расте до предовулаторна големина следена со негова овулација.



Слика 2 Фази на раст на антрални фоликули

Оваријалниот фоликулински раст кај кравите се одвива во вид на бранови. *Фоликулинскиот бран* е опишан како синхронизан развој на група на антрални фоликули 4-5 mm во големина (*регрутација*), при што еден фоликул е селектиран (*селекција*) да премине во доминантен (*доминација*), додека останатите т.н. субординантните подлежат на атрезија (*регресија*).

За време на естралниот циклус кај кравите се одвиваат најчесто два односно три фоликулински брана, иако постојат и репорти каде повремено се забележани и четири фоликулински брана кај *Bos Taurus* и *Bos indicus* говедата.

I. Прв бран

а) Прва фаза Регрутација

Регрутација означува почетно растење на група (најчесто 7-11) антрални фоликули со дијаметар од 4 mm кои континуирано растат 1 до 2 mm/ден за време од 2-3 дена во т.н. *заедничко-растечка фаза* како последица на зголемена FSH-концентрација. Иницијално, ваквото почетно растење е последица на претходно транзитно зголемување на концентрацијата на FSH кое трае околу 1 до 2 дена. Доколку експериментално или од кои било причини зголемувањето на FSH е спречено, тогаш регрутацијата изостанува или е одложена. После 2-4 дена од регрутацијата (2-риот, 3-тиот и 4-тиот ден од естралниот циклус) ултразвучно, можат да се детектираа фоликули со големина од 6 mm. Во оваа фаза на развој, на гранулоза клетките сè уште нема присуство на LH-рецептори.

б) Втора фаза - Селекција

За време на растечкиот бран, регрутираните фоликули подлежат на процес на селекција каде нормално еден фоликул се селектира и развива во доминантен фоликул, додека останатите фоликули подлежат на

атрезија. За разлика од регрутацијата, процесот на селекција коинцидира со намалена концентрација на FSH кој трае 2-3 дена и достигнува најниско ниво 10-24 часа после завршетокот на заедничко-растечката фаза. Како што секој фоликул е стимулиран да расте, истиот од своја страна придонесува до намалување на FSH преку продукција на естрадиол и инхибин. Зголемените концентрации на естрадиол и на инхибин (гликопротеин кој се синтетизира од гранулоза клетките) преку негативна повратна врска (спрега) ја супресираат FSH-синтезата од аденохипофизата предизвикувајќи концентрацијата на FSH да опадне на базално ниво. Токму поради ова својство, естрадиолот и инхибинот можат да се вбројат како главни регулатори на секрецијата на FSH. Намалената FSH-концентрација на крај доведува до пропаѓање на сите фоликули кои ја достигнале фазата на регрутација со исклучок на доминантниот фоликул. Само најголемиот фоликул од групата е во состојба да го продолжи својот раст по процесот на селекција.

Најчесто прифатена теорија за причините зошто само најголемиот фоликул е во состојба да го продолжи својот раст е затоа што е прв фоликул од гнездото на фоликули кој стекнал функционални LH-рецептори. Всушност, стекнувањето и/или присуството на LH-рецепторите на гранулоза клетките го предодредува фоликулот да стане доминантен и да се разликува од останатите регрутирани фоликули. Селектираниот фоликул станува зависен од LH-хормонот и продолжува да расте.

Стимулацијата на LH врз тека клетките е есенцијална за андрогенската синтеза овозможувајќи супстрат (прекурсор) за синтеза на естрадиолот, при што е забележано мало транзитно зголемување на LH околу фазата на селекција овозможувајќи континуиран прогрес во истовремен раст и синтеза на естрадиолот. Моментот при кој идниот доминантен фоликул го продолжува својот раст додека останатите (субординатните) фоликули го прекинуваат растот е означена како девијација, која се карактеризира со разлики во степенот на раст помеѓу доминантниот фоликул и субординатните фоликули. Кај говедата, девијацијата започнува кога најголемиот фоликул достигнува големина

од 8,5 mm во дијаметар, додека дијаметарот на вториот по големина фоликул е 7,7 mm или приближно 2,7 дена од почетокот на фоликулинскиот бран. Всушност, крајот на заедничко-растечката фаза и девијацијата означуваат ист процес и може да се изразат како синоними.

Откако ќе се селектира, како што претходно споменавме, доминантниот фоликул станува зависен од LH за негово понатамошно растење, зголемувајќи ја истовремено синтезата на естрадиолот. Аблацијата (отстранувањето) на најголемиот фоликул за време или непосредно пред крајот на заедничко-растечката фаза или на почетокот на девијацијата е следена преку воспоставување на доминантност од страна на вториот по големина фоликул, што може да се заклучи дека сите фоликули од заедничко-растечката фаза имаат потенцијал за идна доминантност.

в) Трета фаза **Доминација**

Фазата на доминацијата се карактеризира морфолошки со присуство на еден доминантен фоликул со приближен дијаметар од 12 до 17 mm, и отсуство на нов фоликулински бран. *Може да се дефинира од денот кога доминантниот фоликул достигнува големина поголема од 8,5 mm и/или кога разликата помеѓу доминантниот фоликул и вториот по големина фоликул не е помала од 2 mm.* Откако ќе се воспостави доминантност, доминантниот фоликул почнува да продуцира зголемени концентрации на естрадиол и инхибин кои предизвикуваат понатамошно намалување на серумската концентрација на FSH. Доколку развојот на доминантниот фоликул коинцидира со регресија на CL и намалување на концентрацијата на прогестеронот (P4), истиот може да овулира со големина од 12 до 20 mm. Доминантноста на фоликулот може да биде функционална и морфолошка, при што морфолошката трае подолго. Функционалната доминација се дефинира како способност на доминантниот фоликул да го спречи растот на субординатните фоликули, и има способност да овулира при соодветен хормонски третман и

соодветна фаза на фоликулинскиот развој. Сепак, доминантниот фоликул од овој бран, кај повеќето естрални циклуси подлежи на атрезија.

Генерално, првиот доминантен фоликул од естралниот циклус е детектибилен како еден од регрутираните фоликули со големина 2-5 mm еден ден после овулацијата. Се селектира помеѓу 2-от и 3-от ден од естралниот циклус, а станува доминантен помеѓу 4-от и 5-от ден. Максималниот дијаметар од 13 до 16 mm го достигнува помеѓу 6-от и 7-от ден од циклусот, при што следува период на стабилност помеѓу 6-от и 10-от ден. На крај ја намалува големината и не е повеќе визуелен до 15-от ден.

Општо е прифатено дека фазите на регрутација, селекција и доминација за првиот фоликулински бран почнуваат на 1-от и 3-от ден, 3-от и 6-от ден и 6-от и 8-от ден, последователно.

г) Атрезија на доминантниот фоликул

За време на првиот бран, зголемената секреција на прогестеронот од CL, предизвикува супресија на LH-пулсната фреквенција што од своја страна доведува до прекин на растот на доминантниот фоликул. Затоа, повеќето од фоликулите се предодредени на регресија, физиолошки процес познат под името атрезија. Атрезијата на субординатните фоликули настанува доста брзо кај секој фоликулински бран. Кај доминантниот фоликул, атрезијата вклучува редукција на ароматизационата активност и намалена синтеза на естрадиолот, зголемено присуство на врзувачки протеини за фактори слични на инсулинот, кулминирајќи во апоптоза на гранулоза клетките.

Атрезијата на оваријалните фоликули настанува со т.н. програмирана клеточна смрт, процес познат како апоптоза.

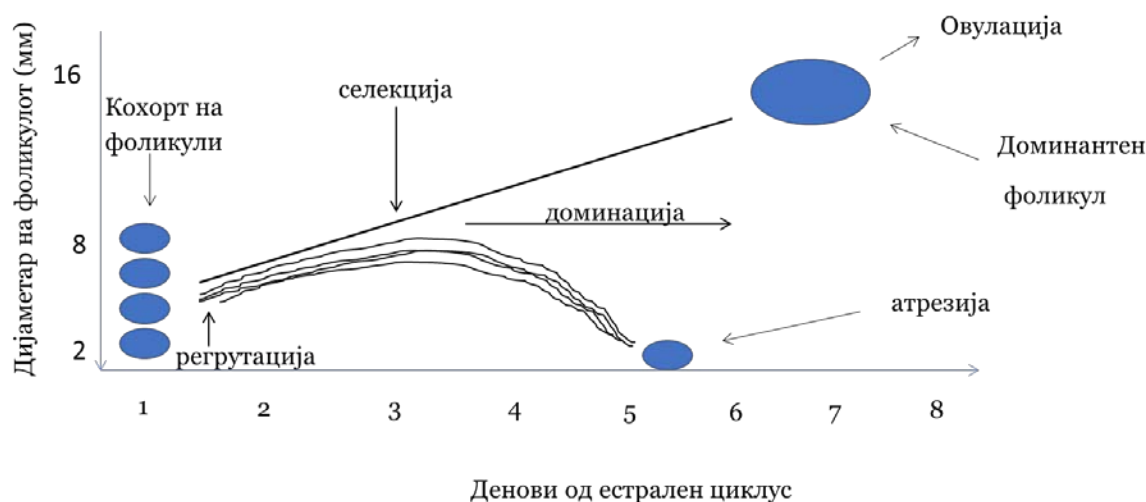
II. Втор бран

Губењето на доминантноста и настанатата атрезија на доминантниот фоликул од првиот бран е следена со намалување на концентрациите на естрадиол и инхибин, овозможувајќи нивото на FSH

повторно да се зголеми. Ваквото зголемување на нивото на FSH предизвикува нова регрутација на група на фоликули со последователна селекција и доминација на нов доминантен фоликул. Истовремено (кај циклуси со два фоликулински брана) околу 6-от и 7-от ден од почетокот на вториот бран (околу 16-17 ден од циклусот) простагландинот секретран од ендометриумот на матката врши лизирање на CL предизвикувајќи нивото на P4 рапидно да се намали. Редукцијата на циркулациската концентрација на P4 предизвикува отстранување на прогестеронска блокада на тоничните гонадотропни релизинг GnRH/LH-пулзации доведувајќи до зголемување на пулсната LH-фреквенција. Показано е дека промените на пулсната LH-фреквенција настануваат при промена на концентрацијата на прогестерон. Администрацијата на прогестерон кај кравите доведува до намалување на пулсната LH-фреквенција, додека истата се зголемува при индуцирана лутеолиза.

Зголемената фреквенција на LH го стимулира растот на доминантниот фоликул и истовремено стимулира синтезата на естрадиолот. Концентрацијата на естрадиолот продолжува да се зголемува сè додека истата е доволна за да предизвика предовулаторен LH-пик и овулација, преку *позитивна повратна спрега*. Овулацијата настанува 28-32 часа од почетокот на видливите знаци на еструс и преовулаторниот LH-пик.

После настанатата овулација концентрациите на естрадиол и инхибин повторно се намалуваат што овозможува ново транзитно зголемување на FSH (4-24 часа после LH-пикот) и регрутација на нови фоликули и почеток на нов фоликулински бран во следниот естрален циклус. Доколку кравите имаат три фоликулински брана, тогаш доминантниот фоликул од вториот бран атрезира и следниот доминантен фоликул (од третиот бран) овулира (слика 3).



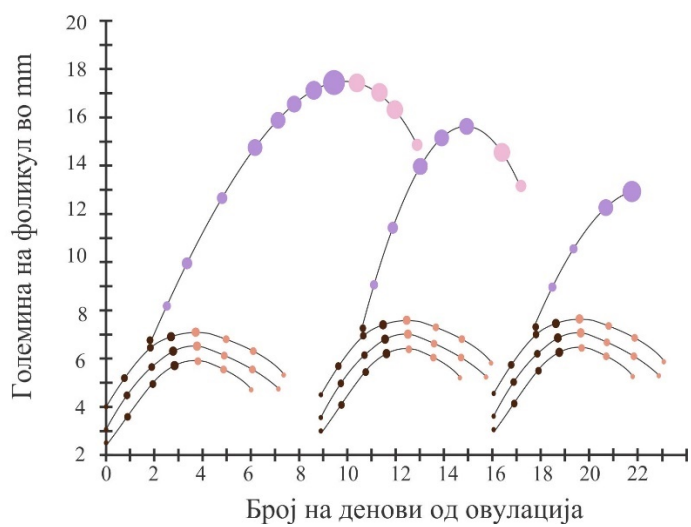
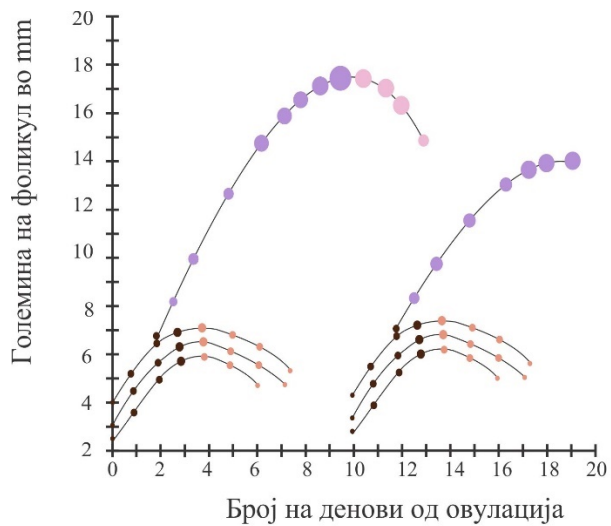
Слика 3. Главни случувања кои настануваат за време на фоликулинскиот бран при регругација, селекција и доминација. На сликата е прикажан само овулаторен бран (адатирано од **Driancourt, 2000**)

И во двата естрални циклуса со два односно со три фоликулински брана (слика 4.) покажано е дека почетокот на првиот фоликулински бран започнува на денот на овулацијата (ден 0).

Генерално, кај естралните циклуси со два фоликулински брана, вториот бран започнува на 9-от или 10-от ден, односно 8-от или 9-от ден кај естралните циклуси со три фоликулински брана, додека третиот бран започнува на 15-от или 16-от ден.

Кравите во лактација кои имаат два фоликулински брана имаат пократок естрален циклус со поголем но постар доминантен фоликул, во споредба со естралните циклуси со три фоликулински брана. Поради продолжената доминантност на фоликулот кај кравите со два брана, се претпоставува дека јајце-клетката (ооцитот) кај овие доминантни фоликули е со намалена фертилна способност, што може да резултира со намалена плодност.

Откритието дека фоликулите растат во вид на бранови доведе до моделирање на протоколи со кои се врши контрола на фоликулинската функција. Во сите тие синхронизациски протоколи клучен момент претставува синхронизацијата на почетокот на фоликулинскиот бран.



Слика 4 Фоликулински бранови а) два брана (горе), б) три брана (долу)

3. Методи за контрола на естралниот циклус

Просечната должина на естралниот циклус кај кравите варира помеѓу 18 до 24 дена со интересен интервал приближно од 20 и 23 дена кај циклуси со два односно со три фоликулински брана, последователно.

Како што и претходно напоменавме, должината на естралниот циклус може или *да се скрати* со апликација на простагландини, со цел предизвикување на предвремена регресија на CL, или *да се продолжи* преку поддржување на функцијата на CL со администрација на надворешен извор на прогестерон или на негови аналози (прогестагени) одреден временски период, следено со негово нагло отстранување. Со други зборови, должината на естралниот циклус зависи од одржливоста на CL.

3.1 Скратување на естралниот циклус со употреба на простагландини $PGF_{2\alpha}$

3.1.1 Простагландини $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)

Терминот простагландин за првпат во литературата се појавува на почетокот на 1930 година и бил употребен од страна на *von Euler*, а името простагландини го добиваат по тоа што за првпат биле изолирани од свежо семе и се претпоставувало дека се продуцираат во простатата.

$PGF_{2\alpha}$ е дериват на незаситена хидрокси линолна киселина и арахидонска киселина и е поделен на серии од A-I врз основа на хемиската структура на циклопентанскиот прстен. Оваа супстанција се покажала со исклучителна потентна лутеолитичка активност кај кравите, овците, козите и кобилите. Се синтетизира од ендометриумот на матката, а

неговата концентрација се зголемувала за и околу времето на регресија на CL.

Ослободувањето на арахидонската киселина од фосфолипидите преку активација на фосфолипазата A₂ (PLA₂) се смета за прв чекор во синтезата на простагландините. Ослободената арахидонска киселина брзо се конвертира во PGF_{2α} преку ензимот PG-синтетаза (уште позната како циклооксигеназа COX). Покажано е дека естадиолот ја зголемува продукцијата на PGF_{2α} првенствено преку стимулација на активноста на ензимот PLA₂ фосфолипаза, одговорна за ослободување на арахидонската киселина од фосфолипидните резерви и ја зголемува активноста на PG-синтетазата.

3.1.2. Употребата на простагландините во синхронизацијата на еструсот

Употребата на PGF_{2α} за синхронизација на еструсот е мошне употребуван метод т.е. протокол имплементиран во краварските фарми. Се состои од една или од повеќекратна апликација на PGF_{2α} или негови аналози со цел да се предизвика регресија (лутеолиза) на CL, со што кравите би се вовеле во еструс за период од 2 до 7 дена.

Комерцијално, во ветеринарската практика достапни се два вида на простагландини (PGF_{2α}). Првиот е *dinoprost tromethamine*, трометаминска сол на природен PGF_{2α}, а вториот е *cloprostenol sodium* (*cloprostenol*) синтетски аналог.

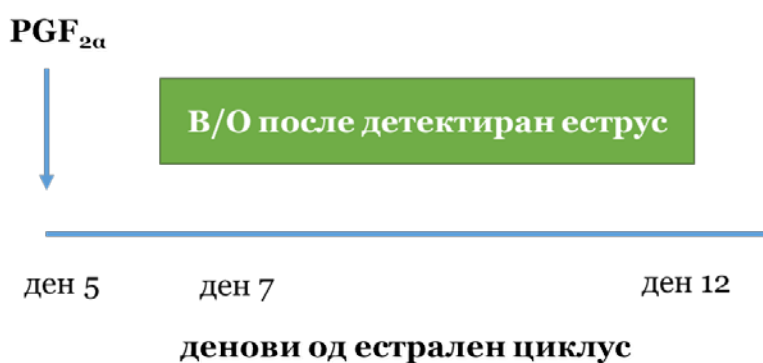
Dinoprost-от има многу краток полуживот (7-8 минути) и рапидно се метаболизира на сличен начин како и ендогениот PGF_{2α}.

За разлика од dinoprost-от, cloprostenol-от е многу potentен синтетски аналог на PGF_{2α} кој во себе содржи бензил хлорински прстен, со што ја прави оваа молекула многу порезистентна од ендогениот метаболизам. Cloprostenol-от има приближно 23 пати подолг биолошки полуживот во споредба со dinoprost-от и изнесува приближно 3 часа.

За индукција на лутеолиза на CL, потребната количина на cloprostenol изнесува 0,5 mg, додека за dinoprost-от изнесува 25 mg.

3.1.3 Синхронизација на еструсот со еднократна апликација на PGF_{2α}

Синхронизација на еструсот кај кравите со еднократна апликација на PGF_{2α} е еден од најстарите и најприменувани методи за синхронизација на еструсот. Се состои од еднократна системска апликација на PGF_{2α} после 5-от ден од циклусот (ден 0 = еструс, слика 5) и тоа исклучително само кај циклични крави (крави со зрело-функционално CL). Според тоа, третманот со PGF_{2α} со цел да се предизвика рана регресија на CL ќе биде ефективен од 5-от до 16-от ден од естралниот циклус.



Слика 5 Синхронизација на еструсот со еднократна апликација на PGF_{2α}

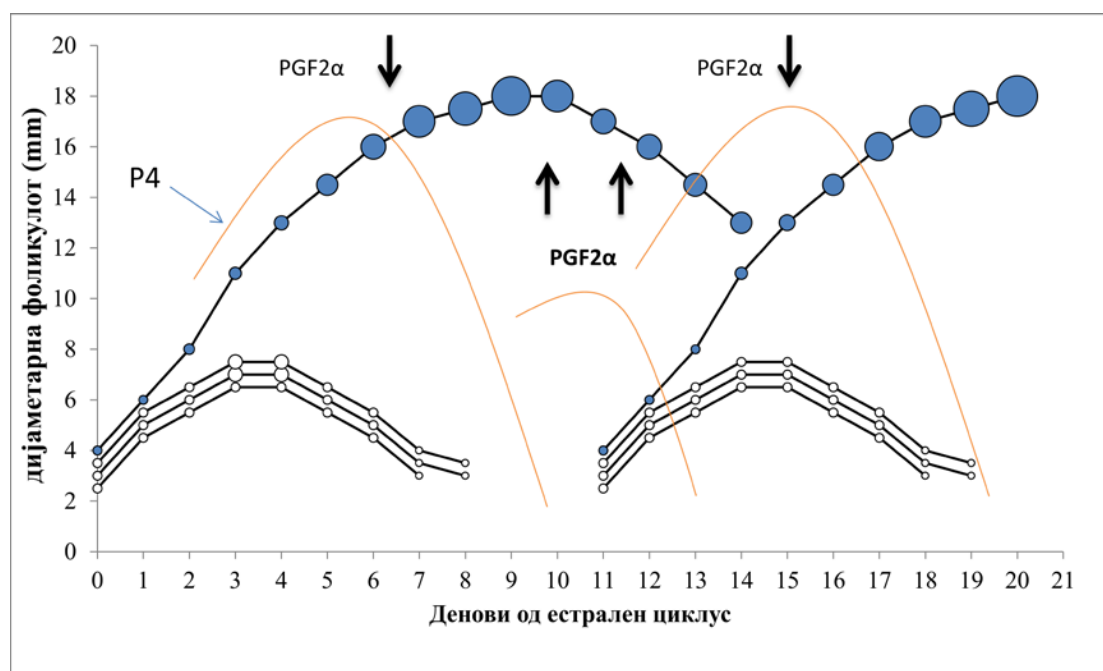
По апликацијата на PGF_{2α}, во првите 24 часа следува брза регресија на CL и брз пад на концентрацијата на P4 на базално ниво, што предизвикува кравата да се воведо во еструс помеѓу 2-риот и 7-миот ден. Меѓутоа, без разлика на брзата лутеолиза, интервалот до почетокот на еструсот е варијабилан и зависи или од големината на доминантниот фоликул или од развојната фаза на фоликулинскиот бран во моментот на апликацијата на PGF_{2α}.

Со други зборови, животните со функционален доминантен фоликул во моментот на апликацијата на PGF_{2α} би се вовеле во еструс помеѓу 2-риот и 3-тиот ден по апликацијата, бидејќи доминантниот фоликул присутен во моментот на индуцираната лутеолиза ќе овулира. Додека на животните во преддоминантна фаза на фоликулинскиот бран,

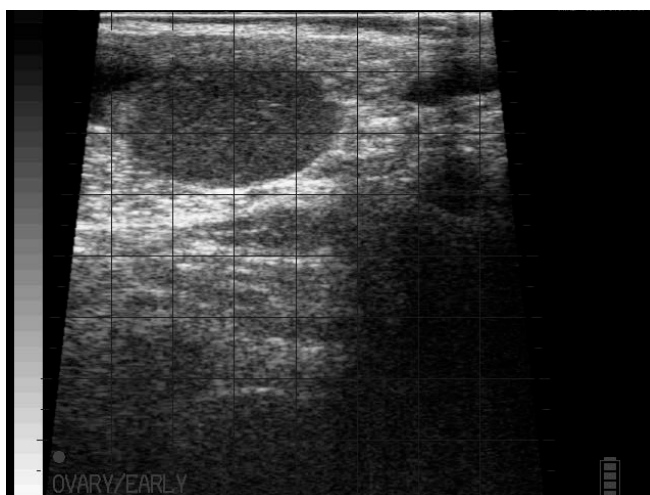
ќе им бидат потребни дополнителни 2-4 дена да формираат доминантен фоликул и затоа би имале подолг и повеќе варијабилен интервал до почетокот на еструсот.

Покажано е дека синхронизацијата на еструсот била попрецизна (повеќе од 70 % од кравите биле во еструс помеѓу 48-72 часа), кога кравите биле третирани во раниот диеструс (седмиот ден после еструсот, ден 7) или во доцниот диеструс (ден 15-16), а многу варијабилен (73-120 часа) помеѓу кравите третирани на ден 12 и ден 13.

Земајќи ги предвид варијациите на интервалот од третманот до појавата на еструс по апликацијата на $PGF_{2\alpha}$ осемењувањата со овој метод треба да се извршат само кога кравите се во еструс т.е. **веднаш штом се детектира еструсот** (2 до 7 дена по апликација, слика 6).



Слика 6. Еднократна апликација на $PGF_{2\alpha}$ во различни фази од естралниот циклус



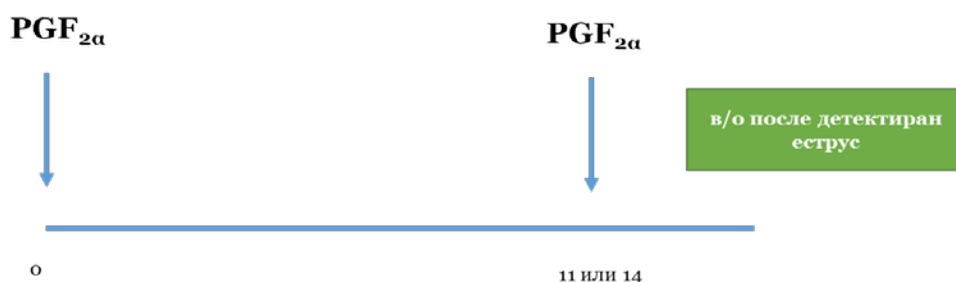
Слика 7. Ултразвучен наод на жолто тело (CL) на јајникот

Во практика многу ветеринари сè уште вршат рутинско фиксно осеменување на кравите „на слепо“ и тоа 72 часа по еднакратна апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ или на негови аналози. Фиксното осеменување после еднакратната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ последователно може да доведе до значително намалена фертилност отколку осеменувањата извршени при детектиран еструс, како последица на веќе споменатите варијации на интервалот од третманот до појавата на еструс. Кога осеменувањето на кравите било извршено фиксно на 72 и 96 час после еднакратна апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ степенот на концепција бил релативно низок.

3.1.4 Синхронизација на еструсот со двократна апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$

Овој метод за синхронизација на еструсот користи двократна апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ што се аплицира во интервал од 10 до 14 дена (слика 8). Вообичаено, овој протокол се користи најчесто кога стадиумот на естралниот циклус кај кравите е непознат. При ваквиот начин на синхронизација, при втората апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ кај сите *циклични крави* треба да се предизвика регресија на CL, без разлика на тоа во која фаза од естралниот циклус биле кравите при првата апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$. Осеменувањето при овој начин на синхронизација се изведува **веднаш**

штом се детектира еструсот (2 до 7 дена по втората апликација на $PGF_{2\alpha}$).



Слика 8 Синхронизација на еструсот со двократна апликација на $PGF_{2\alpha}$,

Протоколот може да се модифицира (слика 9) така што после првата апликација на $PGF_{2\alpha}$, се осеменуваат сите крави кои ќе покажат знаци на еструс, додека втората апликација на $PGF_{2\alpha}$ се аплицира само кај оние крави кои не покажале знаци на еструс т.е. не се осеменети по првата апликација на $PGF_{2\alpha}$.



Слика 9 Модификација на протоколот за синхронизација на еструсот со двократна апликација на $PGF_{2\alpha}$

Во практика, освен гореспоменатите протоколи на еднократна и двократна администрација на $PGF_{2\alpha}$, популарен е и протоколот базиран на 3 еднократни апликации на $PGF_{2\alpha}$ во интервал од 7 дена во три последователни недели со фиксно осеменување на 80-тиот час од последната апликација или т.н. *Понеделник наутро* (анг. *Monday-morning*, слика 10) протокол со цел поголем број на крави да се осеменат помеѓу 90 до 120 ден по отелувањето. Протоколот започнува со еднократна апликација на $PGF_{2\alpha}$ во понеделник (оттука и името) на сите

крави 60 ден по отелувањето. Оние крави кај кои ќе се детектира еструс се осеменуваат, а оние кои не покажале знаци на еструс подлежат на следна еднократна апликација на $PGF_{2\alpha}$ следниот понеделник. Повторно, кравите кои покажале знаци на еструс се осеменуваат, а останатите подлежат на уште една следна еднократна апликација на $PGF_{2\alpha}$ следниот понеделник. Протоколот завршува по третата апликација на $PGF_{2\alpha}$. Осеменувањата при првата и при втората апликација на $PGF_{2\alpha}$ се вршат **веднаш штом се детектира еструсот**, додека по третата апликација на $PGF_{2\alpha}$ осеменувањето се изведува **фиксно на 80-тиот час по апликацијата**.



Слика 10 Синхронизација на еструсот со т.н. Понеделник наутро (Monday-morning) протокол

3.1.5 Фактори кои го лимитираат успехот на синхронизацијата на еструсот со употреба на $PGF_{2\alpha}$

Иако денес простагландините $PGF_{2\alpha}$ најмногу се употребуваат за скратување за естралниот циклус, сепак во нивната примена постојат одредени ограничувања.

Првиот лимитирачки фактор е *цикличноста на кравите*. Имплементацијата на протоколите за синхронизација на еструсот со $PGF_{2\alpha}$ кај ацикличните крави (крави со статични јајници, фоликулински цисти итн.) се неефикасни.

Вториот лимитирачки фактор е *фазата на естралниот циклус* при апликацијата на $PGF_{2\alpha}$. Покажано е дека кравите треба да бидат во соодветна фаза од естралниот циклус за да може да настане лутеолиза на CL. Апликацијата на $PGF_{2\alpha}$ во препорачаната доза во првите 4 дена од естралниот циклус (метеструс), резултирала со невозможност за предизвикување лутеолиза. Прогресивно зголемување на осетливоста на

CL кон $\text{PGF}_{2\alpha}$ настанало од 5-от до 7-от ден постеструс и дека таа негова осетливост останува до крајот на диеструсот доведувајќи до индукција на еструс, кај приближно 85 % од третираните крави.

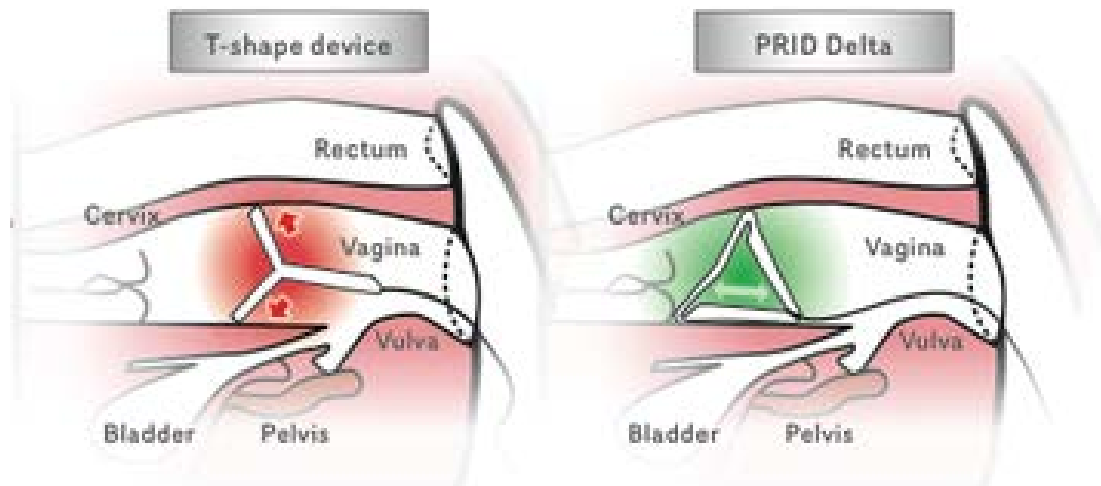
Третиот лимитирачки фактор е невозможноста на еднократната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ да предизвика *комплетна регресија на CL - лутеолиза*. Еднократната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ првенствено кај крави кои имаат висока концентрација на прогестерон, не е во состојба да предизвика комплетна лутеолиза. При ваква состојба, концентрацијата на P4 не се намалува под 1 ng/ml, при што ваквата концентрација на P4 е доволна да ја спречи експресијата на еструсот и да ја блокира овулацијата. Овој лимитирачки фактор може да се отстрани со додатна апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$, 24 часа по првата апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Земајќи ги предвид претходните изнесени факти, произлегува дека апликацијата на $\text{PGF}_{2\alpha}$ во кој било период од естралниот циклус би предизвикал приближно 60-70 % од кравите да се воведат во еструс.

Подобрен синхронизациски одговор на $\text{PGF}_{2\alpha}$ може да се постигне доколку $\text{PGF}_{2\alpha}$ се комбинира со прогестагени како што се интравагинални прогестеронски импланти PRID (*progesterone releasing intra-vaginal device*) или CIDR (*controlled internal drug release*) кои детално ќе бидат опишани во наредно поглавје.

4. Продолжување на естралниот циклус преку употребата на прогестагенски импланти

Една од главните карактеристики на прогестеронот (P4) е способноста да влијае врз оваријалната функција предизвикувајќи супресија на еструсот и на овулацијата. Врз база на овој податок, денес во практиката за синхронизација на еструсот се користат прогестагените, чијашто функција е слична со функцијата на P4, а тоа е супресија на еструсот кај кравите. *Progesterone releasing intravaginal device (PRID, слика 11)* е интравагинален прогестагенски имплант во форма на триаголник кој се состои од намотан силиконски гумен цилиндер импрегниран со 1,55 g на прогестерон. *CIDR (Controlled internal drug release device, слика 11)* е интравагинален прогестагенски имплант во форма на буквата „Т“ кој се состои од импрегнирана силиконска кожа со 1,38 g на прогестерон.



Слика 11 Вагинални прогестагенски импланти *CIDR (Controlled internal drug release device, лево)* и *PRID (Progesterone releasing intravaginal device, десно)*

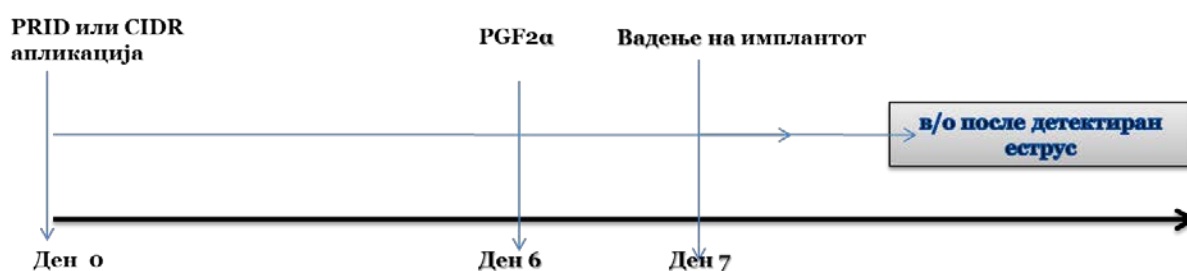
Имплантите, инкорпорирани за синхронизација на еструсот и вметнати интравагинално во кој било период од естралниот циклус одреден временски период (најчесто 7 дена), можат да ја одржат концентрацијата на P4 во крвта на одредено ниво, и да ја супресираат LH-

пулсната фреквенција, прекинувајќи го растот на доминантниот фоликул и да го блокираат преовулаторниот LH-пик и спречат овулација.

По отстранување на прогестагенскиот имплант и апликација на простагландини ($PGF_{2\alpha}$) истовремено или 24 h претходно, синхронизацискиот одговор на еструсот е релативно висок и повеќе од 70 % од кравите, искажуваат знаци на еструс или влегуваат во еструс 2-4 дена подоцна.

4.1 Употребата на прогестагените во синхронизација на еструсот

Во практиката, најчесто применуван протокол за синхронизација на еструсот со прогестагени е 7-дневниот протокол во комбинација со простагландините ($PGF_{2\alpha}$, слика 12). Протоколот се состои од внесување на имплантот вагинално во кој било период од естралниот циклус. Импантот останува во вагината 7 дена. Еден ден порано (ден 6) се аплицира $PGF_{2\alpha}$ (со цел да се предизвика регресија на присутното CL), а наредниот ден (ден 7) имплантот се отстранува. Осемнувањето се врши исклучиво **веднаш штом се детектира еструсот**, кој најчесто се појавува 2-4 дена од отстранување на имплантот.



Слика 12. 7-дневен протокол за синхронизација на еструсот со употреба на вагинални прогестагенски импланти (PRID или CIDR)

4.2 Предности и недостатоци на прогестагените при синхронизацијата на еструсот

Една од главните предности на прогестагените при синхронизација на еструсот е тоа што при нивната имплементација, голем број крави (70 до

80 %) вклучени во протоколот покажуваат знаци на еструс и можат да бидат осеменети. Како што и претходно беше кажано, ова првенствено се должи на способноста на P4 од имплантот за време на протоколот да го супресира излучувањето на гонадотропниот рилизинг хормон (GnRH) од хипоталамусот, а со тоа да го спречи еструсот и овулацијата. По вадењето на имплантот и апликацијата на $PGF_{2\alpha}$, концентрацијата на P4 нагло опаѓа со што се прекинува инхибиторното делување на P4 врз хипоталамусот, а со тоа се стумилира лачење на GnRH кое доведува до зголемено лачење на хипофизарните хормони FSH и LH предизвикувајќи на тој начин кравите да влезат во еструс и да се предизвика овулација.

Треба да напоменеме дека освен за синхронизација на еструсот, денес прогестагените во практиката успешно се користат и во терапија на некои патолошки состојби на јајниците како што се статични или хипофункционални јајници, фоликулински цисти итн. Како терапија при ваквите состојби се користи 7-дневниот протокол.

Главен недостаток на прогестагените при синхронизација на еструсот е што во некои случаи предизвикуваат појава на т.н. *феномен на перзистентни фоликули* кои значително ја намалуваат фертилноста кај кравите. Формирањето на перзистентните фоликули зависи првенствено од присуството или од отсуството на CL во моментот на внесување на имплантот. Имено, доколку кравите при внесувањето на прогестеронскиот имплант на јајникот имаат CL, тогаш концентрацијата на P4 ќе се зголеми што ќе предизвика намалување на пулсната LH-фреквенција. Намалената пулсна фреквенција на LH ќе го супресира растот на доминантниот фоликул резултирајќи во негова регресија и замена со нов доминантен фоликул од следниот бран.

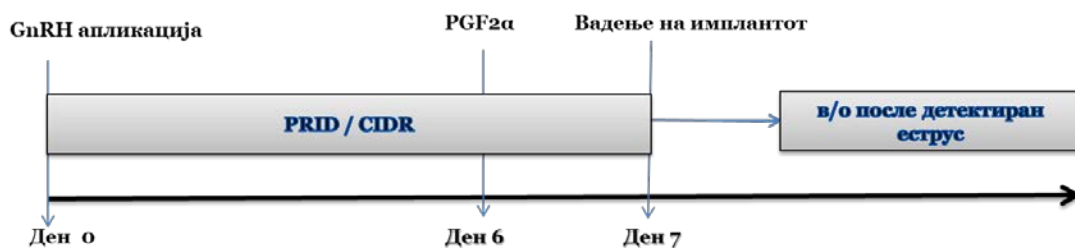
Од друга страна, доколку моментот на внесување на имплантот на јајникот нема присутно CL или во периодот на присутност на прогестеронскиот имплант во вагината настане спонтана лутеолиза, тогаш доминантниот фоликулот ќе биде изложен на прогестеронска концентрација само од имплантот. Прогестеронскиот вагинален имплант кај кравите одржува т.н сублутеална концентрација на P4 (1-2 ng/ml), која

е недоволна за да го оптимализира растот на доминантниот фоликул. Сублутеалната концентрација на P4 ја зголемува пулсната LH-фреквенција, со што се поддржува растот на доминантниот фоликул, се продолжува негова доминантност, резултирајќи во развој на т.н. феномен на перзистентни фоликули.

При појавата на перзистентните фоликули, пулсната LH-фреквенција никогаш не ја достигнува фреквенцијата карактеристична за физиолошката фоликулинска фаза од естралниот циклус, потребна за финална матурација и овулација на овулаторниот фоликул. Сепак, после отстранувањето на прогестагенскиот имплант, сублутеалната концентрација на P4 се намалува што доведува до појава на LH-фреквенција карактеристична за физиолошката фоликулинска фаза од естралниот циклус следена со појава на еструс и овулација, 2 до 4 дена подоцна. Сепак, концепцијата настаната од овулација на перзистентните фоликули е значително намалена во споредба со концепцијата настаната од овулација на нов доминантен фоликул при фоликулински пресврт.

Причината за намалената концепција се претпоставува дека е во предвремената матурација на ооцитот во перзистентниот фоликул, иако овулацијата на ваквите фоликули резултира во формација на CL со физиолошка продукција на P4.

Појавата на перзистентни фоликули и редуцирањето на продолжената фоликулинска доминација може да се намали со дополнителна администрација на GnRH истовремено со вметнувањето на прогестеронскиот имплант (слика 13). Апликацијата на GnRH ќе предизвика овулација на доминантниот фоликул присутен во моментот (во првите 2 дена после администрацијата), со што ќе се овозможи развој на нов фоликулински бран и овулација на нов доминантен фоликул после отстранување на имплантот. Овулацијата на нов доминантен фоликул значително ја подобрува концепцијата кај кравите.



Слика 13. Дополнителна апликација на GnRH при синхронизација на еструсот со прогестагени

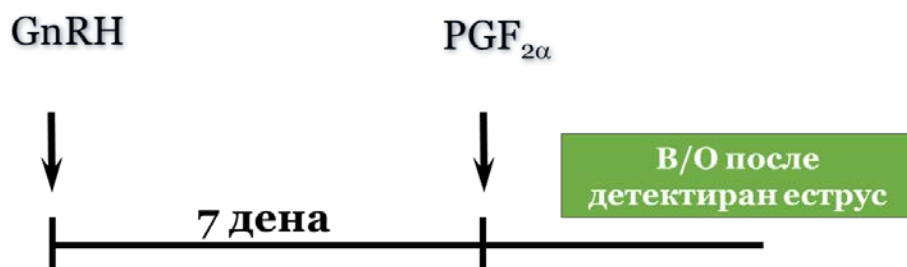
Во практиката, како недостатокоти при синхронизацијата на еструсот со прогестагенски препарати се вбројува и процентот на испаднати импланти и иритации на вагината. Сепак треба да се истакне дека процентот на испаднати импланти е доста низок и изнесува околу 2 %. Иритациите на вагината се доста чести и се пропратени со чиста, заматена или жолта слуз кога ќе се отстрани имплантот. Повторно треба да се истакне дека присуството на слуз е нормална појава и нема влијание врз ефективността на имплантот.

5. Синхронизација на еструсот и овулација со комбинација на синтетски гонадодропен рилизинг хормон (GnRH) и простагландини F2α

Откритието дека растот на фоликулите кај говедата се одвива во вид на бранови, доведе до нова ера т.н. трета генерација на протоколи за синхронизација на еструсот. Главна карактеристика на овие протоколи е контролата на фоликулинскиот бран преку употреба на гонадодропен рилизинг хормон (GnRH).

Контролата на фоликулинскиот бран се постигнува со еднакратна апликација на GnRH во која било фаза од естралниот циклус. Оваа апликација предизвикува ослободување на LH што доведува до овулација на доминантниот фоликул (≥ 10 mm) присутен на јајниците. По овулацијата на доминантниот фоликул, следува иницирање на нов фоликулински бран 2 до 3 дена од администрацијата на GnRH. Лутеалното ткиво т.е. CL кое се формира по овулацијата на доминантниот фоликул е способно да подлежи на лутеолиза индуцирана со апликација

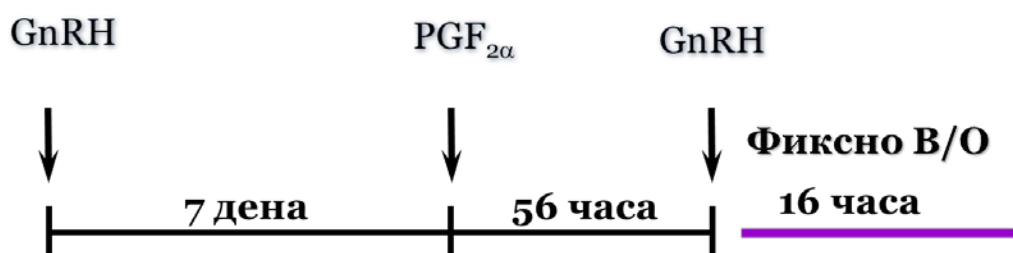
на $PGF_{2\alpha}$ 6 најчесто 7 дена подоцна. На овој начин формиран е протоколот за синхронизација на еструсот кој се состои од комбинација на GnRH и $PGF_{2\alpha}$ (слика 14). Осемењувањето при овој протокол се врши **веднаш** **штом се детектира еструсот**.



Слика 14. Синхронизација на еструсот со употреба на комбинација на GnRH и $PGF_{2\alpha}$

Базирајќи се на познавањето дека апликација на GnRH предизвикува ослободување на LH што доведува до овулација на доминантниот фоликул (≥ 10 mm) присутен на јајниците, направена е модификација на овој протокол со дополнителна апликација на GnRH, 56 часа по апликацијата на $PGF_{2\alpha}$ со цел да се индуцира овулација на доминантниот фоликул настанат од новиот фоликулински бран по првата апликација на GnRH наречен G-P-G-протокол. Бидејќи при овој протокол се врши **синхронизација на овулацијата** (а не на еструсот) осемењувањето се изведува **фиксно** (анг. TAI - timed artificial insemination), 16 часа по втората апликација на GnRH без притоа да се детектира еструсот (осемењувањето се врши без разлика дали кравите исполнуваат или не знаци на еструс). Процентот на концепција при *прво* осемењување постпартум (помеѓу 60 и 90 ден) изнесува 40 %.

Денес, овој протокол за синхронизација на овулацијата е познат под името **Ov-synch** (анг. ovulation – synchronization, слика 15).



Слика 15. Ov-synch протокол (порано познат како G-P-G-протокол)

При **Ov-synch** протоколот, секоја хормонска апликација има своја функција. Првата апликација на **GnRH** (уште се нарекува G1) го елиминира тековниот бран (со овулација на доминантниот фоликул) и иницира почеток на нов бран. $PGF_{2\alpha}$ врши лиза на сите лутеални структури на јајникот (најчесто на CL од претходниот циклус и на новото формирано CL т.н. акцесорно CL настанато со овулација на доминантниот фоликул од G1). Втората апликација на **GnRH** (уште се нарекува G2) предизвикува овулација на доминантниот фоликул од иницираниот бран (слика 16).



Слика 16. Редослед на хормонските апликации во *Ov-synch* протоколот и нивна функција

Треба да се напомене дека иницирањето на **Ov-synch** протоколот мора да се спроведе во точно определен тајминг (саатница). Со други зборови, сите хормонски апликации заедно со осеменувањето мора да се аплицираат и извршат во точно зададен час, што зависи пред сè, од првата апликација на **GnRH**. Така на пример, доколку G1 се аплицира во 8 часот наутро, 7 дена подоцна во 8 часот наутро се аплицира $PGF_{2\alpha}$, 56 часа подоцна или во 16 часот попладне се аплицира G2 и осеменувањето се врши 16 часа подоцна во 8 часот наутро. Доколку G1 се аплицира во 10 часот наутро, тогаш $PGF_{2\alpha}$ се аплицира во 10 часот наутро, G2 во 18 часот попладне. Осеменувањето се врши во 10 часот наутро. Искажано во денови, редоследот на апликациите би бил: G1 понеделник (8 ч наутро), $PGF_{2\alpha}$ следен понеделник (8 ч наутро), G2 среда (16 ч попладне) и ТАИ четврток (8 часот наутро, слика 17).

осеменуваат сите крави т.е. како да се во еструс). Како за споредба, процентот на осеменети крави при имплементација на протоколите кои се базираат на осеменување врз детектиран еструс изнесува помеѓу 60 % - 70 %.

Втората главна предност на *OV-synch* протоколот е во тоа што, овој протокол може да се примени *кај ациклични крави*. Кравите со статични (хипофункционални) јајници, како и кравите со фоликулински цисти можат да се вклучат во протоколот и истите успешно да бидат осеменети.

Третата предност на *OV-synch* протоколот е тоа што во повеќето случаи при негова имплементација се овозможува овулација на т.н. млад доминантен фоликул (при *G2* апликацијата) чија што јајце-клетка е со зголемена фертилна способност. Појавата на млад доминантен фоликул, зависи првенствено од тоа дали при *G1*, **настанала овулација** на доминантниот фоликул или не.

Доколку апликацијата на *G1* предизвика *овулација* на доминантниот фоликул присутен на јајникот, тогаш се елиминира тековниот бран и се иницира нов фоликулински бран што ќе резултира со формирање на доминантен фоликул со краток период на доминација т.н. млад доминантен фоликул. При овулација на ваков фоликул (при *G2* апликацијата) фертилноста на кравите е драстично зголемена.

Од друга страна, доколку апликацијата на *G1* *не предизвика овулација* на доминантниот фоликул присутен на јајникот, тогаш тековниот бран не се елиминира и не се иницира нов фоликулински бран. Во овој случај, не се формира млад доминантен фоликул, туку ќе се предизвика овулација на доминантниот фоликул од тековниот бран (при *G2* апликацијата) кој е со продолжена доминација во кој овулираната јајце-клетка е со намалена фертилна способност во споредба со јајце-клетката овулирана од младиот доминантен фоликул.

Уште една предност на *OV-synch* протоколот е тоа што при негова имплементација, циркулаторната концентрација на *P4* се зголемува која позитивно влијае врз фертилноста на кравите. Имено, доколку при *G1*

апликација се предизвика овулација на доминантниот фоликул тогаш по овулацијата ќе се формира CL т.н. акцесорно CL кое има способност да продуцира P4. Ова новоформирано акцесорно CL заедно со CL настаното од спонтаната овулација од претходниот циклус ја зголемуваат продукцијата на P4. Зголемената концентрација на P4 позитивно влијае врз растот на младиот доминантен фоликул со што дополнително ја зголемува фертилната способност на овулираната јајце-клетка.

Освен свои предности, OV-synch протоколот има и свои *недостатоци* кои ја лимитираат неговата успешност во подобрување на фертилноста кај кравите.

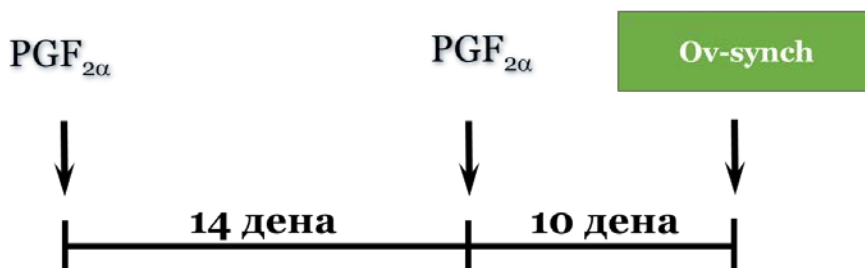
Еден од главните недостатоци на OV-synch протоколот е *невозможност* да при G1 апликацијата се предизвика овулација на доминантниот фоликул, *кога протоколот се започнува во која било фаза од естралниот циклус*. Започнување на протоколот во која било фаза од естралниот циклус, предизвикува овулација на доминантниот фоликул во 50 % до 60 % (при G1 апликацијата) кај кравите вклучени во протоколот. Зголемен процент (до 95 %) на овулација на доминантниот фоликул при G1 се постигнува доколку протоколот се започне помеѓу 5-тиот до 9-тиот ден од естралниот циклус. Со други зборови, *најидеално време* за започнување на Ov-synch протоколот е помеѓу 5-тиот до 9-тиот ден од естралниот циклус (присуство на CL и фоликул со големина над 10 мм при ултразвучен наод), со што кај 95 % од кравите вклучени во протоколот, ќе се предизвика овулација на доминантниот фоликул кој ќе иницира развој на нов бран резултирајќи во формирање и овулација на млад доминантен фоликул (при G2 апликацијата). Овулацијата на младиот доминантен фоликул, како што и претходно беше истакнато ја зголемува фертилноста кај кравите.

Бидејќи во практични услови, тешко може со сигурност да се одреди во која фаза на развојот е фоликулинскиот бран, од гореизнесеното произлегува едно прашањето - *Како да се знае кога кравите се во најидеалното време од естралниот циклус за да се започне OV-synch протоколот?*

Одговорот на ова прашање лежи во воведување на т.н. *претсинхронизациски* протоколи пред имплементацијата на Ov-synch протоколот. Со нивно воведување, се успеа во најголем процент кравите да се доведат во најидеалното време за започнување на Ov-synch протоколот и истовремено да се отстрани еден од недостатоците на OV-synch протоколот.

Денес, имплементирани се голем број на претсинхронизациски протоколи како што се (Pre-synch/Ov-synch, G-G-P-G, Double OV-synch, PG-3-G итн.), а ќе бидат опишани само дел од нив.

Во практиката во почетокот најчесто применуван претсинхронизациски протокол беше т.н. Pre-synch/Ov-synch (слика 19). При негова имплементација фертилноста на кравите била зголемена за околу 15 % во однос кога OV-synch протоколот бил применет самостојно.

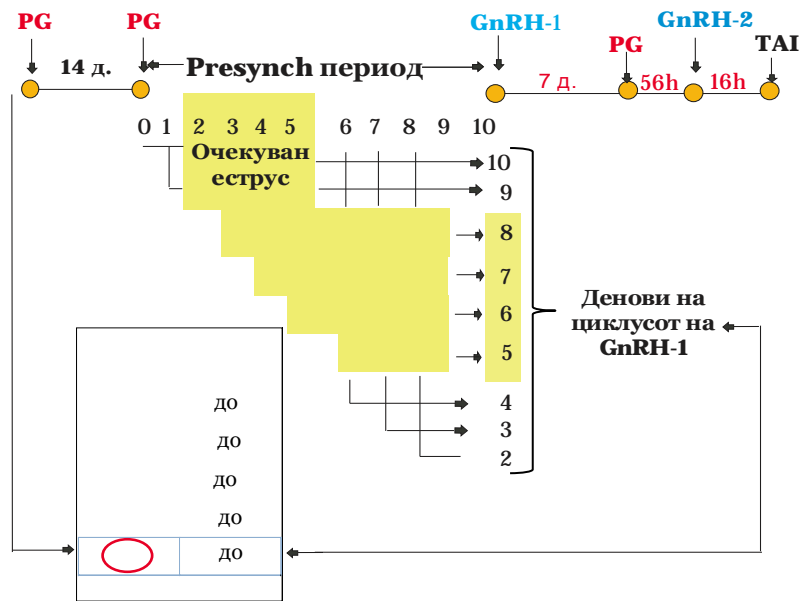


Слика 19. Pre-synch-Ov-synch протокол

Протоколот започнува после 35-тиот ден од отелувањето, а се состои од двократна апликација на PGF_{2α} во интервал од 14 дена, а 10 дена подоцна се започнува со Ov-synch протоколот. При вакво сценарио, иницирањето на Ov-synch протоколот би бил од 9-тиот до 12-тиот ден од естралниот циклус што не коинцидира со најидеалното време за започнување на истиот. Токму поради ова, денес, направена е модификација на претсинхронизацискиот протоколот наречен Pre-synch 10, каде помеѓу двете PGF_{2α} апликации од 14 дена е скратен на 10 дена, а иницирањето на Ov-synch протоколот останува ист т.е. 10 дена од последната апликација на PGF_{2α}. При ова сценарио, иницирањето на Ov-synch протоколот би бил помеѓу 5-тиот до 8-миот ден од естралниот циклус што претставува најидеалното време за започнување на истиот (слика 20).

Presynch - 10

Ovsynch - 56



Слика 20. Претсинхронизациски протокол *Pre-synch 10* (адаптирано од Stevenson 2016)

Главен недостаток на овој претсинхронизациски протокол е што може да се примени само кај циклични крави т.е. крави кои имаат CL при првата или при втората $PGF_{2\alpha}$ апликација. Доколку кравите *не поседуваат* CL било при првата или при втората апликација на $PGF_{2\alpha}$ тогаш настанува асинхронизација и *OV-synch* протоколот нема да се иницира во најидеалното време што драстично ќе ја намали фертилноста кај кравите.

Со цел освен цикличните крави во претсинхронизацискиот протокол да се вклучат и ацикличните крави имплементиран е протокол познат по името *G-7-G* или *GGPG* протокол (слика 21).



Слика 21. *G-7-G* или *GGPG* протокол

Протоколот се состои од дополнителна апликација на GnRH 7 дена пред иницирање на Ov-synch протоколот. Дополнителната апликација на GnRH би предизвикала овулација на доминантниот фоликул кај *цикличните* крави при што кравите би биле во најидеалното време за иницирање на OV-synch протоколот. Кај *ацикличните* крави, дополнителната апликација на GnRH би предизвикала лачење на FSH кој би предизвикал раст на фоликулите и формирање на доминантен фоликул, со што апликацијата на G1 од OV-synch протоколот би предизвикала негова овулација и иницирање на нов фоликулински бран и овулација на млад доминантен фоликул при G2 апликацијата.

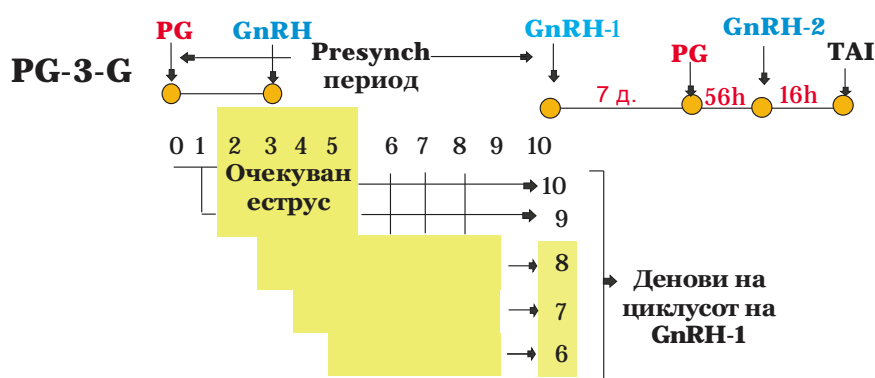
Освен горенаведените протоколи, во практиката атрактивен е и претсинхронизацискиот протокол т.н. PG-3-G протокол (слика 22).



Слика 22. PG-3-G протокол

Протоколот се состои од апликација на PGF_{2α} следено со апликација на GnRH 3 дена подоцна. Седум дена по апликацијата на GnRH, се иницира Ov-synch протоколот (слика 23). Во протоколот можат да се вклучат циклични и ациклични крави и обично со овој протокол се започнува после 35-тиот ден по отелувањето. Генерално, со протоколот се започнува во петок со цел да се избегнат осеменувања за време на викендот.

Ovsynch - 56



Слика 23 Шематски приказ на PG-3-G протоколот (адаптирано од Stevenson 2016)

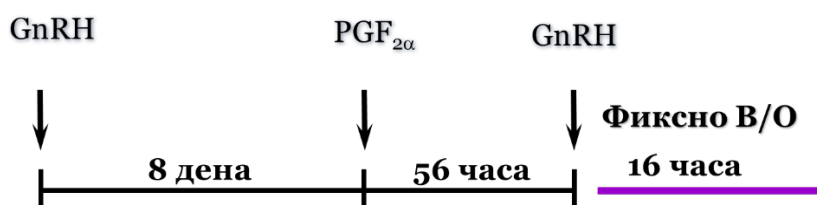
Втор главен недостаток на OV-synch протоколот кој го лимитира неговиот успех е невозможноста еднократната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ да предизвика *комплетна лутеолиза* на сите лутеални структури присутни на јајникот. Овој недостаток се потенцира првенство кога на јајникот ќе се формира акцесорно CL, кое е релативно младо (4-5 дена) и рефракторно (неосетливо) на $\text{PGF}_{2\alpha}$ при негова апликација како дел од протоколот. Некомплетната лутеолиза не овозможува пад на концентрација на P4 под 1 ng/ml, при што, оваа концентрација на P4 ја блокира овулацијата која треба да се предизвика со G2 апликацијата. На овој начин, успехот на OV-synch протоколот за постигнување на задоволителна фертилност драстично е намален.

Овој недостаток може да се отстрани на повеќе начини и тоа преку зголемување (удвостручување) на дозата на $\text{PGF}_{2\alpha}$, двократна апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ во интервал од 12 часа (наутро и навечер) или во интервал од 24 часа (7-миот и 8-тиот) ден од протоколот.

Во практиката денес за надминување на овој проблем се користи двократната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ во интервал од 24 часа т.е. 7-миот и 8-миот ден од протоколот. При ваквиот начин на апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ процентот на предизвикување на комплетна лутеолиза изнесува приближно 100 %. Иако процентот на постигнување на комплетна лутеолиза со двократната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ е релативно висок, сепак

оваа дополнителна апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ бара дополнителна манипулација со кравите, дополнителна посета од ветеринар со што се зголемуваат трошоците при имплементација на *OV-synch* протоколот.

Со цел да се избегне дополнителната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ а да се постигне задоволувачки процент на комплетна лутеолиза, избегнување на дополнителната манипулација со кравите и намалување на трошоците на *OV-synch* протоколот, ние го модифициравме *OV-synch* протоколот и го нарековме ***OV-synch-8 протокол***. *OV-synch-8* протоколот е сличен со стандардниот *OV-synch* протокол, а разликата е во тоа што еднократната апликација на $\text{PGF}_{2\alpha}$ наместо на 7-миот ден (кај стандардниот протокол) се аплицира на 8-миот ден после G1 апликацијата (слика 24).



Слика 24 *OV-synch-8* протокол

Поместувањето на апликацијата на $\text{PGF}_{2\alpha}$ за еден ден подоцна, овозможи:

А) продолжување на животниот век на акцесорното CL за еден ден, и зголемување на неговата осетливост кон $\text{PGF}_{2\alpha}$ со што би се предизвикала негова комплетна лутеолиза.

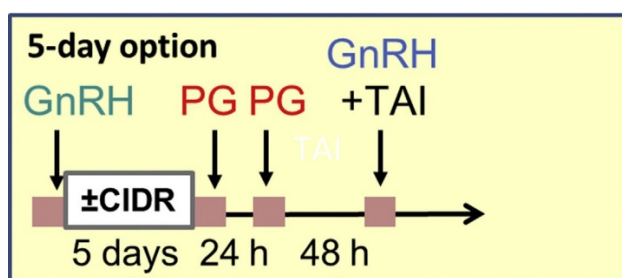
Б) зголемување на концентрацијата на P4 (од страна на акцесорното CL како и CL од претходниот циклус) овозможувајќи на тој начин раст на младиот доминантен фоликул во средина со висока концентрација на P4 што дополнително би ја зголемила неговата фертилност.

При имплементацијата на *Ov-synch-8* протоколот, во нашето истражување, процентот на комплетна лутеолиза изнесуваше повеќе од 93 %, а процентот на фертилност кај кравите од првото осемнување околу 40 %. Од овие податоци, беше заклучено дека *Ov-synch-8* протоколот може

успешно да се користи како алатка за синхронизација на овулацијата во краварските фарми.

На крајот, како недостаток на стандардниот Ov-synch протокол се вбројува и неговата ниска успешност кога истиот се применува кај јуници. Причината за неговата ниска успешност кај јуниците е во разликата на бројот на фоликулински бранови помеѓу кравите и јуниците. За време на естралниот циклус, јуниците обично имаат 3 фоликулински брана додека кравите 2 фоликулински брана. При естрален циклус со 3 фоликулински брана, должината на еден фоликулински бран изнесува околу 7 дена, додека со 2 фоликулински брана околу 10 дена. При фоликулински бран со должина од околу 7 дена, доминантноста на фоликулот е пократка (околу 5 дена) што доведува да при апликацијата на G2 нема доминантен фоликул присутен на јајниците за да се предизвика негова овулација.

Токму поради ова, за синхронизација на овулацијата кај јуниците се користи модификација на Ov-synch протоколот во кој времето од G1 до PGF_{2α} изнесува 5 дена (наместо 7 дена) со задолжителна апликација на прогестеронска направа (CIDR или PRID) 5 дена и дополнителна апликација на PGF_{2α} 24 по првата апликација (ден 5 и ден 6) со цел да се предизвика комплетна лутеолиза (слика 25). Бидејќи овој протокол е економски неиздржлив за фармерите, ретко се користи во практиката.



Слика 25 Примена на Ov-synch протоколот за синхронизација на овулација кај јуници

Генерално кај јуниците за синхронизација на еструсот се користи еднократна апликација на PGF_{2α} каде осемеувањето е веднаш штом се детектира еструсот.

6. Ресинхронизација на еструсот и овулацијата

Протоколите за синхронизација на еструсот и овулацијата (OV-synch, Double-OV-synch итн.) при првото фиксно В/О постпартум се стандардни процедури на многу краварски фарми за производство на млеко во интензивно производство. Овие напредни протоколи овозможуваат зголемување на процентот на успешност т.е. концепција при првото В/О постпартум, во однос на имплементација само на стандардниот Ov-synch протокол. При нивна имплементација степенот на концепција од првото В/О после породување може да биде над 40 %, што претставува доста добар резултат. Сепак, и покрај примената на протоколите за синхронизација, значителен процент од кравите не успеваат да конципираат од првото В/О, што на големите фарми го отежнува откривањето на следниот еструс и нивното навремено повторно осеменување. Токму затоа, Ov-synch протоколот или неговите модификации можат да се користат и за синхронизирање на еструсот и овулацијата во случај на неуспех на првото В/О, а вака применети, се нарекуваат *протоколи за ресинхронизација*. Преовладува мислењето дека најидеалното време за започнување на протоколот за ресинхронизација (Re-synch) е 32 ± 3 дена по првото В/О бидејќи кравите во овој период се во раната лутеална фаза на естралниот циклус, т.е. од 5-ти до 9-тиот ден по овулацијата. Со цел да се воведат негравидни крави во протоколот Re-Synch што е можно порано, истиот може да се започне пред дијагнозата на гравидитет, така што за таа цел може да се користат протоколот Ov-Synch како и протоколот Double-Ov-Synch, што овозможува почетокот на Ov-synch да биде во оптимална фаза на естралниот циклус.

Степенот на концепција со Re-synch протоколот е обично помал во споредба со првото В/О, првенствено поради отсуството на функционално CL на почетокот на Re-Synch протоколот, кога предовулаторниот фоликуларен бран се јавува во неповолни услови. Ниските нивоа на прогестерон имаат негативен ефект врз квалитетот на ендометриумот и ембрионот, поради зголемената пулсација на LH и неусогласениот степен

на раст на овулаторниот фоликул, што се смета за главна причина за ниската фертилна способност кај овие крави. Адекватна концентрација на лутеален прогестерон во текот на протоколот дава информации за присуството на жолтото тело и одговорот на примената на $\text{PGF}_{2\alpha}$. Процесот на лутеолиза треба да биде завршен до втората апликација на GnRH и/или В/О. Ако квалитетот на ооцитот е соодветен, се очекува кравата да конципира и потоа да развие функционално CL доволно за одржување на гравидитетот.

Оптималното ниво на концентрацијата на P4 во плазмата за време на фоликуларниот раст е помеѓу 2,0 и 3,5 ng/mL. Затоа, следењето на нивото на P4 во одредени временски интервали по породувањето или по првото постпартално В/О е важен показател при изборот и евалуацијата на успешноста на протоколот за синхронизација и ресинхронизација на овулацијата и естралниот циклус. Високото ниво на P4 ($\geq 3,50$ ng/mL) има инхибиторен ефект врз секрецијата на GnRH, додека ниското ниво на P4 ($<1,0$ ng/mL) укажува на отсуство на CL и можни нарушувања во овулацијата, што е значајно во ресинхронизацијата и при изборот на самиот протокол, како и во дефинирањето на моментот на неговото започнување.

Протоколите за ресинхронизација се надоврзуваат на протоколите за синхронизација на еструсот и овулацијата при првото постпартално осеменување. Успехот на Re-Synch протоколот е условен од оптималната синхронизација на првото осеменување. Врз основа на сознанието дека најчестиот интеровулаторен интервал кај кравите е 21-23 дена и фактот дека најдобро време за започнување на Ov-synch протоколот е во раната лутеална фаза од 5-тиот до 9-тиот ден по овулацијата, претпоставката е дека идеалното време за започнување на Re-Synch протоколот би било помеѓу 28-тиот и 32-риот ден од првото В/О. Вообичаен пристап да се започне со Re-Synch протоколот е 32-риот ден по првото В/О. За да се воведат кравите кои не се гравидни со Re-Synch протоколот што е можно порано, тој може да се започне пред дијагнозата на гравидитет, па за таа цел може да се користат хормонски протоколи кои започнуваат со

апликација на GnRH, додека апликацијата на PGF_{2α} е контраиндицирана пред дијагностиката за гравидитетот. Протоколот Ov-Synch и некои негови модификации претставуваат соодветен избор за апликацијата. Овој протокол ја вклучува првата инјекција на GnRH на 32-риот ден, проследено со ултразвучен преглед на 39-тиот ден, кога сите негравидни животни добиваат инјекција на PGF_{2α}. По 56 часа, следува втора апликација на GnRH и фиксното осеменување по 16 часа. Овој протокол се нарекува и Re-Synch-56. На резултатите влијаат фактори како што се исхраната, годишното време (топло или ладно), условите на околината, возраста, лактацијата итн.

Double-Ov-Synch овозможува протоколот Ov-Synch да се иницира во оптималната фаза на естралниот циклус. Примената на протоколот за ресинхронизација Double-Ov-Synch започнува на 22-риот ден по претходното В/О, со првата апликација на GnRH, без тест за гравидитет. По 7 дена и ултразвучен преглед, на сите негравидни животни им се аплицира PGF_{2α}, а 72 часа по PGF_{2α} се аплицира втората GnRH, со што се комплетира делот за претсинхронизација од протоколот Double-Ov-Synch. По 7 дена т.е. на 39-тиот ден од првото В/О, кравите се воведуваат во Ov-Synch протоколот. Примената на протоколот Double-Ov-Synch дава подобри резултати од класичниот протокол Ov-Synch. Исто така, речиси 80 % од кравите кај кои е применет протоколот Double-Ov-Synch имаат концентрација на P4 помеѓу 1,0 и 3,5 ng/mL во моментот на првата апликација на GnRH, како и функционално CL, што резултира со повисок степен на концепција во споредба со класичниот Ov-Synch. Наспроти ова, нашите резултати покажаа малку подобри резултати од примената на протоколот Ov-Synch во споредба со протоколот Double-Ov-Synch во ресинхронизацијата на млечните крави.

Одреден процент на крави кои не реагирале соодветно на првата синхронизација, влегуваат во еструс и овулираат многу порано по првото В/О, па така на 32-риот ден од В/О кравите се во диеструс, па затоа кај овие крави беше присутна висока концентрација на P4 (> 3,5 ng/mL). Нивниот одговор на GnRH е несоодветен поради негативната повратна

врска на прогестеронот врз секрецијата на FSH и особено на пулсирачката секреција на LH. Кравите со P4 <1,0 ng/mL имале претходна лутеална регресија и не овулирале до првата апликација на GnRH. Овулаторниот одговор беше намален помеѓу 25-тиот и 35-тиот ден по В/О кај крави каде концентрацијата на P4 била > 1,0 ng/mL. Појавата на споменатите проблеми е далеку помала кога се користи Double-Ov-Synch во споредба со класичниот Ov-Synch протокол.

За правилна дијагноза и избор на адекватен протокол, неопходно е да се користи ултразвучна дијагностика, додека лабораториските методи за одредување на нивото на прогестерон, како и биохемиските параметри на метаболичкиот профил се добри помагала за да се постигнат подобри резултати во концепцијата.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Atanasov B, Dovenski T, Celeska I, Stevenson JS (2021) -Luteolysis, progesterone, and pregnancy per insemination after modifying the standard 7-day OV-synch program in Holstein-Friesian and Holstein cows. *J Dairy Sci.* June; 104(6):7272-7282. doi: 10.3168/jds.2020-19922. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33773782.
2. Atanasov B., Adamov N., Celeska I., Ilievska K., Angjelovski B., Trbogazov Z., Davkov F., Dovenski T., Opsomer G., Stevenson - Modification of the standard 7-day OV-synch protocol to increase the luteolytic and synchronization risks in dairy cows 2020- *J. Mac Vet Rev*; 43 (2): i-vii.
3. Adams GP. (1998) - Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. In: *Proceedings of the XX Congress of the World Association of Buiatrics, Sydney, Australia.* Sydney: Australian Association of Cattle Veterinarians. pp. 595-605.
4. Aerts J.M.J., Bols P.E.J., (2010) - Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Repro. Dom. Anim* , 45, 171-179.
5. Aerts JMJ and Bols PEJ (2010) - Ovarian Follicular Dynamics A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects *Reprod Dom Anim* 45, 180–187.
6. Ajitkumar G, Madhavan E, Iyer C, (1995) - Management of oestrous cycle in crossbred cows using prostaglandin. *J. of Veterinary and Animal Sci.* 26, 117-120.
7. Araujo Rr, Ginther Oj, Ferreira Jc, Palhao Mm, Beg Ma, Wiltbank Mc, (2009) - Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biol Reprod* 81, 426–437.
8. Archbald LF, Tran T, Massey R, Klapstein E, (1992) - Conception rates in dairy cows after timed insemination and simultaneous treatment with gonadotrophin releasing hormone and/or prostaglandin F2 alpha. *Theriogenology* 37, 723-731.
9. Assey Rj, Purwantara B, Greve T, Hyttel P, Schmidt Mh, (1993) - Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology* 39, 1321-1330.
10. Beal W. E., Milvae R. A., Hansel W., (1980) - Oestrous cycle length and plasma progesterone concentrations following administration of prostaglandin F2a early in the bovine oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 59, 393-396.
11. Bergfeld E.G.M., F.N. Kojima, A.S. Cupp, M.E. Wehrman, K.E. Peters, V. Mariscal, T. Sanchez, and J.E. Kinder (1996) - Changing Dose of Progesterone Results in Sudden Changes in Frequency of Luteinizing Hormone Pulses and Secretion of 17P-Estradiol in Bovine Females, *Biology of reproduction* 54, 546-553.
12. Bridges, P. J., Fortune J. E., (2003) - Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Dom. Anim. Endoc.* 25,199–214.

13. Cerri, R.L.A., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G.S., Santos, J.E.P., (2009b) - Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim. Repro. Sci.* 110, 56–70.
14. Chebel, R.C., Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G.S., (2006) - Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J. Dairy Sci.* 89, 4205–4219.
15. Christian RE, Casida LE., (1948) -The effects of progesterone in altering the estrous cycle of the cow, *J Anim Sci*, 7:540.
16. Colazo MG, Martínez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ, (2002) - Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. *Animal Reprod Sci* 72, 47-62.
17. Cooperative Regional Research Project NE-161, (1996) - Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *J. Anim. Sci* 74, 1943-1952.
18. Cupp, A., Garcia-Winder, M., Zamudio, A., Mariscal, V., Wehrman, M., Kojima, N., Peters, K., Bergfeld, E., Hernandez, Sanche, Kittok R., Kinder (1992) - Two concentrations of progesterone (P4) in circulation have a differential effect on pattern of ovarian follicular development in the cow *Bio. Repro.* 46, (Supplement 1) 106 (Abstract).
19. De Rensis F, Peters AR, (1999) - The control of follicular dynamics by PGF2Alpha, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. *Reprod Domest Anim* 34, 49–59.
20. Denicol, A. C., Lopes Jr, G., Mendonça, L. G. D., Rivera, F. A., Guagnini, F., Perez, R. V., Lima, J. R. , Bruno, R. G. S., Santos, J. E. P., Chebel, R. C. (2012) - Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1794–1806.
21. Diskin M.G., E.J. Austin, J.F. Roche (2002) - Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle *Domestic Animal Endocrinology* 23 211–228.
22. 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*, Zagreb.
23. Dovenski T., Kocoski Lj., Trojancanec P., Petkov V., Popovski K., Mickovski G., Popovska-Percinic Florina, Mickov Lj. (1999) - Comparison of ultrasonic morphology of bovine corpora lutea and plasma progesterone concentration during estrous cycle and early pregnancy *Macedonian Journal of Reproduction*, 5, 1 p. 47 – 57.

24. Driancourt MA, (2000) - Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211–1239.
25. Dorđević, M, Blagojević, J, Radinović, M, Cincović, M., Maletić, J., Kreszinger, M., and Maletić, M. (2022).-Efficiency of two protocols of resynchronization of estrus and ovulation in high-producing dairy cows at peak lactation *Acta Veterinaria-Beograd*, 72(3), 362–374.
26. Fair, T., (2003) - Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence, *Animal Reproduction Science* 78,203-216.
27. Flock, S., Geneteau, A., Lagarde, A., Lopez, A., 2010. Comparative pharmacokinetic study of progesterone release of intravaginal devices after single administration in cows. International conference on production diseases in farm animals. XXVI World Buiatrics Congress, November 14-18, Chile.
28. Fogwell, R.L., Reid. W.A., Thompson, C.K., Thome, M.J. and Morrow, D.A. (1986) - Synchronization of estrus in dairy heifers: a field demonstration. *J. Dairy Sci.* 69:1665-1672.
29. Folman Y., Kaim M., Herz Z., and Rosenberg M. (1990) - Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. effects of progesterone and parity on conception *J Dairy Sci* 73:2817-2825.
30. Fortune JE, (1993): Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? *Animal Reproductive Science* 33, 111–125.
31. Garcia A, Van Der Veijden GC, Colenbrander B, Bevers B, (1999) - Monitoring follicular development in cattle by real time ultrasonography: a review. *Vet Rec* 145, 334–340.
32. Ginther O.J., Beg M.A., Donadeu Fx, Bergfelt Dr (2003) - Mechanism of follicle deviation in monoovular farm species, *Anim Reprod Sci.* 78, 239-257.
33. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. (1989a) - Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproductive Science*, 20:187-200.
34. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. (1989b) - Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87:223-230.
35. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K, (1996) - Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* 55, 1187–1194.
36. Hatler, T.B., Hayes, S.H., Ray, D.L., Reames, P.S., Silvia, W.J., (2008) - Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet. J.* 177, 360–368.

37. Hughes F. M. Jr., Gorospe W. C. (1991) - Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*. 129: 2415-2422.
38. Inskeep E. K. (2004) - Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow *J Anim Sci*, 82: E24-E39.
39. Ireland J. J., M. Mihm, E. Austin, M. G. Diskin, and J. F. Roche (1999) - Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles during the Bovine Estrous Cycle: Key Concepts, Studies, Advancements, and Terms *Journal of Dairy Science* Vol. 83, No. 7.
40. Islam R. (2011) - Synchronization of Estrus in Cattle: A Review *Veterinary World*, Vol.4 (3):136-141.
41. Kastelic JP, Knopf L, Ginter OJ (1990) - Effect of day of prostaglandin F_{2α} treatment on selection and development of the follicle in heifers. *Animal Reproduction Science* 23: 169-180.
42. King Me, Kirakofe GH, Stevenson JS, Schalles RR, (1982) - Effect of stage of the estrus cycle on interval to estrus after PGF_{2α} in beef cattle. *Theriogenology* 18, 191-200.
43. Kojima, F.N., Bergelt, E.G., Wehrman, M.E., Cupp, A.S., Fike, K.E. et al., (2003) - Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentration of steroids and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Ani. Repro. Sci.* 77, 187–211.
44. Larson LL, Ball PJH. (1992). - Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology*, 38:255-267.
45. Lucy M. C., Savio J. D., L. Badinga, R. L. De La Sota and Thatcher W. W. (1992) - Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle *Journal of Animal Science* 70:3615-3626.
46. Maletić, M, Blagojević, J, Vakanjac, S, Stanišić, L, Magaš, V, Đurić, M, Radinović, M, and Đorđević, M (2023)-Uspešnost primene protokola resinhronizacije estrusa i ovulacije kod krava. 14. Naučni Simpozijum Reprodukcijska životinja, Divčibare, Fakultet veterinarske medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila.
47. Martins, J. P. N., R. K. Policelli, and J. R. Pursley. (2011) - Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/OV-synch. *J. Dairy Sci.* 94:2806–2814. doi:10.3168/jds.2010-3650.
48. Odde KG. (1990) - A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *Journal of Animal Science*, 68:817-830.

49. Pavlović, V, Maletić, M, Vakanjac, S, Pavlović, M, Đurić, M, and Magaš, V. (2013). Primena hormona u indukciji i sinhronizaciji estrusa i ovulacije kod krava, Veterinarski žurnal Republike Srpske, 13(2), 154–160.
50. Répási, A, Beckers, J.F., Sulon, J., Karen, A., Reiczigel, J. Szenci, O., (2005) - Effect of the type and number of prostaglandin treatments on corpus luteum, the largest follicle and progesterone concentration in dairy cows. Repro. Dom. Anim., 40, 1-7.
51. Santos, J.E.P., (2011) - Reproductive management of lactating dairy cows for first postpartum insemination, in: Dairy Production medicine, John Wiley & Sons, Inc., 90.
52. Savio, J.D., Thatcher, W.W., Badinga, L., De la Sota, R.L., Wolfenson, D., (1993) - Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows J. Repro. Fert. 97, 197-203.
53. Stevenson Js, Schmidt Mk, Call Ep, (1984) - Stage of estrous cycle, time of insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of Holstein heifers after prostaglandin F2 α . J Dairy Sci 67, 1798-1805.
54. Vakanjac, S, Đurić, M, Magaš, V, Maletić, M, Stanišić, L, and Maletić, J. (2015)- Indukcija i sinhronizacija estrusa krava-kada i kako, Zbornik predavanja i kratkih Sadržaja XXVI Savetovanje Veterinara Srbije Beograd.
55. Wiltbank M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, A. P. Cunha, J. O. Giordano, P. M. Fricke, G. M. Baez and M. G. Diskin (2014) - Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle, The Animal Consortium, p. 1 – 12.
56. Wiltbank M.C., A.H. Souza, J.O. Giordano, A.B. Nascimento, J.M. Vasconcelos, M.H.C. Pereira, P.M. Fricke, R.S. Surjus, F.C.S. Zinsly, P.D. Carvalho, R.W. Bender, R. Sartori (2012) - Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle Anim Reprod, v.9, n.3, p.231-241.