

Utjecaj aplikacije sintetičkih analoga GnRH na smanjenje pojavnosti ranih pobačaja krava

R. Zobel, Milena Ukalović, N. Rošić, S. Kostelac, Tanja Gavrić, F. Jakšić, M. Bronzović, Nikica Popović-Golić, G. Pelc, Z. Petković, V. Uzbašić i V. Nakić



Uvod

Smatra se kako je kasna embrionalna smrtnost (KES) jedan od najvećih uzroka gubitaka na farmama mliječnih goveda. Čak se 80% ovih pobačaja zbiva u prvih 40 dana po osjemenjivanju te rezultira preganjanjem u nepravilnim vremenskim razmacima (Diskin i Morris, 2008.). U cilju smanjenja broja životinja s dijagnozom KES i rane fetalne smrtnosti (RFS) te smanjenja broja pregona osmišljeni su brojni hormonalni protokoli, a svima je zajednički pokušaj utjecaja na funkciju jajnika i/ili žutog tijela te razinu spolnih hormona. Poznato je kako aplikacija sint. analoga GnRH ljudima (Schurmeyer i sur., 1984.), štakorima (Labrie i sur., 1980.) i psima (Vickery i sur., 1985.) poboljšava koncepciju. No, s druge strane, slični su pokusi na govedima rezultirali vrlo oprečnim rezultatima (Lincoln i sur., 1986.).

Neki su autori (Drew i Peters, 1992., Peters i sur., 2000., Bartlome i sur., 2005.,

Anjum i sur., 2009.) utvrdili porast postotka koncepcije nakon aplikacije GnRH odmah po osjemenjivanju mliječnih krava, dok drugi nisu mogli utvrditi takav utjecaj (Bentele i Humke, 1987., Ryan i sur., 1991.). Pored toga izvještaji o djelovanju GnRH na funkciju žutog tijela i jajnika vrlo su oprečnih rezultata (Milvae i sur., 1984., Mee i sur., 1993.) pri čemu se navodi porast razine progesterona u plazmi goveda (Lincoln i sur., 1986., Willard i sur., 2003.) te pojačana funkcija žutog tijela (Gaja i sur., 2008.). Noviji nalazi govore kako aplikacija sint. analoga GnRH uz umjetno osjemenjivanje te 5 do 15 dana kasnije povećava koncepciju i umanjuje broj životinja s dijagnozom ranih pobačaja (López-Gatius i sur., 2006.), dok neki tome u prilog ne govore (Bartlome i sur., 2005.).

Kako su razna istraživanja često nesukladnih pa i oprečnih rezultata odlučili smo provjeriti utjecaj aplikacije sint. analoga GnRH na postotak

Dr. sc. Robert ZOBEL, dr. med. vet., Veterinarska stanica Križ; Milena UKALOVIĆ, dr. med. vet., CRSH d.o.o.; Nikola ROŠIĆ, dr. med. vet., Veterinarska stanica Jastrebarsko d.o.o.; Stjepan KOSTELAC, dr. med. vet., Tanja GAVRIĆ, dr. med. vet., Franjo JAKŠIĆ, dr. med. vet., Marinko BRONZOVIĆ, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Otočac d.o.o.; Nikica POPOVIĆ-GOLIĆ dr. med. vet., Goran PELC, dr. med. vet., Veterinarska stanica Sisak d.o.o.; Zoran PETKOVIĆ, dr. med. vet., Vlado UZBAŠIĆ, dr. med. vet., Viktor NAKIĆ, dr. med. vet., Veterinarska stanica Petrinja d.o.o.

konceptije, pojavnost KES-a i RFS-a u krava simentalke pasmine na području Republike Hrvatske.

Materijal i metode

Životinje

Istraživanje je provedeno tijekom 5 godina (travanj 2006. do travanj 2011.) na 1080 krava simentalke pasmine smještenih na 4 farme mliječnih goveda s istim načinom držanja i hranidbe. Životinje su držane slobodno, bez mogućnosti ispusta, a broj životinja na farmama kretao se od 90 do 160. Dob je uključenih životinja bila između 3 i 5 godina (krave nakon 3. i 4. porođaja), kako bi se izbjegao utjecaj dobi i broja porođaja na rezultate. Proizvodnja mlijeka po grlu iznosila je 4.820 ± 228 kg tijekom laktacije od 305 dana. Životinje su na farmama podijeljene u dvije skupine: K (kontrola) i L (liječenje) temeljem posljednjeg broja na ušnoj markici: skupina L parni broj, skupina K neparni broj.

Krave su osjemenjivane nakon što su znaci tjeranja bili primijećeni od strane vlasnika ili radnika, a u cilju prikupljanja istog broja životinja osjemenjenih tijekom istog tromjeseca na svim farmama. Redoviti obilasci farmi organizirani su u razmacima od 10 do 12 dana, a uključivali su: otkrivanje i liječenje stanja smanjene plodnosti, umjetna osjemenjivanja i ultrazvučnu dijagnozu gravidnosti.

Kriteriji za isključenje iz istraživanja uključivali su: pojavu sistemske bolesti tijekom istraživanja, vrućicu (tjelesna temperatura iznad 40°C), deformacije organa spolnog sustava (uključujući priraslice), prethodni otežani porođaji, prethodni porođaji putem carskog reza, zaostajanje posteljice nakon prethodnog porođaja, prisutnost urovagine, ciste jajnika, klinički endometritis, pojavu kliničkog mastitisa dva i više puta tijekom vremena istraživanja te pregon nakon trećeg umjetnog osjemenjivanja.

Godina je podijeljena na 4 tromjesječja (I – siječanj, veljača, ožujak; II – travanj, svibanj, lipanj; III – srpanj, kolovoz, rujan; IV – listopad, studeni, prosinac). Približno isti broj životinja unutar obiju grupa i na svim promatranim farmama osjemenjen je unutar istog tromjesječja sjemenom istog bika kako bi se umanjio utjecaj sezone, temperature okoliša i bika na dobivene rezultate. Nakon primjene pobrojenih kriterija konačan broj od 1080 krava podijeljen je u dvije grupe – K (n=540) i L (n=540).

Eksperimentalni protokol

Tjeranje su otkrivali iskusni radnici ili vlasnici farme promatranjem krava tijekom 30 minuta tri puta dnevno i o početku tjeranja obavještavali veterinara. Ukoliko se krave nisu potjerale do 70. dana po porođaju, tjeranje je inducirano aplikacijom analoga prostaglandina ili GnRH, ovisno o nalazu na jajnicima i dijagnozi. Dijagnoza tjeranja postavljena je kada je na jednom jajniku nađena mjehuričasta tvorba promjera većeg od 15 mm, tvrdo elastične konzistencije maternice uz pojavu bistre sluzi na stidnici, u rodnici ili na grljku maternice uz vaginalni nalaz otvorenog grljka maternice. Dijagnoza je potvrđena ultrazvučno rektalnom sondom 7,5 MHz (BCF EasyScan, Engleska). Krave su osjemenjivane dnevno do nestanka dominantnog folikula, a sjeme je polagano u rog maternice paralelan s jajnikom na kojem je nađen dominantni folikul. Kravama skupine L po osjemenjivanju je aplicirano 0,05 mg im. sint. analoga GnRH (1 mL Depherelin Gonavet Veyx®, Veyx Pharma, Njemačka). Dvanaest dana kasnije životinje su primile drugu dozu 0,05 mg sint. analoga GnRH im. (1 mL Depherelin Gonavet Veyx®, Veyx Pharma, Njemačka). U slučaju pregona životinje su osjemenjivane najviše dva puta, a po pojavi trećeg pregona isključene su iz pokusa i liječene shodno nalazu.

Sumnju na pregon postavili su radnici ili vlasnici farme, a potvrdili su je nakon ginekološkog pregleda veterinari.

Dijagnostika gravidnosti

Krave su pregledavane tijekom redovitih obilazaka farmi u razmacima od 10 do 12 dana. Dijagnoza gravidnosti potvrđena je ultrazvučnom pretragom pomoću transrektalne linearne sonde 7,5 MHz (BCF, EasyScan, Engleska). Prvi je pregled izvršen 30 do 32 dana, a naredni 40-42, 50-52, 60-62, 70-72 i posljednji 80-82 dana po osjemenjivanju. Svaka je životinja u koje je utvrđen rani pobačaj pregledana, postavljena je dijagnoza, poduzeto eventualno liječenje te opet osjemenjena. Dijagnoza gravidnosti postavljena je temeljem nalaza Kastelic i sur. (1988.), a uključivala je prisutnost zametka ili ploda s vidljivim udarcima srca te prisutnošću

tekućine u rogu maternice. Sve životinje u kojih je postavljena sumnja na KES ili RFS pregledane su za 10 do 12 dana s ciljem potvrde dijagnoze. Kasna embrionalna smrtnost i RFS dijagnosticirane su nakon nestanka zametka ili ploda prisutnog pri prethodnom ultrazvučnom pregledu. Dijagnoza KES-a postavljena je do 42. dana gravidnosti, a nakon toga vremena je temeljem preporuka Committee on Bovine Reproductive Nomenclature (1972.) postavljena je dijagnoza RFS-a.

Statistička analiza

U statističku obradu podataka uključeni su: broj krava s dijagnozom KES-a i RFS-a unutar grupe i odnos između dviju grupa životinja. Normalnost distribucije podataka određena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Metoda linearne regresije korištena je za

Tabela 1. Utjecaj grupe na pojavnost KES, RFS i ukupnih ranih pobačaja od 30. do 82. dana gravidnosti

	Grupa K (n = 540)	Grupa L (n = 540)	Dani
KES	15/540 ^a 0,027±0,16	6/540 ^b 0,01±0,1	30 - 42
RFS	16/540 ^a 0,03±0,17	5/540 ^b 0,009±0,09	43 - 52
	15/540 ^a 0,027±0,16	6/540 ^b 0,01±0,1	53 - 62
	8/540 ^a 0,014±0,12	2/540 ^b 0,003±0,06	63 - 72
	6/540 ^a 0,01±0,1	5/540 ^a 0,009±0,09	73 - 82
KES Σ	15/540 ^a 0,027±0,16	6/540 ^b 0,01±0,1	30 - 42
RFS Σ	45/540 ^a 0,08±0,28	18/540 ^b 0,03±0,18	43 - 82
Rani pobačaji Σ	60/540 ^a 0,11±0,31	24/540 ^b 0,04±0,21	30 - 82

Legenda: KES= kasna embrionalna smrtnost (30. do 42. dana gravidnosti); RFS= rana fetalna smrtnost (43. do 82. dana gravidnosti); KES Σ= ukupan broj životinja s dijagnosticiranim kasnom embrionalnom smrtnošću; RFS Σ= ukupan broj životinja s dijagnosticiranim ranom fetalnom smrtnošću; Rani pobačaji Σ= ukupan broj životinja s dijagnosticiranim ranim pobačajima (od 30 do 82 dana po osjemenjivanju); Dani= dani dijagnoze pobačaja

usporedbu odnosa između grupa (L i K) i broja životinja s potvrđenom dijagnozom KES-a i RFS-a. Razlike među grupama i postotka životinja s dijagnozom KES-a i RFS-a testirane su Kruskal-Wallis metodom i usporedbom srednjih vrijednosti. Za statističku analizu korišten je program STATISTICA 8 (StatSoft, Tulsa, SAD), a razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je $P < 0,05$.

Rezultati

Kako je prikazano u tabeli 1, ukupni rani pobačaji (od 30. do 82. dana gravidnosti) zabilježeni su u 7,77% (84/1080) krava. Kasna embrionalna smrtnost (30. do 42. dan gravidnosti) utvrđena je u 1,94% (21/540) i RFS (43. do 82. dan gravidnosti) u 5,83% (63/1080) uključenih krava. Kasna embrionalna smrtnost utvrđena je 2,5 puta češće u krava grupe K ($15/540 = 2,78\%$) u odnosu na krave grupe L ($6/540 = 1,11\%$) ($P < 0,05$). Isto tako, RFS je utvrđen 2,5 puta češće u krava grupe K ($45/540 = 8,33\%$) u odnosu na krave grupe L ($18/540 = 3,33\%$) ($P < 0,05$). Posljedično, ukupni su rani pobačaji zabilježeni 2,5 puta češće u krava kontrolne grupe (K) ($60/540 = 11,11\%$) u odnosu na krave grupe L ($24/540 = 4,44\%$) ($P < 0,05$).

Rasprava

Rezultati predmetnog istraživanja slični su rezultatima Horan i sur. (2004.) sa 7,5% ukupno utvrđenih pobačaja u periodu od 30. do 65. dana gravidnosti. Na uzorku od 860 krava i junica pasmine simentalac i holštajn, Zobel i sur. (2011.) utvrdili su pojavnost ranih pobačaja (od 30. do 80. dana gravidnosti) u 7,99% pregledanih životinja, a rezultati predmetnog istraživanja gotovo su identični. Nasuprot tome, rezultati predmetnog istraživanja znatno su niži od rezultata Silke i sur. (2002.) s 13,3% utvrđenih ranih pobačaja te Vasconcelos

i sur. (1997.) s preko 20% utvrđenih pobačaja u krava Holštajn i Jersey pasmine. Razlike su u dobivenim rezultatima vrlo vjerojatno posljedica činjenice što su predmetnim istraživanjem obuhvaćene samo krave simentalke pasmine, a u citiranim radovima obuhvaćene su krave Holštajn i Jersey pasmine. Utjecaj pasmine svakako ne treba zanemariti budući da je moguće da krave pasmine Holštajn imaju nasljedno nižu plodnost (Lucy, 2001.) ili je ona posljedica slabije i nepravilnije funkcije jajnika povezane s povećanim zahtjevima za energijom i bjelančevinama zbog visoke proizvodnje mlijeka (Butler, 2000.). Znatno viša mliječnost u krava pasmine Holštajn i Jersey u odnosu na krave simentalke pasmine mogla bi biti i uzrokom znatno više pojavnosti ranih pobačaja u krava visoko proizvodnih pasmina.

Nadalje, pojavnost KES i RFS bila je 2,5 puta viša u krava kontrolne grupe u odnosu na grupu L. Znatno niži broj životinja s dijagnozom ranog pobačaja može se dovesti u usku vezu s aplikacijom sint. analoga GnRH, a što potvrđuju i prethodni radovi Bartlome i sur. (2005.) te López-Gatius i sur. (2006.). Kako je već i sugerirano, moguće je da aplikacija GnRH neposredno uz osjemenjivanje i desetak dana kasnije dovodi do razvoja dodatnih žutih tijela ili do žutog tijela s više lutealnog tkiva, a što rezultira višom razinom progesterona i boljom koncepcijom te manjim brojem ranih pobačaja (López-Gatius i sur., 2006.).

Sažetak

Prema dosadašnjim spoznajama aplikacija GnRH mogla bi utjecati na povećanje koncepcije i smanjenje pojavnosti ranih pobačaja u goveda. Cilj predmetnog rada bio je utvrditi utjecaj aplikacije sint. analoga GnRH na pojavnost ranih pobačaja u krava simentalke pasmine na području Republike Hrvatske. Ukupno 1080 krava podijeljeno je u dvije grupe i umjetno osjemenjeno. Krave grupe K ($n=540$) samo su osjemenjivane, a

kravama grupe L (n=540) uz osjemenjivanje i 12 dana kasnije aplicirano je 0,05 mg sint. analoga GnRH. Mjera uspjeha bio je broj životinja s dijagnozom ranog pobačaja. Rani pobačaji dijagnosticirani su 2,5 puta češće u krava kontrolne grupe (K) u odnosu na krave grupe L. Aplikacija sint. analoga GnRH može znatno smanjiti pojavnost ranih pobačaja u mliječnih krava simentalke pasmine.

Literatura

1. ANJUM, I. A., R. H. USMANI, M. T. TUNIO and S. H. ABRO (2009): Improvement of conception rate in crossbred cattle by using GnRH analogue therapy. *Pakistan Vet. J.* 29, 93-94.
2. BARTLOME, J. A., P. MELENDEZ, D. KELBERT, K. SWIFT and J. McHALE (2005): Strategic use of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 63, 1026-1037.
3. BENTELE, R. and R. HUMKE (1987): Use of buselerin in luteal phase in cows after the second or third insemination. *Tierartzl. Umsch.* 42, 388-394.
4. BUTLER, W. R. (2000): Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 449-457.
5. Committee on Reproductive Nomenclature, 1972. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell. Vet.* 62, 216-237.
6. DISKIN, M. G. and D. G. MORIS (2008): Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 260-267.
7. DREW, S. B. and A. R. PETERS (1992): The effect of treatment with a gonadotrophin-releasing hormone analogue on the fertility of dairy cows. *Proc. Int. Congr. Anim. Reprod., Hague, Netherlands.* 3, 319.
8. GAJA, A. O., K. HAMANA, C. KUBOTA and T. KOJIMA (2008): Evaluation of the effect of a 3rd GnRH injection administered six days after the 2nd GnRH injection of Ovsynch on the reproductive performance of Japanese black cows. *J. Vet. Sci.* 9, 273-279.
9. HORAN, B., J. F. MEE, M. RATH, P. O'CONNOR and P. DILLON (2004): The effect of strain of Holstein-Frisian cow and feed system on reproductive performance in seasonal-calving milk production systems. *Anim. Sci.* 79, 453-467.
10. KASTELIC, J. P., S. CURRAN, R. A. PIERSON and O. J. GINTHER (1988): Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology* 29, 39-54.
11. LABRIE, F., L. CUSAN, C. SEGUIN, A. BELANGER, G. PELLETIER, J. REEVES, P. A. KELLY, A. LEMAY and J. P. RAYNAUD (1980): Antifertility effects of LHRH agonists in the male rat and inhibition of testicular steroidogenesis in man. *Int. J. Fertil.* 25, 157-170.
12. LINCOLN, G. A., H. M. FRASER and M. P. ABBOTT (1986): Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *J. Reprod. Fertil.* 77, 587-597.
13. LÓPEZ-GATIUS, F., P. SANTOLARIA, A. MARTINO, F. DELETANG and F. DE RENSIS (2006): The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in Northeastern Spain. *Theriogenology* 65, 820-830.
14. LUCY, M. C. (2001): Reproductive loss in high producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* 84, 1277-1293.
15. MEE, M. O., J. S. STEVENSON, B. M. ALEXANDER and R. G. SASSER (1993): Administrations of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol-17b, pregnancy-specific and in vitro production of progesterone in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 71, 185-198.
16. MILVAE, R. A., B. D. MURPHY and W. HANSEL (1984): Prolongation of the bovine estrous cycle with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Biol. Reprod.* 31, 664-670.
17. PETERS, A., T. A. MARTINEZ and A. J. C. COOK (2000): A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317-1326.
18. RYAN, D. P., E. KOPEL, M. P. BOLAND and R. A. GODKE (1991): Pregnancy rates in dairy cows following the administration of a GnRH analogue at the time of artificial insemination or at mid-cycle post insemination. *Theriogenology* 36, 367-377.
19. SCHURMEYER, T., U. A. KNUTH, C. W. FREISCHEM, J. SANDOW, F. B. AKHTAR and E. NIESCHLAG (1984): Suppression of pituitary and testicular function in normal men by constant gonadotropin-releasing hormone agonist infusion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 19-24.
20. SILKE, V., M. G. DISKIN, K. A. DENNY, M. P. BOLLAND, P. DILLON, J. F. MEE and J. M. SREENAN (2002): Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 1-12.
21. VASCONCELOS, J. L. M., R. W. SILCOX, J. A. LACERDA, J. R. PURSLEY and M. C. WILTBANK (1997): Pregnancy rate, pregnancy loss and response to heat stress after AI at two different times from ovulation in dairy cows. *Biol. Reprod. Suppl.* 1, 230.
22. VICKERY, B. H., G. I. McRAE, W. V. BRIONES, B. B. ROBERTS, A. C. WORDEN, B. D. SCHANBACHER and R. E. FALVO (1985): Dose-response studies on male reproductive parameters in dogs with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Androl.* 6, 53-60.
23. WILLARD, S., S. GANDY, S. BOWERS, K. GRAVES, A. ELIAS and C. WHISNANT (2003): The effects of GnRH administration post insemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates

in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 59, 1799-1810.

24. ZOBEL, R., S. TKALČIĆ, I. PIPAL and V. BUIĆ (2011): Incidence and factors associated with early

pregnancy losses in Simmental dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 121-125.

Influence of synthetic analogue GnRH administration on decreasing the early pregnancy loss ratio in cattle

Robert ZOBEL, DVM, PhD, Veterinary Practice, Križ; Milena UKALOVIĆ, DVM, Center for Reproduction and Animal Breeding of Croatia; Nikola ROŠIĆ, DVM, Veterinary Practice Jastrebarsko; Stjepan KOSTELAC, DVM, Tanja GAVRIĆ, DVM, Franjo JAKŠIĆ, DVM, Marinko BRONZOVIĆ, DVM, Veterinary Practice Otočac; Nikica POPOVIĆ-GOLIĆ, DVM, Goran PELC, DVM, Veterinary Practice Sisak; Zoran PETKOVIĆ, DVM, Vlado UZBAŠIĆ, DVM, Viktor NAKIĆ, DVM, Veterinary Practice Petrinja

It has been suggested that synthetic analogue administration can significantly influence pregnancy rates in cattle. The objective of the study was to establish the influence of synthetic analogue administration on early pregnancy loss rates for Simmental dairy cattle in Croatia. A total of 1080 cows were artificially inseminated and divided into two groups. Cows in the control group (group K, n=540) received no treatment, while those in the treatment group (group L; n=540) received

0.05 mg synthetic analogue GnRH at the time of insemination and again 12 days later. The outcome measure was the early pregnancy loss rate. The early pregnancy loss rate was 2.5 times higher for cows in the control group compared to the treatment group ($P<0.05$). Administration of GnRH at the time of artificial insemination and 12 days later can significantly decrease early pregnancy loss in Simmental dairy cattle.

PRODAVAO MESO BEDRENIČAVE KRAVE. LAKOMISLENOST UZROKOVALA TEŠKU ZARAZU. - ZAKLAO BOLESNU KRAVU

Hrv. Kostajnica, 5. XII. U selu Panjani, općine Majur kod Kostajnice, zaklao je seljak Tade Knečević, pred nekoliko dana jednu bolesnu kravu, od koje je meso u selu rasprodao po 4 dinara kilogram. Medjutim sve bi bilo dobro prošlo, da seljak Golubovac, koji je jeo od toga mesa, nije obolio i liječnik dr. Stipaničić, koji je pozvan bolesniku, ustanovio je bolest bedrenicu. Kako su osim toga dvjema ženama, koje su gulile kravu, stale oticati ruke, ustanovljeno je, da je krava bila bolesna od bedrenice, pa je o tom slučaju podnešena prijava.

„Večer“ (Agreb), 4202, 7, 1934 (god. 15) (5. prosinca 1934.).