

LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY



Birutė Karvelienė

CHANGES IN THE UTERUS OF SOWS WITH DISTURBED REPRODUCTIVE CYCLE DURING SEXUAL CYCLE AND PATHOLOGICAL ANOESTRUS CONDITION

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

Kaunas, 2007

The work has carried out at Lithuanian Veterinary Academy in 2003–2007.

Research supervisor –

Ass. prof. dr. Vita Riškevičienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

Veterinary Medicine Science Council:

Chairman –

Ass. prof. dr. Rasa Želvytė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

Members:

Prof. habil. dr. Vytautas Špakauskas (Lithuanian Veterinary Academy, Veterinary Institute, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Prof. dr. Neringa Paužienė (Kaunas Medicine University, biomedical sciences, medicine – 07 B);

Prof. dr. Antanas Sederevičius (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Ass. prof. dr. Vituolis Žilaitis (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

Opponents:

Ass. Prof. dr. Albina Aniulienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Prof. habil. dr. Ramutis Klimas (Šiauliai University, biomedical sciences, zootechny – 13 B).

Public defence of doctoral dissertation in Veterinary Science Council will take place at the Lithuanian Veterinary Academy I auditorium 1 p.m. on 23th of November, 2007.

Address: Tilžės str. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

The summary of dissertation has been sent on 23th of October, 2007, according to confirmed address list.

Dissertation is available at the libraries of Lithuanian Veterinary Academy and LVA Veterinary institute.

LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA

Birutė Karvelienė

LYTINIO CIKLO IR PATOLOGINĖS ANOESTRUS BŪKLĖS METU VYKSTANTYS POKYČIAI SUTRIKUSIOS REPRODUKCIJOS PARŠAVEDŽIŲ GIMDOJE

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

Kaunas, 2007

Disertacija rengta 2003–2007 metais Lietuvos veterinarijos akademijoje.

Mokslinė vadovė –

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

Disertacija ginama Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarinės medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė –

Doc. dr. Rasa Želvytė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Nariai:

Prof. habil. dr. Vytautas Špakauskas (Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Prof. dr. Neringa Paužienė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B);

Prof. dr. Antanas Sederevičius (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Doc. dr. Vituolis Žilaitis (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Oponentai:

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

Prof. habil. dr. Ramutis Klimas (Šiaulių universitetas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B).

Disertacija bus ginama viešame Veterinarinės medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2007 m. lapkričio 23 d. 13 val. Lietuvos veterinarijos akademijos I auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2007 m. spalio 23 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą.

Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos veterinarijos akademijos ir LVA Veterinarijos instituto bibliotekose.

INTRODUCTION

In big highly specialized pork production enterprises especially high attention is paid to herd reproduction. These enterprises use different feeding, keeping and handling conditions, rather limited movement of the animals, lack of natural sun light, high concentration of the animals, noise and other stress factors suppress defensive functions of the organism and its ability to adopt, disturb physiological functions. All these factors especially negatively effect reproductive processes in pigs (Diehl et al., 2003).

Disturbances of reproductive system in sows are mainly caused not by the direct infringements of the ovaries, but by the disturbances of hormonal regulation in the sow organism, caused by previously mentioned and other factors as well as by the unqualified management. Hormones circulating in blood, excreted by a hypophysis and genital glands, control cycles of uterus and ovaries and so ensure normal reproductive functions in the organism of sows. In case when neuroendocrine regulation is disturbed normal reproductive cycle changes (Chung et al., 2002). Undoubtedly, the role of endocrine and immune system on the reproductive functions of the organism is very important too, however mechanism of this action has not been completely studied (Kayisli et al., 2004).

The initial sign about possible disturbances of hormonal regulation – becoming of the *oestrus* unnoticeable – “silent”, it is hard to define and it causes recurrence of *oestrus* after the insemination or even infertility. About 10-30 percents of sows on the average after weaning the piglets do not have *oestrus* at all and rather high number of inseminated sows due to the poor ovulation or the errors during the insemination fail to get inseminated. This problem becomes especially crucial due to the very complicated and sensitive activity of reproductive system in sows during summer or early autumn months and especially important among primiparous sows if to compare to the sows which have already had piglets.

In order to obtain as many as possible piglets during the year and maintain its productivity as long as possible, it is primary important, that the *oestrus* would manifested during 4-7 days and the sow would be inseminated.

It is evident that studies of ovaries state in alive industrial animals are rather complicated. That's why postmortem examination of ovaries and genitals organs of the animals with disturbed reproduction in a particular herd can be one of the methods allowing to define the causes of the *oestrus* cycle disturbances. Such studies were carried out with cyclic sows (Dalin et al., 1997; Heinonen et al., 1998), however we failed to find such information about the sows suffering from reproductive disturbances. During such ex-

periments it becomes possible to evaluate the percent of sows with reproductive disturbances and the percent of those in *anoestrus* condition.

Determination of the percent of sows in *anoestrus* condition is important due to the fact that hormonal balance in these sows is completely disturbed. Growing follicles of normal sows excrete into the blood higher amount of estrogen which cause manifestation of *oestrus*, peak of hormone liuteine (LH) concentration and ovulation (Knox et al., 2001). Due to the absence of follicles stimulating hormone (FSH) synthesis and secretion maturation of follicles in the ovaries is very slow or absent at all (*anoestrus*), estrogens are not synthesized or excreted, there is no ovulation, formation of *corpus lutei*, development and changes of endometrium, which is essential for *oestrus* cycle is disturbed.

In order to evaluate the activity of the ovaries in sows or to state pregnancy the estimation of the amount of progesterone in blood serum is widely used. However, the data about the possibility enabling to evaluate the stage of *oestrus* cycle or the reason of reproductive cycle disturbances only according to the amount of progesterone in blood serum are rather limited due to the fact that the localization of steroids and other hormones receptors in the endometrium of *anoestrus* sows is changed or absent at all, infiltration of the immune cells, and all the factors mentioned suppress returning of *oestrus* cycle to normal physiological process.

The scientists have succeeded to prove the effectivity of hormonal treatment in stimulating sexual maturation of pigs and manifestation of *oestrus* in sows after weaning piglets (Kirkwood et al., 1998; Bates et al., 2000; Knox et al., 2001). In the ovaries of *anoestrus* sows is stated the absence of follicles maturation and ovulation, what is more, due to the absence of specific receptors or disturbed localization they are unable to react to the substances, commonly used for stimulation – gonadotropic hormones (GnRH).

It is known that steroids participate in many processes of the organism, cause structural and functional changes in uterus tissues, and this action manifests through specific receptors. The distribution of steroid receptors in uterus tissues in case of normal *oestrus* cycle is well studied (Saunders et al., 1989; Geisert et al. 1993; Tarleton et al., 1998; Sukjumlong et al., 2003; 2004; 2005), however such studies were not carried out in the uterus of sows with disturbed reproduction. The main problem in this case is to define whether the number and distribution of sexual steroids in uterus tissues is the reason or the consequence of disturbed reproduction? In order to elucidate this problem even partially the main aim of this research was formed and it was predicted to find out frequency of *anoestrus* in pig herds, to define morphological changes and the distribution of estrogen (ER α) and progesterone (PR-A) receptors in the uterus of sows with disturbed reproduc-

tion during the *oestrus* cycle and in case of pathological *anoestrus* state and to evaluate the level of effectivity of hormonal sexual glands stimulation by GnRH.

Aim of the research:

The aim of this research was to evaluate the effect of various factors on the duration of the period from piglets weaning to *oestrus* manifestation and to define morphological changes and distribution of estrogen receptors (ER α) and progesterone receptors A (PR-A) in the uterus of sows with disturbed reproduction during the *oestrus* cycle and pathological *anoestrus* condition.

Objectives:

1. To analyze factors effecting the duration of the period from piglets weaning to *oestrus* manifestation.
2. To evaluate genital organs of the sows slaughtered due to the disturbed reproduction and define functional state of the ovaries.
3. To evaluate changes in the uterus of sows with disturbed reproduction during the *oestrus* cycle and pathological *anoestrus* condition (histological – morphometric investigation).
4. To study changes of progesterone and estradiol-17 β concentration in blood serum of sows with disturbed reproduction.
5. To analyze progesterone (PR-A) and estrogen (ER α) receptors in the uterus of sows with disturbed reproduction during different stages of *oestrus* cycle and pathological *anoestrus* condition (immunohistochemical investigation).
6. To define changes of progesterone (PR-A) and estrogen (ER α) receptors localization in the uterus of sows with *anoestrus* condition after application of gonadotropic hormones.
7. To evaluate the effectivity of gonadotropic hormones used to induce *oestrus* in sows with disturbed reproduction.

Novelty of the research:

Morphological investigations of sows with disturbed reproduction endometrium were carried out for the first time, changes of luminal endometrial epithelium and glandular epithelium height, infiltration of the immune cells, PR-A and ER α localization during different stages of *oestrus* cycle and pathological *anoestrus* condition were studied.

The effect of the number of gonadotropic hormones (FSH, LH), progesterone (PR-A) and estrogen (ER α) receptors and localization changes was studied.

METHODS OF THE EXPERIMENTS

The experiments were carried out in four pig breeding farms. 399 Lithuanian White and Danish Landraces (LW $\times$ DL) crossbred sows and 239 Danish Landraces (DL $\times$ DL) purebred born in 1999-2002 were by random selected for the experiments. The experimental sows were kept in individual cages, fed according to the rations, formed for the sows on the farms. The rations were formed in accordance to nutritional standards applied for the sows in Lithuanian Republic (Jatkauskas et al., 2002).

Individual and reproductive data of the sows were used for the data analysis. The preliminary data were used to calculate the following parameters: period from piglets weaning to *oestrus* manifestation in days (WSI), the age of the sow during the first insemination (APS), the age of the culled sow (CA), duration of pregnancy (PD) and lactation (LL).

Statistical analysis was carried out using the version of the statistic package SPSS No. 15 (SPSS for Windows 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 1989-1995). Data statistical analysis was done by a descriptive statistic using monofactorial analysis (Student t-test) and multifactorial analysis (ANOVA). The method of dispersive analysis was used in all three models (General Linear Model - GLM). Comparisons among groups were made by Post Hoc multiple comparison method. Differences among groups were analyzed by LSD method. Statistical calculations were carried out using three models. The data were considered to be statistically reliable when: * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$. Correlation among dependent variables and strength of the direct relation were evaluated by Pearson and Spearman correlation matrixes. Box-plot diagrams were used.

The samples for the experiments were collected in autumn. 150 LW $\times$ DL sows with disturbed reproductive cycle were slaughtered. Taking into consideration the reason of culling the sows were divided into two groups. I group - 68 sows – culled due to the absence of *oestrus* signs longer than 30 days after piglets weaning, II group – 82 sows – due to the infertility after third successive insemination.

Macroscopical investigation of sows genital organs. After slaughtering genital organs of the culled sows were evaluated organoleptically and the stage of the *oestrus* cycle was defined. Uterus, ovaries were weighted by an electronic scale (BJIKT, Russia), follicles and *corpus lutea* (CL) were counted in the ovaries, the diameter of the follicles and CL were estimated by a calipers, cysts, the consistence of uterus cervix was evaluated in grades

according to the method offered by M. J. Meredith (1977) for the evaluation of uterus cervix consistence by palpation. If ovaries are active, the diameter of follicles - 6 - 8 mm, and there are no newly formed CL - was stated the stage of *prooestrus*, follicles 8 - 10 mm, no CL - *oestrus*, when the diameter of follicles reaches 5 mm, and the diameter of CL 5-7 mm, CL color is blue or pink with dark dots, blood in the cross-section – very early or early *dioestrus*, the diameter of the follicles 6 - 7 mm, the diameter of CL 10 mm, CL pink color - *dioestrus*, follicles 7-8 mm, CL diameter 5 mm, CL color yellowish – late *dioestrus*. Absence of CL, follicles smaller than 4 mm or their absence, ovaries overgrown by connective tissue – pathological *anoestrus* condition (Dalin et al., 1997).

Histological investigation of the uterus of sows with disturbed reproduction aimed to determine the stage of *oestrus* cycle and to confirm pathological *anoestrus* condition. The samples for histological and morphometric investigation were taken from both horns of the uterus inner side (mesometric) 30 cm from the frontal part of the horns and immediately fixed in 10 percent bupher solution of formaldehyde no longer than 24 hours. After fixation and dehydration samples of tissues were infused into paraffin. From each uterus horn sample were made 2.5 μ thickness incisions by a microtome (SHANDON Scientific Limited is an ISO 9001 and Approved Company. Finesse Microtome series Issue 1 Operator Guide 77510250 Gb, England) and put on the objective glasses (Menzel-Glaser, Freiburg, Germany). The prepared samples were stained for 3 minutes by hematoxilin and 1 minute by eosin.

Confirmation of *oestrus* cycle. Histological investigation. The stage of the *oestrus* cycle was defined by evaluating the sample histologically by Perry and Crombie, (1982) and Leiser et al., (1988) method. The samples prepared were evaluated in order to define changes in different layers of uterus endometrium (appearance of luminal epithelium cells, mitotic activity, the state of the secretive cells of the glandular layer, vascularization, *oedema*), distribution of the immunocompetent cells in the layers of endometrium. Encoded samples were analyzed by random selection of 10 sight areas of a light microscope „OLYMPUS BH-2“ (Japan) using x100 and x400 magnification. All the measurements were carried out by the same person.

Morphometric investigation. 5 samples of each *oestrus* cycle's stage and pathological *anoestrus* stage were selected. The photo of the samples were taken by a „Nikon ccolpix 990“ (Japan). Immune cells were counted in

the area of 3 mm². Morphometric investigations were carried out by a computer program for image analysis (IMAGE PRO PLUS, Ver. 5, Media Cybernetics). In each sample by random were selected 5 areas of measurement in which were measured the height of uterus luminal endometrium, the height of glandular epithelium and diameter of the glands in micrometers during different stages of the *oestrus* cycle and *anoestrus* state.

Investigations of progesterone (P₄) and estradiol-17 β (E₂) concentration in blood serum of sows with disturbed reproduction. The blood for the investigations was collected from the jugular vein 1 hour before slaughtering. The samples were centrifuged for 1 hour after collection at 3000 x/min. speed for 10 min. Blood serum was frozen and kept at 20°C temperature until investigation.

P₄ and E₂ investigations were carried out using diagnostic sets PROGRA-CT and E2-RIA-CT (BioSource Europe S.A., Belgium) according to Duchens et al. (1994) and by Mwanza et al. (1994) described methods used for the hormonal investigations of sows blood.

Investigation of estrogen (ER α) and progesterone (PR-A) receptors in the tissues of the uterus horn walls. The samples for immunohistochemical investigation were collected and prepared by the same methods as for histological investigation. 9 samples of each stage of the *oestrus* cycle and 27 samples of the pathological *anoestrus* state were analyzed. The incisions of 2.5 μ diameter were used, they were placed on Superfrost®Plus glasses (Menzel-Glaser, Freiburg, Germany). Immunohistochemical staining was made using ER α initial antibody: monoclonal antibody of the mouse against estrogen receptor 1D5 supernatant, 0.05M Tris-HCl bupher, pH 7.6, containing protein and 15M sodium azide; PR-A initial antibody: monoclonal antibody of the mouse against progesterone receptor 1A6 supernatant, 0.05M Tris-HCl bupher, pH 7.6, containing protein and 15M sodium azide; negative control reagent: monoclonal IgG1 antibody supernatant of the mouse, 0.05M Tris-HCl bupher, pH 7.6, containing protein and 15M sodium azide, according to Karveliėne et al. method (2007).

Evaluation of the samples. The samples were analyzed by a light microscope „OLYMPUS BH-2“ (Japan) using x400 magnification. The strength of the hormone receptors immune reaction was evaluated according to the number of positively stained nucleus and the intensity of the color (brown). The immune reaction was evaluated in the different layers of the uterus wall (luminal epithelium, stroma, glandular layer, muscle layer) in 5 sight areas selected by random. The average intensity of positively stained

nucleus was evaluated as follows: + - weak, ++ - moderate, +++ - strong. The count of positively stained cells is presented in 4 levels: 0-30 percents of stained cells – weak reaction (A), 31-50 percents – moderate (B), 51-80 percents – strong (C), more than 80 percents – very strong reaction (D) (Sukjumlom et al., 2003).

Investigation of the effectivity of gonadotropic hormones used to induce oestrus in the sows with disturbed reproduction. Animals investigated. 35 sows of the third – forth parity of Lithuanian White x Danish Landraces crossbreeds were selected: 5 with normal *oestrus* cycle, the rest 30 sows had no manifestation of *oestrus* after weaning. Due to the absence of the external signs of *oestrus* for these sows in the industrial conditions was stated *anoestrus* state.

The sows were divided into groups:

I group – 10 days after weaning had no *oestrus* (n=15),

II group – 30 days after weaning had no *oestrus* (n=15),

III group – control – sows with normal reproductive cycle (n=5).

Application of preparation „Sergon“ for the sows with disturbed reproductive cycle. In order to induce *oestrus* in the I and II groups of *anoestrus* sows 500 TV of the preparation „Sergon“ was injected into the muscles. Commercial preparation „Sergon“ (QG03G A03, RV 2004/1613, Czechia) – is gonadotropin of the blood serum of pregnant mares containing 500 TV of the active substance (FSH:LH, 4:2), dextran, propilparaben, methylparaben. The III group of the sows was not injected the preparation as *oestrus* manifested in time.

In order to determine the reproductive state of the sows was investigated the amount of *oestrus* steroid hormones in the blood serum and functional state of the genital organs was evaluated post mortem.

After taking blood samples into the muscles of the sows from the I and II group of *anoestrus* sows in order to induce *oestrus* was injected 500 TV of „Sergon“. After the injection of preparation in dependence on the manifestation of *oestrus* the sows of the I and II groups were additionally divided into groups: I A group – manifestation of *oestrus* in 10 days after injection; I B group – no signs of *oestrus* after the injection; II A group – manifestation of *oestrus* in 10 days after the injection; II B group - no signs of *oestrus* after the injection.

Collection and investigation of blood samples. From the I, II and III groups of the sows selected for the experiment jugular vein the blood for the first time was collected according to the following scheme: from the I group

– on the 10-th day after weaning the piglets, from the II group – on the 30-th day after weaning the piglets, from the III group – on the day of *oestrus* manifestation. The second sampling of blood was carried out: from the I A and II A groups of sows - on the first day of *oestrus* manifestation, from the I B and II B groups - 10 days after the injection of preparation „Sergon“. From the III control group of pigs blood was not sampled the second time.

In order to determine concentration of hormones - progesterone and estradiol-17 β were selected 35 samples: control III gr. (n=5), I gr. (n=5), I A gr. (n=5), I B gr. (n=5), II gr. (n=5), II A gr. (n=5), II B gr. (n=5). The method of blood sampling and investigation is described above.

Collection of samples for the macroscopic evaluation of genital organs and investigation. In order to evaluate the effect of gonadotropic hormones on the *oestrus* cycle and manifestation of *oestrus* in the sows with disturbed reproductive cycle was carried out control slaughtering. Were slaughtered 35 experimental pigs: I gr. – on the 10-th day after weaning the piglets had no signs of *oestrus* (n=5); II gr. - on the 30-th day after weaning the piglets had no signs of *oestrus* (n=5), III gr. - (control sows) on the first day of *oestrus* manifestation (n=5).

After injection the preparation „Sergon“ were slaughtered the I A and II A gr. – on the first day of *oestrus* (n= 5), I B and II B gr. – on the 10-th day of „Sergon“ injection (n= 5).

Macroscopic evaluation of genital organs of sows was carried out as described previously.

Collection of the samples for immunohistochemical investigation. In order to obtain receptors ER α and PR-A in endometrium the samples of uterus were taken only from the sows in *anoestrus* condition: I B and II B group of sows.

Methods of samples preparation and immunohistochemical investigation were described in previous chapters.

RESULTS OF INVESTIGATION AND DISCUSSION

One of the primary important factors on the process of reproduction and *oestrus* manifestation in pigs is the time of weaning (WSI - weaning servis interval) and opportune ovulation. Due to this reason one of the main tasks of our investigation was to define the effect of various factors on the duration of WSI.

Duration of WSI in 95 percents of sows is 3-8 days (Knox et al., 2001). Our experiments evidently demonstrated that as in crossbred LWxDL so in

purebred DLxDL duration of WSI was on average 9.34 ± 1.12 d. and it was longer as in other countries (Vesseur et al., 1994; Knox et al., 2001). B. Kemp and M. Soede, (1996) stated that in sows in which the duration of WSI is longer than physiological norm, ovulation manifests earlier and they should be inseminated earlier than the sows, in which WSI is 3-8 days.

Problems of sows' insemination are often not related to the physiological changes in the organism, but are only the consequence of unqualified management and imprecise determination of *oestrus*. Our investigations revealed quite evident effect of WSI and AC on sows insemination ($p < 0.001$). When the result of the first insemination after weaning the piglets was positive, the WSI continued on average 7.16 ± 12.19 days and the sows were culled on average at the age of 1061.30 ± 300.15 days. When the result of insemination was negative – WSI continued longer than 3 times and the sows were culled 142 days earlier ($p < 0.001$). Our investigations revealed that duration of WSI depends on the sows PD and during the first pregnancy WSI was longer than during the following pregnancies. On the pig breeding farms investigated WSI during the first parity was the longest and on average reached 11.34 ± 16.68 days ($p < 0.05$). These results are similar to the data presented by the authors from other countries (Einarsson et al., 1974; Benjaminsen et al., 1981; Tummaruk et al., 2001). Longer duration of WSI during the first parity may be influenced by unbalanced ration or high weight loss during lactation if to compare to the multiparous sows (Peltoniemi et al., 2000). The mobilization capacity of organism functions in the sows during lactation is lower as they still grow to reach the condition of the mature sow. Increased requirement of energy during the period of growth and lactation together with conditionally lower amount of forage consumed and lower quality can lead to the decreased negative energy balance. Catabolic condition formed under the effect of these processes may lead to the suppressed secretion of the hormones effecting growth of the follicles in the ovaries and manifestation of the *oestrus* after weaning the piglets. It can be predicted that physiological differences of the reproductive tract of young sows can lead to the worse reproductive results if to compare to the older sows.

The season and month of weaning also effected the duration of WSI ($p < 0.05$). Y. Koketsu and co-authors (1997) stated that WSI when farrowing in spring WSI tended to be longer. The fact that seasonal infertility is effected by limited amount of energy obtained with lower amount of forage and considerable weight loss during the period of lactation was confirmed by J. Xue et al. (1994). Regeneration of negative energy balance takes longer time in the organism of sow and it consequently leads to longer WSI (Virolainen et al., 2005). During our experiment WSI for sows was in 8.06 days longer than WSI in winter months ($p < 0.05$). WSI for sows in April –

May was longer ($p < 0.05$) than WSI in summer and winter months. The seasonal effect on reproductive parameters has been quite well studied (Tummaruk et al., 2001; Willis et al., 2003; Peltoniemi and Virolainen, 2006). The experiments evidently demonstrated that the month of piglets weaning considerably effected the duration of time during which the *oestrus* is observed after weaning the piglets and considerably differs in sows in the first parity and sows with later parities (Xue et al., 1994; Merks et al., 1995). It was defined during our experiments that the WSI was the longest in April i.e. on average 9 days and it differed statistically reliably from the other months ($p < 0.05$). Longer duration of WSI in April was stated by the experiments of Xue et al., 1994; Vesseur et al., 1994; Tantasuparuk et al., 2005. It is thought that one of the reasons causing longer WSI is poorer quality of forage in spring. However, the main reason causing seasonal effect is changing length of the day and environmental temperature. Longer period of the day light decreases production of melatonin, which effects secretion of the hormones produced by adenohypophysis (Bassett et al., 2001; Tast et al., 2001; Peltoniemi et al., 2005).

It can be stated from the results of our experiments that APS, PD, AC and breed of the sow effected the duration of WSI ($0.05 > p < 0.001$). It was also defined that not only the size of the nest effected the duration of WSI but this factor also effected the number of new born piglets. The longer the WSI the lower number of piglets in the nest ($p < 0.001$). Negative correlation among the WSI (when the duration of WSI 4-9 days) and the size of the nest was stated by B. Kemp and M. Soede (1996). It was also defined that the size of the nest is different when the duration of WSI differs ($p < 0.001$). M. Kaplon et al., (1991) and D. Marois et al., (2000) stated that the external signs of *oestrus* in sows with shorter WSI which takes up to 7-10 days are more evident as they are in better physiological condition if to compare to the sows in which WSI takes 11 days and longer. In order to evaluate the effect of the breed on reproductive parameters we succeeded to define statistically reliable innerbred differences among crossbred LWxDL and purebred DLxDL sows in reproductive parameters (WSI, APS, PD, LT, AB, nest size ($p < 0.001$)).

Different duration of WSI was defined for LWxDL and DLxDL purebred sows. The duration of WSI in LWxDL sows was by 1.58 days longer than in DLxDL sows ($p < 0.001$). W. Tantasuparuk with co-authors (2000) found that the Landrace pigs are served for the first time younger than Yorkshire, respectively at the age of 244 and 249 days ($p < 0.05$). It was defined during our experiments that the best time for the first service for LWxDL and DLxDL pigs was at the age of 259 and 269 days. APS in both breeds which we investigated was by 15-20 days longer if to compare to the data of

Swedish scientists R. Holder et al. (1993) and J. Merks et al. (1995). They stated that the age of the sows during the first insemination affects the duration of WSI. They defined that later *oestrus* maturity of the sows may negatively affect reproductive life of the sow. Y. Schukken et al. (1994) confirmed that the age of the sow during the insemination affects the length of reproductive use and may be the reason of culling. The sows investigated during our experiments were culled by 158 days earlier than LWxDL sows.

During our experiments were defined innerbreed differences among the period of pregnancy and lactation ($p < 0.001$). J. Willis et al. (2003) proved that the duration of lactation had considerable effect on WSI in sows after weaning the piglets and the duration of lactation. We found that the duration of pregnancy in DLxDL was by 1 day longer and the duration of lactation was inconsiderably shorter than in LWxDL sows.

Y. Koketsu and other authors (1999) stated that older age of the sow during the first insemination is related to the number of new born alive piglets in the nest and affects the sows general condition of reproduction. In our experiment the size of the nest was by 2 percents higher than in crossbreds when crossbred sows had 5 percents more alive piglets than purebred sows. Statistically reliable investigations carried out by S. Kerziene and V. Juozaitiene in 2004 demonstrated that the best reproductive properties are typical for Lithuanian White sows. R. Klimas et al. (2000) stated that the size of the nest of Lithuanian White sows fluctuate from 8.74 to 11.30 piglets, however in the crossbreds investigated in our experiment of LWxDL the size of the nest was on average 11.90 ± 2.72 piglets. We also defined that in the nest of LWxDL sows number of dead piglets was by 61 percents lower than in DLxDL sows.

The sows are culled due to the disturbed reproductive cycle (*anoestrus*), absence of the *oestrus* in time, repeated *oestrus*, shortcomings of the exterior, mechanical trauma, low number of the piglets, small and weak piglets, gynecological diseases and diseases of metabolism (Dalin et al., 1997, Koketsu et al., 2002). D'Allaire with a group of scientists (1992) analyzed the reasons of sows culling in ten countries and came to the conclusion that due to the disturbed reproduction on average are culled about 12.9 – 41.4 percents of sows. Culling of the sows cause quite serious economical loss in Lithuanian pig farming as well. However, the real reasons of the disturbances of reproductive properties and culling have not been studied yet. During our experiments was carried out post mortem examination of the genital organs, were defined changes in genital organs of sows – we evaluated functional state of the ovaries and stage of the *oestrus* cycle during the culling.

Post mortem examination of the genital organs of the sows culled due to

the *anoestrus* carried out by D. K. Bishop (2003) revealed that ovaries only of about 10 percents of sows were in *anoestrus* condition. Our experiments revealed that from 150 sows culled due to the disturbed reproduction 44 percents were in *anoestrus* condition, the ovaries of the rest sows were cyclically active. The exterior signs of the *oestrus* could have remained unnoticed due to the “silent” *oestrus* or wrong methods of the *oestrus* determination, consequently, about two-thirds of the sows were culled causelessly. During our experiment high percent of sows with inactive ovaries can be related to the seasonal infertility.

The *oestrus* manifestation after weaning the piglets depends on the homeostasis of organism functions and neuroendocrine balance. In 95 percents of cases *oestrus* is observed in sows 3 - 8 days after weaning the piglets (Knox and Rodriguez, 2001). However, *oestrus* is observed not in all cases after this period. If manifestation of *oestrus* is not observed during two weeks after weaning the piglets the sow is considered to be in *anoestrus* condition and such sows are often culled (Bishop, 2003). During our experiment the sows from the I group (no signs of *oestrus*) had no exterior signs of *oestrus* after weaning the piglets. Due to this reason they were culled but 62 percents of them were cyclic.

The weight of genital organs of sows changes from birth to *oestrus* maturity, and especially high is when the sow reaches maturity (Heinoen et al., 1998). During our experiment the weight of genital organs of culled sows depended on the different stage of *oestrus* cycle ($p < 0.05$). An average weight of the uterus in *anoestrus* condition was defined by A. M. Dalin et al. (1997), M. Heinonen et al. (1998) it was on average 728 g. We defined that the weight of uterus in sows with *anoestrus* condition was 609.27 g, i. e. by 119 g less than defined previously by other research, however this difference can be related to the breed, age and type of feeding. We also defined mutual positive correlation of uterus weight with right and left sides of ovaries during different stages of *oestrus* cycle ($p < 0.05$). Consequently, it can be concluded that hormonal changes in ovaries and uterus occur at the same time and in dependence on each other.

Manifestation of *oestrus* and growth of the follicles – is a complex process regulated by endocrine mechanisms of the organism (individual differences in the amount of insuline, insuline-growth factors (IGF-I), LH and FSH), common mechanisms of functioning (mutual relation between growth of the follicles and *oestrus* manifestation) and morphological factors (weaning time in dependence on the follicles developing in the ovaries) (Lucy et al., 2001; Guthrie et al., 2005). Due to the disturbances of the balance of this mechanism can be observed hormonal insufficiency (Bishop, 2003). Weakened hormonal system and ovaries cells regeneration (generative) functions

can cause hypofunction of the ovaries. Disturbed secretion of gonadotropic, steroid hormones and substances such as inhibin can cause disturbed growth of the follicles (Guthrie et al., 1995; Lucy et al., 2001). Rather common reason of ovaries hypofunction is unbalanced feeding (lack of amino acids), lack of motion, diseases (Yang et al., 2000). Due to these negative factors development of follicles in the ovaries is suppressed, ovulation experiences failure. It was defined during post mortem examination that in *anoestrus* sows the ovaries were small, hard, there were no *corpus lutea* and follicles were very small (≤ 4 mm) all inseparable from the surface of conjunctive tissue overgrown the ovaries. Low weight of the ovaries (4.66 ± 2.79 g and 4.77 ± 2.82 g) and appearance (no follicles and CL) can cause disappearance of cyclic processes in the ovaries.

It was defined during our investigations that functional state of genital organs in sows differed in dependence on the reason of culling. Evaluation of genital organs of sows culled due to the absence of *oestrus* revealed that 38 percent of them were in *anoestrus* condition, the ovaries of the rest sows were cyclically active. However, among sows culled due to the failed insemination only 6 percents were in *anoestrus* condition. Ovaries of this group of sows were active but in different stages of *oestrus* cycle. It can be concluded that 94 percent of *oestrus* sows inseminated for several times and having failed the insemination not due to the disturbed function of the ovaries but due to other reasons. Negative effect on the infertility of sows can have stress (Elberts et al., 1996; Madej et al., 2005) and improper management (Peltoniemi et al., 1999; Tummaruk et al., 2001). Qualitative parameters of insemination can also be effected by the season, method of insemination, age, organism condition, number of inseminations (Soede et al., 1995; Drickamer et al., 1997).

Physiological and morphological changes observed during normal *oestrus* cycle in the uterus of sows were studied by Bischof et al., (1994); Kaeoket et al., (2001; 2002); Blackwell et al., (2003) and it was defined that the count of immune inflammatory cells and their distribution can be effected by the stages of *oestrus* cycle. During our experiment for sows in late *dioestrus* and *prooestrus* stage due to the increased amount of blood flow in the uterus veins and permeability of capillaries caused by estradiol-17 β concentration in blood was stated acute *oedema* of endometrium. Respond of tissues to the changes of estrogens concentration in blood depends on the functioning of intracellular receptors (Kaeoket, 2002). The presumption can be made that *oedema* of the uterus may be caused by locally increased concentration of E₂. However, in our experiment despite low concentration of estradiol-17 β during late *dioestrus* stage signs of the uterus endometrium *oedema* were quite obvious.

Histological investigation of uterus horns lead to the conclusion that during different stages of *oestrus* cycle in different layers of uterus are observed quantitative and qualitative changes of cells. The highest number of lymphocytes was found in the epithelial and glandular layers of luminal endometrium during *oestrus* while in endometrium stroma the highest number of lymphocytes was defined immediately after *oestrus*, in *metoestrus* condition. Positive correlation of the number of lymphocytes in luminal endometrial epithelium with this number in stroma and glandular layer was also defined ($R=0.4$ and $R=0.2$; $p<0.01$). Different count of lymphocytes and other inflammatory cells (neutrophils, macrophages, plasma cells) during *oestrus* cycle in sows with good reproductive properties were found by K. Kaeoket with co-authors (2002). During pathological *anoestrus* state in the uterus endometrium of sows was found low, thin and uneven luminal epithelium. Mitotic processes of luminal endometrium cells disappear in pathological *anoestrus* condition. Lymphocytes located close to each other and/or grouped around blood vessels prevail in luminal epithelium and stroma. During *anoestrus* condition quite inconsiderable number of glands about 2.54 ± 2.33 μ m in diameter and sporadic plasma cells were found in endometrium. During this pathological state the net of capillaries and blood vessels in endometrium is almost invisible. Capillaries observed in the histological section are small in diameter, surrounded by the cells of connective tissue. The highest number of neutrophils during pathological *anoestrus* condition was found in the epithelium of luminal endometrium and glandular layer. In spite of the fact that neutrophils contain low amount of energy and some of them find their place of localization, their activity weakens, it is well known that the main function of neutrophils is phagocytosis. It can be presumably stated that increased number of neutrophils may be caused by inflammatory processes in the uterus. Strengthened infiltration of neutrophils in the tissue is initiated by cytokines and factors of chemotaxis, produced by activated inflammatory cells. (Salmi and Jalkanen, 1997; Kaeoket, 2002). The highest number of eosinophils in uterus endometrium were defined during cyclic *oestrus* of sows (Rothenberg and Hogan, 2006). In our experiment the highest number of eosinophils was found in endometrium stroma during *dioestrus*, absence of these cells was stated during pathological *anoestrus* condition ($p<0.05$). The highest number of eosinophils was found in the glandular layer of endometrium during early *dioestrus* stage and no eosinophils were found during *dioestrus*, *prooestrus* and *anoestrus* stage ($p<0.001$). It was noticed that eosinophils are localized in endometrium stroma aside surface column and glandular epithelium as well as in the transitional area from endometrium to myometrium (Rothenberg and Hogan, 2006). It has been stated that the number of eosinophils depends on

the amount and concentration of steroid hormones produced by ovaries (Gound-Evans et al., 2001, Rothenberg and Hogan, 2006). The highest number of macrophages during our investigation was found in the endometrium of sows with disturbed reproduction during *oestrus*, but in case of *anoestrus* condition macrophages were not found. J. Jiwakanon with co-authors (2006) found macrophages in the glandular epithelium of the uterus of lactating sows, but failed to find any of them in the endometrium of young pigs. It is known that the function of macrophages is not only phagocytosis and destruction of antigen, but transfer of the signal to T and later to B lymphocytes. Only having this information proliferation and differentiation of lymphocytes into specific antibodies producing cells start (Mackler et al., 2000). It is considered that prostaglandins synthesized by macrophages also effect *oestrus* cycle (Jiwakanon et al., 2006). The role of mastocytes in the organism hasn't been studied well yet, however some authors state that mastocytes participate in the process of angiogenesis, inflammatory process and biological processes of tissues differentiation and are related to the changes in endometrium during *oestrus* cycle (Jeziorska et al., 1995; Kaeoket, 2002). Quite low number of mastocytes was found in endometrium stroma during late *dioestrus* and in glandular layer during *dioestrus* there were no mastocytes, during other stages of *oestrus* cycle number of mastocytes was inconsiderable. It was observed during the experiment that the number of immune cells in each sample differed, consequently it should be noticed that individual properties of the organism effect the number of inflammatory cells and their distribution in uterus endometrium. The effect of individual changes of the organism on different number of immune cells and distribution in the tissues of uterus has been stated by some authors (Meikle et al., 2000; Kaeoket, 2002; Sukjumlong et al., 2003; Jiwakanon et al., 2006).

Morphological measurements of uterus tissues from the sows with disturbed reproduction during different stages of *oestrus* cycle and during pathological *anoestrus* condition revealed that the diameter of glands, height of glandular epithelium and height of luminal endometrial epithelium differed in dependence on the stage of *oestrus* cycle. Positive correlation was defined among the height of endometrium surface and glandular epithelium ($R=0.29$; $p<0.01$). The lowest height of surface epithelium was found during *anoestrus* condition, the highest – during early *dioestrus* ($p<0.001$), while in normal cyclic sows K. Kaeoket (2005) defined the highest epithelium during *oestrus* and *dioestrus*. The results of our experiments confirmed the lowest height of uterus glandular epithelium during *anoestrus* condition. We also found the highest glandular epithelium and the lowest diameter of glands during *dioestrus* state, the highest – during late *dioestrus*, what confirms the

results of K. Kaeoket (2005). It is evident that the processes in the uterus of sows with disturbed reproduction are different if to compare to physiologically normal cyclic sows and are effected by hormonal changes in the organism. It is well known that functions of reproductive system are directly regulated by dependence between estradiol-17 β and progesterone. Estradiol-17 β and progesterone stimulate biochemical processes in the uterus tissue cells taking into account processes of differentiation and proliferation and effect permeability of blood vessels (Nothnick et al., 2004, Edwards, 2005). E_2 acts through estrogen receptors and P_4 through progesterone receptors that's why it is important to understand these processes and their changes during *oestrus* cycle and during pathological *anoestrus* condition.

We found ER α in all layers of uterus: luminal epithelium, subepithelium layer of stroma and muscle (table 1). S. Sukjumlong (2005), who studied sows with normal *oestrus* cycle, stated that ER α cells of surface endometrium in cyclic sows stained positively and most intensively during early *dioestrus* and *dioestrus*, while in the sows with disturbed reproduction we found that in all stages of *oestrus* cycle the number of positive ER α luminal endometrial epithelium cells was the lowest and intensity of color – the weakest. The lowest number of ER α (< 30 perc.) and the weakest color intensity in all four layers of the uterus tissues was found during *oestrus*, however E_2 concentration in blood serum was rather high (43.03 pmol/l). In the cells of uterus glandular epithelium of the sows in late *dioestrus* the number of ER α exceeded 80 percents, but the intensity of nucleus color in this tissue during all stages of *oestrus* cycle was different. It can be presumed from these results that ER α participates in the secretive function of glandular layer during all stages of *oestrus* cycle. Similar data were presented by other authors from the experiments with normal cyclic sows and young pigs (Geisert et al., 1993; Nephew et al., 2000; Nielsen et al., 2001). In our experiment an average intensity of nucleus color of the uterus tissue layer was found during *prooestrus* stage when the concentration of E_2 in blood serum was high (350.79 pmol/l) and P_4 concentration reached only (15.45 nmol/l), and during *dioestrus* stage when concentration of E_2 and P_4 in blood was low, respectively 3.42 pmol/l and 0.19 nmol/l. P_4 concentration in blood was high (49.01 nmol/l) during *dioestrus* stage and low during late *dioestrus* stage, while E_2 concentration during both these stages was low. Due to low concentration of estrogens in blood in our case could be disturbed one of estrogen functions – regulation of cell proliferation and growth of reproductive organs as well as regulation of endometrium glands and secretive function of uterus and stimulation of myometrium contractility (Langendijk et al., 2002; Kayisli et al., 2004).

Table 1. Distribution of estrogen receptors alpha (ER α) in uterus tissues of sows during *oestrus* cycle and pathological *anoestrus* condition

Stage of <i>oestrus</i> cycle	Surface epithelium	Stroma	Glandular epithelium	Myometrium
<i>Anoestrus</i>	A/++	A/+	C/+++	D/+++
<i>Prooestrus</i>	A/+	A/+	B/++	C/++
<i>Oestrus</i>	A/+	A/++	A/+	A/+
<i>Early dioestrus</i>	A/+	A/+	C/+++	B/++
<i>Dioestrus</i>	A/+	A/+	C/+++	A/+
<i>Late dioestrus</i>	A/+	B/++	D/+++	C/++

Color intensity: + = weak, ++ = moderate, +++ = strong

A = weak reaction (<30% cells), B = moderate reaction (30 - 50% cells), C = strong reaction (>51 - 80% cells), D = very strong reaction (almost all cells colored (>81%)).

In our experiment maximal intensity of nucleus color of muscle tissue in the uterus of sows and number of cells were found during pathological *anoestrus* condition, while concentration of oestrus steroids in blood serum at that time was very low. S. Sukjumlong with co-authors (2005) stated that the number of estrogen receptors depends on the concentration of oestrus steroids in blood serum of cyclic sows. However, the effect of oestrus steroids E₂ and P₄ on receptors distribution in uterus tissues has still remained an object of studies.

Positive intensity of ER α cells nucleus color differed not only during different stages of oestrus cycle, but in different tissues of uterus. It was noticed that the difference in ER α number and color intensity is individual for particular sows.

Number of PR receptors is related to secretion of prostaglandin F₂ α in the uterus and differentiation of uterus glands (Spencer et al., 2003; Sukjumlong, 2005). R. Geisert et al. (1994) defined that on the 12-18 day of oestrus cycle there are no PR on the luminal layer of endometrium and glandular epithelium, while E. Persson et al. (1997) stated the highest amount of PR in pigs during *oestrus* and early *dioestrus* stage, the lowest on the 14-18 day of oestrus cycle. However, physiological functions of uterus in young pigs and sows may differ, so the amount of PR defined by different authors may differ too. Previous investigations of ER in uterus (Sukjumlong et al., 2003; 2004; Karveliėne et al., 2007) revealed that ER may be related to the processes of epithelium proliferation; however, PR should effect physiological changes in uterus.

Table 2. Number of progesterone receptors (PR-A) in uterus tissues of sows during *oestrus* cycle and pathological *anoestrus* condition

Stage of <i>oestrus</i> cycle	Surface epithelium	Stroma	Glandular epithelium	Myometrium
<i>Anoestrus</i>	-	-	-	-
<i>Prooestrus</i>	A/++	A/++	C/+++	D/+++
<i>Oestrus</i>	A/+	A/+	A/+	A/+
<i>Early dioestrus</i>	B/++	B/++	C/+++	D/+++
<i>Dioestrus</i>	A/+	A/+++	A/+	A/+
<i>Late dioestrus</i>	A/+	B/++	A/+	A/++

Color intensity: + = weak, ++ = moderate, +++ = strong

A = weak reaction (<30% cells), B = moderate reaction (30 - 50% cells), C = strong reaction (>51 - 80% cells), D = very strong reaction (almost all cells colored (>81%)).

Our investigations revealed the presence of PR-A receptors in the tissues of uterus in sows with disturbed reproductive cycle during all stages of this cycle except *anoestrus* condition (table 2). However, number of receptors and distribution in uterus tissues was different as in different tissues so in different stages of *oestrus* cycle. Number of steroid receptors can differ in uterus tissues even at the same concentration of steroids in blood plasma. This fact was proved by Geisert et al., (1994); Dhaliwal et al., (1997); Sukjumlong et al., (2003; 2004) by the experiments carried out with other animal species and cyclic sows. During our experiment the highest intensity of PR-A nucleus staining in luminal endometrial epithelium (++) and number (30-50 percents) was found in the early *dioestrus* if to compare to different stages of *oestrus* cycle and these data confirm the data of S. Sukjumlong (2005) obtained during investigations of cyclic sows. The highest number, i. e. 30-50 percents of positively stained nucleus in comparison with other stages was defined during early *dioestrus* and late *dioestrus* stages in uterus stroma. The experiments carried out with mice revealed that the expression of PR in epithelial cells requires certain number of PR receptors in stroma (Kurita et al., 2000; 2001). It was proved that epithelial cells are more sensitive to the fluctuations of P₄ concentration in blood than cells of stroma (Padua et al., 2005, Sukjumlong et al., 2005).

Staining intensity in the glandular layer of uterus horns in all cases studied tended to be higher in glandular layer located closer to muscle tissue than in luminal glands located closer to luminal endometrial epithelium. This fact demonstrates that glands located in different height of the tissue

under the effect of the same hormones can have different function. 51 – 80 percents of positively stained PR-A in glandular epithelium were found during late *dioestrus* stage, and the most intensive color (+++) – during *dioestrus* while at the same tissue during *oestrus* were found less than 30 percents of weakly stained nucleus. These results reveal inner correlation between P_4 concentration in blood and PR number in glandular tissue, what confirms the opinion of other authors (Sukjumlong et al., 2005). The most intensively stained PR-A nucleus and the highest number were found during *prooestrus* and early *dioestrus* stages, the lowest and weakest staining was found during *oestrus* and *dioestrus* stages while other authors found the highest concentration of receptors during *oestrus* and related it to the uterus contractions which increases under the effect of hormones (Langendijk et al., 2002; Sukjumlong et al., 2003; 2004b).

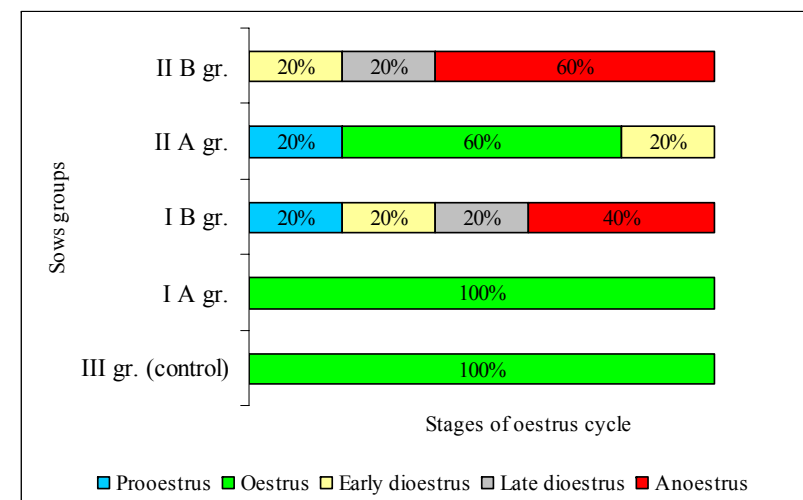
It was proved during our experiments that sows with disturbed reproduction most often have active ovaries and low concentrations of E_2 and P_4 in blood serum what causes low number of ER α and PR-A and different distribution in the sows with disturbed reproduction.

To solve the problem of sows *anoestrus* is recommended hormonal stimulation. However, it not always gives expected results. There are cases described when hormonal stimulation had negative effect, made the organism more sensitive and decreased the number of piglets (Milleret al., 1999). Undoubtedly, these cases are related to poor quality of the preparations used and when physiological, endocrine, immune and other functions of the organism are not taken into account.

We evaluated the effectivity of gonadotropic hormones for the sows with reproductive failure during 10 days after weaning the piglets (I gr.) and for the sows with reproductive failure during 30 days after weaning the piglets (II gr.). Preparation „Sergon“ – gonadotropic hormone from blood serum of pregnant mares, containing 500 TV of active substance (FSH:LH) (4:2), dextran, propilparaben, metilparaben – was used to induce *oestrus* in sows.

After the injection of preparation during 10 day period *oestrus* manifested in 20 percents of the I group of sows and – 16 percents in the II group, in the rest cases after hormonal stimulation *oestrus* experienced failure. The percent of *oestrus* sows in the both groups was not statistically reliable, however, blood analysis and macroscopical investigation of genital organs confirmed previously according to external signs defined stage of the *oestrus* (manifestation of *oestrus* in 10 days after preparation injection) only in 60 percents of sows, while in the II A group (manifestation of *oestrus* in 10 days after preparation injection) initial diagnosis (stage of *oestrus*) was confirmed in 100 percents (pic.1). In sows with no *oestrus* signs longer than 30 days after hormonal stimulation signs of *oestrus* were weaker than in

sows which after stimulation following the weaning of piglets had no signs of *oestrus* for 10 days. It was also defined that in *oestrus* sows after hormonal stimulation from the I A and II A groups E_2 concentration considerably increased and fluctuated respectively from 17.81 to 21.87 pmol/l and from 14.74 to 16.73 pmol/l, but P_4 concentration in blood serum remained low. R. Knox with co-authors stated (2001; 2003) that after injection of gonadotropic preparation increased E_2 concentration in blood and LH and FSH concentration what caused faster manifestation of the *oestrus* after weaning and shortened WSI period. Low concentrations of steroid hormones reveal inactivity of the ovaries. These data confirm investigations of W. Chun et al. (2002) when low concentration of P_4 is one of the main reasons of *anoestrus* in sows. There were no signs of *oestrus* in any sow from the group I B and II B group (no signs of *oestrus* after preparation injection) 10 days after the injection, however, as in group I B so in group II B sows concentration of sexual hormones and macroscopic examination of genital organs demonstrated that only in 40 and 60 percents respectively these sows were in *anoestrus* condition.



Pic. 1. Percentage distribution of *oestrus* cycle in the groups of experimental sows

In the organism of some sows after injection the preparation changes were too weak to induce external signs of *oestrus*, however, sufficient to induce “silent” *oestrus*. R. Bates et al. (2000) and R. Knox et al. (2001) stated that gonadotropic hormones in normal sows are effective only in 94

percent of cases.

The analysis of all the results obtained during the experiments led to the conclusion that these sows in which there were no signs of *oestrus* only 10 days after weaning the piglets had better reproductive condition and reacted to GnRH stimulation more effectively than sows of the II group with no signs of *oestrus* during the period of 30 days. Comparison of the data from both groups of sows enables to state that hormonal stimulation of *oestrus* is purposeful only for these sows in which it does not manifest during 10 days after weaning, as if *anoestrus* stage continuous 30 days, preparation effectiveness decreases. In case of pathological *anoestrus* condition in sows injection of exogenous gonadotropic hormones is not sufficient factor to stimulate follicles growth and induce *oestrus* (Garcia et al., 2004).

Immunohistochemical investigation of steroid hormones receptors demonstrated that despite hormonal stimulation ER α is not found in all uterus wall tissues of *anoestrus* sows. The fact that the effect of exogenous hormones on endometrium is different than during physiologically normal *oestrus* cycle was presented by Johannisson et al., (1982); Johannisson, (1990); Li et al., (1992); Casanas-Roux et al., (1996); Dallenbach-Hellweg and Poulsen, (1996); Habiba et al., (1998).

Number and distribution of ER α in the uterus tissues in the sows from I B and II B group was different, while there were no PR-A receptors at all. In the I B group the highest number of positively stained ER α nucleus was found in glandular epithelium (51 – 80 perc.), while in luminal epithelium ER α receptors were not found during *anoestrus* condition. In the luminal endometrial epithelium of the sows from the II B group as well as in luminal epithelium and stroma ER α were not found. In the glandular endometrial layer ER α were less than 30 percents and in muscle layer 51 – 80 percent of cells.

Comparison of ER α number and distribution in unstimulated *anoestrus* sows and sows which remained in *anoestrus* condition after hormonal stimulation in the I B and II B groups of sows revealed different number of receptors in uterus tissues. In all tissues of unstimulated sows uterus ER α were absent, ER α were not found in the I B group – in luminal epithelium, and in the II B group – in luminal epithelium and stroma. Amount of ER α in glandular and muscle tissue of the uterus in unstimulated sows was higher than in the tissues of stimulated sows. It was revealed during the investigations that the number of steroid hormones receptors P₄ and E₂ and their distribution sows uterus endometrium and myometrium is very peculiar and depends not only on hormonal concentration in blood and duration of the *anoestrus* period, but on the individual peculiarities of sows organism as well.

CONCLUSIONS

1. The duration of the period from weaning the piglets till *oestrus* manifestation depends on sow age during the first insemination, parity number, parity length, month of weaning and breed of the sow ($0.05 > p < 0.001$). The longer the time from piglets weaning to *oestrus* manifestation, the lower number of piglets in the nest ($p < 0.001$).

2. The lowest average uterus weight was in *anoestrus* sows, the highest – in cyclic sows during late *dioestrus*, 609.27 g and 1457.48 g respectively. The weight of ovaries during *oestrus* cycle between left and right side correlated internally ($R=0.76$; $p < 0.001$), and the average means of their weight correlated with uterus weight respectively ($R=0.38$; $R=0.34$; $p < 0.01$).

3. In 62 percents of sows culled due to *oestrus* failure ovaries were cyclically active and in 38 percents – was stated pathological *anoestrus* condition. In the group of cyclic and several times inseminated but experienced failure sows cyclically active ovaries were found in 94 percents of cases and pathological *anoestrus* condition – in 6 percents of sows.

4. During different stages of *oestrus* cycle and in pathological *anoestrus* condition lymphocytes and granulocytes prevailed in sows endometrium. During *oestrus* lymphocytes prevailed in the glandular epithelium and luminal epithelium of endometrium. During *dioestrus* in endometrium stroma and during early *dioestrus* in glandular layer prevalence of eosinophils was stated ($p < 0.05$). The most noticeable infiltration of neutrophils was in luminal and glandular epithelium layers of endometrium during pathological *anoestrus* condition, while no eosinophils were found in any layer of endometrium ($p < 0.05$).

5. In sows with disturbed reproduction which had functionally active ovaries progesterone concentration in blood serum was on average 17.18 ± 19.82 nmol/l, and estradiol-17 β – 82.54 ± 152.15 pmol/l in dependence on the stage of *oestrus* cycle ($p < 0.05$). An average progesterone concentration in blood serum of slaughtered *anoestrus* sows was 0.082 ± 0.04 nmol/l, and estradiol-17 β concentration was lower than the lowest value pmol/l registered by an apparatus.

6. Estrogen receptors alpha (ER α) were found in all tissues of the uterus during all stages of *oestrus* cycle and pathological *anoestrus* condition. ER α staining intensity and their number was different in uterus tissues and among *anoestrus* sows.

7. The lowest number of estrogen receptors alpha and staining intensity

(A/+) were during *oestrus* in sows with disturbed reproduction. The highest number of estrogen receptors alpha and staining intensity (D/+++) was found during late *dioestrus* stage. Progesterone receptors (PR-A) were found in all tissues of the uterus during all stages of *oestrus* cycle. During pathological *anoestrus* condition there no PR-A receptors.

8. GnRH stimulated *oestrus* in sows in dependence on time from piglets weaning to *oestrus* manifestation.

9. GnRH did not cause the increase of estrogen alpha and progesterone A receptors and changes of localization in uterus tissues of *anoestrus* sows.

RECOMMENDATIONS

1. It is recommended to complete uterus cervix palpation in order to define *oestrus* as during *prooestrus* and *oestrus* stages it is very hard, while this feature is not observed during other stages of *oestrus* cycle.

2. It is recommended to carry out evaluation of genital organs in stock herd and for renewal of the herd select only pigs and descendants which were not hormonally treated or external signs of *oestrus* were fully expressed.

3. It is recommended to inject GnRH hormonal preparations only to the sows with no signs of *oestrus* and not later than 10 days after piglets weaning. In case of *oestrus* failure culling is recommended.

REZIUME

Darbo tikslas: įvertinti įvairių veiksnių įtaką laikotarpio trukmei nuo paršelių atjunkymo iki paršavedžių rujos požymių pasireiškimo ir nustatyti morfologinius pakitimus bei estrogenų receptorių alfa (ER α) ir progesterono receptorių A (PR-A) pasiskirstymą sutrikusios reprodukcijos paršavedžių gimdoje lytinio ciklo ir patologinės *anoestrus* būklės metu.

Uždaviniai:

1. Išanalizuoti veiksnus, įtakojančius laikotarpio nuo paršelių atjunkymo iki rujos požymių pasireiškimo trukmę.

2. Įvertinti dėl reprodukcijos sutrikimo paskerstų paršavedžių lytinius organus ir nustatyti funkcinę kiaušidžių būklę.

3. Įvertinti sutrikusios reprodukcijos paršavedžių gimdoje lytinio ciklo ir patologinės *anoestrus* būklės metu vykstančius pokyčius (histologinis – morfometrinis tyrimas).

4. Iširti progesterono ir estradiolio-17 β koncentracijos kitimus sutrikusios reprodukcijos paršavedžių kraujo plazmoje.

5. Nustatyti progesterono (PR-A) ir estrogenų (ER α) receptorių sutrikusios reprodukcijos paršavedžių gimdoje skirtingų lytinio ciklo stadijų ir patologinio *anoestrus* metu (imunohistocheminis tyrimas).

6. Nustatyti progesterono (PR-A) ir estrogenų (ER α) receptorių lokalizacijos pokyčius *anoestrus* būklės kiaulių gimdoje po gonadotropinių hormonų panaudojimo.

7. Įvertinti gonadotropinių hormonų panaudojimo sutrikusios reprodukcijos paršavedžių rujai sukelti efektyvumą.

Mokslinio darbo naujumas:

Pirmą kartą buvo atlikti morfologiniai sutrikusios reprodukcijos paršavedžių endometriumo tyrimai, nustatyti endometriumo paviršinio ir liaukinio epitelio aukščio pokyčiai, imuninių ląstelių infiltracija, PR-A ir ER α lokalizacija skirtingų lytinio ciklo stadijų ir patologinės *anoestrus* būklės metu.

Nustatyta gonadotropinių hormonų (FSH, LH) poveikio įtaka progesterono (PR-A) ir estrogenų (ER α) receptorių kiekio ir lokalizacijos pokyčiams.

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Vienas iš svarbiausių veiksnių, nuo kurio priklauso kiaulių reprodukcijos eiga yra rujos pasireiškimo po paršelių atjunkymo laikas (ARL) ir savalaikė ovuliacija. Todėl ir mūsų darbo vienas uždavinių buvo nustatyti įvairių

veiksnių įtaką tiriamų paršavedžių ARL trukmei.

ARL trukmė 95 proc. paršavedžių trunka 3 - 8 dienas (Knox et al., 2001). Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad ir mišrūnių LBxDL ir grynaveislių DLxDL ARL laikotarpis truko vidutiniškai $9,34 \pm 1,12$ d. ir buvo ilgesnis negu nustatytas kitose šalyse (Vesseur et al., 1994; Knox et al., 2001). B. Kemp ir M. Soede, (1996) teigė, kad paršavedžių, kurių ARL trukmė ilgesnė negu fiziologinė norma, ovuliacija, skaičiuojant nuo rujos simptomų pasireišimo, įvyksta anksčiau ir jos turi būti sėklinamos anksčiau negu tos paršavedės, kurių ARL trunka 3-8 dienas.

Kiaulių apvaisinimo problemos dažnai būna nesusijusios su fiziologiniais pokyčiais kiaušės organizme, o yra nekokybiškos vadybos ir netikslaus rujos nustatymo pasekmė. Atlikti tyrimai parodė reikšmingą sėkmingo po paršelių atjunkymo kiaušės apvaisinimo įtaką ARL ir AB ($p < 0,001$). Kai pirmo sėklinimo po paršelių atjunkymo rezultatas yra teigiamas, tai ARL vidutiniškai trunka $7,16 \pm 12,19$ d., o paršavedės išbrokuojamos vidutiniškai $1061,30 \pm 300,15$ d. amžiaus. Kai sėklinimo rezultatas neigiamas, ARL trunka 3 kartus ilgiau, o paršavedės išbrokuojamos 142 dienomis anksčiau ($p < 0,001$). Tyrimai parodė, kad ARL trukmė priklauso ir nuo paršavedės PS, o pirmaparšių kiaulių ARL ilgesnis nei vėlesnių paršingumų kiaulių. Mūsų tirtuose Lietuvos veisliniuose ūkiuose pirmaparšių kiaulių ARL truko ilgiausiai ir vidutiniškai siekė $11,34 \pm 16,68$ d. ($p < 0,05$). Gauti rezultatai panašūs su kitų šalių autorių pateikiamais duomenimis (Einarsson et al., 1974; Benjaminsen et al., 1981; Tummaruk et al., 2001). Palyginti su daugiaparšėmis kiaušėmis ilgesnis pirmaparšių kiaulių ARL gali būti įtakotas raciono nukrypimų ir didelio svorio netekimo žindymo laikotarpiu (Peltoniemi et al., 2000). Pirmaparšių kiaulių mobilizuoti reikiamas organizmo funkcijas laktacijos laikotarpiu, rezervas mažesnis nei daugiaparšių kiaulių, nes jos dar auga, kol pasiekia suaugusios paršavedės kondiciją. Padidėjęs energijos poreikis kūno augimo bei laktacijos laikotarpiais gali sąlygoti sąlyginį sumažėjimą gaunamų pašarų ir sukelti sumažėjusį neigiamą energijos balansą. Įtakojant šiems procesams atsiradusi katabolinė būklė slopina hormonų, skatinančių folikulų augimą kiaušidėse bei rujos požymių pasireišimą po paršelių atjunkymo, sekreciją. Palyginti su daugiaparšėmis kiaušėmis, fiziologiniai kiaušidžių bei pirmaparšių kiaulių reprodukcinės sistemos skirtumai lemia blogesnius reprodukcinius rodiklius. Paršavedės organizme susidariusiam neigiamam energijos balansui atkurti reikia daugiau laiko, todėl ilgėja ARL (Virolainen et al., 2005).

Sezonas ir paršelių atjunkymo mėnuo įtakoja ARL trukmę ($p < 0,05$). Y. Koketsu su bendraautoriais (1997) pastebėjo, kad pavasarį apsipašėvusių kiaulių ARL buvo ilgesnis. Mūsų tyrimo metu paršavedžių, kurių paršeliai atjunkyti pavasario mėnesiais ARL truko $8,06$ d. ilgiau nei paršavedžių,

kurių paršeliai atjunkyti žiemos mėnesiais ($p < 0,05$). Paršavedžių, kurių paršeliai atjunkyti kovo – gegužės mėn. ARL buvo ilgesnis ($p < 0,05$) nei paršavedžių, kurių paršeliai atjunkyti vasaros ar rudens laikotarpiais. Sezone įtaka reprodukciniams rodikliams buvo plačiai tyrinėta (Tummaruk et al., 2001; Willis et al., 2003; Peltoniemi and Virolainen, 2006). Tyrimai rodo, kad paršelių atjunkymo mėnuo turi reikšmingos įtakos laikotarpio, per kurį pasireiškia paršavedžių rujos požymiai, trukmei po paršelių atjunkymo ir reikšmingai skiriasi pirmaparšių bei daugiaparšių kiaulių (Xue et al., 1994; Merks et al., 1995). Mes nustatėme, kad ARL balandžio mėn. buvo ilgiausias - vidutiniškai 9 d. ir statistiškai patikimai skyrėsi nuo kitų mėn. ($p < 0,05$). Pailgėjusį ARL balandžio mėn. atjunkius paršelius savo atliktais tyrimais taip pat nustatė Xue ir kt., 1994; Vesseur ir kt., 1994; Tantasuparuk ir kt., 2005. Manoma, kad viena iš priežasčių, lemiančių prailgėjusį ARL, yra pavasario laikotarpiu pablogėjusi pašarų kokybė. Tačiau vis dėlto pagrindinė priežastis sukelianti sezoninį efektą - kintantis dienos ilgis ir aplinkos temperatūra. Pailgėjęs šviesusis paros tarpsnis mažina melatonino gamybą, o šis įtakoja visų adenohipofizės išskiriamų hormonų sekreciją (Bassett et al., 2001; Tast et al., 2001; Peltoniemi et al., 2005).

Mes nustatėme, kad APS, PS, AM bei paršavedės veislė įtakoja ARL trukmę ($0,05 > p < 0,001$). Taip pat nustatėme, kad ne tik paršavedės lizdo dydis įtakoja ARL trukmę, bet ir ARL trukmė turėjo reikšmingos įtakos gimusių paršelių skaičiui lizde. Ilgėjant ARL, bendras paršelių kiekis lizde mažėjo ($p < 0,001$). Neigiamą koreliaciją tarp ARL (kai ARL truko 4 - 9 d.) ir pašelių lizdo dydžio nustatė B. Kemp ir M. Soede (1996). M. Kaplon ir kt., (1991) bei D. Marois ir kt., (2000) nustatė, kad paršavedėms, kurių ARL trumpesnis ir trunka iki 7-10 d., išoriniai rujos požymiai pasireiškia ryškiau, nes jos yra gero imitimo ir geros fiziologinės būklės, negu paršavedžių, kurių ARL trunka 11 d. ir ilgiau. Vertinant veislės įtakos stiprumą reprodukciniams rodikliams mes nustatėme statistiškai patikimus tarpveislinius skirtumus tarp mišrūnių LBxDL bei grynaveislių DLxDL paršavedžių reprodukcinių rodiklių (ARL, APS, PT, LT, AB, lizdo dydžio ($p < 0,001$)).

LBxDL bei DLxDL grynaveislėms paršavedėms nustatytas skirtingos trukmės ARL. LBxDL paršavedžių ARL truko $1,58$ d. ilgiau negu DLxDL kiaulių ($p < 0,001$). W. Tantasuparuk su bendraautoriais nustatė (2000), kad 'Landrasų' veislės kiaušaitės pirmą kartą kergiamos jaunesniame amžiuje negu 'Jorkšyrų' veislės kiaušaitės, atitinkamai 244 ir 249 d. amžiaus ($p < 0,05$). Mes nustatėme, kad LBxDL ir DLxDL kiaušaitės pirmą kartą buvo kergiamos sulaukusios atitinkamai 259 ir 269 d. amžiaus. Abiejų mūsų tirtų kiaulių veislių APS buvo 15-20 d. didesnis palyginti su švedų mokslininkų atliktų tyrimų duomenimis. R. Holder ir kt. (1993) bei J. Merks ir kt. (1995) įrodė, kad didesnis kiaušidžių amžius jas pirmą kartą sėklinant turi įtakos

ARL trukmei po paršelių atjunkymo. Šie mokslininkai nustatė, kad vėlesnis kiaulaičių lytinis subrendimas gali turėti neigiamos įtakos ir tolimesniam paršavedžių reprodukciniam gyvenimui. Y. Schukken ir kt. (1994) įrodė, kad kiaušės amžius, ją apvaisinant, įtakoja jos reprodukcinio panaudojimo laiką bei išbrokavimo priežastį. Mūsų tirtos DLxDL paršavedės buvo išbrokuotos 158 d. anksčiau negu LBxDL paršavedės.

Y. Koketsu ir kt. autoriai (1999) nustatė, kad didesnis amžius kiaušaites pirmą kartą sėklinant susijęs su gimusių gyvų paršelių skaičiumi lizde turi įtakos bendrai paršavedės reprodukcinei būklei. Mūsų atliktame tyrime grynaveislių paršavedžių bendras lizdo dydis buvo 2 proc. didesnis negu mišrūnių kiaulių. Mišrūnės paršavedės gyvų paršelių atvedė 5 proc. daugiau negu grynaveislės. S. Kerzienės ir V. Juozaitienės 2004 metais atlikti statistiniai tyrimai parodė, kad geriausiomis reprodukcinėmis savybėmis Lietuvoje pasižymi 'Lietuvos Baltųjų' kiaulių veislės paršavedės. R. Klimas su kitais autoriais (2000) nustatė, kad grynaveislių 'Lietuvos Baltųjų' kiaulių lizdo dydis svyruoja nuo 8,74 iki 11,30 paršelio, o mūsų tirtų mišrūnių LBxDL lizdo dydis vidutiniškai buvo 11,90±2,72 paršelio. Mes nustatėme, kad LBxDL paršavedžių lizde negyvų paršelių skaičius 61 proc. buvo mažesnis negu DLxDL kiaulių.

Kiaušės brokuojamos dėl lytinio ciklo sutrikimų (*anoestrus*), laiku nepasireiškusių rujos, dėl pasikartojančios rujos, išvaizdos (eksterjero) trūkumų, mechaninių traumų, mažo atvestų paršelių skaičiaus, mažų, silpnų paršelių, medžiagų apykaitos ir ginekologinių ligų (Dalín et al., 1997, Koketsu et al., 2002). D'Allaire su grupe tyrėjų (1992) išanalizavo dešimties šalių kiaulių brokavimo priežastis ir nustatė, kad dėl sutrikusios reprodukcijos vidutiniškai išbrokuojama 12,9 - 41,4 proc. paršavedžių. Dėl paršavedžių brokavimo Lietuvos kiaušintinkystės ūkiai taip pat patiria didelius ekonominius nuostolius. Tačiau iki šiol nebuvo tyrinėta, kokia yra tikroji kiaulių reprodukcinių savybių pablogėjimo ir išbrokavimo priežastis. Mūsų bandyme buvo atliktas brokuojamų paršavedžių lytinių organų įvertinimas po skerdimo, nustatyti pakitimai paršavedžių lytiniuose organuose - įvertinta kiaušidžių funkcinė būklė bei lytinio ciklo stadija brokavimo metu.

Brokuotų dėl „*anoestrus*“ kiaušintinkų lytinių organų įvertinimas po skerdimo, atliktas D. K. Bishop (2003), parodė, kad tik 10 proc. kiaulių kiaušidės iš tiesų buvo *anoestrus* būklėje. Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad iš 150 dėl sutrikusios reprodukcijos brokuotų paršavedžių 44 proc. buvo *anoestrus* būklėje, o likusių kiaulių kiaušidės buvo cikliška aktyvios. Išoriniai kiaulių rujos požymiai galėjo būti nepastebėti dėl „tylios“ rujos ar neteisingai parinktų jos nustatymo metodų, todėl du trečdaliai paršavedžių, įvertinus jų reprodukcinę būklę, buvo išbrokuotos nepagrįstai.

Rujos požymių pasireiškimas po paršelių atjunkymo priklauso nuo orga-

nizmo funkcijų homeostazės ir neuroendokrininio balanso. 95 proc. paršavedžių ruja po paršelių atjunkymo pasireiškia per 3 - 8 dienas (Knox et al., 2001). Tačiau ne visos kiaušės praėjus šiam laikotarpiui pradeda rujoti. Per dvi savaites nuo paršelių atjunkymo nepasireiškus rujos požymiams, teigiama, kad kiaušė yra *anoestrus* būklės. Tokios kiaušės dažniausiai išbrokuojamos (Bishop, 2003). Mūsų tyrimo metu I gr. (nepasireiškę rujos požymiai) kiaušės nerodė išorinių rujos požymių po atjunkymo. Dėl šios priežasties jos buvo išbrokuotos, tačiau tik 38 proc. iš jų buvo patologinės *anoestrus* būklės, o net 62 proc. iš jų dėl nepakankamos hormoninės reguliacijos lytinis ciklas buvo sutrikęs.

Rujos požymių pasireiškimas ir folikulų augimas – kompleksinis procesas, į kurį įtraukti endokrininiai organizmo mechanizmai (individualūs insulino kiekio skirtumai, insulino-augimo faktorius (IGF-I), LH ir FSH), bendri funkcionavimo mechanizmai (abipusis ryšys tarp folikulų augimo ir rujos pasireiškimo) ir morfologiniai mechanizmai (atjunkymo laikas, priklausomas nuo kiaušidėse besivystančių folikulų) (Lucy et al., 2001; Guthrie et al., 2005). Dėl šių mechanizmų pusiausvyros sutrikimų organizme gali pasireikšti hormoninis nepakankamumas (Bishop, 2003). Susilpnėjus kiaušidžių ląstelių dauginimosi (generacinei) ir hormoninei funkcijoms, pasireiškia kiaušidžių hipofunkcija. Sutrikus gonadotropinų, steroidinių hormonų ar medžiagų, tokių kaip inhibinas, išsiskyrimui, sutrinka folikulų augimo procesai (Guthrie et al., 1995; Lucy et al., 2001). Dažna kiaušidžių hipofunkcijos priežastis yra nesubalansuotas šėrimas (amino rūgščių stygius), mociono stoka, ligos (Yang et al., 2000). Dėl šių neigiamų veiksnių kiaušidėse neauga, nebirsta folikulai arba laiku neįvyksta ovuliacija. Po skerdimo nustatėme, kad anestrinių kiaulių kiaušidės buvo mažos, kietos, jose geltonųjų kūnų nebuvo, o folikulai buvo labai maži (≤ 4 mm) arba visiškai neišsiskyrė iš jungiamuoju audiniu peraugusių kiaušidžių paviršiaus. Mažas anestrinių kiaušidžių svoris ($4,66\pm 2,79$ g bei $4,77\pm 2,82$ g) ir išvaizda (nėra folikulų bei geltonųjų kūnų) leidžia manyti apie kiaušidėse nevykstančius ciklinius procesus. Kiaulių lytinių organų svoris kinta nuo gimimo iki brandos, o paršavedei pasiekus lytinę brandą ypač padidėja (Heinoen et al., 1998). Mūsų tyrimų metu brokuotų paršavedžių reprodukcinių organų svorį lėmė skirtinga lytinio ciklo stadija ($p<0,05$). *Anoestrus* būklės kiaulių gimdos svorio vidurkis nustatytas A. M. Dalin ir kt. (1997), M. Heinonen ir kt. (1998), buvo vidutiniškai 728 g. Mes nustatėme, kad *anoestrus* būklės kiaulių gimdos svoris buvo 609,27 g - 119 g mažesnis negu nustatytas ankstesniais, kitų tyrėjų tyrimais, tačiau ši skirtumą galėjo nulemti skirtinga tiriamų gyvulių veislė, amžius, šėrimo būdas. Mes nustatėme abipusę teigiamą gimdos svorio koreliaciją su dešinės ir kairės pusės kiaušidėmis skirtingose lytinio ciklo stadijose ($p<0,05$).

Tyrimais nustatėme, kad paršavedžių lytinių organų funkcinė būklė skyrėsi priklausomai nuo jų brokavimo priežasties. Įvertinus kiaulių, brokuotų dėl nepasireiškusių rudos požymių, lytinius organus, 38 proc. iš jų buvo *anoestrus* būklėje, o likusių paršavedžių kiaušidės buvo skirtingose lytinio ciklo stadijose. Tuo tarpu kiaulių, išbrokuotų dėl neapsivaistavimo *anoestrus* būklė nustatyta tik 6 proc. brokuotų kiaulių. Šios grupės paršavedžių kiaušidės buvo aktyvios skirtingose lytinio ciklo stadijose. Taigi galime daryti išvadą, kad 94 proc. rujojusių, sėklintų keletą kartų, bet neapsivaistavusių kiaulių neapsivaistavo ne dėl kiaušidžių veiklos sutrikimo, o dėl kitų priežasčių. Neigiamos įtakos kiaulių nevaisingumui turi stresas (Elberts et al., 1996; Madej et al., 2005) ir neteisinga vadyba (Peltoniemi et al., 1999; Tummaruk et al., 2001). Kiaulių apvaisinimo kokybiniais rodikliais turi įtakos sezonas, sėklinimo būdas (metodas), kiaušės amžius, įmitimas, sėklinimų skaičius (Soede et al., 1995; Drickamer et al., 1997).

Fiziologiniai ir morfolginiai pakitimai vykstantys normalaus lytinio ciklo metu kiaulių gimdoje buvo tyrinėti Bischof ir kt., (1994); Kaeoket ir kt., (2001; 2002); Blackwell ir kt., (2003) ir nustatyta, kad imuninių uždegiminių ląstelių kiekis ir pasiskirstymas yra įtakojamas lytinio ciklo stadijos. Mūsų eksperimento metu kiaušėms buvusioms vėlyvojo porujo ir priešrujo stadijoje, dėl padidėjusio kraujo pritekėjimo į gimdos venas bei estradiolio-17 β koncentracijos kraujyje įtakojamo kapiliarų pralaidumo – nustatyta ryški endometriumo edema. Audinių atsakas į estrogenų koncentracijos kraujo plazmoje kitimus priklauso nuo intraląstelių receptorių funkcionavimo (Kaeoket, 2002). Taip pat galima spėti, kad gimdos edemą vėlyvojo porujo laikotarpiu nulemia gimdos kraujagyslėse vietiskai padidėjusi E₂ koncentracija. Tačiau mūsų tyrime, nepaisant žemos estradiolio-17 β koncentracijos vėlyvo porujo stadijoje gimdos endometriumo edema buvo gerai išreikšta.

Atlikus histologinį gimdos ragų tyrimą nustatyta, kad keičiantis lytinio ciklo stadijai atskiruose gimdos sluoksniuose vyksta kiekybiniai ir kokybiniai ląsteliniai pakitimai. Didžiausias limfocitų kiekis nustatytas paviršiniame endometriumo epitelyje bei liaukiniame sluoksniuose rudos metu. Endometriumo stromoje didžiausias limfocitų kiekis buvo nustatytas tuoj po rudos, *metoestrus* stadijoje. Nustatyta kad, limfocitų kiekis paviršiniame endometriumo epitelyje teigiamai koreliavo su limfocitų kiekiu stromoje bei liaukiniame sluoksnyje ($R=0,4$ ir $R=0,2$; $p<0,01$). Skirtingus limfocitų bei kitų uždegiminių ląstelių (neutrofilų, makrofagų, plazminių ląstelių) kiekius geros reprodukcinės būklės kiaulių lytinio ciklo metu nustatė K. Kaeoket su kitais mokslininkais (2002). Patologinės *anoestrus* būklės metu paršavedžių gimdos endometriume nustatėme žemą, vienasluoksnį ir netolygų paviršinį epitelį. Patologinėje *anoestrus* būklėje paviršinio endometriumo epitelio

ląstelėse nevyksta mitotiniai ląstelių procesai. Paviršiniame epitelyje bei stromoje patologinės *anoestrus* būklės metu vyrauja limfocitai išsidėstę vieni prie kitų ir/ar susigrupavę aplink kraujagysles. *Anoestrus* būklės metu endometriume nustatytas nedidelis kiekis, vidutiniškai $2,54\pm 2,33$ μ m skersmens liaukų bei aptiktos pavienės plazminės ląstelės. Šios patologinės būklės metu endometriume mažai išreikštas kraujagyslių bei kapiliarų tinklas. Histologiniame pjūvyje matomi kapiliarai mažo spindžio, apsupti jungiamojo audinio ląstelėmis. Patologinės *anoestrus* būklės metu daugiausiai neutrofilų nustatyta kiaulių gimdos endometriumo paviršiniame epitelyje bei liaukiniame sluoksniuose. Nors neutrofilų energijos kiekis labai ribotas ir kai jie nukeliauja į savo lokalizacijos vietą, jų aktyvumas susilpnėja, žinoma, kad pagrindinė neutrofilų funkcija yra fagocitozė. Neutrofilų sustiprėjusią infiltraciją audinyje inicijuoja citokinai ir chemotaksio faktoriai išskirti kitų aktyvuotų uždegiminių ląstelių (Salmi and Jalkanen, 1997; Kaeoket, 2002). Didžiausi eozinofilų kiekiai gimdos endometriume nustatyti ciklinėms kiaušėms rudos laikotarpiu (Rothenberg and Hogan, 2006). Sutrikusios reprodukcijos paršavedėms mes daugiausiai eozinofilų nustatėme endometriumo stromoje porujo metu, o patologinės *anoestrus* būklės metu šių ląstelių nebuvo rasta ($p<0,05$). Liaukiniame endometriumo sluoksnyje eozinofilų daugiausiai buvo nustatyta ankstyvo porujo metu, o iš viso jų nerasta porujo, priešrujo ir *anoestrus* būklės metu ($p<0,001$). Pastebėta, kad eozinofilai lokalizuojasi endometriumo stromoje išsidėstę greta paviršinio stulpinio ir liaukinio epitelių, taip pat perėjime iš endometriumo į miometriumą (Rothenberg and Hogan, 2006). Eozinofilų kiekis taip pat priklauso nuo kiaušidžių išskiriamų steroidinių hormonų kiekio bei koncentracijos (Gound-Evans et al., 2001, Rothenberg and Hogan, 2006). Mūsų tyrimo metu didžiausias kiekis makrofagų nustatytas sutrikusios reprodukcijos paršavedžių endometriume rudos laikotarpiu, o patologinės *anoestrus* būklės paršavedėms makrofagų nenustatyta. J. Jiwakanon su kitais autoriais (2006) makrofagus nustatė žindančių paršavedžių gimdos liaukiniame epitelyje, o visai jų nerado kiaušidžių endometriume. Žinoma, kad makrofagų paskirtis ne tik fagocituoti ir suardyti antigeną, bet ir perduoti signalą T, o vėliau B limfocitams. Tik po šios informacijos limfocitai pradeda proliferuoti ir diferencijuotis į specifines antikūnus gaminančias ląsteles (Mackler et al., 2000). Manoma, kad makrofagų sintetinami prostaglandinai taip pat turi įtakos ir lytinio ciklo eigai (Jiwakanon et al., 2006). Mastocitų vaidmuo organizme nėra pilnai išnagrinėtas, tačiau kai kurie autoriai teigia, kad mastocitai dalyvauja angiogeneze, uždegiminiuose bei audinių diferenciacijos biologiniuose procesuose bei yra susiję su lytinio ciklo metu endometriume vykstančiais pakitimais (Jeziorska et al., 1995; Kaeoket, 2002). Endometriumo stromoje vėlyvo porujo stadijos metu, o liaukiniame sluoksnyje ir porujo

metu mastocitų nenustatėme, kitų lytinio ciklo stadijų metu buvo nustatyti maži mastocitų kiekiai. Tyrimo metu pastebėjome, kad imuninių ląstelių kiekiai kiekviename mėginyje buvo skirtingi. Tai leidžia spėti apie individualių organizmo savybių įtaką uždegiminių ląstelių skaičiui bei pasiskirstymui gimdos endometriume. Kad individualūs fiziologiniai organizmo pokyčiai gali nulemti skirtingą imuninių ląstelių kiekį ir pasiskirstymą gimdos audiniuose spėjo dar keletas autorių (Meikle et al., 2000; Kaeoket, 2002; Sukjumlom et al., 2003; Jiwakanon et al., 2006).

Atlikus sutrikusios reprodukcijos paršavedžių gimdos audinių morfometrinius matavimus skirtingomis lytinio ciklo stadijomis ir patologinės *anoestrus* būklės metu nustatyta, kad liaukų skersmuo, liaukinio epitelio aukštis ir endometriumo paviršinio epitelio aukštis skyrėsi priklausomai nuo lytinio ciklo stadijos. Nustatyta teigiama tarpusavio koreliacija tarp endometriumo paviršinio ir liaukinio epitelio aukščių ($R=0,29$; $p<0,01$). Paviršinio epitelio aukštis žemiausias buvo *anoestrus* laikotarpiu, o aukščiausias - ankstyvojo porujo laikotarpiu ($p<0,001$). Didžiausias normalių ciklinių kiaulių paviršinio epitelio aukštis mokslininko K. Kaeoket (2005) buvo nustatytas rujos ir porujo laikotarpiais. Mes nustatėme, kad ir gimdos liaukinio epitelio aukštis žemiausias taip pat buvo *anoestrus* būklės metu. Nustatėme, kad aukščiausias liaukinis epitelis bei mažiausias liaukų skersmuo buvo porujo laikotarpiu, o didžiausias – vėlyvojo porujo laikotarpiu. Tai sutampa su K. Kaeoket (2005) tyrimų rezultatais. Taigi matome, kad sutrikusios reprodukcijos paršavedžių gimdoje vykstantys procesai skiriasi nuo ciklinių fiziologiškai normalių kiaulių ir yra įtakojami hormoninių pokyčių organizme. Žinoma, kad kiaulių reprodukcinio trakto funkcijos tiesiogiai reguliuojamos tarpusavio priklausomybės tarp estradiolio-17 β bei progesterono. Gimdoje estradiolis-17 β bei progesteronas stimuliuoja biocheminius procesus vykstančius gimdos audinių ląstelėse įskaitant ląstelių diferenciacijos ir proliferacijos procesus, taip pat įtakoja kraujagyslių pralaidumą (Nothnick et al., 2004; Edwards, 2005). E₂ veikimas pasireiškia per estrogenų receptorių, o P₄ per progesterono receptorių, todėl svarbu suprasti kaip vyksta šie procesai ir kaip juo keičia kiaulių lytinio ciklo eiga bei patologinę *anoestrus* būklę.

ER α nustatėme visuose gimdos sluoksniuose: paviršiniame epiteliniame, subepiteliniame stromos sluoksnyje, liaukiniame ir raumeniniame. S. Sukjumlom (2005), tirdamas nesutrikusio lytinio ciklo kiaulės nustatė, kad ciklinių paršavedžių endometriumo paviršinio epitelio ląstelės ER α nusidažė teigiamai ir intensyviausiai ankstyvojo porujo ir porujo laikotarpiais, kai tuo tarpu mes tyrinėdami sutrikusios reprodukcijos paršavedes nustatėme, kad visomis mūsų tirtomis lytinio ciklo stadijomis teigiamą ER α endometriumo paviršinio epitelio ląstelių kiekis buvo mažiausias bei nusidažė silpniausiai. Mažiausias ER α kiekis (< 30 proc.) ir silpniausias nusidažymas visuose

keturiuose kiaulių gimdos audinių sluoksniuose mūsų nustatytas rujos stadijoje, nors tuo metu E₂ koncentracija kraujo plazmoje buvo aukšta (43,03 pmol/l). Gimdos liaukinio epitelio ląstelėse, kiaulių buvusių vėlyvo porujo stadijoje, ER α kiekis viršijo 80 proc., bet branduolių nusidažymo intensyvumas šiame audinyje visose lytinio ciklo stadijose buvo skirtingas. Šie rezultatai leidžia manyti, kad ER α dalyvauja liaukinio sluoksnio sekrecinėje funkcijoje viso lytinio ciklo eigoje. Panašius duomenis gavo ir kiti mokslininkai, atlikę tyrimus su normaliomis ciklinėmis kiaulėmis ir kiaulaitėmis (Geisert et al., 1993; Nephew et al., 2000; Nielsen et al., 2001). Mūsų bandyme vidutinis raumeninio gimdos sluoksnio ląstelių branduolių nusidažymo intensyvumas nustatytas priešrūjo stadijoje kai E₂ koncentracija kraujo plazmoje buvo didelė (350,79 pmol/l), o P₄ koncentracija tesiekė (15,45 nmol/l), bei porujo stadijoje, kai E₂ ir P₄ koncentracijos kraujyje buvo mažos, atitinkamai 3,42 pmol/l ir 0,19 nmol/l. P₄ koncentracija kraujyje buvo didelė (49,01 nmol/l) porujo stadijoje ir mažą vėlyvojo porujo stadijoje, kai tuo tarpu E₂ koncentracija abiejų šių stadijų metu buvo maža. Dėl mažos estrogenų koncentracijos kraujyje, mūsų atveju, galėjo būti sutrikdyta viena iš estrogenų funkcijų - ląstelių proliferacijos bei reprodukcinio organų augimo reguliacija, taip pat endometriumo liaukų bei gimdos sekrecinės funkcijos reguliacija bei miometriumo kontraktiškumo stimuliacija (Langendijk et al., 2002; Kayisli et al., 2004).

Mūsų tyrime maksimalus paršavedžių raumeninio gimdos sluoksnio ląstelių branduolių nusidažymo intensyvumas bei ląstelių kiekis nustatytas patologinės *anoestrus* būklės kiaulėms, nors lytinių steroidų koncentracijos kraujo plazmoje tuo metu ir buvo labai mažos. S. Sukjumlom ir kt. (2005) nustatė, kad estrogenų receptorių kiekis priklauso nuo lytinių steroidų koncentracijos ciklinių kiaulių kraujo plazmoje. Tačiau kaip tiesiogiai lytiniai steroidai E₂ ir P₄ įtakoja receptorių pasiskirstymą gimdos audiniuose vis dar yra tyrimų objektu.

Teigiamas ER α ląstelių branduolių nusidažymo intensyvumas skyrėsi ne tik skirtingose lytinio ciklo stadijose, bet buvo skirtingas ir atskiruose gimdos audiniuose. Pastebėjome ir ER α kiekio bei nusidažymo intensyvumo skirtumus būdingus atskiroms kiaulėms individualiai.

PR receptorių kiekis susijęs su prostaglandino F2 α gimdoje išsiskyrimu ir gimdos liaukų diferenciacija (Spencer et al., 2003; Sukjumlom, 2005). R. Geisert ir kt. (1994) nustatė, kad 12-18 lytinio ciklo dieną PR paviršiniame kiaulaičių endometriumo sluoksnyje bei liaukiniame epitelyje nėra. Tuo tarpu E. Persson ir kt. (1997) nustatė, kad PR didžiausias kiekis yra kiaulaičių esančių rujos bei ankstyvojo porujo laikotarpiais, o mažiausias 14-18 lytinio ciklo dieną. Tačiau kiaulaičių ir paršavedžių gimdos fiziologinės funkcijos gali skirtis, todėl ir skiriasi PR kiekis nustatytas skirtingų autorių.

Ankstesni, mūsų ir kitų autorių (Sukjumlong et al., 2003; 2004; Karvelienė ir kt., 2007), ER gimdoje tyrimai parodė, kad ER gali būti susiję su epitelio proliferaciniais procesais, tačiau fiziologiniams gimdos pokyčiams įtakos turi ir PR.

Mūsų tyrimai parodė, kad PR-A receptorių yra visuose sutrikusios reprodukcijos kiaulių gimdos audiniuose visų lytinio ciklo stadijų metu išskyrus patologinę *anoestrus* būklę. Tačiau receptorių kiekis ir pasiskirstymas gimdos audiniuose buvo nustatytas skirtingas tiek skirtinguose audiniuose, tiek skirtingų ciklo stadijų metu. Kad lytinių steroidų receptorių kiekis gali skirtis skirtinguose gimdos audiniuose, net ir esant tokiai pat steroidų koncentracijai kraujo plazmoje, įrodė keletas autorių, atlikę bendymus su kitomis gyvūnų rūšimis taip pat ir ciklinėmis kiaušėmis (Geisert et al., 1994; Dhaliwal et al., 1997; Sukjumlong et al., 2003; 2004). Mūsų tyrime paviršiniame endometriumo epitelyje didžiausias PR-A branduolių nusidažymo intensyvumas (++) ir kiekis (30-50 proc.), palyginti tarp atskirų lytinio ciklo stadijų, nustatytas ankstyvojo porujo metu, tai atitinka su S. Sukjumlong (2005) tyrimo rezultatus, atliktus su ciklinėmis kiaušėmis. Didžiausias kiekis, t. y. 30-50 proc. teigiamai PR-A nusidažusių branduolių buvo nustatyta ankstyvojo ir vėlyvojo porujo metu gimdos stromoje. Atlikti tyrimai su pelėmis parodė, kad PR ekspresijai epitelinėse gimdos ląstelėse reikalingas tam tikras kiekis PR receptorių stromoje (Kurita et al., 2000; 2001). Įrodyta, kad gimdos endometriumo epitelinės ląstelės daug jautresnės P_4 koncentracijos svyravimams kraujyje negu stromos ląstelės (Padua et al., 2005; Sukjumlong et al., 2005).

Gimdos ragų sienelės liaukiniame sluoksnyje nusidažymo intensyvumas visais mūsų tirtais atvejais buvo didesnis liaukiniame sluoksnyje, esančiame arčiau raumeninio sluoksnio, negu paviršinėse liaukose, esančiose arčiau paviršinio endometriumo epitelio. Tai rodo, kad liaukos išsidėsčiusios skirtinguose audinio aukščiuose tų pačių hormonų įtakoje gali atlikti skirtingą funkciją. Liaukiniame epitelyje 51 - 80 proc. PR-A teigiamai nusidažusių branduolių mūsų buvo nustatyta vėlyvojo porujo laikotarpiu, o intensyviausiai (++++) - porujo metu, kai tuo tarpu tame pačiame audinyje rujos metu nustatyta mažiau kaip 30 proc. silpnai nusidažusių branduolių. Šie rezultatai parodo savitarpio ryšį tarp P_4 koncentracijos kraujyje ir PR kiekio liaukiniame audinyje, kas patvirtina ir kitų autorių nuomonę (Sukjumlong et al., 2005). Raumeniniame gimdos sluoksnyje stipriausiai nusidažę PR-A branduoliai ir didžiausias jų kiekis nustatytas priešrujo ir ankstyvojo porujo stadijose buvusių kiaulių, o mažiausiai ir silpniausiai nusidažę rujos ir porujo laikotarpiais. Kiti autoriai nustatė didžiausią kiekį receptorių rujos laikotarpiu ir sieja PR receptorių kiekį su gimdos kontrakcija, kuri dėl hormonų įtakos padidėja rujos metu (Langendijk et al., 2002; Sukjumlong et al., 2003;

2004b).

Tyrimais įrodė, kad sutrikusios reprodukcijos kiaušės dažniai turi sąlygiškai aktyvias kiaušides, bet mažas E_2 ir P_4 koncentracijas kraujo plazmoje, kas ir sąlygoja mažą $ER\alpha$ bei PR-A kiekį bei skirtingą jų pasiskirstymą sutrikusios reprodukcijos paršavedžių gimdoje, ir dėl to jų lytinio ciklo eiga sutrinka.

Paršavedžių *anoestrus* problemai spręsti rekomenduojama naudoti hormoninę stimuliaciją. Tačiau tai ne visuomet duoda laukiamus rezultatus. Yra aprašytų atvejų, kai stimuliacija hormoniniais preparatais turėjo netgi neigiamą poveikį, sensibilizavo organizmą, sumažino paršelių skaičių (Milleret al., 1999). Neabejotina, kad taip atsitinka, naudojant prastos kokybės preparatus, o taip pat neatsižvelgiant į paršavedės fiziologines endokrinines, imunines ir kitų sistemų funkcijas.

Mes įvertinome gonadotropinių hormonų panaudojimo efektyvumą paršavedėms kurios nesurijojo per 10 d. po paršelių atjunkymo (I gr.) ir paršavedėms, kurios nesurijojo per 30 d. po paršelių atjunkymo (II gr.). Tyrimo metu paršavedžių rujai sukelti buvo panaudotas preparatas „Sergon“ – kumelių kumelių kraujo serumo gonadotropinas, kuriame yra 500 TV veikliosios medžiagos (FSH:LH) (4:2), dekstrano, propilparabeno, metilparabeno.

Po preparato injekcijos per 10 dienų surijojo 20,37 proc. I gr. paršavedžių ir – 16,6 proc. II gr., likusioms paršavedėms po hormoninės stimuliacijos rujos požymiai nepasireiškė. Rujojančių paršavedžių procentas abiejose grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė, tačiau IIA gr. (po preparato išvirkštimo per 10 d. surijusios paršavedės) kiaulių tarpe atlikti kraujo bei makroskopiniai lytinių organų tyrimai patvirtino iš anksto, pagal išorinius lytinius požymius, nustatytą rujos stadiją tik 60 proc. kiaulių, kai tuo tarpu IA gr. (po preparato išvirkštimo per 10 d. surijusios paršavedės) pradinė diagnozė (kad paršavedė rujoja) buvo teisinga 100 proc. Taigi paršavedžių, nerujojančių ilgiau nei 30 d., ir po hormoninės stimuliacijos išoriniai rujos požymiai buvo išreikšti silpniau nei kiaulių, kurios, iki stimuliacijos, po paršelių atjunkymo nerijojo 10 d. Nustatėme, kad po stimuliacijos rujojusių IA ir IIA grupių paršavedžių E_2 koncentracija smarkiai išaugo, palyginti su prieš stimuliaciją nustatyta E_2 koncentracija ir kito atitinkamai nuo 17,81 iki 21,87 pmol/l bei 14,74 iki 16,73 pmol/l atitinkamai, o P_4 koncentracija kraujo plazmoje liko maža. R. Knox ir kiti autoriai nustatė (2001, 2003), kad po gonadotropinų injekcijos padidėja E_2 koncentracija kraujyje, todėl taip pat padidėja LH bei FSH koncentracija, tai iššaukia greitesnį rujos požymių pasireiškimą po paršelių atjunkymo ir tokiu būdu ARL sutrumpėja. Mažos steroidinių hormonų koncentracijos rodo visišką kiaušidžių veiklos nebuvimą. Tai patvirtina ir W. Chun ir kt. (2002) atliktus tyrimus, kad maža P_4

koncentracija yra viena iš kiauulių *anoestrus* būklės priežasčių. Nors nei vieni iš IB ir IIB gr. (po preparato išvirkštimo nesurijojusios paršavedės) paršavedžių per 10 d. nuo preparato išvirkštimo rujos požymiai nepasireiškė, tačiau tiek IB gr. tiek IIB gr. paršavedžių lytinių hormonų koncentracijos ir makroskopiniai lytinių organų tyrimai parodė, kad ne visos paršavedės buvo *anoestrus* būklės (atitinkamai 40 ir 60 proc.).

Taigi kai kurių paršavedžių organizme po preparato injekcijos vis dėlto vyko pokyčiai, kurie buvo per silpni, kad iššauktų išorinius rujos požymius, tačiau pakankami "tyliai" rujai prasidėti. R. Bates ir kt. (2000) bei R. Knox ir kt. (2001) nustatė, kad gonadotropinų panaudojimas nesutrikusios reprodukcijos paršavedėms yra efektingas iki 94 proc.

Išanalizavę visus eksperimento metu gautus duomenis nustatėme, kad tos paršavedės, kurių ruja po paršelių atjunkymo neprasidėjo per 10 d., buvo geresnės reprodukcinės būklės ir efektyviau reagavo į stimuliaciją GTH negu II gr. kiauulės, kurių ruja po paršelių atjunkymo neprasidėjo per 30 dienų.

Palyginus abiejų grupių duomenis galime teigti, kad hormoninę rujos stimuliaciją reikia naudoti kiauulėms, kurioms po paršelių atjunkymo rujos požymiai nepasireiškia per 10 d., nes *anoestrus* stadijai užsitęsus 30 d., preparato veiksmingumas smarkiai sumažėja. Pasireiškus paršavedžių patologinei *anoestrus* būklei egzogeninių gonadotropinų injekcijos nepakanka stimuliuoti folikulų augimą bei rujos požymiams sukelti (Garcia et al., 2004).

Imunohistocheminis steroidinių hormonų receptorių tyrimas parodė, kad, nepaisant hormoninės stimuliacijos, ERα yra ne visuose patloginės *anoestrus* būklės paršavedžių gimdos sienos audiniuose. Egzogeninių hormonų poveikis endometriui yra kitoks negu fiziologiškai vykstant natūraliam lytiniam ciklui nustatė Johannisson ir kt. (1982); Johannisson (1990); Li ir kt. (1992); Casanas-Roux ir kt. (1996); Dallenbach-Hellweg ir Poulsen (1996); Habiba ir kt. (1998).

ERα kiekis ir pasiskirstymas IB gr. ir IIB gr. kiauulių gimdos audiniuose buvo nustatytas skirtingas, o PR-A receptorių iš viso nebuvo nustatyta. IB gr. daugiausiai teigiamai nusidažiusių ERα branduolių buvo nustatyta liaukiniame epitelyje (51 – 80 proc.). Paviršiniame epitelyje ERα receptorių esant paršavedėms patloginės *anoestrus* būklės nenustatyta. IIB gr. paršavedžių gimdos endometriui nei paviršiniame epitelyje nei stromoje ERα nenustatyta. Liaukiniame endometriui sluoksnyje ERα nustatyta mažiau negu 30 proc., o raumeniniame sluoksnyje 51 – 80 proc. ląstelių.

Palyginome ERα kiekį ir pasiskirstymą tarp nestimuliuotų *anoestrus* būklės paršavedžių ir po hormoninės stimuliacijos likusių *anoestrus* būklėje IB gr. ir IIB gr. kiauulių. Nustatėme, kad receptorių kiekis jų gimdos audiniuose skyrėsi. Nestimuliuotų kiauulių visuose gimdos audiniuose buvo nu-

statyti ERα, o stimuliuotų kiauulių gimdoje ERα nenustatyti IB gr. kiauulių paviršiniame epitelyje, o IIB gr. kiauulių – paviršiniame epitelyje ir stromoje. ERα kiekis nestimuliuotų kiauulių gimdos liaukiniame ir raumeniniame audiniuose taip pat buvo didesnis negu stimuliuotų kiauulių tuose pačiuose audiniuose. Tyrimai parodė, kad steroidinių hormonų – P₄ bei E₂ receptorių kiekis bei pasiskirstymas kiauulių gimdos endometriui audiniuose bei miometriume yra labai savitas ir priklauso ne tik nuo hormonų koncentracijos kraujyje bei *anoestrus* laikotarpio trukmės, bet ir nuo individualių paršavedės organizmo savybių.

IŠVADOS

1. Laikotarpio nuo paršelių atjunkymo iki rujos požymių pasireiškimo trukmė priklauso nuo paršavedės amžiaus pirmą kartą ją sėklinant, paršingumų skaičiaus, paršingumo trukmės, paršelių atjunkymo mėnesio ir paršavedės veislės (0,05>p<0,001). Kuo ilgesnė laikotarpio trukmė nuo paršelių atjunkymo iki rujos pradžios, tuo mažesnis gimusių paršelių skaičius lizde (p<0,001).

2. Mažiausias gimdos svorio vidurkis nustatytas *anoestrus* būklės kiauulių, o didžiausias - ciklinių kiauulių vėlyvojo porujo stadijoje, atitinkamai - 609,27 g ir 1457,48 g. Lytinio ciklo metu dešinės ir kairės kiaušidžių svoris koreliavo tarpusavyje (R=0,76; p<0,001), o jų svorio vidurkis su gimdos svorio vidurkiu (R=0,38; R=0,34; p<0,01).

3. Dėl nepasireiškusios rujos požymių 62 proc. išbrokuotų paršavedžių kiaušidės buvo cikliškai aktyvios, o 38 proc. nustatyta patloginė *anoestrus* būklė. Rujojusių ir keletą kartų sėklintų, bet neapsivaisinusių paršavedžių grupėje cikliškai aktyvios kiaušidės nustatytos 94 proc., o patloginė *anoestrus* būklė - 6 proc. kiauulių.

4. Skirtingų lytinio ciklo stadijų ir patloginės *anoestrus* būklės metu kiauulių endometriume vyravo limfocitai ir granulocitai. Rujos metu endometriui paviršiniame epiteliname bei liaukiniame sluoksniuose vyravo limfocitai. Porujo metu endometriui stromoje, o ankstyvojo porujo metu liaukiniame sluoksnyje vyravo eozinofilai (p<0,05). Patloginės *anoestrus* būklės metu endometriui paviršiniame bei liaukiniame epitelinuose sluoksniuose buvo ryškiausia neutrofilų infiltracija, o eozinofilų nerasta nei viename endometriui sluoksnyje (p<0,05).

5. Sutrikusios reprodukcijos paršavedžių, kurių kiaušidės buvo funkciškai aktyvios, kraujo plazmoje progesterono koncentracija vidutiniškai buvo 17,18±19,82 nmol/l, o estradiolio-17β – 82,54±152,15 pmol/l, priklausomai

nuo lytinio ciklo stadijos ($p < 0,05$). Paskerstų *anoestrus* būklės kiaulių kraujo plazmoje progesterono vidutinė koncentracija buvo $0,082 \pm 0,04$ nmol/l, o estradiolio-17 β koncentracija buvo mažesnė už aparato fiksuojamą žemiausią reikšmę pmol/l.

6. Estrogenų receptoriai alfa (ER α) nustatyti visuose gimdos audiniuose visų lytinio ciklo stadijų ir patologinės *anoestrus* būklės metu. ER α nusidažymo intensyvumas ir jų kiekis buvo skirtingas skirtinguose gimdos audiniuose.

7. Mažiausias estrogenų receptorių alfa kiekis ir nusidažymo intensyvumas (A/+) buvo sutrikusios reprodukcijos paršavedžių rujos metu. Didžiausias estrogenų receptorių alfa kiekis ir nusidažymo intensyvumas (D/+++) buvo vėlyvojo porujo stadijoje. Progesterono receptoriai (PR-A) buvo visuose gimdos audiniuose visų lytinio ciklo stadijų metu. Patologinės *anoestrus* būklės metu PR-A receptorių nebuvo.

8. Gonadotropiniai hormonai paršavedžių rują stimuliuojo priklausomai nuo laikotarpio nuo paršelių atjunkymo iki rujos požymių pasireiškimo trukmės.

9. Gonadotropiniai hormonai nesąlygojo estrogenų alfa bei progesterono A receptorių kiekio padaugėjimo ir lokalizacijos pokyčių *anoestrus* būklės kiaulių gimdos audiniuose.

PASIŪLYMAI

1. Rekomenduojama atlikti gimdos kaklelio palpaciją rujai nustatyti, nes priešrujo ir rujos stadijose jis yra labai kietos konsistencijos. Šis požymis nepastebimas kitų lytinio ciklo stadijų metu.

2. Rekomenduojama įvertinti veislinės bandos lytinių organų funkcinę būklę, o bandai atnaujinti atrinkti tik tas kiaules arba jų palikuonis, kurioms nebuvo taikytas hormoninis gydymas ir gerai išreikšti išoriniai rujos požymiai.

3. Rekomenduojama gonadotropinių hormonų preparatus švirkšti neruojančioms kiaušėms ne vėliau kaip 10 dieną nuo paršelių atjunkymo, o rujos požymiams nepasireiškus jas brokuoti.

PASKELBTŲ STRAIPSNIŲ SĄRAŠAS

1. Karvelienė B., Riškevičienė V. Paršavedžių reprodukcinio organų kitimas lytinio ciklo metu. Veterinarija ir Zootechnika, 2006. T. 34 / 56. P. 11-17.

2. Karvelienė B., Žilinskas H., Riškevičienė V. Post-mortem Examination of Sows Genital Organs Culled for Reproductive Disturbances and Immunohistochemical Studies on ER α and PR-A Receptors in the Anoestral Sows Uterus. Repro. Dom. Anim., 2007. Vol. 42. No. 3. P. 275-281.

3. Karvelienė B., Žilinskas H., Januškauskas A., Riškevičienė V. Immunohistochemical studies on distribution of ER α in the uterus of sows with reproductive disturbances. Biologija, 2007. Nr. 1. P. 39-44.

TRUMPAS GYVENIMO APRAŠYMAS

BIRUTĖ KARVELIENĖ (Motiejūnaitė) gimė 1975 m. balandžio 16 dieną, Kaune. 1993 m. baigė Kauno 24-ąją vidurinę mokyklą. 1994-1999 m. studijavo Lietuvos Veterinarijos Akademijoje ir įgijo veterinarijos gydytojos kvalifikaciją, o 2001 m. įgijo ir Veterinarijos gydytojos Magistro kvalifikaciją.

Darbo patirtis: 2000-2003 m. dirbo Lietuvos veterinarijos akademijoje Neužkrečiamų ligų katedroje, Eksperimentinėje farmakologijos laboratorijoje laborante. 2003-2007 m. LVA, Užkrečiamų ligų katedroje, Patologijos skyriuje Vyr. Laborante, doktorante. Nuo 2007 birželio 1d. Užkrečiamų ligų katedros asistentė.

Aktyvumas. Kursai:

2003 kovo 31 d. - balandžio 2 d. - "The pregnant female", "Centre for Reproductive Biology", Švedijoje, Uppsaloje (CRU).

2003 gegužės 12 - 16 d. - "Bovine reproduction", Estijos žemės ūkio universitete, Tartu.

2003 spalio 20 - 30 d. - "Reproductive Biotechnology", "Department of Obstetrics and Gynaecology", Švedijoje, Uppsaloje (SLU).

2004 gegužės 10-14 d. - „Reproductive Endocrinology in Vertebrates“, "Centre for Reproductive Biology", Švedijoje, Uppsaloje (CRU).

2004 birželio 28 d. – liepos 2 d. - "Methods in cell biology and cell culturing science", Lietuvos Veterinarijos Akademijoje, Kaune.

2004 lapkričio 16-17 d. - "FACS-instrument flow cytometry training", Vilniuje.

2005 gegužės 9-13 d. - "Bovine Reproduction (with a particular empha-

sis on high production) and swine reproduction”, Estijos žemės ūkio universitete, Tartu.

2006 vasario 2-15 d. ir kovo 14-17 d. NOVA doktorantų kursai “Clinical and Biochemical Research and Scientific Methods. Experimental design in clinical studies. Clinical intervention and evidenced-based medicine”. Kursų I dalis vyko: Karališkajame veterinarijos ir žemės ūkio mokslų universitete, Kopenhagoje, Danijoje (The Royal Veterinary and Agricultural University). II dalis: Femund Fjellstue, Norvegijoje.

2006 gegužės 18 d. seminaras “Dozatoriaus tikslumo reikšmė darbo kokybei”, Lietuvos Veterinarijos Akademijoje.

2006 rugsėjo 01 d. – 2006 gruodžio 24 d. – išklause KTU magistrantams ir doktorantams skirtą statistikos kursą, darbui su SPSS statistine programa.

2006 lapkričio 6-11 d. NOVA doktorantų kursai „Reproductive Toxicology with Emphasis on Persistent Endocrine Disrupting Chemicals in the Environment“, Osle Norvegijos veterinarinėje mokykloje (Norwegian School of Veterinary Science).

2006 rugsėjo 21-22 d. dalyvavo Tarptautinėje mokslinėje konferencijoje “Gyvūnų mitybos, sveikatingumo ir produkcijos kokybės aktualijos”, LVA.

2006 spalio 20 d. dalyvavo mokslinėje konferencijoje „Aktualios gyvulių ir paukščių mitybos problemos: alternatyvių pašarų priedų pašariniam antibiotikams panaudojimas gyvūnų mityboje“, LVA.

2007 birželio 3-8 d. dalyvavo kursuose „Reproductive Endocrinology in Vertebrates“, kurie vyko “Centre for Reproductive Biology”, Švedijoje, Uppsaloje (CRU).

Maketavo R. Trainienė
Už teksto turinį ir redagavimą atsakingas autorius

Spausdino LVA Spaudos ir leidybos skyrius
Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas
Tiražas 50. _____ sp.l. Užs. Nr. _____. 2007