



Latvijas Lauksaimniecības Universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte
Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sīgra”

Latvia University of Agriculture
Faculty of Veterinary Medicine
Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sīgra”

Mg. med. vet. **Ilga Šematoviča**

**Slaucamo govju asins morfoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji,
dzemdes mikrobiālā flora un endometrija pārmaiņas
pēcdzemdību periodā**

**Morphological and biochemical parameters of blood,
microbiological flora of uterus and changes of endometrium
in postparturition period in dairy cows**

Promocijas darba kopsavilkums
Veterinārmedicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Veterinārmedicīnas nozarē, dzemdniecības un ginekoloģijas apakšnozarē

Summary of promotion work for acquiring
The Doctor's degree of Veterinary Sciences in the Obstetric and Gynecology
science

Jelgava 2010

**PĒTĪJUMS VEIKTS AR ESF NACIONĀLĀS PROGRAMMAS "ATBALSTS LLU
DOKTORA STUDIJU ĪSTENOŠANAI", LĪGUMS NR. 04.4-08/EF2.PD.07
ATBALSTU**

Promocijas darbs izstrādāts:

- Latvijas Lauksaimniecības universitātes (LLU) Mācību un pētījumu saimniecībā (MPS) „Vecauce”,
- LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskajā institūtā “Sīgra”,
- Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorijā.

Research has been carried out at the:

- Extension and Research Farm of the Latvian Agricultural University “Vecauce”,
- Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sīgra”,
- Institute of Anatomy and Anthropology, Faculty of Medicine, Riga Stradins University.

Promocijas darba zinātniskie vadītāji:

LLU profesors, Dr. habil. agr., Dr. med. vet., LZA akadēmiķis

Aleksandrs Jemeljanovs

RSU profesore, Dr. habil. med., Dr. med., LZA korespondētājlocekle

Māra Pilmane**Scientific supervisors:**

LLU professor, Dr. habil. agr., Dr. med. vet., full member of the Latvian Academy of Sciences **Aleksandrs Jemeljanovs**

RSU professor, Dr. habil. med., Dr. med., the Corresponding member of the Latvian Academy of Sciences **Māra Pilmane**

Oficiālie recenzenti:

Official reviewers:

LLU profesors, Dr.med.vet. Arnis Mugarēvičs

LLU asociētā profesore, Dr.med.vet. Anda Valdovska

RSU profesore, M.D., Dr.med. Juta Kroiča

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2010. gada 30. Jūnijā plkst. 11:00, LLU Veterinārmedicīnas fakultātē Jelgavā, Kr.Helmaņa ielā 8, 1. auditorijā.

The defense of the thesis will take place at the Latvia University of Agriculture, Faculty of Veterinary Medicine on the June 30, 2010, at 11:00 o'clock.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā Jelgavā, Lielā ielā 2.

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Lielā street 2, Jelgava.

SATURS

| | |
|--|----|
| DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI | 4 |
| IEVADS | 5 |
| Pētījuma priekšmets un problēmas aktualitāte | 5 |
| Pētījuma mērķis un uzdevumi..... | 5 |
| Pētījuma novitāte..... | 6 |
| Zinātniskā darba aprobācija..... | 6 |
| MATERIĀLS UN METODIKA | 7 |
| Darba veikšanas vietas un darbā izmantotā ganāmpulka raksturojums..... | 7 |
| Promocijas darba kopējā shēma | 8 |
| Klīniskā novērtēšana, asins morfoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana | 8 |
| Mikrobioloģiskā izmeklēšana | 8 |
| Govs endometrija biopsijas paraugu ņemšana un izmeklēšana | 9 |
| Imūnhistoķīmiskā metode | 10 |
| TUNEL metode..... | 11 |
| Datu statistiskā apstrāde..... | 11 |
| PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA..... | 12 |
| Slaucamo govju vispārējā veselība un dzemdes involūcija | 12 |
| Dzemdes dobuma satura mikrobioloģiskie izmeklējumi..... | 18 |
| Endometrija pārskata aina un iekaisuma šūnu infiltrācija | 19 |
| Iekaisuma, augšanas un degradācijas faktoru klātbūtne un dinamika | 20 |
| SECINĀJUMI | 25 |
| IETEIKUMI PRAKSEI..... | 26 |
| PUBLIKĀCIJAS PAR PROMOCIJAS DARBA TĒMU | 26 |

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

| Saīsinājums | Angliski | Latviski |
|---------------|---------------------------------------|--|
| AAI | Institute of Anatomy and Anthropology | Anatomijas un Antropoloģijas institūts |
| ALAT | Alanine aminotransferase | Alanīna aminotransferāze |
| AP | Alkaline phosphatase | Sārmainā fosfatāze |
| ASAT | Aspartate aminotransferase | Aspartātaminotransferāze |
| Ca | Calcium | Kalcijs |
| Cl | Chlorum | Hlors |
| Cu | Copper | Varš |
| E2 | Estradiol | Estradiols |
| ECM | Extracellular matrix | Ekstracelullārā metrice |
| EO | Eozin | Eozīns |
| FFA | Free fatty acid | Brīvās taukskābes |
| Glc | Glucose | Glikoze |
| HE | Hematoxylin | Hematoksilīns |
| HM | Holstein cow | Holšteinas melnraibā govju šķirne |
| IMH | Immunohistochemistry | Imūnhistoķīmija |
| K | Kalium | Kālijs |
| LB | Latvian brown cow breed | Latvijas brūnā govju šķirne |
| LDH | Lactatdehydrogenase | Laktātdehidrogenāze |
| LLU | Latvia University of agriculture | Latvijas Lauksaimniecības universitāte |
| Mg | Magnium | Magnijs |
| MMP-9 | Matrix metalloproteinase-9 | Matrices metaloproteināze-9 |
| MPS | Research and training farm | Mācību un pētījumu saimniecība |
| Na | Natrium | Nātrijs |
| NGF | Nerve growth factor | Nervu augšanas faktors |
| NGFR p75 | Nerve growth factor receptor p 75 | Nervu augšanas faktora receptors p 75 |
| P | Phosphor | Fosfors |
| P4 | Progesteron | Progesterons |
| PCD | Programmed cells death | Programmētā šūnu nāve |
| PG | Prostaglandin | Prostaglandīns |
| PGF2 α | Prostaglandin F2 α | Prostaglandīns F2 α |
| PGP 9.5 | Protein gene product 9.5 | Proteīngēnviela 9.5 |
| RSU | Rīga Stradins University | Rīgas Stradiņa universitāte |
| Se | Selenium | Selēns |
| TNF- α | Tumor necrosis factor- α | Audzēju nekrotiskais faktors- α |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | Vaskulārais endoteliālais augšanas faktors |
| Zn | Zinc | Cinks |
| | | |

IEVADS

Pētījuma priekšmets un problēmas aktualitāte

Latvijā uz 2009. gada 1. janvāri bija 169.5 tūkstoši slaucamo govju. Kopš 2007. gada vidus slaucamo govju skaits Latvijā samazinājies par 13.5 tūkstošiem. Slaucamo govju skaita samazināšanās turpinās, bet vienlaicīgi pieaug to produktivitāte. Pēdējos piecos gados valstī vidējais izslaukums no govīs palielinājies no 4963 kg 2004. gadā uz 5487 kg piena no govīs 2008. gadā (Lauksaimniecības datu centrs, 2009. gads).

Slaucamo govju reproduktīvās sistēmas veselība ir ciešā saistībā ar produktivitātes pieaugumu, jo fizioloģisko procesu norise kļūst intensīvāka, kas savukārt atspoguļojas uz vielmaiņas slimību biežumu ganāmpulkos. Ir nepieciešami padziļināti pētījumi par reproduktīvās sistēmas funkcijām intensīvas piena lopkopības apstākļos, lai saglabātu augsta līmeņa produktivitāti un optimālu slaucamo govju reproduktīvās sistēmas veselību.

Piensaaimniecības nozare cieš milzīgus ekonomiskos zaudējumus slaucamo govju reproduktīvās sistēmas slimību dēļ, ko nosaka neiegūts piens neiegūti teļi, govju izbrākēšana, aborti, atkārtota mākslīgā apsēklošana, ārstēšanas izdevumi, servis perioda pagarināšanās, u.c.

Trūkst informācijas par bioloģiski aktīvu vielu, kā degradācijas, augšanas faktoru, neuropeptīdu klātbūtni un to mijiedarbību govīs endometrijā minētajā laikā, kā arī par programmētās šūnu nāves norisēm un citokīnu nozīmi involūcijas procesā govīs endometrijā.

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis bija noteikt govju asins morfoloģiskos un bioķīmiskos rādītājus, dzemdes mikrobiālo floru un endometrija pārmaiņas pirmajā un ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām fizioloģiskas un patoloģiskas dzemdes involūcijas gadījumā.

Promocijas darba uzdevumi.

1. Novērtēt pētījumā iekļautajām govīm veselības stāvokli, veikt dzemdes involūcijas kontroli.
2. Noteikt asins morfoloģiskos un bioķīmiskos rādītājus
3. Veikt dzemdes dobuma satura mikrobioloģisko izmeklēšanu.
4. Novērtēt slaucamo govju endometrija pārskata ainu un iekaisuma šūnu infiltrāciju.
5. Noteikt apoptotisko šūnu daudzuma, audzēju nekrotiskā faktora- α (TNF- α), vaskulārā endoteliālā augšanas faktora (VEGF), nervu augšanas faktora receptoru p75 (NGFR p75), proteīngēnvielas 9.5 (PGP 9.5) un

matrices metaloproteināzes-9 (MMP-9) pozitīvo struktūru klātbūtnes un ekspresijas relatīvā daudzuma pārmaiņas govju endometrijā.

Pētījuma novitāte

1. Vienkopus izvērtēti asins morfoloģiskie, bioķīmiskie rādītāji un dzemdes dobuma satura mikrobioloģiskie izmeklējumi pēcdzemdību periodā kopumā, kā arī saistībā ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdes involūciju.
2. Pirmo reizi vienkopus pēļtas slaucamo govju endometrija pārmaiņas un bioloģiski aktīvu vielu kā VEGF, MMP-9, NGFR p75, PGP 9.5, TNF- α , pozitīvo struktūru klātbūtne, dinamika un mijiedarbība endometrijā slaucamajām govīm pēcdzemdību periodā pirmajā un ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām fizioloģiskas un patoloģiskas dzemdes involūcijas gadījumos.
3. Pirmo reizi Latvijā pētīti iekaisuma, augšanas un degradācijas faktori slaucamo govju endometrijā, izmantojot imūnhistokīmiskās metodes.
4. Pirmo reizi mūsu valstī pētīta programmētās šūnu nāves intensitāte un dinamika govju endometrijā pēcdzemdību periodā, izmantojot TUNEL diagnostikas metodi.

Zinātniskā darba aprobācija

1. Sematovica I., Jemeljanovs A. „Primiparous cows general and reproductive system health in comparison with multiparous cows in postparturition period”. *14th International Conference on Production Diseases in Farm Animals*, 20-24th of June 2010. Gent, Belgium. Abstract submitted.
2. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. „Changes of the cow's endometrium, distribution of growth stimulating and degradation factors in postparturition period. *ICAR 2008*. 2008, July, 13–18, Budapest, Hungary, poster presentation.
3. Sematovica, I; Pilmane, M; Jemeljanovs, A. "Endometrial changes in postpartum period in cows". *XXVth World Buiatrics Congress*, 2008, July, 6-11, Budapest, Hungary, poster presentation.
4. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. “Inflammatory factors and apoptosis in the cows endometrium in the cow's endometrium in postparturition period.”, *International Scientific Conference Research for rural development 2008*, May, 21-23, 2008, Jelgava, Latvia, oral presentation.
5. Šematoviča I., Jemeljanovs A., Pilmane M. " Vascular endothelial growth factor, nerve growth factor receptor p75, protein gene product 9.5, tumor necrosis factor- α and apoptosis in the cow's endometrium in

- postparturition period". *Baltic Morphology 4th Scientific Conference. 2007*, November, 19-20. Riga, Latvia, poster presentation.
6. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. „Dzemdies auđu morfologĳija, apoptoze un matrices metaloproteināzes pēcdzemdĳbu periodā govĳm.” *Rĳgas Stradiņa universitāte 6.zinātniskā konference. 2007. g. 29–30.marts*, Rĳga, Latvija, postera prezentācija.
 7. Šematoviča I., Jemeljanovs A. „Optimal medication of the reproductive system diseases in dairy cattle.” *24th World Buiatrics Congress*, 15–19, October, 2006, Nica, France, poster presentation.
 8. Jemeljanovs A., Konošonoka I.H., Šematoviča I., Pūce B. „Microflora of the reproductive organs in dairy cows around calving”. *57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. 2006. September, 17–20. Turkey, Antalija*, poster presentation.

MATERIĀLS UN METODIKA

Darba veikšanas vietas un darbā izmantotā ganāmpulka raksturojums

Ilgas Šematovičas promocijas darbs „Slaucamo govju asins morfologĳiskie un bioķĳmiskie rādĳtāji, dzemdes mikrobiālā flora un endometrija pārmaiņas pirmajā un ceturtajā nedēļā pēc dzemdĳbām” izstrādāts laikā no 2003. gada februāra līdz 2010. gada janvārim.

Pētĳjums veikts, izmantojot Latvijas Lauksaimniecības universitātes (LLU) Mācĳbu un pētĳjumu saimniecības „Vecauce” (MPS) govĳs. Mikrobiologĳiskie izmeklējumĳi veikti LLU aģentūrā „Biotehnologĳijas un veterinārmedicĳnas zinātniskais institūts „Sĳgra” laboratorijās. Asins morfologĳiskos un bioķĳmiskos rādĳtājus noteicām SIA „Centrālā Laboratorija”. Govju endometrija morfologĳiskie un imūnhistokĳmiskie izmeklējumĳi veikti Rĳgas Stradiņa universitātes Anatomijas un Antropologĳijas institūta (RSU AAI) morfologĳijas laboratorijās.

MPS „Vecauce” slaucamo govju ganāmpulkā 2009. gada jūnijā, bija 277 ražojošas slaucamās govĳs ar vidējo izslaukumu 6557 kg gadā. Vidējais tauku saturs pienā ir 4.42 %, olbaltums 3.39 %, laktoze 4.92 %. Somatisko šūnu skaits pienā 2009. gada jūnijā bija 106 tūkstoši mililitrā. Atrāžošanas datu analĳze parāda, ka ar pirmo apsēklošanas reizi grūsnība iestājusies 60.3 % govju un vairāk kā divas reizes apsēklošana veikta 10.7 % govju. Vidējais serviss periods bija 151 diena.

Pēdējos gados MPS „Vecauce” notikušas pārmaiņas. Ir uzcelta jauna slaucamo govju novietne, kurā govĳs tur nepiesieti. Govĳs tiek grupētas un ēdinātas diferencēti, atkarĳbā no produktivitātes un laktācijas perioda. Augstraĳĳgo govju grupu slauc slaukšanas zālē divas reizes dienā, bet govju grupu, kur uzstādĳti slaukšanas roboti, slauc vairākas reizes diennaktĳ. Govju

atnešanās tiek organizēta īpašos atnešanās boksos dzemdību korpusā, kur tās tiek ievietotas īsi pirms dzemdībām.

Pētījumā iekļautas 38 govīs, kurām bija fizioloģiskas dzemdības, bez klīniski novērojamiem veselības traucējumiem.

Promocijas darba kopējā shēma

Izmeklējumi veikti pirmajā un ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām. Datu analīze veikta par pamatu ņemot pirmās un ceturtais dzemdību nedēļas izmeklējumu rezultātus, noteikti vidējie rādītāji, kā arī tika veikts salīdzinājums fizioloģiskas un patoloģiskas dzemdes involūcijas gadījumā

Govīs reģistrētas, tām veikta termometrija, klīniska novērtēšana, dzimumorgānu rektālā kontrole, asins morfoloģiskās un bioķīmiskās analīzes, dzemdes dobuma satura mikrobioloģiskā izmeklēšana, kā arī noņemti endometrija biopsijas paraugi histoloģiskai, imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai, kā arī apoptotisko šūnu noteikšanai.

Klīniskā novērtēšana, asins morfoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana

Izmēģinājumā iekļautas 38 slaucamās govīs pēc fizioloģiskām dzemdībām, bez klīniski redzamām saslimšanas pazīmēm. Ķermeņa temperatūra mērīta rektāli ar digitālo termometru. Lai kontrolētu dzemdes involūcijas norisi, visas pētījumā iekļautās govīs izmeklētas rektāli un ar vagīnas spoguļi. Novērtēts izdalījumu raksturs no dzimumorgāniem.

Asins morfoloģiskie izmeklējumi (kopējais leikocītu, eritrocītu, hemoglobīna daudzums, hematokrits), kā arī asins bioķīmiskie izmeklējumi (urīnvielas, holesterīna, kopējā proteīna un albumīnu daudzums, triglicerīdu un kreatinīna līmenis, kā arī alanīnaminotransferāzes (ALAT), aspartataminotransferāzes (ASAT), sārmainās fosfatāzes (SP), laktātdehidrogenāzes (LDH), α -amilāzes koncentrācija un Ca, P, Mg daudzums) veikti sertificētās laboratorijās (sertif. Nr. L 9/5-C, līdz 2010.18.05.) SIA „Centrālā laboratorija” (reģ. Nr. 215/L430-C), kur analīžu izpilde atbilst LVS EN ISO 15189:2007 standarta prasībām. Asins paraugi ņemti no astes vēnas sterilos vienreizējās lietošanas 3.0 ml un 4.5 ml vakutaineros „Becton Dickinson Vacutainer systems” un „Precision GlideTM”.

Mikrobioloģiskā izmeklēšana

Mikrobioloģiskie izmeklējumi veikti LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta „Sigra” mikrobioloģijas laboratorijās

(LATAK reģ. Nr. LATAK-T-038-06-99-A) pēc vispārpieņemtām akreditētām standartmetodēm: LVS ISO 7218:1996 un LVS NE ISO 6887-1:1999, kā arī LVS NE ISO 4833:2003 L. Sākotnēji ieguvām mikroorganismu polikultūras, bet no tām izolējām tīrkultūras. Paraugi no govju dzemdes dobuma satura mikrobioloģiskai izmeklēšanai ņemti ar vienreizējās lietošanas instrumentu komplektiem EquiVet (*Kruuse*, Dānija). Stafilokoku ģints mikroorganismu izolēšanai un identificēšanai no dzemdes dobuma satura lietotas sekojošas barotnes: Bairda – Parkera agars (*Biolife*, Spānija); Smadzeņu-sirds infūzijas buljons (*OXOID*, UK); Mannitola sāļu agars (*Becton Dickinson*, US); Barojošais agars ar 5% aitas asins piedevu; Liofilizēta truša plazma.

Grampozitīvās mikrofloras noteikšanai (*Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.* un *Aerococcus urinae*) dzemdes dobuma saturs uzsēts uz barojošā agara ar 5% aitas asins piedevu, paraugi inkubēti 37±1.0 °C temperatūrā 48 stundas, uzsējumus pārskatot pēc 24 stundām. Mikroorganismi līdz sugai noteikti, izmantojot *BBL Crystal* (US) grampozitīvo mikroorganismu identifikācijas sistēmu. Identifikācijas sistēmā iekļauti 33 substrātu fermentācijas, oksidācijas un hidrolīzes testi. Baktērijas identificējam, salīdzinot iegūtos reakciju rezultātus ar datu bāzē esošajiem. *Clostridium spp.* klātbūtne dzemdes dobuma saturā noteikta, izmantojot selektīvo barotni DRCM (ang. *Differential Reinforced Clostridium Medium, Scharlau Microbiology*). Anaerobi apstākļi nodrošināti, pārlejot mēģeni ar inokulēto barotni ar sterilu vazelīnēlļu. Paraugi inkubēti 37±1.0 °C temperatūrā 96 stundas. *Enterobacteriaceae* jeb gramnegatīvā mikroflora, kur ietilpst *Pseudomona spp.*, *Klebsiella spp.*, un *Proteus spp.*, noteikti izmantojot selektīvās barotnes: *MacConkey* agars (*Difco BBL*); Laktozes *TTC* agars (*SIFIN*, Vācija). Uzsējumi inkubēti 37±1.0 °C temperatūrā 48 stundas, uzsējumus pārskatot pēc 24 stundām. Mikroorganismi līdz sugai noteikti, izmantojot *BBL Crystal* (US) gramnegatīvo mikroorganismu identifikācijas sistēmu.

Govs endometrija biopsijas paraugu ņemšana un izmeklēšana

Govju endometrija biopsijas paraugi ņemti dzemdes raga, kur grūsnības laikā attīstījās auglis, dorsālās sienas ventrālās virsmas, izmantojot biopsijas instrumentu (Denmark, „*Kruuse*”, kat. nr.:141700k). Endometrija audu paraugiem veikta: endometrija pārskata ainas mikroskopiska novērtēšana, noteikta iekaisuma šūnu infiltrācija endometrijā (Aughey, Frye, 2001; Corbeil et al., 2005), veikti imūnhistoķīmiskie izmeklējumi, lai konstatētu TNF- α , VEGF, NGFR p75, PGP 9.5 un MMP-9 pozitīvo struktūru klātbūtnes un relatīvā daudzuma pārmaiņas (Hsu et al., 1981). Lai novērtētu apoptozes procesu intensitāti, veikta TUNEL diagnostikas metode, (Negoescu et al., 1998). Katrs dzīvnieks biopsijas procedūrai tika iepriekš sagatavots,

nomazgājot ar ziepēm un ūdeni, dezinficējot ārējos dzimumorgānus (70° *Spiritus Aethylici*). Biopsijas instrumentu ievadīja caur pavērtām kaunuma lūpām, vagīnu, dzemdes kaklu. Kontrolējot rektāli, no dzemdes dorsālās sienas ventrālās virsmas izgriezts apmēram 0.3 x 0.2 mm endometrija audu gabaliņš. Paraugus ievietojam apzīmētos konteineros ar 3.0 ml 10 % formalīna šķīdumu pH 7.5 (Humason, 1967), kur tie uzglabāti līdz izmeklēšanai. Laboratorijā govju endometrija biopsijas paraugi izņemti no formalīna šķīduma un "ieguldīti" parafīnā, veidojot parafīnā ieslēgtus audu blokus, ko ar mikrotomu sagriežām 6 µm biezos griezumus. Tad griezumi tika ievietoti 50 °C ūdens vannā, uzlikti uz attaukota priekšmetstikliņa un ievietoti termostatā 56 °C nožāvēšanai uz 40 minūtēm (Eurell, Frappier, 2006).

Imūnhistoķīmiskā metode

Lai noteiktu govju endometrija audos vaskulārā endoteliālā augšanas faktora (VEGF, kods M7273, 1:50, *DakoCytomation*, Dānija), nervu augšanas faktora receptoru p75 (NGFR p75, kods M3507, 1:150, *DakoCytomation*, Dānija), proteīngēnvielu 9.5 (PGP 9.5, kods Nr.Z5116, 1:1600, *DakoCytomation*, Dānija), Audzēju nekrotisko faktoru- α (TNF- α , kods: Ab6671, 1:100, *Abcam*, Anglija), matrices metaloproteināzi (MMP-9, kods AF909, 1:100, *R&D System*, Vācija) pozitīvās struktūras, lietojam biotīna – streptavidīna imūnhistoķīmisko metodi (Hsu et al., 1981).

Paraugu deparafinizācijai audu paraugi tika izturēti etanolā (99.7–100%) un skaloti ar PBS (fosfātu buferis, pH 7.4) šķīdumu 10 min. Tad preparāti tika ievietoti 4% sālsskābā nātrija citrāta buferšķīdumā mikroviļņu krāsnī uz 20 min.. Preparātus atdzesējam un skalojam ar PBS divas reizes pa 5 min.. Katram griezumam uzklājam 150 µl 3 % ūdeņraža peroksīdu uz 10 min., tad skalojam ar destilētu ūdeni un 2 reizes ar PBS pa 5 min.. Fona noņemšanai lietojam serumu 10 min. (100 ml destilēts ūdens ar 0.03 g vērša sauso serumu). Sekoja primāro antivielu uzklāšana pa 30 µl, ko izturējam 2 stundas. Preparātus noskalojam un uz 10 min. izturējam PBS. Preparātiem uzklājam LSAB + LINK (ang. *linked streptavidin antibody*) ar biotīnu saistītās sekundārās antivielas, uz 30 min., kods: K1015, *DakoCytomation*, Dānija). Tad 5 min. skalojam ar PBS un uzklājam LSAB + KIT (ang. *streptavidin connected with enzyme peroxidase* – streptavidīnu, kas saistīts ar enzīmu peroksidāzi, kods K0690, *DakoCytomation*, Dānija) uz 25 min.. Tad sekoja skalošana ar PBS 5 min. Un uz 10 min. Uzklājam DAB (3-3'-diaminobenzidīna hromogēnā sistēma, kods K3468, *Dako*, Dānija). Preparāti skaloti krāna ūdenī un procesa noslēgumā veicām audu paraugu krāsošanu ar hematoksilīnu 2 minūtes.

Positīvās struktūras nokrāsojās brūnā krāsā.

TUNEL metode

TUNEL (ang. - *TdT-mediated dUTP nick end labeling*) reakciju lietojām, lai noteiktu apoptotisko šūnu daudzumu govju endometrija histoloģiskajos preparātos (Negoescu et al., 1998). Apoptotiskās šūnas, to kodoli iekrāsojās brūnā krāsā.

Lietojam apoptozes noteikšanas komplektu: *In Situ Cell Death Detection, POD*, (kataloga numurs 0 684 814, *Roche Diagnostics*, Vācija) un DAB (diaminbenzamīns) substrāta vektoru (kataloga numurs Sk 4100). Procedūras veikšanā bija šādi etapi: audu paraugu deparafinizācija – ksilols 2 reizes pa 4 min.; 99° etanols 2 reizes pa 2 min.; 95° etanols 2 reizes pa 2 min.; 70° etanols 2 reizes pa 2 min.. Skalošana ar destilētu ūdeni 7 – 10 min. un ar PBS (fosfātu buferis) pH 7.5 10 min.. Endogēnās peroksidāzes aktivitātes bloķēšanai priekšmetstikliņus ievietojam 50 ml PBS ar 500 ml 30 % ūdeņraža peroksīda šķīdumu un izturējam 30 min vibratorā. Sekoja skalošana ar PBS trīs reizes pa 5 min.. Antigēna atgūšanai ievietojam priekšmetstikliņus traukā ar 0.2 M borskābi pH 7.0 un vārījām mikroviļņu krāsnī pie 700 W 10 min.. Piepildījām trauku ar destilētu ūdeni un ļāvām stikliņiem ar paraugiem destilētājā ūdenī atdzist, tad skalojam ar PBS. Tad likām priekšmetstikliņus uz 10 min. 0.1 % BSA (vērša seruma albumīna) šķīdumā ar PBS un inkubējam priekšmetstikliņus ar TUNEL maisījumu (Tdt – T gala deoksīnukleotidiltransferāzes un dioksigenīna iezīmēto nukleotīdu maisījums), kas ir primārā antiviela, kods 11684817910, 1:10 1 h 37 °C. Sekoja skalošana ar PBS un veicām apstrādi ar POD (aitas anti fluorescences anti vielas ar mārutku peroksidāzi saistītais Fab fragments), kas ir sekundārā anti viela, (kods 11684, Roche Diagnostic, Vācija) 30 min 37 °C. Skalojam ar PBS un apstrādājam ar DAB (3-3'-diaminobenzidīns, hromogēnā sistēma), (kods 1718096, Roche Diagnostic, Vācija) 7 min.. Skalojam 5 min. krāna ūdenī un krāsojam ar hematoksilīnu 20 sek.. Apturējam reakciju, skalojot priekšmetstikliņu krāna ūdenī apmēram 10 min.. Tad apstrādājam preparātu ar polistirolu un nosedzām ar segstikliņu.

Pozitīvās struktūras iekrāsojās brūnā krāsā.

Datu statistiskā apstrāde

Iegūtajiem datiem aprēķināti vidējie rādītāji, standartnovirze. Lietots Stjudenta t-tests vienas paraugkopas analīzei. Lai salīdzinātu pētījumā iekļauto govju rādītājus pirmajā un atkārtotajā izmeklēšanas reizē, lietots Vilkinsona tests divu saistītu paraugkopu analīzei. Savukārt, lai salīdzinātu izmeklējumu rezultātus starp govīm ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdes involūcijas gaitu, lietots Kruskala-Valesa tests divu nesaistītu paraugkopu salīdzināšanai. Izmantojam divfaktoru korelācijas analīzi minēto substāncu

savstarpējo sakarību un to statistiskā būtiskuma analīzei (Paura, Arhipova, 2002; Arhipova, Bāliņa, 2003).

Par pamatu pieļaujamām fizioloģiskajām asins bioķīmisko un morfoloģisko rādītāju vērtībām izmantoti publicētie dati (Meyer, Harvey, 1998; Liepa, 2000).

Histoloģiskie izmeklējumi, attiecībā uz iekaisuma šūnu un apoptotisko šūnu skaitu, veikti mikroskopējot ar gaismas mikroskopu *Leica* 400 x palielinājumā trīs brīvi izvēlētos reprezentatīvos redzeslaukos. Iekaisuma šūnu infiltrācijas vērtējums veikts, atsaucoties uz citu autoru darbiem, kur iekaisuma šūnu infiltrācijas vērtēšanai tiek noteikts leikocītu skaits redzeslaukos, un infiltrācijas pakāpe tiek izteikta ar gradācijas klasi atkarībā no kopējā iekaisuma šūnu daudzuma redzeslaukā (Gonzalez et al., 1985; Corbeil et al., 2005; Hirsbrunner et al., 2009).

Imūnhistoķīmiskajos izmeklējumos pozitīvo struktūru relatīvais daudzums vērtēts ar puskvantitatīvo skaitīšanas metodi (Pilmāne et al., 1998). Pozitīvās struktūras reģistrējot lietota šāda vērtējumu gradācija:

(-) – nav pozitīvo struktūru redzeslaukā; (+) – nedaudz pozitīvo struktūru redzeslaukā; (++) – vidējs daudzums pozitīvo struktūru redzeslaukā; (+++) – daudz pozitīvo struktūru redzeslaukā, (++++) – ļoti daudz pozitīvo struktūru redzeslaukā. Datu statistiskajā apstrādē puskvantitatīvajā metodē iegūtie rezultāti apstrādāti kā ordinālās skalas dati.

PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Slaucamo govju vispārējā veselība un dzemdes involūcija

Pētījumā izmantoto govju vidējais izslaukums pēc to pārraudzības datiem bija 27.2 ± 5.23 kg dienā ar tauku saturu 4.1 ± 0.65 %, laktozi 4.8 ± 0.23 %, olbaltumvielām 3.2 ± 0.30 %. Nebija būtiskas atšķirības izslaukuma un piena rādītāju ziņā govīm ar fizioloģisku un patoloģiskiem izdalījumiem ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām ($p > 0.05$).

Pētījumā iekļauto govju vispārējais veselības stāvoklis, vērtējot klīniski, bija normas robežās – govīs stāv, apēd piedāvāto barības devu, dzīvi reagē uz apkārtējo vidi.

Govīm ar patoloģiskiem izdalījumiem bija augstāka ķermeņa temperatūra, lai gan nepārsniedza normas vērtības ($p < 0.05$), (1. tabula). Šīm govīm iespējams bija sācies iekaisuma process dzemdes audos. Konstatējām vāju pozitīvu korelāciju starp ķermeņa temperatūru un izdalījumu raksturu pirmajā nedēļā ($r = 0.37$; $p < 0.05$), kā arī to esamību ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām ($r = 0.42$; $p < 0.05$).

Hematoloģiskie rādītāji un ķermeņa temperatūra slaucamajām govīm pirmajā un ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām

| Nedēļa | Izdalījumi | Ķermeņa temperatūra (C) | Kopējais leukocītu skaits ($\times 10^{12}$) | Eritrocītu skaits ($\times 10^{12}$) | Hemoglobīns (g/L) | Hematokrīts (%) |
|---------|-------------------|-------------------------|--|--|-------------------|-----------------|
| Pirmā | Fizioloģiski n=35 | 38.8±0.43 | 9.3±3.36 | 6.5±0.62 | 102.4±10.94 | 33.0±3.39 |
| | Patoloģiski n=3 | 39.4±0.40* | 5.9±0.7 | 6.6±0.86 | 118.7±7.64* | 36.6±3.31 |
| Ceturta | Fizioloģiski n=29 | 38.5±0.44 | 11.2±5.34 | 6.1±0.72 | 95.3±9.65 | 29.2±2.27 |
| | Patoloģiski = 9 | 39.0±0.40* | 10.46±2.82* | 5.7±0.42 | 90.9±9.79* | 28.4±1.72* |
| Norma | | 37.5–39.5 | 4–12 | 5–10 | 80–150 | 24–46 |

* p<0.05

Pirmajā nedēļā pēc dzemdībām trijām no 38 govīm izdalījumi no dzemdību ceļiem bija ar nepatīkamu smaku, netīri brūnā, sarkanīgā krāsā. Ceturtajā nedēļā deviņām govīm bija vērojami katarāli strutaini izdalījumi no dzimumceļiem. Pirmās nedēļas beigās, izmeklējot rektāli, konstatējām, ka visām govīm dzemde bija kļuvusi ievērojami mazāka, labi reaģēja uz masāžu, tā atradās vēdera dobumā. Ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām govīm bez patoloģiskiem izdalījumiem dzemdes kakls bija aizvērsšanās stadijā, bet vēl bija iespējams netraumatiski ievadīt instrumentus bakterioloģisko un dzemdes biopsijas paraugu ņemšanai, kuru diametrs ir 0.3 cm. Govīm ar patoloģiskiem izdalījumiem dzemdes kakla atvērums, izmeklējot ar vagīnas spoguļi, bija apmēram 1.5 – 2.0 cm diametrā.

Asins bioķīmisko izmeklējumu rezultāti apkopoti 2. tabulā. Kopējā proteīna, albumīnu un globulīnu daudzums visām mūsu pētījumā iekļautajām govīm pirmo četru nedēļu laikā pēc dzemdībām bija būtiski zemāks par pieļaujamajām normas vērtībām (p<0.01). Nenovērojām statistiski nozīmīgu kopējā proteīna, albumīnu un globulīnu daudzuma atšķirību asinīs starp govīm ar fizioloģisku un patoloģisku pēcdzemdību procesu norisi pirmajā un ceturtajā nedēļā (p>0.05), lai gan govīm, kurām ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām bija endometrīts, šie rādītāji bija zemāki (p>0.05).

Ceturtajā nedēļā šo rādītāju daudzums bija statistiski nozīmīgi (p<0.05) pieaudzis, bet joprojām zemāks par normas vērtībām (p<0.01). Tas liek domāt, vai ir pietiekams proteīna nodrošinājums barības devā, vai aknu funkcionālais stāvoklis neļauj pietiekamā daudzumā sintezēt albumīnus, vai par to, kādos procesos organisms pastiprināti zaudē proteīnu un tieši albumīnus (Meyer and Harvey, 2004; Jemeljanovs u.c., 2008). Ir citu autoru pētījumi, kas līdzīgi ir konstatējuši zemu proteīna līmeni govju asinīs pēcatnešanās laikā (Yaylak et al., 2009), kā arī neauglīgām govīm (Афанасьев, 1972).

Ca un P ir makroelementi, kuru daudzuma pazemināšanās gadījumā saistībā ar govju atnešanos un laktācijas uzsākšanos var novest pie pēcdzemdību patoloģijām kā pēcdzemdību parēze un hipokalcēmija. Visām mūsu pētījumā izmeklētajām govīm pirmajā un ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām konstatējām zemu Ca daudzumu asinīs. Ca līmenis asins serumā statistiski nozīmīgi pazeminās dzemdību laikā, salīdzinot šo rādītāju govīm vienu mēnesi pirms un vienu mēnesi pēc dzemdībām (Meglia et al, 2001; Meglia, 2004).

2.tabula

Asins bioķīmiskie rādītāji govīm 1. un 4. nedēļā pēc dzemdībām

| Parametri | Norma | Pirmā nedēļa | | Ceturtā nedēļa | |
|-------------------------|-----------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | | Fizioloģiski izdalījumi n=35 | Patoloģiski izdalījumi n=3 | Fizioloģiski izdalījumi n=29 | Patoloģiski izdalījumi n=9 |
| Kopējais proteīns (g/L) | 55-77 | 39.5±13.55*↓ | 40.2±5.29*↓ | 48.1±9.08*↓ | 45.4±12.19*↓ |
| Albumīni (g/L) | 21-43 | 22.8±4.67 | 21.6±2.76 | 24.1±2.98 | 22.9±4.52 |
| Globulīni (g/L) | 25-41 | 17.2±9.53*↓ | 18.6±5.29*↓ | 23.8±7.64*↓ | 22.5±7.97*↓ |
| Triglicerīdi (mmol/L) | 0.01-0.2 | 0.19±0.296 | 0.20±0.100 | 0.10±0.211 | 0.18±0.181 |
| Ca (mmol/L) | 1.98-2.5 | 1.3±0.52*↓ | 1.25±0.15*↓ | 1.76±0.36*↓ | 1.56±0.50*↓ |
| P (mmol/L) | 1.5-2.9 | 1.08±0.33*↓ | 1.1±0.17*↓ | 1.56±0.32 | 1.56±0.39 |
| Mg (mmol/L) | 0.7-1.1 | 0.55±0.247↓ | 0.53±0.113↓ | 0.41±0.311*↓ | 0.67±0.091 |
| Holesterols (mmol/L) | 2.3-6.6 | 1.38±0.67*↓ | 1.2±0.25*↓ | 2.3±0.83 | 2.0±0.63↓ |
| Urīnviela (mmol/L) | 2.4-7.5 | 4.6±3.0 | 2.9±2.5 | 2.4±0.7 | 2.0±0.80*↓ |
| Kreatinīns (μmol/L) | 62-97 | 71.3±21.34 | 72.6±2.33 | 71.7±17.99 | 67.8±15.92 |
| Amilāze (U/L) | 12-107 | 66.5±32.78 | 56.4±18.9 | 69.7±18.22 | 61.6±24.29 |
| ALAT (U/L) | 17-37 | 20.4±16.49 | 12.30±1.73*↓ | 27.1±5.75 | 29.3±19.62 |
| ASAT (U/L) | 48-100 | 59.6±32.35 | 65.3±24.96 | 40.7±9.48 | 45.2±32.68 |
| LDH (U/L) | 2666-4293 | 1417±55.78 | 1365±87.08 | 2216±50.75 | 1772±574.95 |
| AP (U/L) | 29-99 | 79.1±63.91 | 54.2±14.09 | 49.0±18.69 | 54.2±25.07 |

* p<0.05

Asins serumā ar proteīnu saistītā Ca daudzums ir atkarīgs no proteīna daudzuma izmaiņām asins serumā, bet mūsu pētījuma govīm bija pazemināts gan proteīna, gan arī Ca daudzums asinīs. Citu autoru pētījumi pierāda, ka jau subklīniska hipokalcēmija pēcatnešanās laikā cieši saistīta ar endometrītu gadījumiem un mikrofloras intensīvu klātbūtni dzemdē (Афанасьев, 1972; Mateus, Costa, 2002).

Mūsu pētījumā atklājās, ka govīm ar patoloģiskiem izdalījumiem pirmajā un ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām bija mazāka Ca un P attiecība nekā govīm ar fizioloģisku dzemdes involūcijas norisi. Ir pētījumi, kas parāda Ca un P attiecības saistību ar govju apaugļošanās spējām. Par optimālu Ca un P attiecību atzīta 1.7–2.3 : 1 attiecība. Zemāka vai augstāka šo rādītāju attiecība korelē ar govju neauglību (Афанасьев, 1972). Jāatzīmē, ka pašlaik praktiskajā veterinārmedicinā šo makroelementu attiecības plaši apskata un analizē barības devā, bet ne govju asinīs, jo Ca un P attiecības asinīs regulē hormoni (parathormons un kalcitonīns) un, ir pierādīts, ka dažādas attiecības minerālpiedevas, kur Ca:P attiecības bija no 1.4:1 līdz 4:1 maz (statistiski nenozīmīgi) ietekmēja eksperimenta govju produktivitāti, pie kam dažādās laktācijas fāzēs (Trūpa, Latvietis, 2003). Pirmajā nedēļā pēc dzemdībām arī P līmenis bija pazemināts, bet tā daudzums atkārtotajā izmeklējumā bija palielinājies līdz normas vērtībām. Arī P daudzums asins serumā samazinās saistībā ar dzemdībām un paliek zemākā līmenī, salīdzinot ar tā daudzumu vienu mēnesi pirms dzemdībām (Meglia, 2004).

Ir pētījumi, kuros konstatēts, ka klīniski veselām govīm magnija (Mg) daudzums govju asins serumā paliek nemainīgā līmenī mēnesi pirms un mēnesi pēc dzemdībām (Meglia, 2004). Bet, kā zināms, Mg uzsūcās no uzņemtās barības caur zarnu traktu, saistās ar albumīniem un resorbējās jeb atpakaļuzsūcās nierēs konkurējoši ar Ca. Biežāk klasiskas piena triekas gadījumā novēro hiper magnēmiju. Mūsu pētījumā visām izmeklētajām govīm Mg līmenis asins serumā minētajā laika periodā pirmajā nedēļā pēc dzemdībām bija pazemināts, bet tā līmenis ceturtajā nedēļā sasniedza normas vērtības.

Urīnvielas daudzums asins serumā pirmajā pēcatnešanās nedēļā ir normas robežās visām pētījuma govīm, bet ceturtajā nedēļā redzams, ka tas samazinās govīm, kurām ir patoloģiski izdalījumi no dzemdes jeb tām, kurām izveidojies pēcdzemdību endometrīts. Urīnvielas samazināšanās pēcdzemdību perioda pirmajās trijās nedēļās novērota arī citu autoru pētījumos (Liepa, Krūmiņa, 2004). Urīnvielas pazemināšanās asinīs tiek skaidrota ar samazinātu tās producēšanu aknās, proteīna deficītu barībā, kā arī tā pastiprinātu izvadīšanu poliūrijas dēļ (Jemeljanovs I., Brizule, 1999; Meyer, Harvey, 2004).

Kreatinīna daudzums asins serumā minētajā periodā visām govīm vidēji bija normas robežās. Vairums kreatinīna tiek sintezēts aknās un nonāk muskulatūrā, kur daļa tā tiek pārvērsta par fosfokreatinīnu, un tas ir enerģijas

avots muskuļu vielmaiņas procesiem. Asinīs cirkulējošā kreatinīna un urīnvielas daudzums pieaug nieru patoloģiju gadījumā (Meyer, Harvey, 2004). Tā kā arī urīnvielas daudzums bija normas robežās, tad varam izslēgt nieru patoloģijas pētījumā iekļautajām govīm. Lai gan, samazināts urīnvielas daudzums atgremotāju asinīs liecina par samazinātu tā producēšanu sakarā ar aknu nepilnvērtīgu funkcionēšanu, vai proteīna deficītu barībā (Meyer et al., 1992).

Par nieru patoloģiju liecina arī samazināta amilāzes izdalīšanās ar urīnu, vienlaicīgi tās daudzumam pieaugot asinīs. Savukārt urīnā nieru patoloģiju gadījumā amilāzes līmenis ir normas robežās, vai pat samazināts (Hofbauere, 2004), bet mēs urīnu neizmeklējām. Amilāzes līmeņa palielināšanās asinīs liecina arī par pankreatītu (Meyer, Harvey, 2004). Savukārt samazināts triglicerīdu daudzums asinīs liecina par dislipidēmiju. Mūsu pētījumā triglicerīdu un arī amilāzes līmenis asinīs caurmērā būtiski neatšķīrās starp pirmās un ceturtās pēcdzemdību nedēļas izmeklējumu rezultātiem, kā arī fizioloģiskas un patoloģiskas dzemdes involūcijas gaitas norises gadījumā. Ir pierādīts, ka triglicerīdu daudzumam asinīs nav saistības ar olnīcu cikliskas darbības atsākšanos pēc dzemdībām (Gúedon et al., 2009). Varam secināt, ka mūsu pētījuma govīm ir optimāla nieru darbība.

Viens no aknu funkcionālo spēju rādītājiem ir holesterīna daudzums asinīs, jo tā lielākā daļa tiek sintezēta aknās (Rosenberger et al., 1979). Holesterīna līmenis visām pētījumā iekļautajām govīm pirmajā nedēļā bija būtiski zemāks par pieļaujamo normas vērtībām ($p < 0.05$), bet ceturtajā nedēļā tā daudzums pieauga govīm ar fizioloģisku pēcdzemdību perioda norisi, sasniedzot minimālās normas vērtības. Liepa, Krūmiņa (2004) ir konstatējušas, ka holesterīna līmenis asinīs govīm ar sabalansētu barības devu samazinās trīs dienas pirms atnešanās, bet tad sasniedz normas vērtības pirmo triju nedēļu laikā pēc dzemdībām. Bet ir pētījumi, kas parāda holesterīna līmeņa atjaunošanos deviņu nedēļu laikā pēc dzemdībām (Gúedon et al., 2009). Holesterīns ir svarīgs steroīdo hormonu un žultsskābju struktūras komponents (Jemeljanovs L., u.c., 2008). Saskaņā ar to, ir rezultāti, kas parāda, ka augsts holesterīna līmenis asinīs ir saistībā ar optimālu olnīcu cikliskas darbības atsākšanos pēc dzemdībām govīm (Guédon et al., 2009). Govīm, kurām bija paaugstināts progesterona līmenis asinīs no trešās līdz septītajai pēcdzemdību dienai, biežāk novērotas pēcdzemdību patoloģijas kā placentas aizture un dzemdes iekaisums (Zralý et al., 1989).

ALAT un ASAT ir sastopamas visās organisma šūnās, bet vislielākajā koncentrācijā tās atrodas aknu un sirds muskuļu šūnās (Hofbauere, 2006). ALAT un ASAT vidējās vērtības abu grupu starpā būtiski neatšķīrās no normas vērtībām, bet vērojām, ka šie rādītāji ir paaugstināti atsevišķām govīm ar un bez pēcdzemdību patoloģijām. To būtiskais pieaugums pēcdzemdību periodā skaidrojams ar intensīvu aknu funkcionēšanu saistībā ar fizioloģisku negatīvu enerģijas bilanci, dēļ kā notiek pastiprināta brīvo taukskābju pārstrāde aknās un tauku izgulsnēšanās hepatocītos (Liepa,

Krūmiņa, 2004), bet citi autori norāda, ka ASAT daudzuma paaugstināšanās var būt kā viens no parametriem, lai prognozētu endometrīta iespējamību slaucamajām govīm pēcdzemdību periodā (Sattler, Fürll, 2004). ASAT daudzuma pieaugums asinīs tiek saistīts ar intensīvu vielmaiņas procesu aktivitāti aknās (Antāne u. c., 2000) vai ar aknu patoloģijām citām dzīvnieku sugām. Govīm par aknu patoloģijām informatīvi rādītāji ir sorbitoldehidrogenāze, gamma-glutamilttransferāze (Jemeljanovs Ļ., u.c. 2008), bet mūsu darbā netika īpaši pētītas aknu patoloģijas.

LDH visām pētījuma govīm ir virs pieļaujamās normas laikā no pirmās līdz ceturtajai nedēļai pēc dzemdībām ($p < 0.01$), ja tos pielīdzina normatīviem, kādi doti atsevišķos avotos (Howard, 1986; Jemeljanovs Ļ., Brizule, 1999; Liepa, 200; Jemeljanovs Ļ., u.c., 2008), bet ir norāde par to, ka, ja šis enzīms ir palielinātā daudzumā asinīs bez citu enzīmu būtiska paaugstinājuma, tad šāds fakts ir ignorējams un analīzes jāatkārto pēc vairākām nedēļām. Pēdējos gados laboratorijas iekārtām, ko ražo firma *Kodak EKTACHEM*, ir norādītas ievērojami lielākas fizioloģiskās LDH vērtības govīm (2666–4293 U/L). Laktātdehidrogenāze atrodas ne tikai aknu, bet arī muskuļu šūnās, eritrocītos un leukocītos, tādēļ tā daudzuma pieaugums vērojams hemolīzes, aktīva patoloģiska procesa aknās un ekstensīva muskuļu audu bojājuma gadījumā (Liepa, 2000; Hofbauere, 2006). Domājams, ka LDH līmeņa paaugstinājums asinīs ir saistāms ar dzemdes involūcijas procesu. Arī citi autori ir atzīmējuši šādu faktu pat līdz 27. pēcatnešanās dienai un saista to ar atrofiskiem procesiem miometrijā pēcdzemdību laikā (Jaesechke, Muller, 2007).

Sārmainā fosfatāze (AP) minētajā laika periodā izmeklēto govju asins serumā bija normas robežās. Šis ferments atrodas praktiski visos audos dažādā daudzumā. Biežāk to apskata kā holestāzes rādītāju, bet tā daudzums asinīs mēdz paaugstināties pastiprinātas osteoblastu aktivitātes, osteodistrofijas, stresa gadījumā (Rosenberger et al., 1979; Meyer, Harvey, 2004; Jemeljanovs u.c., 2008)

Vielmaiņas slimības, placentas aizture, laktāciju skaits korelē ar endometrīta iespējamību govīm pēcdzemdību periodā (Kim and Kang, 2003). Mūsu pētījumā konstatējām statistiski nozīmīgu negatīvu korelāciju starp laktāciju skaitu un endometrītu gadījumu skaitu. Biežāk ar pēcdzemdību endometrītu slimo pirmpienes, turklāt tika novērots, ka pirmpienēm bija zemāks globulīnu daudzums asinīs, salīdzinot ar vecēkam govīm.

Literatūrā tiek minēts, ka neliela dažu rādītāju novirze no normas vērtības var būt fizioloģisks process saistībā ar pēcdzemdību periodu (Meyer, Harvey, 2004), tomēr nav noteiktu kritēriju, cik lielas novirzes ir pieļaujamas, un cik ilgā laikā asins morfoloģiskajiem un bioķīmiskajiem parametriem būtu jāatgriežas vispārpieņemto normu robežās. Saistībā ar šo jautājumu joprojām notiek arvien jauni pētījumi.

Dzemdē dabuma saturā mikrobioloģiskie izmeklējumi

Dzimumceļu mikrobiālā kontaminācija ir viens no biežāk sastopamajiem iemesliem dzimumsistēmas slimībām pēcdzemdību periodā (Kirks, Oertons, 2000; Herath et al., 2009). Pirmajā nedēļā pēc dzemdībām govju dzemdē dabuma saturā mikroflora konstatēta 51.7 % izmeklēto govju, bet 48.3 % gadījumu mikroflora netika atrasta. Ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām šie rādītāji bija attiecīgi 31.4 %, un 68.6 %. Visbiežāk sastopamā mikroflora bija *Staphylococcus* ģints un *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismi, kā arī to asociācijas. Būtisku atšķirību dzemdē dabuma saturā mikrobioloģisko izmeklējumu rezultātos govīm ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdē involūcijas norisi nenovērojām.

No govju dzemdē dabuma saturā pirmajā nedēļā pēc dzemdībām tika izolēti: fakultatīvi anaerobie *Staphylococcus* ģints, anaerobās grampozitīvās *Clostridium* ģints, gramnegatīvās *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroflora, to skaitā *Klebsiella spp.* un *Proteus spp.*, kā arī *Pseudomonas spp.*, *Corynebacterium spp.* grampozitīvās nūjiņas un *Bacillus cereus* sugas mikroorganismi. Ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām no govju dzemdē dabuma saturā bez iepriekš minētajiem, tika izolēti vēl grampozitīvie *Micrococcus* ģints. un *Aerococcus urinae* sugas mikroorganismi, bet *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* mikroorganismi vairs netika izolēti. Daudzi autori govīm pēcdzemdību periodā izdalījuši plašu spektra mikroorganismus no dzemdē dabuma saturā: fakultatīvi anaerobo mikrofloru: *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, kā arī anaerobo mikrofloru, *Bacteroides spp.*, *Actinomyces pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* (Зверева и Хомин, 1976; Bonnett et al., 1991; Bekana, 1996; Kask et al., 1998; Kask, 1999; Twardon et al., 2000; Königsson et al., 2001; Lewis, 2003). Tas ir viens no galvenajiem iemesliem intensīvai endometrija infilācijai ar iekaisuma šūnām pēcatnešanās laikā. Ir dati, ka 90 – 100 % govīm pirmajā nedēļā mikrobiālā kontaminācija skar dzemdē dabumu, un 25 – 30 % govju šo kontamināciju nespēj iznīcināt (Herath et al., 2009), bet citi autori atzīmē mazāku saslimšanas gadījumu daudzumu, 15 – 20 % govju (LeBlanc, 2008). Mūsu pētījumā visbiežāk sastopamās mikrofloras asociācijas dzemdē bija starp *Staphylococcus spp.* un *Enterobacteriaceae* mikroorganismiem. Iespējams, ka tas saistāms ar šo mikroorganismu simbiozi vai līdzīgiem apstākļiem to dzīvošanai. Daži autori (Kirks, Oertons, 2000; Heuwieser, 2007) atzīmē, ka veselas govju organisms ir spējīgs iznīcināt dzemdību procesā radušos dzimumceļu mikrobiālo kontamināciju un šis process ilgst 4 nedēļas pēc dzemdībām, bet citi autori novērojuši pilnīgu mikrobu elimināciju no govju dzemdē 2 līdz 3 nedēļu laikā (Bondurant, 1999) un 6 nedēļās (Kask, u.c., 1999) pēc dzemdībām. Mūsu pētījumā ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām dzemdē dabuma saturā mikroflora govju netika konstatēta 68.6 % izmeklēto govju. Tas liecina par pētījumā iekļauto govju imūnsistēmas optimālu darbību.

Pētījuma mikrobioloģiskie dzemdes dobuma satura rezultāti norāda uz apkārtējās vides un govju turēšanas higiēnas nozīmi, jo analizēs konstatētie mikroorganismi ir sastopami govīs apkārtējā vidē – novietnes gaisā, uz grīdas, sienām, pakaišos, barībā, uz govīs apmatojuma un ādas, uz slaukšanas iekārtu virsmām. Gramnegatīvās *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismi atrodas kūtīs vidē, īpaši dzīvnieku fekālijās un pakaišos. Ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām bija palielinājies to govju skaits, kuru dzemdes dobuma saturā mikroorganismi netika atrasti, tas parāda govju imūnsistēmas nozīmi pēcdzemdību periodā. jo tās nomākums pēcdzemdību laikā ir par imeslu dzemdes iekaisumam (Kimura et al., 2002; Sheldon, Dobson, 2004; Corbeil et al., 2005; Kim et al., 2005; LeBlanc, 2008; Herath et al., 2009; Gabler et al., 2009; Chapwanya et al., 2009).

Endometrija pārskata aina un iekaisuma šūnu infiltrācija

Mūsu izmeklētajos slaucamo govju endometrija histoloģiskajos paraugos pirmajā nedēļā pēc dzemdībām tas bija klāts ar prizmatisko epitēliju, kas vietām ir noārdījies. Fizioloģiski govīs dzemdes gļotādu klāj prizmatiskais epitēlijs, kas veido arī dziedzerus (Brūveris, Baumane, 1987). Ir pētījumi, kas parāda, ka endometrija virsmas epitēlijs govīm pēc dzemdībām paliek zems līdz pat 31. dienai pēc dzemdībām (Емельянова, 1974; Okano et al., 2007). Audos izteikta tūska, dziedzeri vietām maz izteikti. Pēcdzemdību periodā notiek dzemdes dziedzeru reģenerācija. Mūsu pētījumā slaucamo govju endometrija biopsijas paraugos, kas ņemti pirmajā nedēļā pēc dzemdībām, tika konstatēta bazālo šūnu hiperplāzija, perēkļveida, zemepitēlija un difūzi endometrijā pilnasinīgi asinsvadi, tūska dzemdes audos, bet atsevišķos paraugos – erozīva gļotādas virsma. Iekaisuma šūnu vidējais daudzums, skaitot trijos reprezentatīvos redzeslaukos 400 X palielinājumā bija 50.6 ± 24.94 . Jāatzīmē, ka iekaisuma šūnu skaits bija ievērojami mazāks audos, kuros bija izteikta tūska.

Ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām govju endometrija biopsijas paraugos konstatējām, ka endometrija epitēlija šūnas ir reģenerējušās. Joprojām atsevišķos paraugos vērojami difūzi izvietoti pilnasinīgi kapilāri. Daži autori novērojuši, ka epitelizācijas procesi endometrijā ilgst līdz 20. pēcdzemdību dienai (Kummer et al., 1989). No 21. līdz 30. dienai pēc dzemdībām dzemdes gļotāda ir klāta ar vienrindu epitēliju, kam atsevišķās vietās ir pseidodaudzrindīgas šūnas (Емельянова, 1974). Ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām endometrijā vērojama izteikta iekaisuma šūnu infiltrācija ap dziedzeru izvadiem, un dziedzeru proliferācija, kā arī endometrija dziedzeru slānī bija vērojami izveidojušies perēkļveida limfocītu infiltrāti. Pie kam šo limfocītu mezgliņu klātbūtni endometrijā konstatējām vāju, bet statistiski nozīmīgu korelāciju ar izdalījumu esamību no dzimumceļiem šajā laikā ($r=0.33$; $p<0.01$). Limfocītu perēkļveida infiltrācija govīm novērota jau ap

10. dienu pēc dzemdībām, un mobilo iekaisuma šūnu infiltrācija endometrijā ir svarīgs faktors dzemdes audu atjaunošanās procesos pēc dzemdībām (Kummer et al., 1989). Lokālās imunitātes izpausmes pēttas saistībā ar govju pēcdzemdību procesu norisi dzemdes audos (Chapwanya et al., 2009). Tā kā ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām vērojama intensīva limfocītu perēkļveida infiltrātu veidošanās, tad varam domāt, ka govīm pirmajā nedēļā pēc dzemdībām dzemdes audos sākotnēji prevalē celulārie, bet vēlāk, aktivizējas humorālie aizsardzības mehānismi. Daudzi autori akcentē un ir pētījuši lokālās (Kummer et al., 1989; Chapwanya et al., 2009). un vispārējās imunitātes nozīmi govīm pēcdzemdību periodā (Kimura et al., 2002; Sheldon, Dobson, 2004; Corbeil et al., 2005; Kim et al., 2005; LeBlanc, 2008; Herath et al., 2009; Gabler et al., 2009; Chapwanya et al., 2009).

Ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām vērojām vidēju un spēcīgi izteiktu iekaisuma šūnu infiltrāciju endometrijā (102.9 ± 60.69). Bija liela datu izkliede jeb standartnovirze, kas, iespējams, var tikt skaidrota ar individuālu govju organisma imūnsistēmas kapacitāti.

Mūsu pētījums liecina, ka slaucamo govju dzemdes audos ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām var būt intensīva iekaisuma šūnu infiltrācija bez klīniskām dzemdes iekaisuma pazīmēm. Arī citi autori atzīmē, ka dzemdes involūcijas procesā aktīvi darbojas iekaisuma atbildes mehānisms ar apoptozes, neitrofilo un citu leikocītu migrāciju, kā arī degradācijas enzīmu atbrīvošanos (Nilsen-Hamilton et al., 2003). Līdzīgas atziņas ir citiem pētniekiem, kuri apgalvo, ka pilnīga dzemdes involūcija norit 33-35 (Chasandra, Krishna, 2009) 41 - 50 dienas pēc dzemdībām (Garcia, Larsson, 1982; Leslie, 1983).

Iekaisuma, augšanas un degradācijas faktoru klātbūtne un dinamika

Mūsu pētījumā konstatējām, ka govīs endometrijā **TNF- α** izdala aktivizēti makrofāgi. Šis citokīns izraisa šūnu proliferāciju, diferenciaciju, piedalās iekaisuma reakcijā, endometrija šūnu proliferācijā, dzimumcikla un grūsnības laikā (Gamo et al., 2007). TNF- α pozitīvo struktūru daudzums govju endometrijā bija būtiski palielinājies, salīdzinot ceturto un pirmo nedēļu pēc dzemdībām ($p < 0.01$), tā pozitīvo struktūru relatīvais daudzums pozitīvi statistiski nozīmīgi korelē ar iekaisuma šūnu skaitu endometrijā ($r = 0.48$, $p < 0.01$) pirmo četru nedēļu laikā pēc dzemdībām. Vērojām pozitīvu TNF- α korelāciju ar apoptotisko šūnu daudzumu endometrijā, kas kļuva ciešāka, salīdzinot pirmo nedēļu ($r = 0.40$, $p < 0.05$) ar ceturto nedēļu ($r = 0.44$, $p < 0.01$) pēc dzemdībām. Bez tam TNF- α pozitīvo struktūru relatīvais daudzums vāji, bet statistiski nozīmīgi korelēja ar NGFR p75 pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu govīs endometrijā pirmajās četrās nedēļās ($r = 0.36$, $p < 0.01$). Nekonstatējām būtisku atšķirību govīm ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdes involūcijas gaitu ($p > 0.05$).

VEGF ir iesaistīts angiogēnēzē gan embrionālās asins cirkulācijas sistēmas radīšanai, gan arī angiogēnēzē nobriedušā organismā (Guidi et al., 1998; Halder et al., 2000; Wang et al., 2003; Wei et al., 2004; Ylä-Herttua et al., 2007; Ozbudak et al., 2008). VEGF saturošās struktūras tika atrastas endometrija asinsvadu endoteliocītos. VEGF pozitīvo struktūru pieaugums endometrija audos bija statistiski nozīmīgs, salīdzinot ceturto un pirmo nedēļu pēc dzemdībām ($p < 0.05$). Konstatējām vāju, bet statistiski nozīmīgu VEGF pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma korelāciju ar PGP 9.5 pirmajā nedēļā ($r = 0.34$, $p < 0.05$), kas nedaudz mazinājās ceturtajā nedēļā, bet joprojām bija statistiski nozīmīga ($r = 0.33$, $p < 0.05$). Pirmajā nedēļā VEGF pozitīvo struktūru relatīvais daudzums vidēji pozitīvi korelēja ar apoptotisko šūnu skaitu govīs endometrija audos ($r = 0.48$, $p < 0.01$). VEGF pozitīvo struktūru relatīvajam daudzumam govīs endometrijā konstatējām vāju statistiski nozīmīgu pozitīvu korelāciju ar iekaisuma šūnu daudzumu endometrija audos ($r = 0.24$, $p < 0.05$), kā arī ar hemoglobīna daudzumu asinīs (0.27 , $p < 0.05$). Nekonstatējām būtiskas atšķirības VEGF daudzuma ziņā govju endometrijā, salīdzinot govīs ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdes involūcijas norisi ($p > 0.05$). Pastiprināta angiogēno faktoru producēšanās kā atbilde uz hipoksiskiem stimuliem novērojama audu dzīšanas un patoloģisku procesu laikā (Scott et al., 1998; Ankoma-Sey et al., 2000; Ozbudak et al., 2008).

NGFR p75 pozitīvās nervšķiedras bija atrodamas zem endometrija epitēlija, ap asinsvadiem, kā arī pie endometrija dziedzeriem un stromā. NGFR p75 pozitīvo struktūru daudzums govju endometrijā bija statistiski nozīmīgi pieaudzis pirmo četru nedēļu laikā pēc dzemdībām ($p < 0.001$). Pirmajā nedēļā pēc dzemdībām NGFR p75 pozitīvo struktūru daudzumam govīs endometrijā novērojām statistiski nozīmīgas vidējas korelācijas ar PGP 9.5 ($r = 0.52$, $p < 0.01$) un apoptotisko šūnu skaitu ($r = 0.58$, $p < 0.01$). Kopumā pirmo četru nedēļu laikā pēc dzemdībām govīs endometrijā konstatējām vājas, bet statistiski nozīmīgas NGFR p75 pozitīvo struktūru daudzuma korelācijas ar iekaisuma šūnu skaitu endometrijā ($r = 0.37$, $p < 0.01$), MMP-9 ($r = 0.44$, $p < 0.01$), apoptotisko šūnu skaitu ($r = 0.45$, $p < 0.01$) un TNF- α pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu ($r = 0.36$, $p < 0.01$). Nekonstatējām būtisku atšķirību NGFR p75 pozitīvo struktūru daudzuma ziņā govīm ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdes involūcijas norisi ($p > 0.05$). NGF ir iesaistīts neiromūnās reakcijās un audu iekaisuma procesos, kā arī tiek minēts kā viens no inducētājiem apoptozes norisē (Vaidyanathan et al., 1998), kā arī ir pētījums, kas norāda uz NGF spēju veicināt endoteliālo šūnu izdzīvošanu un ka tas veicina autoimūnus un iekaisuma procesus (Julio-Pieper et al., 2006). NGF koekspresija ar angiogēnēzē iesaistītajām molekulām un proteintirokināzes A (ang. protein tirokinase A; p-TrkA) ekspresiju endoteliālajās šūnās, norāda uz to proangiogēnētisko lomu (Davidson et al., 2003). Neironālo struktūru komunikāciju regulē arī apoptotisko procesu norise, kā arī fizioloģiskie, tā arī patoloģiskie procesi

(Green et al., 2003; Jacob, 2003). Par to liecina mūsu pētījumā konstatētā NGFR p 75 relatīvo struktūru daudzuma pieaugums patoloģiskas dzemdes involūcijas gadījumā govīm.

PGP 9.5 pozitīvo struktūru daudzuma pieaugums govju endometrijā, salīdzinot pirmo un ceturto nedēļu pēc dzemdībām, nebija būtisks ($p > 0.05$). Pirmajā nedēļā pēc dzemdībām PGP 9.5 pozitīvo struktūru klātbūtne un ekspresijas relatīvais daudzums govju endometrijā vāji, statistiski nozīmīgi korelē ar VEGF pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu ($r = 0.34$, $p < 0.05$), šādu tendenci saglabājot arī ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām ($r = 0.33$, $p < 0.05$). Kā arī konstatējam vidēju statistiski nozīmīgu korelāciju ar NGFR p75 pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu endometrijā pirmajā nedēļā ($r = 0.52$, $p < 0.01$). Nekonstatējam būtisku atšķirību PGP 9.5 pozitīvo struktūru daudzuma ziņā govīm ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdes involūcijas norisi ($p > 0.05$). Iekaisuma procesā iekaisuma mediatori veicina nervu šķiedru veidošanos, bet mēs šādu tendenci attiecībā uz PGP 9.5 nenovērojam, jo pie augstas iekaisuma šūnu infiltrācijas proporcionālu PGP 9.5 imūnreaktīvo nervšķiedru daudzuma pieaugumu neatradām. PGP 9.5 ir viens no būtiskiem dzemdes inervācijas morfoloģijas parametriem pēcdzemdību periodā (Lundberg et al., 1988; Tingaker et al., 2006). Par aktīvu reģenerācijas procesu uzsākšanos pirmās nedēļas laikā pēc dzemdībām liecina atrastās PGP 9.5 pozitīvās struktūras, kuras galvenokārt bija endometrija nervšķiedrās ap dziedzeriem, zemgļotādā un asinsvadu sienās. Ir dati, kas apgalvo, ka dzimumbriedumu sasniegušām telēm dzemdes inervācijas struktūrā nav atrastas būtiskas izmaiņas saistībā ar dzimumcikla stadijām (Wrobel et al., 1993), lai gan citi autori vēlākos pētījumos pierāda, ka dzemdes inervācija ir pakļauta būtiskām pārmaiņām saistībā ar dzimumciklu un fizioloģisko stāvokli (Zoubina et al., 1998; Stjernholm et al., 1999; Zoubina and Smith, 2000; Zoubina et al., 2001), kā arī tās daudzuma izmaiņas saistībā ar estrogēna receptoriem endometrijā (Blacklock et al., 2004). Iespējams pēcdzemdību periodā dominē citi iekaisuma mehānismi nekā klasiska infekcioza iekaisuma procesa gadījumā.

Iekaisuma šūnas, īpaši makrofāgi, spēj sintezēt, uzkrāt un izdalīt **MMP-9** (92 kDa želatināzi, želatināzi B), kas spēj šķelt IV un V tipa kolagēnu, elastīnu un želatīnu (Jacob, 2003). MMP-9 pozitīvo struktūru ekspresiju galvenokārt konstatējam endometrija dziedzerslāņa fagocitārajās šūnās. To var saistīt ar specifisku šīs proteīnāzes aktivāciju, kā arī atbilstošu vielu, ko MMP-9 spēj šķelt, klātbūtni un aktīvu remodelēšanos jeb pārveidošanos govju endometrijā minētajā laikā. MMP-9 pozitīvo struktūru relatīvais daudzums govju endometrijā, salīdzinot pirmo un ceturto nedēļu pēc dzemdībām, bija būtiski pieaudzis ($p < 0.05$). Konstatēta MMP-9 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma statistiski nozīmīga vāja korelācija ar NGFR p75 pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu endometrijā minētajā laika periodā ($r = 0.31$, $p < 0.05$). Konstatējam tendenci, ka MMP-9 pozitīvās struktūras bija vairāk to govju endometrijā, kurām pēcdzemdību periodā konstatējam

patoloģiskus izdalījumus no dzimumcēļiem ($p=0.053$), un jo īpaši ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām ($p<0.05$). Iekaisuma atbildes mehānisms, apoptozes norise, neitrofilo un citu leukocītu migrācija, kā arī degradācijas enzīmu atbrīvošanās ir svarīgi komponenti dzemdes involūcijas procesos (Nilsen-Hamilton et al., 2003). Bez tam, vērtējot iegūtos datus pirmo četru nedēļu laikā pēc dzemdībām, konstatējām MMP-9 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma statistiski nozīmīgu vāju korelāciju ar govju ķermeņa temperatūru, un NGFR p75 pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu endometrijā minētājā laika periodā. Tātad iekaisuma procesa gadījumā prevalē iekaisuma un deģeneratīvie procesi, kas ir par iemeslu neironālo struktūru proliferācijai. Ir autori, kas pierādījuši sakarību starp MMP-9 pozitīvo struktūru daudzumu un *Proteus vulgaris* mikrobiālo kontamināciju audos. Šie pētījumi apliecina, ka MMP-9 ekspresijas intensitāte var būt kā indikators, lai atbrīvotos no bakteriālās substances ar iekaisuma reakcijas nodrošināšanu (Balotescu et al., 2008). Tādējādi MMP-9 uzskatāms par būtisku iekaisuma marķieri.

Apoptotisko šūnu skaits govju endometrijā bija būtiski pieaudzis, salīdzinot pirmo un ceturto nedēļu pēc dzemdībām ($p<0.01$). Konstatējām vāju, statistiski nozīmīgu korelāciju ar iekaisuma šūnu infiltrāciju endometrijā ($r=0.35$, $p<0.05$), un ar TNF- α pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu endometrijā ($r=0.40$, $p<0.05$), kas ceturtajā nedēļā kļūst ciešāka ($r=0.44$, $p<0.01$). Bez tam apoptotisko šūnu skaitam endometrijā pirmajā nedēļā konstatējām vidēju korelāciju ar VEGF ($r=0.48$, $p<0.01$) un NGFR p75 (0.58 , $p<0.01$) pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu. Šūnu izzušana apoptozes ceļā novērojama involūcijas un atrofijas procesos dažādu tipu dziedzeros. Tādā veidā procesam ir raksturīga orgāna samazināšanās apmēros bez pamatarhitektūras dezorganizācijas (Walker et al. 1989). Viens no apoptotisko šūnu daudzuma pieauguma iemesliem endometrija audos pirmo četru nedēļu laikā varētu būt skaidrojams ar to, ka govju dzemde četras nedēļas pēc dzemdībām ir involūcijas noslēgumā, dzemdes audi ir kompakti un blīvi, salīdzinājumā ar pirmo nedēļu, kad dzemdes audos dominē tūska. Bez tam, statistiski nozīmīgi bija palielinājies iekaisuma šūnu skaits endometrijā, bet kā zināms, aktivizēti makrofāgi izdala TNF- α , kas savukārt ir viens no apoptozes inducētājiem (Zhdanov et al., 2003). Minēto apstiprina mūsu pētījumā konstatētā apoptotisko šūnu skaita vājā, statistiski nozīmīgā korelācija ar iekaisuma šūnu infiltrāciju endometrijā, kā arī ar TNF- α pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu endometrijā, kas ceturtajā nedēļā kļūst ciešāka. Apoptotisko šūnu skaitam endometrijā pirmajā nedēļā konstatējām vidēju korelāciju ar VEGF un NGFR p75 pozitīvo struktūru relatīvo daudzumu, kas vēlreiz apstiprina intensīvu vielmaiņas procesu endometrijā hipoksisko stimulu un iekaisuma radīto neironālo struktūru proliferāciju.

Pētījumā tika iekļautas govju bez redzamiem veselības traucējumiem vērtējot klīniski, tomēr darba gaitā atklājās, ka atsevišķi asins morfoloģiskie

un bioķīmiskie rādītāji bija ārpus fizioloģiskajām normas vērtībām, un tas, iespējams, vērtējamas kā nespecifiskas organisma reakcijas.

Kopumā govīm pēcdzemdību laikā pirmajā un ceturtajā nedēļā konstatējām zemu kopējā proteīna un globulīnu līmeni, kā arī pazeminātu Ca, P un Mg daudzumu pirmajā nedēļā pēc dzemdībām. Arī citi autori ir konstatējuši, ka neliela dažu rādītāju novirzes no normas vērtības var būt fizioloģisks process saistībā ar pēcdzemdību periodu (Meyer, Harvey, 2004), tomēr nav noteiktu kritēriju, cik lielas novirzes ir pieļaujamas, un cik ilgā laikā asins morfoloģiskajiem un bioķīmiskajiem parametriem būtu jāatgriežas vispārpieņemto normu robežās.

Govīm ar patoloģiskiem pēcdzemdību izdalījumiem ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām bija zemāks kopējā proteīna, globulīnu, Ca, holesterīna un urīnvielas daudzums asinīs, salīdzinot ar govīm, kurām pēcdzemdību periodā novēroti fizioloģiski izdalījumi no dzimumceļiem. Govīm ar patoloģiskiem izdalījumiem pirmajā nedēļā pēc dzemdībām un govīm, kurām ceturtajā nedēļā bija izveidojies endometriīts, bija statistiski nozīmīgi augstāka ķermeņa temperatūra nekā govīm ar fizioloģisku dzemdes involūcijas procesu norisi, lai gan joprojām tā bija fizioloģiskās normas robežās. Nebija būtiskas atšķirības dzemdes dobuma satura mikrobioloģisko izmeklējumu rezultātu ziņā govīm ar fizioloģisku un patoloģisku dzemdes involūcijas gaitu. Biežāk izolētie mikroorganismi no govju dzemdes dobuma satura pēcdzemdību periodā pirmajā un ceturtajā nedēļā bija no enterobaktēriju dzimtas kā arī stafilokoku ģints mikroorganismi, kas norāda uz apkārtējās vides un govju turēšanas higiēnas nozīmi, jo analizēs konstatētie mikroorganismi ir sastopami govju apkārtējā vidē – novietnes gaisā, uz grīdas, sienām, pakaišos, barībā, uz govju apmatojuma un ādas, uz slaukšanas iekārtu virsmām.

Morfoloģiski pirmajā nedēļā pēc dzemdībām govju endometrijā raksturīga akūta iekaisuma pazīmes – hiperēmija, difūza iekaisuma šūnu infiltrācija, tūska, erozīva endometrija gļotādas virsma. Iekaisumam raksturīgo morfoloģisko pazīmju persistence endometrijā turpinās ceturtajā pēcdzemdībām nedēļā, tomēr bez būtiskām govju vispārējā veselības stāvokļa pārmaiņām, liecinot par audu procesu lokalizāciju.

Būtiski novatora atradne ir statistiski nozīmīgs iekaisuma, apoptotisko šūnu daudzuma, citokīna TNF- α , augšanas faktoru VEGF, NGFR p75, neuropeptīdus saturošās inervācijas marķiera PGP 9.5, audu degradācijas enzīma MMP-9 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma klātbūtne un pieaugums endometrijā no pirmās līdz ceturtajai nedēļai. Tas norāda uz intensīvu endometrija audu remodelēšanos minētajā laikā. Pētījumā konstatējām arī dažādu faktoru savstarpējo korelāciju, piemēram, TNF- α un apoptozes, kad augstākminētais citokīns veicina programmēto šūnu nāvi. Savukārt, VEGF relatīvā daudzuma pieaugums apstiprina endometrija hipoksijas persistenci dzemdes involūcijas laikā, bet vienlaicīgais NGFR p75 un PGP 9.5 relatīvā

daudzuma pieaugums norāda uz iekaisuma procesa stimulētu nervaudu proliferāciju.

Govīm ar patoloģiskiem izdalījumiem no dzimumorgāniem, kas ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām var liecināt par endometrītu, bija novērojama intensīvāka iekaisuma šūnu infiltrācija, izteiktāka limfocītu perēkļveida infiltrātu veidošanās un vairāk MMP-9 pozitīvās struktūras endometrija audos, kas norāda, ka iekaisuma šūnu infiltrācijas, apoptotisko šūnu skaita un MMP-9 pozitīvo struktūru daudzuma izmaiņas endometrijā var izmantot kā iekaisuma procesa marķierus vēlākā pēcdzemdību periodā govīm.

SECINĀJUMI

1. Govīm ar patoloģisku dzemdes involūciju, ir statistiski nozīmīgi augstāka ķermeņa temperatūra kā govīm ar fizioloģisku dzemdes involūcijas procesu norisi, lai gan tā ir pieļaujamās normas vērtībās.
2. Govīm ar patoloģisku dzemdes involūciju asinīs vērojams kopējā leukocītu daudzuma pieaugums, eritrocītu, hemoglobīna daudzuma un hematokrīta samazināšanās, kā arī zems kalcija, urīnvielas un holesterīna daudzums.
3. Govju dzemdes dobuma saturā pēcdzemdību pirmajā un ceturtajā nedēļā dominējošie ir enterobaktēriju dzimtas un stafilokoku ģints mikroorganismi. Govīm ar patoloģiskiem pēcdzemdību izdalījumiem dzemdes dobuma satura mikroorganismu asociācijās bieži atrod *Proteus* spp. gan pirmajā, gan arī ceturtajā nedēļā, un *Bacillus cereus* ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām.
4. Mikroskopiskā govju endometrija pārskata ainā var būt novērojama intensīva iekaisuma šūnu infiltrācija, tomēr bez klīniskām dzemdes iekaisuma pazīmēm.
5. Govīm ar patoloģisku dzemdes involūcijas gaitu endometrijā novērojama intensīvāka iekaisuma šūnu infiltrācija, izteiktāka limfocītu perēkļveida infiltrātu veidošanās un vairāk MMP-9 pozitīvās struktūras ceturtajā nedēļā pēc dzemdībām, tā liecinot par intensīvākiem iekaisuma procesiem kā govīm ar fizioloģisku dzemdes involūciju.
6. Statistiski nozīmīgs iekaisuma, apoptotisko šūnu daudzuma, citokīna TNF- α , augšanas faktoru VEGF, NGFR p75, neuropeptīdus saturošās inervācijas marķiera PGP 9.5, audu degradācijas enzīma MMP-9 pozitīvo struktūru relatīvā daudzuma pieaugums endometrijā no pirmās līdz ceturtajai nedēļai norāda uz intensīvu endometrija audu remodelēšanos minētajā laikā, kurā iesaistīta šo faktoru un procesu (īpaši TNF- α un apoptozes) savstarpējā mijiedarbība.
7. VEGF relatīvā daudzuma pieaugums apstiprina endometrija hipoksijas persistenci dzemdes involūcijas laikā, bet vienlaicīgais NGFR p75 un

PGP 9.5 relatīvā daudzuma pieaugums norāda uz iekaisuma procesa stimulētu nervaudu proliferāciju.

IETEIKUMI PRAKSEI

1. Lai savlaicīgi konstatētu un novērstu novirzes govju veselībā saistībā ar dzemdes involūciju, pēcdzemdību perioda laikā ieteicams sekot govju ķermeņa temperatūras izmaiņām un pēcdzemdību izdalījumu raksturam.
2. Lai analizētu, profilaktētu un, nepieciešamības gadījumā, veiktu ārstēšanu, būtu ieteicams veikt mikrobioloģisko izmeklēšanu dzemdes dobuma saturam.
3. Iekaisuma šūnu infiltrācijas, apoptotisko šūnu skaita un MMP-9 pozitīvo struktūru daudzuma izmaiņas endometrijā var izmantot kā iekaisuma procesa marķierus vēlākā pēcdzemdību periodā govīm.
4. TNF- α un VEGF pozitīvo struktūru relatīvais daudzums un tā izmaiņas liecina par iekaisuma, reģenerācijas un hipoksisko stimulu turpināšanos govju endometrijā pēcdzemdību periodā.

PUBLIKĀCIJAS PAR PROMOCIJAS DARBA TĒMU

1. Šematoviča I., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2010) Slaucamo govju vispārējās veselības vērtējums pēcdzemdību periodā saistībā ar reproduktīvās sistēmas mikrobiālo floru. = Evaluation of the general health in dairy cows in postparturition period with relevance to microflora in the reproductive system *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*. Submitted on December, 2009.
2. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Inflammatory factors and apoptosis in the cows endometrium in postparturition period. *Research for rural development 2008, International Scientific Conference Proceedings*. Latvia, Jelgava, p. 266–269.
3. Sematovica I. Pilmane M. Jemeljanovs A., (2008) Endometrial changes in postpartum period in cows. *Proceedings of XXVth World Buiatrics Congress*. Budapest, Hungary, p.88–91.
4. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Distribution of growth stimulating and degradation factors in cow's endometrium in postparturition period. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*, Latvia, Jelgava, 21(316), p. 66–72.
5. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Vascular endothelial growth factor receptors p75, protein gene product 9.5, tumor necrosis factor- α and apoptosis in the cow's endometrium in postparturition period. *Agraarteadus, Journal of agricultural science*, Estonia, Tartu XIX;(2), p. 46–50.

6. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Matrices metalloproteināzes, interleikīns-10, audzēju nekrotiskais faktors- α , neuropeptīdi un apoptoze govju endometrijā pēcdzemdību periodā = Matrix metalloproteinases, interleukine-10, tumor necrosis factor- α , neuropeptides and apoptosis in cows endometrium in postparturition period. *LLU Raksti = Proceedings of the Latvia University of agriculture*. Latvija, Jelgava, 21(316), p. 73–78.
7. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2007) Slaucamo govju dzemdes morfoloģija pēcdzemdību periodā = Morphology of Cow's Uterus in Postparturition Period. *LLU Raksti = Proceedings of the Latvia University of agriculture*. Latvija, Jelgava, 18(313), p. 58–62.
8. Šematoviča I., Jemeljanovs A., Vētra J. (2006) Uz augu valsts un ķimioterapeitisko komponentu bāzes veidotas barības piedevas ietekme uz slaucamo govju reproduktīvo sistēmu = The effect of feed additives with the plant kingdom and chemotherapeutic components on the reproductive system of milking cows. *Starptautiskās zinātniskās konferences Raksti „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna” = International scientific conference Proceedings „Animals. Health. Food Quality”*. Latvija, Jelgava, p. 284-289.

CONTENT

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 29 |
| Subject Matter of Research and Topicality of the Problem | 29 |
| Purpose and Targets of the Study | 29 |
| Novelty of the Study | 30 |
| Approbation of the Research Study | 30 |
| MATERIALS AND METHODS | 31 |
| Trial sites of the study and profile of the herd included in trials | 31 |
| Overall Scheme of the Promotion Work | 32 |
| Clinical Evaluation, Blood Morphology and Biochemistry | 32 |
| Microbiological Examination | 33 |
| Drawing of Biopsy Samples from Cow's Endometrium and Examination thereof | 34 |
| Immunohistochemical Method | 34 |
| TUNEL Method | 35 |
| Statistical Processing of Data | 36 |
| RESULTS AND DISCUSSION OF THE RESEARCH STUDY | 37 |
| General Health and Uterus Involution of the Milking Cows | 37 |
| Microbiological Examinations of the Contents of Uterus Cavity | 42 |
| General Outlook of Endometrium and Infiltration of Inflammatory Cells | 44 |
| Presence and dynamics of inflammatory, growth and degradation factors | 45 |
| CONCLUSIONS | 49 |
| RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE | 50 |
| BIBLIOGRAPHY OF PUBLICATIONS ON THEME ADDRESSED IN THE PRESENT PROMOTION WORK | 50 |

INTRODUCTION

Subject Matter of Research and Topicality of the Problem

As on 1 January 2009, there were 169.5 thousand milking cows registered in Latvia. Since mid-2007, the headage of milking cows in this country has undergone reduction by 13.5 thousand. Currently, this trend continues to grow in proportion with the increase of the production per cow. Over the past 5 years, the average milk yield per cow has increased from 4963 kg in 2004 to 5487 kg per cow in 2008. (Agricultural Data Centre, 2009).

The reproductive health system of milking cows is directly related to the growing milk yields because the more intensive physiological processes become, the stronger they tell on the incidence of metabolic diseases in dairy herds. In order that dairy herds would be able to balance a high productivity with optimum reproductive health of the milking cows, there are both, management and health-care steps required as well as in-depth research studies on functions of the reproductive system under circumstances of intensive metabolic activity.

Dairy industry incurs continuous losses due to reproductive system diseases of cows through unharvested milk, culled animals, unborn calves, repeated insemination, abortions, veterinary expenses, longer period of days open etc.

At the same time, very few studies and research data are found on physiological micro-processes taking place in endometrium of milking cows over the period post partum due to involution of the uterus (Bonnet et al., 1990; Chapwanya et al., 2009). There is a gap of information concerning biologically active substances as the presence of degradation, growth factors and neuropeptides and their interaction within the uterus over the given period, as well as on the course of the cell death and the role of cytokines in the involution process in cow's endometrium.

Purpose and Targets of the Study

Purpose of the Promotion Paper establishment of morphological and biochemical indicators, microbial flora of the uterus and changes of endometrium over the first and the fourth week post-partum in case of both, a physiological and pathological involution of the uterus.

Targets of the Promotion Paper.

1. Evaluation of the general health status and the uterus involution control for cows involved in the study.
2. Assessment of morphological and biochemical parameters of blood

3. Microbiological examination of the contents of the uterine cavity.
4. Assessment of the general outlook of endometrium and infiltration of inflammatory cells.
5. Evaluation of apoptotic cell amount and establish the presence of the tumour necrosis factor- α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor receptor p75 (NGFR p75), Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) and Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) – their positive structures and changes of the relative amount expressions in endometrium of cows.

Novelty of the Study

1. An overall assessment has been provided on the blood morphological and biochemical indicators as well as microbiological investigations of the contents of uterine cavity over the period post-partum; interaction of the said indicators with physiological and pathological involution of the uterus has been addressed.
2. The changes taking place in endometrium of the milking cows together with the presence of positive structures of such biologically active substances as VEGF, MMP-9, NGFR p75, PGP 9.5 and TNF- α , their dynamics and interaction over the first and the fourth week post-partum in case of both, physiological and pathological involution of the uterus have been for the first time in Latvia addressed together in one study.
3. For the first time in Latvia, the inflammatory, growth and degradation factors in the endometrium of milking cows were studied by use of immunohistochemical methods.
4. For the first time in Latvia the intensity of the programmed cell death and the dynamics in the cow's endometrium over the post-partum period was studied with the help of TUNEL diagnostics method.

Approbation of the Research Study

1. Šematoviča I., Jemeljanovs A. „Primiparous cows general and reproductive system health in comparison with multiparous cows in postparturition period”. *14th International Conference on Production Diseases in Farm Animals*, 20-24th of June 2010. Gent, Belgium. Abstract submitted.
2. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. „Changes of the cow's endometrium, distribution of growth stimulating and degradation factors in postparturition period. *ICAR 2008*. 2008, July, 13–18, Budapest, Hungary, poster presentation.

3. Šematoviča, I; Pilmane, M; Jemeljanovs, A. "Endometrial changes in postpartum period in cows". *XXVth World Buiatrics Congress*. July, 6-11, 2008. Budapest, Hungary, poster presentation.
4. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. "Inflammatory factors and apoptosis in the cows endometrium in the cow's endometrium in postparturition period.", *International Scientific Conference Research for rural development 2008*, May, 21-23, 2008. Jelgava, Latvia, oral presentation.
5. Šematoviča I., Jemeljanovs A., Pilmane M. "Vascular endothelial growth factor, nerve growth factor receptor p75, protein gene product 9.5, tumor necrosis factor- α and apoptosis in the cow's endometrium in postparturition period". *Baltic Morphology 4th Scientific Conference*. November, 19-20, 2007. Riga, Latvia, poster presentation.
6. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. „Dzemes audu morfoloģija, apoptoze un matricēs metaloproteināzes pēcdzemdību periodā govīm.” *Rīgas Stradiņa universitāte 6.zinātniskā konference*. 2007. g. 29–30.marts, Latvija, Rīga, postera prezentācija.
7. Šematoviča I., Jemeljanovs A. „Optimal medication of the reproductive system diseases in dairy cattle.” *24th World Buiatrics Congress*. October, 15–19, 2006, Nica, France, poster presentation.
8. Jemeljanovs A., Konošonoka I.H., Šematoviča I., Pūce B. „Microflora of the reproductive organs in dairy cows around calving”. *57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. September, 17–20, 2006. Turkey, Antalija, poster presentation.

MATERIALS AND METHODS

Trial sites of the study and profile of the herd included in trials

The promotion thesis “**Morphological and biochemical parameters of blood, microbiological flora of uterus and changes of endometrium in postparturition period in dairy cows**” by Ilga Šematoviča was completed over the period February, 2006 – January, 2010.

The research study was carried out on the basis of dairy herd located at “*Vecauce*” Extension and Research Farm (MPS) of the Latvian Agricultural University. Microbiology tests were performed in the laboratories of Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine “*Sigma*”. Indicators of blood morphology and biochemistry were investigated at SIA *Centrālā Laboratorija*. Morphological and immunoassays of the cow endometrium were performed at morphological laboratories of the Anatomy and Anthropology Institute of the Riga Stradins University (RSU AAI).

In June of 2009, the dairy herd of MPS „*Vecauce*” comprised 277 lactating dairy cows with the average yield of 6,557 kg/year. The average

milk fat reached 4.42 %, protein - 3.39 % and lactosis - 4.92 %. The somatic cell count indicator was 106 000 per mml. The analysis of reproduction data showed that 60.3% of cows had reached pregnancy with one insemination and 10.7% of cows needed 2 inseminations per pregnancy. The average service period was 151 days.

Over the past few years the dairy operation of *Vecauce* agricultural holding had experienced massive changes. A new free-stall barn for lactating cows has been constructed. Cows are grouped and fed different rations depending upon productivity and the phase of lactation. High producing cows are milked in the milking parlour twice a day, while cows serviced by milking robots are milked multiple times per day. Calving takes place in separate calving boxes in calving area where they are placed shortly pre-partum. 38 cows were included in the trial having undergone normal physiological calving without evident clinical health problems.

Overall Scheme of the Promotion Work

Examinations were performed in the first and fourth week post partum. Data analysis was carried out on the basis of examination results of the first and fourth week post-partum, establishing the average values and comparing physiological and pathological cases of involution

The cows were registered and subjected to the following manipulations: taking of temperature, clinical evaluation, rectal examination of reproductive organs, morphological and biochemical blood tests, microbiological examination of contents of the uterine cavity as well as biopsy samples of endometrium for histological and immunohistochemic examination and identification of apoptotic cells.

Clinical Evaluation, Blood Morphology and Biochemistry

The trial comprised 38 milking cows having undergone normal physiological calving without clinically evident disease problems. The body temperature was taken in rectum with a digital thermometer. Animals were registered, their health history collected including the husbandry, management, feeding conditions, productivity, etc. For examination of the internal reproductive organs and control of the course of involution, all cows within the trial were examined rectally and with the help of vaginal mirror. The nature of discharge from reproductive organs was assessed.

The morphological testing of blood (total number of leucocytes and erythrocytes, haemoglobin level and hematocrit level), as well as biochemistry of blood (carbamide, cholesterol, total protein and albumin, triglyceride and kreatinin level, alanine aminotransferase (ALAT), aspartate

transaminase (ASAT), alkaline phosphatase (SP), lactate dehydrogenase (LDH), concentration of α -amilase and Ca, P, Mg content) were carried out in SIA *Centrālā laboratorija*, a certified laboratory (certificate No. L 9/5-C, valid until 2010.18.05.) (Reg. No. Nr. 215/L430-C), where the testing performance is in conformity with standard LVS EN ISO 15189:2007. The blood samples were drawn from the tail vein in sterile disposable sample vacutainers of 3.0 ml and 4.5 ml produced by the company *Becton Dickinson Vacutainer Systems* and *Precision Glide™*.

Microbiological Examination

Microbiological tests were carried out in microbiological laboratories of the Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine *Sigra* (LATAK Reg. Nr. LATAK-T-038-06-99-A) pursuant to universally recognized accredited standardized methods: LVS ISO 7218:1996 and LVS NE ISO 6887-1:1999, as well as LVS NE ISO 4833:2003 L. Originally we obtained polycultures of micro-organisms out of which the stock cultures were isolated. The samples from the contents of cow's uterus for microbiological examination were obtained with disposable kits *EquiVet* (*Kruuse*, Denmark). The following growth media were used for isolation and identification from the uterus cavity of micro-organisms of the *Staphylococci* family: *Bairda – Parker's* agar (*Biolife*, Spain); brain-heart infusion stock (*OXOID*, UK); mannitol salt agar (*Becton Dickinson*, US); enriched agar with 5% sheep blood; liophilised rabbit plasma.

For determination of the gram-positive micro-flora (*Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.* un , *Aerococcus urinae*) the content of uterus cavity was inoculated on the enriched agar with 5% sheep blood added, the samples were incubated at 37 ± 1.0 °C temperature for 48%, reviewing the inoculations after 24 hours. Micro-organisms were determined up to the name of the species by making use of *BBL Crystal* (US) gram-positive identification system of micro-organisms. It involves fermentation, oxidation and hydrolyses test of several substrates (in total – 33). Bacteria were identified by comparing the obtained reaction results with those available in the data base.

The presence in uterus content of *Clostridium spp.* was assayed by selective culture medium DRCM (ang. *Differential Reinforced Clostridium Medium, Scharlau Microbiology*). Anaerobic conditions were ensured pouring sterile paraffin oil over the vial with inoculated medium. The samples were incubated at 37 ± 10 °C temperature for 96 hours. *Enterobacteriaceae* or the gram-negative microflora comprising *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, and *Proteus spp.* were established with the help of selective culture media: *MacConkey* agar (*Difco BBL*); *lactose TTC* agar (*SIFIN*, Germany). The inoculations were incubated at 37 ± 1.0 °C temperature for 48 hours,

rechecking the inoculations after 48 hours. Micro-organisms were determined down to the name of species by making use of *BBL Crystal* (US) identification system of gram-negative micro-organisms.

Drawing of Biopsy Samples from Cow's Endometrium and Examination thereof

The biopsy samples from cow's endometrium were taken from the ventral surface, dorsal wall of horn of the uterus - the site of embryo development during pregnancy by making use of a biopsy instrument (Denmark, *Kruuse*, Cat. No.:141700k). The tissue samples of endometrium were subject to the following tests: microscopic evaluation of the general status of endometrium and establishment of infiltration of inflammatory cells in endometrium (Aughey, Frye, 2001; Corbeil et al., 2005), Immunohistochemical tests were carried out to identify the presence of positive structures of TNF- α , VEGF, NGFR p75, PGP 9.5 and MMP-9 as well as alterations in their relative amount (Hsu et al., 1981). TUNNEL diagnostics method was applied to monitor the intensity of apoptosis processes (Negoescu et al., 1998). Every animal was individually prepared for biopsy by washing (with water and soap) and disinfecting the external sexual organs (70° *Spiritus Aethylici*). The biopsy sampling instrument was inserted through the vagina lips, vagina and cervix. Under rectal control a 0.3X 0.2 mm endometrium tissue patch was cut from ventral surface, dorsal wall of the uterus. The samples were immediately placed in marked containers with 3.0 ml of 10 % formal solution at pH 7.5 (Humason, 1967), where they were retained until testing. In the laboratory, the tissue samples were taken out of the formalin solution and immersed in paraffin wax forming a paraffin encased tissue blocks which we cut in strips 6 μ m thick with the help of microtome Subsequently, the strips were placed in + 50 °C water bath, placed on degreased slides and placed in a thermostat in +56 °C temperature for 40 minutes for drying out (Eurell, Frappier, 2006).

Immunohistochemical Method

Biotin-streptavidin immunohistochemical method was applied to establish the presence of positive structures of vascular endothelial growth factor (VEGF, code M7273, 1:50, *DakoCytomation*, Denmark), nerve growth factor receptor p75 (NGFR p75, code M3507, 1:150, *DakoCytomation*, Denmark), Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5, code Nr.Z5116, 1:1600, *DakoCytomation*, Denmark), tumour necrosis factor- α (TNF- α , code: Ab6671, 1:100, *Abcam*, England), Matrix Metalloproteinase -9 (MMP9, code AF909, 1:100, *R&D System*, Germany) (Hsu et al., 1981).

According to a universally accepted scheme, we treated the sample strips with xylene for deparaffination. The tissue samples were kept in ethanol (99.7–100 %) and rinsed with PBS (phosphate buffer, pH 7.4) solution for 10 min. After that, the preparations were placed in 4% alkaline sodium citrate, kept in a microwave oven for 20 minutes, then cooled down and rinsed with PBS. The strips were covered with 150 µl 3 % hydrogen peroxide for 10 minutes then again rinsed with distilled water and PBS. Subsequently, 30 µl of primary antibodies were applied and kept for 2 hours, at the same time applying also LSAB + LINK (ang. linked streptavidin antibody – secondary antibodies linked with biotine, code: K1015, *DakoCytomation*, Denmark) and LSAB + KIT (ang. streptavidin connected with enzyme peroxidase, code K0690, *DakoCytomation*, Denmark) for 25 minutes, as well as for 10 minutes DAB (3-3'-diaminobenzidine, chromogen system) (code K3468, *Dako*, Denmark) was applied. At the end of the process, staining of the tissue samples with haematoxylin for 2 minutes was performed.

TUNEL Method

TUNEL reaction was applied to establish the amount of apoptotic cells in histological preparations (Negoescu et al., 1998). We made use of the TUNEL labelling assay kit: *In Situ Cell Death Detection, POD*. Catalogue No. 0 684 814, *Roche Diagnostics* (Germany) and *DAB Peroxidase Substrate Kit* from *Vector Laboratories*, catalogue No. Sk 4100. The procedure required several stages. 1) deparaffinising of tissue samples (xylol – 2 times x 4 minutes.; 99° ethanol 2 x 2 minutes.; 95° ethanol 2 x 2 minutes.; 70° ethanol 2 x 2 minutes.; distilled water 7 – 10 minutes.; rinsing of slides with PBS (phosphate buffer) pH 7.5 5 – 10 min.). 2) Activity blocking of endogenic peroxidase (slides are placed in 50 ml PBS with 500 ml 30 % hydrogen peroxide solution and placed in a shaker for 30 min.) followed by a 3-fold washing with PBS for 5 minutes each time and recovery of antigen – placing of slides in a container with 0.2 M boric acid (pH 7.0) and then placed in a microwave oven at 700 W. The container was filled with distilled water allowing cooling down of the slides and samples, which then were rinsed with PBS. After that the slides were placed in a freezer for 10 minutes in 0.1 % BSA (bull serum albumin) solution with PBA, subsequently incubating the slide in TUNEL mixture (Tdt – T end mixture of deoxynucleotidyl *transferase* and *Digoxigenin Labeled Nucleotides*) for 1 h at 37 °C. The slides were washed with PBS 1:10. Afterwards slides were stained with POD (Fab fragment of anti-fluorescence antibodies of sheep connected with horseradish peroxidase) placed for 30 min in 37°C then washed with PBS. Developed with DAB (3-3'-diaminobenzidine, chromogen system) for determination of the solution peroxidase, then slides were washed

with tap water for 5 minutes, stained with haematoxylin for 20 sec. The reaction was terminated in the tap water for approximately 10 minutes. The tissue sample in question was stained in violet or blue colour.

Statistical Processing of Data

Of the data obtained, the average values and the standard deviation was calculated. For analysis of a sampled population, Student's t-test was applied. For comparison of the obtained indicators from the first and second examination of cows included in the trial, Wilkinson's test for analyses of 2 interrelated sampled populations was applied. Kruskal-Wallis test for comparison of 2 non-related sampled populations, in its turn, was applied to compare the examination results among cows with physiological and pathological courses of involution. The two-factor correlation analysis was applied to establish correlations between both the above substances and the statistical significance thereof (Paura, Arhipova, 2002; Arhipova, Bălița, 2003).

The data available in publications (Meyer, Harvey, 1998; Liepa, 2000) were used as basis for the admissible physiological values of biochemical and morphological indicators of blood (Meyer, Harvey, 1998; Liepa, 2000).

Histological examinations in relation to the numbers of inflammatory and apoptotic cells were carried out by applying the light microscope *Leica* with magnification 400 x in three freely selected representative fields of vision. The infiltration evaluation of the inflammatory cells was performed by reference to research publications of other scientists, where the number of leucocytes in the fields of vision was taken as the main factor for assessment of the cell infiltration and the degree of infiltration was expressed with graduation class depending upon the total number of inflammatory cells found in the field of vision (Gonzalez et al., 1985; Corbeil et al., 2005; Hirsbrunner et al., 2009).

In immunohistochemical examinations, the relative number of positive structures is evaluated with semi-quantitative counting method (Pilmane et al., 1998). The following assessment graduation was applied for registration of the positive structures: (–) – no positive structures within the field of vision; (+) – few positive structures within the field of vision; (++) – average quantity of positive structures within a field of vision; (+++) – large quantity of positive structures within the field of vision, (+++++) – very large quantity of positive structures within the field of vision. In statistical processing, the results obtained by semi-quantitative method, are processed as ordinal scale data.

RESULTS AND DISCUSSION OF THE RESEARCH STUDY

General Health and Uterus Involution of the Milking Cows

According to recording data, the average milk yield of cows included in the trial was 27.2 ± 5.23 kg per day with fat content 4.1 ± 0.65 %, lactose - 4.8 ± 0.23 %, and protein - 3.2 ± 0.30 %. As to the milk yields and milk components over the fourth week post-partum, there were no essential differences between the cows of physiological and pathological involution of the uterus. ($p > 0.05$). The clinical assessment of cows included in the trial showed that their health status is normal: animals were standing upright, consuming the feed provided to them and lively reacting to the environment.

Table 1

Hematologic Indicators and Body Temperature of the Milking Cows over the first and the fourth week post-partum

| Week | Discharge | Body temperature (C) | Total number of leucocytes ($\times 10^{12}$) | Number of erythrocytes ($\times 10^{12}$) | Haemoglobin (g/L) | Hematocrite (%) |
|--------|-------------------------|----------------------|---|---|-------------------|-----------------|
| First | Physiologically n=35 | 38.8±0.43 | 9.3±3.36 | 6.5±0.62 | 102.4±10.94 | 33.0±3.39 |
| | Pathologically n=3 | 39.4±0.40* | 5.9±0.7 | 6.6±0.86 | 118.7±7.64 * | 36.6±3.31 |
| Fourth | Physiologically n=29 | 38.5±0.44 | 11.2±5.34 | 6.1±0.72 | 95.3±9.65 | 29.2±2.27 |
| | Pathologically n= 9 | 39.0±0.40 * | 10.46±2.82 * | 5.7±0.42 | 90.9±9.79 * | 28.4±1.72 * |
| Norm | | 37.5–39.5 | 4–12 | 5–10 | 80–150 | 24–46 |

* $p < 0.05$

Cows with pathological discharge had higher body temperature which nevertheless did not exceed the upper admissible limit ($p < 0.05$), (Table 1.). For these cows the inflammation process in the uterine tissue was probably underway. A weak correlation was established between the body temperature and the nature of discharge over the first week ($r=0.37$; $p < 0.05$), as well as their presence in the fourth week post-partum ($r=0.42$; $p < 0.05$).

For 3 out 38 cows, in the first week post partum, the discharge from the uterus had an unpleasant smell, dirty brown or reddish colour. In the fourth week, nine cows had catarrhal purulent discharge from the reproductive tract. In rectal examination at the end of the first week, for all cows a significant reduction in size of the uterus was established, the uterus was sensitive to massage and placed in the abdominal cavity. In the fourth week, for cows without pathological discharge, the cervix was in the stage of closing up,

however it was possible to enter it with instruments of 0.3 cm diameter for bacteriologic samples and biopsy without causing injuries to animals. For cows with pathological discharge, the opening of cervix when examined with vaginal mirror was approximately 1.5 – 2.0 cm in diameter.

The results of the blood biochemical tests are summarised in Table 2. The level of total protein, albumins and globulins for all the cows included in the trail in the fourth week post-partum was significantly lower the admissible threshold values ($p < 0.01$). A statistically significant difference of the total protein, albumin and globulins in blood for cows with pathological and physiologic; involution was observed in the first and fourth week ($p > 0.05$), however, for cows which had endometritis in the fourth week post-partum, these indicators were lower ($p > 0.05$).

In the fourth week the number of these indicators had statistically significantly increased ($p < 0.05$), but nevertheless it was still lower than normal values ($p < 0.01$). This may suggest an insufficient protein in the feed ration or the functional inability of liver to synthesize albumins or that there may processes going on causing the system to lose protein and moreover, albumins (Meyer and Harvey, 2004; Jemeljanovs et al, 2008). There are studies of other scientists found who have similarly established a low protein level in the blood of cows post-partum (Yaylak et al., 2009), as well as for infertile cows (Афанасьев, 1972).

Ca and P are parameters, the decrease of which in relation to parturition and start of lactation may lead to serious post-partum pathologies: post-partum paresis and hypocalcemia. For all cows examined within the study, the level of calcium in blood over the first and the fourth week post-partum was low. Ca level in blood serum shows a statistically significant decrease at the time of parturition in comparison with one month pre- and one month post-partum (Meglia et al, 2001; Meglia, 2004). The amount of protein-related Ca in blood serum depends upon the fluctuations of protein level in blood serum, but for our cows both, the calcium and the protein level was decreased in blood. Research of other authors proves that already a sub-clinical hypo-calcemia in the period after calving is closely linked with incidence of endometritis and intensive presence of microflora in the uterus (Афанасьев, 1972; Mateus, Costa, 2002).

In our study it was established that for cows with pathologic discharge over the first and forth week after calving the Ca to P relation was lower than for cows with physiological involution of the uterus. There are research results available demonstrating the correlation between the Ca and P relationship and the fertility of cows. The 1.7–2.3 : 1 of Ca and P relationship is considered optimum. A lower or higher relationship correlates with infertility of cows (Афанасьев, 1972).

Table 2

Biochemical indicators of blood for cows in the 1st and 4th week after calving

| Parameters | Reference values | First week | | Fourth week | |
|------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | | Physiological discharge n=35 | Pathological discharge n=3 | Physiological discharge n=29 | Pathological discharge n=9 |
| Total protein (g/L) | 55-77 | 39.5±13.55*↓ | 40.2±5.29*↓ | 48.1±9.08*↓ | 45.4±12.19*↓ |
| Albumins (g/L) | 21-43 | 22.8±4.67 | 21.6±2.76 | 24.1±2.98 | 22.9±4.52 |
| Globulins (g/L) | 25-41 | 17.2±9.53*↓ | 18.6±5.29*↓ | 23.8±7.64*↓ | 22.5±7.97*↓ |
| Triglycerides (mmol/L) | 0.01-0.2 | 0.19±0.296 | 0.20±0.100 | 0.10±0.211 | 0.18±0.181 |
| Ca (mmol/L) | 1.98-2.5 | 1.3±0.52*↓ | 1.25±0.15*↓ | 1.76±0.36*↓ | 1.56±0.50*↓ |
| P (mmol/L) | 1.5-2.9 | 1.08±0.33*↓ | 1.1±0.17*↓ | 1.56±0.32 | 1.56±0.39 |
| Mg (mmol/L) | 0.7-1.1 | 0.55±0.247↓ | 0.53±0.113↓ | 0.41±0.311*↓ | 0.67±0.091 |
| Cholesterol (mmol/L) | 2.3-6.6 | 1.38±0.67*↓ | 1.2±0.25*↓ | 2.3±0.83 | 2.0±0.63↓ |
| Urea (mmol/L) | 2.4-7.5 | 4.6±3.0 | 2.9±2.5 | 2.4±0.7 | 2.0±0.80*↓ |
| Creatine (μmol/L) | 62-97 | 71.3±21.34 | 72.6±2.33 | 71.7±17.99 | 67.8±15.92 |
| Amilase (U/L) | 12-107 | 66.5±32.78 | 56.4±18.9 | 69.7±18.22 | 61.6±24.29 |
| ALAT (U/L) | 17-37 | 20.4±16.49 | 12.30±1.73*↓ | 27.1±5.75 | 29.3±19.62 |
| ASAT (U/L) | 48-100 | 59.6±32.35 | 65.3±24.96 | 40.7±9.48 | 45.2±32.68 |
| LDH (U/L) | 2666-4293 | 1417±55.78 | 1365±87.08 | 2216±50.75 | 1772±574.95 |
| AP (U/L) | 29-99 | 79.1±63.91 | 54.2±14.09 | 49.0±18.69 | 54.2±25.07 |

* p<0.05

Currently the in veterinary practice, the proportions of these macroelements are extensively addressed and analysed in the feed ration but not in cow's blood, for if Ca and P relationships in blood are determined by hormones (Parathormone and calcitonin) and it is proved that mineral feed supplements in different proportions where the Ca:P proportions were from 1.4:1 to 4:1 influenced the productivity of cows very little (statistically insignificant influence), moreover, the same was true for different stages of lactation (Trūpa, Latvietis, 2003). In the first week post-partum the P level was decreased also, while in repeated examination its level had normalized. Likewise, parturition causes the decrease of P in blood serum in comparison

with its level a month pre-partum (Meglia, 2004). Research has shown that for clinically healthy cows the level of magnesium (Mg) in blood serum amount before calving and a month after calving remains the same (Meglia, 2004). But, as is common knowledge, Mg is absorbed from the feed through gastro-intestinal tract, connected with albumins and re-absorbed in kidneys competing with Ca. In classical cases of the milk fever, hypermagnemia is observed more often. Within our study, for all the milking cows examined, the Mg level in blood serum was reduced in the first week after calving but at the four week after calving it had reached normal values.

The amount of urea in blood serum over the first week post-partum was normal for all cows, but in the fourth week it had a down-going trend for cows with pathologic discharge from the uterus or the ones with post-partum endometritis. The reduction of urea over the first three weeks after calving has been also referred to in studies of other scientists (Liepa, Krūmiņa, 2004). It has been explained by lower production of urea in liver, protein deficit in feed as well as its more active discharge due to polyuria (Jemeljanovs Ļ, Brizule, 1999; Meyer, Harvey, 2004).

The amount of creatinine in blood serum over the given period on the average was normal for all cows. Most of creatinine is synthesized in liver and passed to muscles where a part of it turns into phospho-creatinine serving as a source of energy for processes of the muscle metabolism. The amount of urea and creatinine circulation in blood increases in case of kidney pathologies (Meyer, Harvey, 2004). As in our case, the amount of urea was normal, we can exclude kidney pathologies for the cows investigated. The reduced urea level in the blood of ruminants however, suggests its reduced production due to disfunctions of liver or protein deficit in feed (Meyer et al., 1992). Another indication of kidney pathology is a reduced extraction of amylase with urine, with the amount of it simultaneously going up in blood. In urine, at the same time, in case of kidney pathology the amylase level is normal or even reduced (Hofbauere, 2004), but in this study urine was not tested. The elevation of the amylase level in blood is an indication of pancreatitis (Meyer, Harvey, 2004). At the same time, a reduced level of triglycerides in blood suggests dislipidemia. In our study, the level of triglycerides and amylase on the whole did not significantly differ between the first and the fourth week after calving; neither did it show material differences in cases of physiological and pathological involution of the uterus. It is proven that the amount of triglycerides in blood have no relation to the restart of the ovary cycle after parturition (Gúedon et al., 2009). Henceforth, we can conclude that cows in our study have an optimum kidney function.

One of indicators of liver functionality is cholesterol level in blood, because most of cholesterol is synthesized in liver (Rosenberger et al., 1979). For all the cows within the trial, the cholesterol level in blood over the first week after calving was essentially lower than the admissible levels ($p < 0.05$),

while in the fourth week it increased for cows with physiologic post-partum period, gradually reaching the lower threshold values. Liepa, Krūmiņa (2004) have established that cholesterol level in blood for cows receiving a well balanced feed ration reduces three days before calving but increases again to the normal values over the first three weeks after calving. At the same time there are research data available showing the renovation of cholesterol level over nine weeks after calving (Gúedon et al., 2009). Cholesterol is an important component of steroid hormones and the structure of bile acids (Jemeljanovs Ļ., et al, 2008). Consequently there are research results demonstrating, that for cows a high cholesterol level in blood is associated with optimum restart of cyclic activity of ovaries (Guédon et al., 2009). For cows with elevated cholesterol levels from the third to the seventh day after calving, the post-partum pathologies as retained placenta and inflammation of the uterus is observed more often (Zralý et al., 1989).

ALAT and ASAT are found in any cells of the organism but the highest concentration is in the muscle cells of heart and liver (Hofbauere, 2006). The average values of ALAT and ASAT did not deviate from normal values for both groups; however we observed that these indicators are increased for separate cows both, with and without post-partum pathologies. Their considerable increase after calving is explained with an intensive liver function in relation with a negative energy balance causing an intensified processing in liver of the free fatty acids and precipitation of fat in hepatocytes (Liepa, Krūmiņa, 2004), while other authors indicate that the increase of ASAT amounts may be one of the parameters to forecast the probability of endometritis for milking cows in the period after calving (Sattler, Fürll, 2004). The increase of ASAT amount in blood is associated with intensive activity of metabolic processes in liver (Antāne u. c., 2000) or liver pathologies for other species of animals. For cows, the relevant indicators of liver pathologies are sorbitol dehydrogenase, gamma-glutamyltransferase (Jemeljanovs Ļ., et al, 2008), but in our study the liver pathologies were not specially investigated.

For all cows, LDH exceeded the admissible level from the first to the fourth week after calving ($p < 0.01$), if compared with standards provided in different sources (Howard, 1986; Jemeljanovs Ļ., Brizule, 1999; Liepa, 200; Jemeljanovs Ļ., et al, 2008), however there is a side note in the given sources that if this enzyme shows elevated levels while the level of other enzymes has not significantly increased, such finding should be ignored and tests repeated after several weeks. Over the last years for laboratory equipment produced by the company *Kodak EKTACHEM*, considerably higher physiologic values of LDH are admitted for cows (2666–4293 U/L). Lactate dehydrogenase is found not only in liver but also in muscle cells erythrocytes and leucocytes therefore its increased values may be observed in cases of haemolysis, active pathological processes in the liver and extensive damage of the muscle tissue (Liepa, 2000; Hofbauere, 2006). Presumably, the elevation of LDH level in

blood may be attributed to the involution process of the uterus. Also other authors have pointed out that this may happen even up to the 27th day after calving relating it to atrophic processes in myometrium in the period after calving (Jaesechke, Muller, 2007).

Over the given period, AP was within normal limits. In different quantities, AP is found actually in all tissues. More often it is regarded as indicator of holostase, however the amount of it in blood tends to increase also at increased activity of osteoblasts, osteodistrophy, stress, jatrogenes and disturbances of the hormonal system as hypertyreoidism and hyperadrenocorticism as well as chronic heart failure and neoplasia (Rosenberger et al., 1979; Meyer, Harvey, 2004; Jemeljanovs et al, 2008)

Metabolic diseases, retained placenta and number of lactations have a correlation with incidence of post-partum endometritis (Kim and Kang, 2003). Comparing the average number of globulins in blood for cows in the first lactation and those in further lactations, we established increase of the number of globulins ($p > 0.05$). Drifting of separate indicators slightly off their standard values may be attributed to physiological processes in the period after calving (Meyer, Harvey, 2004).

Post-partum period is a critical period of time, when different deviations tend to occur in the field of general health and specifically of reproductive health (Gustafsson et al., 2004; Heuwieser, Drillich 2007). However there are no exact criteria how large deviations are admissible and in what period of time the morphological and biochemical parameters of blood should return to universally accepted normal levels.

Microbiological Examinations of the Contents of Uterus Cavity

Microbial contamination of reproductive tract is one of the most common reasons for reproductive system diseases in the period after calving (Kirks, Oertons, 2000; Herath et al., 2009). In the first week post-partum, microflora in the uterus cavity contents was found for 51.7 % of the examined cows while in 48.3 % of cases the presence of microflora was not established. In the fourth week post-partum these proportions were 31.4 % and 68.6 % accordingly. Microorganisms of *Staphylococcus spp.* and *Enterobacteriaceae* family were the ones found most often, as well as their associations. We did not establish essential differences in the microbiological test results of the contents of uterus cavity for cows with physiological versus pathological involution of the uterus.

The following microorganisms were isolated from the contents of the uterus cavity in the first week after calving: facultative anaerobic *Staphylococcus spp.*, anaerobic gram-positive *Clostridium spp.* and gram-negative *Enterobacteriaceae* family microflora including *Klebsiella spp.* and *Proteus spp.*, as well as *Pseudomona spp.*, *Corynebacterium spp* gram-

positive rods and microorganisms of species *Bacillus cereus*. Apart from above listed, in the fourth week post-partum the following microorganisms were isolated: gram-positive genus *Micrococcus* and species *Aerococcus urinae*, while *Pseudomona spp.* and *Klebsiella spp.* were not any more found. From cows after calving, many authors have isolated a wide spectrum of micro-organisms from the contents of the uterus cavity: facultative anaerobic microflora like *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, as well as anaerobic microflora as *Bacteroides spp.*, *Actinomyces pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* (Зверева и Хоми́н, 1976; Bonnett et al., 1991; Bekana, 1996; Kask et al., 1998; Kask, 1999; Twardon et al., 2000; Königsson et al., 2001; Lewis, 2003). This is one of the most important reasons for intensive infiltration of endometrium with inflammatory cells at the time after calving. There are data available that for 90 – 100 % of cows in the first week post-partum the microbial contamination affects the uterus cavity and 25 – 30 % of cows cannot cope with this contamination (Herath et al., 2009), while other authors mention a lower number of the disease cases - 15 – 20 % of cows (LeBlanc, 2008). In our study the most common microflora associations in uterus occurred between *Staphylococcus spp.* and *Enterobacteriaceae* microorganisms. This may possibly be related to symbiosis of these micro-organisms or similar conditions for their survival. Some authors (Kirks, Oertons, 2000; Heuwieser, 2007) point out that a healthy animal's system may eliminate the microbial contamination of reproductive tract induced during the parturition process all by itself, and it takes about 4 weeks, while other authors have observed a complete elimination of microorganisms in the cow's uterus within 2 to 3 weeks (Bondurant, 1999) and 6 weeks (Kask, et al, 1999) after calving. In our study, in the fourth week after calving, microflora was not found in the contents of uterus cavity for 68.6 % of the cows examined. That indicates an optimum function of the immunity system for cows included in our trial.

Microbiological test results of the contents of uterus cavity point out the role of housing environment and hygiene, for the micro-organisms established in tests are characteristic of environment – found in the surrounding air, on the barn floor, bedding, walls, in the feed, as well as on the coat and skin of animals and surface of the milking equipment. The gram-negative microorganisms of family *Enterobacteriaceae*, are found in the environment of the animal holding, especially in feces and bedding. In the fourth week after calving the number of those cows, microflora from the uterus cavity of which was not isolated, had grown which underlines the role of immunity system in the period after calving. Its suppressed status post-partum becomes the cause for inflammations of the uterus (Kimura et al., 2002; Sheldon, Dobson, 2004; Corbeil et al., 2005; Kim et al., 2005; LeBlanc, 2008; Herath et al., 2009; Gabler et al., 2009; Chapwanya et al., 2009) and also udder (Lessard et al., 2003; Pyörälä, 2008).

General Outlook of Endometrium and Infiltration of Inflammatory Cells

In the histological samples of endometrium over the first week post-partum for cows included in our trial, it was covered with prismatic epithelium, which was at places degraded. Physiologically, the mucous membrane of the cow's uterus is covered with prismatic epithelium which *inter alia* forms also glands (Brūveris, Baumann, 1987). There are research results available showing that the surface epithelium of endometrium after parturition for cows remains low up till the 31st day after calving (Емельянова, 1974; Okano et al., 2007). There is a manifest tissue oedema and glands at places are little pronounced. In this period, the regeneration of the uterus glands takes place. In the biopsy samples taken from endometria of our cows over the first week post-partum, hyperplasia of the basal cells, focus-formed, under-epithelium and diffuse blood vessels plethoric in endometrium, oedema of the uterus' tissue was established, but in separate samples, even an erosive surface of the mucus membrane was identified. The average number of the inflammatory cells, calculated in three representative fields of vision in 400 x magnification was 50.6 ± 24.94 . It should be noted that the number of inflammatory cells was considerably lower in tissue with pronounced oedema.

In the fourth week after calving, the biopsy samples from endometrium were taken and tested again and the results showed regeneration of the epithelial cells. In separate samples diffuse located plethoric capillary blood vessels were still identified. Some authors have observed that epithelisation processes last until the 20ieth day post-partum (Kummer et al., 1989). From day 21 to day 30 after calving the mucous membrane of the uterus is covered with single-row epithelium, with pseudo-multiple-row cells in separate places (Емельянова, 1974). In the fourth week post-partum, a manifest infiltration of the inflammatory cells around the output of glands, proliferation of glands as well as focus-formed lymphocyte infiltrates within the gland layer. Furthermore, we found a weak but statistically significant correlation between the presence of the lymphocyte nodes in endometrium with presence of discharge from the reproductive tract at that time ($r=0.33$; $p<0.01$). The focus-formed lymphocyte infiltration for cows have been observed already around day 10 post-partum and the infiltration of the mobile inflammatory cells in endometrium is an important factor for the regeneration process of the uterus' tissue after calving (Kummer et al., 1989). Local expressions of immunity have been investigated in connection with post-parturition processes in tissue of the cow's uterus (Chapwanya et al., 2009). As over the fourth week after calving an intensive formation of the focus-formed infiltrates of lymphocytes, it suggests that in the first week post-partum, cellular hormonal defence mechanisms prevail in the tissue of uterus, while later humoral mechanisms are activated. Many authors accentuate the role of

local and general immunity (Kummer et al., 1989; Chapwanya et al., 2009). Of cows over period post-partum (Kimura et al., 2002; Sheldon, Dobson, 2004; Corbeil et al., 2005; Kim et al., 2005; LeBlanc, 2008; Herath et al., 2009; Gabler et al., 2009; Chapwanya et al., 2009).

In the forth week after calving we observed an average and a strongly manifested infiltration of inflammatory cells in endometrium (102.9 ± 60.69). There was a large standard deviation, data were dispersed which can be possibly explained with capacity of the immunity system of individual cows.

Our study proves that in the fourth week post-partum there may be an intensive infiltration of inflammatory cells in cow's endometrium without clinical signs of the uterus inflammation. Also other authors point out that within the uterus involution process, the inflammation response mechanism with migration of apoptosis, neutrophils and other leucocytes is actively working, as well as the release of degradation enzymes takes place (Nilsen-Hamilton et al., 2003). Similar opinion is expressed by other scientists who declare that a complete involution of the uterus lasts up tot 33-35 (Chasandra, Krishna, 2009) or 41 - 50 days after calving (Garcia, Larsson, 1982; Leslie, 1983).

Presence and dynamics of inflammatory, growth and degradation factors

In our study it was found that **TNF- α** in cow's endometrium is released by activated macrophages this cytokine triggers the cell proliferation, differentiation and takes part in inflammatory reaction, proliferation of the cells of endometrium over the reproductive cycle and in the period of pregnancy (Gamo et al., 2007). The number of TNF- α positive structures in cow's endometrium had considerably grown when comparing the first and the fourth week after calving ($p < 0.01$), the relative amount of its positive structures had a positive statistically significant correlation with the number of inflammatory cells in endometrium ($r = 0.48$, $p < 0.01$) within first four weeks after calving. We observed a positive TNF- α correlation with the number of apoptotic cells in endometrium which became closer when comparing the first week ($r = 0.40$, $p < 0.05$) with the fourth week ($r = 0.44$, $p < 0.01$) after calving. Besides the relative amount of TNF- α positive structures has a weak, yet statistically significant correlation with the relative number of NGFR p75 positive structures in cow's endometrium within the first four weeks after calving ($r = 0.36$, $p < 0.01$). We failed to find a significant difference between the cows with a physiologic and cows with pathologic course of involution ($p > 0.05$).

VEGF is involved in angiogenesis both, for the sake of creation the blood circulation system of embryo as well as it is involved in angiogenesis of and adult organism (Guidi et al., 1998; Halder et al., 2000; Wang et al.,

2003; Wei et al., 2004; Ylä-Herttuala et al., 2007; Ozbudak et al., 2008). Structures containing VEGF were found in endotheliocytes of the blood vessels. The increase of the VEGF positive structures in tissues of endometrium was statistically significant, comparing the fourth and the first week post-partum ($p<0.05$). We established a weak, yet statistically significant correlation of relative amount of VEGF positive structures with PGP 9.5 in the first week ($r=0.34$, $p<0.05$), slightly decreasing over the fourth week, however did not lose its statistical significance ($r=0.33$, $p<0.05$). In the first week the relative amount of VEGF positive structures had an average positive correlation with the number of apoptotic cells in the tissues of cow's endometrium ($r=0.48$, $p<0.01$). For the relative amount of VEGF positive structures in cow's endometrium, there was a weak, yet statistically significant correlation with the number of inflammatory cells in the tissues of endometrium ($r=0.24$, $p<0.05$), as well as with amount of haemoglobin in blood (0.27 , $p<0.05$). We did not establish material differences in the amount of VEGF in cow's endometrium comparing cows with physiologic and pathologic involution of the uterus ($p>0.05$). and increased production of angiogenic factors as a reaction to hypoxic stimuli can be observed over the periods of tissue healing and pathological processes (Scott et al., 1998; Ankoma-Sey et al., 2000; Ozbudak et al., 2008).

The **NGFR p75** positive nerve fibres were found under the epithelium of endometrium, as well as at the glands of endometrium and in stroma. The amount of NGFR p75 positive structures in cow's endometrium over the first four weeks post-partum had undergone a statistically significant growth ($p<0.001$). In the first week after calving the amount of NGFR p75 positive structures in cows endometrium had a statistically significant average correlation with PGP 9.5 ($r=0.52$, $p<0.01$) and number of apoptotic cells ($r=0.58$, $p<0.01$). On the whole over the four weeks long post-partum period, we established in cows' endometrium week but statistically significant correlation of NGFR p75 positive structures with number of inflammatory cells in endometrium ($r=0.37$, $p<0.01$), MMP-9 ($r=0.44$, $p<0.01$), number of apoptotic cells ($r=0.45$, $p<0.01$) and the relative amount of TNF- α positive structures ($r=0.36$, $p<0.01$). We did not find essential difference as to the amount of NGFR p75 positive structures between the cows with physiological and cows with pathological involution of the uterus ($p>0.05$). NGF is involved in neuro-immune reactions and tissue inflammatory processes, as well as it is pointed out as one inducing factors of the course of apoptosis (Vaidyanathan et al., 1998); one of the research studies points to the ability of NGF to promote viability of endothelial cells and underpin auto-immune both, the auto-immune and inflammatory processes (Julio-Pieper et al., 2006). The co-expression of NGF with molecules involved in angiogenesis and protein tirokinase A (p-TrkA) expression in endothelial cells points to their pro-angiogenetic role (Davidson et al., 2003). The communication of neuron structures is regulated also by the course of

apoptotic processes as well as physiologic and pathologic processes (Green et al., 2003; Jacob, 2003). This is certified by the increase of the relative amount of NGFR p 75 positive structures in case of pathologic uterus' involution for cows.

The increase of **PGP 9.5** positive structures in the cow's endometrium was not material comparing the first and the fourth week post-partum ($p>0.05$). In the first week after calving, the presence and the relative amount of expressions of PGP 9.5 positive structures in cow's endometrium had a weak yet statistically significant correlation with the relative amount of VEGF positive structures ($r=0.34$, $p<0.05$), retaining the same trend also over the fourth week after calving ($r=0.33$, $p<0.05$). At the same time, we established an average statistically significant correlation the relative amount of NGFR p75 positive structures in endometrium over the first week ($r=0.52$, $p<0.01$). We did not find essential difference in the amount of PGP 9.5 positive structures for cows with physiological and cows with pathologic involution of the uterus ($p>0.05$). In inflammatory process, the inflammation mediators promote the formation of the nerve fibres, however in respect of PGP 9.5, we did not observe such a trend, because at high infiltration level of inflammatory cells we did not establish a proportional increase in the amount of PGP 9.5 immunoreactive fibers. PGP 9.5 is one of the essential parameters of the innervation morphology of the uterus over the period after calving (Lundberg et al., 1988; Tingaker et al., 2006). The PGP 9.5 positive structures found over the first week post-partum certify the start of active regeneration processes, which were mainly found in nerve fibres around glands of endometrium, under the mucous membrane and in walls of the blood vessels. However the increase of the amount of PGP 9.5 positive structures in cow's endometrium over the first four weeks post-partum was considerable. There are data underpinning assertion that for heifers having reached sexual maturity, essential changes in the innervation structure of the uterus between different stages of the reproductive cycle have not been found (Wrobel et al., 1993), despite that, several authors in subsequent studies have proved that the innervation of uterus is subject to important changes depending upon the reproductive cycle and the physiologic condition (Zoubina et al., 1998; Stjernholm et al, 1999; Zoubina and Smith, 2000; Zoubina et al., 2001), as well as changes in its amounts in connection with receptors of estrogen in endometrium (Blacklock et al., 2004). Presumably, over the post-partum period different inflammatory mechanisms, other than those dominating the classical inflammatory process, are the decisive ones.

Inflammatory cells, especially macrophages are capable of synthesizing, storing and emitting **MMP-9** (92 kDa gelatinase, gelatinase B), able to split type IV, V collagen, elastin and gelatine (Jacob, 2003). The expression of MMP-9 positive structures in its turn was found in the phagocyte cells of the glandular layer of endometrium. This may be associated with specific activation of this proteinase, as well as the presence and active remodelling or

transformation within the cow's endometrium over the given time of relevant substance, which may be split by MMP-9. The relative amount of MMP-9 positive structures in cow's endometrium, comparing the first and the fourth week post-partum, has grown with statistical significance ($p < 0.05$). A weak, positive correlation of the relative amount of MMP-9 positive structures in endometrial was established with relative amount of NGFR p75 positive structures in endometrial over the given period of time ($r = 0.31$, $p < 0.05$). We established that positive structures of MMP-9 were found more in endometrium of cows having pathologic discharge from reproductive tract ($p = 0.053$), especially, over the fourth week post-partum ($p < 0.05$). The inflammatory response mechanism, the course of apoptosis, migration of neutrophile and other leucocytes, as well as release of degradation enzymes are important components in involution processes of the uterus (Nilsen-Hamilton et al., 2003). Furthermore, evaluating the obtained data over the first four weeks after calving, we established a weak, yet statistically significant correlation of the relative amount of MMP-9 positive structures with the body temperature of cows and the relative amount of NGFR p75 positive structures in cow's endometrium over the given period of time. Thus, in case of inflammation, the inflammatory and degenerative processes prevail, becoming the reason of the proliferation of neuronal structures. The ECM degradation of cells with components of the matrix metalloproteinases' systems is required for migration of endothelial cells, angiogenesis, ensuring of homeostasis in tissue transformation processes (Kliem, 2006).

Some authors have proven the relation between the number of MMP-9 positive structures and *Proteus vulgaris* microbial contamination in tissues. The above studies ascertain that the expression intensity of MMP-9 may serve as an indicator to get rid of the bacterial substance ensuring the inflammatory reaction (Balotescu et al., 2008). Thus, MMP-9 may be considered an important inflammation marker.

The number of apoptotic cells in cow's endometrium had significantly increased when comparing the first week (21.5 ± 24.62) and the fourth week post-partum (45.0 ± 35.53) ($p < 0.01$). The number of apoptotic cells in cow's endometrium in the first week post-partum had a weak yet statistically significant correlation with the infiltration of inflammatory cells in endometrium ($r = 0.35$, $p < 0.05$), as well as with the relative amount of TNF- α positive structures in endometrium ($r = 0.40$, $p < 0.05$), which over the fourth week gets closer ($r = 0.44$, $p < 0.01$). Furthermore, the number of apoptotic cells in cow's endometrium over the first week after calving had a average statistically significant correlation with VEGF ($r = 0.48$, $p < 0.01$) and the relative amount of NGFR p75 (0.58 , $p < 0.01$) positive structures. Disappearance of cells via apoptosis is observable in involution and atrophy processes in different glands. Thus, the process is characterized by the reduction of an organ in size without disorganization of its basic structure (Walker et al. 1989). One of the reasons for increase of the amount of

apoptotic cells in tissue of endometrium over the first four weeks post partum could be associated with the cow's uterus undergoing the closing stage of involution at the fourth week, the tissue of uterus are dense and solid in comparison with the first week when oedema is dominant in its tissue. Besides, the amount of inflammatory cells in endometrium had statistically significantly increased and it is known that activated macrophages emit TNF- α , which in its turn is one of the inducing factors of apoptosis (Zhdanov et al., 2003). The above is certified by the weak, yet statistically significant correlation established in our study between number of apoptotic cells and infiltration of inflammatory cells in endometrium, as well as the relative amount of TNF- α positive structures in endometrium which gets closed over the fourth week. Over the first week, the number of apoptotic cells in endometrium had an average correlation with relative amount of VEGF and NGFR p75 positive structures once again certifying an intensive metabolic process in endometrium, hypoxic stimulate and proliferation of the inflammation induced neuronal structures.

CONCLUSIONS

1. Cows with pathologic involution of the uterus have a statistically significantly higher body temperature than cows with physiological involution of the uterus despite that it still within the admissible limits.
2. For cows with pathologic involution of the uterus, the increase of the total amount of leucocytes and decrease of erythrocytes and haemoglobin in blood, as well as a low level of calcium, urea and cholesterol in blood is observed.
3. Examining the contents of the uterus cavity of cows in the first and fourth week after calving, the bacteria of *Enterobacteriaceae* family and *Staphylococcus spp.* were established as the dominating micro-organisms. For cows with pathologic discharge from the reproductive tract over the first and fourth week post-partum in associations of micro-organisms from the uterus cavity *Proteus spp.* is often found, in both, the first and the fourth week and *Bacillus cereus* – in the fourth week post-partum.
4. The general outlook of microscopy of the cow's endometrium may show intensive infiltration of inflammatory cells without clinical signs of the inflammation of uterus.
5. For cows with pathologic involution of the uterus, a more intensive infiltration of inflammatory cells in endometrium, more manifest formation of the focus-formed lymphocyte infiltrates and more MMP-9 positive structures over the fourth week post-partum are observed thus indicating more intensive inflammatory processes than for cows with physiological involution of the uterus.

6. A statistically significant increase in cow's endometrium of inflammation, number of apoptotic cells, cytokine TNF- α , growth factors VEGF, NGFR p75, innervation marker PGP 9.5 containing neuropeptides, relative amount of tissue degradation enzyme MMP-9 positive structures from the first to the fourth week post-partum is indicative of intensive remodelling of the endometrium tissue in the given period involving mutual interaction of the said factors and processes (especially TNF- α and apoptosis).
7. The increase of the relative amount of VEGF positive structures certifies the persistence of endometrium hypoxia in the period of the involution of uterus, while a simultaneous increase of the relative amounts of NGFR p75 positive structures and PGP 9.5 positive structures are indicative of the nerve tissue proliferation stimulated by inflammatory process.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE

1. Over the post-partum period it is advisable to monitor the changes of body temperature of cows and the nature of post-partum discharge.
2. Microbiological examination of uterus cavity content is profitable for prophylaxes and successful treatment of postpartum endometritis
3. Changes in infiltrations of the inflammatory cells, numbers of apoptotic cells and amounts of MMP-9 positive structures may be used as inflammation process markers for cows in the later period after calving.
4. The relative amount of TNF- α and VEGF positive structures and alterations thereof are indicative of continuation of the inflammation, regeneration and hypoxic stimulate in endometrium of cows over the period post-partum.

BIBLIOGRAPHY OF PUBLICATIONS ON THEME ADDRESSED IN THE PRESENT PROMOTION WORK

1. Šematoviča I., Jemeljanovs A., Pilmane M. (2010) Slaucamo govju vispārējās veselības vērtējums pēcdzemdību periodā saistībā ar reproduktīvās sistēmas mikrobiālo floru. = Evaluation of the general health in dairy cows in postparturition period with relevance to microflora in the reproductive system *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*. Submitted on December, 2009.
2. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Inflammatory factors and apoptosis in the cows endometrium in postparturition period. *Research for rural development 2008, International Scientific Conference Proceedings*. Latvia, Jelgava, p. 266–269.

3. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A., (2008) Endometrial changes in postpartum period in cows. *Proceedings of XXVth World Buiatrics Congress*. Budapest, Hungary, p.88–91.
4. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Distribution of growth stimulating and degradation factors in cow's endometrium in postparturition period. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*, Latvia, Jelgava, 21(316), p. 66–72.
5. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Vascular endothelial growth factor receptors p75, protein gene product 9.5, tumor necrosis factor- α and apoptosis in the cow's endometrium in postparturition period. *Agraarteadus, Journal of agricultural science*, Estonia, Tartu XIX;(2), p. 46–50.
6. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2008) Matrices metaloproteināzes, interleikīns-10, audzēju nekrotiskais faktors- α , neuropeptīdi un apoptoze govju endometrijā pēcdzemdību periodā = Matrix metalloproteinases, interleukine-10, tumor necrosis factor- α , neuropeptids and apoptosis in cows endometrium in postparturition period. *LLU Raksti = Proceedings of the Latvia University of agriculture*. Latvija, Jelgava, 21(316), p. 73–78.
7. Šematoviča I., Pilmane M., Jemeljanovs A. (2007) Slaucamo govju dzemdes morfoloģija pēcdzemdību periodā = Morphology of Cow's Uterus in Postparturition Period. *LLU Raksti = Proceedings of the Latvia University of agriculture*. Latvija, Jelgava, 18(313), p. 58–62.
8. Šematoviča I., Jemeljanovs A., Vētra J. (2006) Uz augu valsts un ķimioterapeitisko komponentu bāzes veidotas barības piedevas ietekme uz slaucamo govju reproduktīvo sistēmu = The effect of feed additives with the plant kingdom and chemotherapeutic components on the reproductive system of milking cows. *Starptautiskās zinātniskās konferences Raksti „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna” = International scientific conference Proceedings „Animals. Health. Food Quality”*. Latvija, Jelgava, p. 284-289.