

KATEDRA ROZRODU Z KLINIKĄ ZWIERZĄT GOSPODARSKICH
WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ
UNIwersYTET PRZYRODnicZY WE WROCLAWIU

Lek. wet. Natalia Krasowska

**Możliwości wykorzystania wybranych technik
ultrasonograficznych do monitorowania cyklu
jajnikowego suk**

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Wojciech Nizański

Wrocław, 2023

10 STRESZCZENIE

W związku z rozwojem hodowli psów nakierowanej w dużej mierze na pożądane cechy fenotypowe w wielu liniach/rasach zaobserwować można obecnie wyraźne obniżenie potencjału reprodukcyjnego. Proces ten dotyczy zarówno samic jak i samców, manifestując się między innymi w postaci spadku jakości nasienia, zaburzeń cyklu jajnikowego, pustych kryć oraz poronień. Dodatkowo, narażenie zwierząt na niekorzystnie oddziałujące środowisko życia (zanieczyszczenia wód, gleb, powietrza, dodatki do żywności, konserwanty itp.) wiąże się z coraz częstszym występowaniem schorzeń cywilizacyjnych odbijających się niekorzystnie na płodności. Przez lata, silna ingerencja ludzi w rozród psów, mająca na celu uzyskiwanie licznych miotów u ras cieszących się popularnością odbiła się niekorzystnym piętnem na ich cechach genetycznych. Dodatkowo, wśród ras mniej rozpowszechnionych, opiekunowie zwierząt często spotykają się z trudnościami w uzyskaniu miotów ze względu na bardzo ograniczoną liczbę reproduktorów. Wraz z rozwojem globalizacji, rośnie także zjawisko przemieszczania zwierząt bądź nasienia na duże odległości. Fakty te narzucają konieczność ciągłego doskonalenia procedur wykorzystywanych w celu wspomaganie rozrodu psów. Ze względu na stale rosnącą konieczność wprowadzania do codziennej praktyki lekarsko-weterynaryjnej technik wspomaganego rozrodu (m.in. inseminacji dopochwowej i domacicznej) oraz coraz częstsze wykorzystanie do zapłodnienia nasienia chłodzonego bądź mrożonego niezbędne jest doskonalenie metod wyznaczania optymalnego terminu krycia. Warunkiem powodzenia zapłodnienia jest konieczność precyzyjnej detekcji momentu owulacji. W tym celu obecnie w praktyce lekarsko-weterynaryjnej najczęściej zastosowanie znajdują badanie cytologiczne nabłonka pochwy oraz oznaczenie poziomu progesteronu w surowicy.

U suk w cyklu płciowym wyróżnia się 4 fazy: *prooestrus*, *oestrus*, *diestrus* i *anoestrus*. W fazie *prooestrus* organizm znajduje się pod dominującym wpływem estrogenów, podczas gdy w rui i fazie *diestrus* przeważa aktywność progesteronu. W związku z działaniem wspomnianych hormonów zachodzi szereg zmian, szczególnie w obrębie układu rozrodczego. Do niedawna możliwości diagnostyczne układu rozrodczego u suk były znacznie ograniczone ze względu na gatunkowe cechy anatomiczne oraz ograniczenia sprzętowe. Wraz z rozwojem technologii możliwe stało się wykorzystanie różnorodnych technik obrazowania ultrasonograficznego w celu badania zmian fizjologicznych zachodzących pod wpływem hormonów płciowych.

Celem prowadzonych badań była:

1. Ocena echostruktury oraz wymiarów poszczególnych elementów układu rozrodczego suk w okresie okołowulacyjnym przy zastosowaniu ultrasonografii w prezentacji B;
2. Analiza zmian przepływu krwi w tętnicach macicznych i jajnikowych w wybranych punktach czasowych w cyklu jajnikowym przy użyciu technik dopplerowskich;
3. Oszacowanie zmian sprężystości tkanek jajnika i macicy suk przy zastosowaniu obrazowania elastograficznego w *proestrus* i *oestrus*;
4. Pomiar średnicy pęcherzyków jajnikowych przy zastosowaniu mikropęcherzykowych środków kontrastujących;
5. Określenie przydatności wykorzystania określonych parametrów ultrasonograficznych w monitorowaniu cyklu jajnikowego i wyznaczaniu momentu owulacji u suk.

W badaniu wyodrębniono dwie grupy zwierząt. Grupę 1 stanowiły psy zakwalifikowane do badania ultrasonograficznego w trybie B, Color Doppler, Doppler Fali Pulsacyjnej oraz badania elastograficznego, będące pacjentami przyjmowanymi w ramach działalności usługowej Ambulatorium Katedry Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich. Procedury były przeprowadzane u osobników, u których standardowo wykonywane są badania (pomiar stężenia progesteronu, badanie cytologiczne nabłonka pochwy) w ramach wyznaczania optymalnego terminu krycia w celach reprodukcyjnych (n=52). Grupę 2 stanowiły suki rasy Beagle z panelu doświadczalnego. U tych zwierząt przeprowadzono dodatkowo drugi etap badania, czyli badanie ultrasonograficzne z wykorzystaniem mikropęcherzykowych środków kontrastujących (n=5).

Do badania zakwalifikowano zwierzęta zdrowe, w optymalnym wieku rozrodczym (2-6 lat), bez stwierdzonych zaburzeń w funkcjonowaniu układu rozrodczego. Badanie poziomu progesteronu, cytologia nabłonka pochwy oraz ocena ultrasonograficzna były powtarzane co 48 godzin od zaobserwowania objawów *proestrus* do +5 dnia po wyrzucie LH. Dzień 0 cyklu jajnikowego (dzień wyrzutu LH) wyznaczano na podstawie oznaczenia poziomu progesteronu w surowicy. W końcowym etapie pozyskane dane zostały poddane analizie statystycznej.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wysnuto wniosek, że obrazowanie w trybie B, w połączeniu z obrazowaniem wykorzystującym techniki dopplerowskie, pozwala na identyfikację zjawisk zachodzących w obrębie układu rozrodczego ze szczególnym uwzględnieniem okresu okołowulacyjnego. Jednak do precyzyjnej oceny konieczne jest wykorzystanie informacji pozyskanych podczas przeprowadzanego, w regularnych odstępach czasu wywiadu, analizy objawów klinicznych, przeprowadzonego badania fizykalnego wraz z badaniem ginekologicznym, cytologii pochwy oraz testów hormonalnych.

W okresie przedrujowym, możliwa do zaobserwowania w badaniu Color Doppler, perfuzja w obrębie naczyń wewnątrz jajnika stopniowo wzrasta. Badanie z zastosowaniem Color Doppler może pełnić bardzo ważną rolę jako metoda wykrywania piku LH.

Badanie elastograficzne macicy przy pomocy elastografii statycznej nie ma zastosowania w celu wyznaczania optymalnego terminu krycia. Natomiast, analogiczne badanie wykazało istotną zmianę sprężystości tkanki jajnikowej wraz z postępem *proestrus* i *oestrus*. W badaniu własnym wykazano istotne statystycznie różnice dla pomiarów prowadzonych dla sztywności jajnika lewego w stosunku do okolicznych mięśni jamy brzusznej. W analizie wykazano wyraźny spadek badanych wartości w kolejnych dniach badania. Problem wymaga dalszego badania z wykorzystaniem elastografii dynamicznej.

Podczas badania z wykorzystaniem mikropęcherzykowych środków kontrastujących wykazano, że w przypadku pomiarów pęcherzyków jajnikowych pozwala ono na przeprowadzenie precyzyjnych pomiarów struktur w obrębie jajników, a średni wymiar pęcherzyków określany tą metodą jest większy niż w przypadku zastosowania trybu B. Wyniki prowadzonych badań wskazują na jednakową przydatność ultrasonografii wzmacnianej kontrastem oraz ultrasonografii w trybie B w monitorowaniu wzrostu pęcherzyków jajnikowych, można jednak wnioskować o większej przydatności CEUS w ocenie rozwoju zjawiska luteinizacji.

Ze względu na bardzo szerokie wykorzystanie diagnostyki ultrasonograficznej we współczesnej medycynie konieczne jest ciągle poszerzanie badań w tym zakresie. Mnogość pozyskiwanych informacji przy jednoczesnej znikomej inwazyjności badania potwierdza wyjątkowe znaczenie tej techniki diagnostycznej w codziennej praktyce klinicznej, a także pracy naukowej.

10.1 ABSTRACT

Due to the development of dog breeding aimed largely at desirable phenotypic traits, a marked depression of reproductive potential can now be observed in many lines/breeds. This process affects both females and males, manifesting itself, among other things, in the form of a decrease in semen quality, ovarian cycle disorders, unsuccessful mating and stillbirths. In addition, the exposure of animals to the ever-increasing impact of the unfavorable human living environment (pollution of water, soil, air, food additives, preservatives, etc.) is associated with an increasing incidence of civilization-related diseases that adversely affect fertility. Over the years, strong human interference in dog reproduction to obtain numerous litters in popular breeds has taken an adverse toll on genetic traits. In addition, among less common breeds, breeders often face difficulties in obtaining litters due to very limited number of male dogs. With the development of globalization, there is also a growing phenomenon of moving animals or semen over long distances. These facts impose the need for continuous improvement in the procedures used as assisted reproductive technology in dog reproduction. Due to the ever-increasing necessity of introducing assisted reproductive technologies (including vaginal and intrauterine insemination) into everyday veterinary practice, as well as the increasing use of refrigerated or frozen semen for insemination, it is necessary to improve methods of determining the optimal mating time. A condition for successful insemination is the need for precise detection of the moment of ovulation. For this purpose, the cytological examination of the vaginal smear and the determination of serum progesterone levels are most commonly used in veterinary practice today.

In bitches, 4 phases are distinguished in the reproductive cycle: proestrus, oestrus, diestrus and anoestrus. During proestrus phase, the body is under the dominant influence of estrogen, while in the oestrus and diestrus phases, progesterone activity prevails. Due to the action of the mentioned hormones, several changes take place, especially within the reproductive system. Until recently, the diagnostic capabilities of the reproductive system in bitches were significantly limited due to species-specific anatomical features and equipment limitations. With the development of technology, it has become possible to use a variety of ultrasound imaging techniques to study physiological changes occurring under the influence of reproductive hormones.

The purpose of the ongoing research was:

1. to evaluate the echostructure and dimensions of the various elements of the reproductive system of bitches during the perovulatory period using ultrasonography in B-Mode
2. to analyze changes in blood flow in the uterine and ovarian arteries at selected time points in the ovarian cycle using Doppler techniques
3. the estimation of changes in elasticity of ovarian and uterine tissues of bitches using elastographic imaging in proestrus and oestrus
4. measurement of ovarian follicle diameter using microbubble contrast agents
5. to determine the usefulness of the use of specific ultrasound parameters in monitoring the ovarian cycle and determining the timing of ovulation in bitches.

In the study animals were divided in two groups. Group 1 (patients of the Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals) were dogs qualified for B-mode ultrasound, Color Doppler, Pulse Wave Doppler, and elastography examination. The procedures were carried out on individuals with standard tests (measurement of serum progesterone concentration, cytological examination of vaginal smear) as part of determining the optimal mating time for reproductive purposes (n=52). Group 2 were Beagle bitches from the experimental panel. In this case second stage of the study was additionally carried out i.e. ultrasound examination using microbubble contrast agents (n=5).

Healthy animals of optimal reproductive age (2-6 years old), with no known reproductive disorders, were qualified for the study. Serum progesterone concentration testing, vaginal epithelial cytology and ultrasound examination were repeated every 48 hours from the observation of proestrus symptoms until +5 days after the LH peak. Day 0 of the ovarian cycle (the day of the LH peak) was determined from the determination of serum progesterone levels. At the final stage, the obtained data was subjected to statistical analysis.

Based on the results of the study, it was concluded that B-mode imaging, combined with imaging using Doppler techniques, allows the identification of phenomena occurring within the reproductive system of the perovulatory period. However, for an accurate assessment, it is necessary to use the information obtained during an anamnesis taken at regular intervals, analysis of clinical symptoms, a physical examination performed along with a gynecological examination, vaginal cytology and hormonal tests.

During the pre-ovarian period, the perfusion within the vessels inside the ovary, observed in the Color Doppler examination, gradually increases. Color Doppler ultrasound examination can play a very important role as a method of detecting an LH peak.

Elastographic examination of the uterus using static elastography is not applicable for determining the optimal mating time. In contrast, an analogous study showed a significant change in the elasticity of the ovarian tissue with the progression of proestrus and oestrus. Our study showed statistically significant differences for measurements conducted for the stiffness of the left ovary in relation to the surrounding abdominal muscles. The analysis showed a marked decrease in the tested values on subsequent days of the study. The problem requires further investigation using dynamic elastography.

During the examination with the use of microbubble contrast agents, it was shown that in the case of measurements of ovarian follicles, it allows precise measurements of structures within the ovaries, and the mean dimension of follicles determined by this method is greater than when using the B-mode. The results of the current study indicate that contrast-enhanced ultrasonography and B-mode ultrasonography are equally useful in monitoring the growth of ovarian follicles, but it can be concluded that CEUS is more useful in assessing the development of luteinization.

Due to the very wide use of ultrasound diagnostics in current medicine, it is necessary to constantly expand research in this area. The abundance of information obtained with the insignificant invasiveness of the examination confirms the exceptional importance of this diagnostic technique in everyday clinical practice, as well as scientific studies.