

İneklerde Ovsynch Protokolünde İkinci Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) Enjeksiyonu Yerine Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Kullanımının Etkinliğinin Araştırılması[#]

Mehmet KÖSE^{1*}, Mesut KIRBAŞ², Bülent BÜLBÜL², Ahmet OYAR²

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

²Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Konya

*Sorumlu Yazar: Mehmet KÖSE Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,
21280, Sur, Diyarbakır

e-posta: mehmetkose1977@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 02.05.2013

ÖZET

Bu çalışma, laktasyondaki ineklerde klasik ovsynch protokolünde ikinci Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) uygulaması yerine human Chorionic Gonadotropin (hCG) uygulamasının plazma progesteron düzeyi ve gebelik oranı üzerine etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmanın başlangıcında 36 baş sağmal inek rastgele iki uygulama grubuna ayrıldı: OV-GnRH (n=20) ve OV-hCG (n=16) grubu. Bütün ineklere 0. gün GnRH ve 7. gün PGF2α enjeksiyonu yapıldı. Dokuzuncu gün OV-GnRH grubundaki ineklere GnRH enjekte edilirken, OV-hCG grubundakilere ikinci GnRH yerine hCG enjekte edildi. Son enjeksiyon (9. gün) ve tohumlama günü preovulatör folliküllerin büyüklükleri 7,5 MHz transrektal prob kullanılarak ultrason ile ölçüldü. Bütün inekler ikinci GnRH ya da hCG enjeksiyonundan 16-18 saat sonra tohumlandı. Plazma progesteron (P4) düzeyinin tespiti için tohumlama günü (ST) ve sonrasındaki 5 ve 12. günlerde heparinize tüplere kan örnekleri toplandı. Tohumlamadan 24 saat sonra ovulasyon, 30 gün sonra ise gebelik kontrolü ultrasonla gerçekleştirildi. Son enjeksiyon ve tohumlama günü yapılan ultrasonografik muayenede pre-ovulatör folliküllerin ortalama büyüklükleri (±S.E.M.) OV-GnRH grubunda 1,41±0,06 ve 1,53±0,06 cm, OV-hCG grubunda ise 1,56±0,08 ve 1,67±0,06 cm olarak belirlendi. Ovulasyon ve gebelik oranları sırasıyla OV-GnRH grubunda %90 ve %40, OV-hCG grubunda ise %93,75 ve %56,25 olarak tespit edildi. Gruplarda pre-ovulatör folliküllerin ortalama büyüklükleri, ovulasyon ve gebelik oranları arasındaki farklar istatistik açıdan önemli bulunmadı (P>0,05). Sunulan çalışmada elde edilen verilere dayanarak, ineklerde ovsynch protokolünde ikinci GnRH yerine hCG uygulamasının da yapılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnek, ovsynch, GnRH, hCG

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFICACY OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (HCG) INSTEAD OF SECOND GONADOTROPIN-RELEASING HORMON INJECTION (GNRH) AT OVSYNCH PROTOCOL IN COWS

This study was carried out to determine the efficacy of replacing the second Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) with human Chorionic Gonadotropin (hCG) on pregnancy rate and plasma progesterone level in ovsynch protocol in cows. Thirty-six cows were randomly divided into two treatment groups: OV-GnRH (n=20) and OV-hCG (n=16) groups. All cows were treated with GnRH on day 0 and PGF2α on day 7. On day 9, cows in OV-GnRH group

[#]Bu çalışmanın bir bölümü, V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 1-4 Ekim 2009, Elazığ'da sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

were injected with GnRH while those in OV-hCG group were injected with hCG. Pre-ovulatory follicle sizes (\pm S.E.M.) were examined by ultrasonography on 9 and 10 days. All cows were inseminated 16-18 h after the last injection. Ovulation and pregnancy examinations were performed by ultrasonography at 24 h and on 30 day after the insemination, respectively. Blood samples were collected on artificial insemination day and then at 5 and 12 days for progesterone assay. Mean pre-ovulatory follicle sizes on last injection and insemination days were determined 1.41 \pm 0.06 and 1.53 \pm 0.06 cm in OV- GnRH group, 1.56 \pm 0.08 and 1.67 \pm 0.06 cm in OV-hCG group. Ovulation and pregnancy rates were 90% and 40% for OV-GnRH group and 93.75% and 56.25% for OV-hCG group. Pre-ovulatory follicle sizes and ovulation and pregnancy rates did not differ significantly between groups ($P>0.05$). It is concluded that hCG can be used instead of the second GnRH injection in ovsynch protocol in cows according to the results obtained from this study.

Key Words: Cow, ovsynch, GnRH, hCG

Giriş

Ovsynch yöntemi, östrüs tespitine gerek olmadan sabit zamanlı tohumlama yapılmasına olanak sağlayan ve yaygın olarak kullanılan bir senkronizasyon protokolüdür. ProstaglandinF_{2 α} (PGF_{2 α}) enjeksiyonundan yedi gün önce ve iki gün sonra uygulanan GnRH enjeksiyonlarından oluşan bu protokolda luteal regresyonun eşliğinde folliküler gelişimin, dolayısıyla ovulasyonların senkronize edilmesi amaçlanmaktadır (Pursley ve ark., 1997a). Teorik olarak birinci GnRH enjeksiyonuyla büyük folliküllerin ovulasyonu veya luteinizasyonu ile sekonder luteal yapıların oluşması sağlanır ve yeni bir folliküller dalga başlatılır. Yedi gün sonra yapılan PGF_{2 α} enjeksiyonuyla ovaryumlardaki korpus luteum (CL)/CL'ler lize olurken, ikinci GnRH enjeksiyonuyla hipofiz bezinden oluşturulan luteinizing hormon (LH) salınımıyla ilk GnRH uygulamasını takiben başlayan yeni folliküler dalganın dominant follikülünün ovulasyonu uyarılır (Bülbül ve ark., 2009; Köse ve Tekeli, 2006; Pursley ve ark., 1997b).

Ovsynch protokolü günümüzde sütçü işletmelerde sıklıkla tercih edilmekle birlikte elde edilen gebelik oranlarının östrüs tespitine dayalı tohumlamalara göre düşük olması bu yöntemin önemli bir dezavantajını oluşturmaktadır (Schmitt ve ark., 1996; Wiltbank ve ark., 2011). Ayrıca önceki çalışmalarda elde edilen gebelik oranları arasında önemli farklılıklar olduğu belirtilmektedir (Kırbaş ve ark., 2008)

Ovsynch protokolü sonrası elde edilen düşük gebelik oranlarının nedenlerinden birisinin ikinci GnRH enjeksiyonu sonrası senkronize ovulasyonların oluşmaması olduğu, bu oranın

%20'lere ulaşabildiği (Galvão ve Santos, 2010) ve bu ineklerin gebe kalma ihtimalinin çok düşük olduğu belirtilmektedir (Wiltbank ve ark., 2011). Senkronize ovulasyonların oranını artırmak amacıyla ikinci GnRH yerine hipofiz üzerine direkt etkiye sahip ve yarılanma ömrü daha uzun olan human chorionic gonadotropin (hCG)'in ovsynch protokolünde kullanılabilmesi belirtilmektedir (De Rensis ve ark., 2010).

Ruminantlarda embriyonik ölümlerin etiolojisindeki en önemli faktörlerden birinin de progesteron hormonunun düzeyinin düşüklüğü ile sonuçlanan luteal yetmezlik olduğu çok iyi bilinmektedir (Diskin ve Morris, 2008; Mann ve Lamming, 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda tohumlama sonrası erken dönemdeki progesteron düzeyi ve profilinin, embriyonal yaşama gücü açısından geç döneme göre daha önemli ve pozitif bir ilişki taşıdığı (Diskin ve ark., 2006; McNeill ve ark., 2006; Starbuck ve ark., 2006), özellikle ovulasyon sonrası progesteronun yükselme zamanı ve konsantrasyonunun erken embriyonik ölümlerle ilişkili olduğu bildirilmektedir (McNeill ve ark., 2006; Starbuck ve ark., 2006; Stronge ve ark., 2005). Dolayısıyla özellikle fertilizasyon sonrası 8-16. günler arasında çok yüksek düzeyde olduğu belirtilen embriyonik ölümlerin (Diskin ve Sreenan, 1980) azaltılması amacıyla embriyonal yaşama gücüne olumlu etkisi olduğu bilinen progesteronun düzeyinin artırılmasına yönelik eksojen gonadotropik hormon uygulamaları yapılabileceği belirtilmektedir (Ataman ve ark., 2011). Tohumlama öncesi veya sonrasında değişen günlerde hCG uygulamasının farklı etkiler (ovulasyonu uyarmak, luteal hücrelerin büyüklüğü ve/veya sayısını artırmak) yoluyla

luteal fonksiyonları iyileştirdiği ve progesteron düzeyinde artış oluşturduğu bilinmektedir. hCG'in bu etkilerini GnRH analoglarının aksine hipotalamustan bağımsız oluşturması ve yarılanma ömrünün daha uzun olması GnRH analoglarına karşı avantaj oluşturmaktadır (De Rensis ve ark., 2010; Thatcher ve ark., 2002). Bu avantajları nedeniyle ovsynch gibi sabit zamanlı tohumlama protokollerinde özellikle tohumlama sonrası erken luteal fonksiyonlara ilişkin erken embriyonik ölümlerin azaltılması yoluyla fertilitenin iyileştirilmesi amacıyla GnRH yerine hCG kullanımı daha uygun bir seçenek olabilir.

Sunulan bu çalışmada laktasyondaki İsviçre Esmeri ineklerde uygulanan ovsynch protokolünde ikinci GnRH yerine hCG uygulamasının senkronize ovulasyon, tohumlama sonrası 5 ve 12. günlerdeki plazma progesteron düzeyi ve gebelik oranı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yarı açık serbest dolaşimli sistemde yetiştirilen sağmal İsviçre Esmeri inekler üzerinde yapıldı. Materyal olarak doğum sonrası gönüllü bekleme süresini dolduran ineklerde yapılan klinik muayene sonrası seçilen sağlıklı ve günlük süt verimi 15-25 litre olan 3-7 yaşlı 36 baş inek kullanıldı. İnekler işletmede hazırlanan karma yem, mısır slajı ve kuru yonca ile beslendi. Su ad libitum verildi.

İnekler östrüs siklusunun dönemine bakılmaksızın rastgele iki gruba ayrıldı; OV-GnRH grubu (n=20) ve OV-hCG grubu (n=16). Bütün ineklere 0. gün 10 µg buserelin asetat (GnRH analogu, Receptal®, Intervet, İstanbul, Türkiye) ve 7. gün 150 µg d- kloprostenol (PGF2α, Dalmazin®, Vetaş, İstanbul, Türkiye) kas içi enjekte edildi. OV-GnRH grubundaki ineklere PGF2α uygulamasından 48 saat sonra (9. gün) 10 µg buserelin asetat enjekte edilirken, OV-hCG grubundakilere ise 1500 IU hCG (Chorulon, Intervet, İstanbul, Türkiye) enjekte edildi. Bütün inekler son enjeksiyondan yaklaşık 16-18 saat sonra tecrübeli bir

teknisyen tarafından aynı boğaya ait sperma içeren payetlerle tohumlandı (ST günü). İkinci GnRH/hCG enjeksiyon ve ST günü 7,5 MHz transrektal prob donanımlı B-Mode Real Time ultrason cihazı (Scanner 480 Vet, Esaote Pie Medical, Maastrich, Hollanda) ile ovaryumlarda bulunan pre-ovulatör folliküllerin büyüklükleri ölçüldü. Tohumlama sonrası 24. saatte ultrason cihazı kullanılarak ovulasyon kontrolü yapıldı ve ikinci GnRH/hCG enjeksiyonunda tespit edilen pre-ovulatör follikülün olmaması senkronize ovulasyon olarak tanımlandı (Vasconcelos ve ark., 1999). Gebelik kontrolü, tohumlama sonrası 30. günde ultrason cihazı ile yapıldı.

Progesteron düzeyini belirlemek amacıyla ineklerden tohumlama günü ve tohumlama sonrası 5 ve 12. günlerde Na-EDTA içeren vakumlu tüplere kuyruk venasından kan örnekleri toplandı. Alınan kan örnekleri bekletilmeden 5000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve ependorf tüplere alınan plazma örnekleri progesteron analizleri yapılmaya kadar -18°C'de saklandı. Plazma örneklerinde progesteron düzeyleri (ng/ml) Access Beckmann Coulter (USA) cihazında Access Progesterone kiti kullanılarak radioimmunoassay (RIA) yöntemi ile ölçüldü.

Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizi bilgisayarda istatistik paket programı (MINITAB, Release 12.1, Minitab Inc.) kullanılarak yapıldı. Gruplarda ikinci GnRH/hCG enjeksiyon günleri ve tohumlama günü ortalama follikül büyüklüklerinin (cm) karşılaştırılması t testi, senkronize ovulasyon ve gebelik oranları ki-kare, ortalama progesteron düzeylerinin karşılaştırılması ise varyans analizi testi ile yapıldı.

Bulgular

Çalışmada gruplara ilişkin belirlenen ikinci GnRH/hCG enjeksiyon ve tohumlama günü ortalama pre-ovulatör follikül büyüklükleri (cm), senkronize ovulasyon oranı ve 30. gün gebelik oranları arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmadı (Tablo 1).

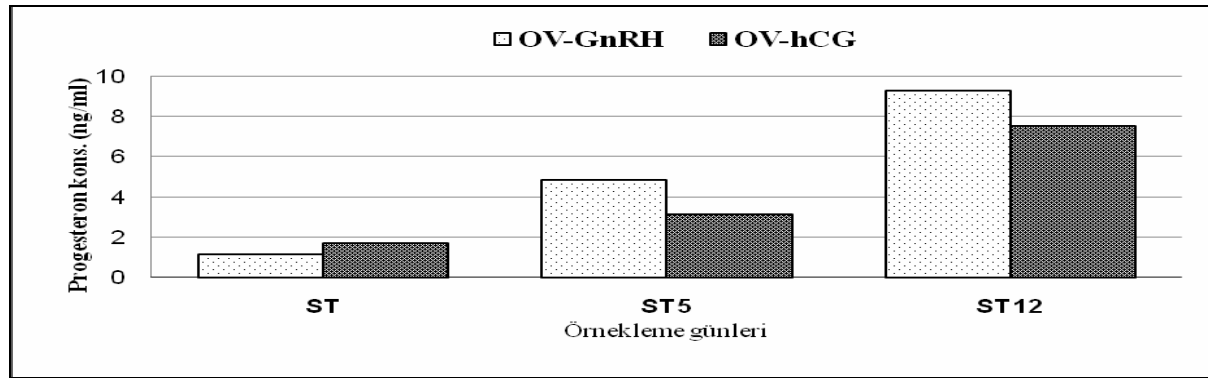
Tablo 1. Gruplarda ikinci GnRH/hCG ve tohumlama günü (ST) ortalama pre-ovulatrör follikül büyüklükleri (cm), senkronize ovulasyon ve gebelik oranları (%) (\pm S.E.M.).

Table 1. Mean (\pm S.E.M) of pre-ovulatory follicle sizes on days of second GnRH/hCG and insemination, and rates (%) of synchronized ovulation and pregnancy in groups.

Grup	Pre-ovulatrör follikül büyüklüğü		Senkronize Ovulasyon Oranı (%)	Gebelik Oranı (%)
	İkinci GnRH/hCG	Tohumlama Günü		
OV-GnRH	1,41 \pm 0,06	1,53 \pm 0,06	90,0 (18/20)	40,0 (8/20)
OV-hCG	1,56 \pm 0,08	1,67 \pm 0,06	93,8 (15/16)	56,2 (9/16)

İstatistiksel farklılık yoktur ($P>0,05$).

Gruplarda tohumlama günü ve tohumlama sonrası 5 ve 12. günlerdeki ortalama progesteron değerleri Şekil 1’de gösterildi ve belirtilen günler açısından gruplar arasında istatistiki farklılık belirlenmedi ($P>0,05$).



İstatistiksel farklılık yoktur, $P>0,05$.

Şekil 1. Gruplarda tohumlama günü (ST) ve izleyen 5 ve 12. günlerde ortalama kan progesteron düzeyleri (ng/ml).

Figure 1. Plasma progesterone concentration (ng/ml) determined on artificial insemination day and at days 5 and 12 following artificial insemination in groups.

Tartışma

Sabit zamanlı tohumlama yapılan östrüs senkronizasyonu protokolleri, östrüs tespiti için iş gücü ve zaman sarfiyatını azalttığından dolayı özellikle büyük işletmelerde sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak bu tür protokollerde yüksek fertilitte oranlarının elde edilebilmesi için sürüdeki ineklerde tohumlama zamanıyla uyumlu olacak şekilde ovulasyonların da toplulaştırılması gerekmektedir (Pursley ve ark., 1997a; Pursley ve ark., 1997b). İneklerde eksojen gonadotropin enjeksiyonu ile ovulasyonun uyarılabilmesi için 10 mm follikül büyüklüğünün yeterli olduğu belirtilmektedir

(Dolezel ve ark., 2002). Pursley ve ark. (1998) sağmal ineklerde ovulasyonların %90'ının ikinci GnRH enjeksiyonu sonrası 24-32. saatler arasında oluştuğunu belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada hem OV-GnRH hem de OV-hCG grubunda ikinci GnRH/hCG enjeksiyon günündeki follikül büyüklüklerinin (1,41 \pm 0,06 ve 1,56 \pm 0,08) ovulasyonun uyarılması için yeterli olduğu ve gruplar arasında ovulatrör follikül büyüklükleri açısından farklılık olmadığı görülmektedir. Çalışmada gruplardaki senkronize ovulasyon oranlarının %90'ı geçmesi ve gruplar arasında fark olmaması 1500 IU hCG dozunun ovulasyonu uyarması

için GnRH analogu olan 10 µg buserelin asetat ile aynı derecede etkili olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde Aslan ve ark. (2011) da hCG uygulaması sonrası pre-ovulatör follikülün çeperindeki kan akımındaki artışın ve ovulasyon öncesi maksimal çapa ulaşımının GnRH uygulamasına göre daha erken oluştuğunu ancak her iki gonadotropinin ovulasyonu uyarılmasında eşdeğer olarak etkili olduğunu ve ovulasyonların 48 saat içerisinde oluştuğunu bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada günümüze kadar elde edilen bilgiler ışığında ovsynch protokolünde ikinci GnRH yerine 1500 IU hCG'nin daha etkin ve uzun süreli luteotropik etki oluşturarak tohumlama sonrası erken dönemde yüksek düzeyde progesteron üretimi sağlayacağı ve bunun sonucu olarak gebelik oranının artacağı beklentisinin aksine bu uygulamanın, tohumlama sonrası 5 ve 12. günlerdeki plazma progesteron düzeyi üzerine olumlu etkisi belirlenmedi. Tohumlama öncesi/sırasında veya östrüs sonrası erken dönemde hCG uygulamasının plazma progesteron düzeyi üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. De Rensis ve ark. (2008a) 3300 IU hCG enjeksiyonunun tohumlama sonrası erken diöstrüs döneminde ortalama plazma progesteron düzeyini artırdığını ancak bu olumlu etkinin yılın sıcak dönemlerinde oluşmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Aslan ve ark. (2011) düvelerde yaptıkları çalışmada 3000 IU hCG enjeksiyonu sonrası 9 ve 12. günlerdeki plazma progesteron düzeyinin GnRH enjekte edilenlerden farklı olmadığını ve CL'lerin luteotropik fonksiyonları üzerine olumlu etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada östrüs sonrası birinci günde 1500 IU hCG uygulamasının 6, 7 ve 14. günlerdeki progesteron düzeyini artırmadığı bildirilmiştir (Nishigai ve ark., 2002). Aynı çalışmada araştırmacılar 6. günde 1500 IU hCG uygulanan 12 inekten 11'inde yeni CL oluşmasına rağmen 14. günde plazma progesteron düzeyinin kontrol ve 1. günde hCG uygulanan gruplarla benzer olduğunu bildirmişlerdir. hCG enjeksiyonunun tohumlamayı izleyen günlerde

progesteron düzeyi üzerine olumlu etkisinin olmadığını bildiren çalışmaların aksine olumlu etkisinin olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Johnson ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada eş zamanlı yapılan GnRH+PGF2α uygulaması sonrası 48. saatte yukarıda belirtilen çalışmalardan daha düşük doz olan 1500 IU hCG uygulamasının hem folliküller gelişimi hızlandırdığı hem de progesteron düzeyinde hızlı ve önemli bir artış oluşturduğunu belirlemişlerdir. Carvalho ve ark. (2007) bufalolarda yaptıkları çalışmada 1500 IU hCG enjeksiyonu yapılan grupta tohumlama sonrası 12. günde ortalama progesteron düzeyinin GnRH enjekte edilen gruptan yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu farklılık gebelik durumuna göre incelendiğinde gebe olanlarda tespit edilmesine rağmen gebe olmayanlarda tespit edilememiştir. Bununla birlikte tohumlama sonrası progesteron düzeyinin artırılması amacıyla hCG uygulamasına, hem metabolizma hızının yüksek olduğu hem de negatif enerji dengesi nedeniyle canlı ağırlık kaybı gibi fertilité problemi olan yüksek süt verimli ineklerde fertilitenin iyileştirilmesinde daha iyi cevap alınabileceğini belirtilmiştir (Thatcher ve ark., 2002; Thatcher ve ark., 2006). Bunlara ilave olarak çalışmalarda tohumlama sonrası plazma progesteron düzeyleri açısından elde edilen farklı sonuçların, belirtilen çalışmalar arasındaki farklılıkları oluşturan sürü, hayvan türü, mevsim, gebeliğin varlığı ve uygulanan protokol vb. farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada gebelik oranları açısından da gruplar arasındaki farklılık istatistiki düzeyde önemli bulunmadı. Sabit zamanlı tohumlama öncesinde veya tohumlama ile birlikte hCG enjeksiyonunun ilk tohumlama sonrası gebelik oranı üzerine olumlu etkisinin olduğunu bildiren çalışmalar (Carvalho ve ark., 2007; De Rensis ve ark., 2002; De Rensis ve ark., 2008b) olduğu gibi etkisiz olduğunu bildiren çalışmalar da (De Rensis ve ark., 2008a; Schmitt ve ark., 1996) bulunmaktadır. Ayrıca ovsynch protokolünde ovulasyonu uyarmak için hCG kullanılan daha önceki

çalışmalarda genel olarak gebelik oranlarındaki artışın ilk tohumlamada olmadığı, gebelik oranlarındaki arzu edilen artışın kümülatif gebelik oranlarında olduğu görülmektedir (De Rensis ve ark., 2008a). İneklerde gebeliğin oluşumu ve devamlılığı açısından ovulasyon sonrası progesteron konsantrasyonunun yükselme profilinin seyri ve zamanlamasının luteal evrede oluşan maksimum progesteron düzeyinden daha önemli olduğu belirtilmektedir (Mann ve ark., 2006). Sunulan çalışmada gruplar arasında folikül büyüklükleri, senkronize ovulasyon oranları ve tohumlama sonrası 5 ve 12. günlerde plazma progesteron açısından farklılığın olmamasının gebelik oranlarına da yansıtıldığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgulara göre ovsynch protokolünde ikinci GnRH (10 µg buserelin asetat) yerine 1500 IU hCG uygulamasının ovulasyonun uyarılması için aynı derecede etkili olduğu, ancak plazma progesteron düzeyi ve ilk tohumlama sonrası gebelik oranı üzerine olumlu etkisinin olmadığı kanısına varıldı. Bu sonuçlar ışığında, ovsynch protokolünde fertilité problemi olmayan, sağlıklı ineklerde ikinci GnRH yerine hCG preparatlarının kullanılabilmesi ancak gebelik başına östrüs senkronizasyonu maliyetinin yükseltilmemesi ve hCG uygulamasından kaynaklanan antikor oluşumu riskine karşılık GnRH uygulamasının daha avantajlı olduğu söylenebilir.

Teşekkür

Yazarlar olarak çalışmanın yürütülmesinde katkıları olan Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü çalışanlarına yardımlarından dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- Aslan, S., Aslanbas, D., Beindorff, N., Bollwein, H., 2011. Effects of induction of ovulation with GnRH or hCG on follicular and luteal blood flow in Holstein-Friesian Heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 781-786.
- Ataman, M.B., Erdem, H., Bülbül, B., Ümütlü, S., Çolak, M., 2011. The effect of buserelin injection 12 days after insemination on some reproductive characteristics in cows. *Acta Veterinaria Brno* 80, 171-177.
- Bülbül, B., Kırbaş, M., Köse, M., Dursun, Ş., Çolak, M., 2009. İneklerde östrüs siklusunun farklı dönemlerinde başlatılan ovsynch protokolünün östrüs senkronizasyonuna etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 35, 7-17.
- Carvalho, N.A.T., Nichi, M., Henriquez, C.E.P., Oliveira, C.A., Baruselli, P.S., 2007. Use of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) for fixed-time artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction* 4, 98-102.
- De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., Lopez-Gatius, F., 2008a. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 69, 1077-1082.
- De Rensis, F., Botarelli, E., Battioni, F., Capelli, T., Techakumpu, M., Lopez-Gatius, F., 2008b. Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after synchronizing ovulation using GnRH or hCG during the warm or cool period of the year. *Theriogenology* 69, 481-484.
- De Rensis, F., López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Techakumpu, M., 2010. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. *Theriogenology* 73, 1001-1008.
- De Rensis, F., Marconi, P., Capelli, T., Gatti, F., Facciolongo, F., Franzini, S., Scaramuzzi, R.J., 2002. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrous synchronization and fixed time AI after the induction an LH surge with GnRH or hCG. *Theriogenology* 58, 1675-1678.
- Diskin, M.G., Morris, D.G., 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 260-267.
- Diskin, M.G., Murphy, J.J., Sreenan, J.M., 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* 3-4, 297-311.
- Diskin, M.G., Sreenan, J.M., 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 59, 463-468.
- Dolezel, R., Cech, S., Zajic, J., Havlicek, V., 2002. Oestrus synchronization by PGF_{2α} and GnRH in intervals according to stage of follicular development at time of initial treatment in cows. *Acta Veterinaria Brunensis* 71, 101-108.

- Galvão, K.N., Santos, J.E.P., 2010.** Factors affecting synchronization and conception rate after the ovsynch protocol in lactating Holstein Cows. *Reproduction in Domestic Animals* 45 (3), 439-446.
- Johnson, R., Bennett, W.A., Cuadra, E.J., Njiti, V., Jung, Y., Mason, M., 2010.** Roles of hCG in advancing follicular growth to ovulation after concurrent injections of PGF_{2α} and GnRH in postpubertal Holstein Heifers bearing a CL. *Veterinary Medicine International* 1-7.
- Kırbaş, M., Çoyan, K., Bülbül, B., Ataman, M., Köse, M., Akman, O., Dursun, Ş., 2008.** İnek ve düvelerde luteal aktivitenin ovsynch protokolüne etkisi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 27, 47-52.
- Köse, M., Tekeli, T., 2006.** İneklerde östrüs ve ovulasyonun senkronizasyonunda güncel yaklaşımlar. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 16, 25-33.
- Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E., 2006.** Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *The Veterinary Journal* 171, 500-503.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2009.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 269-274.
- McNeill, R.E., Diskin, M.G., Sreenan, J.M., Morris, D.G., 2006.** Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology* 65, 1435-1441.
- Nishigai, M., Kamomea, H., Tanaka, T., Kaneda, Y., 2002.** Improvement of pregnancy rate in Japanese Black by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 58, 1597-1606.
- Pursley, J.R., Kosorok, M.R., Wiltbank, M.C., 1997b.** Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science* 80, 301-306.
- Pursley, J.R., Silcox, R.W., Wiltbank, M.C., 1998.** Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81, 2139-2144.
- Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., Stevenson, J.S., Ottobre, J.S., Garverick, H.A., Anderson, L.L., 1997a.** Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science* 80, 295-300.
- Schmitt, E.J., Diaz, T., Drost, M., Thatcher, W.W., 1996.** Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of Animal Science* 74, 1084-1091.
- Starbuck, G.R., Gutierrez, C.G., Peters, A.R., Mann, G.E., 2006.** Timing of follicular phase events and the postovulatory progesterone rise following synchronisation of oestrus in cows. *The Veterinary Journal* 172, 103-108.
- Stronge, A.J.H., Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Mee, J.F., Kenny, D.A., Morris, D.G., 2005.** Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 64, 1212-1224.
- Thatcher, W.W., Bilby, T.R., Bartolome, J.A., Silvestre, F., Staples, C.R., Santos, J.E.P., 2006.** Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65 (1), 30-44.
- Thatcher, W.W., Moreira, F., Pancarci, S.M., Bartolome, J.A., Santos, J.E.P., 2002.** Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 243-254.
- Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Rosa, G.J.M., Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., 1999.** Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52, 1067-1078.
- Wiltbank, M.C., Sartori, R., Vasconcelos, J.L.M., Nascimento, A.B., Souza, A.H., Cunha, A.P., Keskin, A., Guenther, J.N., Gumen, A., 2011.** Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 76, 1568-1582.