

Leczone i nieleczone braki jajczkowania związane z przepływem krwi w jajnikach i macicy u klaczy arabskich (studium przypadku)

Amal M. Abo El-Maaty^{1#}, Yehia El Baghdady², Khalid A. ElShahat²,
Mahmoud A. Helmy², Elshymaa A. Abdelnaby²

¹National Research Center, Veterinary Division, Animal Reproduction and AI Department, Dokki, Egypt; #e-mail: amalaboelmaatyl@yahoo.com

²Cairo University, Faculty of Veterinary Medicine, Theriogenology Department, Egypt

Aby zbadać rozwój leczonych i nieleczonych tzw. pustych pęcherzyków (anovulatory follicle – AnOV) na tle hormonalnym, w związku z unaczynieniem macicy i jajników, przeprowadzono dopplerowskie badania ultrasonograficzne sondą dorektalną u siedmiu klaczy arabskich przed i po rozwinięciu się AnOV. Poza pomiarem średnicy, powierzchni i objętości tzw. pustego pęcherzyka, analizowano codziennie wykonywane skany dopplerowskie w kolorze i z wykorzystaniem całkowitej emisji sygnału (technologia power), aby zmierzyć obszary przepływu krwi w kolorach czerwonym i niebieskim oraz w technologii power (w pikselach). Dokonywano też pomiarów poziomu estradiolu (E2), progesteronu (P4), leptyny, insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-1) oraz tlenku azotu (NO) w surowicy krwi klaczy. Średnica (cm), powierzchnia (cm²), objętość (cm³), powierzchnia (w pikselach) i powierzchnia pęcherzyków wzrastających jamistych (w pikselach), obwód oraz procentowe zmiany krążenia w przypadku tzw. pustego pęcherzyka wzrastały (P<0,0001) stopniowo po zniknięciu obrzęku macicy, w porównaniu do wartości w trakcie obrzęku. Obszary tzw. pustego pęcherzyka w kolorze niebieskim, całkowite obszary unaczynienia przy USG dopplerowskim w kolorze i w technologii power zwiększały się po zniknięciu obrzęku macicy (P<0,0001). Po wyłączeniu obszaru jamistego procentowy udział warstwy ziarnistej w dopplerowskim badaniu w kolorze i typu power zmniejszał się po zniknięciu obrzęku macicy. Róg macicy leżący po tej samej stronie i trzon macicy miały istotnie (P<0,0001) wysokie wartości obszarów unaczynienia dla przepływu krwi w kolorze niebieskim i czerwonym w trakcie obrzęku macicy. Występowanie tzw. pustego pęcherzyka było związane z niskimi wartościami P4, IGF-1 (P<0,001) i leptyny (P<0,05). Potraktowanie pustego pęcherzyka GnRH powodowało jego luteinizację i wywoływało owulację w 9 i 30 dni później. Można stwierdzić, że nagłe zwiększenie się przepływu krwi z powodu zmniejszonego poziomu progesteronu, estradiolu oraz zwiększonego poziomu IGF-1 powoduje brak jajczkowania. Brak zachowań typowych dla rui i znacznego unaczynienia pęcherzyka oraz leżącego po tej samej stronie rogu macicy, związanego z obrzękiem macicy, to wskaźniki sugerujące brak jajczkowania.

SŁOWA KLUCZOWE: anowulacja / badanie dopplerowskie w kolorze / badanie dopplerowskie w technologii power / przepływ krwi w macicy / hormony / klacz

Od dwudziestu lat w diagnostyce reprodukcyjnej stosowana jest na szeroką skalę technologia dopplerowska do badań przepływu krwi w jajnikach [2, 3, 4, 5, 6, 12, 15, 16, 17, 18, 24, 36, 38] i macicy kłaczy [1, 8, 9, 13, 14, 22, 23, 25, 26, 32, 39].

Wykazano, że u kłaczy występowanie braku owulacji w przypadku pęcherzyka dominującego pod koniec rui jest niskie (5%), w porównaniu z jesiennym okresem przejściowym (20%) [34] i z okresem poprzedzającym falę owulacyjną (25%) [30]. Liczba kłaczy, u których rozwijają się dominujące puste pęcherzyki podczas okresu przejściowego jest różna, w zależności od badań, np. 15 na 15 [43], 9 na 10 [20] czy do 3 na 8 [21]. Rozwój pęcherzyka dominującego, bez względu na to czy jest on pusty, czy owulacyjny, związany jest z falą wzrostu pęcherzykowego i procesem różnicowania wzrostu pęcherzyków, w którym rozwijający się dominujący pęcherzyk nadal rośnie, a kolejne pęcherzyki II rzędu ulegają atrezji [31]. Cechy charakterystyczne dla różnicowania wzrostu pęcherzyków są porównywalne między występującymi czasami falami wzrostu pustych pęcherzyków z dominującymi pęcherzykami a sezonowymi falami owulacyjnymi [7].

Przeprowadzone badania własne miały na celu zbadanie zmian w wymiarach pustych pęcherzyków (AnOV), przepływu krwi związanego z poziomem hormonów we krwi obwodowej i macicznym przepływem krwi w przypadku AnOV u kłaczy arabskich podczas obrzęku macicy i po jego ustąpieniu.

Material i metody

Zwierzęta i badanie ultrasonograficzne. Dorosłe, zdrowe, będące w cyklu reprodukcyjnym egipskie kłaczki arabskie ($n=7$) w wieku 4-11 lat, o masie ciała 320 ± 30 kg, należące do Ministerstwa Spraw Wewnętrznych (30.0276°N , 31.2101°E), przebywały w jednakowych warunkach żywienia i utrzymania. Kłaczki były utrzymywane pojedynczo na krytym padoku, z dostępem naturalnego światła i sztucznym oświetleniem w nocy, w temperaturze otoczenia. Żywiłone były zakupioną paszą treściwą i sianem, miały dostęp do czystej wody.

Jedną kłaczki poddawano codziennym dopplerowskim badaniom USG (SonoAceR3, Medison, Samsung, Korea Płd.) – rys. 1A-C. Pozostałe kłaczki najpierw diagnozowano i leczono (rys. 1D-L), aż do momentu, gdy stwierdzono dwie kolejne owulacje, przy czym dzień 0 był dniem zabiegu. Badania przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Instytucjonalnego Komitetu Opieki nad Zwierzętami i Wykorzystania Zwierząt (IACUC) Wydziału Nauki Uniwersytetu Kairskiego oraz Narodowego Centrum Badawczego. Obrazowanie obszaru przepływu krwi (rys. 1) wykonano tak, jak we wcześniejszych badaniach dotyczących pęcherzyków jajnikowych [3, 4], rogów macicy i macicy [23]. Za pomocą USG dopplerowskiego w kolorze i w technologii power mierzono przepływ krwi jedynie w przypadku największych pęcherzyków jajnikowych związanych z obrzękiem macicy (dni 1-5), po ustąpieniu obrzęku macicy (dzień 6. do 10.) oraz w dniach od 11. do 17. Całkowita powierzchnia zabarwiona to suma obszarów niebieskich i czerwonych (w pikselach). Procentowy udział obszaru zabarwionego jest stosunkiem całkowitego obszaru zabarwionego (w pikselach) do obszaru pęcherzyka (w pikselach). Procentowy udział powierzchni zabarwionej obszaru ziarnistego jest stosunkiem powierzchni zabarwionej podzielonej przez powierzchnię pęcherzyka minus powierzchnia pęcherzyków wzrastających jamistych. Procentowy udział obszaru w technologii power to stosunek obszaru w technologii power

(w pikselach) podzielonego przez powierzchnię pęcherzyka. Procentowy udział obszaru powierzchni ziarnistej w technologii power to stosunek powierzchni w technologii power podzielonej przez powierzchnię pęcherzyka minus powierzchnia jamista.

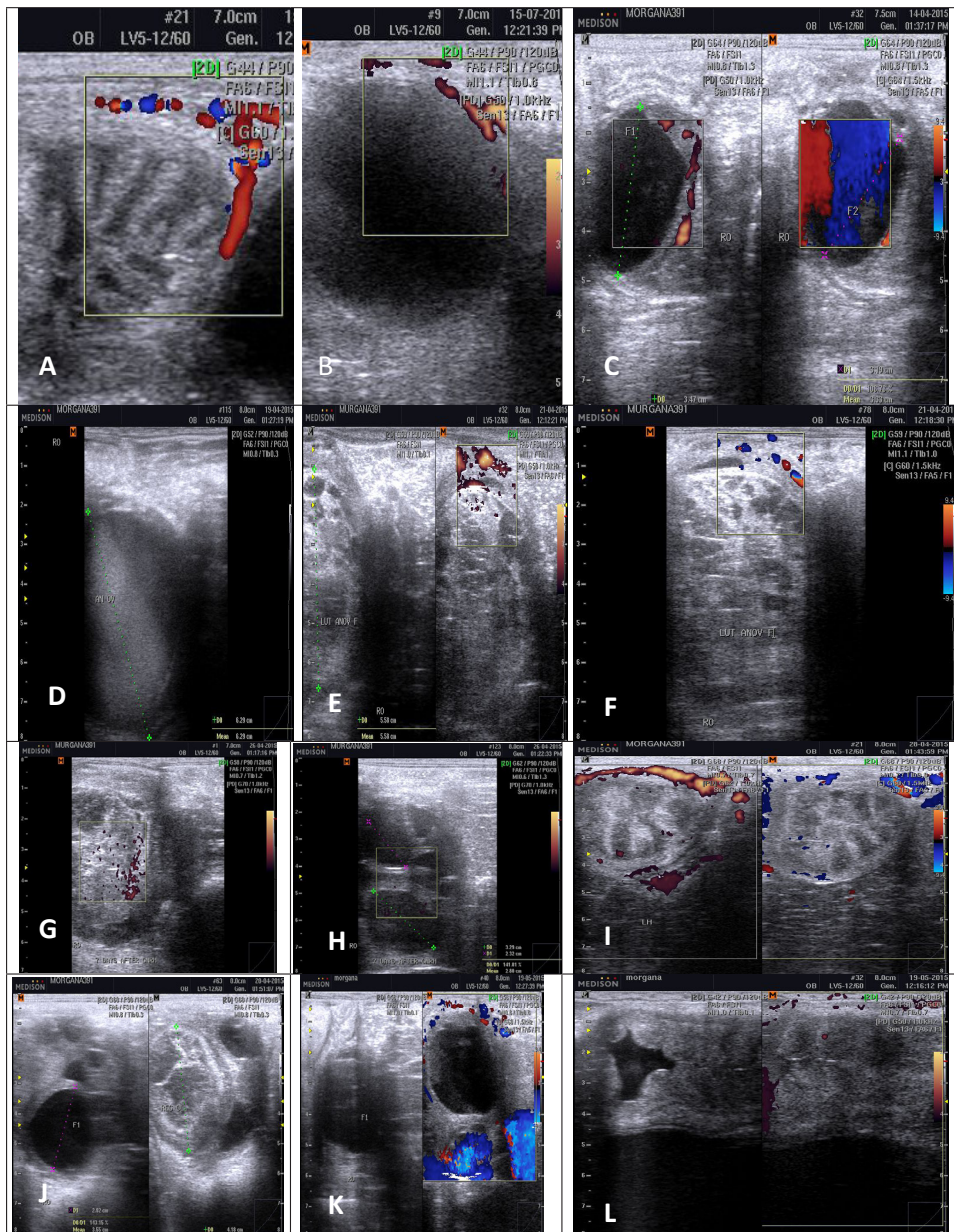
Pobieranie krwi i oznaczanie hormonów. Codziennie od wszystkich kłaczy pobierano próbki krwi przez nakłucie żyły szyjnej. Krew zbierano do zwykłych probówek próżniowych. Surowicę przechowywano w temperaturze -20°C do czasu oznaczenia hormonów. Czulość testu na progesteron (P4, EIA-1561) wynosiła 0,045 ng/ml, przy precyzji wewnątrz testów i między testami odpowiednio 5,4 i 9,96. Czulość testu na estradiol (E2, EIA-2693) wynosiła 9,714 pg/ml, przy precyzji wewnątrz testów i między testami odpowiednio 6,81 i 7,25. W teście „sandwich” do oznaczania leptyny (EIA-2395) dolna granica detekcji wynosiła 1,0 ng/ml, przy współczynnikach zmienności wewnątrz testu i między testami odpowiednio 3,1% i 9,7%. Czulość testu do oznaczania insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-1 600, EIA-4140) wynosiła 1,29 ng/ml, przy precyzji wewnątrz testu i między testami odpowiednio 6,62 i 7,79. Wszystkie hormony były oznaczane przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA (DRG, International Inc, USA). W celu pomiaru metabolitów tlenku azotu (NO) próbki surowicy mieszano z równą im objętością świeżo przygotowanego odczynnika Griessa i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej; absorbancję mierzono przy długości fali 540 nm, używając czytnika płytek do mikromiareczkowania. Wzorca azotynu (NO_2), w zakresie 0-50 mM, używano do określenia stężenia NOM w każdej studziencie w identyczny sposób, jak w poprzednich pomiarach prowadzonych w naszym laboratorium u kłaczy [3, 4]. Współczynniki zmienności wewnątrz oznaczeń i między oznaczeniami dla testów NOM wynosiły odpowiednio 5,3% i 6,9%. Czulość oznaczenia wynosiła 0,225 mmol/l.

Analiza obrazów. Powierzchnia przepływu krwi w ścianie pęcherzyka, rogach macicy i trzonie macicy była mierzona w pikselach, tak jak to opisano u krów [7] i kłaczy [3, 4, 23], przy użyciu oprogramowania Adobe PhotoShop CC (1990-2013, Adobe Systems).

Analiza statystyczna. Użyto oprogramowania SPSS [40] do wyliczenia średnich \pm SEM (błąd standardowy średniej). Zastosowano prostą jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) do zbadania wpływu fazy rui na średnicę pęcherzyka (cm), powierzchnię (cm^2), objętość (cm^3), powierzchnię (w pikselach), powierzchnię jamistą pęcherzyka (w pikselach), powierzchnię warstwy ziarnistej (w pikselach), powierzchnie zabarwione na niebiesko i na czerwono (w pikselach), powierzchnie w technologii power (w pikselach) oraz na procentowy udział powierzchni zabarwionych i w USG typu power dla pęcherzyków oraz powierzchni warstwy ziarnistej pęcherzyka (w pikselach), powierzchni zabarwionych na niebiesko i na czerwono oraz w technologii power (w pikselach) dla rogów macicy leżących po tej samej stronie i stronie przeciwnej oraz dla trzonu macicy. Wykonano test wielokrotnych porównań Duncana, aby porównać istotność różnic pomiędzy średnimi przy wartości $P < 0.05$.

Wyniki i dyskusja

Średnica (cm), powierzchnia (cm^2), objętość (cm^3), powierzchnia (w pikselach) oraz powierzchnia jamista (w pikselach), obwód oraz krążenie (%) pustego pęcherzyka (AnOV) wzrastały ($P < 0,0001$) stopniowo po zaniku obrzęku macicy w porównaniu do wartości w czasie obrzęku (tab. 1, rys. 2). Obszary AnOV w kolorze niebieskim, całkowita po-



Rys. 1. Ultrasonogram obrzęku macicy: A – za pomocą technologii dopplerowskiej w kolorze podczas rozwoju nieleczzonego pustego pęcherzyka, B – za pomocą technologii dopplerowskiej typu power. C – AnOV w technologii dopplerowskiej w kolorze (po prawej stronie) i w technologii power (po lewej stronie) 5 dni przed anowulacją. D – dzień 0 – AnOV o średnicy >60 mm leczony GnRH. E – dzień 2. po GnRH na USG typu power i F – w kolorze. G – dzień 7. po GnRH w technologii power

i H – następna fala owulacyjna. I – dzień 9. po obrzęku macicy w technologii USG typu power (po lewej stronie) i w kolorze (po prawej stronie). J – następny pęcherzyk owulacyjny o średnicy 31 mm (po lewej stronie) i luteinizujący AnOV w regresji o średnicy 41 mm (po prawej stronie). K – dzień 30. po GnRH drugi pęcherzyk owulacyjny o wielkości 35 mm na USG w kolorze i L – trzon macicy po rozrodzie w technologii dopplerowskiej typu power

Fig. 1. Ultrasonogram of uterine oedema: A – with colour Doppler during development of untreated AnOV follicle, B – with power Doppler. C – AnOV with colour (right) and power (left) Doppler 5 days before anovulation. D – day 0 – AnOV with diameter >60 mm treated with GnRH. E – day 2 after GnRH with power and F – colour Doppler. G – day 7 after GnRH with power and H – next ovulatory wave. I – day 9 after uterine oedema with power (left) and colour (right) Doppler. J – next ovulating follicle 31 mm in diameter (left) and regressing luteinized AnOV 41 mm in diameter (right). K – day 30 after GnRH second ovulating follicle of 35mm with colour Doppler and L – uterine body after breeding with power Doppler

wierzchnia zabarwiona oraz powierzchnia w technologii power zwiększały się po zaniku obrzęku macicy ($P<0,0001$). Całkowita powierzchnia AnOV w USG w kolorze i typu power zmniejszała się ($P<0,0001$) po zaniku obrzęku macicy oraz po 13. dniu. Kiedy powierzchnia jamista została wykluczona, procentowy udział powierzchni ziarnistej na USG w kolorze i typu power malał ($P<0,0001$) po zaniku obrzęku macicy. Róg macicy leżący po tej samej stronie i trzon macicy miały istotnie ($P<0,0001$) większe obszary przepływu krwi zabarwione na niebiesko i czerwono w trakcie obrzęku macicy. Występowanie AnOV było związane z niskim poziomem progesteronu (P4) od dnia 1. do 5. i od 5. do 10., w porównaniu do dni 11-18, kiedy rozwijał się następny dominujący pęcherzyk. Poziomy IGF-1 ($P<0,001$) i leptyny ($P<0,05$) zmniejszały się po zaniku obrzęku macicy.

Stężenie progesteronu było dodatnio skorelowane (tab. 2) ze średnicą AnOV ($r=0,55$; $P<0,01$), jego powierzchnią ($r=0,78$; $P<0,0001$) oraz powierzchnią jamistą ($r=0,78$; $P<0,0001$). Stężenie progesteronu było ujemnie skorelowane z powierzchnią ziarnistą zabarwioną na niebiesko ($r=-0,72$; $P<0,0001$), w technologii power i z procentowym udziałem powierzchni ziarnistej w technologii power ($r=-0,52$; $P<0,0001$), całkowitym obszarem zabarwionym oraz procentowym udziałem zabarwionej powierzchni ziarnistej ($r=-0,73$; $P<0,0001$), całkowitym udziałem procentowym powierzchni zabarwionej ($r=-0,71$; $P<0,0001$), powierzchnią ziarnistą w technologii power ($r=-0,59$; $P<0,0001$), powierzchniami leżącego po tej samej stronie rogu macicy zabarwionymi na niebiesko ($r=-0,71$; $P<0,0001$), na czerwono oraz w technologii power ($r=-0,57$; $P<0,0001$).

Poziom estradiolu (E2) był jednakowo dodatnio skorelowany (tab. 2) z obszarem przepływu krwi zabarwionym na niebiesko, całkowitym obszarem zabarwionym oraz procentowym udziałem całkowitej zabarwionej powierzchni ziarnistej ($r=0,37$; $P<0,01$), natomiast skorelowany ujemnie z obszarem powierzchni przepływu krwi zabarwionym na czerwono ($r=-0,37$; $P<0,01$).

Z kolei poziom IGF-1 był skorelowany ujemnie ze średnicą AnOV ($r=-0,46$; $P<0,01$), dodatnio natomiast z powierzchnią zabarwioną na niebiesko ($r=0,35$; $P<0,05$), powierzchnią w technologii power i procentowym udziałem powierzchni ziarnistej w technologii power ($r=0,44$; $P<0,01$), całkowitym obszarem zabarwionym, procentowym obszarem powierzchni ziarnistej w kolorze ($r=0,36$; $P<0,05$), procentowym udziałem całkowitej powierzchni zabarwionej ($r=0,38$; $P<0,05$), oraz powierzchnią ziarnistą w technologii power ($r=0,45$; $P<0,01$). Ujemne korelacje stwierdzono między poziomem leptyny a średnicą, powierzchnią oraz powierzchnią

Tabela 1 – Table 1

Wymiary, unaczynienie (przepływ krwi) w obrazowaniu dopplerowskim w technologii power i w kolorze tzw. pustego pęcherzyka (AnOV), unaczynienie macicy i zmiany hormonalne podczas rozwoju nielezione-go AnOV

Dimensions of an AnOV follicle, vascularization of the follicle and uterus in colour and power Doppler, and hormonal changes during the development of an untreated AnOV follicle

Wyszczególnienie Item	Dzień 1-5 podczas obrzęku macicy Days 1-5 during uterine oedema	Dzień 6-10 po zaniku obrzęku macicy Days 6-10 after uterine oedema	Dzień 11-18 po zaniku obrzęku macicy Days 11-18 after uterine oedema	Wartość P P-value
1	2	3	4	5
Średnica (cm) Diameter (cm)	3,40 ^a ±0,04	4,03 ^b ±0,06	4,23 ^c ±0,04	<0,0001
Powierzchnia (cm ²) Area (cm ²)	10,93 ^a ±0,33	15,56 ^b ±0,40	17,00 ^c ±0,33	<0,0001
Objętość (cm ³) Volume (cm ³)	17,51 ^a ±0,68	30,98 ^b ±1,17	35,30 ^c ±0,99	<0,0001
Powierzchnia (piksel) Area (pixels)	67 195 ^a ±1531	98 301 ^b ±7379	132 257 ^c ±1645	<0,0001
Powierzchnia jamista (piksel) Antrum area (pixels)	60 674 ^a ±1531	91 780 ^b ±7380	125 736 ^c ±1645	<0,0001
Powierzchnia ziarnista Granulosa area	6521 ±10,51	6521 ±0,01	6521 ±0,01	=0,40
Obwód Circumference	913 ^a ±19	1211 ^b ±59	1452 ^c ±34	<0,0001
Krążenie (%) Circulation (%)	73,40 ^a ±0,62	76,15 ^b ±0,32	80,00 ^c ±0,47	<0,0001
Powierzchnia przepływu krwi zabarwiona na niebiesko Blue blood flow area	4257 ^c ±77	2589 ^b ±256	1607 ^a ±128	<0,0001
Powierzchnia przepływu krwi zabarwiona na czerwono Red blood flow area	1492 ^a ±32	1629 ^b ±29	1696 ^b ±14	<0,0001
Całkowita powierzchnia zabarwiona Total coloured area	5749 ^c ±50	4218 ^b ±228	3304 ^a ±115	<0,0001
Powierzchnia przepływu krwi w technologii power Power blood flow area	5706 ^c ±158	2839 ^b ±145	2464 ^a ±26	<0,0001
Powierzchnia zabarwiona (%) Coloured area (%)	8,59 ^c ±0,15	4,73 ^b ±0,49	2,51 ^a ±0,12	<0,0001
Zabarwiona powierzchnia ziarnista (%) Coloured granulosa area (%)	88,16 ^c ±0,76	64,7 ^b ±3,49	50,7 ^a ±1,76	<0,0001
Powierzchnia w technologii power (%) Power area (%)	8,49 ^c ±0,12	3,18 ^b ±0,33	1,87 ^a ±0,04	<0,0001
Powierzchnia ziarnista w technologii power (%) Power granulosa area (%)	87,51 ^c ±2,42	43,53 ^b ±2,23	37,8 ^a ±0,39	<0,0001
Leżący po tej samej stronie róg zabarwiony na niebiesko Blue ipsilateral horn area	2407 ^c ±32	2185 ^b ±121	1929 ^a ±36	<0,0001

1	2	3	4	5
Leżący po tej samej stronie róg zabarwiony na czerwono Red ipsilateral horn area	1453 ^b ±22	1251 ^a ±53	1205 ^a ±15	<0,0001
Leżący po tej samej stronie róg w technologii power Power ipsilateral horn area	3292 ^c ±97	2597 ^b ±75	2414 ^a ±23	<0,0001
Przeciwstronny róg macicy zabarwiony na niebiesko Blue contralateral horn area	1070 ^a ±45	1332 ^b ±113	1559 ^c ±38	<0,0001
Przeciwstronny róg macicy zabarwiony na czerwono Red contralateral horn	981 ^c ±15	835 ^b ±58	698 ^a ±11	<0,0001
Przeciwstronny róg macicy w technologii power Power contralateral horn area	2203 ^a ±100	2269 ^{ab} ±65	2393 ^b ±28	=0,025
Powierzchnia trzonu macicy zabarwiona na niebiesko Blue uterine body area	4715 ^b ±36	4511 ^b ±218	3916 ^a ±38	=0,001
Powierzchnia trzonu macicy zabarwiona na czerwono Red uterine body area	1229 ^b ±25	1042 ^a ±29	1011 ^a ±9,59	<0,0001
Powierzchnia trzonu macicy w technologii power Power uterine body area	3457 ^a ±11	3554 ^b ±57	3641 ^b ±21	<0,0001
P4 (ng/ml)	1,18 ^a ±0,14	1,36 ^a ±0,24	3,35 ^b ±0,25	<0,0001
E2 (pg/ml)	180 ±4,3	169 ±8,4	169 ±9,5	=0,593
IGF-1 (ng/ml)	269 ^b ±11,3	227 ^a ±7,9	227 ^a ±5,8	=0,001
Leptyna (ng/ml) Leptin (ng/ml)	1,40 ^b ±0,09	1,23 ^a ±0,03	1,19 ^a ±0,03	=0,026
NO (µmol/l)	32,59 ±2,86	30,69 ±2,23	30,62 ±1,66	=0,26

Średnie o różnych indeksach górnych (a, b, c) w wierszach są istotne przy P<0,05
Means with different superscripts (a, b, c) within rows are significant at P<0.05

jamistą, natomiast dodatnie korelacje stwierdzono dla wszystkich AnOV i warstwy ziarnistej zabarwionej na niebiesko oraz unaczynieniem w technologii power (tab. 2).

W pracy omówiono spontanicznie powstały, nieleczony tzw. pusty pęcherzyk (AnOV) spośród 15 pęcherzyków owulacyjnych oraz inny przypadek AnOV, tym razem leczony, spośród 13 pęcherzyków owulacyjnych. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami, występowanie krwotocznych pustych pęcherzyków (hemorrhagic anovulatory follicle – HAF) dotyczy od 5% do 20% cykli rujowych podczas wczesnego i późnego sezonu owulacyjnego [33], a ich rozwój jest związany z niskim stężeniem hormonu antymülerowskiego u klaczy [29]. Nieleczona klacz ze spontanicznym AnOV w badaniach własnych była młoda, w wieku 4-5 lat, podczas gdy klacz leczona miała poniżej 20 lat. Jednak anowulacja jest dużo częstsza u klaczy w wieku powyżej 20 lat i z reguły występuje ponownie, a także jest najczęstsza podczas późnej fazy pęcherzykowej [41]. Chociaż nieleczony pusty pęcherzyk nie stawał się krwotoczny w ciągu 12 dni po zaniku obrzęku macicy, miał on większą mak-

Tabela 2 – Table 2

Współczynniki korelacji Pearsona dla poziomu hormonów, wymiarów pęcherzyka, przepływu krwi i przepływu krwi w leżącym po tej samej stronie rogu macicy podczas rozwoju pustego pęcherzyka (AnOV)

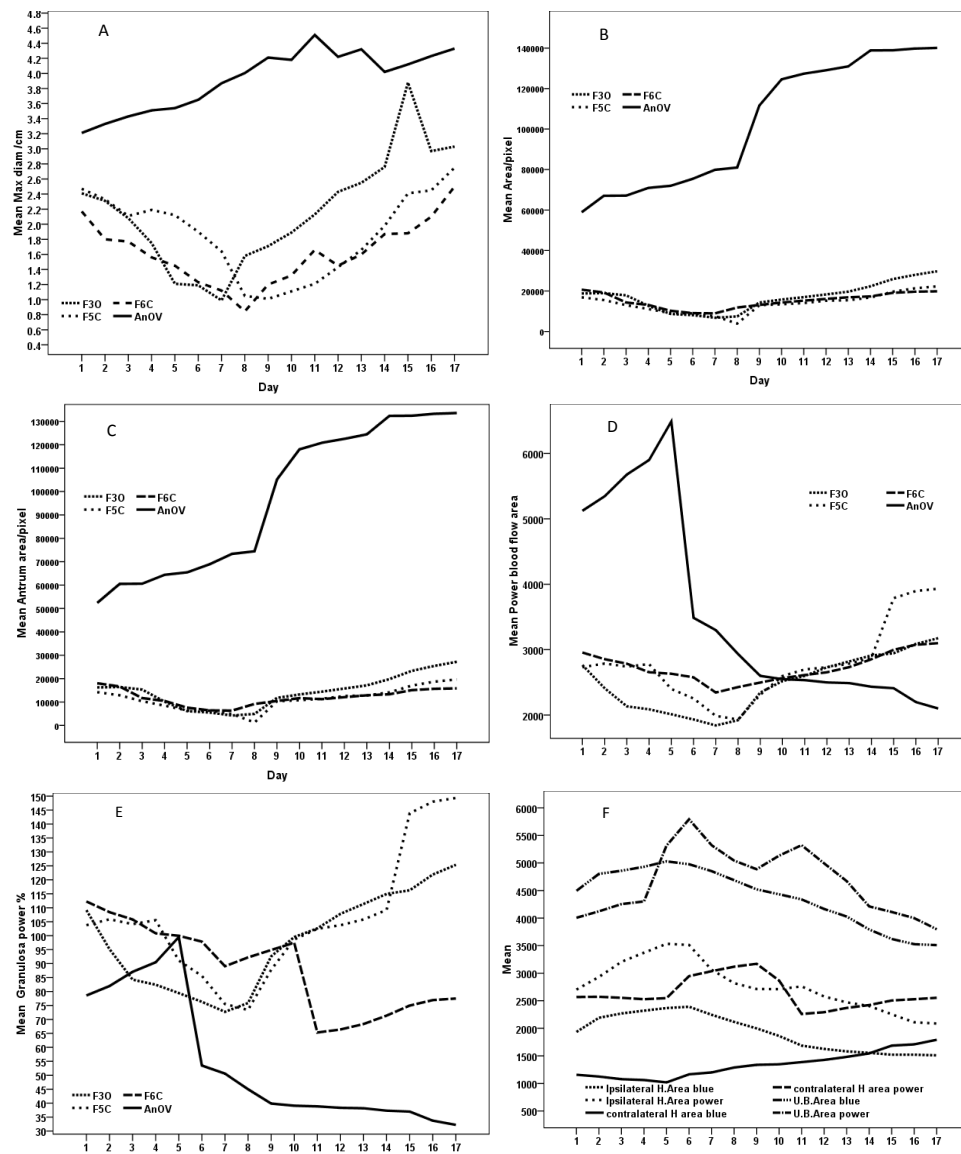
Pearson correlation coefficients among circulating hormones, follicle dimensions, blood flow and ipsilateral uterine horn blood flow during AnOV development

Wyszczególnienie Item	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)	Leptyna Leptin (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)
Maks. średnica (cm) Max diameter (cm)	-0,13 ⁺	0,55 ^{**}	-0,62 ^{**}	-0,46 ^{**}
Powierzchnia (piksel) Area (pixels)	-0,32 ⁺	0,78 ^{***}	-0,52 [*]	-0,32 ⁺
Powierzchnia jamista (piksel) Antrum area (pixels)	-0,32 ⁺	0,78 ^{***}	-0,89 ^{***}	-0,32 ⁺
Obszar przepływu krwi zabarwiony na niebiesko Blue blood flow area	0,37 [*]	-0,72 ^{***}	0,89 ^{***}	0,35 [*]
Obszar przepływu krwi zabarwiony na czerwono Red blood flow area	-0,37 ⁺	0,61 ^{***}	-0,88 ^{***}	-0,22 ⁺
Powierzchnia przepływu krwi w technologii power (piksel) Power blood flow area (pixels)	0,21 ⁺	-0,52 ^{**}	0,63 ^{**}	0,44 ^{**}
Całkowita powierzchnia zabarwiona Total coloured area	0,37 [*]	-0,73 ^{**}	0,88 ^{***}	0,36 [*]
Całkowita powierzchnia zabarwiona (%) Total coloured area (%)	0,29 ⁺	-0,71 ^{***}	0,81 ^{***}	0,38 [*]
Udział zabarwionej powierzchni ziarnistej (%) Coloured granulosa area (%)	0,37 [*]	-0,73 ^{***}	0,88 ^{***}	0,36 [*]
Powierzchnia ziarnista w technologii power Power granulosa area	0,22 ⁺	-0,59 ^{***}	0,67 ^{**}	0,45 ^{**}
Udział powierzchni ziarnistej w technologii power (%) Power granulosa area (%)	0,21 ⁺	-0,52 ^{**}	0,63 ^{***}	0,44 ^{**}
Powierzchnia leżącego po tej samej stronie rogu zabarwionego na niebiesko Blue ipsilateral horn area	0,39 [*]	-0,71 ^{***}	0,97 ^{***}	0,13 ⁺
Powierzchnia leżącego po tej samej stronie rogu zabarwionego na czerwono Red ipsilateral horn area	0,33 [*]	-0,57 ^{***}	0,86 ^{***}	0,35 [*]
Powierzchnia leżącego po tej samej stronie rogu w technologii power Power ipsilateral horn area	0,26 ⁺	-0,57 ^{***}	0,70 ^{**}	0,46 ^{**}

⁺średnie P>0,05; ^{*}średnie P<0,05, ^{**}średnie P<0,01, ^{***}średnie P<0,0001

⁺means P>0.05; ^{*}means P<0.05, ^{**}means P<0.01, ^{***}means P<0.0001

symalną średnicę w porównaniu z przeciętną średnicą pęcherzyka owulacyjnego u kłacz arabskich [3]. Leczony pusty pęcherzyk wykryto 5 dni po przewidywanej owulacji, a jego średnica przekraczała 60 mm. Zgodnie z wynikami własnymi, część pustych pęcherzyków osiągała wymiary, które nie różniły się od ekstremalnej szerokości pęcherzyka owulacyjnego [33, 43]. Naturalne występowanie spontanicznego luteinizującego pustego pęcherzyka jest trudne do przewidzenia [19]. W przeciwieństwie do zwiększonego obszaru przepływu krwi w technologii power, w kolorze niebieskim i czerwonym przed wystąpieniem pustego pęcherzyka w trakcie obrzęku macicy, kiedy zarówno owulacyjny, jak



F3O – wypełnienie pęcherzyka jajnika owulacyjnego, F5C i F6C – pęcherzyki na jajniku nieowulacyjnym (A-E)
 F3O – follicle on the ovulating ovary, F5C and F6C – follicles on the contralateral ovary (A-E)

Rys. 2. Wartości średnie: średnica (A), obszar w pikselach (B), powierzchnia jamista (C), powierzchnia przepływu krwi w technologii power (D), procentowy udział powierzchni ziarnistej w technologii power pęcherzyków II rzędu związanych z tzw. pustym pęcherzykiem AnOV (E), unaczynienie rogów macicy i trzonu macicy w kolorze niebieskim i w technologii power (F)
 Fig. 2. Means: diameter (A), area in pixels (B), antrum area (C), power blood flow vascularization (D), granulosa power area % of growing follicles associated with the AnOV (E), blue and power vascularization of uterine horns and uterine body (F)

i pusty pęcherzyk miały 25-30 mm średnicy, obszar przepływu krwi był mały w przypadku pustego pęcherzyka w porównaniu z pęcherzykiem owulacyjnym [16]. Obszar przepływu krwi w technologii power w przypadku AnOV był pozornie największy w porównaniu z kolejnymi wzrastającymi pęcherzykami dominującymi i pęcherzykami II rzędu (rys. 1C), jednak na podstawie obliczonego udziału procentowego powierzchni ziarnistej unaczynienia w USG typu power okazało się, że było to najmniejsze unaczynienie (rys. 1D). Podobnie, średni obszar przepływu krwi był dwa razy większy w przypadku pęcherzyków owulacyjnych o średnicy 30 mm niż dla pęcherzyków pustych o tej samej średnicy [33].

W porównaniu do pęcherzyków owulacyjnych [3, 4] AnOV miał podobną średnicę od 1. do 5. dnia, następnie jego średnica, powierzchnia i obszar przepływu krwi stopniowo się zwiększały po zaniku obrzęku macicy (dzień 5.). Analogicznie zaobserwowano, że dominujące puste pęcherzyki o średnicy 30 mm miały mniejszą średnicę o mniejszej powierzchni przepływu krwi niż powierzchnia pęcherzyków owulacyjnych w każdym dniu, począwszy od dnia 1., kiedy pęcherzyki miały 25 mm lub więcej [16]. Obniżone unaczynienie zabarwione na niebiesko i w technologii power, procentowy udział obszaru zabarwionego oraz procentowy udział zabarwionej powierzchni ziarnistej mogły być związane z obniżoną proliferacją komórek śródbłonkowych w naczyniach włosowatych pęcherzyka oraz obniżonym unaczynieniem osłonki [37]. Podobnie do wysokiego udziału procentowego ściany pustego pęcherzyka (powierzchni ziarnistej) ze średnim sygnałem w USG w kolorze ($88,16 \pm 0,76$) i w technologii power ($87,51 \pm 2,42$) od 1. do 5. dnia, w grupie krwotocznych pustych pęcherzyków (HAF) stwierdzono większy udział procentowy ściany pęcherzyka w USG w kolorze ($90\% \pm 4\%$) [33]. Zwiększenie udziału procentowego w USG w kolorze i w technologii power było przypisywane unaczynieniu ściany pęcherzyka w obszarze przewidywanej owulacji (obszarze wierzchołkowym) u kłaczy, u których tworzył się krwotoczny pusty pęcherzyk (HAF), w przeciwieństwie do kłaczy, które przechodziły owulację z różnymi średnicami pęcherzyka [33].

Zmniejszone stężenie progesteronu, poniżej 2 ng/ml podczas 5 kolejnych dni przed przekształceniem się w pusty pęcherzyk oraz 5 dni po przekształceniu się w pusty pęcherzyk, wskazuje na jego rolę w dojrzewaniu i owulacji dominującego pęcherzyka, co wyraźnie zaobserwowano, kiedy poziom P4 wzrastał powyżej 3 ng/ml podczas rozwoju następnego dominującego pęcherzyka. Progesteron może też być produkowany przez luteinizację pustego pęcherzyka po zwiększeniu się średnicy i wypełnieniu się cząstkami echogennymi lub przez następne dominujące lub drugorzędowe komórki ziarniste, aby zapobiec drugiej anowulacji [33, 41]. Zmniejszający się przepływ krwi w AnOV był związany z obniżeniem poziomu leptyny, a korelacja między tymi parametrami była statystycznie istotna. Natomiast w pęcherzyku dojrzałym niedobory zaopatrzenia w substancje żywieniowe, z powodu krótkotrwałego ograniczenia paszy, rekompensowane są przez zwiększenie unaczynienia, poprzez zmniejszenie zarówno ustrojowego, jak i wewnątrzpęcherzykowego stężenia leptyny [28]. Istotnie obniżone ustrojowe stężenie IGF-1, E2 oraz leptyny w momencie, kiedy zmniejszał się obrzęk macicy u kłaczy z zespołem pustego pęcherzyka mogło być powodem anowulacji, ponieważ wewnątrzpęcherzykowy poziom IGF-1 spadał i był związany z wysokim poziomem E2 u kłaczy podczas końcowych stadiów wzrostu pęcherzyków o wielkości powyżej 40 mm oraz tych bliskich owulacji [11]. Istotna dodatnia korelacja IGF-1 ze wszystkimi przypadkami unaczynienia pęcherzyków w USG

typu power i w kolorze niebieskim wskazuje na rolę tego hormonu w regulacji funkcjonowania pęcherzyków i w owulacji. W komórkach ziarnistych dojrzałych pęcherzyków IGF-1, wraz z gonadotropinami, pobudza wydzielanie hormonów i wzrost pęcherzyków, a także zapobiega apoptozie. Podobnie w pęcherzyku dojrzałym przepływ krwi był skorelowany ze stężeniem IGF-1 i E2 w osoczu krwi bawołów [42] oraz klaczy [35]. Obniżony ustrojowy poziom E2 w przypadku AnOV mógł wynikać ze zmniejszonego stężenia steroli aktywujących mejozę (MAS – meiosis activating sterols) w pęcherzykach odgrywających fizjologiczną rolę podczas dojrzewania przedowulacyjnego [10]. Zmniejszenie się powierzchni warstwy ziarnistej i związane z proliferacją obniżone stężenie E2 i P4 oraz anowulacja, mogą być związane z obniżonym stężeniem czynnika wzrostowego śródbłonna naczyniowego (VEGF), który jest niezbędny do normalnej angiogenezy i funkcjonowania pęcherzyków [27].

Na podstawie niniejszych badań można stwierdzić, że tzw. pusty pęcherzyk osiąga większą maksymalną średnicę niż pęcherzyk owulacyjny z dużą powierzchnią jamistą i prawdopodobnie perfuzją naczyniową podczas fazy wzrostu pęcherzykowego, a także mały obszar przepływu krwi w USG w kolorze niebieskim i w technologii power po zaniku oznak rui i obrzęku macicy. Puste pęcherzyki różnią się pod względem perfuzji naczyniowej, co pozwala wybrać pęcherzyki dla potrzeb technik wspomaganego rozrodu.

Podziękowania. Autorzy dziękują kadrze weterynaryjnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych Egiptu za udzielenie zgody na badania dopplerowskie i pobieranie krwi u koni dla celów niniejszych badań oraz Narodowemu Centrum Badawczemu za udostępnienie skanera dopplerowskiego.

PIŚMIENNICTWO

1. ABDELNABY E.A., ABO EL-MAATY A.M., RAGAB R.S.A., SEIDA A.A., 2016 – Assessment of uterine vascular perfusion during the estrous cycle of mares in connection to circulating leptin, and nitric oxide concentrations. *Journal of Equine Veterinary Science* 39, 25-32.
2. ABDELNABY E.A., ABO EL-MAATY A.M., 2017 – Luteal blood flow and growth in correlation to circulating angiogenic hormones after spontaneous ovulation in mares. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 20, 97-109.
3. ABDELNABY E.A., ABO EL-MAATY A.M., 2017 – Dynamics of follicular blood flow, antrum growth, and angiogenic mediators in mares from deviation to ovulation. *Journal of Equine Veterinary Science* 55, 51-59.
4. ABO EL-MAATY A.M., ABDELNABY E.A., 2017 – Follicular blood flow, antrum growth and angiogenic mediators in mares from ovulation to deviation. *Animal Reproduction* 14, 1043-1056.
5. ACOSTA T.J., BEG M.A., GINTHER O.J., 2004 – Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biology of Reproduction* 71, 637-642.
6. ACOSTA T.J., GASTAL E.L., GASTAL M.O., BEG M.A., GINTHER O.J., 2004 – Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. *Biology of Reproduction* 71, 502-507.

7. ACOSTA T.J., HAYASHI K.G., OHTANI M., MIYAMOTO A., 2003 – Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in the cow. *Reproduction* 125, 759-767.
8. BAILEY C.S., HEITZMAN J.M., BUCHANAN C.N., BARE C.A., SPER R.B., BORST L.B., MACPHERSON M., ARCHIBALD K., WHITACRE M., 2012 – B-mode and Doppler ultrasonography in pony mares with experimentally induced ascending placentitis. *Equine Veterinary Journal* 44, Suppl. 43, 88-94.
9. BAILEY C.S., SPER R.B., SCHEWMAKER J.L., BUCHANAN C.N., BEACHLER T.M., POZOR M.A., WHITACRE M.D., 2012 – Uterine artery blood flow remains unchanged in pregnant mares in response to short-term administration of pentoxifylline. *Theriogenology* 77, 430-436.
10. Baltsen M., Bøgh I.B., Byskov A.G., 2001 – Content of meiosis activating sterols in equine follicular fluids: correlation to follicular size and dominance. *Theriogenology* 56, 133-145.
11. BASHIR S.T., ISHAK G.M., GASTAL M.O., ROSER J.F., GASTAL E.L., 2016 – Changes in intrafollicular concentrations of free IGF-1, activin A, inhibin A, VEGF, estradiol, and prolactin before ovulation in mares. *Theriogenology* 85, 1491-1498.
12. BOAKARI Y.L., FERREIRA J.C., CANESIN H.S., THOMPSON D.L. Jr, LIMA F.S., PANTOJA J.C.F., MEIRA C., 2017 – Influence of two ovulation-inducing agents on the pituitary response and follicle blood flow in mares. *Theriogenology* 100, 95-99.
13. BOLLWEIN H., KOLBERG B., STOLLA R., 2004 – The effect of exogenous estradiol benzoate and altrenogest on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 61, 1137-1146.
14. BOLLWEIN H., MAYER R., STOLLA R., 2003 – Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. *Theriogenology* 60, 597-605.
15. BOLLWEIN H., MAYER R., WEBER F., STOLLA R., 2002 – Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 57, 2043-2051.
16. BOLLWEIN H., WEBER F., KOLBERG B., STOLLA R., 2002 – Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 57, 2129-2138.
17. BRITO L.F., BALDRIGHI J.M., WOLF C.A., GINTHER O.J., 2017 – Effect of GnRH and hCG on progesterone concentration and ovarian and luteal blood flow in diestrous mares. *Animal Reproduction Science* 176, 64-69.
18. BROGAN P.T., HENNING H., STOUT T.A., DE RUIJTER-VILLANI M., 2016 – Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. *Animal Reproduction Science* 166, 22-27.
19. CUERVO-ARANGO J., NEWCOMBE J.R., 2012 – Ultrasound characteristics of experimentally induced luteinized unruptured follicles (LUF) and naturally occurring hemorrhagic anovulatory follicles (HAF) in the mare. *Theriogenology* 77 514-524.
20. DONADEU F.X., GINTHER O.J., 2002 – Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin, and estradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction* 124, 875-885.
21. DONADEU F.X., GINTHER O.J., 2004 – Interrelationships of estradiol, inhibin, and gonadotropins during follicle deviation in pony mares. *Theriogenology* 61, 1395-1405.
22. ESTELLER-VICO A., LIU I.K., VAUGHAN B., STEFFEY E.P., BROSANAN R.J., 2015 – Effects of vascular elastosis on uterine blood flow and perfusion in anesthetized mares. *Theriogenology* 83, 988-994.

23. FERREIRA J.C., CANESIN H.S., IGNÁCIO F.S., ROCHA N.S., PINTO C.R., MEIRA C., 2015 – Effect of age and endometrial degenerative changes on uterine blood flow during early gestation in mares. *Theriogenology* 84, 1123-1130.
24. FERREIRA J.C., FILHO L.F.N., BOAKARI Y.L., CANESIN H.S., THOMPSON D.L. JR, LIMA F.S., MEIRA C., 2018 – Hemodynamics of the corpus luteum in mares during experimentally impaired luteogenesis and partial luteolysis. *Theriogenology* 107, 78-84.
25. FERREIRA J.C., GASTAL E.L., GINTHER O.J., 2008 – Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. *Reproduction* 135, 541-550.
26. FERREIRA J.C., IGNÁCIO F.S., ROCHA N.S., THOMPSON D.L. JR, PINTO C.R., MEIRA C., 2015 – Real-time characterization of the uterine blood flow in mares before and after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 160, 90-96.
27. FRASER H.M., DUNCAN W.C., 2009 – Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and endometrium. *Reproduction Fertility and Development* 21, 377-392.
28. GASTAL M.O., GASTAL E.L., BEG M.A., GINTHER O.J., 2010 – Short-term feed restriction decreases the systemic and intrafollicular concentrations of leptin and increases the vascularity of the preovulatory follicle in mares. *Theriogenology* 73, 1202-1209.
29. GHARAGOZLOU F., AKBARINEJAD V., YOUSSEFI R., MASOUDIFARD M., HASANI N., 2014 – Reduced anti-Müllerian hormone (AMH) in mares with hemorrhagic anovulatory follicles. *Iranian Journal Veterinary Research* 15, 336-340.
30. GINTHER O.J., 1990 – Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *Journal Reproduction and Fertility* 90, 311-320.
31. GINTHER O.J., BEG M.A., DONADEU F.X., BERGFELT D.R., 2003 – Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* 78, 239-257.
32. GINTHER O.J., GASTAL E.L., GASTAL M.O., BEG M.A., 2006 – Conversion of a viable preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. *Animal Reproduction* 3, 29-40.
33. GINTHER O.J., GASTAL E.L., GASTAL M.O., BEG M.A., 2007 – Incidence, endocrinology, vascularity, and morphology of hemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 27, 130-139.
34. GINTHER O.J., GASTAL E.L., GASTAL M.O., BERGFELT D.R., BAERWALD A.R., PIERSON R.A., 2004 – Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biology of Reproduction* 71, 1195-1201.
35. GINTHER O.J., GASTAL E.L., GASTAL M.O., SIDDIQUI M.A., BEG M.A., 2007 – Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. *Biology of Reproduction* 77, 202-208.
36. ISHAK G.M., BASHIR S.T., GASTAL M.O., GASTAL E.L., 2017 – Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science* 187, 1-12.
37. JIANG J.Y., MACCHIARELLI G., TSANG B.K., SATO E., 2003 – Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction* 125, 211-223.
38. LEMES K.M., SILVA L.A., ALONSO M.A., CELEGHINI E.C.C., PUGLIESI G., CARVALHO H.F., AFFONSO F.J., SILVA D.F., LEITE T.G., DE ARRUDA R.P., 2017 – Follicular dynamics, ovarian vascularity and luteal development in mares with early or late postpartum ovulation. *Theriogenology* 1, 96, 23-30.

39. OUSEY J.C., KÖLLING M., NEWTON R., WRIGHT M., ALLEN W.R., 2012 – Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Veterinary Journal* 44, Suppl. 41, 15-21.
40. SPSS, 2007 – Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA Copyright©for Windows, version 16.0.
41. TODA T., 1990 – Ultrasonographical study on luteinized unruptured follicle. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 42, 1195-1202.
42. VARUGHESE E.E., BRAR P.S., HONPARKHE M., GHUMAN S.P., 2014 – Correlation of blood flow of the preovulatory follicle to its diameter and endocrine profile in dairy buffalo. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 140-144.
43. WATSON E.D., AL-ZI'ABI M.O., 2002 – Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season *Reproduction* 124, 227-234

Amal M. Abo El-Maaty, Yehia El Baghdady, Khalid A. ElShahat,
Mahmoud A. Helmy, Elshymaa A. Abdelnaby

Treated and untreated anovulation associated with ovarian and uterine blood flow in Arabian mares (a case study)

Summary

To investigate the development of treated and untreated hormonal anovulatory follicles (AnOV) associated with uterine and ovarian vascularization, rectal Doppler ultrasound of seven Arabian mares was performed before and after the development of an AnOV. In addition to measuring the diameter, area and volume of the follicle, daily colour and power Doppler scans were analysed in order to measure red, blue and power blood flow areas in pixels. Serum levels of estradiol (E2), progesterone (P4), leptin, insulin-like growth factor-I (IGF-1) and nitric oxide (NO) were measured as well. The diameter (cm), area (cm²), volume (cm³), area in pixels, antral area in pixels, circumference, and percentage change in circulation of the AnOV progressively increased (P<0.0001) after the disappearance of uterine oedema compared to the values obtained during oedema. The blue, total colour and power areas of the AnOV increased after the disappearance of uterine oedema (P<0.0001). When the antral area was excluded, the percentage of the granulosa layer in the colour and power Doppler decreased after the disappearance of uterine oedema. The ipsilateral uterine horn and uterine body had significantly (P<0.0001) high blue and red blood flow vascularization areas in the presence of uterine oedema. The AnOV was associated with low P4, IGF-1 (P<0.001), and leptin (P<0.05). Treatment of the AnOV follicle with GnRH resulted in its luteinization and induced ovulation 9 and 30 days later. It can be concluded that an abrupt increase in blood flow due to decreased progesterone and E2 and increased IGF-1 causes anovulation. The absence of oestrous behaviour and high uterine-oedema-associated follicular and ipsilateral uterine horn vascularization are predictors of ovulation failure.

KEY WORDS: anovulation / colour Doppler / power Doppler / uterine blood flow / hormones / mare