



Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte
KLĪNISKAIS INSTITŪTS

Latvian University of Agriculture
Faculty of Veterinary Medicine
CLINICAL INSTITUTE

Evija Liepiņa

**ĶĒVJU DZEMDES ĢLOTĀDĀS MORFOĻOĢISKAIS UN FUNKCIONĀLAIS STĀVOKLIS PĒC
MĀKSLĪGĀS APSĒKĻOŠANAS ATKARĪBĀ NO DZEMDES KAKLA ATVĒRUMA**

***THE MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATUS OF THE ENDOMETRIUM IN THE
MARES AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION DEPENDING ON THE OPENING OF THE
CERVIX***



Promocijas darba
KOPSAVILKUMS

Dr. med. vet. zinātniskā grāda iegūšanai

Veterinārmedicīnas nozarē
Dzemdniecības un ginekoloģijas apakšnozarē

SUMMARY
of doctoral thesis
for scientific degree Dr.med.vet.

Promocijas darba izstrāde un noformēšana līdzfinansēta no
Eiropas Savienības Sociālā fonda

Jelgava 2011

Promocijas darbs izstrādāts:

LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Klīniskajā institūtā;
Lauksaimniecības un pārtikas zinātnes centrā un Hipoloģijas koledžā, Ypajā, Somijā;
Autonomus Universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Dzīvnieku medicīnas un ķirurģijas departamenta Imunohistoķīmijas laboratorijā Barselonā, Spānijā.

Research has been carried out at the:

Clinical institute of the Faculty of Veterinary Medicine, Latvian University of Agriculture;
MTT Agrifood Research and Equine College, Ypājā, Finland;
The Department of Surgery and Animal Medicine, Autonomus University, Barcelona, Spain.

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med. vet., asociētā profesore

Vita Antāne

Scientific supervisor:

Dr. med. vet., associated professor

Vita Antāne

Zinātniskā konsultante:

DVM., MS, PhD, dzīvnieku reprodukcijas speciāliste, ECAR diplomāte, profesore

Terttu Katila

Scientific consultant:

DVM, MS, PhD, specialist in Animal Reproduction, ECAR diplomate, professor

Terttu Katila

Oficiālie recenzenti:**Official reviewers:**

Dr. med. vet., profesors

Arnis Mugurēvičs

Dr. med. vet., asociētā profesore

Anda Valdovska

Dr. med. vet., LLU BVZI "Sigra" vadošā pētniece

Inese Zītare

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2011. gada 12. septembrī, plkst. 10:00 LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, K. Helmaņa ielā 8, 1. auditorijā.

The defence of the thesis will take place at the Faculty of Veterinary Medicine the Latvian University of Agriculture on 12th September, 2011 at 10:00 o' clock.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielā ielā 2, kā arī interneta vietnē: <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvian University of Agriculture, Lielā iela 2, Jelgava and <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	5
Darba uzdevumi	6
Darba zinātniskā novitāte	6
PĒTĪJUMA REZULTĀTU APROBĀCIJA	7
MATERIĀLS UN METODES	8
Pētījuma vieta, materiāls un laiks	8
Eksperimenta shēma	8
Dzemes gļotādas virsmas mikrobioloģiskā izmeklēšana un neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšana	11
Ķēvju dzemes gļotādas biopsiju paraugu noņemšana un izmeklēšana	12
IL-6 un TNF- α iekaisumu citokīnu noteikšana intrauterīnajā šķidrumā	12
Datu statistiskā apstrāde	12
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	13
Ķēvju dzemes gļotādas bakteriālā mikroflora un neitrofilo leukocītu infiltrācija	13
Dzemes gļotādas histoloģiskā aina pirms un pēc dzemes kakla noslēgšanas	13
Apgaļošanās rezultātu analīze ķēvēm	16
Intrauterīnā šķidruma daudzums un dzemes gļotādas tūska ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas ...	17
Neitrofilie leukocīti intrauterīnajā šķidrumā	23
Iekaisuma marķieru klātbūtne ķēvju intrauterīnajā šķidrumā	25
SECINĀJUMI	26
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES	27
PATEICĪBA	28



CONTENTS

INTRODUCTION	29
Objects of the research	29
Scientific novelty of the research	30
APPROBATION OF RESEARCH RESULTS.....	30
MATERIALS AND METHODS.....	31
Place, material and time of the research.....	31
Schema of the experiment	32
Microbiological examination of the endometrial surface and determination of infiltration of polymorphonuclear leukocytes	34
Sampling and evaluation of endometrial biopsies of mares.....	34
Determination of IL-6 and TNF- α inflammation cytokines in intrauterine fluid.....	35
Data statistical processing	35
RESULTS AND DISCUSSION OF THE STUDY	35
Bacterial microflora of endometrium and infiltration of polymorphonuclear leukocytes	35
Histological status of endometrium before and after occlusion of the cervix.....	36
Analysis of pregnancy rates in mares.....	37
Amount of intrauterine fluid and endometrial oedema in mares after artificial insemination.....	37
Polymorphonuclear leukocytes in intrauterine fluid	39
Presence of inflammatory markers in intrauterine fluid of mares.....	40
CONCLUSIONS	41
SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND ABSTRACTS.....	42
ACKNOWLEDGMENT	43

IEVADS

Endometrīts tiek uzskatīts par vienu no galvenajiem zemas auglības cēloņiem ķēvēm. Normāli ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas vai aplecināšanas izveidojas akūts dzemdes gļotādas iekaisums, kuru raksturo neitrofilo leukocītu infiltrācija dzemdē, kas palielinās apmēram 8 stundu laikā un izzūd 24 stundu laikā (Kotilainen et al., 1994). Ja tas neizzūd, attīstās hronisks pēc-pārošanas dzemdes gļotādas iekaisums. Kā vienu no galvenajiem hroniska pēc-pārošanas gļotādas iekaisuma cēloņiem uzskata pastiprinātu intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos, neitrofilo leukocītu paaugstinātu infiltrāciju pēc spermas ievadīšanas dzemdē, kā arī dzemdes kakla funkciju traucējumus meklēšanās ciklā. Hronisks dzemdes gļotādas iekaisums tiek uzskatīts par vienu no galvenajiem zemas auglības cēloņiem ķēvēm. Ir noskaidrots, ka dzemdes gļotādas iekaisumu arī ierosina mākslīgās apsēklošanas vai lecināšanas laikā ar spermu dzemdē nokļuvušās baktērijas (Troedsson, 1995).

Dzemdes gļotādas funkciju raksturošanai un apaugļošanās rādītāju izvērtēšanai Kenney un Doig (1986) ir ieviesis gļotādas histoloģisko paraugu klasifikāciju. Autori (Kenney et al., 1986) īpašu vērību pievērš periglandulārās fibrozes attīstībai ķēvēm. Arī Oddsdotir et al. (2008) savā pētījumā atzīmējusi, ka neauglības cēlonis ķēvēm ir periglandulārā fibroze, tā samazina dzemdes aizsargmehānismus. Periglandulārās fibrozes izteiktības pakāpe ir tieši saistīta ar dzemdes spējam iznēsāt augli līdz grūsnības beigām. Ja dažāda smaguma pakāpes periglandulārā fibroze skar lielu dzemdes gļotādas dziedzeru daudzumu, tad pozitīvs grūsnības iznākums samazinās līdz minimālam un bieži novēro abortu, parasti līdz 90. grūsnības dienai.

Intrauterīnais šķidrums, kas veidojas akūta dzemdes gļotādas iekaisuma gadījumā, tiek izvadīts divos veidos – pa dzemdes limfvadiem vai caur dzemdes kaklu. Neatkarīgi no izvadīšanas veida svarīga loma ir dzemdes muskulatūras kontrakcijām. Samazināta dzemdes muskulatūras aktivitāte vai dzemdes noliekšanās ventrāli attiecībā pret kaunuma kaula pamatni var būt par dzemdes šķidruma uzkrāšanās iemeslu dzemdes ķermenī ķēvēm (LeBlanc et al., 1998). Ir pierādīts, ka ķēvēm, ar noslieci dzemdes gļotādas iekaisuma izveidošanos ir pavājinātas dzemdes muskulatūras kontrakcijas (Troedsson et al., 1993).

Ķēvēm, kurām ir samazināta dzemdes rezistence pret infekciju un tajā pat laikā, ir traucēta iekaisumu eksudāta izvadīšana caur dzemdes kaklu, novēro apaugļošanās traucējumus vai embriju agro nāvi. Traucēta dzemdes šķidruma notece biežāk ir novērojama vecām, vairāk dzemdējušām ķēvēm (LeBlanc et al., 1998).

Līdz šim ir maz pētīta dzemdes kakla nozīme eksudāta izvades procesā no dzemdes. Lai veicinātu eksudāta evakuāciju no dzemdes, agrākos pētījumos pielietoja manuālu dzemdes kakla dilatāciju vai arī medikamentu oksitocīns (Pycocock et al., 1996). Literatūrā neatrodam nevienu kontrolētu (tiešu) pētījumu par dzemdes kakla atvēruma nozīmi dzemdes gļotādas iekaisuma etioloģijā ķēvēm, tāpēc mūsu darba **mērķis** bija noskaidrot dzemdes gļotādas morfoloģisko un funkcionālo stāvokli ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas saistībā ar dzemdes kakla atvērumu.

Darba uzdevumi

1. Noteikt dzemdes gļotādas histoloģiskās ainas izmaiņas pirms un pēc dzemdes kakla noslēgšanas ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas.
2. Noskaidrot dzemdes bakteriālo mikrofloru pirms un pēc dzemdes kakla noslēgšanas.
3. Izpētīt dzemdes gļotādas tūskas un intrauterīnā šķidruma akumulācijas intensitātes izmaiņas ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas saistībā ar dzemdes kakla atvērumu.
4. Izvērtēt neitrofilo leikocītu daudzumu un iekaisuma citokīnu IL – 6 un TNF – α intensitāti intrauterīnajā šķidrumā ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas saistībā ar dzemdes kakla atvērumu.

Darba zinātniskā novitāte

Pirmo reizi veikts kontrolēts pētījums par dzemdes kakla atvēruma nozīmi ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas un tā ietekmi uz dzemdes gļotādas morfoloģisko un funkcionālo stāvokli.

PĒTĪJUMA REZULTĀTU APROBĀCIJA

Pētījuma rezultāti aprobēti šādās zinātniskās konferencēs

1. Liepiņa E., Antāne V., Rivera del Alamo M.M. (2010) Intrauterine fluid secretion in mares after artificial insemination. *Proceedings of the 16th International Scientific Conference „Research For Rural Development 2010”*. Jelgava, 19-21, pp. 12 – 16.
2. Liepina E., Alamo del. M.M., Reilas T., Katila T. (2010) IL-6 and TNF- α expression in uterine fluids of mares with induced delay in uterine clearance. *Proceeding of the 10th International Symposium on Equine Reproduction. Animal Reproduction Science. (Vol. 121)*, Kentucky, USA, pp. 107 – 109.
3. Liepina E., Antane V. (2010) Endometrial histological changes and pregnancy rates in mares with impaired uterine drainage. *Proceedings of the 29th International Scientific Conference Animals. Health. Food Higiene*. Jelgava, pp. 73 – 78.
4. Reine E., Reilas T., Rivera del Alamo M.M., Katila T. (2008) Effect of impaired uterine drainage via cervix in normal mares after insemination. *16th International Congress on Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 43, Suppl 3)*, Budapest, Hungary. pp. 112.
5. Katila T., Reine E., Reilas T. (2008) Functioning cervical drainage is important for uterine clearance of mares after insemination. *12th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 43, Suppl 5)*, Utrecht The Netherlands. pp 106 - 107.
6. Rivera del Alamo M.M., Reine E., Reilas T., Rodriquez - Gil J.E., Fernandez - Novell J.M, Ballester J., Katila T. (2009) Interleukin-1 beta, Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor - alpha expression on equine endometrium determined by immunohistochemistry. *13th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 44, Supl 3)*, Ghent, Belgium. pp. 12.

Promocijas darbs noformēts uz 93 lappusēm un sastāv no anotācijas, ievada, literatūras apskata, darba metodikas, pētījumu rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, izmantotās literatūras saraksta un pielikumiem.

MATERIĀLS UN METODEDES

Pētījuma vieta, materiāls un laiks

Promocijas darbam izmantotas 24 klīniski veselas, nelaktējošas, nedzemdējušas ķēves: 20 Somijas vieglā tipa šķirnes ķēves un 4 dažādu šķirņu ķēves, vecumā no 3 – 17 gadiem, kas pieder Lauksaimniecības un pārtikas zinātnes centram un Hipoloģijas koledžai, Ypaja, Somijā.

Pētījums veikts Lauksaimniecības un pārtikas zinātnes centrā un Hipoloģijas koledžā, Ypajā, Somijā.

Ķēvju dzemdes gļotādas virsmas mikrobiālā piesārņojuma un neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšanu veicām Lauksaimniecības un pārtikas zinātnes centra laboratorijā, Ypajā, Somijā.

Dzemdes gļotādas biopsijas paraugus histoloģiskajai izmeklēšanai sagatavojām Helsinku Universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Patoloģijas katedras imunohistoķīmijas laboratorijā, Somijā.

Dzemdes gļotādas histoloģisko paraugu pārskata ainas novērtēšanu veicām Helsinku Universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Produktīvo dzīvnieku medicīnas departamentā, Saari Unit, Somijā.

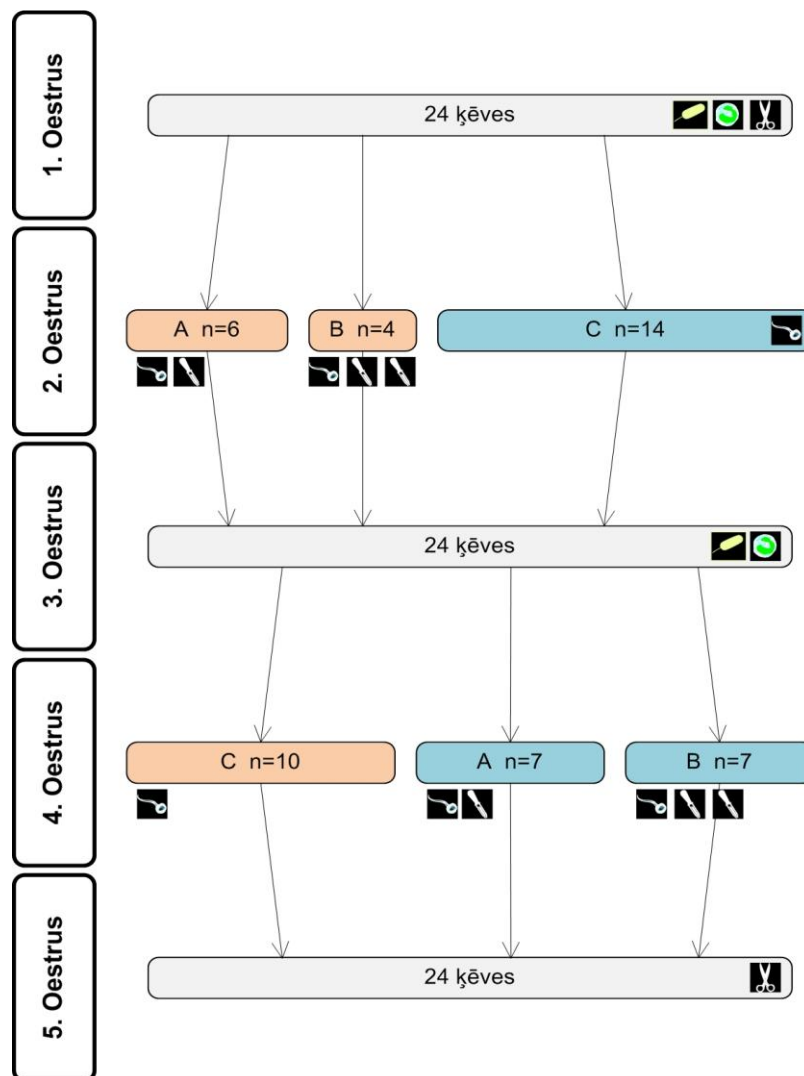
Interleikīna-6 un audzēja nekrozes faktora α iekaisuma marķieru klātbūtni ķēvju intrauterīnajā šķidrumā noteicām Autonomous Universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Dzīvnieku medicīnas un ķirurģijas departamenta Imunohistoķīmijas laboratorijā, Barselonā, Spānijā.

Eksperimenta shēma

Eksperiments veikts piecos meklēšanās periodos. Lai panāktu ķēvju vienlaicīgu meklēšanos, veicām tās sinhronizāciju ar prostaglandīna $F_{2\alpha}$ sintētisko preparātu kloprostenolu devā 0.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intramuskulāras injekcijas veidā.

Kopējā eksperimenta shēma un dzīvnieku skaits grupās attēlots 1. attēlā.

Visa kopējā eksperimenta shēma bija veidota tā, lai katra ķēve būtu pati sev kā kontrole otrajā vai ceturtajā *oestrus* (meklēšanās periodā).



1.att. Eksperimenta kopējā shēma
Fig. 1 Experimental combined schema

- Eksperimenta A un B grupas ķēves (n=10), kurām dzemdes kakls otrajā oestrus bija noslēgts, bet ceturtajā oestrus šīs pašas ķēves kalpoja kā kontroles grupa
- Eksperimenta A un B grupas ķēves (n=14), kurām dzemdes kakls ceturtajā oestrus bija noslēgts, bet otrajā oestrus šīs pašas ķēves kalpoja kā kontroles grupa/ *Experiment A and B group mares (n=14) , the cervix was closed in fourth oestrus , but in second oestrus these marles where control group.*

A – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 25 stundām pēc mākslīgās apsēklošanas/ *intrauterine catheter closed for 25 h after artificial insemination*; **B** – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 6 stundām, iegūts šķidrums un katetrs aizvērts uz 19 stundām (kopā 25 stundas pēc mākslīgās apsēklošanas)/ *intrauterine catheter opened at 6h, intrauterine fluid drained, catheter closed and opened again after 19 h (together 25 h after artificial insemination)*. **C** - kontroles grupa/ *control group*.

- dzemdes gļotādas virsmas mikrobiālā piesārņojuma izmeklēšana/ *endometrial microbiology*;
- neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšana dzemdes gļotādā/ *determination of neutrophile leycocyte infiltration in the endometrium* ;
- dzemdes gļotādas histoloģiskā parauga iegūšana/ *endometrial biopsy*;
- mākslīgā apsēklošana/ *artificial insemination*;
- intrauterīnā katetra ievietošana un intrauterīnā šķidruma iegūšana atkarībā no eksperimenta grupas/ *insertion of intrauterine catheter and intrauterine fluid* .

Pirmais oestrus. Ķēvju meklēšanos noteicām vizuāli, kā arī veicām ķēvju rektālo un ultrasonogrāfisko izmeklēšanu līdz brīdim, kad konstatējām ovulāciju. Visām 24 eksperimenta

ķēvēm noņēmām no dzemdes gļotādas virsmas paraugus bakteriālās mikrofloras un neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšanai. Tajā pat laikā veicām dzemdes gļotādas biopsiju dzemdes gļotādas histoloģiskās ainas raksturošanai. Pēc 6 – 14 dienām veicām atkārtotu ķēvju meklēšanas sinhronizāciju.

Otrais oestrus. Ķēvju meklēšanās laikā veicām dzimumorgānu izmeklēšanu rektāli un ar ultrasonogrāfu, kur noteicām dzemdes un olnīcu stāvokli, folikulu skaitu un lielumu, dzelteno ķermeņu skaitu un lielumu, dzemdes gļotādas tūskas lielumu, lai noteiktu optimālo mākslīgās apsēklošanas laiku. Laikā, kad ķēvēm rektāli konstatējām *oestrus* pazīmes: mīksts, plats dzemdes kakls ar grūti sataustāmām robežām, liela, mīksta dzemde ar grūti sataustāmām robežām, 1 – 2 mīksti preovulatorie folikuli, kā arī ultrasonogrāfiski konstatējām dzemdes gļotādas tūsķu un folikulus ≥ 35 mm diametrā, veicām mākslīgo apsēklošanu, izmantojot svaigi atdzēsētu ērzeļu spermū. Svaigi iegūtas spermas atšķaidīšanai izmantojām Kenney spermas atšķaidītāju, iegūstot apsēklošanas devu 500×10^6 progresīvi kustīgus spermatozoīdus. Ovulācijas veicināšanai ķēvēm nekavējoties pēc mākslīgās apsēklošanas intravenozi injicējām 1500 internacionālās vienības (IU) cilvēka horiagonadotropīnu (hCG). Ovulācijas iestāšanos kontrolējām ar rektālo palpāciju un ultrasonogrāfiju, kuru veicām ik pārdienas līdz ovulācijai.

Ķēves pēc nejaušības principa sadalījām trīs eksperimenta A, B un C grupās. **Eksperimenta grupas A un B ķēvēm** pēc mākslīgās apsēklošanas veicām mākslīgu dzemdes kakla noslēgšanu, dzemdē ievieojot 63 cm garu, sterilu Bivona katetru. Katetra galā atradās balons, kuru piepildījām ar 80 ml gaisa, tādā veidā nodrošinot katetra atrašanos dzemdē un nosprostojojot dzemdes šķidruma izdalīšanos caur dzemdes kaklu. Ķēves pēc mākslīgās apsēklošanas un eksperimentālas dzemdes kakla noslēgšanas turējām boksos 25 stundas bez pastaigām.

Eksperimenta A grupas ķēvēm noslēgtu intrauterīno katetru atstājām uz 25 stundām, tad to atvērām, intrauterīno šķidrumu izvadījām sterilā Falkona cilindrā. **Eksperimenta B grupas ķēvēm** intrauterīno katetru atvērām pēc 6 stundām, izvadījām intrauterīno šķidrumu un katetru aizvērām uz 19 stundām, pēc kurām atkal izvadījām intrauterīno šķidrumu.

Izmantojot jau iepriekš ievadītos Bivona katetrus, eksperimenta A un B grupu ķēvēm veicām dzemdes dobuma skalošanas procedūru (irigāciju), dzemdē ievadot 500 ml Ringera šķidrumu. Pēc 2 minūtēm šķidrumu izvadījām no dzemdes un uzkrājām speciālā maisiņā. Lai pēc iespējas izvadītu visu iepriekš ievadīto šķidrumu no dzemdes, ķēvēm intravenozi (i.v) ievadījām 10 IU (internacionālās vienības) oksitocīna. Pēc dzemdes irigācijas intrauterīno katetru izņēmām.

Eksperimenta C grupas ķēvēm, kas kalpoja kā kontrole, intrauterīnais šķidrumš varēja brīvi izplūst caur dzemdes kaklu. Divdesmit piecas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas dzemdes dobumā ievieojām sterilu normāla izmēra tamponu. Pēc 20 minūtēm caur sterilu dzemdes kakla spoguļi tamponu aiz aukliņas izņēmām no dzemdes. Tamponā sasūkušos intrauterīno šķidrumu izspiedām Falkona cilindrā, izmantojot sterilu ķiploku spiedi. Eksperimenta C grupas ķēvēm pēc tampona izņemšanas dzemdē ievieojām Bivona katetru, caur kuru dzemdē ievadījām 500 ml Ringera šķidrumu, un turpmākās manipulācijas veicām tāpat kā eksperimenta A un B grupas ķēvēm.

Iegūtajā intrauterīnajā šķidrumā eksperimenta grupu A, B un C ķēvēm noteicām **neitrofilo leukocītu koncentrāciju**, kur 25 μ l intrauterīnā šķidruma atšķaidījām ar 475 μ l 2% metilēnvioleto etiķskābi. Iegūto maisījumu ar mikropipeti ievieojām Bürker kamerā, neitrofilo leukocītu skaitīšanai gaismas mikroskopā 20 un 40 x palielinājumā.

Mākslīgās apsēklošanas laikā (0 stunda), kā arī 6, 25, 48 stundas pēc mākslīgās apsēklošanas un pēc ovulācijas noteicām arī **dzemdes gļotādas tūsķu**, izmantojot dzemdes ultrasonogrāfisko (Sono Site Vet 180 plus ar 5-MHz transrektālo zondi) izmeklēšanu. Dzemdes gļotādas tūskas izteiktību atzīmējām ballēs no 0 – 5, kā aprakstījis Ginther un Pierson (1994).

Tajā pat laikā ar ultrasonogrāfiju noteicām **intrauterīnā šķidruma daudzumu** izteiktu laukuma vienībās (mm²), izmērot tā garumu (mm) un platumu (mm).

Sešpadsmitajā dienā pēc ovulācijas veicām **grūsnības diagnostiku** ar dzemdes manuālo palpāciju un ultrasonogrāfu. Grūsnajām ķēvēm izraisījām abortu, pielietojot vienreizēju intramuskulāru kloprostenola injekciju. Pēc kloprostenola injekcijas 4. – 6. dienā ķēves izrādīja meklēšanās pazīmes. Arī negrūsnām ķēvēm veicām meklēšanās sinhronizāciju.

Trešais oestrus. Visu eksperimenta grupu ķēvēm, tāpat kā pirmajā *oestrus*, ieguvām paraugus dzemdes gļotādas virsmas bakteriālās mikrofloras un neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšanai. Ķēvju rektālo un ultrasonogrāfisko izmeklēšanu veicām, līdz konstatējam ovulāciju. Turpinājumā pēc 6 – 14 dienām veicām ķēvju meklēšanās sinhronizāciju, pielietojot sintētiskā prostaglandīna F_{2α} preparātu kloprostenolu. Pēc 4 – 6 dienām ķēves sāka meklēties.

Ceturtais oestrus. Eksperimenta shēma pēc veikto manipulāciju secības ir līdzīga kā otrajā *oestrus* periodā, bet atšķirība ir tā, ka ceturtajā oestrus periodā Bivona katetru ievadījām un dzemdes kaklu noslēdzām tām 14 ķēvēm, kuras otrajā *oestrus* periodā bija kontroles grupa C. Savukārt tās 10 ķēves, kurām otrajā *oestrus* periodā bija noslēgts dzemdes kaklu, ceturtajā *oestrus* periodā bija kā kontroles grupa C.

Piektais oestrus. Visām ķēvēm veicām dzemdes gļotādas biopsiju dzemdes gļotādas histoloģiskās ainas raksturošanai pēc eksperimenta.

Dzemdes gļotādas virsmas mikrobioloģiskā izmeklēšana un neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšana

Paraugi no ķēvju dzemdes gļotādas virsmas mikrobioloģiskai izmeklēšanai un neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšanai ņemti ar sterilu vienreizējās lietošanas instrumentu, kura vates tampons atradās kontaktā ar dzemdes gļotādas virsmu vismaz 20 sekundes.

Grampozitīvo mikroorganismu *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.* noteikšanai paraugi uzsēti uz gaļas peptona asins agara, kuru sastāvā ir 5% aitas asiņu. *E. coli* precīzai diferencēšanai izmantojam Endoagaru un MacConkey agaru, Streptokoku ģints baktēriju diferencēšanai izmantojam seroloģiskos testus. Savukārt Stafilokoku ģints baktēriju diferencēšanai izmantojam mannitola sāls agaru. Paraugus inkubējam termostatā +37 °C temperatūrā 24 stundas. Pēc 24 stundu inkubācijas veicām dzemdes gļotādas bakterioloģiskās mikrofloras puskvantitatīvu vērtēšanu pēc Mackintosch (1981), kurā atbilstoši koloniju skaitam uz asins agara virsmas tiek pretstatīts noteikts vērtējums ballēs.

Dzemdes gļotādas virsmas mikrobioloģiskai izmeklēšanai paredzētos paraugus izmantojam arī neitrofilo leukocītu infiltrācijas noteikšanai. Pagatavojām uztriepes uz priekšmetstikliņa, ko žāvējam, fiksējam metanolā un krāsojam pēc May-Grünwald-Giemsa metodes (Jain, 1986). Neitrofilo leukocītu infiltrāciju dzemdes gļotādā vērtējam gaismas mikroskopā (400 x palielinājumā) 10 redzes laukos (Brook, 1993). Iegūtos rezultātus vērtējam ar puskvantitatīvo metodi ballēs pēc Brook (1993) izstrādātas skalas.

Ķēvju dzemdes gļotādas biopsiju paraugu noņemšana un izmeklēšana

Dzemdes gļotādas biopsiju paraugus noņēmām pirmajā un piektajā *oestrus* periodā ar mērķi noskaidrot ķēvju dzemdes gļotādas stāvokli pirms un pēc dzemdes kakla noslēgšanas. Dzemdes gļotādas biopsijas paraugus ieguvām no dzemdes ventrālās sienas pie labā vai kreisā dzemdes raga pamatnes. Dzemdes gļotādas histoloģiskā parauga mikroskopisko novērtēšanu veicām gaismas mikroskopā 100, 200 un 400 reižu palielinājumā, kur noteicām limfocītu infiltrācijas, periglandulārās fibrozes, dziedzeru cistveida dilatācijas pakāpi un limfātisko lakūnu daudzumu. Gļotādas histoloģiskās ainas izvērtēšanu veicām ballēs no 0 līdz 5.

IL-6 un TNF- α iekaisumu citokīnu noteikšana intrauterīnajā šķidrumā

Intrauterīno šķidrumu paraugus, kuri iegūti no eksperimenta A, B un C grupas ķēvēm, izmantojām IL-6 un TNF- α noteikšanai ar Westerna Blota metodi (Burnette, 1981). Pavisam izmantoti 12 paraugi: 4 paraugi no eksperimenta A grupas ķēvēm, 2 paraugi no eksperimenta B grupas ķēvēm un 6 paraugi no eksperimenta C jeb kontroles grupas ķēvēm otrajā un ceturtajā *oestrus* periodā. Proteīnu koncentrāciju intrauterīnajā šķidrumā noteicām ar Bradforda (Bradford, 1976) tehniku. Turpinājumā veicām proteīnu atdalīšanu ar SDS – PAGE un pārnesām tos uz nitrocelulozes membrānas, kā aprakstījis Sirois and Dore (1997). Membrānas aprobējām ar specifisku imūno serumu pret IL-6 un TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Interleikīna -6 un TNF- α klātbūtnes noteikšanai izmantojām anti-kazas poliklonālās antivielas, pēc kurām pielietojām ECL Plus Westerna Blotta konstatēšanas reaģentus.

Datu statistiskā apstrāde

Datu statistiskajā apstrādē lietojām Excel 2003 un SPSS 11.5 programmu ar varbūtību 95% jeb, ar būtiskuma līmeni $P < 0.05$. Iegūtajiem datiem aprēķināti vidējie rādītāji un standartklūda (SEM).

Neitrofilo leukocītu koncentrācijas, intrauterīnā šķidruma un dzemdes gļotādas tūskas salīdzināšanai izmantojām Vilksoksona testu divu saistītu paraugkopu analīzei. Savukārt, lai salīdzinātu izmeklējumu rezultātus starp dažādu grupu ķēvēm, lietojām Mann-Vitnija testu divu nesaistītu paraugkopu salīdzināšanai (Arhipova, Bāliņa, 2003).

Dzemdes gļotādas histoloģisko izmeklējumu savstarpējo sakarību un to statistiskā būtiskuma noteikšanai izmantojām Spīrmana korelācijas analīzi (Paura, Arhipova, 2002; Arhipova, Bāliņa, 2003).

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Ķēvju dzemdes gļotādas bakteriālā mikroflora un neitrofilo leukocītu infiltrācija

Paraugi no ķēvju dzemdes gļotādas bakteriālās mikrofloras un neitrofilo leukocītu daudzuma noteikšanai, iegūti pirmajā un trešajā *oestrus* periodā. Literatūrā (Nielsen et al., 2005) tiek uzsvērts, ka *Streptococcus spp.* un *Escherichia coli* ir biežākie cēloņi, kas izraisa dzemdes gļotādas iekaisumu ķēvēm, tādēļ arī mūsu pētījumā dzemdes gļotādas mikrofloras noteikšanā uzmanību pievēršam tieši šiem mikroorganismiem. Rezultātā no 48 bakterioloģiski izmeklētajiem paraugiem nevienai no eksperimentā iesaistītajām ķēvēm dzemdes gļotādā minētos mikroorganismus neatradām, bet divām ķēvēm (Oliivia un Yrri) dzemdes gļotādas virsmas paraugos konstatējām *Staphylococcus spp.* mikroorganismu klātbūtni. LeBlanc (2009) uzsver, ka *Staphylococcus spp.*, kas izolēti no dzemdes gļotādas, ir subklīniska dzemdes gļotādas iekaisuma cēlonis. Savukārt Albihn et al., (2003) uzskata, ka gadījumi, kad ķēvēm konstatē dzemdes gļotādas bakteriālo mikrofloru un tajā pat laikā neitrofilo leukocītu infiltrāciju dzemdes gļotādā neatrod, ir saistīti ar parauga kontamināciju tā sagatavošanas laikā. Jāatzīmē, ka divām ķēvēm (Oliivia un Pika) vienlaicīgi dzemdes gļotādas virsmas paraugos konstatējām gan neitrofilo leukocītu infiltrāciju dzemdes gļotādā, gan *Staphylococcus spp.* Riddle et al., (2007) atzīmē, ka ķēvēm, kurām izolēti mikroorganismi no dzemdes, kā arī vienlaicīgi konstatēta neitrofilo leukocītu infiltrācija dzemdes gļotādā, novēro bakteriālas izcelsmes dzemdes gļotādas iekaisumu.

Joprojām ir aktuāls jautājums vai neitrofilo leukocītu klātbūtne dzemdes gļotādā bez dzemdes bakteriālās mikrofloras ir uzskatāma par predispozīciju dzemdes gļotādas iekaisumam (LeBlanc, 2009). Nielsen et al., (2008) apgalvo, ka ķēves, kurām identificē neitrofilo leukocītu infiltrāciju dzemdes gļotādā, bet mikrobiālā piesārņojuma rezultāti ir negatīvi, ir uzskatāmas par dzemdes gļotādas iekaisumam predisponētām ķēvēm.

Neskatoties uz to, ka dažādu autoru uzskati ir pretrunīgi, mēs uzskatām, ka *Staphylococcus spp.* izolēšana no dzemdes gļotādas vienai ķēvei norāda uz paraugu kontamināciju to sagatavošanas laikā, bet ķēvei, kurai izolējām gan *Stafilococcus spp.*, gan neitrofilos leukocītus, neizslēdzam subklīniska dzemdes gļotādas iekaisuma iespējamību.

Dzemdes gļotādas histoloģiskā aina pirms un pēc dzemdes kakla noslēgšanas

Turpinot izvērtēt dzemdes veselības stāvokli, veicām ķēvju dzemdes gļotādas histoloģiskās ainas novērtēšanu pirmajā *oestrus* periodā, t.i., pirms dzemdes kakla noslēgšanas, kā arī piektajā *oestrus* periodā, laikā, kad eksperiments tika pabeigts.

Lielākai daļai ķēvju pirms (14 ķēves) un pēc (12 ķēves) eksperimenta novērojām maz izteiktas līdz mērenas dzemdes gļotādas pārmaiņas, kuras pēc Kenney un Doig (1986) atbilda kategorijai IIA, kas raksturojas ar nelielu limfocītu infiltrāciju *stratum compactum* un maz izteiktu atsevišķu dzemdes gļotādas dziedzeru periglandulāro fibrozi.

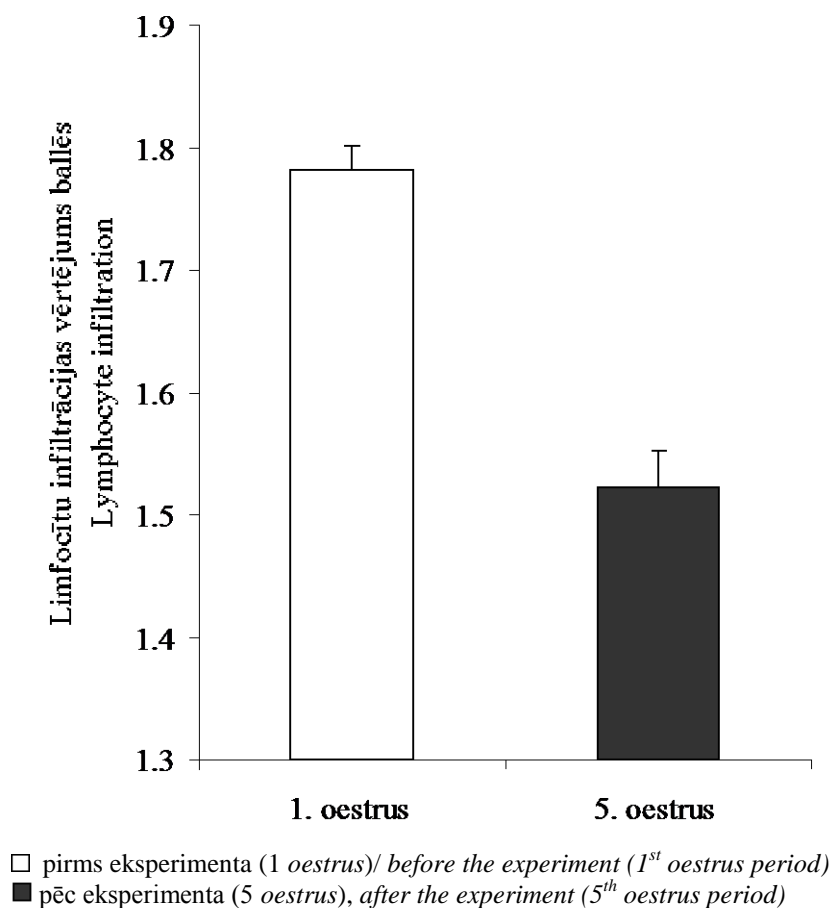
Mūsu pētījumā limfātisko lakūnu daudzums un plašums dzemdes gļotādas histoloģiskajā ainā samazinājās piektajā *oestrus* periodā, salīdzinot ar pirmo *oestrus* periodu, kā arī nenovērojām statistiski būtisku korelāciju starp limfātisko lakūnu kategorijām ķēvju dzemdes gļotādā pirms un pēc eksperimenta ($r = 0.13$, $P = 0.5$). Kenney et al., (1978) atzīmē, ka limfātiskās lakūnas biežāk novēro vecām, daudz dzemdējušām ķēvēm, kā arī ķēvēm, kam samazinātas dzemdes muskulatūras kontrakcijas un traucēta intrauterīnā šķidrums evakuācija no dzemdes. Savukārt Bergman et al., (1975) uzsver, ka limfātisko lakūnu esamība ķēvju dzemdes gļotādas histoloģiskajos paraugos ir

saistīta ar biopsiju parauga ķirurģisko iegūšanas veidu un, kā secina pētījumi (Oddsdottir et al., 2008), to loma iekaisuma etioloģijā nav zināma.

Turpinot dzemdes gļotādas biopsiju analīzi konstatējām, ka dziedzeru cistvstveida dilatācijai bija tendence palielināties pēc eksperimenta (piektais *oestrus*) salīdzinot ar pirms eksperimenta periodu (pirmais *oestrus*), bet šī paaugstināšanās nebija statistiski būtiska ($p > 0.05$). Kenney (1978) arī atzīmē, ka dzemdes dziedzeru cistveida dilatācija ir bieži novērojama ķēvēm, jo īpaši vecām ķēvēm. Savukārt Ricketts et al., (1975) uzsver, ka konkrēts iemesls dzemdes dziedzeru cistveida dilatācijas attīstībai ķēvei nav zināms, un uzstāda hipotēzi, ka viens no iemesliem varētu būt dzemdes gļotādas periglandulārā fibroze.

Dzemdes gļotādas histoloģiskajā ainā atsevišķi izvērtējām iekaisuma šūnu infiltrācijas un periglandulārās fibrozes izteiktību.

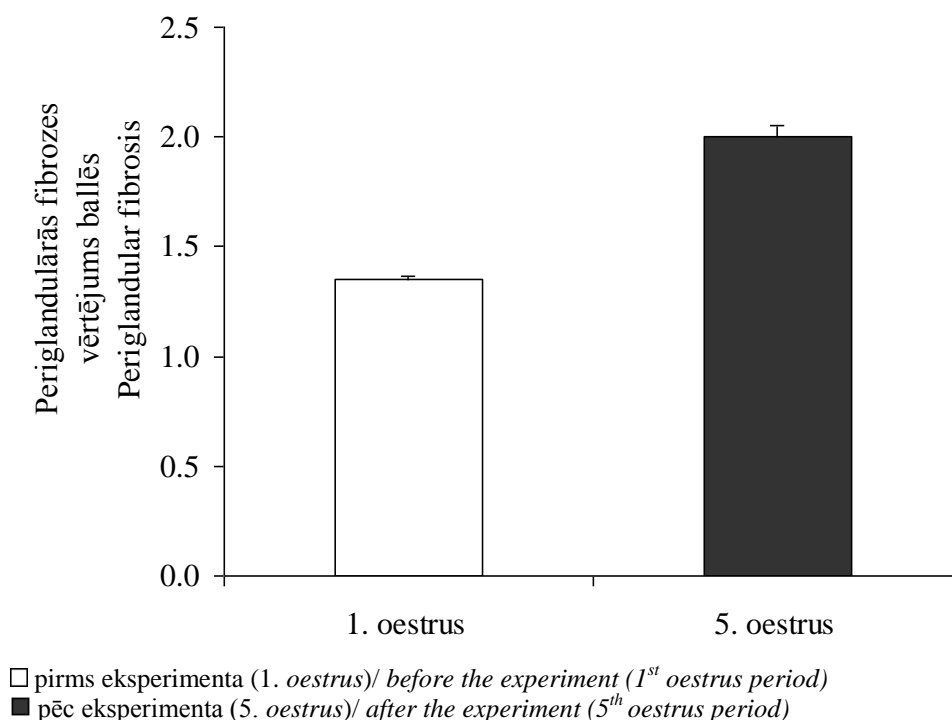
Difūzu limfocītu infiltrāciju novērojām gan *stratum compactum*, gan *stratum spongiosum* slānī. Limfocītu infiltrācijas intensitāte ķēvju dzemdes gļotādas histoloģiskajā ainā pirms eksperimenta atbilda 1.8 ± 0.2 , bet pēc eksperimenta 1.52 ± 0.03 ballēm (2. att). Nosakot rezultātu būtiskuma līmeni ar Mann – Vitnija testu, atšķirības nebija būtiskas ($p > 0.05$), kā arī novērojām statistiski nebūtisku vidēju korelāciju starp limfocītu infiltrācijas intensitāti ballēs ķēvju dzemdes gļotādā pirms un pēc eksperimenta ($r = 0.42$, $P = 0.11$). Limfocītu infiltrācijas intensitātes samazināšanos pēc eksperimenta varētu izskaidrot ar prostaglandīna injekciju pielietošanu meklēšanās sinhronizācijā, kā arī ar dzemdes skalošanu ar fizioloģisko 0.9% sāls šķīdumu. Jāatzīmē, ka limfocītu infiltrācija dzemdes gļotādas histoloģiskajā ainā ir uzskatāma par hroniska dzemdes gļotādas iekaisuma rādītāju ķēvēm (Kenney, 1978). Savukārt Oddsdottir et al., (2008b) uzskata, ka limfocītu infiltrācija dzemdes gļotādā parādās 20 stundas pēc spermas vai *Streptococcus zooepidemicus* iekļūšanas dzemdē.



2. att. Limfocītu infiltrācija dzemdes gļotādā ķēvēm vērtēta ballēs.

Fig. 2 Lymphocyte infiltration in mares endometrial biopsies scored from 0 to 5 (mean ± SEM).

Lielu uzmanību mūsu pētījumos pievēršām dzemdes gļotādas dziedzeru periglandulārajai fibrozei, kas, kā atzīmē literatūrā (Ellensberger et al., 2008) ir viens no galvenajiem neauglības un agrās embriju nāves cēloņiem ķēvēm. Mūsu pētījumā dzemdes gļotādas dziedzeru periglandulārā fibroze ķēvju dzemdes gļotādā pirms dzemdes kakla noslēgšanas atbilda 1.35 ± 0.02 , bet pēc eksperimenta 2 ± 0.05 ballēm (3. att). Starp periglandulārās fibrozes vērtējumu ballēs ķēvju dzemdes gļotādā pirms un pēc eksperimenta novērojām statistiski būtisku atšķirību ($p < 0.05$), kā arī vāju, bet statistiski būtisku korelāciju ($r = 0.24$, $p = 0.01$).



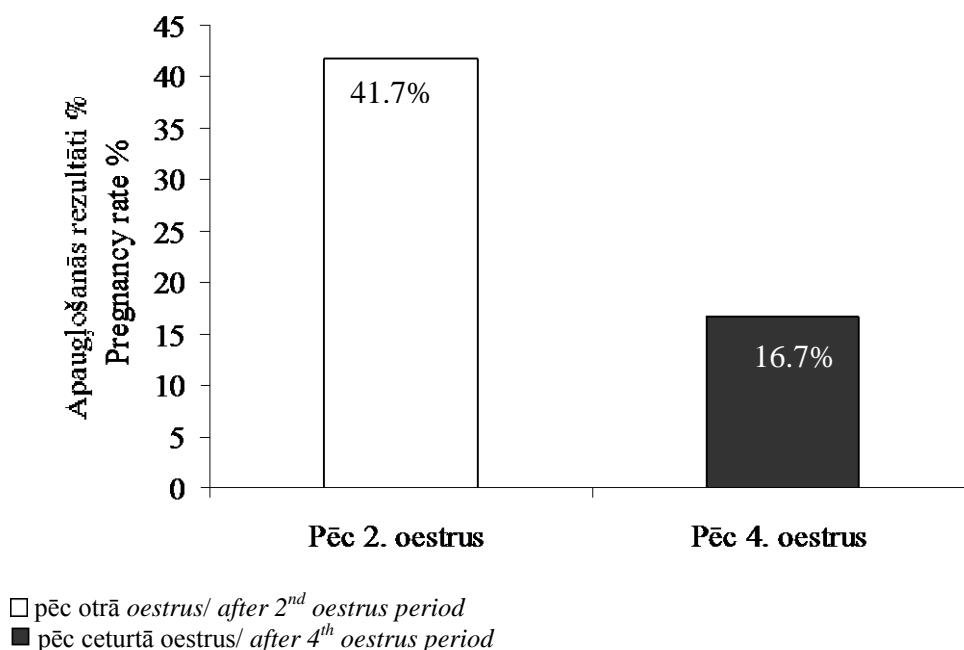
3. att. Ķēvju dzemdes gļotādas periglandulārā fibroze vērtēta ballēs (vidējā vērtība ± standartklūda).

Fig. 3 Periglandular fibrosis in mares endometrial biopsies scored from 0 to 5 (mean ± SEM).

Kopumā savā pētījumā novērojām, ka eksperimentāla dzemdes kakla noslēgšana nepaaugstināja limfocītu infiltrācijas intensitāti ķēvju dzemdes gļotādas histoloģiskā parauga ainā, bet tajā pat laikā dzemdes periglandulārā fibroze būtiski paaugstinājās.

Apaugļošanās rezultātu analīze ķēvēm

Apaugļošanās rezultātu salīdzinošo vērtējumu veicām par otro un ceturto oestrus periodu eksperimenta A, B un C grupu ķēvēm 16 dienā pēc mākslīgās apsēklošanas un tie parādīti 4 attēlā. Grūsnība, kura iestājās pēc apsēklošanas 4. oestrus periodā bija 2.5 reizes zemāka (16.7%), salīdzinot to ar otro oestrus periodu (41.7%), kas norāda, ka dzemdes kakla noslēgšana otrajā oestrus periodā būtiski ($p < 0.05$) ietekmēja grūsnības rezultātus ceturtajā oestrus periodā.



4. att. Eksperimenta grupu A, B un C ķēvju apaugļošanās rezultāti (%).

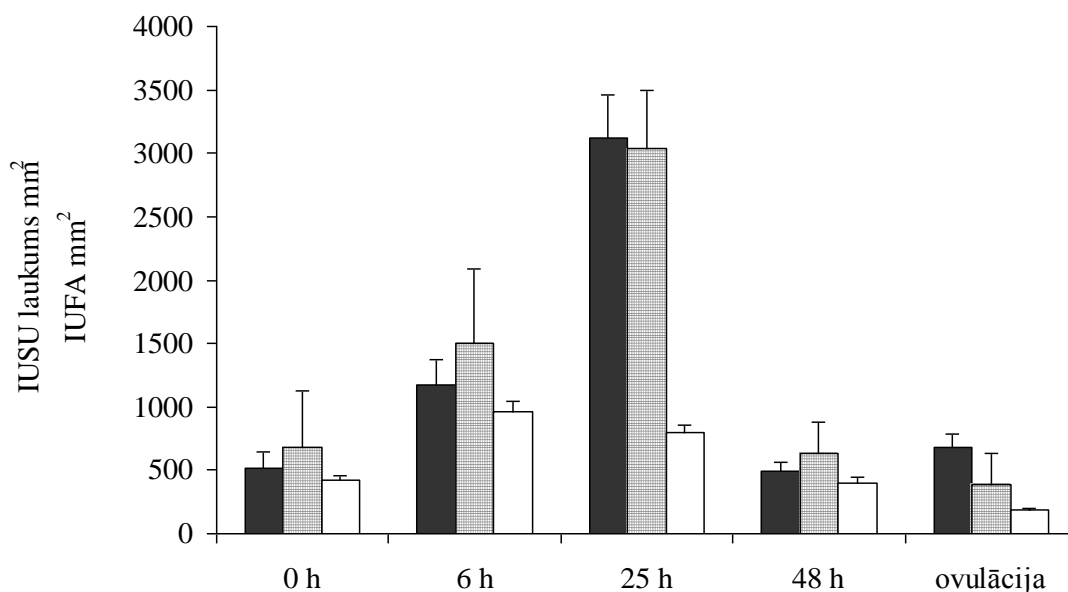
Fig. 4 Pregnancy rates in mares in experimental group A, B and C (%).

Kā iepriekš atzīmējām, kakla noslēgšana ir paaugstinājusi dzemdes gļotādas periglandulārās fibrozes attīstību, kas savukārt, iespējams, ir ietekmējis apaugļošanās rezultātus ķēvēm. Kaut gan konstatējām vāju, statistiski nenozīmīgu korelāciju ($r = 0.3$, $p > 0.05$) starp ķēvju gļotādas periglandulāro fibrozi un apaugļošanās rezultātiem.

Carnevale et al., (1992, 2008) uzsver, ka ne tikai ķēvju vecums, bet arī dzemdes veselības stāvoklis būtiski ietekmē auglības rezultātus ķēvēm, īpaši uzsverot ilgstošu dzemdes iekaisumu. Savukārt Troedsson (1997) min, ka iekaisums, jo īpaši atkārtots dzemdes gļotādas iekaisums, var izraisīt deģeneratīvas tā izmaiņas un agro embrija nāvi. Oddsottir et al., (2008) uzsver, ka tieši dzemdes gļotādas periglandulārā fibroze ir biežākais agrās embrija nāves cēlonis ķēvēm, un ka periglandulārās fibrozes izteiktības pakāpe ir tieši saistīta ar dzemdes spējām iznēsāt augli līdz grūsnības beigām. Ja dažāda smaguma pakāpes periglandulārā fibroze skar lielu dzemdes gļotādas dziedzeru daudzumu, tad apaugļošanās samazinās līdz minimālam.

Intrauterīnā šķidrums daudzums un dzemdes gļotādas tūska ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas

Mūsu pētījumā sevišķu vērību pievēršām dzemdes kakla nozīmei intrauterīnā šķidrums izvadīšanā no dzemdes dobuma ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas. Intrauterīnā šķidrums uzkrāšanās (IUSU) dinamika otrajā oestrus periodā grafiski parādīta 5. attēlā.



Ekspieriments A ■ – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 25 stundām pēc mākslīgās apsēklošanas/ *intrauterine catheter closed for 25 h in mares after artificial insemination*.

Ekspieriments B ▨ – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 6 stundām, iegūts šķidrums un katetrs aizvērts uz 19 stundām (kopā 25 stundas pēc mākslīgās apsēklošanas)/ *intrauterine catheter opened at 6h, intrauterine fluid drained, catheter closed and opened again after 19 h (together 25 h after artificial insemination)*.

Ekspieriments C □ – kontroles grupa/ *control group*.

5. att. Intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās laukuma izmaiņas (mm²), noteiktas ar ultrasonogrāfu ķēvēm otrajā oestrus periodā (vidējā vērtība ± standartklūda): mākslīgās apsēklošanas laikā (0 h), 6 h, 25 h un 48 h pēc mākslīgās apsēklošanas, kā arī pēc ovulācijas.

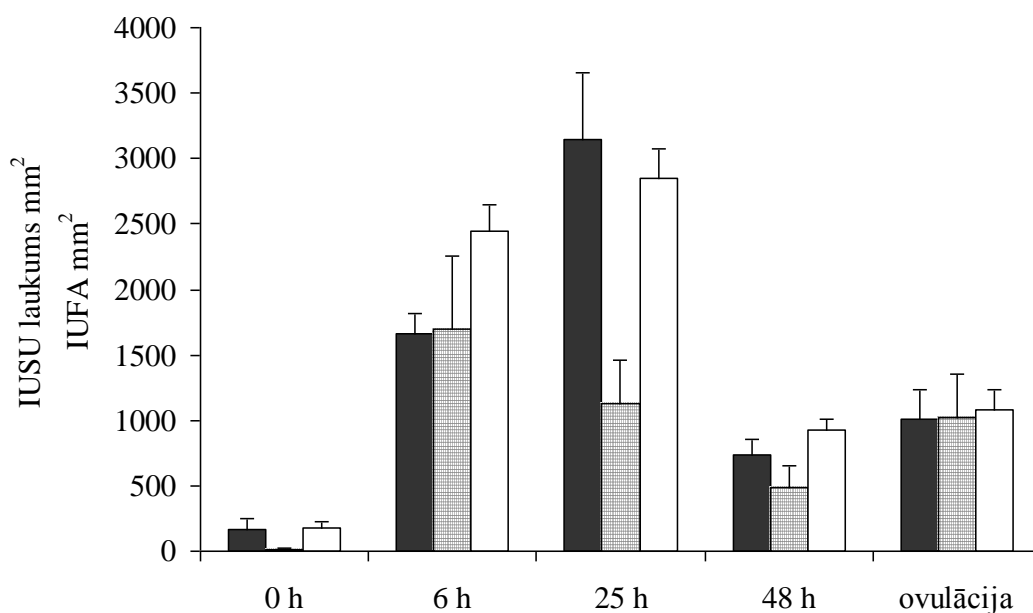
Fig. 5 Intrauterine fluid accumulation (IUF) (mm²) detected with ultrasound in mares in second oestrus period (mean ± SEM): at the time of artificial insemination (0 h), 6 h, 25 h, and 48 h after artificial insemination and after the ovulation.

Otrajā oestrus periodā mākslīgās apsēklošanas laikā (0 h) kontroles grupas C ķēvēm novērojām intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos un tā daudzums bija $418.3 \pm 35.0 \text{ mm}^2$, kas būtiski neatšķīrās no eksperimentā A un B iesaistītajiem dzīvniekiem (attiecīgi $516.7 \pm 124.3 \text{ mm}^2$ un $683.8 \pm 448.1 \text{ mm}^2$). Sešas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas novērojām IUSU pieaugumu visu eksperimenta grupu dzīvniekiem neatkarīgi no dzemdes kakla atvēruma, attiecīgi kontroles grupas C ķēvēm $960.6 \pm 80.0 \text{ mm}^2$, eksperimenta A $1170.3 \pm 205.3 \text{ mm}^2$ un eksperimenta B $1500 \pm 589.4 \text{ mm}^2$ grupas ķēvēm, bet atšķirības nebija būtiskas ($p > 0.05$). Divdesmit piecas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas IUSU dzemdē bija palielinājusies, sevišķi eksperimenta A un B grupu dzīvniekiem, attiecīgi līdz $3125 \pm 338.7 \text{ mm}^2$ un $3037.5 \pm 459.7 \text{ mm}^2$, kas salīdzinājumā ar kontroles grupas C rādītājiem ($792 \pm 66.0 \text{ mm}^2$), atšķīrās būtiski ($p < 0.05$). Jāatzīmē, ka, neskatoties uz to, ka eksperimenta B grupas ķēvēm pēc 6 stundām katetrs tika atvērts un šķidrums izvadīts no dzemdes, 25 h pēc MA šķidrums dzemdē bija palielinājies un sasniedza eksperimenta A dzīvnieku IUSU daudzumu, kuriem katetrs bija pastāvīgi aizvērts uz 25 stundām pēc mākslīgās apsēklošanas.

Divdesmit piecas stundas pēc MA visu grupu ķēvēm izņēmām intrauterīno katetru un tajā pat laikā injicējām 10 IU vienības oksitocīna, lai veicinātu brīvu intrauterīnā šķidruma izvadi caur dzemdes kaklu. Nākošā dienā, kas ir 48 stundas pēc MA, veicām atkārtotu intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās daudzuma noteikšanu dzemdē. Rezultātā novērojām IUSU samazināšanos visu grupu ķēvēm: eksperimenta A – no $3125 \pm 338.8 \text{ mm}^2$ uz $495 \pm 68.5 \text{ mm}^2$, eksperimenta B – no $3037.5 \pm 459.7 \text{ mm}^2$ uz $637.5 \pm 245.5 \text{ mm}^2$ un eksperimenta C – no $792 \pm 66.0 \text{ mm}^2$ uz $404.2 \pm 36.7 \text{ mm}^2$, bet

atšķirības starp eksperimenta grupām A, B un C 48 stundas pēc MA nebija statistiski būtiskas ($p > 0.05$). Eksperiments turpinājās, līdz ķēvēm ar ultrasonogrāfu diagnosticējām ovulāciju. Pēc ovulācijas intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās turpināja samazināties visu grupu ķēvēm, izņemot eksperimenta A grupu, kurām intrauterīnā šķidruma daudzums bija palielinājies, bet šī palielināšanās nebija statistiski būtiska ($p > 0.05$).

Ceturtajā *oestrus* periodā mākslīgās apsēklošanas laikā (skat. 6. attēlu) eksperimenta C (kontroles grupas) ķēvēm intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās bija $182.5 \pm 42.4 \text{ mm}^2$, eksperimenta A un B dzīvniekiem IUSU daudzums bija attiecīgi $171.0 \pm 75.6 \text{ mm}^2$ un $16.7 \pm 8.2 \text{ mm}^2$ un atšķirības nebija būtiskas ($p > 0.05$). Ceturtajā *oestrus* periodā līdzīgi kā otrajā *oestrus* periodā sešas stundas pēc MA novērojām IUSU pieaugumu visu grupu dzīvniekiem, attiecīgi kontroles grupai – $2445 \pm 204.2 \text{ mm}^2$, eksperimenta A ķēvēm – $1657.1 \pm 162.7 \text{ mm}^2$ un eksperimenta B ķēvēm – $1700 \pm 558.0 \text{ mm}^2$, bet IUSA atšķirības starp grupām šajā laikā nebija būtiskas ($p > 0.05$). Divdesmit piecas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas IUSA daudzums ir vēl palielinājies eksperimenta grupām A un C, attiecīgi līdz $3150 \pm 508 \text{ mm}^2$ un $2850 \pm 228.1 \text{ mm}^2$. Savukārt eksperimenta B grupas ķēvēm, kurām pēc sešām stundām katetrs tika atvērts, novērojām IUSU samazināšanos, attiecīgi no 1700 ± 558.0 uz $1133.3 \pm 320.9 \text{ mm}^2$. Intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās atšķirības starp eksperimenta grupu B un kontroles grupu bija būtiskas ($p < 0.05$).



Eksperiments A ■ – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 25 stundām/ *intrauterine catheter closed for 25 h in mares after artificial insemination.*

Eksperiments B ▨ – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 6 stundām, iegūts šķidrums un katetrs aizvērts uz 19 stundām (kopā 25 stundas pēc mākslīgās apsēklošanas)/ *intrauterine catheter opened at 6h, intrauterine fluid drained, catheter closed and opened again after 19 h (together 25 h after artificial insemination).*

Eksperiments C □ – kontroles grupa/ *control group.*

6. att. Intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās laukuma izmaiņas (mm^2), noteiktas ar ultrasonogrāfu ķēvēm ceturtajā *oestrus* periodā (vidējā vērtība \pm standartklūda): mākslīgās apsēklošanas laikā (0 h), 6 h, 25 h un 48 h pēc mākslīgās apsēklošanas, kā arī pēc ovulācijas.

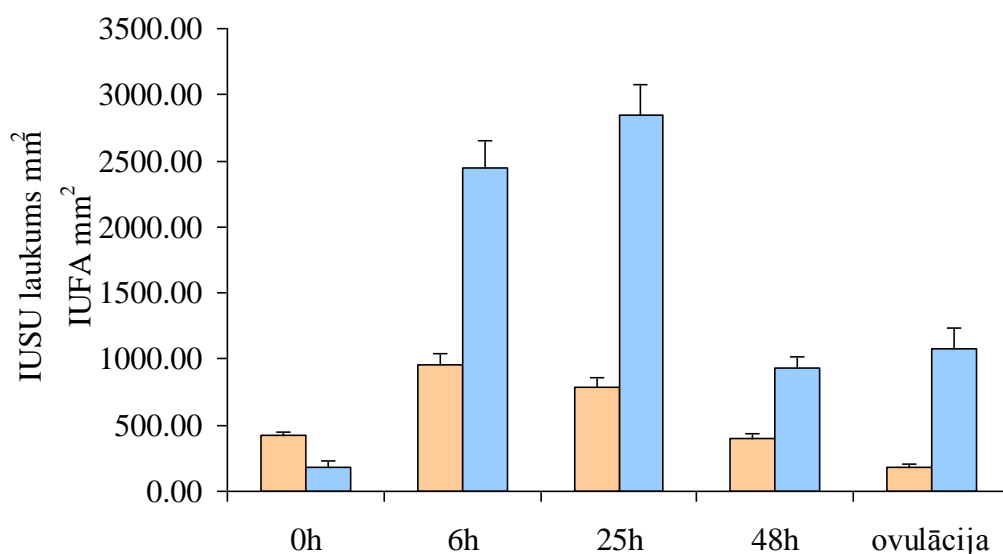
Fig. 6 Intrauterine fluid accumulation (IUFA) (mm^2) detected with ultrasound in mares in fourth oestrus period (mean \pm SEM): at the time of artificial insemination (0 h), 6 h, 25 h, and 48 h after artificial insemination and after the ovulation.

Tāpat kā otrajā *oestrus*, arī ceturtajā *oestrus* divdesmit piecas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas visu grupu ķēvēm izņēmām intrauterīnos katetrus un tajā pat laikā injicējām 10 IU

vienības oksitocīna, lai veicinātu brīvu intrauterīnā šķidruma izvadi caur dzemdes kaklu. Nākamā dienā, kas ir 48 stundas pēc MA, veicām atkārtotu IUSU daudzuma noteikšanu dzemdē. Rezultātā novērojām IUSU samazināšanos visu grupu ķēvēm: A – no $3150 \pm 508 \text{ mm}^2$ uz $740 \pm 112.3 \text{ mm}^2$; B – no $1133.3 \pm 320.9 \text{ mm}^2$ uz $487.5 \pm 162.4 \text{ mm}^2$ un C – no $2850 \pm 228.1 \text{ mm}^2$ uz $930 \pm 83.3 \text{ mm}^2$. Savukārt pēc ovulācijas visu eksperimenta grupu ķēvēm novērojām nelielu IUSU paaugstināšanos, kura nebija būtiska ($p > 0.05$).

Risco et al. (2009) novēroja, ka ķēvju grupai, kura saņēma oksitocīna ārstēšanu 4 h, 8 h un 25 h pēc mākslīgās apsēklošanas novēroja mazāku intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos, tā secinot, ka dzemdes muskulatūras kontrakcijām ir būtiska loma intrauterīnā šķidruma izvadē no dzemdes.

Lai noskaidrotu eksperimenta A un B ilglaicīgo ietekmi uz intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos dzemdes dobumā veicām salīdzinošu vērtējumu starp kontroles grupām otrajā un ceturtajā *oestrus* periodā (7. att). Rezultātā novērojām, ka ceturajā *oestrus* perioda kontroles grupas ķēvēm (C), kurām dzemdes katetrs otrajā *oestrus* periodā bija noslēgts, intrauterīnā šķidruma daudzums bija būtiski lielāks ($p < 0.05$), salīdzinot ar otrā *oestrus* perioda kontroles grupas ķēvēm (C), kurām dzemdes kakls pirms eksperimenta bija brīvi atvērts.



■ C – kontroles grupa otrajā *oestrus* periodā, dzemdes kakls brīvi atvērts pirms eksperimenta/ control group in second *oestrus* period, the cervix is opened before the experiment.

■ C - kontroles grupa ceturtajā *oestrus* periodā, kurām otrajā *oestrus* periodā dzemdes kakls bija noslēgts/ control group in fourth *oestrus* period, cervix closed in second *oestrus* period.

7. att. Eksperimenta A un B ilglaicīgā ietekme uz intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos turpmākajos dzimumciklos. Salīdzinošs vērtējums veikts starp kontroles grupām otrajā un ceturtajā *oestrus* periodā.

Fig. 7. Experiment group A and B long – term effect on intrauterine fluid accumulation (IUFA) in following oestrus periods. The evaluation is made between the control groups in second and fourth oestrus period (mean \pm SEM).

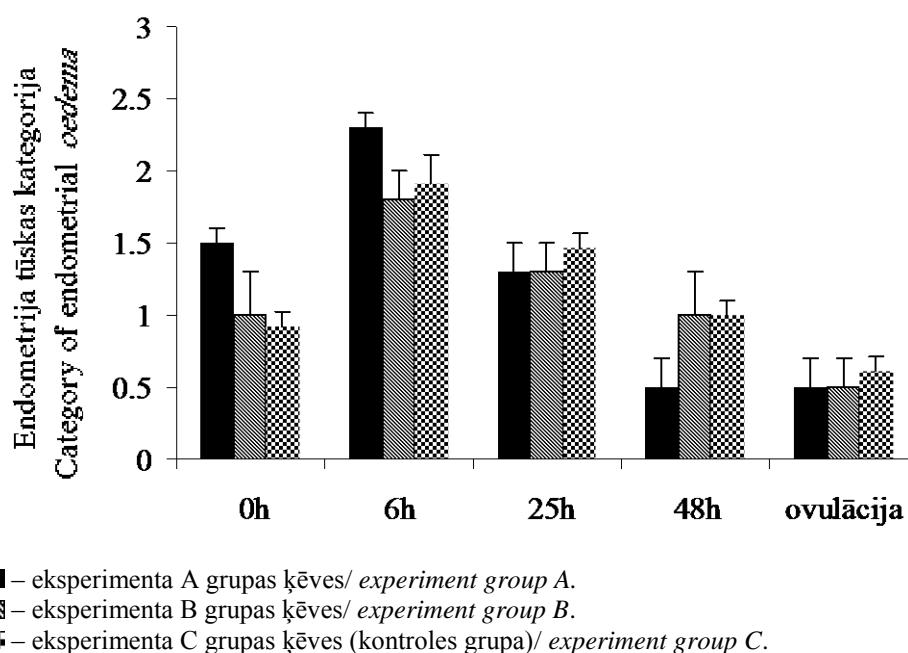
Mūsu eksperimentā iegūtie rezultāti parāda, ka dzemdes kakla noslēgšana būtiski palielina uzkrātā intrauterīnā šķidruma daudzumu ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas.

Vairāki autori min, ka starp daudziem faktoriem, kas izraisa intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos dzemdes dobumā, galvenais ir traucēta dzemdes mehāniskā atbrīvošanās no intrauterīnā šķidruma

caur dzemdes kaklu (Evans et al., 1986; Allen et al., 1989; LeBlanc et al., 1989; Troedsson et al., 1991).

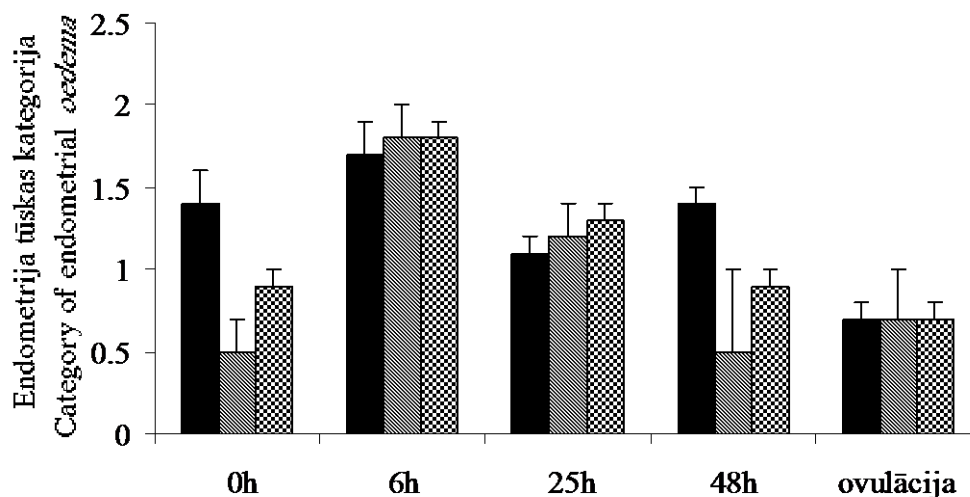
Kopumā jāpiekrīt autoriem, kas atzīmē dzemdes kakla būtisko nozīmi intrauterīnā šķidruma izvadīšanā no dzemdes (Evans et al., 1987; Allen, 1990; Causey, 2007; LeBlanc, 2008; Pycock, 2009). Kā atzīmē Nielsen, (2005), intrauterīnais šķidrums ir atbilstoša vide baktēriju vairošanās procesiem un attīstībai dzemdē, kā rezultātā samazinās grūsnības rādītāji ķēvēm.

Vienlaicīgi ar intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās mērījumiem veicām dzemdes gļotādas tūskas pakāpes noteikšanu. Ir zināms, ka dzemdes gļotādas tūska parādās un kļūst redzama ultrasonogrāfā *dioestrus* perioda beigās un izteiksmīgāka tā kļūst, *oestrus* periodam progresējot. Divas dienas pirms ovulācijas tā samazinās, bet pavisam izzūd ovulācijas dienā (Nielsen, 2005). Mēs savā pētījumā novērojām, ka mākslīgās apsēklošanas laikā (0 h) dzemdes gļotādas tūska variēja no kategorijas 0 līdz 2 gan otrajā, gan ceturtajā *oestrus* periodā visām eksperimenta A, B un C ķēvēm. Sešās stundās pēc mākslīgās apsēklošanas novērojām dzemdes gļotādas tūskas pastiprināšanos līdz kategorijai 2.5. Sākot ar divdesmit piekto stundu pēc mākslīgās apsēklošanas, dzemdes gļotādas tūscai bija tendence atkal samazināties gan otrajā, gan ceturtajā *oestrus* periodā visu grupu ķēvēm. Viszemāko dzemdes gļotādas tūska novērojām ovulācijas brīdī.



8. att. Ķēvju dzemdes gļotādas tūskas kategorija (0 – 3) otrajā *oestrus* periodā (vidējā vērtība ± standartklūda) mākslīgās apsēklošanas laikā (0 h), 6 h, 25 h un 48 h pēc mākslīgās apsēklošanas, kā arī pēc ovulācijas.

Fig. 8 Endometrial oedema in mares (scored from 0 to 3) in second oestrus period (mean ± SEM): at the time of artificial insemination (0 h), 6 h, 25 h, and 48 h after artificial insemination and after the ovulation.



Ekspieriments A ■ – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 25 h/ *intrauterine catheter closed for 25 h in mares after artificial insemination.*

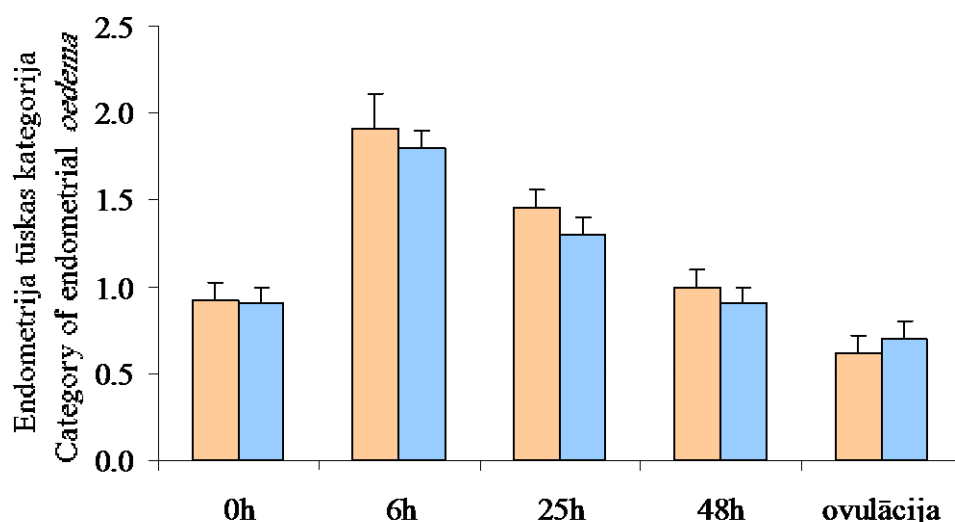
Ekspieriments B ▨ – intrauterīnais katetrs aizvērts uz 6 h, iegūts šķidrums un katetrs atkārtoti aizvērts uz 19 h (kopā 25 stundas pēc mākslīgās apsēklošanas)/ *intrauterine catheter opened at 6h, intrauterine fluid drained, catheter closed and opened again after 19 h (together 25 h after artificial insemination).*

Ekspieriments C ▩ – kontroles grupa/ *control group.*

9. att. Ķēvju dzemdes gļotādas tūskas kategorija (0 - 3) ceturtajā *oestrus* periodā (vidējā vērtība ± standartklūda) mākslīgās apsēklošanas laikā (0 h), 6 h, 25 h un 48 h pēc mākslīgās apsēklošanas, kā arī pēc ovulācijas.

Fig. 9 Endometrial oedema in mares (scored from 0 to 3) in fourth oestrus period (mean ± SEM): at the time of artificial insemination (0 h), 6 h, 25 h, and 48 h after artificial insemination and after the ovulation

Noslēgta dzemdes kakla (eksperiments A un B) ilglaicīgā ietekme uz dzemdes gļotādas tūskas attīstību, salīdzinot savā starpā kontroles grupas ķēves otrajā *oestrus* periodā, kurām dzemdes kakls brīvi atvērts, un kontroles grupas ķēves ceturtajā *oestrus* periodā, kurām otrajā *oestrus* periodā dzemdes kakls bija noslēgts grafiski attēlota 10. attēlā, kurā redzam, ka visa eksperimenta laikā kontroles grupu (C) ķēvēm dzemdes gļotādas tūska gan otrajā, gan ceturtajā *oestrus* periodā būtiski neatšķīrās ($p > 0.05$).



■ C – kontroles grupa otrajā *oestrus* periodā, dzemdes kakls brīvi atvērts/ *control group in second oestrus period, the cervix is opened before the experiment.*

■ C – kontroles grupa ceturtajā *oestrus* periodā, kurām otrajā *oestrus* periodā dzemdes kakls bija noslēgts/ *control group in fourth oestrus period, cervix closed in second oestrus period.*

10. att. Eksperimenta A un B ilglaicīgā ietekme uz dzemdes gļotādas tūskas intensitāti turpmākajos dzimumciklos. Salīdzinošs vērtējums veikts starp kontroles grupām otrajā un ceturtajā *oestrus* periodā.

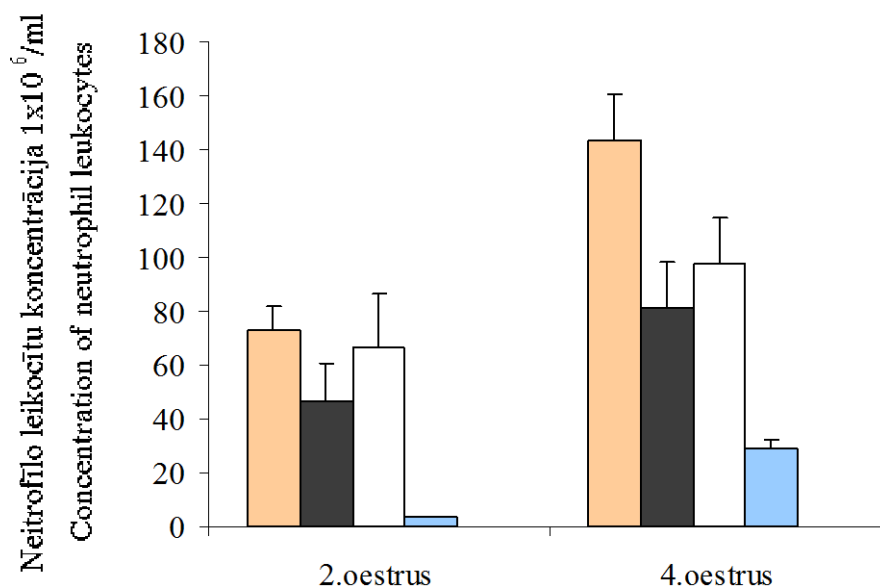
Fig. 10. Experiment group A and B long – term effect on endometrial oedema in following *oestrus* periods. The evaluation is made between the control groups in second and fourth *oestrus* period (mean ± SEM).

Literatūrā (Hayes et al., 1985; Ginther et al., 1994; Plata-Madrid et al., 1994) ir atrodami dati, ka 90 % ķēvju ovulācijas brīdī dzemdes gļotādas tūska ir samazinājusies vai nav novērojama vispār. Vairāki autori (McKinnon et al., 1988; Ginther et al., 1994; Sampers, 1997) savos pētījumos, izmantojot dažādu šķirņu ķēves, konstatēja, ka dzemdes gļotādas tūska samazinājās jau divas dienas pirms ovulācijas.

Ja salīdzinām dzemdes kakla noslēgšanas ilglaicīgo ietekmi uz intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos dzemdes dobumā un dzemdes gļotādas tūsku (attēls 7 un attēls 9) redzam, ka tā būtiski palielināja uzkrātā intrauterīnā šķidruma daudzumu ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas, bet tajā pat laikā dzemdes gļotādas tūska neietekmēja. Kaut gan vairākos darbos (Hayes et al., 1985; Griffin et al., 1991; Plata-Madrid et al., 1994; Pycoc et al., 1995; Pelehach et al., 2002) ir norādes, ka vienlaicīgi ar dzemdes gļotādas tūska *oestrus* perioda laikā dzemdē kļūst redzams arī intrauterīnais šķidrums, kam par iemeslu ir paaugstināts cirkulējošā estrogēna līmenis asinīs.

Neitrofile leukocīti intrauterīnajā šķidrumā

Apkopojot iegūtos rezultātus par neitrofilo leukocītu koncentrāciju intrauterīnajā šķidrumā secinām, ka eksperimenta A, B un C grupu ķēvēm ceturajā *oestrus* periodā ir palielinājusies neitrofilo leukocītu koncentrācija, salīdzinot to ar otro *oestrus* periodu (11. att).



■ - eksperiments A, intrauterīnais šķidrums iegūts pēc 25 stundām/ *experiment A, intrauterine catheter opened 25 h after artificial insemination.* ■ - eksperiments B, intrauterīnais katetrs aizvērts uz 6, iegūts šķidrums un katetrs aizvērts uz 19 stundām/ *experiment B - intrauterine catheter opened at 6h, intrauterine fluid drained, catheter closed and opened again after 19 h.* □ - eksperiments B, intrauterīnais šķidrums iegūts pēc 25 stundām pēc mākslīgās apsēklošanas/ *experiment B, intrauterine catheter opened 25 h after artificial insemination.* ■ - eksperiments C (kontroles grupa)/ *experiment C, control group.*

11. att. Neitrofilo leukocītu koncentrācija intrauterīnajā šķidrumā ($10^6/\text{ml}$, vidējā vērtība \pm standartklūda) ķēvēm pēc mākslīgās apsēklošanas otrajā un ceturtajā oestrus periodā.

Fig. 11 Concentration of neutrophil leukocytes in intrauterine fluid ($10^6/\text{ml}$, mean \pm SEM) in mares after artificial insemination in second and fourth oestrus period.

Tā eksperimenta grupas A ķēvēm neitrofilo leukocītu koncentrācija ir būtiski palielinājusies no $73.2 \pm 8.4 \cdot 10^6/\text{ml}$ otrajā oestrus periodā līdz $143.3 \pm 17.3 \cdot 10^6/\text{ml}$ ceturtajā oestrus periodā ($p < 0.05$). Eksperimenta B grupas ķēvēm 6 stundas pēc mākslīgās apsēklošanas neitrofilo leukocītu koncentrācija otrajā oestrus periodā bija $46.0 \pm 14.2 \cdot 10^6/\text{ml}$, ceturtajā oestrus periodā – 81.4 ± 16.9 , divdesmit piecas stundas pēc MA neitrofilo leukocītu koncentrācija bija attiecīgi 66.3 ± 19.9 un $97.9 \pm 16.7 \cdot 10^6/\text{ml}$, bet šīs atšķirības nebija statistiski būtiskas ($p > 0.05$). Kontroles grupai C neitrofilo leukocītu koncentrācija intrauterīnajā šķidrumā bija būtiski palielinājusies no $3.3 \pm 0.2 \cdot 10^6/\text{ml}$ otrajā oestrus periodā līdz $29.1 \pm 3.0 \cdot 10^6/\text{ml}$ ceturtajā oestrus periodā ($p < 0.05$). Šī palielināšanās izskaidro dzemdes kakla būtisko nozīmi neitrofilo leukocītu izvadē no dzemdes, jo ilgstoša dzemdes kakla noslēgšana otrajā oestrus periodā atstājusi ilgstošu negatīvu ietekmi uz dzemdes aizsargfunkcijām ceturtajā oestrus periodā.

Kad dzemdes gļotāda saņem tādu kairinājumu kā spermatozoīdi vai baktērijas, sākas straujš iekaisuma process, kura laikā notiek neitrofilo leukocītu migrācija no vēnām un venulām dzemdes lūmenā, kā arī intrauterīnā šķidruma akumulācija (Nikolakopoulos et al., 2000). Literatūrā tiek minēts, ka neitrofilo leukocītu infiltrācija sākas 30 minūtes pēc mākslīgās apsēklošanas un samazinās 24 stundu laikā pēc tās (Kotilainen et al., 1994; Katila, 1995; Katila, 2001).

Dzemdes atvēršanas nolūkos otrajā un ceturtajā oestrus periodā divdesmit piecas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas visu eksperimenta grupu ķēvēm veicām dzemdes skalošanu (irigāciju) ar 500 ml 0.9% NaCl šķīdumu. Iegūtajā dzemdes irigācijas šķidrumā noteicām neitrofilo leukocītu koncentrāciju $10^6/\text{ml}$. Līdzīgi kā neitrofilo leukocītu koncentrācija intrauterīnajā šķidrumā, arī dzemdes irigācijas šķidrumā neitrofilo leukocītu koncentrācija kontroles grupas ķēvēm ceturtajā

oestrus periodā ir būtiski palielinājusies, salīdzinot to ar otro *oestrus* periodu, attiecīgi no $1.0 \pm 0.1 \cdot 10^6/\text{ml}$ uz $21.5 \pm 2.2 \cdot 10^6/\text{ml}$ ($p < 0.05$). Arī šeit apstiprinās, ka dzemdes kakla noslēgšana ar intrauterīno katetru otrajā *oestrus* periodā ir sekmējusi neitrofilo leukocītu pieaugumu ceturtajā *oestrus* periodā. Literatūrā min, ka dzemdes gļotādas iekaisumam predisponētām ķēvēm profilakses nolūkos dzemdes irigāciju visoptimālāk veikt 4 stundas pēc mākslīgās apsēklošanas (Brinsko et al., 1990, 1991, 2003).

Iekaisuma marķieru klātbūtne ķēvju intrauterīnajā šķidrumā

Lai izvērtētu dzemdes gļotādas iekaisumu kā atbildes reakciju uz spermas ievadīšanu ķēvēm ar eksperimentāli noslēgtu dzemdes kaklu, noteicām iekaisuma marķieru TNF- α un IL-6 ekspresijas intensitāti un neitrofilo leukocītu daudzumu intrauterīnajā šķidrumā otrajā un ceturtajā *oestrus* periodā. Pētījumos pierādīts, ka spermas plazma un spermas atšķaidītājs paaugstina IL-6 un TNF- α ekspresiju ķēvju dzemdes intrauterīnajā šķidrumā (Palm et al., 2008). TNF- α ir akūtās fāzes proteīns, kas stimulē citu citokīnu pievienošanos iekaisuma procesā, kā arī paaugstina asinsvadu caurlaidību, tādā veidā novirzot neitrofilos leukocītus un makrofāģus uz iekaisuma vietu. Interleikīns-6 tāpat kā TNF- α ir akūtās fāzes proteīns, kas ir galvenais akūtas iekaisuma reakcijas regulētājs organismā un kura ekspresiju organismā stimulē audu bojājumi, baktēriju endotoksīni un TNF- α .

Mūsu pētījumā, salīdzinot TNF- α un IL-6 ekspresiju ar neitrofilo leukocītu koncentrāciju intrauterīnajā šķidrumā **otrajā *oestrus* periodā**, konstatējām, ka pie augstākas neitrofilo leukocītu koncentrācijas eksperimenta A un B grupas ķēvēm samazinājās iekaisuma marķieru ekspresijas intensitāte. Savukārt pie zemākas neitrofilo leukocītu koncentrācijas, kuru novērojām kontroles grupas ķēvēm, iekaisuma citokīnu TNF- α un IL-6 ekspresija intrauterīnajā šķidrumā bija intensīvāka. Iegūtie rezultāti nesaskan ar iepriekš literatūrā minētām norisēm, un mēs dotajā brīdī nevaram izskaidrot šos rezultātus, jo nepieciešami turpmākie pētījumi ar lielāku dzīvnieku skaitu.

Salīdzinot TNF- α un IL-6 ekspresiju ar neitrofilo leukocītu koncentrāciju intrauterīnajā šķidrumā **ceturtajā *oestrus* periodā**, konstatējām, ka pie augstākas neitrofilo leukocītu koncentrācijas eksperimenta A grupas ķēvēm paaugstinājās iekaisuma marķieru ekspresijas intensitāte. Savukārt pie zemākas neitrofilo leukocītu koncentrācijas, kuru novērojām kontroles grupas ķēvēm, TNF- α un IL-6 ekspresija intrauterīnajā šķidrumā bija zemāka. Šajā gadījumā mūsu iegūtie rezultāti saskan ar literatūrā (Cadario et al., 2002) minētajiem, kur norādīts, ka IL-6, iespējams, pilda dzemdes gļotādas aizsargfunkcijas *oestrus* perioda laikā jaunām ķēvēm, kad viens no spēcīgākajiem iekaisuma aģentiem – spermatozoīdi – nokļūst dzemdē. TNF- α loma dzemdes gļotādas iekaisuma etioloģijā vēl nav skaidri zināma (Fumuso et al., 2003). Ir noskaidrots, ka TNF- α sievietēm stimulē IL-6 sintēzi un izdalīšanos. Literatūrā atrodam, ka arī vecuma ietekmē novēro iekaisuma citokīnu intensitātes pieaugumu perifērajās asinīs (Adams et al., 2008, 2009).

SECINĀJUMI

Ilgstoša dzemdes kakla noslēgšana pēc mākslīgās apsēklošanas ķēvēm būtiski ($p < 0.05$) palielina dzemdes gļotādas periglandulāro fibrozi un samazina apaugļošanās rādītājus ķēvēm.

Dzemdes kakla noslēgšana otrajā *oestrus* periodā nav sekmējusi bakteriālas izcelsmes dzemdes gļotādas iekaisuma attīstību ceturtajā oestrus periodā, jo izolētās *Streptococcus spp.* baktērijas no dzemdes gļotādas virsmas divām ķēvēm, iespējams, liecina par paraugu kontamināciju to uzsēšanas laikā.

Mākslīgās apsēklošanas laikā ķēvēm novēro intrauterīnā šķidruma uzkrāšanos dzemdē. Sešas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas intrauterīnā šķidruma daudzumam ir tendence palielināties neatkarīgi no dzemdes kakla atvēruma. Divdesmit piecas stundas pēc mākslīgās apsēklošanas intrauterīnā šķidruma uzkrāšanās dzemdē būtiski ($p < 0.05$) palielinās ķēvēm ar traucētu šķidruma noteci caur dzemdes kaklu.

Ķēvju meklēšanās laikā dzemdes gļotādas tūskas izteiktības pakāpei nav tiešas saistības ar intrauterīnā šķidruma daudzumu dzemdē.

Pēc ķēvju mākslīgās apsēklošanas traucēta intrauterīnā šķidruma izvade caur dzemdes kaklu būtiski ($p < 0.05$) palielina neitrofilo leukocītu koncentrāciju un izraisa iekaisuma citokīnu TNF- α un IL-6 ekspresijas intensitātes palielināšanos intrauterīnajā šķidrumā. Nenovērojām vecuma ietekmi uz iekaisuma citokīnu TNF- α un IL-6 ekspresijas intensitātes palielināšanos intrauterīnajā šķidrumā.

ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

1. Liepiņa E., Antāne V., Rivera del Alamo M.M. (2010) Intrauterine fluid secretion in mares after artificial insemination. *Proceedings of the 16th International Scientific Conference „Research For Rural Development 2010”*. Jelgava, 19-21, pp. 12 – 16.
2. Liepina E., Alamo del. M.M., Reilas T., Katila T. (2010) IL-6 and TNF- α expression in uterine fluids of mares with induced delay in uterine clearance. *Proceedings of the 10th International Symposium on Equine Reproduction. Animal Reproduction Science. (Vol. 121)*, Kentucky, USA, pp. 107 – 109.
3. Liepina E., Antane V. (2010) Endometrial histological changes and pregnancy rates in mares with impaired uterine drainage. *Proceedings of the 29th International Scientific Conference Animals. Health. Food Hygiene*. Jelgava, pp. 73 – 78.
4. Reine E., Reilas T., Rivera del Alamo M.M., Katila T. (2008) Effect of impaired uterine drainage via cervix in normal mares after insemination. *16th International Congress on Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 43, Suppl 3)*, Budapest, Hungary. pp. 112.
5. Katila T., Reine E., Reilas T. (2008) Functioning cervical drainage is important for uterine clearance of mares after insemination. *12th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 43, Suppl 5)*, Utrecht, The Netherlands. pp 106 - 107.
6. Rivera del Alamo M.M., Reine E., Reilas T., Rodriquez - Gil J.E., Fernandez - Novell J.M, Ballester J., Katila T. (2009) Interleukin-1 beta, Interlekin-6 and Tumor Necrosis Factor - alpha expression on equine endometrium determined by immunohistochemistry. *13th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 44, Supl 3)*, Ghent, Belgium. pp. 12.

PATEICĪBA

Izsaku pateicību Helsinku universitātes profesorei Terttu Katilai par doto iespēju piedalīties viņas vadītajā starptautiskajā projektā, kā arī izmantot iegūtos datus sava promocijas darba veikšanai. Kā arī izsaku pateicību par sava promocijas darba vadīšanu.

Izsaku pateicību doktorei Tiina Reilas par sniegto atbalstu promocijas darba pētniecības daļas vadīšanu un publikāciju sagatavošanu, koriģēšanu.

Izsaku pateicību doktorei Maria Montserrat Rivera del Alamo par promocijas darba pētniecības daļas, iekaisuma citokīnu noteikšanas vadīšanu un publikāciju sagatavošanu, koriģēšanu.

Izsaku pateicību Pärtikas un zinātnes centra un hipoloģijas koledžas kolektīvam par veikto palīdzību promocijas darba praktiskajā darbā.

Izsaku pateicību asistentēm Anne Timonen un Taina Koivuniemi par palīdzību pētījuma praktiskajā darbā.

Izsaku pateicību Annikai Böström par ieguldīto darbu manis izglītošanā ķēvju reprodukcijā.

INTRODUCTION

Endometritis is regarded as one of the main causes of low fertility in mares. In normal mares, after artificial insemination (AI) or mating an acute endometrial inflammation occurs characterized by the infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the uterus that increases during approximately 8 hours and disappears within 24 hours (Kotilainen et al., 1994). If it does not disappear, a post-breeding endometritis develops. The most important causes of a chronic post-breeding endometrial inflammation are considered the following: an increased intrauterine fluid accumulation, infiltration of polymorphonuclear leukocytes after introducing semen into the uterus, and disorders of the cervix functions during the *oestrus* cycle. The chronic endometritis is regarded as one of the main causes of low fertility in mares. It was established that bacteria introduced into the uterus together with the semen during the artificial insemination or mating (Troedsson, 1995) could also cause endometritis.

In order to characterize the endometrial functions and to evaluate the pregnancy rates, Kenney and Doig (1986) introduced the classification of histological samples of endometrium. The authors (Kenney et al., 1986) had paid attention to the development of periglandular fibrosis in mares. Oddsdottir et al. (2008) in her research had reported that the main reason of infertility in mares was periglandular fibrosis. The fibrosis reduces the efficacy of uterine defense mechanisms. The degree of periglandular fibrosis is directly associated with the uterine capacity to carry a foal to term. When the periglandular fibrosis of different degrees of severity affects a large number of endometrial glands then a positive outcome of pregnancy is reduced to minimum, and abortion is a frequent sequel, usually until the 90th day of pregnancy.

Intrauterine fluid in mares is drained in two ways – via lymphatic or through the cervix. Independently of the way of drainage, myometrial contractions have an important role. A reduced myometrial activity or the uterus that tilts ventrally in relation to the base of the pubis might be a reason of fluid accumulation in the uterus (LeBlanc et al., 1998). Authors had proved that in mares with a predisposition to endometritis myometrial contractions were reduced (Troedsson et al., 1993).

In mares with a reduced uterus resistance to infection, and at the same time the drainage of inflammatory exudate via the cervix is impaired, the pregnancy failure or early embryonic death is observed. An impaired uterine fluid drainage is observed most often in old pluriparous mares (LeBlanc et al., 1998).

Until now, the importance of the cervix in the process of exudate drainage has not been much investigated. To facilitate the fluid evacuation out of the uterus, in earlier studies a manual dilatation of the cervix or a medicine oxytocin was applied (Pycock et al., 1996). We failed to find in the literature any investigations on the importance of the opening of the cervix in etiology of endometritis in mares that is why the **aim** of this research was to ascertain the morphological and functional status of endometrium in mares after artificial insemination in connection with the cervical opening.

Objectives of the research

1. To determine the changes of the endometrium morphology before and after occlusion of the cervix in mares after artificial insemination.
2. To investigate the uterine bacterial microflora before and after occlusion of the cervix.
3. To determine the intensity changes of accumulation of intrauterine fluid and endometrial *oedema* in mares after artificial insemination in connection with the cervical opening.
4. To establish the concentration of polymorphonuclear leukocytes and the intensity of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in the intrauterine fluid in mares after artificial insemination in connection with the cervical opening.

Scientific novelty of the research

This was the first controlled investigation on the importance of the cervical opening in mares after artificial insemination and its effect on the morphological and functional status of endometrium.

APPROBATION OF THE RESEARCH RESULTS

The research results are approbated in the following scientific conferences

1. Liepiņa E., Antāne V., Rivera del Alamo M.M. (2010) Intrauterine fluid secretion in mares after artificial insemination. *Proceedings of the 16th International Scientific Conference "Research for Rural Development 2010"*. Jelgava, 19 – 21 May, pp. 12-16.
2. Liepiņa E., Alamo del M.M., Reilas T., Katila T. (2010) IL-6 and TNF- α expression in uterine fluids of mares with induced delay in uterine clearance. *Proceedings of the 10th International Symposium on Equine Reproduction. Animal Reproduction Science*. (Vol. 121), Kentucky, USA, pp. 107 - 109.
3. Liepiņa E., Antāne V. (2010) Endometrial histological changes and pregnancy rates in mares with impaired uterine drainage. *Proceedings of the 29th International Scientific Conference Animals. Health. Food Hygiene*. Jelgava, pp.73 -78.
4. Reine E. Reilas T., Rivera del Alamo M.M., Katila T. (2008) Effect of impaired uterine drainage via cervix in normal mares after insemination. *16th International Congress on Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol. 43, Suppl. 3)*, Budapest, Hungary, pp. 112.
5. Katila T., Reine E., Reilas T. (2008) Functioning cervical drainage is important for uterine clearance of mares after insemination. *12th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol. 43 Suppl. 5)*, Utrecht, The Netherlands, pp. 106 – 107.
6. Rivera del Alamo M.M., Reine E., Reilas T., Rodriguez-Gil J.E., Fernandez-Novell J.M., Ballester J., Katila T. (2009) Interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha expression on equine endometrium determined by immunohistochemistry. *13th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol. 44, Suppl. 3)*, Ghent, Belgium, pp.12.

Volume of the research: the doctoral thesis contains 93 pages and consists of abstract, introduction, survey of scientific sources, methods, results, discussion, references, and annex.

MATERIAL AND METHODS

Place, material and time of the research

Twenty-four clinically healthy non-lactating mares were used for investigation: 20 light breed mares and four mares of different breeds at the age from 3 to 17 years from the MTT Agrifood Research Finland and Equine College, Ypäjä, Finland.

The research was carried out at the MTT Equine Research Station and Equine College, Ypäjä, Finland.

The determination of endometrial surface microbial contamination and infiltration of polymorphonuclear leukocytes of mares were carried out at the MTT Equine Research Station, Ypäjä, Finland.

Endometrial biopsy specimens for histological examination were prepared at the department of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine of the Helsinki University, Finland.

The assessment of endometrial histological specimens was performed at the Department of Productive Animal Medicine of the Helsinki University, Saari Unit, Finland.

The presence of inflammation marker interleukin - 6 and tumor necrosis factor - α in the intrauterine fluid of mares was determined at the Immunohistochemistry laboratory of the Department of Animal Medicine and Surgery of the Faculty of Veterinary Medicine of the Autonomous University, Barcelona, Spain.

Schema of the experiment

The experiment was carried out in five oestrus periods. To reach a simultaneous oestrus in the mares, they were synchronized with the synthetic preparation of prostaglandin F₂ α cloprostenol by intramuscular injections at a dose 0.55 μ g/kg.

The combined experimental schema and number of animals per groups is presented in Figure 1.

The study was designed as a crossover study where each mare received two treatments one of which was control treatment thus serving as internal control during the second or fourth oestrus period.

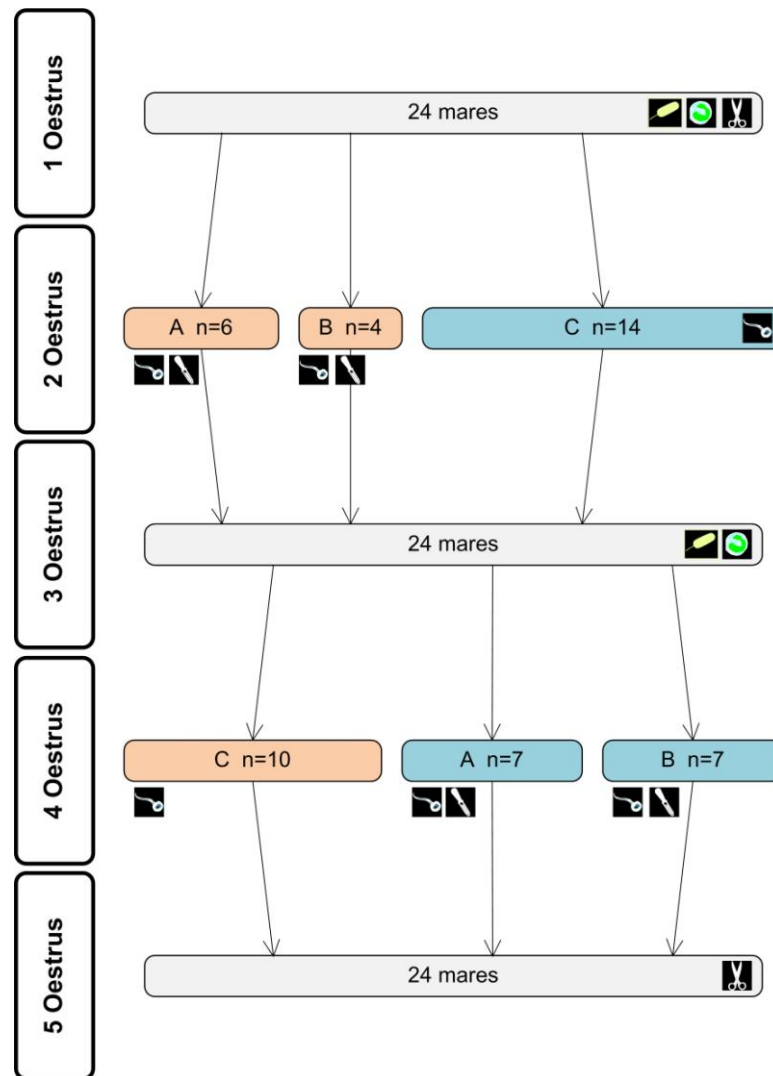


Fig.1 Experimental combined schema

- Experimental A and B group mares (n=10), the cervix was closed in the second oestrus, but in the fourth oestrus these mares were a control group.
- Experimental A and B group mares (n=14), the cervix was closed in the fourth oestrus, but in the second oestrus these mares were a control group.

A – intrauterine catheter closed for 25 hours after artificial insemination.

B – intrauterine catheter was closed for 6h, then opened and intrauterine fluid drained, catheter closed and opened again after 19h (in all 25h after artificial insemination).

- examination for endometrial microbial contamination;
- determination of polymorphonuclear leukocyte infiltration in the endometrium ;
- endometrial biopsy;
- artificial insemination;
- insertion of intrauterine catheter and drainage of intrauterine fluid .

The first oestrus. Oestrus in mares was determined visually and by transrectal and ultrasonographic examination until the ovulation was detected. In all the 24 experimental mares, samples were collected from the endometrial surface for examination of bacterial microflora and infiltration of polymorphonuclear leukocytes. At the same time, endometrial biopsy specimens were obtained for histological examination. In 6 to 14 days, the oestrus was synchronized in mares repeatedly.

The second oestrus. During the oestrus period of mares, reproductive organs were examined transrectally and with an ultrasound. We determined the uterus and ovaries condition, number and size of follicles, number and size of corpus luteum, degree of endometrial oedema in order to establish the optimal time of artificial insemination. When the following signs of oestrus were detected in mares: soft and wide cervix, large and soft uterus, one to two soft preovulatory follicles, as well as endometrial oedema and follicles in diameter ≥ 35 mm by ultrasonographic examination, then mares were artificially inseminated using freshly cooled semen. For the semen extending, Kenney semen extender was used, obtaining an insemination dose of 500×10^6 progressively motile spermatozoa. To aid the ovulation, immediately after artificial insemination mares were injected intravenously 1500 international units (IU) human chorionic gonadotropin (hCG). The onset of ovulation was controlled with a transrectal palpation and ultrasonograph every other day until the ovulation was detected.

Mares were randomly divided into three experimental groups – A, B, and C group. **In experiment A and B group mares**, after artificial insemination the cervix was occluded by inserting in the uterus a sterile intrauterine 63 cm long Bivona catheter. At the end of the catheter, there was a balloon type cuff and after insertion, it was filled with 80 ml of air so ensuring the catheter situation in the uterus and occlusion of the cervix that no fluid could escape via it. After artificial insemination and experimental occlusion of the cervix, mares were stabled for 25 hours.

In the experiment A group mares, the intrauterine catheter was closed for 25 hours, then it was opened and the intrauterine fluid drained into a sterile Falcon cylinder. After that, the uterus was lavaged (irrigated) and catheter withdrawn. **In the experiment B group mares**, the intrauterine catheter was opened after six hours, the intrauterine fluid was drained and the catheter was closed for 19 hours. After that, the intrauterine fluid was drained again.

Previously inserted Bivona catheters were used to lavage the uterus with 500ml of Ringer's solution. In two minutes, fluid was drained and collected in a special bag. To drain fluid out of the uterus as much as possible, mares received 10 IU oxytocin intramuscularly. After the uterus lavage, the intrauterine catheter was removed.

In the experiment C group mares, which served as a control group, intrauterine fluid was allowed to drain out free via cervix. Twenty-five hours after artificial insemination, a sterilized, regular-sized tampon was placed into the uterus. After 20 minutes, the tampon was removed by a string through a sterilized speculum. The fluid absorbed into the tampon was squeezed out into a sterile Falcon cylinder with a sterile garlic press. In mares of experiment C group, after removal of the tampon, a Bivona catheter was inserted into the uterus through which the lavage was performed with 500 ml of Ringer's solution, and the further manipulations were performed as in mares of experiment A and B group.

In the intrauterine fluid of experiment group A, B, and C mares, the concentration of polymorphonuclear leukocytes was determined, where 25 μ l of intrauterine fluid were extended with 475 μ l of 2% methylene violet acetic acid. The obtained mixture was placed into the Bürker's chamber with a microdropper for counting polymorphonuclear leukocytes under light microscope with 20 X and 40 X of magnification.

During the artificial insemination (0 hour), as well as 6, 25, and 48 hours after artificial insemination and after ovulation, **endometrial oedema was determined** using ultrasonographic (Sono Site Vet 180 plus with a 5-MHz transrectal probe) examination. The expression of endometrial oedema was scored from 0 to 5, as Ginther and Pierson have described (1994).

At the same time, the amount of intrauterine fluid accumulation was determined with ultrasound expressed as area units (mm^2) by measuring its length (mm) and width (mm).

On the 16th day after the ovulation, pregnancy diagnosis was made by a manual palpation and ultrasonography. In pregnant mares, on day 16 after the ovulation abortion was caused using a single intramuscular injection of cloprostenol. On the 4th – 6th day after cloprostenol administration, mares showed signs of oestrus. Non-pregnant mares were also oestrus synchronized.

The third oestrus. In all experiment group mares, like at the first oestrus, specimens were obtained for determination of endometrial surface bacterial microflora and infiltration of polymorphonuclear leukocytes. Transrectal and ultrasonographic examinations of mares were performed until the ovulation was detected.

The fourth oestrus. The experiment schema of manipulations performed was similar to that in the second oestrus period. The only difference was that at the fourth oestrus, a Bivona catheter was inserted and the cervix occluded in those mares, which in the second oestrus period were control group C. In turn, those 10 mares, in which the cervix was occluded in the second oestrus period, they served as a control group C.

The fifth oestrus. From all mares, endometrial biopsy specimens were obtained to determine the histological status of endometrium after the experiment.

Microbiological examination of the endometrial surface and determination of infiltration of polymorphonuclear leukocytes

Specimens of the endometrium surface for microbiological examination and determination of infiltration of polymorphonuclear leukocytes were taken by a sterile double guarded swab pipette and the cotton tampon of which was in contact with the endometrium at least 20 seconds.

For detection of gram-positive microorganisms *Escherichia coli* and *Streptococcus spp.* the samples were plated on a meat peptone agar containing 5% of sheep blood. For a precise differentiation of *E. coli*, Endoagar and MacConkey agar were used, and for differentiation of *Streptococcus* genus bacteria serological tests were used. To differentiate *Staphylococcus* genus bacteria, mannitol salt agar was used. Specimens were incubated into thermostat at +37 °C for 24 hours. After 24 hours of incubation, a half-quantitative evaluation of endometrial bacteriological microflora was performed according to Macintosh (1981) when the evaluation is scored in compliance with the number of colonies on the blood agar surface.

The same specimens, examined for microbiological status, were used to determine the infiltration of polymorphonuclear leukocytes. Smears were prepared on slides, dehydrated, fixed in methanol, and stained by May-Grünwald-Giemsa method (Jain, 1986). The infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the endometrium was evaluated under a light microscope (400 x magnification) in 10 vision fields (Brook, 1993). The obtained results were evaluated using a half-quantitative method.

Sampling and evaluation of endometrial biopsies of mares

Endometrial biopsy specimens were obtained during the first and fifth oestrus period to determine the histological status of endometrium before and after the cervix occlusion. Endometrial biopsy specimens were obtained from the ventral wall at the base of right or left horn. The histological slides were examined under a light microscope 100, 200, and 400 times of magnification where we determined the degree of infiltration of polymorphonuclear leukocytes, periglandular fibrosis, glandular cystic dilatation, and amount of lymphatic lacunae according to Kenney and Doig (1986). Endometrial histological evaluation was scored from 0 to 5.

Determination of IL-6 and TNF- α inflammatory cytokines in intrauterine fluid

Intrauterine fluid specimens obtained from experimental A, B, and C group mares were used to determine IL-6 and TNF- α by Western Blotting method (Burnette, 1981). In total, 12 specimens were used: 4 specimens from experiment A group, 2 specimens from experiment B group mares, and 6 specimens from group C or control group mares in the second and fourth oestrus period. Protein concentration in intrauterine fluid was determined by Bradford's (Bradford, 1976) technique. Then protein was separated with SDS- PAGE and transferred to the nitrocellulose membrane as described by Sirois and Doré (1997). Membranes were probed with a specific immune antisera against IL-6 and TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Interleukin-6 and TNF- α presence was determined by using anti-goat polyclonal antibody after which ECL Plus Western Blotting Detection Reagents were used.

Data statistical processing

The data obtained in the study were statistically processed by Excel 2003 and SPSS 11.5 program with probability 95% or significance level $P < 0.05$. Mean arithmetic value and the standard error (SEM) were calculated for each parameter. Wilcoxon test of related samples was applied for comparison of polymorphonuclear leukocytes concentration, intrauterine fluid, and endometrial oedema. Whereas, Mann-Whitney U test of unrelated samples between different groups of mares was used (Arhipova, Băliņa, 2003).

Spearman correlation analysis (Paura, Arhipova, 2002; Arhipova, Băliņa, 2003) was applied for determination of the correlation and statistical significance among parameters of endometrial histological examinations.

RESULTS AND DISCUSSION OF THE STUDY

Bacterial microflora of endometrium and infiltration of polymorphonuclear leukocytes

Samples of the endometrium of mares for determination of bacterial microflora and number of leukocytes were obtained during the first and third oestrus period. In literature (Nielsen et al., 2005) it is stressed that *Streptococcus spp.* and *Escherichia coli* are most often reasons causing endometritis in mares, that is why in this study of endometrial microflora more attention was paid to these microorganisms. In the result of bacteriologically examined 48 samples, in none of the mares involved into the experiment the above mentioned microorganisms were not found; however, in two mares (Oliivia and Yrri) *Staphylococcus spp.* microorganisms were found present. LeBlanc (2009) points out that *Staphylococcus spp.* isolated from the endometrium might cause subclinical endometritis. Albin et al., (2003) are of the opinion that cases when the endometrial bacterial microflora is detected in mares but the infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the endometrium is not found are associated with the sample contamination during its preparation. It should be remarked that in two mares (Oliivia and Pika), at the same time in the samples of endometrium both infiltration of polymorphonuclear leukocytes and *Staphylococcus spp.* were detected. Riddle et al. (2007) reports that in mares, in which is isolated uterine microorganisms and detected infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the endometrium, endometritis of bacterial origin is observed.

A question is still topical – whether the presence of polymorphonuclear leukocytes in the endometrium without uterine bacterial microflora should be considered as a predisposing factor for endometritis (LeBlanc, 2009). Nielsen et al. (2008) think that mares in which infiltration of polymorphonuclear leukocytes are detected but the results of microbial contamination are negative should be considered as endometritis predisposed mares.

In spite of the fact that different authors opinions are contradictory, we consider that *Staphylococcus spp.* presence in the endometrium of one mare indicates the sample contamination during its preparation; whereas the mare in which both *Staphylococcus spp.* and polymorphonuclear leukocytes were isolated, possibility of subclinical endometritis was not excluded.

Histological status of endometrium before and after occlusion of the cervix

Evaluation of the uterine health condition and endometrial histological status was evaluated during the first oestrus period, i.e. before the cervix occlusion as well as in the fifth period when the experiment was finished.

In most part of the mares before (14 mares) and after (12) the treatment, changes of the endometrium were expressed as little up to moderate, and according to Kenney and Doig (1986), they corresponded to category IIA characterized by a slight infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the *stratum compactum* and little expressed periglandular fibrosis.

In the present study, amount of lymphatic lacunae and spread in the endometrial histological specimens decreased during the fifth oestrus period in comparison with the first oestrus period. In addition, there was no statistically significant correlation between the categories of lymphatic lacunae in the endometrium before and after the experiment ($r = 0.13$, $P = 0.5$). Kenney et al. (1978) indicate that lymphatic lacunae are most often observed in old pluriparous mares as well as in mares with reduced myometrial contractions and impaired intrauterine fluid clearance of the uterus. Bergman et al. (1975), in turn, stress that the presence of lymphatic lacunae in the endometrial histological samples is associated with the invasive way of obtaining biopsies, and as studies show their role in inflammation etiology is still unknown.

When analyzing endometrial biopsies, it was established that the cystic glandular dilatation had a tendency to increase after the experiment (fifth oestrus) in comparison with the pre - experiment period (first oestrus), but the increase was statistically insignificant ($p > 0.05$). Kenney (1978) also indicates that cystic glandular dilatation is often observed in mares, especially in old mares. Ricketts et al. (1975) point out that exact cause of uterine cystic dilatation development in the mare is unknown, and advance a hypothesis that one of the causative agents might be endometrial periglandular fibrosis.

In endometrial histological samples, expression of inflammation cell infiltration and periglandular fibrosis were evaluated separately.

A diffuse lymphocyte infiltration was observed both in *stratum compactum* and *stratum spongiosum*. The intensity of lymphocyte infiltration in the endometrial histological samples before the experiment was 1.8 ± 0.2 but post experiment 1.52 ± 0.03 scores (Fig. 2). Differences of the results were statistically insignificant ($p > 0.05$). An insignificant medium correlation between the intensity scores of lymphocyte infiltration in the endometrium of mares pre and post experiment was observed ($r = 0.42$, $P = 0.11$). The decrease of intensity of lymphocyte infiltration after the treatment might be explained with administration of prostaglandin injections in oestrus synchronization, as well as the uterine lavage with 0.9% of physiological saline solution. It should be remarked that the lymphocyte infiltration in the endometrium is considered as an indicator of chronic endometrial inflammation in mares (Kenney, 1978). Oddsdottir et al. (2008b) suggest that the lymphocyte infiltration in the endometrium appears 20 hours after semen or *Streptococcus zooepidemicus* has penetrated into the uterus.

In our studies, a great attention was paid to periglandular fibrosis of endometrial glands that, as literature sources suggest (Ellensberger et al., 2008) is one of the major causes of infertility and early embryonic death in mares. In this investigation, periglandular fibrosis of endometrial glands in mares

before the cervix occlusion corresponded with 1.35 ± 0.02 , but after the treatment 2 ± 0.05 scores (Fig.3). Between the scoring of periglandular fibrosis before and after the experiment there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) as well as poor but statistically significant correlation ($r = 0.24$, $p = 0.01$).

In all, this study shows that an experimental occlusion of the cervix did not increase the intensity of lymphocyte infiltration in the endometrial biopsies while the periglandular fibrosis had increased significantly.

Analysis of pregnancy rates in mares

A comparative evaluation of pregnancy rates was made after the second and fourth oestrus period in experimental A, B, and C group mares 16 days after artificial insemination, and they are presented in figure 4. As the data show, the pregnancy rate after insemination in the fourth oestrus period was 2.5 times lower (16.7%) compared to that of the second oestrus period (41.7%) indicating that occlusion of the cervix in the second oestrus period, possibly, affected significantly the pregnancy rates in the fourth oestrus period.

In our study, we observed that cervical occlusion had increased the development of periglandular fibrosis of endometrium, which, in turn, possibly had influenced the pregnancy rates in mares. There was a poor statistically insignificant correlation between the endometrial periglandular fibrosis and pregnancy rates ($r = 0.3$, $p > 0.05$).

Carnevale et al. (1992; 2008) point out that not only the age of mares but also the health condition of uterus affects pregnancy rates in mares, especially prolonged inflammation of the uterus. Troedsson (1997), in turn, mentions that inflammation, especially recurrent endometritis, may cause degenerative changes and early embryonic death. Oddsdottir et al. (2008) suggest that exactly endometrial periglandular fibrosis is the most often cause of early embryonic death in mares, and that the degree of periglandular fibrosis expression is directly associated with the uterus abilities to carry the foal until the term. If periglandular fibrosis affects a large part of endometrium then a positive pregnancy result decreases to minimum.

Amount of intrauterine fluid and endometrial oedema in mares after artificial insemination

In our study, a special attention we paid to the cervix importance in intrauterine fluid drainage from the uterus lumen in mares after artificial insemination. Dynamics of intrauterine fluid accumulation (IUFA) during the second oestrus period is shown in Figure 5.

In the second oestrus period at the time of artificial insemination of experiment C group (control group) mares we observed intrauterine fluid accumulation, and its amount was $418.3 \pm 35.0 \text{ mm}^2$, only a little less than in mares of experimental groups A and B, $516.7 \pm 124.3 \text{ mm}^2$ and $683.8 \pm 448.1 \text{ mm}^2$, respectively. Six hours after artificial insemination, IUFA increase was observed in mares of all groups independently of cervical opening, in C group mares $960.6 \pm 80.0 \text{ mm}^2$; A and B group mares $1170.3 \pm 205.3 \text{ mm}^2$ and $1500.0 \pm 589.4 \text{ mm}^2$, respectively; however, the differences were insignificant ($p > 0.05$). Twenty-five hours after artificial insemination IUFA in the uterus was increased, in particular in experimental groups A and B, up to $3125.0 \pm 338.7 \text{ mm}^2$ and $3037.5 \pm 459.7 \text{ mm}^2$, respectively, that in comparison with parameters of control group C ($792.0 \pm 66.0 \text{ mm}^2$) differed significantly ($p < 0.05$). It should be remarked that despite of the fact that in mares of the experimental group B catheter was opened after six hours and fluid drained, 25 hours after artificial insemination fluid in the uterus had increased and reached the amount of IUFA of A group animals in which the catheter was closed for 25 hours after artificial insemination.

Twenty-five hours after AI, the intrauterine catheter was removed in all group mares and at the same time, oxytocin of 10 IU was injected to aid a free flow of the fluid via cervix. On next day, 48 hours after AI, we repeatedly determined intrauterine fluid accumulation in the uterus. As a result, IUFA was decreased in all groups of mares: treatment A – from $3125.0 \pm 338.7 \text{ mm}^2$ to $495.0 \pm 68.5 \text{ mm}^2$, treatment B – from $3037.5 \pm 459.7 \text{ mm}^2$ to $637.5 \pm 245.5 \text{ mm}^2$, and treatment C – from $792.0 \pm 66.0 \text{ mm}^2$ to $404.2 \pm 36.7 \text{ mm}^2$. The differences between the experimental groups A, B, and C 48 hours after artificial insemination were statistically insignificant ($p > 0.05$). The experiment was continued until the ovulation was detected. After the ovulation, accumulation of intrauterine fluid continued to decrease in all groups of mares except group A mares in which the amount of intrauterine fluid had increased, but the increase was statistically insignificant ($p > 0.05$).

In the fourth oestrus period at the time of artificial insemination (see Fig.6), treatment C (control group) mares had intrauterine fluid accumulated $182.5 \pm 42.4 \text{ mm}^2$, treatment A and B animals the amount of IUFA was $171.0 \pm 75.6 \text{ mm}^2$ and $16.7 \pm 8.2 \text{ mm}^2$, respectively, and differences were insignificant ($p > 0.05$). In the fourth oestrus period, similar to the second oestrus period, six hours after AI an increase of intrauterine fluid accumulation was observed in all group mares: control group C – $2445.0 \pm 204.2 \text{ mm}^2$, treatment A mares – $1657.1 \pm 162.7 \text{ mm}^2$, and treatment B mares – $1700.0 \pm 558.0 \text{ mm}^2$. Differences of intrauterine fluid accumulation between groups at this time were insignificant ($p > 0.05$). Twenty-five hours after AI, the amount of intrauterine fluid accumulation was increased in treatment groups A and C, to $315.0 \pm 508.0 \text{ mm}^2$ and $2850.0 \pm 228.1 \text{ mm}^2$, respectively. In treatment group B mares, in which the catheter was opened, a decrease of IUFA was observed from $1700.0 \pm 558.0 \text{ mm}^2$ to $1133.3 \pm 320.9 \text{ mm}^2$, respectively. Differences of intrauterine fluid accumulation between the treatment group B and control group C were significant ($p < 0.05$).

In the same way as in the second oestrus, 25 hours after AI, the intrauterine catheter was removed in all group mares and at the same time, oxytocin of 10 IU was injected to facilitate a free fluid flow via cervix. On next day, 48 hours after AI, we determined repeatedly intrauterine fluid accumulation in the uterus. As a result, IUFA was decreased in all groups of mares: treatment A- from $3150.0 \pm 508.0 \text{ mm}^2$ to $740.0 \pm 112.3 \text{ mm}^2$; treatment B – from $1133.3 \pm 320.9 \text{ mm}^2$ to $487.5 \pm 162.4 \text{ mm}^2$, and control C – from $2850.0 \pm 228.1 \text{ mm}^2$ to $930.0 \pm 83.3 \text{ mm}^2$. After the ovulation, a slight and statistically insignificant ($p > 0.05$) increase of intrauterine fluid accumulation was observed in all groups of mares.

Risco et al., (2009) have detected that in the group of mares, which received oxytocin treatment 4, 8, and 25 hours after artificial insemination observed less intrauterine fluid accumulation, and concluded that myometrial contractions had a significant role in the uterine clearance.

To ascertain the experiment A and B long-term effect on intrauterine fluid accumulation in the uterus lumen, a comparative evaluation was made between control groups during the second and fourth oestrus period (Fig.7). As a result, we observed that in control group (C) mares of the fourth oestrus period, which had a closed intrauterine catheter in the second oestrus period, the amount of intrauterine fluid was significantly larger ($p < 0.05$) compared with control group (C) mares of the second oestrus period, which had an opened cervix before the experiment.

The obtained results show evidence that cervical occlusion increases significantly the amount of intrauterine fluid in mares after artificial insemination.

Several authors mention that the major factor among many factors causing intrauterine fluid accumulation in the uterus lumen is impaired mechanical uterus clearance of intrauterine fluid via cervix (Evans et al., 1989; LeBlanc et al., 1989; Troedsson et al., 1991).

In all, we should agree with authors who emphasize the important role of cervix in intrauterine fluid drainage (Evans et al., 1987; Allen, 1990; Causey, 2007; LeBlanc, 2008; Pycock, 2009). As Nielsen

(2005) has reported, intrauterine fluid is an adequate media for bacterial proliferation and development in the uterus, as well as it decreases pregnancy rates in mares.

Together with intrauterine fluid accumulation measurements, we determined the degree of endometrial oedema. It is well known that endometrial oedema appears and becomes visible in ultrasonograph at the end of dioestrus period and becomes more prominent as oestrus progresses. Two days before the ovulation, oedema diminishes but disappears completely on day of the ovulation (Nielsen, 2005). In the present research, we observed that during artificial insemination (0 h) endometrial oedema varied from category 0 to 2 both in the second and fourth oestrus period in all experiment mares of groups A, B, and C. During six hours after artificial insemination, endometrial oedema increased up to 2.5. Starting with the 25th hour post AI, endometrial oedema again had a tendency to decrease both in the second and fourth oestrus period in all groups of mares. The lowest degree of oedema was at the time of ovulation.

A long-term effect of occluded cervix (experiment A and B) on the development of endometrial oedema, comparing control group mares in the second oestrus period, which had an opened cervix, and control group mares in the fourth oestrus period, which had occluded cervix in the second oestrus period, is graphically shown in Figure 10. Here we can see that during the time of all experiment, in control group (C) mares endometrial oedema did not differ both in the second and fourth oestrus period ($p > 0.05$).

In literature (Haynes et al., 1985; Ginther et al., 1994; Plata-Madrid et al., 1994), there are data that in 90% of mares at the time of ovulation endometrial oedema has diminished or is not observed at all. Several authors (McKinnon et al., 1988; Ginther et al., 1994; Sampers, 1997) in their studies, using various mare breeds, have established that endometrial oedema decreased already two days before the ovulation.

If we compare a long-term effect on intrauterine fluid accumulation in the uterus lumen and endometrial oedema (Fig. 7 and 9), we can see that it increased the amount of intrauterine fluid in mares after artificial insemination, but at the same time, did not affect endometrial oedema. However, in several studies (Haynes et al., 1985; Griffin et al., 1991; Plata-Madrid et al., 1994; Pycocock et al., 1995; Pelehach et al., 2002) there are indications that simultaneously with endometrial oedema in the oestrus period, fluid is visible, the reason of which is an elevated level of circulating estrogen in the blood.

Polymorphonuclear leukocytes in intrauterine fluid

Summarizing the obtained data on the concentration of polymorphonuclear (PMN) leukocytes in intrauterine fluid, a conclusion can be drawn that in mares of treatment A, B, and C in the fourth oestrus period the concentration of polymorphonuclear leukocytes has increased compared to the second oestrus period (Fig.11).

In mares of treatment A, concentration of polymorphonuclear leukocytes has significantly increased from $73.2 \pm 8.4 \cdot 10^6/\text{ml}$ in the second oestrus period to $143.3 \pm 17.3 \cdot 10^6/\text{ml}$ in the fourth oestrus period ($p < 0.05$). In mares of treatment B 6 hours after AI, the concentration of polymorphonuclear leukocytes in the second oestrus period was $46.0 \pm 14.2 \cdot 10^6/\text{ml}$, in the fourth oestrus period – $81.4 \pm 16.9 \cdot 10^6/\text{ml}$, twenty-five hours after AI the concentration of PMN leukocytes was 66.3 ± 19.9 and $97.9 \pm 16.7 \cdot 10^6/\text{ml}$, respectively, but these differences were statistically insignificant ($p > 0.05$). In control group C, the concentration of polymorphonuclear leukocytes in the intrauterine fluid had significantly increased from $3.3 \pm 0.2 \cdot 10^6/\text{ml}$ in the second oestrus period to $29.1 \pm 3.0 \cdot 10^6/\text{ml}$ in the fourth oestrus period ($p < 0.05$). This increase explains the significant role of cervix in drainage of polymorphonuclear leukocytes out of the uterus because a long-term cervical occlusion in the oestrus period has a negative effect on the defense functions of the uterus in the fourth oestrus period.

When the endometrium receives such an irritation as spermatozoa or bacteria, a rapid inflammation process starts and polymorphonuclear leukocytes migrate from veins and veinules in the uterus lumen, as well as intrauterine fluid accumulates (Nikolakopoulos et al., 2000). There are data in literature that the

infiltration of polymorphonuclear leukocytes starts 30 minutes post AI and decreases within 24 hours after that (Kotilainen et al., 1994; Katila, 1995; Katila, 2001).

To aid the recovery of uterus, in the second and fourth oestrus period 25 hours after AI, in all experiment groups of mares a uterus lavage (irrigation) was performed with 500 ml of 0.9% NaCl solution. In the obtained lavage fluid, the concentration of polymorphonuclear leukocytes was determined 10^6 /ml. Similar to intrauterine fluid, also in the lavage fluid concentration of PMN leukocytes in the fourth oestrus period in mares has increased significantly compared to the second oestrus period from $1.0 \pm 0.1 \cdot 10^6$ /ml to $21.5 \pm 2.2 \cdot 10^6$ /ml, respectively ($p < 0.05$). These findings approve that the occlusion of the cervix with an intrauterine catheter in the second oestrus period has facilitated the increase of polymorphonuclear leukocytes in the fourth oestrus period. Literature data show that for preventive purposes in endometritis predisposed mares the optimum time of uterine lavage is four hours after AI (Brinsko et al., 1990, 1991, 2003).

Presence of inflammatory markers in intrauterine fluid of mares

In order to evaluate endometritis as a response to the semen introduction in mares with experimentally occluded cervix we determined the intensity of inflammation markers TNF- α and IL-6 expressions, and the amount of polymorphonuclear leukocytes in intrauterine fluid in the second and fourth oestrus period. Investigations approve that the semen plasma and semen extender increase IL-6 and TNF- α expression in the intrauterine fluid of mares (Palm et al., 2008). TNF- α is an acute phase protein that stimulates other cytokines to be involved in the process of inflammation, as well increases penetrability of the blood vessels thus directing polymorphonuclear leukocytes and macrophages to the site of inflammation. Interleukin-6 like TNF- α is an acute phase protein which is the major regulator of an acute inflammatory response in the body, and the expression of which in the body is stimulated by tissue lesions, endotoxins of bacteria, and TNF- α .

In the present investigation, comparing TNF- α and IL-6 expressions with the concentration of polymorphonuclear leukocytes in intrauterine fluid in **the second oestrus period** it was detected that at a higher PMN leukocyte concentration in treatment A and B mares the expression intensity of inflammation markers decreased. In turn, at a lower PMN leukocyte concentration seen in control group mares, expression of inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in intrauterine fluid was more intense. The obtained results disagree with above mentioned literature data, and we cannot explain that, as further research is needed with a larger number of animals.

Comparing TNF- α and IL-6 expressions with the concentration of polymorphonuclear leukocytes in intrauterine fluid in **the fourth oestrus period** it was detected that at a higher PMN leukocyte concentration in treatment A group mares the expression intensity of inflammation markers increased. In turn, at a lower polymorphonuclear leukocyte concentration seen in control group mares, expression of TNF- α and IL-6 in intrauterine fluid was lower. In this case, our results agree with those mentioned in literature (Cadario et al., 2002) where it is indicated that IL-6 possibly has a protective effect on endometrium during the oestrus period in young mares when one of the most powerful inflammatory agents – spermatozoa enter the uterus. The role of TNF- α in etiology of inflammation is still not clearly known (Fumuso et al., 2003). It is determined that TNF- α in woman, stimulates IL- synthesis and secretion. It is found in literature that also under the effect of age the increase of inflammatory cytokine intensity is observed in peripheral blood (Adams et al., 2008, 2009).

CONCLUSIONS

A long-term occlusion of the cervix after artificial insemination in mares increases significantly ($p < 0.05$) periglandular fibrosis of endometrium and decreases pregnancy rates in mares.

Occlusion of the cervix in the second oestrus period has not facilitated development of inflammation of bacterial origin in the fourth oestrus period.

During the time of artificial insemination, intrauterine fluid accumulation is observed in mares. Six hours after artificial insemination, intrauterine fluid has a tendency to increase independently of the opening of the cervix. Twenty-five hours after artificial insemination, intrauterine fluid accumulation in the uterus increases significantly ($p < 0.05$) in mares with impaired fluid drainage via cervix.

The degree of expression of endometrial oedema has no direct association with the amount of intrauterine fluid in the uterus.

An impaired intrauterine fluid drainage via cervix after artificial insemination increases significantly ($p < 0.05$) polymorphonuclear leukocyte concentration and causes an increase of intensity of inflammatory cytokine TNF- α and IL-6 expression in intrauterine fluid.

SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES

1. Liepiņa E., Antāne V., Rivera del Alamo M.M. (2010) Intrauterine fluid secretion in mares after artificial insemination. *Proceedings of the 16th International Scientific Conference „Research For Rural Development 2010”*. Jelgava, 19-21, pp. 12 – 16.
2. Liepina E., Alamo del. M.M., Reilas T., Katila T. (2010) IL-6 and TNF- α expression in uterine fluids of mares with induced delay in uterine clearance. *Proceeding of the 10th International Symposium on Equine Reproduction. Animal Reproduction Science. (Vol. 121)*, Kentucky, USA, pp. 107 – 109.
3. Liepina E., Antane V. (2010) Endometrial histological changes and pregnancy rates in mares with impaired uterine drainage. *Proceedings of the 29th International Scientific Conference Animals. Health. Food Hygiene*. Jelgava, pp. 73 – 78.
4. Reine E., Reilas T., Rivera del Alamo M.M., Katila T. (2008) Effect of impaired uterine drainage via cervix in normal mares after insemination. *16th International Congress on Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 43, Suppl 3)*, Budapest, Hungary. pp. 112.
5. Katila T., Reine E., Reilas T. (2008) Functioning cervical drainage is important for uterine clearance of mares after insemination. *12th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 43, Suppl 5)*, Utrecht, The Netherlands. pp 106 - 107.
6. Rivera del Alamo M.M., Reine E., Reilas T., Rodriguez - Gil J.E., Fernandez - Novell J.M, Ballester J., Katila T. (2009) Interleukin-1 beta, Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor - alpha expression on equine endometrium determined by immunohistochemistry. *13th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Reproduction in Domestic Animals (Vol 44, Suppl 3)*, Ghent, Belgium. pp. 12.

ACKNOWLEDGMENTS

I am grateful to DVM, MS, PhD, Animal Reproduction specialist, ECAR diplomate and professor of the Helsinki University Terttu Katila for giving me the opportunity to participate in international scientific research and to use this study for develop my thesis. I am also grateful to professor Terttu Katila for supervising my thesis and in assistance during publication process.

I am grateful to DVM, PhD Tiina Reilas for giving me the opportunity to participate in international scientific research and to use this study for develop my thesis. I am also grateful to Tiina Reilas in assisting me during publication process.

I am grateful to DVM, PhD, ECAR diplomate Maria Montserrat Rivera del Alamo for attendance in the experimental part of my thesis and for big help in performing Western Blotting, and in assisting me during publication process.

I am grateful to MTT Agrifood Research Finland, Equine College and expecially to stable managers for assistance with mares during the experiment.

I am grateful to Taina Koivuniemi and Anne Timonen for great assistance during the experiment.

I am grateful to Annica Böström for being my first teacher on equine reproduction.