

İNEKLERDE TOHURLAMA SONRASI 4. GÜNDE UYGULANAN HUMAN CHORİONİC GONADOTROPİN'İN (HCG) GEBELİK ORANI VE PROGESTERON SEVİYELERİNE ETKİSİ

Hayrettin ÇETİN¹ Tanzer BOZKURT² Erdal KAYGUSUZUOĞLU² Ali RİŞVANLI² Halis ÖCAL²

¹Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Şanlıurfa-TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi:27.04.1999

Effect of hCG Administration on Fourth Day after Insemination on Pregnancy Rate and Serum Progesterone Levels in Cows

SUMMARY

The present study was undertaken to investigate the influence of hCG, administered on the 4th day following insemination, on serum progesterone levels, pregnancy rates and the duration of the oestrous cycle in the Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) cows.

Fifteen DAK cows aged between 6 and 8 years were used in this study. All animals were synchronised by injecting prostaglandin F₂ alpha twice at 11 day intervals and the animals were then inseminated. Those cows which exhibited regular oestrous cycles were allocated as experimental (n=9) and control (n=6) groups. These two groups received 1500 IU hCG and physiological saline (2 ml), respectively, commencing on the 4th day following insemination. Blood samples were obtained from all animals on the days 0 (at insemination), 4, 7, 10, 13, 16, 19 and 21st days following insemination. Serum progesterone levels were determined by using double radioimmunoassay method. The pregnancy of cows was determined by ultrasonographic examination on the 45th day.

In the ultrasonographic examination of the animals on the day 45, 1 control and 7 hCG-injected cows were found to be pregnant. Serum progesterone levels were significantly different between the experimental and control groups on day 13 (p<0.05). The significant differences were also observed when progesterone values on day 19 (p<0.05) and mean progesterone values (p<0.05) of non-pregnant cows in both groups were compared.

In conclusion, we suggest that hCG administration on the 4th day following insemination increases pregnancy rates, but has no effect on serum progesterone levels and the duration of the oestrous cycle in the DAK cows.

Key Words: Cow, Fertility, hCG.

ÖZET

Bu çalışmada, Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ineklere tohumlama sonrası 4. günde uygulanan HCG'nin progesteron seviyelerine, gebe kalma oranlarına ve gebe kalmayanlarda siklus süresi üzerine etkisini ortaya koymak amaçlandı.

Çalışmada, yaşları 6-8 arasında değişen 15 baş DAK inek kullanıldı. Tüm hayvanlara 11 gün ara ile 2 kez prostaglandin F₂ alfa enjekte edilerek östrüsleri senkronize edildi ve hayvanlar tohumlandı. Tohumlama sonrası inekler rastgele 9'u uygulama, 6'sı kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tohumlamayı izleyen 4. gün uygulama grubu ineklere 1500 IU HCG, kontrol grubu hayvanlara ise 2 ml serum fizyolojik enjekte edildi. Tohumlama gününden başlanarak, tohumlamayı takip eden 4, 7, 10, 13, 16, 19 ve 21. günlerde tüm ineklerden kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde progesteron tayini double RIA yöntemi ile yapıldı. İneklerin gebelikleri, 45. günde yapılan ultrasonografik muayene ile belirlendi.

Kırkbeşinci günde yapılan ultrasonografik muayenede, uygulama grubundan 7, kontrol grubundan 1 hayvanın gebe olduğu tespit edildi. Uygulama ve kontrol grubunda bulunan hayvanların progesteron değerlerinin karşılaştırılmasında, 13. gündeki farkın önemli olduğu (p<0.05), yine her iki grupta gebe kalmayan hayvanların 19. gün progesteron değerleri arasında (p<0.05) ve ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında önemli (p<0.05) farklılıklar tespit edildi.

Sonuç olarak, tohumlama sonrası 4. günde uygulanan HCG'nin gebelik oranlarını artırdığı, fakat progesteron seviyeleri ve östrüs siklusu süresini etkilemediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: İnek, Fertilite, HCG.

GİRİŞ

İneklerdeki ovulasyonların %88-90'ı fertilizasyonla sonuçlanmasına rağmen, tohumlama sonrası 45-60. günlerde yapılan muayenelerde bunların %55-60'ında gebeliğinin devam ettiği, fertilizasyon oranları ile 45-60. günlerde tespit edilen gebelik oranları arasındaki bu farklılığın, erken embriyonik ölümlerden kaynaklanabileceği bildirilmektedir. Erken embriyonik ölümlerin sebepleri arasında, yüksek çevre ısı, uterus enfeksiyonları, aşırı diyet proteini ve korpus luteumun yetersiz fonksiyonu sayılmaktadır (5, 28).

Özellikle erken embriyonik dönemde (ilk 15 gün) hormonal denge çok önemlidir (5, 16, 28). Bu dönemdeki düşük progesteron konsantrasyonu, tohumlama sonrası 8-16. günler arasında görülen embriyonik ölümlerin önemli sebeplerinden biridir (5). Özellikle korpus luteumun yetersiz fonksiyonunu ortadan kaldırmak, progesteron üretimini ve ilk tohumlamada gebelik oranını artırma amacına yönelik değişik uygulamalar yapılmaktadır. Bunlar arasında tohumlama sonrası progesteron uygulaması (20, 32) ile siklusun değişik zamanlarında GnRH ve HCG uygulamaları yaygın olarak kullanılmaktadır. HCG'nin östrüs günü uygulanması ile ovulasyon üzerine olan etkisinden faydalanılmış (3, 7, 14). luteal dönemde yapılan uygulamalarda ise genellikle bu dönemde mevcut olan dominant folliküllerin luteinizasyonunu sağlayarak, oluşan aksesör korpus luteumların progesteron üretimine katkısı düşünülmüş ve bu uygulamaların döş verimi üzerine olan olumlu etkisinden faydalanılmak istenmiştir (12, 21, 32).

Bazı araştırmacılar (2, 19, 23), yapılan uygulama ile gebelik oranlarının ve progesteron miktarlarının arttığını, bazıları ise (7, 8-11, 18, 21, 29, 32) uygulamaların gebelik oranlarını etkilemediğini fakat progesteron seviyesini artırdığını bildirmektedirler. Progesteron miktarındaki artışa sebep olarak ise, mevcut korpus luteumların hipertrofisi ve dominant folliküllerin luteinizasyonu gösterilmektedir (6, 18, 23, 24, 27, 31).

Siklus süresi ile ilgili olarak bazı araştırmacılar (2, 10, 11, 32). HCG uygulaması ile siklus süresinin uzadığını belirtirlerken, diğerleri (19, 25), siklus süresinin değişmediğini bildirmektedirler.

Bu çalışmada, Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ineklere tohumlama sonrası 4. günde kas içi olarak uygulanan 1500 IU HCG'nin gebe kalma oranlarına, progesteron düzeylerine ve siklus süresine olan etkilerini araştırmak amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, yaşları 6-8 arasında değişen 15 DAK inek kullanıldı. Materyaller Fırat Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinden temin edildi. Hayvanlara rektal muayene yapılarak, uterusun durumu ve ovaryumlar değişik zamanlarda kontrol edildi ve düzenli kızgınlık gösteren hayvanlar çalışmaya dahil edildi. Tüm hayvanlara 11 gün ara ile iki defa 2 ml prostaglandin F₂ alfa (Estrumate, DİF) verilerek östrüsleri sinkronize edildi. Östrüs gösteren hayvanlara sun'i tohumlama uygulandı ve hayvanlar rastgele 9'u uygulama, 6'sı kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tohumlama sonrası 4. günde, uygulama grubu hayvanlara 1500 IU HCG (Pregnyl, ORGANON), kontrol grubuna ise 2 ml serum fizyolojik kas içi olarak enjekte edildi.

Hayvanlardan tohumlama günü başlanmak üzere, tohumlama sonrası 4, 7, 10, 13, 16, 19 ve 21. günlerde kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 2 saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra çizildi ve serum vermesi için beklendi. Çıkan serumlar 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüje edildi. Serum saklama tüplerine aktarıldı ve progesteron analizleri yapılana kadar -20 °C'de derin dondurucuda bekletildi.

Serum progesteron düzeyleri double RIA ile coated tüp metodu kullanılarak tayin edildi (1,13). Progesteron kiti olarak DSL (Diagnostic Systems Laboratories Inc. Ithaca, USA) kullanıldı.

Östrüs siklus sürelerinin tespitinde, Thatcher ve arkadaşlarının (30) belirttiği 1.0 ng/ml'lik progesteron düzeyi temel alınıp, progesteron düzeyi 1.0 ng/ml'nin altına düştüğünde, hayvanların östrüs evresine girdiği kabul edilerek belirlendi.

Hayvanların gebelik durumları, tohumlama sonrası 45. günde ultrasonografik muayene ile tespit edildi.

İstatistiksel karşılaştırmalarda t testi kullanıldı ve IBM bilgisayarda Minitab (17) programında yapıldı.

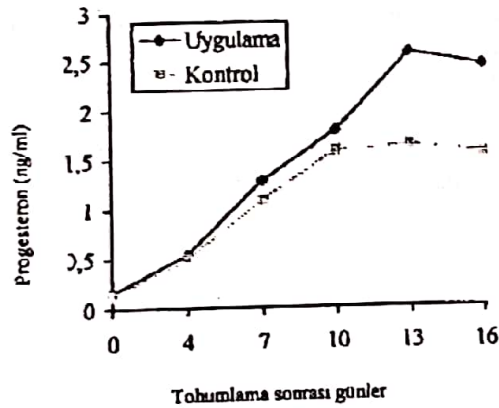
BULGULAR

Çalışmada kullanılan hayvanların, tohumlama sonrası 45. günde yapılan gebelik muayenelerinde, uygulama grubundaki 9 hayvandan yedisinin, kontrol grubundaki altı hayvandan birinin gebe olduğu tespit edildi.

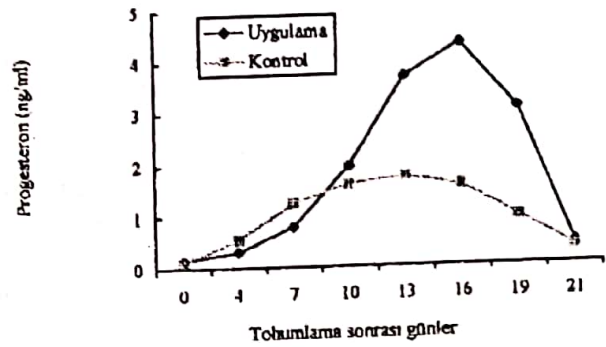
Uygulama ve kontrol grubu hayvanların tohumlama günü (0. gün) ve tohumlama sonrası 4, 7, 10, 13 ve 16. günlerdeki kan serumu progesteron seviyeleri tablo 1'de verildi. Uygulama ve kontrol grubu hayvanların tohumlama sonrası 13. günde progesteron değerleri arasındaki farkın önemli olduğu ($p < 0.05$), her iki grup hayvanların ortalama progesteron değerleri arasında farklılığın olmadığı ($p > 0.05$) tespit edildi (Tablo2, Şekil 1-2).

Tablo 1. Uygulama ve kontrol grubu hayvanların ortalama progesteron (P₄) seviyeleri (ng/ml)

Günler	Uygulama grubu (n=9)	Kontrol Grubu (n=6)	t testi
0.	0.16 ± 0.06	0.13 ± 0.03	
4.	0.54 ± 0.12	0.49 ± 0.14	
7.	1.29 ± 0.25	1.09 ± 0.21	
10.	1.79 ± 0.15	1.59 ± 0.10	
13.	2.58 ± 0.47	1.64 ± 0.16	P<0.05
16.	2.45 ± 0.64	1.56 ± 0.17	
Ortalama	1.46 ± 0.40	1.08 ± 0.26	



Şekil 1. Uygulama ve kontrol grubu hayvanların ortalama progesteron değerlerinin grafiği



Şekil 2: Uygulama ve kontrol grubunda gebe kalmayan hayvanların ortalama progesteron değerlerinin grafiği

Tablo 2: Uygulama ve kontrol grubunda gebe kalmayan hayvanların ortalama progesteron (P₄) seviyeleri (ng/ml)

Günler	Uygulama grubu (n:2)	Kontrol Grubu (n:5)	t testi
0.	0.15 ± 0.05	0.11 ± 0.01	
4.	0.31 ± 0.21	0.54 ± 0.16	
7.	0.79 ± 0.005	1.25 ± 0.16	
10.	1.96 ± 0.29	1.61 ± 0.13	
13.	3.70 ± 1.79	1.74 ± 0.15	
16.	4.33 ± 3.16	1.57 ± 0.21	
19.	3.07 ± 0.24	0.94 ± 0.08	P<0.05
21.	0.40 ± 0.30	0.33 ± 0.09	
Ortalama	1.83 ± 0.59	1.01 ± 0.22	P<0.01

TARTIŞMA VE SONUÇ

İneklerde infertilitenin önemli sebeplerinden biri progesteron yetersizliğine bağlı şekillenerek erken embriyonik ölümlerdir. Erken embriyonik dönemdeki progesteron yetersizliğini ortadan kaldırmaya yönelik yapılan çalışmalarda, bazı araştırmacılar (19, 23, 26), siklusun 7 veya 14. gününde, Price ve Webb (18), siklusun değişik dönemlerinde (östrüs öncesi, erken, orta ve geç luteal dönem), Veenhuizen ve ark. (31), östrüs sonrası ilk haftada, Helmer ve Britt (9), tohumlama sonrası 2, 3 ve 4. günde, Tharnish ve Larson (29), tohumlama sonrası 4. günde, Shipley ve ark. (22), östrüsün gözlenmesinden 48 saat sonra uygulanan HCG'nin progesteron seviyesini artırdığını bildirmektedirler. Siklusun 5. gününde yapılan uygulamalarda da progesteron düzeyinde artma meydana geldiği bildirilmektedir (4, 21, 32). Fricke ve ark. (6), siklusun 6. gününde intravenöz uygulanan 1500 IU HCG'nin, Kot

ve ark. (12) da yine siklusun 6. gününde kas içi uygulanan 1000 IU ve follikül içi uygulanan 100 IU HCG'nin dominant follikülü luteinize ettiğini ve aksesör korpus luteum oluşumuna sebep olduğunu bildirmektedirler. Breuel ve ark. (2), tohumlama sonrası 4 veya 7. günde uygulanan HCG'nin progesteron seviyesini yükselttiğini, 1 veya 10. günde uygulandığında etkisinin olmadığını, Hardin ve Randel (8) ise prostaglandinlerle uyarılan östrüsten 12 saat sonra uygulanan HCG'nin progesteron seviyesini artırdığını bildirmektedirler. Progesteron miktarındaki artışın HCG'nin etkisi ile mevcut korpus luteumun hipertrofisinden ve meydana gelen aksesör korpus luteumların progesteron salgılamasından kaynaklandığı bildirilmekte, buna sebep olarak siklik korpus luteumların daha ağır olması ve oluşan aksesör korpus luteumların fonksiyonel olması gösterilmektedir (6, 12, 18, 23, 24, 27, 31).

Bu çalışmada, her iki gruptaki hayvanların progesteron değerleri incelendiğinde uygulama grubundaki hayvanların progesteron değerlerinin daha yüksek seyrettiği, uygulama grubu hayvanların 13. gün ortalama progesteron değerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu ($p<0.05$) görülmektedir. Fakat, Lukaszewska ve Hansel (15), tohumlama sonrası siklusun ilk 18 günü gebe kalan hayvanlarda progesteron seviyesinin gebe kalmayan hayvanlardan yüksek olduğunu bildirmektedir. On üçüncü günde görülen bu farklılığın sebebi uygulama grubunda gebe kalan inek sayısının fazla olmasından kaynaklanabilir. Bu sebeple, HCG uygulamasının progesteron seviyesine etkisini tespit etmek için, her iki gruptaki gebe kalmayan hayvanların progesteron seviyeleri karşılaştırıldı. Siklusun 19. gününde ve ortalama değerleri arasındaki fark önemli ($p<0.05$) bulundu. Fakat, farkın 19. günde olması uygu-

lama grubundaki hayvanların daha geç folliküler evreye girmesinden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanabilir.

HCG uygulaması ile elde edilen gebelik sonuçları farklılık göstermektedir. Bazı araştırmacılar (2, 8, 19, 26), gebelik oranlarında artma bildirirken, diğer bazıları (9, 21, 29, 32) gebelik oranlarını etkilemediğini, Shipley ve ark. (22) ise östrüsün gözlenmesinden 48 saat sonra HCG uygulanan ineklerde gebelik oranının daha düşük olduğunu bildirmektedirler. Yapılan çalışmada, uygulama grubundaki 9 hayvandan 7'si gebe kalırken, kontrol grubundaki 6 hayvandan sadece birinin gebe kaldığı tespit edildi ve bu durum gebelik oranlarını artırdığı şeklinde yorumlandı.

Bazı araştırmacılar (2, 10, 11, 32) siklusun değişik günlerinde bir veya birkaç HCG enjeksiyonunun siklus süresini uzattığını bildirirken, bazıları ise (19, 25) ise 0, 7 veya 14. gün HCG uygulanan gruplardaki gebe kalmayan ineklerde, korpus luteumların normal östrüs siklusu sonunda regrese olduğunu ve siklus uzunluğuna etkisi olmadığını bildirmektedirler. Sunulan çalışmada, uygulama grubundaki gebe kalmayan 2 hayvanda siklusun 21. gününde progesteron miktarının 1 ng/ml'nin altında olduğu, hayvanların folliküler evreye girdiği ve siklus süresinin etkilenmediği tespit edildi.

Sonuç olarak yapılan çalışmada, DAK ineklere tohumlama sonrası 4. günde uygulanan HCG, gebelik oranlarını artırırken, progesteron seviyesini artırmadaki etkisinin net olmadığı ve siklus süresini etkilemediği tespit edildi. Gebe kalma oranlarına etkisini net tespit edebilmek için, materyal sayısının daha yüksek tutulduğu çalışmaların yararlı olacağı kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Abraham, G.E. The Application of Natural Steroid Radioimmunoassay to Gynecologic Endocrinology. In: "Radioassay System in Clinical Endocrinology", Ed. G.E. Abraham, Marcel Dekker, Basel. Gonadotropin, 1981, 475-529.
2. Breuel, K.F., Spitzer, J.C., Thompson, C.E. and Breuel, F.F. First Service Pregnancy Rate in Beef Heifers as Influenced by Human Chorionic Gonadotropin Administration Before and/or After Breeding. Theriogenology. 1990, 34, 139-145.
3. Çetin, H. ve Apaydın, A.M. İneklerde Tohumlama ile Birlikte HCG (Human Chorionic Gonadotropin) Uygulamasının Kan Progesteron Düzeyine ve Gebe Kalma Oranlarına Etkisi. F.Ü. Sağlık Bil. Derg., 1997, 11, 2, 299-306.
4. Diaz, T., Schmitt, E.J., de la Sota, R.L., Thatcher, M.J. and Thatcher, W.W. Human Chorionic Gonadotropin-induced Alterations in Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle of Heifers. J. Anim. Sci., 1988, 76, 7, 1929-1936.
5. Diskin, M.G. and Sreenan, J.M. Fertilisation and Embryonic Mortality Rates in Beef Heifers After Artificial Insemination. J. Reprod. Fertil., 1980, 59, 463-468.

6. Fricke, P.M., Reynolds, L.P. and Redmer, D.A. Effect of Human Chorionic Gonadotropin Administered Early in the Estrous Cycle on Ovulation and Subsequent Luteal Function in Cows. *J. Anim. Sci.*, 1993, 71, 1242-1246.
7. Hansel, W., Spalding, R.W., Larson, L. L., Laster, D.B., Wagner, J.F. and Braun, R.K. Influence of Human Chorionic Gonadotropin of Pregnancy Rates in Lactating Dairy and Beef Cows. *J. Dairy Sci.*, 1976, 59, 751-754.
8. Hardin, D.R. and Randel, R.D. The Effect of Cloprostenol and Cloprostenol + HCG on Corpora Lutea and Serum Progesterone in Brahman Cows. *Theriogenology*, 1982, 17, 6, 669-675.
9. Helmer, S.D. and Britt, J.H. Fertility of Dairy Cattle Treated with Human Chorionic Gonadotropin (HCG) to Stimulate Progesterone Secretion. *Theriogenology*, 1986, 26, 5, 683-695.
10. Helmer, S.D. and Britt, J.H. Hormone Secretion and Characteristics of Estrous Cycles After Treatment of Heifers with Human Chorionic Gonadotropin or Prostaglandin F 2 alfa During Corpus Luteum Formation. *J. Anim. Sci.*, 1987, 64, 782-789.
11. Holness, D.H., and McCabe, C.T. and Sprowson, G.W. Observations on the Use of Human Chorionic Gonadotropin (HCG) During the Post-Insemination Period on Conception Rates in Synchronized Beef Cows with Suboptimum Reproductive Performance. *Theriogenology*, 1982, 17, 2, 133-140.
12. Kot, K., Gibbons, J.R., and Ginther, O.J. A Technique for Intrafollicular Injection in Cattle. *Theriogenology*, 1995, 44, 41-50.
13. Kubasik, N.P., Hallauer, G.D. and Brodows, R.G. Evaluation of Direct Solid-Phase Radioimmunoassay for Progesterone Useful for Monitoring Luteal Function. *Clinical Chemistry*, 1984, 30,2, 284-286.
14. Leidl, W., Bostedt, H., Lamprecht, W., Prinzen, R. and Wendt, V. Influence of GnRH analogues and HCG on the Time of Ovulation in Artificially Inseminated Cows. *T. Umschau.*, 1979, 34, 8, 546-555.
15. Lukaszewska, J. and Hansel, W. Corpus Luteum Maintenance During Early Pregnancy in the Cow. *J. Reprod. Fertil.*, 1980, 59, 485-493.
16. Maurer, R.R. and Echternkamp, S.E. Hormonal Asynchrony and Embryonic Development. *Theriogenology*, 1982, 17, 1, 11-22.
17. Minitab 11.12 for Windows. 1996, Minitab Inc.
18. Price, C.A. and Webb, R. Ovarian Response to HCG Treatment During the Oestrous Cycle in Heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, 86, 303-308.
19. Rajamahendran, R. and Sianangama, P.C. Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Dominant Follicles in Cows: Formation of Accessory Corpora Lutea. Progesterone and Pregnancy Rates. *J. Reprod. Fertil.*, 1992, 95, 2, 577-584.
20. Robinson, N.A., Leslie, K.E. and Walton, J.S. Effect of Treatment with Progesterone on Pregnancy Rate and Plasma Concentrations of Progesterone in Holstein Cows., 1989, 72, 202-207.
21. Schmitt, E.J., Diaz, T., Barros, C.M., de la Sota, R.L., Drost, M., Fredriksson, E.W., Staples, C.R., Thorner, R. and Thatcher, W.W. Differential Response of the Luteal Phase and Fertility in Cattle Following Ovulation of the First-wave Follicle with Human Chorionic Gonadotropin or an Agonist of Gonadotropin-releasing Hormone. *J. Anim. Sci.*, 1996, 74, 5, 1074-1083.
22. Shipley, S.K., Fuguay, J.W., Smith, A.E. and Stuart, M.J. Response of Dairy Heifers to Prostaglandin F 2 alpha After Treatment with Human Chorionic Gonadotropin. *Theriogenology*, 1988, 29, 743-749.
23. Sianangama, P.C. and Rajamahendran, R. Effect of Human Chorionic Gonadotropin Administered at Specific Times Following Breeding on Milk Progesterone and Pregnancy in Cows. *Theriogenology*, 1992, 38,85-96.
24. Sianangama, P.C. and Rajamahendran, R. Characteristics of Corpus Luteum Formed From the First Wave Dominant Follicle Following HCG in Cattle. *Theriogenology*, 1996, 45, 977-990.
25. Sianangama, P.C. and Rajamahendran, R. Effect of HCG Administration on Day 7 of the Estrous Cycle on Follicular Dynamics and Cycle Length in Cows. *Theriogenology*, 1996, 45, 583-592.
26. Sianangama, P.C., Rajamahendran, R. and Fisher, R.J. Effect of Human Chorionic Gonadotropin (HCG) Administration at Various Times Following Breeding on Progesterone Profiles and Pregnancy Rates in Dairy Cattle. *J. Anim. Sci.*, 1990, 70,1171.
27. Sianangama, P.C., Rajamahendran, R. and Harvey-Clark, C. Are Corpora Lutea Induced by Human Chorionic Gonadotropin HCG) on Day 7 of Bovine Estrous Cycle Functional. *Theriogenology*, 1994, 41, 293.
28. Sreenan, J.M. and Diskin, M.G. Early Embryonic Mortality in the Cow: Its Relationship with Progesterone Concentration. *Vet. Rec.*, 1983, 28, 517-521.

29. Tharnish, T.A. and Larson, L.L. Vitamin A Supplementation of Holsteins at High Concentration: Progesterone and Reproductive Responses. *J. Dairy Sci.*, 1992, 75, 9, 2375-2381.
30. Thatcher, W.W., Terqui, M., Thimonier, J. and Maulcon, P. Effect of Estradiol 17 Beta on Peripheral Plasma Concentration of 15-Keto 13, 14-Dihydro PGF 2 Alpha and Luteolysis in Cystic Cattle. *Prostaglandins*, 1986, 31, 4, 745-756.
31. Veenhuizen, E.L., Wagner, J.F. and Tonkinson, L.U. Corpus Luteum Response to 6-Chloro-17 Aceto Oxyprogesterone and HCG in the Cow. *Biol. Reprod.*, 1972, 6, 270-276.
32. Walton, J.S., Halbert, G.W., Robinson, N.A. and Leslie, K.A. Effect of Progesterone and Human Chorionic Gonadotropin Administration Five Days Postinsemination on Plasma and Milk Concentration of Progesterone and Pregnancy Rates of Normal and Repeat Breeder Dairy Cows. *Canadian J. Vet. Res.*, 1990, 54,3,305-308.