

LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY

Arūnas Rutkauskas

**ASSESSMENT OF OVARIAN FUNCTION IN POST PARTUM
DAIRY COWS**

Summary of doctoral dissertation
Biomedical sciences, veterinary medicine (12B)

Kaunas, 2005

The work has carried out at Lithuanian Veterinary Academy in 2001–2005.

Research supervisor -

Prof. Habil. Dr. Henrikas Žilinskas (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary Medicine – 12B).

Chairman of the Veterinary science council -

Assoc. Prof. Dr. Eugenijus Aniulis (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary Medicine – 12B).

Members:

Dr. Aloyzas Januškauskas (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary Medicine – 12B);

Assoc. Prof. Dr. Vita Riškevičienė (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary Medicine – 12B);

Prof. Habil. Dr. Vytautas Sirvydis (Vilnius Pedagogical University, Biomedical Sciences, Zootechny – 13B);

Prof. Habil. Dr. Vytautas Špakauskas (Veterinary institute of Lithuanian veterinary academy, Biomedical Sciences, Veterinary Medicine – 12B).

Opponents:

Dr. Raimundas Mockeliūnas (Lithuanian Veterinary Academy, Biomedical Sciences, Veterinary Medicine – 12B);

Dr. Jonas Kutra (Lithuanian Veterinary Academy's Institute of Animal Science, Biomedical Sciences, Zootechny – 13B).

Public defence of doctoral thesis in Veterinary science council will take place at the Lithuanian Veterinary Academy I auditorium 1 pm LT on 21th October of 2005
Address: Tilžės 18, LT-3022 Kaunas, Lithuania.

The abstract of doctoral thesis has been send on 20th of September 2005 according to confirmed address list.

The doctoral thesis is available at the library of Lithuanian Veterinary Academy.

LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA

Arūnas Rutkauskas

**KARVIŲ KIAUŠIDŽIŲ FUNKCIJOS TYRIMAS PO
APSIVERŠIAVIMO**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina (12B)

Kaunas, 2005

Darbas atliktas 2001–2005 metais Lietuvos Veterinarijos Akademijoje.

Mokslinis vadovas -

Prof., habil. dr. Henrikas Žilinskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B).

Disertacija ginama Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos medicinos mokslo krypties taryboje.

Pirmininkas -

Doc., dr. Eugenijus Aniulis (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B);

Nariai:

Dr. Aloyzas Januškauskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B);

Doc., dr. Vita Riškevičienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B);

Prof., habil. dr. V. Sirvydis (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B);

Prof., habil. dr. V. Špakauskas (LVA Veterinarijos institutas, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B).

Oponentai:

Dr. Raimundas Mockeliūnas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B);

Dr. Jonas Kutra (LVA Gyvulininkystės institutas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B).

Disertacija bus ginama viešame Veterinarinės medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2005m. spalio mėn. 21 d. 13 val. Lietuvos veterinarijos akademijos I auditorijoje.

Adresas: Tilžės 18, LT-3022 Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2005 m. rugsėjo mėn. 20 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą.

Su disertacija galima susipažinti Lietuvos veterinarijos akademijos bibliotekoje.

INTRODUCTION

Disorders of dairy cows' reproduction or wrong determination of insemination time constitute large economical loss for dairy companies as well as for single farmers. In latter years dairy farms tend to expand, milk yields become greater and at the same time more reproductive problems emerge. Improvement of cows' herds in long-run with the aim to obtain more milk per cow/year in many countries rendered a decreased fertility, because it is known that in lactating dairy cows there is a strong negative genetic relationship between milk production and fertility (Oltencu et al., 1991). Cows attain peak of their reproductive capacity at five to seven years of age, later together with advancing age there is a rise in embryo mortality and lowered conception rate due to inadequate oocyte development (E. Hafez, 1980).

Often cows are culled due to anestrus, infertility, endometritis, and mastitis. Therefore it is very important to diagnose causes of estrus disorder in time in order to start treatment as soon as possible and to restore cow's productivity. Many problems influencing disorder of cow's reproductive function occur during post partum period. During parturition as well as in post partum period cow's organism undergoes many changes. Physiologically changes take place in cow's uterus, ovaries, endocrine system and their course depends on different influencing external factors. Cows do not conceive on time due to mistakes in estrus detection and because sometimes "silent" estrus comes into play which is unnoticeable because sparse clear mucus is secreted. If first estrus passes by then after 21 day (interval from 17th to 24th) cow comes in to estrus again (Gene, 1996). Because estrus is missed the next insemination is usually unsuccessful.

Cows that do not conceive after 4 – 5 inseminations (or 60 – 160 days post partum) are considered to be infertile. Number of cows that do not come to estrus in post partum period ranges from 10 to 40 per cent (Zdunczyk et al., 2002). Infertility invokes many economical losses due to the expenditure on sperm purchase, workforce increase and increased interval from one partum to the next one. Usually there are two or even more reasons of infertility. The main are the following: 1) ovarian and (or) uterine diseases, 2) failures of fertilized oocyte implantation, 3) embryonic mortality and 4) wrong determination of estrus and due to wrong insemination time (Shearer et al., 1992). The primary focus of this work was to study disorders of ovarian function and to investigate causes of infertility in cows.

Early resumption of ovarian functioning is absolutely necessary for the interval between the two consecutive parturitions to be no longer than 365 days. Anestrus is the main reason that extends this period. The three main clinical forms of non-estrus are distinguished: "silent" estrus, functional disorders of ovaries and persistent corpus luteum (*corpus luteum pseudograviditatis*) (Zdunczyk et al., 2002). Size of the ovaries and ovarian follicular growth dynamics are regarded to be fairly exact measurements of cow's ovarian functional activity. For this reason rectal palpations are carried out to investigate the functional status of ovaries;

however application of this investigation method allows some mistakes. Ultrasonographic investigation presents the possibility of getting precise assessment of follicular growth dynamic in cows during the post partum period (Savio et al., 1990; Ginther et al., 1996; Perez et al., 2003; Masiulis 2003). During ultrasonographic investigation organ that is under investigation can be directly seen in the monitor. This presents a possibility to count follicles and assess corpus luteum, to measure them and during repeated investigations observe their growth or regression. Process of follicular growth dynamics is controlled by various hormones, growth factors, cellular interactions and genes (Sartori et al., 2002; Perez et al., 2003). During this process only one follicle, that is able to ovulate, must mature. Estrus cycle of cow usually has two follicular waves, but in some cases waves may be three or four. The number of follicular waves during estrus cycle is also dependent on cow's age, parity, season and milk yield (Williams, 2002).

Ovarian activity of cow may be determined by evaluating progesterone concentration in peripheral blood plasma. This hormone is secreted by corpus luteum cells. Normally, its concentration is increased from the baseline values on the 4th day of the cycle, reaches its peak on day 8 and remains elevated till the day 17 of the estrus cycle (Peters et al., 1994). This hormone directly represents activity of corpus luteum which is the indicator of ovarian function when observing estrus cycle and ovarian activity in post partum period.

Frequently estrus cycle in cows is disturbed because of the persistent corpus luteum (PCL). When PCL is, diagnosed it is artificially dissolved with the help of medicaments because suprabasal progesterone concentrations during estrus have an inhibitory effect on the positive feedback of high estradiol concentrations on the hypothalamus (Stock and Fortune, 1993). The early sources of literature (Aniulis, Znaidaukas et al., 1989) suggest that it is possible to squeeze out corpus luteum however nowadays this method is no longer used because it causes massive haemorrhages inside the ovaries and thereafter appearing concrescences. In order to stimulate ovarian activity at the time of estrus, GnRH can be applied to regulate the frequency of LH pulses (Pursley et al., 1993; Bage, 2002). For estrus stimulation, GnRH is usually applied together with prostaglandins.

The aim of the study: to evaluate factors affecting resumption of ovarian activity and to assess follicular size dynamics in post partum period of Lithuanian Black and White (LBW) and German Black and White (GBW) breed cows and to determine efficacy of prostaglandin in combinations with other preparations for treatment of persistent corpus luteum.

Goals:

1. To evaluate and investigate factors affecting resumption of ovarian activity in cows during post partum period;

2. To evaluate and investigate changes in the size of ovaries and follicular growth dynamics in clinically healthy cows and cows with persistent corpus luteum during estrus cycle;
3. To evaluate and investigate treatment efficacy of anestrus cows when using prostaglandins in combinations with vitamins and GnRH.

Novelty of the scientific study. Measurements of ovarian, corpus luteum, follicles of Lithuanian Black and White and German Black and White breed cows made by ultrasound scanner were revised. Effect of different factors, such as age, breed and season determining persistence of corpus luteum was statistically evaluated. Validation of treatment efficacy of persistent corpus luteum was carried out based on testing of progesterone concentration in peripheral blood plasma.

INVESTIGATION METHODS

In the experiments we have used Lithuanian Black and White and German Black and White breed cows, in which ovarian, corpus luteum and follicular measurements were made with an ultrasound scanner (Scanner 100 LC Vet, the Netherlands).

To observe **resumption of ovarian activity post partum** 24 LBW and GBW breed cows of 3 to 8 years old were selected on the basis of parturition date. Investigation started 3 months post partum and lasted to pregnancy determination day. Rectal manual palpations and ultrasound investigations were performed. With the help of ultrasound scanner size of ovaries, corpus luteum and follicles were determined. Average size of ovary, corpus luteum and follicle was determined based on methods described by Ginther O. J. (1996), Sirois J. (1988): the length and the width of ovary were determined first, then the size of corpus luteum and follicle was measured, in order to calculate the arithmetical average of their dimensions. With the aim to gain precise data it is possible to repeatedly measure derivatives inside ovaries. Arithmetical average of length and width – which is defined as an average size of ovary, corpus luteum or follicle - was derived with the help of statistical packages (SPSS for Windows 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 1989-2004).

The effect of factors, such as age, breed, season, milk yield that influence reproductive function in cows was assessed on resumption of ovarian activity post partum. Number of follicular waves, maximum size of ovaries and follicles and interaction on ovarian, corpus luteum and follicles size was determined in both breeds of cows. SPSS statistical package was used to analyze impact of all the factors. Data processing was performed with the help of “Microsoft Excel” program. Influence of different factors on reproductive performance of cows was assessed by way of descriptive statistics and interrelations and levels of these factors were analyzed.

To observe change of ovarian size and follicular growth dynamics of clinically healthy cows and cows with persistent corpus luteum during estrus cycle 25 cows of various lactation stages, 3 to 7 years old, LBW and GBW breed were investigated that according to the insemination plan were intended to be inseminated after the first signs of estrus. They were grouped in to two groups: the first group (n=18) included cows post partum that did not present any disorders of estrus cycle. The second group (n=7) included anestrus cows with persistent corpus luteum that was diagnosed after two or more tests. Cows were investigated for 11 days; during this period while performing rectal palpations with the help of ultrasound scanner ovaries, follicles, persistent corpus luteum were measured and progesterone concentration plasma was evaluated.

During investigation plasma samples were taken from every experimental cow to evaluate progesterone concentration in plasma, blood samples were collected in a disposable vacuum test-tubes ("Venoject", Terumo Europe N. V, Belgium). Plasma samples in 1 hour were delivered to LVA Animal Reproduction Lab where they were centrifuged for 5 minutes under the speed of 3.000 revolutions per min. Segregated plasma with the help of Paster pipette of 1 ml volume and 140 mm length (Einweg-Pasteurpipetten, Carl Roth GmbH, Germany) was poured in volumes of 0.5 – 1.0 ml into Eppendorf-centrifugation tubes and frozen at -20 C.

Progesterone evaluation. Progesterone testing was carried out by using progesterone diagnostic kit PROG-RIA-CT (BioSource Europe S.A., Belgium), designed for quantitative assessment of progesterone in serum according to the radio-immune investigation of progesterone in cattle plasma described by Duchens et al.,1994. Investigation was carried out in Hormone Lab of Kaunas University of Medicine following producer guidelines (BioSource Europe S.A., Belgium). Measurements used radio-immune analyzer "TAMMA – 12" (Russia).

Assessment of **treatment efficacy of anestrus cows post partum by prostaglandins in different combinations with vitamins and GnRH** synthetic analogues consists of three parts:

1. Use of preparation *Estron* in different combinations with *Trivit* for treatment of persistent corpus luteum;
2. Use of preparations *Dalmazin* and *Estron* for estrus stimulation;
3. Use of preparations *Estron* and *Fertagyl* for estrus stimulation.

When carrying out testing of the first investigation part (**Use of preparation *Estron* in different combinations with *Trivit* for treatment of persistent corpus luteum**) 25 cows of different lactation stages, LBW and GBW breed were selected. For purpose of testing all cows were divided in three groups.

The first group (n=5) consisted of cows that were diagnosed having persistent corpus luteum and they were treated once injecting preparation *Estron* (Cloprostenolum sodium, Bioveta, Plc., Czech Republic). This preparation contains: 0.25 g cloprostenolum sodium salt, less than 1 ml of additional substances (like chlorocresol, citric acid monohydrate and etc.). Active substance of the preparation is synthetic analogue of prostaglandin F2 – cloprostenolum that reduces

content of progesterone in plasma. Concentration of 17-estradiol remains at the same level as during normal estrus cycle. Luteolytic activity of the preparation is based on blocking of LH receptors in luteal cells. For this reason circulation of corpus luteum energy is disturbed (synthesis of AMF is disturbed) which stimulates its regression. While LH receptors in luteal cells interact with LH, cloprostenolom is not effective. Therefore the preparation is not effective for young corpus luteum, i.e., in the beginning of estrus cycle.

The second group (n=7) consisted of anestrus cows having persistent corpus luteum that were treated by preparation *Estron* together also injecting a vitamin preparation *Trivit* (vitamin suspension, joint stock company "Ukmergės biofabrikas", Ukmergė, Lithuania). This preparation is solution for injection and 1 ml of which contains: vitamin A – 300 000 IU, vitamin D3 – 100 000 IU, vitamin E – 50 mg, additional substances – less than 1 ml. *Trivit* consists of fat-soluble vitamins A, D3, E –biologically active organic substances.

The third group (n=13) consisted of anestrus cows having persistent corpus luteum that were treated by preparation *Estron* repeating treatment after 11 days.

On the first day of investigation injection of 2 ml of preparation *Estron* IM was made for every cow of the first group. After four days when cows came to estrus they were inseminated. On the same day injection of 2 ml of preparation *Estron* IM was made for every cow of the second group together injecting 20 ml of preparation *Trivit* in muscle. These cows were also inseminated after four days when they came to estrus. Injection of 2 ml of preparation *Estron* (in muscle) was made for every cow of the third group and after 11 days treatment was repeated. After three to four days following the second injection cows came to estrus and were inseminated. During investigation every 5 – 7 days and on the day of estrus cows have undergone rectal palpations, with the help of ultrasound scanner dimensions of ovaries, follicles and corpus luteum have been assessed. Before injecting preparations and ultrasonography, plasma samples were taken to evaluate progesterone concentration. For investigated cows plasma samples were taken and biochemical testing carried out in National Food and Veterinary Lab of Marijampolė district. What parameters were assessed. According to the findings of investigation the key biochemical plasma parameters of majority of cows were within the mark. Quality of semen samples that was used for insemination of cows that came to estrus, was assessment in LVA Animal Reproduction Lab following methodological guidelines of Riškevičienė and Žilinskas 1999). According to the results, morphological parameters of sperm quality fitted within the dynamic range of sperm quality.

Testing of cows' genitals, ovaries, corpus luteum and follicles was of the rectal and ultrasound type.

When carrying out testing of the second investigation part (**Use of preparations *Dalmazin* and *Estron* for estrus stimulation**) 20 cows of different lactation stages that were marked in the insemination plan, LBW and GBW breed were selected and tested. They have undergone rectal and ultrasound testing after

persistent corpus luteum or anestrus had been diagnosed. For purpose of testing all cows were divided in three groups.

The first group (n=13) consisted of cows that were diagnosed persistent corpus luteum. Each of them had injections of *Dalmazin* preparation (Fatro S.p.A. Italy). 1 ml of the solution contains cloprostenolum – 0.075 mg, alcohol – 0.675 mg, citric acid – 9.55 mg, chlorocrezolum – 1mg, sodium hydroxide – 5.3 mg, injective water – less than 1 mg. Active substance is the rightward (dextrorotatory) enantiomer of cloprostenolum. It is a synthetic analogue of prostaglandin F_{2α}. It is a biologically active, luteolytic derivative of cloprostenolum. In luteolytic phase (corpus luteum formation phase) *Dalmazin* reduces number of luteolytic hormone's (LH) receptors inside the ovary therefore corpus luteum regresses quickly and suddenly decreases content of progesterone. Synthesis of follicles stimulating hormone (FHS) becomes more active. This induces maturation of new follicles, causes estrus and ovulation. Injections of the preparation were made for all the cows by 2 ml IM and every day with the help of ultrasound scanner functional derivatives were measured inside ovaries and plasma samples were taken with the aim to evaluate progesterone concentration in plasma.

The second group (n=4) consisted of cows that were diagnosed a persistent corpus luteum. They were injected with *Estron* preparation. Injections of the preparation were made for all the cows by 2 ml IM and every day with the help of ultrasound scanner functional derivatives were measured inside ovaries and plasma samples were taken to evaluate progesterone concentration in plasma.

The third control group (n=3) consisted of cows with PCL that were simply observed without using any preparations.

Measurements of their ovaries and follicles were made with ultrasound scanner.

When cows came to estrus they were inseminated 5 - 7 days following the insemination, functional status of ovaries was examined. If cows didn't come to estrus and were not inseminated after 10 - 12 days stimulation was repeated for the second time. The third control group (n=3) included cows that were characterized by estrus without any disorders and came to estrus on their own account and were inseminated without injections of any medicaments.

Semen used for insemination of cows was tested as stated above. Morphological indicators of sperm were within the dynamical range of sperm quality.

When carrying out testing of the third investigation part (**Use of preparations *Estron* and *Fertagyl* for estrus stimulation**) 26 cows of different lactation stages, LBW and GBW breed were selected and tested that were marked in the insemination plan. They have undergone rectal and ultrasound testing after persistent corpus luteum or anestrus had been diagnosed. For purpose of testing all cows that were diagnosed anestrus were divided in to four groups.

The first group (n=8) included cows that were diagnosed a persistent corpus luteum. Each of them had one injection of *Estron* preparation. All cows received 2 ml IM injections of preparation on daily occasions and every day until the insemination took place, anatomical structures of the ovaries have been measured

with the help of ultrasound scanner. Blood plasma samples were taken to evaluate progesterone concentration in plasma.

The second group (n=7) included cows that were diagnosed a persistent corpus luteum. Each of them had two injections of *Estron* preparation with interval of 11 days between two injections. All cows received 2 ml IM injections of preparation on daily occasions and every day until the insemination took place, anatomical structures of the ovaries have been measured with the help of ultrasound scanner. Blood plasma samples were taken to evaluate progesterone concentration in plasma.

The third group (n=8) included cows that were diagnosed a persistent corpus luteum. Each of them had two injections of *Estron* preparation with interval of 11 days. After three days following the second injection of preparation *Estron*, *Fertagyl* (Intervet International B. V.) was injected. 1 ml of the Fertagyl contains gonadorelin - 100 µg, additional substances – less than 1 ml. Gonadorelin is a synthetic decapeptide identical to the natural gonadotropin releasing hormone (GnRH) that is produced in hypothalamus. The preparation works as the exogenous GnRH. Hypophysis under its effect releases luteolytic (LH) hormones and follicle stimulating (FSH) hormones. LH and FSH directly affect ovarian function. FSH stimulates development of follicles and LH causes ovulation and luteolytic activity. On the 18th – 23rd day following preparation injection cows come to estrus and can be inseminated. Small doses stimulate release of LH. When used during insemination preparation synchronizes ovulation and in the middle of estrus cycle (on the 11th to 14th day) – stimulates release of LH and corpus luteum functioning. Recommended dose for fertility improvement is 2.5 – 5 ml. Injections of the *Estron* preparation were made for all the cows in 2 ml in muscle. All cows received 2.5 ml IM injections of *Fertagyl* preparation and every day ovarian structures were monitored using an ultrasound scanner and plasma samples were taken to evaluate progesterone concentration.

The fourth, control group (n=3) included cows that were closely observed without using any preparations.

Cows that came to estrus were inseminated and after 5 - 7 days after insemination condition of ovaries were examined. If cows didn't come to estrus after 25 days following the last injection of preparations ultrasound measurements were no more performed.

Plasma samples were taken on random manner and plasma biochemical indicators were investigated in LVA Large Animal Clinics Lab. Plasma indicators of cows were within the range of normal.

INVESTIGATION FINDINGS AND DISCUSSION

The main purpose of this work was to assess factors affecting infertility of cows and to determine changes of ovarian size and cyclic changes emergent under the influence of these factors and variation of progesterone concentrations in peripheral blood plasma. of the size of ovaries and follicles were measured with ultrasound

scanner. The first published reference to use ultrasound scanner for investigation of cows' genitalia is 1982 (Kahn, 1992). In Lithuania scanner was used for scientific investigations of reproduction in cows in 2003 (Masiulis et al., 2003). The use of ultrasound in investigations of bovine reproduction gave some additional information about changes in ovarian structure and function during estrus cycle. Ultrasound scanner enables to detect follicular growth waves, growth and regression of corpus luteum and foetal development.

Ovaries can be investigated using an ultrasound sensor of 3.5 or 5 to 6 MHz. To view follicles that are 3 to 5 mm in size or larger, sensor performing at 6.0 MHz frequency is used, and to view smaller structures, such as follicles that are less than 3 mm in size, sensor performing at 7.5 to 8 MHz frequency is used (Taverne and Willemse, 1989). Under routine examination, follicles are measured with 5 MHz frequency sensor when they are less than 10 mm in size due to unecogenic fluid-filled cavity (Brown, 1997).

Ribadu (1999) measured follicular diameter with the help of ultrasound scanner live and slaughtered animals. Correlation coefficient on follicular diameter in live and slaughtered animals accounted to 0.7 to 0.9 proving that transrectal sonography (ultrasound examination via rectum) is reliable method for identification and measurement of follicles inside cows' ovaries.

Corpus luteum (CL) is an ecogenic structure as well as ovarian stroma. In many cases CL resembles solid formation however in some occasions it may have a fluid-filled cavity. Investigating dairy breed heifers with ultrasound scanner it was found that in 79% of all cases assessed CL contains cavity of 2 to 10 mm in diameter in the beginning of estrus cycle or in during early pregnancy (Kastelic et al., 1990). Positive correlations was found between the diameter of corpus luteum, area of luteolytic tissues and ecogenicity of CL as well as between the size of CL and its ability to produce and secrete progesterone. It is known (Kastelic et al., 1991) that according to the structure of luteolytic tissues it is possible to specify pregnancy of heifers however this criterion is not characteristic for cows. Investigation with ultrasound scanner allows differentiation between the developing and regressing corpus luteum. In 1991 Kastelic (Kastelic et al., 1991) presented new data about follicular growth dynamics and corpus luteum formation. It has been proved that corpus luteum containing cavity is a normal formation for cows. Use of ultrasound scanner facilitated diagnosis and differentiation of follicular *theca* cysts with thin wall, single or multiple present in one or both ovaries, and follicular luteolytic – single structures, found in one ovary with thicker wall than of follicular *theca* cysts – cysts (Morrow, 1986), and also early diagnosis of pregnancy on the 21st – 30th day of calving period.

The present investigation reveals that ovaries of Lithuanian Black and White breed cows are larger in size compared to that of German Black and White breed cows. The right ovary of LBW breed cows was by 1.35 ± 2.20 mm larger compared to that of GBW breed cows; the left ovary - 1.10 ± 0.85 mm ($p < 0.001$). It was also found that follicles of these breed cows are of different size too. Follicles of the right ovary of LBW breed cows were larger by 1.60 ± 1.40 mm when compared to

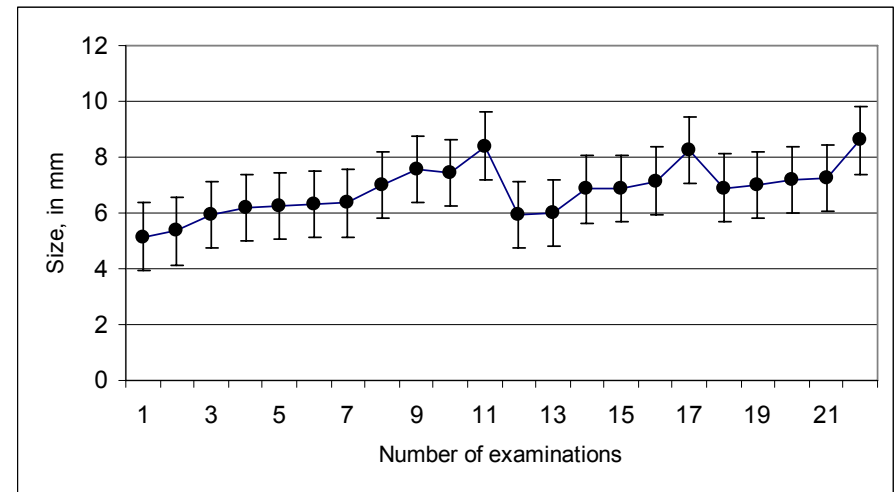
those of GBW breed cows, and follicles of the left ovary of LBW breed cows were also larger by 0.55 ± 0.34 mm when compared to those of GBW breed cows ($p < 0.001$). Some authors (The Merck Veterinary Manual, 1998; Tian and Zao, 2000) describe this discrepancy by the fact that native cattle breeds adapt better to local environment and climate, differ in growing and maturation rate and reproductive functions. Especially this adaptation is significant in dairy breed cows (Ensminger, 1993).

Multifactor analysis revealed that cow's age, breed and season at the factors that significantly influence ovarian size as well as the size of follicles of the left ovary ($p < 0.05$), whereas influence of season on the size of right ovary was not statistically significant. Investigation of interaction effects on ovarian size (average of length, width and size) and follicular size (average of length, width and size) showed that influence of cow's age (A), cow's breed (B) and season (S) – A*B*S – significantly affect the size of the follicles in left ovary ($p < 0.05$). No significant effect on the size the follicles of the right ovary was not found. Ovarian size and follicular size of the left ovary is influenced by cow's age and season, interaction between cow's age and breed, and interaction between breed and season ($p < 0.05$). Follicular size of the right ovary is significantly influenced only by cow's age and breed and interaction between cow's age and season ($p < 0.05$). It was found that all the parameters of ovarian size positively correlate with cow's age ($p < 0.001$). Milk production and the size of ovaries and follicles were not correlated.

When analyzing influence of the single cow's age factor on ovarian size (table 4) the largest right ovary (average of the size) was found in six years old cows – 23.40 ± 4.70 mm ($p < 0.05$), and the largest left ovary (average of the size) was found in seven and eight years old cows – respectively 22.80 ± 3.73 mm and 22.22 ± 2.50 mm ($p < 0.05$). The sizes of both ovaries of yearling heifer is almost identical however of these matured the right ovary is larger compared to the left one (Tian and Zhao, 2000). It was observed that with advancing age of the animal the right ovary remains larger than the left one ($p < 0.001$) and only in three and four years old cows the left ovary is larger than the right one. It was also observed that the right ovary increases in size until six years of age and later starts to decrease ($p < 0.05$). This fact supported investigations carried out by Bouchard (2003) that found decrease of cows' reproductive capacity beginning from the seventh year of age. Older cows present metabolic defects more often; this could prevent the final follicular growth by hypothalamic negative feedback of estradiol, reducing GnRH pulses, and prompting a decrease in LH pulses that prevents the follicles from achieving the ovulatory size; appropriate estradiol quantities are therefore released to develop a LH peak and ovulation (Perez et al., 2003).

During our investigation follicular growth dynamics of LBW and GBW breed cows was assessed. LBW breed cows 1.3 times more often present two follicular waves ($p < 0.01$). By examinations with ultrasound scanner it was observed that on the average follicle of LBW breed grew 1.15 ± 1.13 mm per day, and ovulated being 10.20 ± 5.38 mm in diameter. When studying estrus cycle of GBW breed cows it

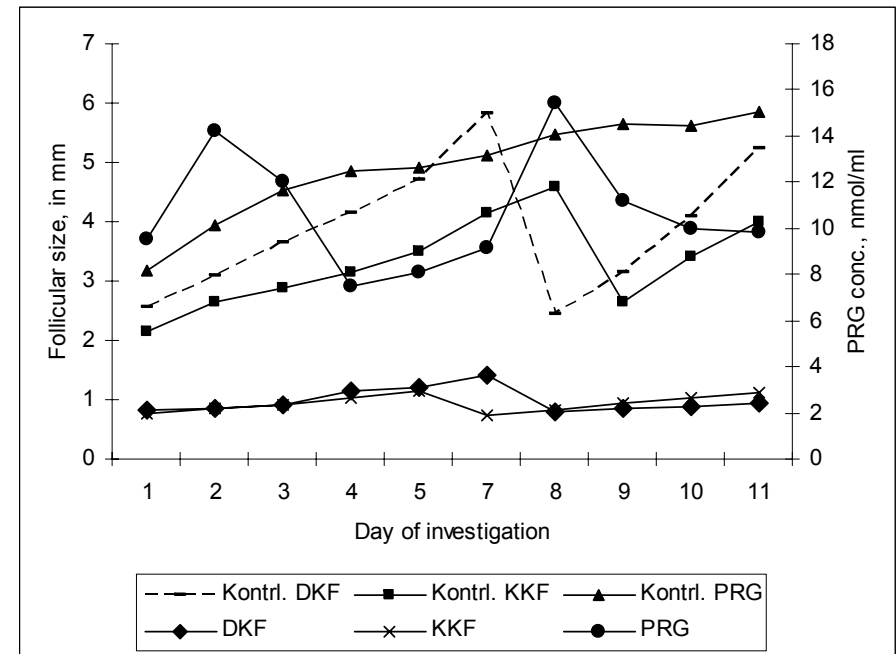
was found that they present three follicular waves 0.7 times more often (Picture 1) compare to two follicular waves ($p<0.001$).



Picture 1. **Change of follicular size of GBW breed cows during follicular growth waves.**

On the average follicles grew 0.79 ± 0.59 mm per day and ovulated being 8.60 ± 2.95 mm in diameter. Crowe (1999) suggests that most often during estrus cycle two or three follicular waves occur, however one or four follicular waves are diagnosed in very rare cases. During our investigations we did not observe any of the cases with one or four follicular waves. According to Perez et al. (2003) two follicular waves are characteristic for cows with higher reproductive capacity. When number of follicular waves is lower, estrus cycle is shorter and ovulatory follicle is by 2 mm larger in size compared to the follicle matured during estrus cycle of three follicular waves. With increasing age there is a rise in embryo mortality (E. Hafez, 1980). Advancing age renders a decline in uterine resistance which are manifested through a development of metritis and endometritis. In this condition prostaglandin $F_{2\alpha}$ is still released, however with decline of uterine contractility there's also decline in released amount of $PGF_{2\alpha}$. Therefore according to Wiltbank (2002), in cows beginning with the third lactation that do not conceive, often develop a persistent corpus luteum. During our investigation we have found that persistent corpus luteum was diagnosed in 55% cases of LBW breed cows, and 45% cases of GBW breed cows. It was found that persistent corpus luteum is most often found in 8 years old LBW breed cows, and in 5 years old GBW breed cows ($p<0.05$). According to Geoffrey (1996), regression of corpus luteum and its size in the ovary is dependant upon environment and patho-physiological factors: feeding,

fat, suckling duration, difficulties during parturition, breed, age, season of parturition, uterus pathologies and chronic diseases.



Picture 2. Change of follicular size and progesterone concentration in plasma during investigation. Kontrl. DKF – average follicular size in the right ovary of the control group cows. Kontrl. KKF - average follicular size in the left ovary of the control group cows. Kontrl. PRG – progesterone concentration in plasma of control group cows (in nmol/ml). DKF - average follicular size in the right ovary of cows with persistent corpus luteum. KKF - average follicular size in the left ovary of cows with persistent corpus luteum. PRG - progesterone concentration in plasma of cows with persistent corpus luteum (in nmol/ml).

When experiment cows without disturbances of estrus cycle were investigated with ultrasound scanner, averages of ovarian, follicular and corpus luteum sizes were assessed. It was found that on the first day of the investigation average size of the right ovary in this group was 22.6 ± 2.86 mm and average size of the left ovary – 21.00 ± 2.05 mm. Follicular size in the right ovary amounted for 2.56 ± 0.95 mm and in the left one – 2.15 ± 1.15 mm. Average of corpus luteum size on the first day of investigation was 3.5 ± 1.26 mm and progesterone concentration was 3.18 nmol/ml ($p \leq 0.05$). Average sizes of ovaries and their changes in cows with persistent corpus luteum in the ovary were determined. On the first day of investigation the average size of the cows' right ovary was 19.08 ± 3.52 mm and average size of the left ovary

was 18.15 ± 3.48 mm ($p < 0.05$), it is respectively by 3.52 ± 0.66 mm and 2.85 ± 0.78 mm smaller compared to the first group cows. Average size of the follicle in the right ovary was 2.15 ± 0.32 mm ($p < 0.05$), and in the left ovary was 1.95 ± 0.26 mm ($p < 0.05$). Average size of corpus luteum in the right ovary was 10.59 ± 1.26 mm ($p < 0.05$), and in the left ovary was 9.65 ± 2.05 mm ($p < 0.05$). Progesterone concentration was 9.5 nmol/ml ($p < 0.05$). During investigation we have found that ovaries of the clinically healthy cows were larger in size compared to the cows with persistent corpus luteum. It was also found that not only ovaries were larger in size but also follicular growth of the clinically healthy cows was more intensive (Picture 2).

We have found that follicles grew in ovaries of cows with persistent corpus luteum however follicular waves were not expressed, follicles didn't reach size of ovulatory follicle and cows didn't come to estrus. Progesterone concentration in plasma declined 5.79 ± 2.71 nmol/l (from 13.29 nmol/l to 7.5 nmol/ml) ($p \leq 0.05$) thus preventing follicular growth and their ovulation. When corpus luteum is present in ovary, it releases progesterone that prevents release of GnRH and LH (Roche et al., 1992; Stevenson, 2001; Hall et al., 2002); for this reason estrus cycle is disturbed and follicle capable to ovulation does not mature.

There are many factors causing disorders of cows' estrus and ovulation. These factors often include persistent corpus luteum, experienced endometritis, and inactive ovaries. Therefore for the purpose of estrus stimulation of cows with estrus disorders or cows that had been inseminated for two or even more times but didn't conceive synthetic prostaglandins were used.

Traditional ways of estrus synchronization, while using prostaglandins or synthetic analogues of them during luteolytic phase of estrus cycle, invoke ovulation. Under treatment by $\text{PGF}_{2\alpha}$ time of ovulation is dependant upon the stage of follicular growth (Doležel et al., 2000), although ovulation usually takes place on the day 3 to day 5 day post partum (Doležel et al., 2002). It was proved that when using prostaglandins or synthetic analogues of them twice with interval of 11 days between injections, cows and heifers come to estrus in 3 - 5 days after the second injection. For the purpose of investigation preparation *Estron* was used that has luteolytic activity on corpus luteum present in ovary. The active substance of the preparation is synthetic analogue of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ – cloprostenolium.

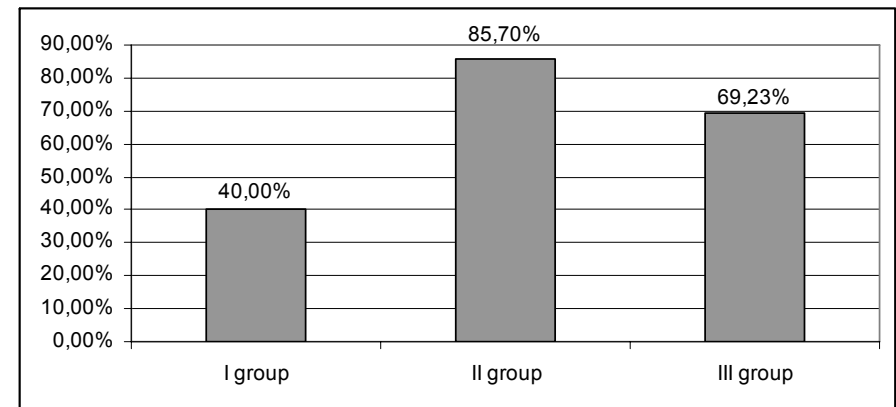
In the first group of cows with persistent corpus luteum after three days of the treatment with synthetic prostaglandins 4 cows came to estrus (80%), in the second group – six cows (85.7%). Corpus luteum present in their ovaries was partially resolved. In the ovaries of cows that didn't come to estrus the same corpus luteum was found however it was smaller in size. On the first day average size of persistent corpus luteum in the right ovary was 16.8 ± 2.5 mm and in the left one was 16.2 ± 1.0 mm, and progesterone concentration was 18.02 ± 5.6 nmol/l. After three days of preparation *Estron* injection, size of corpus luteum in the right ovary was 12.5 ± 1.7 mm, and in the left one – 11.7 ± 1.3 mm. Progesterone concentration in plasma of cows that didn't come to estrus was 10.87 ± 4.3 nmol/l. Size of the follicle in the right ovary on the estrus day was 9.8 ± 1.1 mm, and in the left ovary was 8.9 ± 0.9

mm. Rate of conception in cows was 50%. Progesterone concentration in plasma of cows that came to estrus was 3.38 ± 2.1 nmol/l.

When *Estron* was used in combination with vitamin preparation *Trivit* that stimulates secretion of gonadotropin hormones, stabilizes membranes and improves synthesis of enzymes, size of the ovulatory follicle in the right ovary on the estrus day was 10.1 ± 1.2 mm, in the left ovary was 10.5 ± 0.8 mm, progesterone concentration was 2.56 ± 0.7 nmol/l. After use of this combination of medicaments, 85.7% of cows came to estrus and 66.67% conceived. According to Geoffrey (1996), when prostaglandins are used twice, there is a lower incidence of cows coming to estrus, however conception rate is higher compared to prostaglandins used once.

Cows of the third group on the eleventh day of investigation were injected with preparation *Estron* for the second time. On this day progesterone concentration in their plasma was 7.67 ± 0.24 nmol/l and the next day declined to 5.10 ± 0.11 nmol/l ($p < 0.05$).

In the third group in three days after the second injection of preparation *Estron* 9 cows (69.23%) came to estrus. Progesterone concentration in their plasma was 1.18 ± 0.13 nmol/l. There was no corpus luteum persistent in ovaries. Corpus luteum in the right ovary of cows that didn't come to estrus was 12.3 ± 1.6 mm in size, and in the left one ovary was 10.3 ± 0.9 mm in size. Progesterone concentration was 7.81 ± 1.9 nmol/l. On estrus day follicular size in the right ovary of cows that came to estrus was 9.7 ± 0.9 mm, and in the left ovary was 10.6 ± 1.1 mm. Conception rate was 55.56% of cows (Picture 3).



Picture 3. **Rate of coming to estrus after use of preparation**

Luteolytic activity of prostaglandin $F_{2\alpha}$ is already known since 1970. Normally left derivatives of cloprostenolum chemical synthesis are used however recently preparation *Dalmazin* is more and more often used in persistent corpus luteum

treatment and it is different in that it contains the rightward (dextrorotatory) enantiomer of cloprostenolum. *Dalmazin* works much better than similar preparations of cloprostenolum racemates. In luteolytic phase (corpus luteum formation phase) *Dalmazin* reduces number of luteolytic hormones' (LH) receptors inside the ovary therefore corpus luteum regresses quickly and suddenly content of progesterone decreases. In the hypophysis synthesis of follicle stimulating hormone (FHS) becomes more active. This induces maturation of new follicles, causes estrus and ovulation.

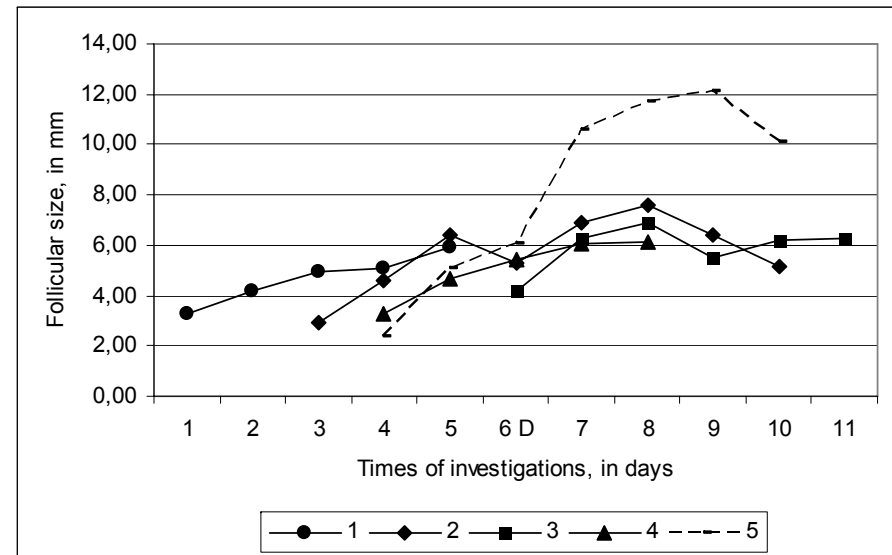
Investigation showed that persistent corpus luteum in ovaries LBW breed cows happens to be more often (55% of cases) found compared to that of GBW breed cows (45%). It was observed that most often persistent corpus luteum is found in 8 years old LBW breed cows and in 5 years old GBW breed cows ($p < 0.05$).

Multifactor analysis showed that influence of cow's age and breed on ovarian, follicular and corpus luteum in the left ovary size is significant ($p < 0.05$), and only influence of breed on corpus luteum size in the right ovary is insignificant. Investigation of interactions influence on ovarian size (average of length, width and size), follicular size (average of length, width and size) and corpus luteum size (average of length, width and size) showed that influence of cow's age (A), cow's breed (B) and of these two factors' interaction – A*B – on ovarian size and size of corpus luteum in the left ovary is statistically significant ($p < 0.05$), however significant influence on corpus luteum size in the left ovary was not found.

Analysis of single factor – age – influence on ovarian size showed that the largest persistent corpus luteum in the right ovary (size average) were found in 8 years old cows being 16.50 ± 4.65 mm, and in the left ovary (size average) of 5 years old cows being 12.15 ± 3.24 mm ($p < 0.05$). It was found that all the ovarian parameters significantly correlated with cow's age ($p < 0.05$).

For the purpose of experiment preparations *Estron* and *Dalmazin* were used. After injection of *Estron* progesterone concentration in plasma declined from 14.75 ± 0.53 nmol/l on the first day of investigation to 5.04 ± 0.42 nmol/l on the next day and when preparation *Dalmazin* was used, respectively from 15.21 ± 1.01 nmol/l to 4.73 ± 0.84 nmol/l ($p \leq 0.05$).

Investigation showed that after use of *Dalmazin* follicles grow 2.03 ± 0.16 mm per day, and 92.31% of all treated cows came to estrus meanwhile after treatment by traditional cloprostenolum derivative, preparation *Estron*, follicles grow 1.21 ± 0.11 mm per day and 75% of cows came to estrus. After injection of preparation *Dalmazin* its luteolytic activity on persistent corpus luteum in ovary was more expressed and progesterone concentration on estrus day was lower compared to preparation *Estron*. In the group of cows that were treated by preparation *Dalmazin* progesterone concentration on estrus day was by 13.58 ± 4.92 nmol/l lower compared to that on the first day of investigation. This difference among *Estron*-treated cows amounted for 12.26 ± 3.94 nmol/l.



Picture 4. **Dynamics of follicular growth in presence of corpus luteum and after treatment by preparation *Dalmazin*.** Letter “D” in diagram shows time of injection. Numbers represent follicles.

According to Chiesa (2004) dextrorotatory enantiomer of cloprostenolum – preparation *Dalmazin* – works faster because reduces number of LH receptors in ovary and for this reason corpus luteum suddenly regresses and progesterone concentration in plasma declines, moreover FSH release rises and new follicles form. Investigation showed that under treatment by *Dalmazin* on estrus day, the follicles ovulated being by 2.35 ± 0.05 mm larger compared to that of cows treated by *Estron*. Follicular growth dynamics under *Dalmazin* injection is showed in Picture 4. In group of cows with persistent corpus luteum two cows (66.57%) spontaneously recovered (came to estrus) however size of the ovulatory follicle was by 2.95 ± 0.35 mm smaller when compared to that of cows treated by *Dalmazin* and by 0.6 ± 0.30 mm smaller compared to *Estron*.

Ultrasound examination showed that 83.33% of all cows treated by *Dalmazin* and only 66.67% of the cows treated by *Estron* conceived, meaning that when treating by dextrorotational cloprostenolum derivative 17.31% more cows came to estrus and 16.66% more cows conceived compared to those treated by preparation *Estron*.

Investigation of follicular waves (Macmillan et al., 1985; Thatcher et al., 1989; Twagiramungu et al., 1995) showed that use of GnRH and its analogues invokes ovulation and luteinization of dominant follicle. Many authors (Thatcher et al., 1989; Stevenson J., 2001; Doležel et al., 2002; Noseir, 2003) describe scheme

where prostaglandins are used together with GnRH. Gonadotropins were also used to induce ovulation when injecting them right before insemination (Taponen, 1999).

In our investigation we used GnRH (*Fertagyl*) that was injected two hours before the insemination took place, when estrus was initiated by two repeated injections of prostaglandins with interval of 11 days between injections with subsequent insemination carried out three days after the second injection.

Eleven days after use of *Estron* for every cow in the second and the third group injection of 2 ml of this preparation was made. On the day of injection in the second group of cows average size of the right ovary was 26.80 ± 1.98 mm, average follicular size was 4.78 ± 1.97 mm, and average corpus luteum size was 7.50 ± 2.10 mm. Average size of the left ovary was 25.90 ± 1.87 mm, average follicular size was 6.24 ± 2.10 mm, and average corpus luteum size was 10.63 ± 1.85 mm. Progesterone concentration was 1.66 ± 0.15 nmol/l.

On the eleventh day of investigation in the third group of cows the average size of the right ovary was 29.45 ± 4.29 mm, average follicular size was 10.15 ± 1.86 mm, and average corpus luteum size was 8.95 ± 2.22 mm. Average size of the left ovary was 25.92 ± 3.02 mm, average follicular size was 8.69 ± 3.51 mm, and average corpus luteum size was 8.52 ± 1.93 mm. Progesterone concentration was 7.67 ± 0.24 nmol/l.

Three days after the second injection of preparation *Estron* five cows in the second group (71.43%) and seven cows in the third group (87.5%) came to estrus. Cows of the third group that came to estrus were injected *Fertagyl* two hours before the insemination.

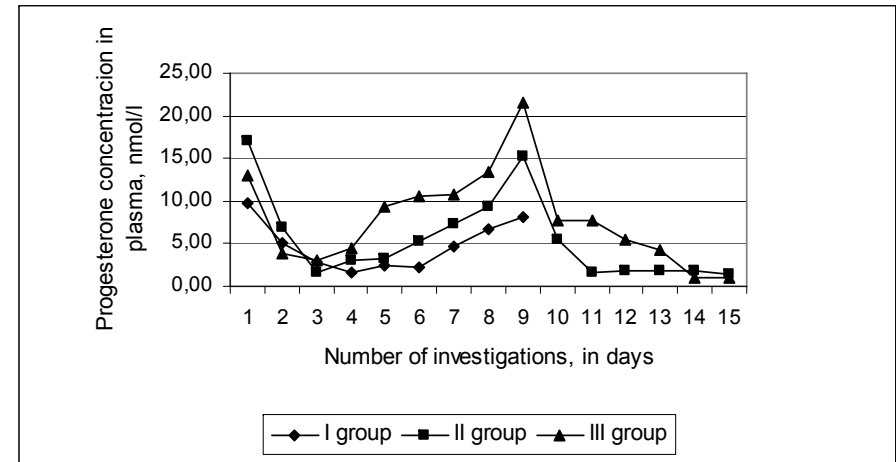
On the day of estrus in the second group of cows average size of the right ovary was 24.75 ± 1.05 mm, average follicular size was 9.87 ± 0.65 mm. Average size of the left ovary was 28.25 ± 1.12 mm, average follicular size was 9.40 ± 2.33 mm. Progesterone concentration on estrus day was 1.92 ± 0.14 nmol/l.

On the day of estrus in the third group of cows average size of the right ovary was 24.82 ± 3.51 mm, average follicular size was 10.83 ± 0.23 mm. Average size of the left ovary was 27.04 ± 1.43 mm, average follicular size was 10.05 ± 0.12 mm. Progesterone concentration before injection of *Fertagyl* was 1.08 ± 0.06 nmol/l and after two hours (right before insemination) – 1.03 ± 0.06 nmol/l.

Estrus of cows that were injected *Fertagyl* was better expressed, more vaginal mucus was secreted. Rectal palpations showed that uterus was more rigid compared to that of the controls. We found that after use of this preparation follicles grow larger in size: i.e. by 0.96 mm larger follicles in the right ovary and by 0.65 mm larger follicles in the left ovary ($p < 0.05$).

Changes of progesterone concentration in plasma dependant on the preparation used in treatment were also evaluated. On the first day of investigation in the first, second and third group, progesterone concentration in plasma of cows was 17.11 nmol/l. Three days after use of *Estron*, progesterone concentration declined significantly in all three groups of cows. On the third day of investigation, ultrasound scanner showed highly reduced corpus luteum. Beginning from the fifth

day of investigation progesterone concentration in plasma started to increase slowly. Beginning from the eleventh day following repeated *Estron* injection, progesterone concentration declined to $1.03\text{--}1.92\pm 0.23$ nmol/l in cows from the second and third group. Changes of progesterone concentration when prostaglandins were used in treatment are shown in Picture 5.



Picture 5. **Changes of progesterone concentration in plasma (nmol/l) during investigation**

We have found that following repeated injection of *Fertagyl* 87.5% of all treated cows came to estrus. When compared to group of cows that were treated with single injection of prostaglandins, 25% more cows came to estrus, and when compared to the group of cows that were treated with double injection of prostaglandins but without use of *Fertagyl* – 16.07% more cows came to estrus. When *Fertagyl* was used right before insemination progesterone concentration in plasma of cows was 1.03 ± 0.06 nmol/l 0.53 ± 0.06 nmol/l less compared to that after single injection of prostaglandins and by 0.89 ± 0.02 nmol/l less compared to that after double injection of prostaglandins. Size of the ovulatory follicle following infection of *Fertagyl* was 10.05 ± 0.12 mm, i.e., by 0.65 mm larger in size compared to that using GnRH analogues. Pursley et al. (1993) found that after injection of GnRH analogues sufficient amount of LH and FSH is released into plasma. Released LF affects ovulation of the largest follicle or its regression and formation of corpus luteum (Morrow, 1980; Pursley, 1998; Rasby and Gene, 2000; Doležel et al., 2002; Noseir, 2003).

During investigation of cows' pregnancy after use of preparation *Fertagyl* 100% of treated cows conceived. After use of double injection of prostaglandins without GnRH during insemination, only 60% of treated cows conceived. *Fertagyl* increased conception rate by 40%. Using single injection of prostaglandins, 80% of treated cows conceived.

CONCLUSIONS

1. Our experiments show that reproductive functions of Lithuanian Black and White and German Black and White breed cows post partum are affected by cow's age that had an impact on ovarian size ($p<0.05$) and have significant positive correlations with follicular size in the left ovary ($p=0.001$). Season has an effect on conception rate ($p<0.05$). The effect of milk production has no relationship with the size of the ovaries and the size of the follicles ($p>0.05$).

2. The right ovary of six year old cows post partum was of the largest size ($p<0.001$), however left ovary of four – five years old cows was larger in size than the right one ($p<0.05$). Size of the right ovary in cows older than six years starts to be smaller in size ($p<0.05$). The left ovary also undergoes reduction however it remains smaller than the right one ($p<0.05$).

3. Ovarian and follicular size is affected by cow's breed, age and interaction between cow's age and breed.

Ovaries of LBW breed cows are larger (the right ovary 1.35 mm, the left one – 1.10 mm) compared to that of GBW breed cows' respectively. In the right ovary the largest follicles in were found in six years old cows, and in the left ovary – in three and six years old cows ($p<0.05$).

The largest follicles during post partum period in the right ovary are in five year old LBW breed cows (10.20 ± 5.38 mm) and in seven years old GBW breed cows (8.60 ± 2.95 mm) ($p=0.0001$). The largest follicles during post partum period in the left ovary are found in four years old LBW breed cows (8.35 ± 3.19 mm) and three years old GBW breed cows (7.80 ± 2.75 mm) ($p=0.0001$).

4. Ovaries of healthy post partum LBW breed cows presented two follicular waves, the waves were more expressed, follicles were larger than in cows with persistent corpus luteum ($p<0.05$). In ovaries of untreated GBW breed cows three follicular growth waves occurred and in ovaries of treated cows two follicular growth waves occurred, ovulatory follicle was smaller in size ($p<0.05$).

5. After single injection of *Estron* 80% of treated cows came to estrus and 50% of them conceived ($p<0.05$). When *Estron* was used together with *Trivit* - 85.7% and 66.67% of cows respectively ($p<0.05$). When *Estron* is used twice with interval of 11 days between injections, 69.23% of cows came to estrus and 55.56% conceive ($p<0.05$).

6. It was found that *Dalmazin* is the most efficacious preparation to treat persistent CL after it's use, 92.31% of treated cows came to estrus and 83.33% of them conceived ($p<0.05$). Preparation *Estron* invoked estrus for 75% cows out of which 66.67% conceived ($p<0.05$).

7. The cows with persistent corpus luteum in both ovaries that were treated with *Dalmazin* present two follicular waves. They had faster follicular growth rate and the waves were shorter in time than under treatment with *Estron* ($p\leq0.05$).

8. Treatment efficacy increased when *Estron* is used in combination with synthetic GnRH analogue – (*Fertagyl*). In this case, 87.5% of treated cows came to estrus and all of them (100%) conceived ($p<0.05$).

9. In the case of persistent CL, progesterone concentration in plasma on average was 15.01 ± 4.90 nmol/l. ($p \leq 0.05$). *Estron* reduced progesterone concentration on the 2nd day following injection to 5.04 ± 1.02 nmol/l ($p < 0.05$), and *Dalmazin* preparation – to 4.73 ± 0.95 nmol/l ($p \leq 0.05$). When prostaglandins were used twice with interval of 11 days between injections, progesterone concentration before the second injection of preparation was 7.67 nmol/l and 24 hours after the second injection reduced by 2.57 nmol/l (5.10 nmol/l) ($p < 0.05$).

RECOMMENDATIONS

1. To use ultrasound scanner for comprehensive assessment of cows' ovarian activity and condition of uterus. To use 6 MHz frequency for testing of ovaries, CL and follicles larger than 3 mm in size. In order to study structures smaller than 3 mm in size to use 8 MHz frequency, for diagnosis of early pregnancy (from 25th day) – use 6 MHz frequency.
2. In order to treat persistent CL, it is advisable single IM injection of 2 ml *Dalmazin* and to inseminate the cows 72 to 96 hours thereafter. Persistent CL can be treated by single IM injection of 2 ml *Estron*, followed by 20 ml IM injection of *Trivit*.
3. In order to improve cows' conception rate use GnRH analogue – *Fertagyl*, using single 2.5 ml IM injection two hours before insemination.

IVADAS

Karvių reprodukcijos sutrikimai ar netinkamas sėklinimo laiko nustatymas padaro nemažus ekonominius nuostolius ne tik bendrovėms, bet ir pavieniams ūkininkams. Pastaraisiais metais Lietuvoje pieno ūkiai stambėja, didėja primilžiai, kartu daugėja ir įvairių reprodukcijos problemų. Ilgametis karvių bandų gerinimas, norint gauti kuo daugiau pieno, daugelyje valstybių sumažino karvių vaisingumą, nes jau seniai yra nustatytas neigiamas genetinis ryšys tarp pieno produkcijos ir vaisingumo. (Oltenu ir kt. 1991). Maksimalus reprodukcinis pajėgumas būna penkerių septynerių metų amžiaus karvių, vėliau kartu su karvių amžiumi didėja embrioninis mirtingumas ir dėl nepilnaverčio kiaušinėlio išsivystymo mažėja apsisvaisinimo galimybė. (Hafez, 1980).

Dažnai karvės brokuojamos dėl nerujavimo, neapsivaisinimo, endometritų, mastitų. Todėl svarbu laiku nustatyti rujos sutrikimo priežastį, kad būtų galima kuo anksčiau pradėti gydymą ir kuo greičiau atstatyti karvės produktyvumą. Dauguma priežasčių, veikiančių karvių reprodukcinę funkciją sutrikimą, atsiranda po apsiveršavimo. Tiek veršiamosi metu, tiek po jo karvės organizme įvyksta daugybė pasikeitimų. Fiziologiškai laikotarpiu po apsiveršavimo vyksta pakitimai karvės gimdoje, kiaušidėse, endokrininėje sistemoje, o jų eiga priklauso ir nuo juos veikiančių įvairių išorinių veiksnių. Karvės nebūna laiku apsėklintos, nes ne visuomet tiksliai nustatoma ruja, kartais pasireiškia „tyli“ ruja, kuri nepastebima, kadangi išskiriamos negausios skaidrios gleivės. Jei ruja nebūna pastebėta, tai karvė vėl suruoja po 21 dienos, nes tiek laiko trunka lytinis ciklas (intervalas nuo 17-os iki 24-ių dienų) (Gene, 1996). Praleidus rują gana dažnai kitas sėklinimas nebūna sėkmingas. Karvės, kurios neapsivaisina sėklinant 4 – 5 kartus (arba 60 – 160 dienų po apsiveršavimo), laikomos nevaisingomis. Skaičius karvių, kurioms po apsiveršavimo nepasireiškia ruja, svyruoja nuo 10 iki 40 procentų (Zdunczyk ir kt., 2002). Nevaisingumas sukelia nemažai ekonominių nuostolių, nes išauga išlaidos spermai pirkti, didėja darbo sąnaudos, taip pat pailgėja laiko tarpas nuo vieno veršiamosi iki kito. Dažnai būna dvi ar daugiau nevaisingumo priežasčių. Pagrindinės yra keturios: 1) kiaušidžių ir (arba) gimdos ligos; 2) apvaisinto kiaušinėlio implantacijos sutrikimai; 3) embrioninis mirtingumas; 4) neteisingas rujos laiko nustatymas ir neteisingai atliktas sėklinimas (Shearer ir kt., 1992). Šiame darbe tiriančiame karvių nevaisingumą, didžiausias dėmesys skiriamas kiaušidžių veiklos sutrikimams.

Ankstyvas kiaušidžių funkcinės veiklos atsinaujinimas yra būtinas, norint, kad intervalas tarp veršiamosi būtų ne didesnis nei 365 dienos. Nerujojimas po apsiveršavimo yra pagrindinė priežastis, dėl kurios šis laikotarpis užsitęsia. Skiriamos keturios klinikinės nerujavimo formos: „tyli“ ruja, kiaušidžių cistos, kiaušidžių funkciniai sutrikimai ir susilaikęs geltonkūnis (*corpus luteum pseudograviditatis*) (Zdunczyk ir kt., 2002). Pakankamai tiksliai karvės kiaušidžių funkcinių pajėgumą parodo kiaušidžių dydžio ir folikulų augimo dinamikos pakitimai. Tam tikslui atliekamas rektinis tyrimas, tačiau taikant šį tyrimo metodą pasitaiko nemažai klaidų. Atsiradus naujiems tyrimo metodams,

pradėtas taikyti tyrimas ultragarsu, ir tai leido tiksliau nustatyti folikulų augimo dinamiką karvėms ir po apsiveršiavimo (Savio ir kt., 1990; Ginther ir kt., 1996; Perez ir kt., 2003; Masiulis 2003). Ultragarso tyrimo metu tiriamojo organo vaizdas matomas ekrane. Taip galima suskaičiuoti folikulus ar geltonkūnius, juos išmatuoti, o atliekant pakartotinį tyrimą - stebėti jų augimą arba regresiją. Folikulų augimo dinamikos procesas yra reguliuojamas hormonų, augimo faktorių, ląstelių tarpusavio sąveikų bei genų (Sartori ir kt., 2002; Perez ir kt., 2003). Jo metu turi būti subrandintas vienas folikulas, galintis ovuluoti. Karvėms lytinio ciklo metu dažniausiai pasireiškia dvi folikulų augimo bangos, bet gali būti ir trys arba keturios. Folikulinių bangų skaičiui lytinio ciklo metu taip pat daro įtaką karvės amžius, veršiamosios trukmė ir sezonas, pieno produkcijos kiekis (Williams, 2002).

Karvių kiaušidžių aktyvumą galima nustatyti tiriant progesterono koncentraciją kraujyje. Šis hormonas sekretuojamas geltonkūnio ląstelių. Esant normaliai lytinio ciklo eigai, jo koncentracija kraujyje pakyla 4-ą ciklo dieną, 8-ą dieną pasiekia aukščiausią tašką ir tokiam lygyje išsilaiko iki 17-os ciklo dienos (Peters ir kt., 1994). Šis hormonas tiesiogiai parodo geltonkūnio aktyvumą, kuris yra kiaušidžių funkcijos indikatorius stebint lytinį ciklą ir kiaušidžių aktyvumą po apsiveršiavimo.

Dažnai karvių lytinis ciklas sutrinka dėl susilaikiusio geltonkūnio kiaušidėse. Nustačius šį susirgimą, geltonkūnis dirbtinai tirpdomas medikamentų pagalba, nes dėl per didelės progesterono koncentracijos rujos metu slopinamas estradiolio atgalinis ryšys pogumburiui (Stock ir Fortuke, 1993). Ankstesniuose literatūros šaltiniuose (Aniulis, Znaidauskas ir kt. 1989) buvo nurodoma, jog geltonkūnis gali būti išspaudžiamas, tačiau pastaraisiais metais šis metodas jau nebetaikomas dėl vėliau pasikartojančių kraujavimų kiaušidėse bei suaugimų. Sutrikusiam kiaušidžių funkciniam aktyvumui, LH bangų pasireiškimo procesui reguliuoti sėklinimo metu galima panaudoti GnRH (Pursley ir kt., 1993; R. Bage, 2002). Rujos stimuliavimui GnRH dažniausiai naudojami kartu su prostaglandiniais.

Darbo tikslas:

Įvertinti Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvių kiaušidžių funkcijos atsistatymą ir folikulų dydžio dinamiką veikiančius veiksnius po apsiveršiavimo bei nustatyti prostaglandinų derinių su kitais preparatais efektyvumą susilaikiusių geltonkūnių gydymui.

Uždaviniai:

1. Ištirti ir įvertinti karvių kiaušidžių atsistatymą įtakančius veiksnius po apsiveršiavimo;
2. Ištirti ir įvertinti kliniškai sveikų ir karvių su susilaikiusiu geltonkūniu kiaušidžių dydžio kitimą ir folikulų augimo dinamiką lytinio ciklo eigoje;
3. Ištirti ir įvertinti karvių, nerujančių po apsiveršiavimo, gydymo efektyvumą naudojant prostaglandinus deriniais su vitaminais ir GnRH.

Mokslinio darbo naujumas. Buvo patikslinti Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvių kiaušidžių, geltonkūnių, folikulų matavimai ultragarso aparatu. Statistiškai įvertinta geltonkūnių susilaikymą lemiančių veiksnių - kaip amžius, veislė, sezonas - ryšio įtaka. Susilaikiusių geltonkūnių gydymo efektyvumui pagrįsti panaudotas progesterono koncentracijos kraujyje nustatymas.

TYRIMO METODAI

Bandymams naudojome Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karves, kurioms portatyviniu ultragarso aparatu (Scanner 100LC Vet, Olandija) matuotos kiaušidės, geltonkūniai ir folikulai.

Skirtingo amžiaus ir veislės karvių kiaušidžių funkcijos atsistatymui po apsiveršiavimo stebėti buvo atrinktos 24 Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės 3 - 8 metų amžiaus karvių, atrinktos pagal apsiveršiavimo datą. Tyrimas pradėtas nuo 3 mėnesių po apsiveršiavimo ir tęstas iki veršingumo nustatymo dienos. Buvo atliktas rektinis ir ultragarsinis tyrimas. Ultragarso aparatu buvo matuojami kiaušidžių, geltonkūnių ir folikulų dydžiai. Kiaušidės, geltonkūnio ir folikulo dydžio vidurkis apskaičiuotas remiantis Ginther O. J. (1996), Sirois J. (1988) metodu: išmatavus kiaušidės, geltonkūnio ar folikulo ilgį ir plotį, apskaičiuojamas matavimų vidurkis. Norint gauti tikslius duomenis, kiaušidėse esantys dariniai gali būti matuojami kelis kartus. Statistinės programos (SPSS for Windows 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 1989-2004) pagalba apskaičiuotas ilgio ir pločio aritmetinis vidurkis, kuris apibrėžiamas kaip kiaušidės, geltonkūnio ar folikulo dydžio vidurkis.

Nustatyta reprodukcijos funkcijas veikiančių veiksnių (amžiaus, veislės, sezono, pieno produkcijos kiekio) įtaka kiaušidžių funkcijos atsistatymui po apsiveršiavimo. Abiejų veislių karvėms nustatytas folikulinių bangų skaičius, maksimalus kiaušidžių ir folikulų dydis bei veiksnių sąveika kiaušidžių, geltonkūnių ir folikulų dydžiui. Visi veiksniai buvo analizuoti SPSS statistiniu paketu. Duomenys apdorojami naudojant "Microsoft Excel" programą. Aprašomosios statistikos būdu buvo vertinama įvairių veiksnių įtaka karvių reprodukciniams rodikliams bei analizuoti veiksnių tarpusavio ryšiai bei lygmenys.

Kliniškai sveikų ir karvių su susilaikiusiu geltonkūniu kiaušidžių dydžio kitimui ir folikulų augimo dinamikai stebėti lytinio ciklo eigoje buvo ištirtos 25 įvairių laktacijų, 3 – 7 metų, Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvės, kurios pagal sėklinimo planą pasireiškus rujai turėjo būti sėklinamos. Jos buvo suskirstytos į dvi grupes: pirmai grupei (n=18) priskirtos karvės po apsiveršiavimo, kurioms nenustatyta lytinio ciklo sutrikimų. Antrai grupei (n=7) priskirtos neruojančios karvės esant susilaikiusiam geltonkūniui, kuris buvo nustatomas tiriant du ir daugiau kartų. Karvės buvo tiriamos 11 dienų, per tą laiką rektinio tyrimo metu ultragarsu išmatuotos kiaušidės, folikulai, susilaikę geltonkūniai bei nustatyta progesterono koncentracija kraujyje.

Bandymo metu visoms karvėms buvo imamas kraujas progesterono koncentracijai nustatyti į sterilius vienkartinius vaakuminius mėgintuvėlius

("Venoject", Terumo Europe N. V, Belgium). Kraujo mėginiai per 1 val. buvo pristatomi į LVA Gyvulių reprodukcijos laboratoriją, 5 minutes centrifuguojami 3 000x apsisukimų per minutę. Išsiskyręs kraujo serumas, 1 ml tūrio ir 140 mm ilgio Pastero pipete (Einweg-Pasteurpipetten, Carl Roth GmbH, Vokietija), po 0,5 - 1,0 ml išpilstomas į Eppendorf tipo mikromėgintuvėlius ir užšaldomas -20°C temperatūroje.

Progesterono tyrimas. Progesterono tyrimas buvo atliekamas naudojant progesterono diagnostinį rinkinį PROG-RIA-CT (BioSource Europe S.A., Belgium), skirtą kiekybiniam progesterono nustatymui serume radioimuniniu tyrimo metodu, pagal aprašytą progesterono tyrimo metodiką galvijų kraujo serume (Duchens ir kt., 1994). Tyrimas atliktas Kauno medicinos universiteto Hormonologijos laboratorijoje, remiantis gamintojo (BioSource Europe S.A., Belgium) instrukcija. Matavimui naudotas radioimunitinis analizatorius „ГAMMA – 12“ (Rusija).

Duomenų apdorojimas atliktas naudojant SPSS statistinį paketą.

Karvių, neruojančių po apsiveršavimo, gydymo efektyvumo naudojant prostaglandinus įvairiais deriniais su vitaminais ir GnRH įvertinimas susideda iš trijų dalių:

1. Preparato *Estron* įvairių derinių su *Trivit* panaudojimas susilaikiusių geltonkūnių gydymui.
2. Preparatų *Dalmazin* ir *Estron* panaudojimas rudos stimuliacijai.
3. Preparatų *Estron* ir *Fertagyl* panaudojimas rudos stimuliacijai.

Atliekant pirmosios tyrimo dalies bandymą (**Preparato *Estron* įvairių derinių su *Trivit* panaudojimas susilaikiusių geltonkūnių gydymui.**) buvo atrinktos 25 įvairių laktacijų, Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvės. Karvės buvo suskirstytos į tris grupes.

Pirmajai grupei (n=5) priskirtos karvės, kurioms nustatytas susilaikęs geltonkūnis ir jos gydytos leidžiant vieną kartą preparatą *Estron* (Cloprostenolum natrium, Bioveta, Plc., Čekija). Šio preparato sudėtyje yra: kloprostenolio natrio druskos 0,25 mg, pagalbinių medžiagų (chlorokrezolio, citrinos rūgšties monohidrato ir kt.) iki 1 ml. Preparato veiklioji medžiaga yra sintetinis prostaglandino F₂ analogas — kloprostenolis, kuris mažina kraujo plazmos progesterono kiekį. 17-estradiolio koncentracija kraujyje lieka tokia pat kaip normalaus lytinio ciklo metu. Preparato liuteolitinis poveikis pagrįstas liuteocitų LH receptorių blokavimu. Dėl to sutrinka geltonkūnio energijos apykaita (sutrinkama AMF sintezė) ir skatinama jo involiucija. Kol liuteocitų receptoriai sąveikauja su LH, kloprostenolis neveikia. Todėl preparatas neefektyvus esant jaunam geltonkūniui, tai yra lytinio ciklo pradžioje.

Antrajai grupei (n=7) priskirtos neruojančios karvės esant susilaikiusiam geltonkūniui, kurios gydytos preparatu *Estron*, kartu leidžiant ir vitamininį preparatą *Trivit* (vitamininė suspensija, UAB "Ukmergės biofabrikas", Lietuva). Tai injekcinis tirpalas, kurio 1 ml yra: vitamino A - 300 000 TV, vitamino D3 - 100 000 TV, vitamino E - 50 mg, pagalbinių medžiagų iki 1 ml. Trivitą sudaro

riebaluose tirpūs vitaminai A, D3, E — būtinos biologiškai labai aktyvios organinės medžiagos.

Trečiajai grupei (n=13) priskirtos nerujojančios karvės esant susilaikiusiam geltonkūniui, kurios gydytos preparatu *Estron* pakartojant gydymą po 11 dienų.

Preparatas *Estron* leistas pirmosios grupės karvėms pirmąją bandymo dieną į raumenis po 2 ml. Po trijų keturių dienų karvėms suruojus jos buvo sėklinamos. Antrosios grupės karvėms leistas preparatas *Estron* į raumenis po 2 ml, tą pačią dieną buvo leidžiamas ir preparatas *Trivit* po 20 ml į raumenis. Šios grupės karvės taip pat buvo sėklinamos po trijų keturių dienų pasireiškus rujai. Trečiosios grupės karvėms buvo leistas preparatas *Estron* į raumenis po 2 ml ir po 11 dienų gydymas pakartojamas. Praėjus trims keturioms dienoms po antrosios injekcijos ir pasireiškus rujai karvės buvo sėklinamos. Bandymo metu, kas 5 – 7 dienos, ir rujos dieną karvės buvo tiriamos rektiškai, ultragarsu išmatuojamos kiaušidės, folikulai bei geltonkūniai. Prieš leidžiant preparatus bei kiekvieną kartą tiriant buvo imami kraujo mėginiai progesterono kiekiui kraujyje nustatyti. Tiriamoms karvėms buvo paimti kraujo mėginiai ir atlikti biocheminiai tyrimai Marijampolės apskrities valstybinėje maisto ir veterinarijos laboratorijoje. Pagal gautus tyrimų rezultatus daugumos karvių pagrindiniai kraujo biocheminiai parametrai atitiko normą. Tyrimo metu buvo atrinkti dažniausiai sėklinimui naudojamų bulių spermos šiaudeliai ir atliktas spermos kokybės vertinimas LVA Gyvulių reprodukcijos laboratorijoje laikantis metodinių nurodymų (Riškevičienė, Žilinskas, 1999). Pagal gautus atsakymus spermos morfologiniai rodikliai atitiko dinamines spermos kokybės ribas.

Karvių lytinių organų, kiaušidžių, geltonkūnių ir folikulų tyrimas buvo atliekamas rektiškai ir ultragarsu. Gautų duomenų apdorojimas atliktas naudojant SPSS statistinį paketą ir "Microsoft Excel" programą.

Atliekant tyrimo antrosios dalies (**Preparatų *Dalmazin* ir *Estron* panaudojimas rujos stimuliavimui.**) bandymą buvo atrinkta ir ištirta 20 įvairių laktacijų, Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvių, kurios buvo pažymėtos sėklinimo plane. Jos buvo tirtos rektiškai ir ultragarsu, nustačius susilaikiusį geltonkūnį ar nesant rujai. Visos bandymui atrinktos karvės buvo suskirstytos į 3 grupes.

Pirmajai grupei (n=13) priskirtos karvės, kurioms nustatytas susilaikęs geltonkūnis. Joms buvo leidžiamas preparatas *Dalmazin* (Fatro S.p.A. Italija). 1 ml tirpalo yra kloprostenolio – 0,075 mg, alkoholio – 0,675 mg, citrinų rūgšties – 9,55 mg, chlorokrezolio – 1 mg, natrio hidroksido – 5,3 mg, injekcinio vandens iki 1 ml. Veiklioji medžiaga yra kloprostenolio dešininis (dekstrotacinis) enantiomeras. Tai sintetinis prostaglandino F2_α analogas. Tai biologiškai aktyvus, liuteolitinis kloprostenolio darinys. *Dalmazin* veikia žymiai geriau nei panašūs kloprostenolio racematų preparatai. Liuteininės (geltonkūnio formavimosi) fazės metu *Dalmazin* mažina liuteinizuojančio hormono (LH) receptorių skaičių kiaušidėje, todėl greitai regresuoja geltonkūnis ir staiga sumažėja progesterono kiekis. Kankorėžinės liaukos priekinėje skiltyje suaktyvėja folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) sintezė. Tai skatina naujų folikulų brendimą, sukelia rują ir ovuliaciją. Preparatas

leistas visoms karvėms po 2 ml į raumenis ir kiekvieną dieną ultragarsu pagalba buvo matuojami funkciniai dariniai kiaušidėse ir imami kraujo mėginiai progesterono koncentracijai kraujyje nustatyti.

Antrajai grupei (n=4) priskirtos karvės, kurioms nustatytas susilaikęs geltonkūnis Joms buvo leidžiamas preparatas *Estron*. Preparatas leistas visoms karvėms po 2 ml į raumenis ir kiekvieną dieną ultragarsu pagalba buvo matuojami funkciniai dariniai kiaušidėse bei imami kraujo mėginiai progesterono koncentracijai kraujyje nustatyti.

Trečiajai, kontrolinei, grupei (n=3) priskirtos karvės, kurios buvo stebimos nenaudojant jokių preparatų. Joms buvo atliekami kiaušidžių ir folikulų matavimai ultragarsu.

Jeigu karvės rujojo – jos buvo sėklinamos ir 5-7 d. po sėklinimo buvo patikrinama kiaušidžių būklė. Jeigu karvės nerujojo, ir nebuvo apsėklintos, po 10-12 d. stimuliacija buvo kartojama antrą kartą. Kontrolinei grupei (n=3) buvo priskiriamos karvės, kurių ruja buvo be sutrikimų ir kurios rujojo pačios bei buvo sėklinamos, neleidžiant joms jokių medikamentų.

Tyrimo metu buvo atrinkti dažniausiai sėklinimui naudojamų bulių spermos šiaudeliai ir atliktas spermos kokybės vertinimas LVA Gyvulių reprodukcijos laboratorijoje laikantis metodinių nurodymų (Riškevičienė, Žilinskas, 1999). Spermos morfologiniai rodikliai atitiko dinamines spermos kokybės ribas.

Gautų duomenų apdorojimas atliktas naudojant SPSS statistinį paketą ir "Microsoft Excel" programą.

Atliekant tyrimo trečiosios dalies (**Preparatų *Estron* ir *Fertagyl* panaudojimas rujos stimuliavimui.**) bandymą buvo atrinkta ir ištirta 26 įvairių laktacijų Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvės, kurios buvo pažymėtos sėklinimo plane. Karvės buvo tirtos rektiškai ir ultragarsu nustačius susilaikiusį geltonkūnį ar nesant rujai. Visos bandymui atrinktos karvės, kurioms nepasireiškė ruja, buvo suskirstytos į 4 grupes.

Pirmajai grupei (n=8) priskirtos karvės, kurioms nustatytas susilaikęs geltonkūnis. Joms buvo leidžiamas vieną kartą preparatas *Estron*. Preparatas leistas visoms karvėms po 2 ml į raumenis ir kiekvieną dieną iki sėklinimo ultragarsu matuojami funkciniai dariniai kiaušidėse, imami kraujo mėginiai progesterono kiekiui nustatyti.

Antrajai grupei (n=7) priskirtos karvės, kurioms nustatytas susilaikęs geltonkūnis. Joms du kartus su 11-os dienų intervalu buvo leidžiamas preparatas *Estron*. Preparatas leistas visoms karvėms po 2 ml į raumenis ir kiekvieną dieną ultragarsu buvo matuojami funkciniai dariniai kiaušidėse ir imami kraujo mėginiai progesterono nustatymui.

Trečiajai grupei (n=8) priskirtos karvės, kurioms nustatytas susilaikęs geltonkūnis. Joms du kartus su 11-os dienų intervalu buvo leidžiamas preparatas *Estron*. Praėjus 3-ims dienoms po antrosios preparato *Estron* injekcijos suleistas preparatas *Fertagyl* (Intervet International B. V.). 1 ml tirpalo yra gonadorelino - 100 µg, pagalbinių medžiagų – iki 1 ml. Gonadorelinas – sintetinis dekaeptidas, identiškas natūraliam gonadotropiną atpalaiduojančiam hormonui (GnRH), kuris

gaminamas pagumburyje. Preparatas veikia kaip egzogeninis GnRH. Jo veikiamą hipofizę išskiria liuteinizuojantį (LH) ar folikulus stimuliuojantį (FSH) hormoną. LH ir FSH tiesiogiai veikia kiaušides. FSH stimuliuoja folikulų vystymąsi, o LH sukelia ovuliaciją ir liuteinizaciją. 18 – 23 dieną po preparato sušvirkštimo karvės suruoja ir gali būti apsėklintos. Nedidelės dozės stimuliuoja LH išsiskyrimą. Panaudotas sėklinimo laiku preparatas synchronizuoja ovuliaciją, o lytinio ciklo viduryje (11 – 14 dieną) – skatina LH išsiskyrimą ir geltonkūnio funkciją. Vaisingumui pagerinti rekomenduojama preparato dozė 2,5 – 5 ml. Preparatas *Estron* leistas visoms karvėms po 2 ml į raumenis. Preparatas *Fertagyl* leistas po 2,5 ml į raumenis ir kiekvieną dieną ultragarsu matuojami funkciniai dariniai kiaušidėse ir imami kraujo mėginiai progesterono nustatymui.

Ketvirtajai, kontrolinei, grupei (n=3) priskirtos karvės, kurios buvo stebimos nenaudojant jokių preparatų.

Jeigu karvės rujojo – jos buvo sėklinamos ir 5-7 d. po sėklinimo buvo patikrinama kiaušidžių būklė. Jeigu karvės nerujojo, praėjus 25 d. po paskutinės preparatų injekcijos, matavimai ultragarsu nebebuvo atliekami.

Buvo paimti kraujo mėginiai atsitiktinės atrankos būdu ir kraujo biocheminiai rodikliai ištirti LVA Stambių gyvulių klinikų laboratorijoje. Karvių kraujo rodikliai atitiko normą.

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APITARIMAS

Pagrindinis mūsų darbo tikslas buvo įvertinti karvių nevaisingumą veikiančius veiksnius bei nustatyti jų poveikyje pasireiškiančius kiaušidžių ir besikeičiančių ciklinių darinių dydžio kitimus ir progesterono koncentracijos kitimo kraujyje dinamiką. Kiaušidžių ir folikulų matavimus atlikome ultragarsu, kuris karvių lytinių organų tyrimui pradėtas naudoti nuo 1982 metų (Kahn, 1992), o Lietuvoje moksliniams tyrimams tuo tikslu buvo panaudotas 2003 metais (Masiulis ir kt., 2003). Kai tyrimas ultragarsu buvo pradėtas naudoti studijuojant galvijų reprodukciją, pasikeitė kai kurios žinios apie kiaušidžių dydžio kitimą ir folikulų augimą. Tiriant ultragarsu, išaiškintos folikulų augimo bangos, geltonkūnio augimas ir regresija, vaisiaus vystymasis. Šis tyrimas papildė ne tik mokslinius tyrinėjimus, bet ir palengvino kasdieninį veterinarijos gydytojų darbą. Ankstyvojo veršingumo, kiaušidžių ir gimdos patologijų, lyties nustatymas - tai tik dalis šio tyrimo galimybių.

Kiaušidės gali būti matuojamos naudojant 3,5 arba 5 - 6 MHz dažnio daviklį. Kait folikulai būna 3 - 5 mm dydžio ar didesni, naudojamas 6,0 MHz dažnio daviklis, o kai folikulai mažesni nei 3 mm, tada tiriama naudojant 7,5 - 8 MHz dažnio daviklį (Taverne ir Willemse, 1989). Atliekant įprastinį tyrimą folikulų matavimas atliekamas 5 MHz dažnio davikliu, kai jie būna 10 mm dydžio dėl neechogeniškos, skysčiu pripildytos ertmės (Braun, 1997).

Ribadu (1999) atliko folikulų diametro matavimą ultragarso aparatu gyviems ir paskerstiems gyvuliams. Folikulų diametro koreliacijos koeficientas, atlikus matavimus gyviems ir paskerstiems gyvuliams, buvo 0,7–0,9. Tai įrodė, kad

transrektinė sonografija (tyrimas ultragarsu per tiesiąją žarną) yra patikimas būdas karvės kiaušidėse esančių folikulų identifikavimui ir matavimui.

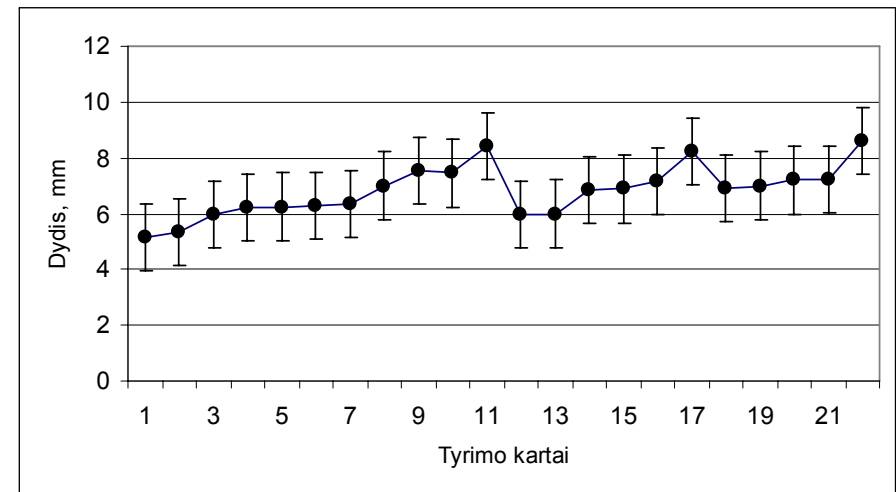
Tiriant geltonkūnį karvių kiaušidėse ultragarsu, galima pastebėti, jog jis yra echogeniškos struktūros kaip ir kiaušidžių stroma. Daugeliu atvejų geltonkūniai atrodo kaip vientisi dariniai, tačiau pasitaiko atvejų, kai būna pripildyti skysčio. Tiriant ultragarsu pieninių veislių telyčias nustatyta, kad 79 % tirtų atvejų geltonkūnis būna su 2 - 10 mm skersmens ertme lytinio ciklo pradžioje arba esant ankstyvam veršingumui (Kastelic ir kt., 1990). Matuojant geltonkūnio diametrą, liuteininių audinių plotą ir stebint echogeniškumą nustatyta koreliacija tarp geltonkūnio dydžio ir jo gebėjimu gaminti ir išskirti progesteroną. Nustatyta (Kastelic ir kt., 1991) kad pagal liuteininių audinių struktūrą galima patikslinti veršingumą telyčioms, tačiau karvėms tai nėra būdinga. Tiriant ultragarsu galima diferencijuoti besivystančius ir regresuojančius geltonkūnius. Šio autoriaus (Kastelic ir kt., 1991) tyrimų metu buvo gauta naujų žinių apie folikulų augimo dinamiką ir geltonojo kūno susidarymą. Buvo įrodyta, kad geltonasis kūnas su ertme karvei yra normalus reiškinys. Panaudojus ultragarsą buvo palengvinta folikulinių *theca* cistų su plona sienele, pavienių arba daugybinių, esančių vienoje ar abiejose kiaušidėse, ir folikulinių luteininių - pavienių struktūrų, randamų vienoje kiaušidėje su storesne nei folikulinių *theca* cistų sienele – cistų, diagnozė bei diferencijavimas (Morrow, 1986), taip pat ir ankstyva veršingumo diagnostika 21-ą - 30-ą veršingumo dieną.

Ultragarsu atlikę tyrimus nustatėme, kad Lietuvos juodmargių (LJ) veislės karvių kiaušidės didesnės nei Vokietijos juodmargių (VJ). LJ veislės karvių dešinioji kiaušidė buvo $1,35 \pm 2,20$ mm didesnė nei VJ veislės karvių. Kairioji kiaušidė buvo $1,10 \pm 0,85$ mm ($p < 0,001$). Taip pat nustatyta, kad skiriasi ir šių veislių karvių kiaušidžių folikulų dydžiai. LJ veislės karvių dešinėsios kiaušidės folikulai buvo didesnis $1,60 \pm 1,40$ mm nei VJ veislės karvių, taip pat ir kairiosios kiaušidės folikulai LJ veislės karvių $0,55 \pm 0,34$ mm yra didesnis nei VJ veislės karvių ($p < 0,001$). Kai kurie autoriai (The Merck Veterinary manual, 1998; Tian ir Zhao, 2000) tai aiškina tuo, kad vietinės veislės karvės visada pasižymi geresniu prisitaikymu prie aplinkos ir klimato sąlygų, augimo, brendimo greičiu ar reprodukcineis savybėmis. Ypač šis prisitaikymas pastebimas pieninių karvių veislių (Ensminger M. E., 1993).

Naudojant statistinę programą atlikus daugiafaktorinę veiksnių analizę nustatyta, kad karvės amžiaus, veislės ir sezono įtaka kiaušidžių dydžiui bei kairiosios kiaušidės folikulų dydžiui yra reikšminga ($p < 0,05$), bet dešinėsios kiaušidės dydžiui sezonas reikšmingos įtakos neturi. Tiriant veiksnių tarpusavio sąveikas kiaušidžių dydžiams (ilgiui, pločiui ir dydžio vidurkiui) bei folikulų dydžiams (ilgiui, pločiui ir dydžio vidurkiui) nustatyta, kad karvės amžiaus (A), karvės veislės (V) ir sezono (S) bei šių trijų veiksnių - $A*V*S$ - sąveikos įtaka kiaušidžių dydžiams ir kairiosios kiaušidės folikulų dydžiams statistiškai yra reikšminga ($p < 0,05$), tačiau dešinėsios kiaušidės folikulų dydžiams statistiškai reikšmingos įtakos nenustatėme. Kiaušidžių dydžiams ir kairiosios kiaušidės folikulų dydžiams įtakos turi karvės amžiaus ir sezono, karvės amžiaus ir veislės

bei veislės ir sezono įtaka ($p < 0,05$). Dešinėsios kiaušidės folikulų dydžiams reikšminga yra tik karvės amžiaus ir veislės bei karvės amžiaus ir sezono įtaka ($p < 0,05$). Nustatyta, kad visi kiaušidžių dydžio parametrai patikimai teigiamai koreliuoja su karvės amžiumi ($p < 0,001$). Pieno produkcijos kiekis kiaušidžių ir folikulų dydžiams nenustatytas.

Analizuojant pavienio karvės amžiaus veiksnio įtaką kiaušidžių dydžiui (4 lentelė), nustatyta, kad didžiausia dešinioji kiaušidė (dydžio vidurkis) yra šešerių metų karvių - $23,40 \pm 4,70$ mm ($p < 0,05$), o kairioji kiaušidė (dydžio vidurkis) yra didžiausia septynerių ir aštuonerių metų karvių - atitinkamai $22,80 \pm 3,73$ mm ir $22,22 \pm 2,50$ mm ($p < 0,05$). Tik atvestai telyčaitėi abiejų kiaušidžių dydis būna beveik vienodas, tačiau lytiškai subrendusių dešinioji kiaušidė būna didesnė už kairiąją (Tian ir Zhao, 2000). Nustatyta, kad didėjant gyvulio amžiui dešinioji kiaušidė išlieka didesnė už kairiąją ($p < 0,001$), tik trejų ir ketverių metų karvių kairioji kiaušidė buvo didesnė už dešiniąją. Taip pat pastebėta, kad dešinioji kiaušidė didėja iki šešerių metų amžiaus, o vėliau pradeda mažėti ($p < 0,05$). Tai patvirtino Bouchard (2003) atliktus tyrimus, kuriais jis nustatė, kad nuo septynerių metų amžiaus silpnėja karvių reprodukcinis pajėgumas. Vyresnio amžiaus karvėms dažniau pasireiškia metaboliniai susirgimai, kurie gali trikdyti galutinį folikulų subrendimą dėl atsakomosios hipofizio reakcijos pasikeitimo, kuri pasireiškia estradiolio padidėjusiu išskyrimu, kuris sutrumpina GnRH impulsus ir padidina LH kiekio išskyrimą į kraują. O šis hormonas neleidžia folikulams pasiekti ovuliacinio folikulo dydžio, nes sukelia priešlaikinę ovuliaciją (Perez ir kt., 2003).



1 paveikslas. VJ veislės karvių folikulų dydžio kitimas folikulų augimo bangų metu.

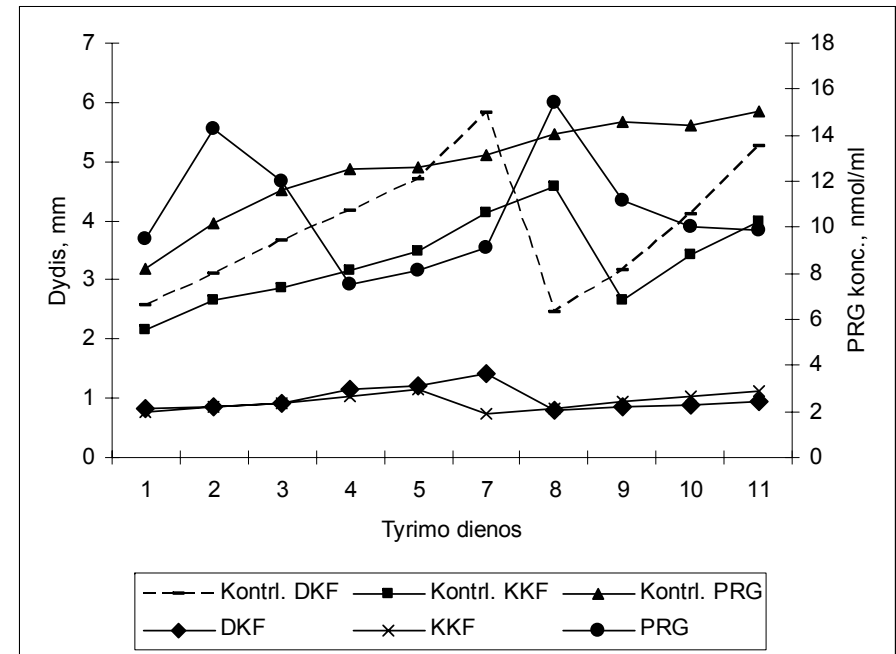
Mūsų bandymo metu buvo nustatyta Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvių folikulų augimo dinamika. LJ veislės karvėms 1,3 karto dažniau pasireiškė dvi folikulinės bangos ($p<0,01$). Tiriant ultragarsu nustatyta, kad per dieną LJ veislės karvių folikulas vidutiniškai paaugdavo $1,15\pm 1,13$ mm, o ovuliuojančio folikulo dydis buvo $10,20\pm 5,38$ mm. Stebint VJ veislės karvių lytinį ciklą nustatyta, kad joms 0,7 karto dažniau pasireiškia trys folikulinės bangos (1paveikslas) nei dvi ($p<0,01$).

Folikulas per dieną vidutiniškai paaugdavo $0,79\pm 0,59$ mm, o maksimalus ovuliuojančio folikulo dydis siekė $8,60\pm 2,95$. Crowe M. (1999) nurodo, kad dažniausiai lytinio ciklo eigoje pasireiškia dvi ar trys folikulinės bangos, viena ar keturios retai pasitaiko. Mes taip pat nenustatėme atvejų, kad būtų buvę vieną arba keturios folikulinės bangos. Pasak Perez (2003) dvi folikulinės bangos pasireiškia toms karvėms, kurios yra reprodukciskai pajėgesnės. Esant mažesniai folikulinių bangų skaičiui lytinis ciklas yra trumpesnis, ovuliacinis folikulas būna dviem milimetrais didesnis, lyginant su trijų folikulinių bangų ciklo metu subręstančiu folikulu.

Didėjant karvės amžiui didėja ir embrioninio mirtingumo tikimybė, nes patelei senstant išsivysto nepilnavertis kiaušinėlis (Hafez, 1980). Kartu su amžiumi mažėja ir gimdos rezistentiškumas, ko pasekoje karvės suserga metritais arba endometritais. Nors prostaglandinas $F_{2\alpha}$ dar išskiriamas, tačiau, mažėjant gimdos kontraktiliškumui, mažėja ir išskiriamo $PGF_{2\alpha}$ kiekis. Todėl, pagal Wiltbank (2002), nuo trečios laktacijos karvių, kurios neapsivaisina kiaušidėse, dažnai nustatomi susilaukę geltonkūniai. Tyrimo metu nustatėme, kad LJ veislės karvėms susilaukę geltonkūniai diagnozuoti 55 % atvejų, o VJ veislės karvėms - 45 % atvejų. Nustatyta, kad susilaukę geltonkūniai dažniausiai nustatomi 8 metų amžiaus LJ veislės karvėms, o VJ veislių karvėms - 5 metų amžiaus ($p<0,05$). Pasak Geoffrey A. (1996), geltonkūnio regresija ir jo dydis kiaušidėje priklauso nuo aplinkos ir patofiziologinių faktorių: šėrimo, ėmitimo, žindymo trukmės, sunkumų veršiavimosi metu, veislės, amžiaus, veršiavimosi sezono, gimdos patologijų ir lėtinių ligų.

Bandymo metu tiriant ultragarsu karves, kurioms nenustatyta lytinio ciklo sutrikimų, nustatyti kiaušidžių, folikulų ir geltonkūnių dydžių vidurkiai. Nustatyta, kad šioje grupėje dešinėsios kiaušidės dydžio vidurkis pirmąją tyrimo dieną buvo $22,6\pm 2,86$ mm, kairiosios kiaušidės dydžio vidurkis – $21,00\pm 2,05$ mm. Folikulo dydis dešiniojoje kiaušidėje siekė $2,56\pm 0,95$ mm, kairiojoje $2,15\pm 1,15$ mm. Geltonkūnio dydžio vidurkis pirmąją dieną buvo $3,5\pm 1,26$ mm, o progesterono koncentracija kraujyje – $3,18$ nmol/ml ($p\leq 0,05$). Karvėms su susilaukusių geltonkūniu kiaušidėje nustatyti kiaušidžių, jų darinų dydžio vidurkiai. Pirmąją tyrimo dieną karvių dešinėsios kiaušidės dydžio vidurkis buvo $19,08\pm 3,52$ mm, o kairiosios kiaušidės dydžio vidurkis – $18,15\pm 3,48$ mm ($p<0,05$), tai atitinkamai $3,52\pm 0,66$ mm ir $2,85\pm 0,78$ mm mažiau nei pirmosios grupės karvių. Folikulo dydžio vidurkis dešiniojoje kiaušidėje buvo $2,15\pm 0,32$ mm ($p<0,05$), kairiojoje kiaušidėje – $1,95\pm 0,26$ mm ($p<0,05$). Dešinėsios kiaušidės geltonkūnio dydžio vidurkis $10,59\pm 1,26$ mm ($p<0,05$), o kairiosios kiaušidės – $9,65\pm 2,05$ mm ($p<0,05$).

Progesterono koncentracija kraujyje buvo 9,5 nmol/ml ($p<0,05$). Tirdami nustatėme, kad sveikų karvių kiaušidės buvo didesnės nei karvių su susilaikiusiu geltonkūniu. Taip pat pastebėta, kad buvo didesnės ne tik kiaušidės, bet ir sveikų karvių folikulų augimas buvo intensyvesnis (2 paveikslas).



2 paveikslas. Folikulų dydžio ir progesterono koncentracijos kitimas tyrimo metu. Kontrl. DKF – kontrolinės karvių grupės dešinėsios kiaušidės folikulų dydžio vidurkis. Kontrl. KKF – kontrolinės karvių grupės kairiosios kiaušidės folikulų dydžio vidurkis. Kontrl. PRG – kontrolinės karvių grupės progesterono koncentracija kraujyje, nmol/ml. DKF – karvių su susilaikiusiu geltonkūniu dešinėsios kiaušidės folikulų dydžio vidurkis. KKF – karvių su susilaikiusiu geltonkūniu kairiosios kiaušidės folikulų dydžio vidurkis. PRG – karvių su susilaikiusiu geltonkūniu progesterono koncentracija kraujyje, nmol/ml.

Nustatėme, kad karvių su susilaikiusiu geltonkūniu kiaušidėse folikulai kiaušidėse augo, tačiau folikulinės bangos nebuvo išreikštos, folikulai nepasiekė ovuliuojančio folikulo dydžio, ir karvės nerujojo. Progesterono koncentracija kraujyje sumažėjo $5,79 \pm 2,71$ nmol/l (iki 7,5 nmol/ml) ($p \leq 0,05$), tokiu būdu neleidama augti folikulams ir jiems ovuliuoti. Esant kiaušidėje geltonkūniui, jis išskiria progesteroną, kuris neleidžia išskirti GnRH ir LH (Roche ir kt., 1992; Stevenson, 2001; Hall ir kt., 2002), dėl to sutrinka lytinis ciklas ir kiaušidėje nesubręsta galintis ovuliuoti folikulas.

Yra labai daug priežasčių, sukeliančių karvių rujos bei ovuliacijos sutrikimus. Tokiomis priežastimis gana dažnai būna susilaikęs geltonkūnis, persirgęs endometritas, neaktyvios kiaušidės. Tuo tikslu karvių, turinčių rujos pasireišimo sutrikimų arba sėklintų du ar daugiau kartų, bet neapsivaisinusių, rujai stimuliuoti buvo panaudoti sintetiniai prostaglandinai.

Tradiciniai rujos sinchronizavimo metodai naudojant prostaglandinus ar jo sintetinius analogus lytinio ciklo luteininės fazės metu sukelia ovuliaciją. Gydant $\text{PGF}_{2\alpha}$ ovuliacijos laikas priklauso nuo folikulų augimo stadijos (Doležel ir kt., 2000), nors paprastai ovuliacija įvyksta 3 – 5 – tą dieną po gydymo (Doležel ir kt., 2002). Buvo patvirtinta, kad, naudojant prostaglandinus ar jų analogus du kartus su 11 dienų intervalu, karvės ir telyčios pradeda rujoti praėjus 3 – 5 dienoms po antrosios injekcijos. Tyrimo metu naudojome preparatą *Estron*, kuris lizuoja kiaušidėje esantį geltonkūnį. Preparato veiklioji medžiaga yra sintetinis prostaglandino $\text{F}_{2\alpha}$ analogas — kloprostenolis.

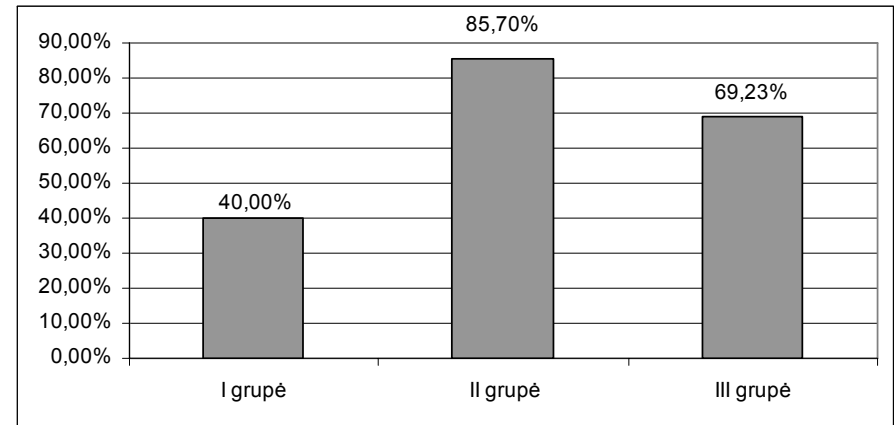
Karvių su susilaikiusiais geltonkūniais pirmojoje grupėje praėjus trimis dienoms po gydymo sintetiniais prostaglandiniais surujo keturios karvės (80%), antrojoje – šešios karvės (85,7%). Jų kiaušidėse esantis susilaikęs geltonkūnis buvo dalinai rezorbuotas. Nesurujojusių karvių kiaušidėse buvo rastas tas pats geltonkūnis, tačiau mažesnis. Pirmąją dieną susilaikiusio geltonkūnio dydžio vidurkis dešiniojoje kiaušidėje buvo $16,8 \pm 2,5$ mm, kairiojoje kiaušidėje – $16,2 \pm 1,0$ mm, o progesterono koncentracija kraujyje – $18,02 \pm 5,6$ nmol/l. Praėjus trimis dienoms po preparato *Estron* suleidimo geltonkūnis dešiniojoje kiaušidėje buvo $12,5 \pm 1,7$ mm, o kairiojoje – $11,7 \pm 1,3$ mm. Progesterono koncentracija nesurujojusių karvių kraujyje – $10,87 \pm 4,3$ nmol/l. Folikulo dydis dešiniojoje kiaušidėje rujos dieną buvo $9,8 \pm 1,1$ mm, kairiojoje kiaušidėje – $8,9 \pm 0,9$ mm. Apsivaisino – 50 % karvių. Karvių, kurioms ruja pasireiškė, progesterono koncentracija kraujyje buvo $3,38 \pm 2,1$ nmol/l.

Naudojant *Estron* derinyje su vitamininiu preparatu *Trivit*, kuris stimuliuoja gonadotropinių hormonų sekreciją, stabilizuoja membranas bei gerina fermentų sintezę, ovuliuojančio folikulo dydis rujos dieną dešiniojoje kiaušidėje buvo $10,1 \pm 1,2$ mm, kairiojoje – $10,5 \pm 0,8$ mm, o progesterono koncentracija $2,56 \pm 0,7$ nmol/l. Naudojant šį vaistų derinį surujo 85,7 %, o apsivaisino – 66,67 % karvių. Pasak Geoffrey A. H. (1996), naudojant prostaglandinus du kartus, ruja pasireiškia rečiau, tačiau apsivaisinimo procentas būna didesnis nei naudojant vieną kartą.

Trečiosios grupės karvėms vienuoliktąją tyrimo dieną antrą kartą buvo panaudotas preparatas *Estron*. Tą dieną progesterono koncentracija karvių kraujyje buvo $7,67 \pm 0,24$ nmol/l, o kitą dieną sumažėjo iki $5,10 \pm 0,11$ nmol/l ($p < 0,05$).

Trečiojoje grupėje po antrosios preparato *Estron* injekcijos praėjus trimis dienoms ruja pasireiškė 9 karvėms (69,23 %). Progesterono koncentracija jų kraujyje buvo $1,18 \pm 0,13$ nmol/l. Kiaušidėse susilaikiusio geltonkūnio nebuvo. Nesurujojusių karvių dešiniojoje kiaušidėje geltonkūnis buvo $12,3 \pm 1,6$ mm, kairiojoje kiaušidėje – $10,3 \pm 0,9$ mm. Progesterono koncentracija buvo $7,81 \pm 1,9$ nmol/l. Suruojusių karvių folikulo dydis rujos dieną dešiniojoje kiaušidėje buvo –

9,7±0,9 mm, kairiojoje kiaušidėje – 10,6±1,1 mm. Apsivaisinimo - 55,56 % karvių (3 paveikslas).



3 paveikslas. Surujojo po preparato panaudojimo.

Prostaglandino $F_{2\alpha}$ liuteolitinis veikimas žinomas jau nuo 1970-ųjų metų. Dažniausiai naudojami kairiniai kloprostenolio cheminės sintezės dariniai, tačiau pastaraisiais metais susilaikiusių geltonkūnių gydymui vis dažniau naudojamas preparatas *Dalmazin* skiriasi tuo, kad yra kloprostenolio dešininis (dekstrotacinis) enantiomeras. *Dalmazin* veikia žymiai geriau nei panašūs kloprostenolio racematų preparatai. Liuteininės (geltonkūnio formavimosi) fazės metu *Dalmazin* mažina liuteinizuojančio hormono (LH) receptorių skaičių kiaušidėje, todėl geltonkūnis greitai regresuoja ir staiga sumažėja progesterono kiekis. Hipofizio priekinėje skiltyje suaktyvėja folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) sintezę. Tai skatina naujų folikulų brendimą, sukelia rują ir ovuliaciją.

Bandymo metu nustatėme, kad Lietuvos juodmargių veislės karvių kiaušidėse susilaikę geltonkūniai aptinkami dažniau (55 % atvejų) nei Vokietijos juodmargių veislės karvių kiaušidėse (45 % atvejų). Nustatyta, kad dažniausiai susilaikę geltonkūniai nustatomi 8 metų amžiaus LJ veislės karvėms, o VJ veislės karvėms – 5 metų amžiaus ($p < 0,05$).

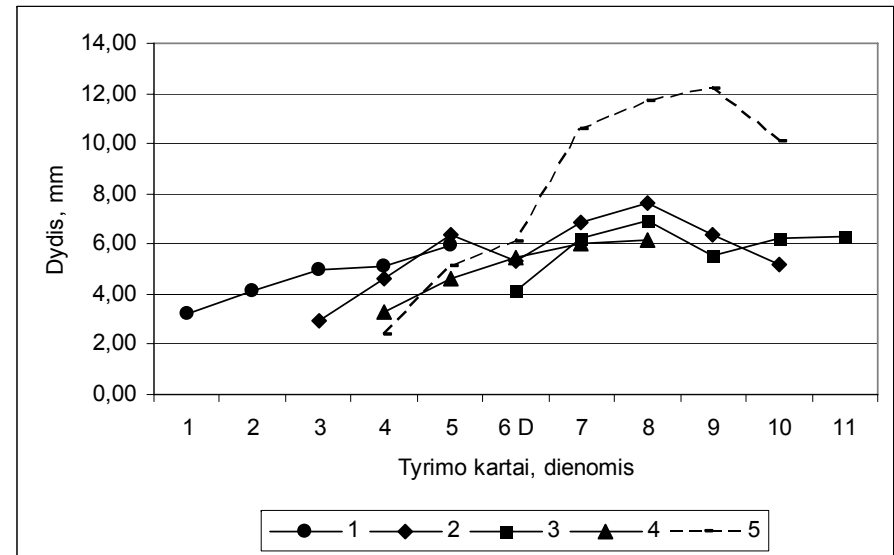
Atlikus daugiafaktorinę veiksnių analizę nustatyta, kad karvės amžiaus ir veislės įtaka kiaušidžių, folikulų ir kairiosios kiaušidės geltonkūnio dydžiui yra reikšminga ($p < 0,05$), tik dešiniosios kiaušidės geltonkūnio dydžiui veislė reikšmės neturi. Tiriant veiksnių tarpusavio sąveikas kiaušidžių dydžiams (ilgiui, pločiui ir dydžio vidurkiui), folikulų dydžiams (ilgiui, pločiui ir dydžio vidurkiui) bei geltonkūnių dydžiui (ilgiui, pločiui ir dydžio vidurkiui) nustatyta, kad karvės amžiaus (A) ir karvės veislės (V) bei šių dviejų veiksnių A*V sąveikos įtaka kiaušidžių ir folikulų dydžiams bei kairiosios kiaušidės geltonkūnio dydžiams

statistiškai yra reikšminga ($p < 0,05$), bet dešinėsios kiaušidės geltonkūnio dydžiui reikšmės neturi.

Analizuojant pavienio amžiaus veiksnio įtaką kiaušidžių dydžiui, nustatyta, kad didžiausi susilaukę geltonkūniai dešiniojoje kiaušidėje (dydžio vidurkis) yra aštuonerių metų karvių – $16,50 \pm 4,65$ mm, o kairiojoje kiaušidėje (dydžio vidurkis) penkerių metų karvių – $12,15 \pm 3,24$ mm ($p < 0,05$). Nustatyta, kad visi kiaušidžių dydžio parametrai patikimai teigiamai koreliuoja su karvės amžiumi ($p < 0,001$).

Atliekant bandymą naudojome preparatus *Estron* ir *Dalmazin*. Po preparato *Estron* panaudojimo progesterono koncentracija kraujyje nuo $14,75 \pm 0,53$ nmol/l pirmą dieną sumažėjo iki $5,04 \pm 0,42$ nmol/l kitą dieną, o naudojant preparatą *Dalmazin* nuo $15,21 \pm 1,01$ nmol/l iki $4,73 \pm 0,84$ nmol/l atitinkamai ($p \leq 0,05$).

Tyrimo metu nustatėme, kad naudojant preparatą *Dalmazin* folikulai per dieną vidutiniškai paaugdavo po $2,03 \pm 0,16$ mm, surūjojo 92,31 % gydytų karvių, tuo tarpu gydant tradiciniu klostrostenolio dariniu, preparatu *Estron*, folikulus per dieną paaugdavo $1,21 \pm 0,11$ mm, o surūjojo 75 % karvių. Suleidus preparatą *Dalmazin* susilaukę geltonkūniai kiaušidėje buvo lizuoti greičiau ir progesterono koncentracija rujos dieną buvo žemesnė nei lyginant su preparatu *Estron*. Karvių grupėje, kuri buvo gydyta *Dalmazin*, progesterono koncentracija rujos dieną buvo $13,58 \pm 4,92$ nmol/l mažesnė nei pirmą tyrimo dieną. *Estron* gydytų karvių šis skirtumas sudarė $12,26 \pm 3,94$ nmol/l.



4 paveikslas. Folikulų augimo dinamika esant susilaikiusiam geltonkūniui ir po gydymo preparatu *Dalmazin*. “D” raidė grafike parodo preparato *Dalmazin* suleidimo laiką. Skaičiais nurodyti folikulai.

Pasak Chiesa F. (2004), klostrostenolio dekstrorotacinis enantiomeras, preparatas *Dalmazin* veikia greičiau, nes mažina LH receptorių skaičių kiaušidėje, dėl ko greitai regresuoja geltonkūnis ir staiga sumažėja progesterono kiekis, be to padidėja FSH išskyrimas bei formuojasi nauji folikulai. Tyrimo metu nustatėme, kad gydant preparatu *Dalmazin* rudos dieną ovuliuojančio folikulo dydis buvo $2,35 \pm 0,05$ mm didesnis nei karvių, gydytų preparatu *Estron*. Folikulų augimo dinamika švirkščiant preparatą *Dalmazin* pavaizduota 4 paveiksle. Karvių su susilaikiusiu geltonkūniu grupėje spontaniškai pasveiko (surujojo) dvi karvės (66,67 %), tačiau ovuliuojančio folikulo dydis buvo $2,95 \pm 0,35$ mm mažesnis lyginant su preparatu *Dalmazin* gydytų karvių ir $0,6 \pm 0,30$ mm mažesnis lyginant su preparatu *Estron*.

Tirdami ultragarsu nustatėme, kad apsivaisino 83,33 % karvių, gydytų preparatu *Dalmazin*, o gydytų preparatu *Estron* apsivaisino tik 66,67 %. Tai parodo, kad gydant dekstrorotaciniu klostrostenolio dariniu preparatu *Dalmazin*, surujojo 17,31 % ir apsivaisino 16,66 % daugiau karvių nei gydant preparatu *Estron*.

Tiriant folikulines bangas nustatyta (Macmillan ir kt., 1985; Thatcher ir kt., 1989; Twagiramungu ir kt., 1995), kad GnRH ir jo analogų panaudojimas skatina ovuliaciją ir dominantinio folikulo liuteinizaciją. Daugelis autorių (Thatcher ir kt., 1989; Stevenson J., 2001; Doležel ir kt., 2002; Noseir, 2003) aprašo prostaglandinų dvikartinę panaudojimo schemą kartu su GnRH. Gonadotropinai taip pat buvo naudojami ovuliacijai sukelti juos suleidžiant prieš pat sėklinimą (Taponen, 1999).

Savo tyrimams naudojome GnRH (preparatą *Fertagyl*) dvi valandos iki sėklinimo, kai ruja sukelia švirkščiant prostaglandinus du kartus su 11 dienų intervalu ir sėklinama praėjus trimis dienoms nuo antrosios injekcijos.

Praėjus vienuolikai dienų nuo preparato *Estron* panaudojimo, antrojoje ir trečiojoje grupėse karvėms buvo pakartotinai suleista po 2 ml šio preparato. Suleidimo dieną antrosios grupės karvių dešinėsios kiaušidės dydžio vidurkis buvo $26,80 \pm 1,98$ mm, folikulo dydžio vidurkis $4,78 \pm 1,97$ mm, geltonkūnio dydžio vidurkis - $7,50 \pm 2,10$ mm. Kairiosios kiaušidės dydžio vidurkis buvo $25,90 \pm 1,87$ mm, folikulo dydžio vidurkis - $6,24 \pm 2,10$ mm, geltonkūnio - $10,63 \pm 1,85$ mm. Progesterono koncentracija kraujyje buvo $1,66 \pm 0,15$ nmol/l.

Trečiosios grupės karvių dešinėsios kiaušidės dydžio vidurkis vienuoliktąją tyrimo dieną buvo $29,45 \pm 4,29$ mm, folikulo dydžio vidurkis $10,15 \pm 1,86$ mm, geltonkūnio dydžio vidurkis $8,95 \pm 2,22$ mm. Kairiosios kiaušidės dydžio vidurkis buvo $25,92 \pm 3,02$ mm, folikulo dydžio vidurkis $8,69 \pm 3,51$ mm, geltonkūnio dydžio vidurkis - $8,52 \pm 1,93$ mm. Progesterono koncentracija kraujyje buvo $7,67 \pm 0,24$ nmol/l.

Po trijų dienų nuo antrosios preparato *Estron* injekcijos antrojoje grupėje ruja pasireiškė penkioms karvėms (71,43 % atvejų), o trečiojoje grupėje - septynioms karvėms (87,5 % atvejų). Trečiosios grupės karvės, kurioms pasireiškė ruja, dvi valandos iki sėklinimo buvo suleistas preparatas *Fertagyl*.

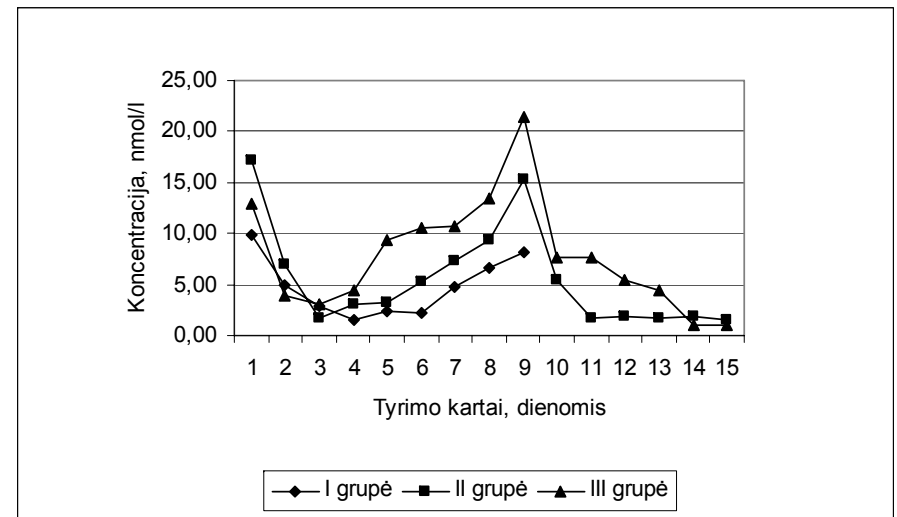
Antrosios grupės karvių dešinėsios kiaušidės dydžio vidurkis rudos dieną buvo $24,75 \pm 1,05$ mm, folikulo dydžio vidurkis $9,87 \pm 0,65$ mm. Kairiosios kiaušidės

dydžio vidurkis buvo $28,25 \pm 1,12$ mm, folikulo dydžio vidurkis $9,40 \pm 2,33$ mm. Progesterono koncentracija rudos dienos buvo $1,92 \pm 0,14$ nmol/l.

Trečiosios grupės karvių dešinės kiaušidės dydis rudos dienos buvo $24,82 \pm 3,51$ mm, folikulo $10,83 \pm 0,23$ mm. Kairiosios kiaušidės dydžio vidurkis - $27,04 \pm 1,43$ mm, folikulo dydžio vidurkis $10,05 \pm 0,12$ mm. Progesterono koncentracija prieš leidžiant preparatą *Fertagyl* buvo $1,08 \pm 0,06$ nmol/l, o po dviejų valandų (prieš pat sėklinant) - $1,03 \pm 0,06$ nmol/l.

Karvių, kurioms buvo suleistas preparatas *Fertagyl*, ruda buvo labiau išreikšta, išsiskyrė daugiau gleivių iš makšties. Tiriant rektiškai nustatyta, kad jų gimda buvo labiau rigidiška. Nustatėme, kad panaudojus šį preparatą karvių kiaušidėse subrendo 0,96 mm didesni folikulai dešiniojoje ir 0,65 mm kairiojoje kiaušidėje ($p < 0,05$).

Nustatytas ir progesterono koncentracijos kitimas priklausomai nuo panaudoto gydymo preparato. Pirmąją tyrimo dieną pirmoje, antroje ir trečioje grupėse progesterono koncentracija karvių kraujyje siekė iki 17,11 nmol/l. Praėjus trims dienoms po preparato *Estron* panaudojimo progesterono koncentracija ženkliai sumažėjo visose trijose grupėse. Tiriant ultragarsu trečiąją dieną nustatytas labai sumažėjęs geltonkūnis. Nuo penktosios tyrimo dienos progesterono lygis pradeda nežymiai didėti. Nuo vienuoliktos - antrosios ir trečiosios grupės karvėms, suleidus antrą kartą preparatą *Estron*, progesterono koncentracija nukrito iki $1,03$ - $1,92 \pm 0,23$ nmol/l. Progesterono koncentracijos kitimas naudojant gydymui prostaglandinus pavaizduotas 5 paveiksle.



5 paveikslas. Progesterono koncentracijos (nmol/l) kitimas tyrimo metu.

Nustatėme, kad po dvikartinės prostaglandinų injekcijos naudojant preparatą *Fertagyl* surūjojo 87,5 % gydytų karvių. Lyginant su karvių grupe, kurios buvo gydytos tik vienkartinę prostaglandinų injekcija, surūjojo 25 % daugiau, o lyginant su karvių grupe, kurios buvo gydytos dvikartinę prostaglandinų injekcija, bet nenaudojant *Fertagyl* preparato – 16,07 % daugiau. Prieš sėklinant panaudojus *Fertagyl* progesterono koncentracija karvių kraujyje buvo $1,03 \pm 0,06$ nmol/l, arba $0,53 \pm 0,06$ nmol/l mažiau nei naudojant vienkartinę prostaglandinų injekciją, ir $0,89 \pm 0,02$ nmol/l mažiau nei naudojant dvikartinę prostaglandinų injekciją. Ovuliacinio folikulo dydis po preparato *Fertagyl* panaudojimo buvo $10,05 \pm 0,12$ mm, t. y. $0,65$ mm didesnis nei nenaudojant GnRH analogų. Pursley ir kt. (1993) nustatė, kad po GnRH analogų suleidimo išsiskiria pakankamas LH ir FSH kiekis į kraują. Išsiskyręs LH paveikia didžiausio folikulo ovuliaciją arba regresiją ir geltonkūnio formavimąsi (Morrow, 1980; Pursley, 1998; Rasby ir Gene, 2000; Doležel ir kt., 2002; Noseir, 2003).

Tiriant gydytų karvių veršingumą panaudojus preparatą *Fertagyl* apsisvaisino 100 % gydytų karvių. Naudojant dvikartinę prostaglandinų injekciją be GnRH sėklinimo metu, apsisvaisino tik 60 % gydytų karvių. Preparatas *Fertagyl* net iki 40 % padidino apsisvaisinimą. Naudojant vienkartinę prostaglandinų injekavimo taktiką apsisvaisino 80 % gydytų karvių.

IŠVADOS

1. Mūsų bandymais nustatyta, kad Lietuvos ir Vokietijos juodmargių veislės karvių reprodukcijos funkcijas po apsiveršiavimo veikia karvės amžius, kuris turėjo įtakos kiaušidžių dydžiui ($p < 0,05$) bei patikimai teigiamai koreliavo su folikulo dydžiu kairiojoje kiaušidėje ($p = 0,001$). Sezonas irgi veikia apsisvaisinimą ($p < 0,05$). Pieno produkcijos kiekio įtaka kiaušidžių ir folikulų dydžiams nenustatyta ($p > 0,05$).

2. Po apsiveršiavimo šešerių metų karvių dešinioji kiaušidė buvo didžiausia ($p < 0,001$), bet ketverių - penkerių metų karvių kairioji kiaušidė buvo didesnė už dešiniąją ($p < 0,05$). Vyresnių nei šešeri metai karvių dešinėsios kiaušidės dydis pradeda mažėti ($p < 0,05$). Kairioji kiaušidė mažėja taip pat, tačiau išlieka mažesnė už dešiniąją ($p < 0,05$).

3. Nustatyta, kad kiaušidžių ir folikulų dydžiui daro įtaką karvės veislė, amžius bei karvės amžiaus ir veislės sąveika.

LJ veislės karvių kiaušidės buvo didesnės (dešinioji kiaušidė - $1,35$ mm, kairioji - $1,10$ mm) nei VJ veislės karvių atitinkamai ($p < 0,05$). Dešiniojoje kiaušidėje didžiausi folikulai po apsiveršiavimo būna šešerių metų karvių, o kairiojoje kiaušidėje – trejų ir šešerių metų amžiaus karvių ($p < 0,05$).

Didžiausi folikulai periode po apsiveršiavimo dešiniojoje kiaušidėje buvo penkerių metų LJ veislės ($10,20 \pm 5,38$ mm) karvių ir septynerių metų VJ veislės ($8,60 \pm 2,95$ mm) karvių ($p = 0,0001$). Didžiausi folikulai po apsiveršiavimo kairiojoje kiaušidėje buvo ketverių metų LJ veislės ($8,35 \pm 3,19$ mm) karvių ir trejų metų VJ veislės ($7,80 \pm 2,75$ mm) karvių ($p = 0,0001$).

4. Sveikų Lietuvos juodmargių veislės karvių kiaušidėse po apsiveršiavimo vyko po dvi folikulų bangas, jos labiau išreikštos, folikulai didesni nei karvių su susilaikiusiais geltonkūniais ($p < 0,05$). VJ veislės negydytų karvių kiaušidėse vyko po tris folikulų augimo bangas, o gydytų karvių kiaušidėse buvo dvi folikulų augimo bangos, ovuliacinis folikulas buvo mažesnio dydžio ($p < 0,05$).

5. Naudojant vienkartinę preparato *Estron* injekciją, surujo 80 % gydytų karvių, iš jų apsivaisino 50 % ($p < 0,05$). Naudojant *Estron* kartu su *Trivit*, 85,7 % ir 66,67% atitinkamai ($p < 0,05$). Naudojant preparatą *Estron* du kartus su 11 dienų intervalu surujo 69,23 % karvių, apsivaisino - 55,56 % ($p < 0,05$).

6. Nustatyta, kad užsilaikiusių geltonkūnių gydymui efektyviausias yra preparatas *Dalmazin*, kurį panaudojus surujo 92,31 % gydytų karvių, iš kurių apsivaisino 83,33 % ($p < 0,05$). Preparatas *Estron* rują sukėlė 75 % karvių, iš kurių 66,67 % apsivaisino ($p < 0,05$).

7. Preparatu *Dalmazin* gydytoms karvėms su užsilaikiusiu geltonkūniu abiejose kiaušidėse buvo nustatyta po dvi folikulų augimo bangas, folikulai augo greičiau, o folikulinės bangos vyko trumpiau nei preparatu *Estron* gydytoms karvėms ($p \leq 0,05$).

8. Gydymo efektyvumas padidėjo preparatą *Estron* derinant su sintetiniu GnRH analogu - preparatu *Fertagyl*. Surujo 87,5 %, o apsivaisino 100 % visų gydytų karvių ($p < 0,05$).

9. Esant susilaikiusiam geltonkūniui, progesterono koncentracija kraujyje vidutiniškai buvo $15,01 \pm 4,90$ nmol/l. ($p \leq 0,05$). Preparatas *Estron* progesterono koncentraciją 2-ą dieną po suleidimo sumažino iki $5,04 \pm 1,02$ nmol/l ($p < 0,05$), o preparatas *Dalmazin* iki $4,73 \pm 0,95$ nmol/l ($p \leq 0,05$). Panaudojus prostaglandinus du kartus su 11 dienų intervalu, progesterono koncentracija prieš antrą preparato suleidimą buvo 7,67 nmol/l, o po antro suleidimo praėjus parai sumažėjo 2,57 nmol/l ($5,10$ nmol/l) ($p < 0,05$).

PASIŪLYMAI

1. Karvių kiaušidžių funkcinėi veiklai ir gimdos būklei visapusiškai įvertinti būtina naudoti ultragarso prietaisą. Kiaušidžių, geltonkūnių ir didesnių nei 3 mm dydžio folikulų tyrimui naudoti 6 MHz dažnį, o mažesnių nei 3 mm dydžio darinių tyrimui naudoti 8 MHz dažnį, ankstyvo veršingumo (nuo 25 dienos) nustatymui - 6 MHz dažnį.

2. Susilaikiusių geltonkūnių gydymui naudoti preparatą *Dalmazin*, švirkščiant jo po 2 ml į raumenis vieną kartą ir praėjus 72 - 96 valandoms karves sėklinti.

Susilaikiusių geltonkūnių gydymui naudojant preparatą *Estron*, jo švirkšti po 2 ml į raumenis, tuo pačiu metu sušvirkšti ir vitamininį preparatą *Trivit* (20 ml į raumenis).

3. Karvių apsivaisinimui pagerinti naudoti GnRH analogą - preparatą *Fertagyl* švirkščiant jo į raumenis 2,5 ml likus dviems valandoms iki sėklinimo.

SKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Rutkauskas A., Žilinskas H. „Use Cloprostenolum combine with vitamins therapy: Follicular growth and progesterone level“. Proceedings from minisymposium at Lithuanian Veterinary Academy, Kaunas, Lithuania. CRU report 17. 2003. P. 42-44.
2. Rutkauskas A., Žilinskas H. „Postpartum ovarian follicular and estrous activity in dairy cows using prostaglandin $F_{2\alpha}$ “ Veterinarija ir zootechnika, T.31 (53), 2005. Priimta spausdinti.

TRUMPAS GYVENIMO APRAŠYMAS

Gimė 1976 m. liepos mėn. 28 d. Mokėsi Kelmės raj., Stulgių pagrindinėje mokykloje, kurią 1991 m. baigė. Vėliau lankė Raseinių raj., Nemakščių M. Mažvydo vidurinę mokyklą.

1999 metais įgijo veterinarijos gydytojo kvalifikaciją LVA. 2001 m. kovo mėn. įgijo magistro laipsnį. Nuo 2001 m. LVA, Neužkrečiamų ligų katedros, Gyvulių reprodukcijos laboratorijos doktorantas. Dirbo LVA Stambių gyvulių klinikoje (1995 – 1996), vėliau L. Kriaučeliūno smulkių gyvulių klinikoje (1996 – 1999).

Maketavo: R. Trainienė

Už teksto turinį ir redagavimą atsakingas autorius

Spausdino LVA spaudos ir leidybos skyrius
Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas
Tiražas 50. 2,63 sp.l. Užs. Nr. 40d. 2005