

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КИРИЧЕНКО ВЕРОНІКА ВІКТОРІВНА

УДК 636.7:612.017:591.147

ДИСЕРТАЦІЯ

**ІМУННИЙ СТАТУС ЗА РІЗНОГО РІВНЯ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ У
ОРГАНІЗМІ СОБАК**

21 Ветеринарія

211 Ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ В.В.Кириченко

Науковий керівник: Брошков Михайло Михайлович, доктор ветеринарних наук,
професор.

Одеса – 2024

АНОТАЦІЯ

Кириченко В.В. Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». – Одеський державний аграрний університет МОН України, Одеса, 2024.

Експерименти кваліфікаційної праці проведено з 2020 до 2024 рр. на кафедрі фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету. В досліді були залучені породисті та помісні собак у яких відбирали кров в різні фази статевого циклу та в анестральний період для визначення показників функціонального стану ендокринної та імунної системи. Також для дослідження особливостей поширення дисфункцій статевого циклу у собак за різних зовнішніх та внутрішніх чинників був проведений аналіз статистичних даних клінічного обстеження собак у ветеринарних клініках м. Одеси. Імуногістохімічні та морфологічні показники тканини матки досліджувались після оваріогістероектомії з використанням моноклональних антитіл до основних CD рецепторів місцевого імунітету та прогестерону. Проведені дослідження надали можливість отримати нові наукові дані щодо впливу віку, розміру, умов утримання та сезону року на поширення дисфункцій репродуктивних органів у сук. Встановлена залежність відсотку поширення дисфункцій залежно від віку. Так, у сук до 2-х років лише в 12,2 % випадків серед інших дисфункцій встановлювали неплідність, проти 39,0% – в зрілому віці та 48,8% – в старшому (після 6 років) віці. Також найменший відсоток встановлений і серед сук віком до 2-х років, у яких виявлена піометра (19,3%) та кістозні утворення в яєчниках та матці (13,2%). При цьому слід зазначити, що серед сук до 2-х років частіше, ніж в дорослому віці (від 2-х то 6 років), встановлювали дисфункції, пов'язані с ациклією або поліциклією, кількість таких тварин становила 34,1%. Серед сук великих розмірів частіше всього (46,2%) діагностується кістозне переродження матки та яєчників, проте

неплідність та ациклічні і поліциклічні статеві цикли у цієї групи тварин є найменшими. У сук маленьких розмірів в 61,5% серед інших груп тварин встановлено випадки піометри, проте як у собак середніх розмірів – лише 13,5%, що в 4,6 разів менше. Також прояв ациклії та поліциклії в 50% випадків був встановлений у сук дрібних порід, в той час як у сук великих порід цей відсоток становив лише 15,9%. Прояв піометри також частіше реєструється у сук в умовах квартири (65,1%) порівнянно з утриманням в приватних будинках (34,9%). У 2,5 рази випадки ациклії та поліциклії та в 3,0 рази кістозного переродження матки і яєчників частіше спостерігаються у сук за квартирною утримання. В середньому за квартирною способу утримання у сук прояв дисфункцій становить 68,3%, а за утримання в умовах приватного будинку – 31,7%. У літній період у сук в 37,4% діагностуються кісти на яєчниках та в матці, що супроводжується ациклічними та поліциклічними статевими циклами на рівні 29,5%. В літній період року лише у 17,1% тварин встановлено неплідність, проте ця кількість була вищою на 36,6% у зимовий період. За осінній період найбільше вираженим був прояв ациклічних та поліциклічних статевих циклів – 33,0%, що є найбільшим показником порівняно з іншими сезонами року.

Результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів (ФАН), абсолютної кількості лейкоцитів (АКЛ), нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів протягом статевого циклу показали, що здатність нейтрофілів до фагоцитозу на 5-ту добу-естрального циклу збільшилася на 13% ($p < 0,05$) порівняно з першим днем. Протягом статевого циклу динаміка абсолютної кількості лейкоцитів відзначилася тенденцією до зниження на 21%. Проте популяції різних клітин мали неоднакову закономірність. Так, на фоні загальної тенденції зниження АКЛ, на 5 добу вміст нейтрофілів мав тенденцію до збільшення, а лімфоцитів – до зменшення. Також в незначній мірі встановлено зменшення популяції моноцитів. На 10-ту добу еструсу, тенденцією до зниження відзначилися всі популяції досліджуваних клітин, а на 15-ту добу кількість лімфоцитів збільшується на 13%, за тенденції до нижчого рівня нейтрофілів. На відміну від

T- та В лімфоцитів, природні клітини-кілери, які відображають вроджений клітинний імунітет, позначилися тенденцією до зниження протягом фолікулярної фази статевого циклу (перші 10 діб).

Дослідженнями клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу, залежно від віку та сезону року встановлено, що фагоцитарна активність нейтрофілів протягом циклу в молодих собак мала тенденцію до зниження, з $3,38 \pm 0,84$ Г/л на 1-у добу циклу до $2,11 \pm 0,56$ Г/л на 20-ту добу. У тварин віком від 2-х до 6-ти років з 1-ої по 5-ту добу цей показник мав тенденцію до збільшення, а при подальшому аналізі – знижувався. У крові сук від 2-х до 6-ти років життя з 10-ї до 15-ї доби статевого циклу встановлена тенденція до збільшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів, в подальшому (до 25-ї доби) – спостерігали тенденцію до зменшення. Більше виражені зміни кількості лімфоцитів на 25-ту добу стосувалися, Т-хелперних клітин та НК-лімфоцитів. Достовірна різниця між групами на 25-ту добу становила 27% ($p < 0,001$) для Т-хелперів та 29% ($p < 0,001$) – для НК-лімфоцитів.

Отримані нові дані щодо клітинної ланки імунітету у сук за різного стану репродуктивної системи. Так, порівнюючи абсолютну кількість лейкоцитів встановлено, що в анеструсі цей показник становив $5,86 \pm 0,89$ Г/л порівняно з $5,43 \pm 1,53$ Г/л в період статевої охоти та $5,68 \pm 0,08$ Г/л – за піометри. Показник АКЛ був достовірно ($p < 0,05$) меншим в групі сук з піометрою і становив $1,48 \pm 0,35$ Г/л, що на $0,92$ Г/л менше порівняно з групою тварин в анестральний період. Аналіз динаміки вмісту прогестерону протягом статевого циклу у сук показав, що на 1-у добу циклу в середньому концентрація відповідного показника становила $2,13 \pm 0,11$ нмоль/л, що є характерним для анеструсу. Протягом наступних 5-ти діб відмічене незначне збільшення вмісту прогестерону – до $3,27 \pm 0,69$ нмоль/л. На 10-у добу еструсу вміст прогестерону достовірно збільшився ($P \leq 0,05$) до $6,48 \pm 0,54$ нмоль/л. Варто відзначити, що така концентрація характерна для початкової стадії лютеїнової фази статевого циклу. Дослідження концентрації прогестерону в сироватці крові на п'ятнадцяту добу

статевого циклу відзначилася його значним (в 16 разів) достовірним ($P \leq 0,05$) збільшенням в порівнянні з 10-ою добою. Тенденція до збільшення концентрації зберіглася і в наступні 5 діб спостереження, і вже на 20-ту добу відповідний показник становив $299,3 \pm 10,87$ нмоль/л ($P \leq 0,05$). Після 20-ї доби статевого циклу відмічено зниження концентрації в сироватці крові прогестерону, а на 25-ту добу зменшення відбулося до $202,80 \pm 0,76$ нмоль/л.

У результаті проведених досліджень запропоновано спосіб прогнозування розвитку дисфункцій репродуктивних органів у сук залежно від ступеня стресованості організму, який включає визначення відсотку інверсії Т-«активних» лімфоцитів під час навантаження (*in vitro*) нейромедіатором адреналіном. Для зниження ризику виникнення запальних процесів у матці після статевого циклу обов'язковим є визначення показників клітинної ланки імунітету і фагоцитарної активності нейтрофілів.

Ключові слова: статевий цикл, собаки, прогестерон, естрадіол, кортизол, лімфоцити, CD 4, CD 8, фагоцитарна активність нейтрофілів, кров, імунна система.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА:

Основні наукові результати дисертації:

- *Статті у наукових фахових виданнях України:*

1. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка статевих стероїдних гормонів, кортизолу та трийодтиронину у собак за естрального циклу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 104, 18-25. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.104.03> (особистий внесок - аспірантка самостійно провела аналіз літературних джерел з напрямку досліджень, представлених в науковій статті, відібрала проби крові та самостійно визначила вміст гормонів в сироватці крові)

2. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка відносних показників імунограми у сук за еструсу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 105, 5-12. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.105.01> (особистий внесок – здобувачка провела пробовідбір зразків крові та визначила відносний вміст лімфоцитів та їх імунорегуляторних субпопуляцій, а також провела аналіз наукової літератури з зазначеного напрямку)

3. Брошков, М.М., & Кириченко, В.В. (2023). Стан клітинної ланки імунітету та вміст стероїдних гормонів у сук за різного стану репродуктивної системи. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*, 25(112), 175-180. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11228>. (особистий внесок – аспірантка провела порівняльний аналіз отриманих даних з іншими літературними джерелами, відпрацювала методику визначення вмісту гормонів в сироватці крові та сформувала мету досліджень)

4. Кириченко, В.В. (2023). Поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від віку, розміру, умов утримання та сезону року. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 109, 110-116. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2023.109.17> (особистий внесок – аспірантка самостійно проаналізувала амбулаторні журнали ветеринарних клінік та систематизувала отримані дані залежно від віку, умов утримання, розміру та періоду року, а також побудувала графіки та сформувала висновки)

- *Статті у наукових виданнях інших держав:*

5. Broshkov, M.M., & Kyrychenko, V.V. (2023). Dynamics of progesterone, estradiol, cortisol, triiodothyronine and indicators of adaptive immunity concentrations in female dogs during estrus. *Journal of Biometry Studies*, Vol. 3(1), 2-11.

<https://doi.org/10.29329/JofBS.2023.501.03> (особистий внесок – провела аналіз наукових джерел з даного напрямку за останні п'ять років та порівняння їх з отриманими даними в результаті власних досліджень, сформовано самостійно мету досліджень та висновки)

- *Монографії:*

6. Broshkov, M., Fedkalova, T., Kyrychenko, V. & Kot V. (2022). *Methods for regulation of immune reactivity in dogs*. OSAU (особистий внесок – приймала участь у дослідженнях пов'язаних з визначенням вмісту статевих стероїдів в організмі сук та показників клітинної ланки імунітету, проаналізувала літературні джерела з вказаного напрямку)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

- *Тези наукових доповідей на конференціях та конгресах:*

7. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 12-13 жовтня). Динаміка статевих стероїдних гормонів та кортизолу у собак за естрального циклу. *Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присв. 35-річчю заснування факультету вет. медицини (с.68-70)*. Поліський національний університет. <https://polissiauniver.edu.ua/wp-content/uploads/2022/11/Збірник-праць-до-35-річчя-факультету-ветеринарної-медицини.pdf> (особистий внесок – самостійно провела лабораторні дослідження сироватки крові на вміст гормонів, написала тези та відповідно сформувала висновки)

8. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 8-12 грудня). Динаміка показників імунограм у сук за еструсу. *Актуальні аспекти розвитку науки і освіти: зб. тез доп. II міжнар. наук.-практ. конф. НПП та молодих науковців. (с.73-76)*. Одеський державний аграрний університет. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2023/01/Zbirnuk_II_Mignarodnoi_nauk-prakt_konferencii_8-9.12.pdf (особистий внесок – самостійно провела відбір проб та лабораторні дослідження плазми крові, проаналізувала динаміку показників клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу)

9. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2023, 31 січня). Концентрація прогестерону, естрадіолу, кортизолу, трийодтироніну та показників клітинної ланки адаптивного імунітету у сук за піометри. *Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Євразії: зб.наук.праць. III міжнар. наук.-практ.інтернет-конф. (с. 14-16)*. Університет Григорія Сковороди в Переяславі.

<http://conferences.neasmo.org.ua/uk/art/7189> (особистий внесок – провела діагностування дисфункції у сук, відібрала проби крові та приймала участь у оперативному втручанні під час оваріогістероектомії, також були сформовані самостійно мета та результати досліджень)

10. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 9-11 листопада). Динаміка показників клітинної ланки імунітету та прогестерону у сук за естрального циклу. *Молодіжна наука заради миру та розвитку*: зб. Мат. I Міжнар. Наук.-пр. конф. (с. 44-47). Чернівецький національний університет. ім. Ю. Федьковича. https://drive.google.com/drive/folders/1pkUUKn_HQeBSnkueerSCvn6MdEDFw3Bo (особистий внесок – самостійно провела лабораторні дослідження сироватки та плазми крові, проаналізувала динаміку серологічних та імунологічних показників протягом статевого циклу).

11. Кириченко, В.В., Брошков, М.М., & Найда, В.В. (2023, 14-15 вересня). Динаміка імунофізіологічних показників у сук протягом естрального циклу залежно від віку. *Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах Євроінтеграції*: зб. Мат. Міжнар. Наук.-пр. конф. наук.-пед.працівників та молод.науковців. (с. 86-88). Одеський державний аграрний університет. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/01/Progr_Mizhnarodnoyi-konf-FVM_85-2023.pdf (особистий внесок – самостійно провела відбір проб крові у сук протягом статевого циклу, визначила показники клітинної ланки імунітету з врахуванням віку. Провела аналіз літературних джерел з вказаного напрямку та сформулювала висновки).

12. Кириченко, В.В., Брошков, М.М., & Найда, В.В. (2023, 9-10 листопада). Динаміка імунофізіологічних показників у сук протягом естрального циклу залежно від сезону року. *Актуальні аспекти розвитку освіти і науки*: зб. Мат. III Міжнар. Наук.-пр. конф. наук.-пед.працівників та молод.науковців. (с. 60-61). Одеський державний аграрний університет. https://drive.google.com/file/d/1ViB68uhzkYjDm2B2IYiOsyqs_gAhmOwg/view (особистий внесок – самостійно провела відбір проб крові у сук протягом статевого циклу, визначила показники клітинної ланки імунітету з врахуванням сезону року та систематизувала отримані дані в таблиці. Провела аналіз літературних джерел з вказаного напрямку та сформулювала висновки).

ABSTRACT

Kyrychenko V.V. Immune status at different levels of sex hormones in dogs' organism. – Qualification scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the PhD degree in the subject area 211 “Veterinary medicine”.
– Odesa State Agrarian University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Odesa, 2024.

Qualification work experiments were conducted from 2020 to 2024 at the department of physiology, pathophysiology and biochemistry of Odesa State Agrarian University. Purebred and domestic dogs were involved in the experiments. Blood of these dogs was collected in different phases of the sexual cycle and in the anestrus period. It was made to determine indicators of the functional state of the endocrine and immune systems. Also, statistical data analysis of clinical examination of dogs in veterinary clinics of Odesa was carried out to study the peculiarities of the distribution of sexual cycle dysfunctions in dogs due to various external and internal factors. Immunohistochemical and morphological indicators of uterine tissue were studied after ovariectomy using monoclonal antibodies to the main CD receptors of local immunity and progesterone.

The conducted researches provided an opportunity to obtain new scientific data on the influence of age, size, housing conditions and season of the year on the prevalence of dysfunctions of reproductive organs in bitches. The dependence of the distribution of dysfunctions depending on age has been established. Thus, among bitches up to 2 years of age, infertility was established in only 12.2% of cases among other dysfunctions, this indicator was 39.0% in adulthood and 48.8% in older (after 6 years old) age. Also, the lowest percentage was established among bitches under 2 years of age with pyometra (19.3%) and cystic formations in the ovaries and uterus (13.2%). At the same time, it should be noted that dysfunctions associated with acyclicity or polycyclicity were diagnosed more often among bitches under 2 years of age than in adults (from 2 to 6 years). The percentage of such animals was 34.1%. Among large-sized bitches, cystic degeneration of the uterus and ovaries is most often diagnosed (46.2%). However, infertility and acyclic and polycyclic sexual cycles are the least common in this group of animals. Pyometra cases were found in 61.5% of small bitches, but only 13.5% in medium-sized dogs, which is 4.6 times less. Also, the manifestation of acyclicity and polycyclicity in 50% of cases was established in bitches of

small breeds, while in bitches of large breeds this percentage was only 15.9%. Manifestation of pyometra is also more often registered in bitches in apartment conditions (65.1%) compared to keeping in private houses (34.9%). Cases of acycilia and polycycilia and cystic degeneration of the uterus and ovaries are 2.5 and 3.0 times respectfully more frequent in bitches kept in apartments. On average, the manifestation of dysfunctions is 68.3% in apartment housing and 31.7% - in private housing. In summer, 37.4% of bitches were diagnosed with ovarian and uterine cysts, and 29.5% had acyclic and polycyclic sexual cycles. In the summer period of the year, only 17.1% of animals were found to be sterile, but 36.6% - in the winter period. For the autumn period, the manifestation of acyclic and polycyclic sexual cycles was the most pronounced, in this period the relative number of such animals was 33.0%, which is the largest indicator compared to other seasons of the year.

The results of the phagocytic activity of neutrophils (FAN), the absolute leukocyte count (ALC), neutrophils, lymphocytes and monocytes study during the sexual cycle showed that the ability of neutrophils to phagocytosis changed during the estrous cycle by 13% ($p < 0.05$) on the 5th day, compared to the first day. During sexual cycle, the dynamics of the ALC tended to decrease on 21%. However, the populations of different cells had different regularities. Thus, on the background of the general trend of ALC decreasing, on the 5th day the content of neutrophils tended to increase, and lymphocytes - to decrease. A slight decrease in the monocyte population was also found. On the 10th day of estrus, all the populations of the studied cells had a tendency to decrease, and on the 15th day, the number of lymphocytes increased by 13%, and the tendency of the decrease in neutrophils remained. Unlike T and B lymphocytes, natural killer cells, which reflect innate cellular immunity, tended to decrease in dynamics during the follicular phases of the sexual cycle (first 10 days).

Studies of the cellular link of immunity in bitches during the sexual cycle, depending on age and season of the year, proved that the phagocytic activity of neutrophils during the cycle in young dogs had a tendency to decrease, from 3.38 ± 0.84 G/l on the 1st day of the cycle – to 2.11 ± 0.56 G/l on the 20th day. In animals aged from 2 to 6 years, from the 1st to the 5th day, this indicator had a tendency to increase, and during further analysis, it decreased. In bitches' blood from 2 to 6 years old, from the 10th to the 15th day of the sexual cycle, a tendency to increase the absolute number of T-lymphocytes was observed. Later (up to the 25th day), there was a tendency to

decrease. More pronounced changes in the number of lymphocytes on the 25th day were related to T-helper cells and NK lymphocytes. Reliable difference between groups on the 25th day was 27% ($p < 0.001$) for T-helpers and 29% ($p < 0.001$) –for NK lymphocytes.

New data were obtained regarding the cellular link of immunity in bitches with different states of the reproductive system. Thus, comparing the absolute number of leukocytes, it was established that in anestrus this indicator was 5.86 ± 0.89 G/l in comparison with 5.43 ± 1.53 G/l in the period of sexual desire and 5.68 ± 0.08 G/l – in conditions of pyometra. The indicator of the absolute number of lymphocytes was reliably ($p < 0.05$) lower in the group of bitches with pyometra and was 1.48 ± 0.35 G/l, which is 0.92 G/l less compared to the group of animals in the anestrus period. Analysis of the dynamics of progesterone content during the sexual cycle in bitches showed that on the 1st day of the cycle, its concentration was on average 2.13 ± 0.11 nmol/L, which is characteristic of anestrus. During the next five days, a slight increase in progesterone content was noted (up to 3.27 ± 0.69 nmol/L). On the 10th day of estrus, the hormone content increased reliably ($P \leq 0.05$) up to 6.48 ± 0.54 nmol/L. This concentration is typical for the initial stage of the luteal phase of estrus. Determination of progesterone concentration in blood serum on the 15th day of estrus showed a significant (16-fold) reliable ($P \leq 0.05$) increase compared to the 10th day. The tendency to increase the concentration was saved in the next five days of observation and already on the 20th day this indicator was 299.3 ± 10.87 nmol/L ($P \leq 0.05$). After the 20th day of estrus, we note a decrease in progesterone serum concentration, and already on the 25th, it decreased to 202.8 ± 0.76 nmol/L.

A method of predicting the development of dysfunctions of reproductive organs in bitches depending on the degree of body stress is proposed. It includes determining the percentage of inversion of T-"active" lymphocytes during addition (in vitro) of adrenaline. To reduce the risk of inflammatory processes in the uterus after the sexual cycle, it is necessary to determine the indicators of the cellular link of immunity and the phagocytic activity of neutrophils.

Key words: sexual cycle, dogs, progesterone, estradiol, cortisol, lymphocytes, CD 4, CD 8, phagocytic activity of neutrophils, blood, immune system.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ЗМІСТ	12
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Ендокринний контроль статевого циклу у сук	24
1.2. Імунофізіологічний статус клітинної ланки імунітету сук за статевого циклу	34
1.3. Моніторинг дисфункцій статевого циклу у сук та методи їх корекції	41
Висновки до розділу 1	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	50
2.1. Вибір напрямів досліджень, загальні етапи та методи досліджень	50
2.2. Методи застосованих досліджень	57
2.2.1. Клінічні методи дослідження	57
2.2.2. Методи дослідження показників імунограми	57
2.2.3. Методика обчислення відсотку інверсії «активних» Т-лімфоцитів при встановленні індивідуальної адренергічної реактивності	60
2.2.4. Метод визначення фагоцитарної активності нейтрофілів	60
2.2.5. Метод визначення абсолютної кількості природних кілерних клітин	61
2.2.6. Імуноферментне дослідження концентрації гормонів в сироватці крові	61
2.2.7. Гематологічні методи дослідження	62
2.2.8. Гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні методи досліджень	63
2.3. Методи статистичної обробки даних	65
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	67
3.1. Поширення дисфункцій репродуктивної системи у собак залежно від віку, розміру, способу утримання та сезону року	67

3.2. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу	72
3.2.1. Результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів, абсолютної кількості лейкоцитів, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів протягом статевого циклу	72
3.2.2. Результати дослідження динаміки Т-лімфоцитів їх імунорегуляторних субпопуляцій, В-лімфоцитів, природних кілерних лімфоцитів та імунорегуляторного індексу протягом статевого циклу	74
3.3. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від віку та сезону року	79
3.3.1. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від віку	79
3.3.2. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від сезонів року	83
3.4. Дослідження динаміки гормональних показників у сук протягом статевого циклу	88
3.4.1. Дослідження вмісту прогестерону та естрадіолу в сироватці крові сук протягом статевого циклу та залежно від віку і сезону року	88
3.4.2. Дослідження вмісту кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові сук протягом статевого циклу	90
3.4.3. Дослідження вмісту прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові сук протягом статевого циклу, залежно від сезону року	92
3.4.4. Дослідження вмісту прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові сук протягом статевого циклу, залежно від віку	96
3.5. Гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження стінки матки за різного стану репродуктивної системи	99
3.5.1. Результати морфометричних та гістологічних досліджень стінки матки залежно від стану репродуктивної системи	100

3.5.2. Результати імуногістохімічних досліджень стінки матки залежно від стану репродуктивної системи	106
3.6. Дослідження показників клітинної ланки імунітету організму сук залежно від адренергічної імунореактивності та функціонального стану репродуктивної системи	116
3.6.1. Дослідження показників клітинної ланки імунітету організму сук залежно від адренергічної імунореактивності	116
3.6.2. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук за різного стану репродуктивної системи	119
Висновки до розділу 3	122
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	123
Висновки до розділу 4	134
ВИСНОВКИ	135
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139
ДОДАТКИ	181

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АКЛ – абсолютна кількість лейкоцитів
АМГ – антимюллерів гормон
АФК – активна форма кисню
ГГНС – гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система
ГК – глюкокортикоїд
ДК – дендритна клітина
Е2 – естрадіол
ЖТ – жовте тіло
ІГХ – імуногістохічний
ІМ – інерція матки
ІРІ – імунорегуляторний індекс
Кр – кортизол
ЛГ – лютеїнізуючий гормон
МФМ – морфометричний
ПРЛ – пролактин
САС – симпато-адреналова система
Т3 – трийодтиронін
ФАН – фагоцитарна активність нейтрофілів
ФСГ – фолікулостимулюючий гормон
ШО – штучне осіменіння
CD – кластери диференціювання (cluster of differentiation)
ER α – естроген альфа
IFN gamma – гамма-інтерферон
IL – інтерлейкін (Interleukin)
NK-клітини – природні клітини-кілери (natural killers)
PBMNC – мононуклеарна клітина периферичної крові (peripheral blood mononuclear cells)
PG – простагландин (Prostaglandin)
PR, ПГ – прогестерон
PTGS – простагландин-ендопероксидсинтаза (Prostaglandin-endoperoxide synthase)
TLR – толл-подібний рецептор (Toll-like receptor)
TNF – тумор-некротичний фактор (tumor necrotic factor)

ВСТУП

Актуальність теми. В галузі ветеринарних наук відтворення дрібних тварин стає все більш важливим, враховуючи зростання інтересу до розведення домашніх тварин [97] і вивчення одомашнених хижаків, як моделі для розробки біотехнологій для збереження видів, що зникають [301]. Собаки завжди були фундаментальною опорою у різних аспектах життя людей. Звідси важливість собак у суспільстві не тільки для прогулянок з ними, а й для інших корисних видів діяльності, таких як пошук і порятунок, медичні домашні тварини, емоційна підтримка, полювання, випас та захист [105]. Головним завданням при організації відтворення тварин є інтенсифікація репродуктивної функції самок, підвищення багатоплідності тварин і профілактика та лікування неплідності [149]. Чисельна кількість науковців визначають патологію розмноження самок у вигляді порушення їх відтворювальної функції, що є результатом відхилень у розвитку організму та наявності патологічних процесів у статевій та інших системах організму, а також впливу несприятливих чинників довкілля. У той же час розлади відтворювальної функції у самок можливі і при фізіологічному функціонуванні їх статевої системи [176]. Розуміння цих відмінностей має вирішальне значення у розробці допоміжних репродуктивних технологій для зусиль збереження псових [214]. Піометра є одним з актуальних прикладів порушення взаємовідносин між ендокринною і імунною системою, що призводить до небажаної вибраковки тварин, передчасної оваріогістероектомії та виведення з розведення біля 25% сук. [13, 320, 321]. Показано, що розвиток цієї дисфункції починається під час лютеїнової фази естрального циклу (дієтруссу), коли прогестерон стимулює проліферацію та секрецію залоз ендометрію, а також інгібує скорочення міометрію та послаблює імунну відповідь матки, тим самим сприяючи бактеріальній колонізації [94, 237]. Останнім часом вчених з різних країн світу все більше приваблює роль імунних клітин у формуванні імунного гомеостазу в організмі тварин [121, 267, 306]. Імунні реакції важливі на всіх етапах становлення репродуктивної системи

тварин і мають регулюючу дію у різні періоди їх репродуктивної здатності [271, 319]. Сучасна наука все більше поповнюється новими даними про фізіологічне значення гонадотропних і статевих гормонів на імунні відповіді [238]. Знання функціональних можливостей імунної системи тварин на різних етапах їх життєвого циклу може допомогти ветеринарним лікарям визначити профілактичні та терапевтичні підходи для покращення здоров'я та тривалості життя собак [233].

Розведення собак, а також виведення нових порід стає все більш популярним, кількість розплідників зростає, кількість племінних сук і псів також збільшується. Це призводить до більш частого виявлення власниками тварин і лікарями ветеринарної медицини порушень функцій відтворення собак. Враховуючи вищевикладене, розробка сучасних методів діагностики і досліджень захворювань репродуктивної системи, а також корекції функції відтворення у собак є вкрай актуальним завданням сьогодення [323].

Отже, дослідження механізмів взаємодії між імунною і ендокринною системою під час статевого циклу, як критичного періоду онтогенезу, є актуальним науковим напрямом, що дозволить встановити прогностичні біомаркери порушення імунного контролю в репродуктивній системі та розробити методи імунокорекції, які дозволять упереджати прояв дисфункцій в репродуктивній системі сук.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами та планами. Розроблена наукова праця є частиною науково-дослідних тематик, а також відокремлених досліджень кафедри фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету, зокрема «Механізми імунної відповіді у домашніх всеїдних в різні періоди онтогенезу» (№ держреєстрації 0121U110932), яка має період реалізації 2021-2025 роки; «Вивчення фізіолого-біохімічних аспектів та імунного статусу у тварин і птиці в умовах господарств Півдня України» (№ держреєстрації 0118U001665), яка мала період реалізації 2018-2022 роки.

Мета роботи – дослідження імунного та гормонального статусу організму собак за статевого циклу і розробка науково-обґрунтованих методів прогнозування прояву репродуктивних дисфункцій.

Для досягнення визначеної мети передбачено вирішення наступних наукових **задач**:

1. Встановити поширення дисфункцій репродуктивної системи сук залежно від віку, розміру, способу утримання та сезону року.
2. Дослідити динаміку показників клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу і з врахуванням віку та сезону року.
3. Дослідити динаміку статевих стероїдів, трийодтироніну та кортизолу у сук протягом статевого циклу та залежно від віку і сезону року.
4. Дослідити стан клітинної ланки імунітету у сук залежно від адренергічної імунореактивності їх організму та розробити спосіб прогнозування розвитку дисфункцій репродуктивних органів у сук залежно від ступеня стресованості організму.
5. Дослідити стан клітинної ланки імунітету та вміст стероїдних гормонів в сироватці крові у сук за різного стану репродуктивної системи.
6. Дослідити гістологічні та імуногістохімічні показники стінки матки сук залежно від стану репродуктивної системи.

Об'єкт дослідження – статевий цикл у собак і його вплив на ендокринні та імунофізіологічні показники крові та ендометрію.

Предмет досліджень – показники клітинної ланки імунітету, гормональні показники сироватки крові, морфологічні та імуногістохімічні показники матки, вік собак, сезон року.

Методи дослідження – фізіологічні (загальна оцінка стану організму собак, вміст гормонів у сироватці крові), імунологічні (дослідження показників клітинного імунітету), гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні (дослідження тканини матки), клінічні (дослідження стану слизових оболонок, шкірного покриву), статистичні (визначення вірогідних та середніх величин і їх похибок).

Наукова новизна одержаних результатів полягає у встановленні поширення різних форм дисфункцій репродуктивної системи у сук та розробки науково обґрунтованого способу прогнозування їх прояву залежно від ступеня стресованості організму. Зокрема, вперше проведений аналіз особливостей поширення та форм клінічного прояву дисфункцій у сук протягом трьох років з врахуванням віку, розміру, сезону року та умов утримання. Так, найбільш вираженим критерієм прояву дисфункції репродуктивної системи, за яким проявляється високий ступінь залежності і, імовірно, прогностичності – це вік та розмір тварини і спосіб їх утримання. Середній показник відсотку прояву дисфункцій у старечому віці (старші 6-ти років) становив 45,3% проти 34,5% в зрілому віці (від 2-х до 6-ти років) та 20,2 % у молодих (до 2-х років) сук.

Отримано нові дані щодо стану клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу. Вперше показано, особливості зміни клітинної ланки імунітету у сук за статевого циклу з врахуванням сезону року та віку. Нашими дослідженнями доповнені дані, щодо ендокринного профілю організму собак за статевого циклу та з врахуванням сезону року і віку тварин.

Вперше проведені гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження мatok сук з визначення кластерів диференціювання (CD), де CD45 – загальнолімфоцитарний кластер, CD4 – притаманний Т-хелперам, CD8 – цитотоксичним лімфоцитам, CD20 – маркер В-клітин, зрілих В-клітин – CD138 та маркеру гістіоцитарних, макрофагальних клітин – CD 68.

Запропоновано визначення індивідуальної адренергічної імунореактивності організму за різного стану репродуктивної системи та прогнозування розвитку дисфункцій.

Практичне значення одержаних результатів. Дослідження, які проведені у дисертації дають можливість зрозуміти масштаби та особливості клінічного прояву дисфункцій репродуктивної системи у сук та вплив на цей прояв кліматичних і індивідуальних чинників. Також для практикуючих ветеринарних лікарів отримані дані, які дають уяву про стан клітинної ланки імунітету та вмісту гормонів у крові сук за статевого циклу, що є інструментом

для підбору оптимальних протоколів імунокорекції та протоколів лікування.

Результати науково-дослідної роботи впроваджено в освітній процес кафедри фізіології та біохімії тварин Державного біотехнологічного університету шляхом наповнення лекційного матеріалу та практичних занять з тем фізіологія клітин крові та фізіологія репродуктивної системи у тварин (Додаток 1).

Результати дисертаційної роботи впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Фізіологія тварин», зокрема розділи «Фізіологія ендокринної системи», «Фізіологія крові» та «Фізіологія обміну речовин» доповнені новими науковими даними щодо особливостей фізіолого-біохімічних процесів та ендокринного профілю організму собак з врахуванням сезону року і віку тварин на кафедрі біохімії і фізіології тварин ім. акад. М.Ф. Гулого у підготовці фахівців ОР «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина із спеціальності «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України (Додаток 2).

Представлені матеріали дисертації використовуються у навчальному процесі при викладанні навчальних дисциплін «Етологія тварин», «Зоопсихологія» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», а також у науковій роботі кафедри біології продуктивності тварин імені академіка О. В. Квасницького Полтавського державного аграрного університету (Додаток 3).

Результати дослідження впроваджено у навчальну програму кафедри нормальної та патологічної фізіології імені С. В. Стояновського для викладання дисциплін «Фізіологія тварин» та «Ветеринарна патофізіологія» під час підготовки фахівців з ступеня вищої освіти «Магістр» та третього освітньо-наукового рівня зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького (Додаток 4).

Спосіб прогнозування розвитку дисфункцій репродуктивних органів у сук

залежно від ступеня стресованості організму, який включає визначення відсотку інверсії Т-«активних» лімфоцитів під час навантаження (in vitro) нейромедіатором адреналіном впроваджено у освітню програму при викладанні освітніх компонентів для здобувачів ступеню доктора філософії третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти ОНП «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (Додаток 5).

Результати дисертації впроваджено в освітній процес при викладанні освітніх компонентів «Акушерство та гінекологія» та «Акушерство, гінекологія, біотехнологія» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти факультету ветеринарної медицини на кафедрі акушерства та хірургії Сумського національного аграрного університету (Додаток 6).

Результати науково-дослідної роботи впроваджено у навчальну програму при викладанні освітнього компоненту «Фізіологія тварин» (розділи «Фізіологія ендокринної системи», «Фізіологія крові» та «Фізіологія обміну речовин»), а також освітнього компоненту «Ветеринарна імунологія» (розділ «Вроджений та адаптивний клітинний імунітет»), що викладаються на кафедрі фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету. Ці розділи доповнені новими науковими даними щодо особливостей фізіолого-біохімічних процесів та ендокринного профілю організму собак з врахуванням сезону року і віку тварин (Додаток 7).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є науковою працею, що самостійно виконана здобувачкою. Авторський підхід в дослідженнях, що був сформований дисертанткою з вивчення поширення дисфункцій репродуктивної системи сук, визначення імунного та ендокринного профілю організму сук за статевого циклу дозволив дисертантці самостійно визначитись з тематикою. Здобувачка самостійно провела аналіз наукових літературних першоджерел за напрямом досліджень; провела відбір зразків тканин під час оперативного втручання, а також крові у сук протягом статевого циклу. В рамках власних наукових досліджень здобувачка провела дослідження з визначення

ендокринних показників сироватки крові у сук. Разом з науковим керівником здобувачкою були сформульовані висновки та розділ щодо пропозицій виробництву. Аналіз та систематизацію отриманих експериментальних даних, а також інтерпретацію морфологічних показників здобувачкою проведено під методичним керівництвом наукового керівника.

Значну кількість практичних експериментів здобувачка провела спільно із співробітниками експертного патологоанатомічного центру у м. Одеса, лабораторії імунології ДП «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова», а також багатопрофільної лабораторії ветеринарної медицини Одеського державного аграрного університету, при цьому слід зауважити, що статистична обробка отриманих результатів виконана повністю самостійно.

Апробація результатів дисертації. Базисні та головні результати дисертації піддано дискусії, обговорено та позитивно оцінено на переліку відповідних науково-практичних заходів, зокрема: міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини «Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти» в Поліському національному університеті (Житомир, 12-13 жовтня 2022 року) щодо дослідження динаміки статевих стероїдних гормонів, а також кортизолу у собак за статевого циклу; II міжнародній науково-практичній конференції НПП та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку науки і освіти» Одеського державного аграрного університету (Одеса, 8-12 грудня 2022 року) у напрямку вивчення динаміки показників імунограм у сук за еструсу; основні характеристики динаміки показників клітинної ланки імунітету і прогестерону у сук за статевого циклу висвітлені на I міжнародній науково-практичній конференції «Молодіжна наука заради миру та розвитку» у Чернівецькому національному університеті ім. Ю. Федьковича (Чернівці, 9-11 листопада 2022 року); особливості дослідження концентрації прогестерону, трийодтироніну, естрадіолу, кортизолу та показників клітинної ланки адаптивного імунітету у сук за піометри було розкрито на III міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку

сучасної науки в країнах Євразії» в університеті Григорія Сковороди в Переяславі (Переяслав, 31 січня 2023 року); результати дослідження динаміки імунофізіологічних показників у сук протягом статевого циклу в залежності від віку обговорені на міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах Євроінтеграції» (Одеса, 14-15 вересня 2023 року) в Одеському державному аграрному університеті; характеристика динаміки імунофізіологічних показників у сук протягом естрального циклу залежно від сезону року висвітлена та обговорена на III міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку освіти і науки» (Одеса, 9-10 листопада 2023 року) в Одеському державному аграрному університеті.

Публікації. Основні результати дослідження дисертації викладено в 12 наукових працях, а саме 4 статтях – у фахових наукових виданнях України, 1 статті – у іноземному науковому виданні країни ОЕСР, 1 монографії та 6 тезах доповідей – у збірниках за результатами міжнародних конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Робота висвітлена на 180 сторінках комп'ютерного тексту, забезпечена ілюстраціями у вигляді 22 таблиць, 28 рисунків та має у своєму змісті анотації, вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати власних досліджень, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки та пропозиції виробництву, список використаних джерел, що містить 324 найменування, із яких 313 – латиницею, додатки.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ендокринний контроль статевого циклу у сук

У домашнього собаки репродуктивний цикл відрізняється від такого як в інших домашніх ссавців [291]. Суки є моноестральними, зазвичай несезонними, мають спонтанну овуляцію та спонтанну лютеїнову фазу, яка триває в середньому 64 дні, з подальшим облігатним анеструсом перед наступною 2–3-тижневою статевою охотою. Інтервали між тичкою тривають 5–12 місяців, як правило, 6–7 місяців, коливаються від дуже варіативних до регулярних строків, і середні значення не відрізняються суттєво між вагітними та невагітними циклами. У більшості порід статевозріла тичка настає на 6–14-му місяці, причому середнє значення позитивно корелює з розміром породи. Як і в інших ссавців, яєчниковий цикл псових регулюється гіпоталамо-гіпофізарно-гонадною віссю [59]

Згідно досліджень науковців [70], перші репродуктивні цикли у сук можуть значно відрізнитися залежно від індивідуальних особливостей, доки не буде встановлено закономірність. Цей інтервал також можна співвіднести з розміром тварини. Для великих собак, таких як німецька вівчарка, інтервал між тичкою можна вважати період у 5 місяців, тоді як для тварин дрібних порід нормальним можна вважати інтервал до 12 місяців [70].

Цикл собаки класично поділяється на 4 фази [57] – 5-20 днів проєструсу, 5–15 днів тички, 50–80 днів метєструсу (постєстральна частина лютеїнової фази) і анєструс, який зазвичай триває 80 – 240 днів. Ці фази відображають відповідно підвищення рівня естрогену у фолікулярній фазі, підвищення рівня прогестерону та зниження рівня естрогену на початку лютеїнової фази, закінчення лютеїнової фази та інтервал між зниженням активності жовтого тіла та початком наступного циклу [62]. Початок проєструсу зазвичай характеризується кров'яними виділеннями з піхви і триває 3-17 днів. Еструс, який визначається як період сприйнятливості до спарювання, має тривалість від 3 до 21 днів [70]. У

преовуляторному фолікулі незрілі ооцити піддаються впливу високих концентрацій естрадіолу (E2) і прогестерону (ПГ). Після овуляції ооцити також піддаються впливу високих концентрацій ПГ і E2 у бурсі та яйцепроводі, що вказує на те, що ці гормони відіграють вирішальну роль у відновленні мейозу ооцитів [125]. Значну роль у репродуктивних процесах відіграє лютеїнізуючий гормон (ЛГ). Цей гіпофізарний гонадотропін регулює дозрівання фолікула/овоцита, овуляцію, а також оптимальне запліднення та розвиток жовтого тіла (ЖТ) [74]. В яєчнику гранульозні, тека та лютеїнові клітини секретують стероїдні гормони, такі як естроген, тестостерон і прогестерон у відповідь на ЛГ. Виникнення передовуляторного викиду ЛГ та овуляції неможливо надійно передбачити шляхом визначення дати від початку тічки [58, 104, 116]. Тип і кількість вивільненого гормону змінюється залежно від репродуктивно-фізіологічного статусу фолікула та ЖТ [93, 227]. Фактично припинення анеструсу включає відбір ЛГ-чутливих фолікулів, і це остаточний відбір фолікулів викликаний підвищеною частотою високоамплітудних імпульсів ЛГ наприкінці анеструсу [79], потім реакція на гонадотропіни посилює циркулюючий базальний рівень ЛГ [222]. Цей період підвищеної пульсації ЛГ вважається важливою детермінантою початку нової фолікулярної фази [116]

У собак імпульси фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) виникають одночасно з імпульсами ЛГ на всіх стадіях естрального циклу та в анеструсі [162]. Передовуляторний сплеск ЛГ також пов'язаний із збільшенням секреції ФСГ [161].

Середня тривалість передовуляторного сплеску ЛГ становить 36 годин [115]. Однак є мало інформації про тимчасовий зв'язок між передовуляторними викидами ЛГ та ФСГ у сук. Під час фолікулярної фази концентрація естрадіолу-17 β у плазмі поступово збільшується, і пікові рівні значно різняться залежно від естральних циклів як усередині виду, так і між окремими особинами [56]. За даними Wildt та ін [317], передовуляторний сплеск естрадіолу-17 β , ймовірно, викликає передовуляторний сплеск ЛГ. Навпаки, Concannon та ін [62, 80] повідомили, що початок передовуляторного сплеску ЛГ було пов'язане зі

зниженням концентрації естрадіолу-17 в плазмі. Onclin та ін [224] повідомляють, що концентрація естрадіолу-17 β у плазмі досягала максимуму за 24-48 год до піку передовуляторного сплеску ЛГ [74]. У сук передовуляторний сплеск ЛГ пов'язаний із збільшенням концентрації прогестерону у плазмі [74].

ЖТ відіграє центральну роль під час вагітності, синтезуючи ПГ. У собак він має вагоме значення, оскільки регулює всю лютеїнову фазу. Справді, відсутність плацентарної стероїдогенної активності цього виду робить ЖТ єдиним джерелом ПГ, що підтримує вагітність [289]. Функція ЖТ активно припиняється у вагітних сук незадовго до пологів (близько 60-го дня після овуляції) під час передпологового лютеолізу. Отже, у невагітних сук спостерігається фізіологічна псевдовагітність з рівнями циркулюючого ПГ, аналогічними рівням у вагітних тварин [58]. Таким чином виявляється, що за відсутності активного лютеолітичного принципу тривалість життя ЖТ у невагітних собак регулюється деякими внутрішніми регуляторними механізмами [165].

Регуляція підтримки та функціонування ЖТ також досить своєрідна у домашньої собаки. У сук на ранніх стадіях лютеїнової фази (4-й день після овуляції) абляція гіпофіза мала лише тимчасовий вплив на циркулюючі рівні ПГ, які поверталися до нормальних рівнів на 6-10 день після операції [174]. Таким чином, встановлюється перехідна незалежність від гіпофізарної підтримки протягом перших 3–4 тижнів (24–28 днів) лютеїнової фази [174]. Висока експресія простагландин-ендопероксид-синтази 2 (PTGS2/COX2) протягом цього періоду, а також простагландин E2 синтази (PTGES) і двох рецепторів P_gE₂ 2 і 4 (EP2/PTGER2 і EP4/PTGER4) свідчить про ауто та паракринну роль простагландинів (P_g) у регуляції функціонування ЖТ [173, 174]. Крім того, P_gE₂ може модулювати стероїдогенез, а також експресію рецептора ендотеліну В (потужний вазодилататор) і рецептора пролактину у лютеїнових клітинах *in vitro* [174]. Інгібування CO² *in vivo* та подальше зниження внутрішньолютеїнових простагландинів додатково вплинули не лише на стероїдогенну здатність ЖТ, але й на його чутливість до пролактину, васкуляризацію та імунну систему [143,

174]. Ці висновки свідчать про те, що P_g відносять до числа основних лютеотропних факторів у ранньому дієструсі собак. Тим не менш, підтримка гонадотропінами необхідна для підтримки функції ЖТ у другій половині дієструсу/вагітності, причому як пролактин, так і лютеїнізуючий гормон мають лютеотропну роль [221].

Оскільки у собак немає лютеолітичної реакції на відсутність вагітності, у них відсутнє класичне розпізнавання вагітності, спрямоване на збереження ЖТ від лютеолізу. Вочевидь, видоспецифічне розпізнавання вагітності матір'ю включає скоординовану взаємодію між ЖТ і матково-плацентарним компартментом, що сприяє настанню та прогресуванню вагітності [167]. Життєвий цикл ЖТ собаки можна розділити на дві стадії: ранню стадію (25–30 днів після овуляції) і зрілу стадію (до регресії ЖТ). На ранній стадії ЖТ не є гонадотропін-залежним і не реагує на лютеолітичний агент, простагландин F₂ альфа (P_gF₂α) [143, 170], що узгоджується зі спостереженнями ЖТ у корів в перші 5 днів після овуляції. У невагітних собак P_gF₂α у матці відсутній, а гістеректомія не впливає на функцію ЖТ [130, 197]. Факторами, які підтримують розвиток і підтримку ЖТ на цій ранній стадії, є простагландин-ендопероксидсинтаза 2 (PTGS2) [25, 169], і простагландин E₂ (P_gE₂) [58]. Після цієї ранньої стадії ЖТ стає зрілим і чутливим до лютеолітичних агентів. Лютеотропні фактори, такі як пролактин і ЛГ, підтримують ЖТ і синтез прогестерону на цій зрілій стадії [172].

Гормональна регуляція всієї лютеїнової стадії естрального циклу у вагітних і невагітних сук подібна, за винятком продукції P_gF₂α перед пологами. У вагітних сук P_gF₂α, який викликає лізис ЖТ, виробляється матково-плацентарною одиницею перед пологами [166]. Однак P_gF₂α не виробляється в ендометрії невагітних сук, і ЖТ повільно регресує у цих тварин. Ця повільна регресія відбувається, незважаючи на наявність кількох лютеотропних факторів, таких як пролактин і ЛГ, які підтримують функцію ЖТ під час статевозрілої стадії у невагітних сук [166, 170]. Це свідчить про те, що механізм лютеолізу досить складний і змінюється залежно від строку вагітності сук [296].

Прогестерон є важливим стероїдним гормоном яєчників, який виконує багато репродуктивних функцій. Цей гормон секретується до того, як настане овуляція у сук, і постійно синтезується з підвищенням концентрації в сироватці крові [123]. Під час дозрівання ооцитів *in vivo* синтез стероїдів відбувається в тека-клітинах завдяки стимуляції гонадотропінами [156], що призводить до збільшення продукції ПГ у преовуляторних фолікулах [156]. Підвищення рівня ПГ є ознакою процесу лютеїнізуючої фолікулярної клітини, і висока концентрація ПГ у фолікулярній рідині спостерігалася в преовуляторних фолікулах собак під час періоду тічки, що безпосередньо пов'язано з високою концентрацією прогестерону в сироватці [254]. Таким чином, під час розвитку фолікулів собачі ооцити піддаються зростаючим концентраціям ПГ до та після піку ЛГ [156]; однак фізіологічна роль преовуляторного підвищення рівня ПГ у сук, а також різні фактори, відповідальні за його індукцію, не зовсім відомі [77]. Підвищення рівня ПГ свідчить про те, що цей гормон впливає на дозрівання ооцитів собак. Фактично, *in vivo* інгібування ПГ антагоністами ПГ -рецептора затримує відновлення мейозу ооцитів [76].

Концентрацію ПГ у плазмі або сироватці сук визначають і використовують для прийняття різних клінічних рішень [219]. Анаєструс характеризується $\text{ПГ} \leq 1,3$ нмоль/л [144] або $\leq 1,6$ нмоль/л [58]. Перший день естрального циклу, в якому ПГ перевищує 6 нмоль/л, настає за 6 днів до дня найвищої очікуваної фертильності з використанням заморожено-розморожених сперматозоїдів [279]. За оцінками, викид ЛГ починається, коли ПГ досягає 3 нмоль/л [58]. Пік ЛГ виникає, коли ПГ досягає 5,1 нмоль/л [60], або 8,3 нмоль/л [60] або 9,8 нмоль/л [34]. Овуляція відбувається у 26 з 39 сук, коли концентрація ПГ досягає 15,9 нмоль/л [96]. Дослідження усього періоду тічки у сук, засновані на великій кількості значень прогестерону в сироватці крові (4213 значень прогестерону), отриманих від сук різних порід, віку та маси тіла, показали, що середня концентрація прогестерону становила $2,7 \pm 0,6$ нг/мл [132].

Циркулюючі рівні ПГ починають повільно знижуватися в середині дієструсу, відзначаючи перехід між розвиненим ЖТ з високим стероїдогенним

виходом у повільно регресуючий ЖТ. Перші ознаки морфологічної дегенерації, які відображені в подальшому зниженні синтезу стероїдів, можна спостерігати приблизно на 35 день після овуляції [129].

Естроген переважно секретується гранульозними та лютеїновими клітинами та бере участь у широкому спектрі фізіологічних та патологічних механізмів, причому особливе значення має репродуктивна система [103, 145]. Для його вироблення холестерин, субстрат синтезу стероїдів, повинен перетворюватися на прогестагени та андростани, причому останні зазнають ароматизації в естрогени на ферментативних стадіях, опосередкованих ароматазою [205]. Під час статевого циклу собак кількість циркулюючого естрадіолу досягає піку перед овуляцією (за 1-2 дні до сплеску ЛГ), знижуючись до базальних концентрацій на початку дієтрусусу [58, 168]. Падіння рівня естрогену та підвищення рівня ЛГ та прогестерону викликають поведінкові ознаки раннього еструсу, змушують самку стояти на місці та дозволяють самцю спарюватися [23].

Після утворення ЖТ, тобто приблизно на 10-й день після овуляції, концентрації естрадіолу в плазмі знову збільшується слідом за підвищеною експресією лютеїнового гену CYP19A1 (ароматаза), але ніколи не досягають значень, порівнянних з передовуляційним піком, і приблизно відповідають закономірностям, що спостерігаються у секреції для ПГ [168, 224, 229]. Під час лютеїнової регресії концентрація лютеїнових стероїдів як ПГ, так і естрадіолу в периферичній плазмі починає повільно знижуватися з пасивною регресією лютеїнової активності у бік базальних концентрацій [277]. Існуючі відмінності в концентрації циркулюючого естрадіолу, що відмічаються в різних дослідженнях, пов'язані, мабуть, не тільки з технічними обмеженнями (через низьку концентрацію циркулюючого естрадіолу), але і з індивідуальними та/або можливими породними відмінностями [224]. Передача сигналів і, отже, можливі біологічні ефекти естрадіолу можуть залежати від репродуктивного статусу суки та функціонального статусу ЖТ (пізня лютеїнова регресія порівняно з передпологовою лютеолізісом). Передача сигналів, опосередкована естрогенами

(яка, можливо, антипроліферативна), мабуть, більш поширена в середині дієтруссу [291].

Представляє клінічний інтерес час овуляції, коли суки, що мають репродуктивну цінність, піддаються тривалій подорожі для парування з вибраним кобелем або коли вони піддаються штучному осіменінню свіжою, охолодженою або заморожено-розмороженою спермою. Виявлення дня овуляції особливо важливе у випадках штучного осіменіння (ШО) з малоконцентрованою, неякісною або замороженою спермою. ШО свіжою або охолодженою спермою зазвичай проводять через 3-5 днів після піку ЛГ [131]. Численні дослідження показали, що день піку ЛГ можна оцінити ретроспективно, вимірюючи концентрацію ПГ [181]. Концентрація ПГ 0,9–3,0 нг/мл відповідає дню піку ЛГ. Інтервал піку ЛГ до пологів, отриманий в науковому дослідженні [203], дуже подібний до інтервалу, про який повідомляють інші [203]. Транзиторне пульсуюче посилення, яке триває 50-110 хв, можна спостерігати кожні 1-8 год протягом усього циклу, частішаючи під час пізнього анеструсу [30, 245]. В дослідженнях проведених Minghui Zhao з співавторами, показано, що визначення концентрації естрадіолу в сироватки крові у сук є більш інформативним для встановлення часу овуляції в порівнянні з концентрацією ПГ [322].

Крім гальмівних та стимулюючих сигналів гіпоталамуса, гонадні стероїди модулюють гіпофізарну секрецію пролактину (ПРЛ) у сук [63] Пролактин – це пульсуючий гормон гіпофіза, що містить 197–198 амінокислот, масою 23–24 кДа [188]. Секреція ПРЛ гіпофізом знаходиться під прямим гальмівним контролем гіпоталамуса дофаміном, основним інгібуючим фактором ПРЛ, або опосередковано стимулюється серотоніном, який пригнічує вивільнення дофаміну [230]. ПРЛ, а не ЛГ, стає абсолютно необхідним лютеотропним фактором приблизно з 25-го дня після овуляції [174, 221]. Порушення функції ПРЛ (за допомогою бромкриптину, агоніста рецептора дофаміну) серйозно впливає на функцію ЖТ, що призводить до передчасного лютеолізу та викликає аборт [174]. Ці ефекти можуть бути нівельовані при введенні ПРЛ, але не ЛГ.

[174]. Рівень пролактину підвищується до середини дієструсу та залишається високим протягом всього дієструсу, незважаючи на індивідуальні та добові коливання [174, 223]. Роль ПРЛ виявляється більш сприятливою, оскільки навіть за високих рівнів цього лютеотропіну лютеїнова регресія все ще має місце. Це може бути пов'язано зі зниженням підтримки P_gE2 та його стимулюючої ролі в експресії ПРЛ-рецепторів, що призводить до десенсибілізації ЖТ щодо ПРЛ. [170, 171].

Нещодавня робота з культурою фолікулів *in vitro* продемонструвала роль протеїнового гормону активіну в розвитку порожнини антрального відділу фолікулів щурів, корів і людини [270]. Активін є глікопротеїном із суперродини трансформуючого фактора росту β , що виробляється гранульозними клітинами фолікула яєчника [201], і вважається, що він діє як ендокринний фактор, що сигналізує про вивільнення ФСГ гіпофізом, і як паракринний та аутокринний фактор в яєчнику [218].

Менше відомо про вплив естрального циклу та вагітності на функцію щитовидної залози у собак [128]. Повідомлялось, що під час анеструсу рівень тироксину (T₄) в сироватці крові вище, ніж під час вагітності [293]. Крім того, концентрація T₄ у сироватці була вище у вагітних суків порівняно з тими, у яких стався аборт [47]. Однак інше дослідження не виявило яких-небудь змін концентрації T₄ в сироватці під час вагітності та лактації в порівнянні з концентрацією під час овуляції [228]. Підвищена активність щитовидної залози також була продемонстрована під час вагітності у собак за рахунок збільшення поглинання I¹²⁵ щитовидною залозою в порівнянні з суками під час анеструсу [228]. Вагітність, скоріш за все, надає мінімальний вплив на концентрацію трийодтироніну (T₃) в сироватці [228]. У собак не існує аналогу гормону вагітності хоріогонічного гормону людини, який би збільшив секрецію гормону щитоподібної залози, як це відбувається у людей. Таким чином, вплив вагітності на функцію щитовидної залози у сук може бути іншим, ніж у жінок [46]. Те, що щитоподібна залоза впливає на функцію гонад, а відповідно і на статевий цикл, підтверджено дослідженнями де видалення статевих залоз стало причиною розвитку

гіпотиреозу у собак [180]. Вважається, що функція щитовидної залози має значний вплив на фертильність і розвиток плода у ссавців. Однак поки що було опубліковано лише кілька досліджень про потенційний вплив стадії репродуктивного циклу на концентрацію гормонів щитовидної залози у собак [128].

Окситоцин регулює багато репродуктивних функцій в організмі сук, а саме скорочення міометрію [217], контроль тривалості естрального циклу [275] і розширення шийки матки [42]. Загалом регуляція дії окситоцину сильно залежить від статевих стероїдних гормонів [278]. На експресію рецепторів окситоцину та статевих стероїдів у репродуктивному тракті впливають стадії естрального циклу [157] та різні стадії вагітності [234]. Крім того, окситоцин бере участь у розширенні шийки матки під час естрального циклу і пологів [84, 237].

Антимюллерів гормон (АМГ) також показав багатообіцяючі результати для визначення наявності тканини яєчників у кішок і собак [26, 292] У самок собаки, як і в інших видів, АМГ секретується гранульозними клітинами фолікулів преантральної та антральної стадії в яєчнику після статевого дозрівання [95]. АМГ пригнічує початок росту примордіальних фолікулів [54], а також має стимулюючий ефект ФСГ на ріст преантральних і малих антральних фолікулів [54], що важливо під час циклічного добору фолікулів [14].

Преантральні та малі антральні фолікули були більш імунореактивними по відношенню до АМГ. Ці дані свідчать про те, що збільшення кількості антральних фолікулів пов'язане з підвищенням АМГ у сироватці крові, коли анестральний період добігає кінця. Підвищення АМГ може бути корисним для прогнозування початку тічки і, отже, допомогти в оптимізації протоколів індукції тічки та, можливо, інших допоміжних репродуктивних технологій [212].

Гістологічні, анатомічні та поведінкові кореляти естрального циклу собаки були детально описані ще в минулому сторіччі багатьма дослідниками [17, 110].

В умовах сьогодення фактори, які контролюють репродуктивну сезонність, повністю не з'ясовані [211]. Було висловлено припущення, що інтервали

оваріального циклу басенджі та диких псових є частиною ендогенного навколорічного циклу, на який впливає фотоперіод [59]. Доказами, що підтверджують це твердження, є те, що переміщення псових (гривистих вовків, африканських диких собак, рудих лисиць) з Південної півкулі до Північної або навпаки зсуває сезон розмноження на 6 місяців [198, 299]. Було показано, що шишкоподібна залоза та її гормон мелатонін відіграють центральну роль у забезпеченні нейроендокринних реакцій на зміну денного світла у сезонних заводчиків [307]. Викликане мелатоніном поліпшення репродуктивного сезону було зареєстровано у чорнобурих лисиць (*Vulpes vulpes*) [98], єнотовидних собак (*Nyctereutes procyonoides*) [22] і самців песців [216], але не у самок песців, що вирощуються на фермах [274]. Крім того, вплив короткого денного світла на одомашнених самців сріблястої лисиці з лютого (природний сезон розмноження) по червень (сезон відсутності розмноження) може продовжити сперматогенез [99].

На відміну від худоби, у собак периферичне підвищення кортизолу в період статевого циклу та пологів спостерігається нерегулярно, демонструючи високі індивідуальні варіації. Виявляється також, що це більше пов'язане з самими пологами [61, 218, 304], ніж з передпологовим лютеолізісом. Примітно, однак, як зазначено раніше [113, 220], периферичні концентрації кортизолу можуть не відображати його локальну активність.

Оскільки собака характеризується видоспецифічними регуляторними ендокриними механізмами, він є цікавою моделлю для порівняльного дослідження та еволюційно обумовлених аспектів розмноження у ссавців. У сукупності, очевидно, що навіть при досягненні тієї самої мети максимального репродуктивного успіху, у собаки застосовуються інші стратегії регулювання, ніж в інших видів домашніх тварин. Результати цього огляду вказують, на існування необхідності подальшого вивчення процесів ендокринної регуляції статевого циклу у собак та виявлення біологічних маркерів контролю адекватності його перебігу.

1.2 Імунофізіологічний статус клітинної ланки імунітету сука за статевого циклу

Імунна система розпізнає та чинить опір чужорідним мікроорганізмам та внутрішнім змінам, що призводять до порушення функцій клітин та тканин. Протягом життя собаки імунна система повинна адаптуватися до різних фізіологічних умов, забезпечуючи ретельний та контрольований нагляд і захист [233]. Статевий цикл змінює гомеостаз, що потребує балансу між імунною та ендокринною системами. Імунна система дуже сприйнятлива до ендокринних сигналів завдяки експресії рецепторів гормонів на імунних клітинах. Вплив цього перехресного зв'язку між імунною і ендокринною системами та відповідних імунних реакцій стає чітко очевидним при оцінці імунітету [281].

Імунні реакції важливі на всіх етапах становлення репродуктивної системи тварин і мають регулюючу дію у різні періоди їх репродуктивної здатності [319].

Основна увага приділяється стероїдним гормонам (естрогени, прогестерон, тестостерон, глюкокортикоїди (ГК)), оскільки дія цих гормонів на сьогоднішній день найкраще вивчена. Слід зазначити, що імунна модуляція гормонами, відповідальними за ріст і метаболізм (наприклад, інсулін [269], лептин [240], тиреоїдні гормони [78], баланс рідини та електролітів (наприклад, вазопресин і стероїдний гормон альдостерон [184], а також норадреналін і адреналін [199] також можуть впливати на імунітет. Гормони прогестерон і 17β -естрадіол мають імуномодулюючі властивості, впливаючи на деякі імунні клітини та на синтез цитокінів. [264].

Стероїдні гормони зв'язуються зі специфічними гормональними рецепторами (ядерними або мембранними) і індукують як геномні, так і негеномні дії в тканинних і циркулюючих імунних клітинах [31]. Низький рівень естрогену стимулює клітини вродженої імунної відповіді [246]. І навпаки, високі концентрації естрогенів сприяють пригніченню прозапальних вроджених функцій [122] і пригнічують ефективну презентацію антигену дендритних клітин (ДК). Естрогени також впливають на адаптивну імунну відповідь, наприклад, у первинному місці генерації Т-клітин у тимусі. Тут естрогени можуть індукувати

атрофію тимуса, збільшувати генерацію зрілих CD4+ Т-клітин [288] та їх еміграцію [235]. Однією вражаючою особливістю, опосередкованою естрогеном, є залежний від концентрації ефект на поляризацію CD4+ Т-хелперних (Th) клітин: низькі концентрації естрогенів супроводжуються проліферацією клітин Th1, клітинним імунітетом та інтерфероном (IFN)- γ , а також виробленням антитіл [232]. Ця реакція має швидше прозапальну природу і супроводжується підвищенням цитотоксичної активності CD8+ Т-лімфоцитів (цитотоксичних) [311]. Навпаки, високі концентрації естрогену збільшують вироблення інтерлейкіну (IL)-4 клітинами Th2, які індукують гуморальний імунітет і мають протизапальний ефект [152]. Крім того, високі концентрації IL збільшують кількість Т-регуляторних (Treg) клітин [21] (що супроводжується підвищеною експресією IL-10 і трансформуючого фактора росту β [193]), інгібіторну коstimулюючу молекулу (запрограмовану протеїном клітинної смерті (PD-1) [309]) і перфорин (що опосередковує клітинну смерть [297]).

Хоча естрогени зменшують кількість В-клітин-попередників у кістковому мозку, вони збільшують кількість периферичних В-клітин [127], їх активацію, дозрівання та виживання [257] і вироблення антигенспецифічних антитіл [90]. Загалом вплив естрогенів на імунну систему можна підсумувати, як імунопідсилення завдяки стимуляції функції вроджених імунних клітин, активності цитотоксичних лімфоцитів і відповідей Th1, а також виробленню антитіл і дозріванню В-клітин. Вважається, що цей ефект сприяє відносній імунологічній перевазі самок у формуванні імунної відповіді на патогени [281].

Прогестерон знижує регуляцію вроджених імунних реакцій, спричинених макрофагами [283], НК-клітинами [20] або DC [137]. Крім того, прогестерон антагонізує вплив естрогенів на прогресування Т-клітинного циклу та апоптоз і пригнічує проліферацію Т-клітин після стимуляції дендритних клітин та їх диференціацію в прозапальні клітини Th17. Найважливішим є те, що високі концентрації прогестерону, наявні під час вагітності, пригнічують зміщення Th1 імунної відповіді шляхом стимуляції генерації Treg [186] і протизапальних CD4+, що секретують IL-4 та IL-10 [206]. Крім того, прогестерон зменшує

кількість В-клітин, що секретують імуноглобулін, і пригнічує їх дозрівання [257]. Отже, загальний ефект прогестерону можна підсумувати як імуносупресивний [281].

Під час естрального циклу рівні як прогестерону, так і естрогену є високими, що послаблює імунний нагляд і таким чином мінімізує ризик імунної відповіді проти алогенних антигенів сперматозоїдів і, якщо відбувається імплантація, напівміалогенної бластоцисти. Це супроводжується низьким рівнем антитіл у цервікальному секреті [118]. У той же час ендометрій готується до можливої імплантації бластоцисти через збільшення НК-клітин матки. Ці НК-клітини демонструють унікальний фенотип, оскільки виявляють низьку цитотоксичну активність [88]. Крім того, ендометріальна CD8⁺ цитотоксична активність Т-лімфоцитів пригнічується [183]. Після гормонального піку пов'язаного з овуляцією кількість клітин Treg зменшується на початку фолікулярної фази, що ставить під сумнів їхню центральну роль у сприянні збереженню імунної толерантності в ранній період вагітності [33].

Вважається, що коливання рівнів естрогенів і прогестерону під час естрального циклу та пов'язані з цим зміни в імунній функції впливають на реакцію на патогенні мікроорганізми слизової оболонки. Дослідження, проведені на мишах, виявили знижений захист від бактеріальної інфекції в статевих шляхах у відповідь на прогестерон [153]. Крім того, виявилось, що вірусна інфекція посилюється в дієструс, тоді як реплікація вірусу знижується під час преовуляторної фази з домінуванням естрогену [107].

Дослідження щодо вивчення концентрацій гонадних стероїдів [102], встановлених в інтактних собак, діють як імунодепресанти, що робить інтактну собаку сприйнятливою до інфекційних захворювань. Хоча відомо, що статеві стероїди впливають на імунну реакцію, але автори припускають що, додаткові фактори, ймовірно, впливають на частоту та тяжкість захворювання [200]

Кортизол разом з іншими ендогенними глюкокортикоїдами (ГК) має дихотомічний вплив на вроджену імунну відповідь, оскільки вони стимулюють макрофаги [83]. але пригнічують НК-клітини [75]. Крім того, ГК інгібують

дозрівання дендритних клітин (ДК) і антиген-презентуючу функцію [138], таким чином блокуючи ДК у толерогенному стані [194]. Що стосується адаптивної імунної відповіді, ГК знижують рівень циркулюючих наївних Т-клітин [35] і запускають апоптоз Т-клітин [241]. Вони пригнічують активацію, проліферацію та розповсюдження CD8 Т-клітинами і зменшують кількість NK і Т-клітин та їх цитотоксичну активність [75]. ГК пригнічують клітинний (Th1) імунітет шляхом пригнічення продукції та вивільнення прозапальних цитокінів з Th1 і Th17 клітин [100] і стимулюють гуморальний (Th2) імунітет [206].

Використовуючи коктейль цитокінів, що виробляється активованими Т-клітинами вдалося встановити вплив гормонів яєчників на дозрівання ДК і моноцитів в периферійній крові у сук [313]. ДК є найпотужнішими антигенпрезентуючими клітинами і значною мірою стимулюють не лише первинну імунну відповідь, але й вторинні відповіді [312]. ДК існують як на незрілих, так і на зрілих стадіях. Також виявили значне збільшення експресії імуностимулюючих молекул під час дозрівання ДК собаки [285, 314]. На відміну від зрілих ДК, повідомлялося, що незрілі ДК індукують толерантність. Тому дозрівання ДК вважається дуже важливим для імунітету під час запліднення [195].

Дослідження фагоцитозу лейкоцитів у лютеїнову фазу статевого циклу показали, що клітинна активність фагоцитуючих лейкоцитів, виражена як середня активність флуоресценції, була значно нижчою під час пізньої лютеїнової фази, ніж під час ранньої лютеїнової фази. Відсоток лейкоцитів, які були здатні до фагоцитозу, істотно не відрізнявся. Відсоток клітин, стимульованих *E.Coli* до окисного вибуху, був значно нижчим під час пізньої лютеїнової фази. Їх активність не відрізнялася між двома періодами. Зміни фагоцитарної активності та кількості лейкоцитів, які показали окислювальний вибух, не були пов'язані з будь-якими змінами в пропорції різних лейкоцитів [133].

Важливим гомеостатичним фактором та ключовим медіатором імунопатології при хронічних інфекціях є простагландин E2 (Pg E2). Pg E2

вибірково пригнічує ефекторні функції макрофагів та нейтрофілів, а також імунітет 1-го типу, який опосередкований Th1-, цитотоксичними Т-лімфоцитами- та NK-клітинами, але стимулює відповіді Th2, Th17 та регуляторних Т-клітин. P_g E2 модулює вироблення хемокінів, інгібуючи залучення прозапальних клітин, одночасно посилюючи локальне накопичення регуляторних Т-клітин та клітин-супресорів мієлоїдного походження [151].

Оцінка кількох імуноклітинно-специфічних маркерів та інших імунних факторів дає нове уявлення про імунологічний статус матки та можливу функціональну динаміку на різних стадіях статевого циклу собак [290].

Імунна система слизової оболонки матки відіграє важливу роль у процесі розпізнавання матері та встановлення вагітності. Це досягається шляхом підтримання балансу між захистом від патогенів та толерантністю до алогенних сперматозоїдів та напівалогенних ембріонів, адаптуючись таким чином до різних подій, пов'язаних з вагітністю (імплантацією, плацентацією, пологам) та сприяючи ремоделюванню тканин. Цей баланс залежить від складної популяції тканинних імунних клітин, які складаються з макрофагів, NK-клітин, В- і Т-лімфоцитів, регульованих локальними і системними сигналами, включаючи ендокринні [43, 108, 207, 245, 289].

У собак імплантація відбувається приблизно на 17 день після утворення ембріону, і, хоча вони піддаються впливу відносно високих концентрацій циркулюючого прогестерону, присутність ембріонів необхідна для формування децидуальної оболонки [290]. Не зважаючи на високі рівні ПГ, що спостерігаються протягом цього періоду, спонтанної децидуалізації не спостерігається у невагітних сук, оскільки наявність імплантованої бластоцисти необхідна для індукції диференціювання материнських стромальних клітин у децидуальні клітини [174].

Що стосується змін, викликаних ембріоном, більш ранні якісні аналізи передімплантаційного імунного середовища матки у вагітних та псевдовагітних сук виявили відмінності в присутності таких факторів, як CD4, CD8, INF γ , TNF α та деяких інтерлейкінів [29, 262]. Як і в інших видів, у собак імунна система, бере

участь у механізмах, що регулюють функцію ЖТ, оскільки спочатку можна виявити підвищену присутність лімфоцитів у ЖТ [CD4-CD8-, головний комплекс гістосумісності (МНС)II-клітини, що експресують антиген] і в другій половині дієтруссу (клітини, що експресують антиген CD8 та МНСII). Таким чином, цитокіни, що походять з лейкоцитів, можуть мати важливе значення, і експресія мРНК інтерлейкіну (IL) 8, IL10, IL12, фактора некрозу пухлини (TNF) α і трансформуючого фактора росту (TGF) β 1 спостерігалася протягом всього дієтруссу [129].

Хоча роль усіх різних популяцій імунних клітин матки повністю не вивчена, деякі з них, такі як НК-клітини, мають вирішальне значення для початку вагітності. У матці людини та миші вони потрібні для формування високоінвазивної децидуальної плаценти [87]. НК-клітини є найбільш поширеною популяцією імунних клітин у матці у цих видів і беруть участь у регуляції інвазії трофобласту, відіграючи ключову роль у ремоделюванні спіральних артеріол під час формування децидуальної тканини [109]. Однак, незважаючи на децидуативну ендотеліохоріальну плаценту, у собаки такі механізми невідомі, а також склад імунної системи не був ретельно вивчений у цього виду [290].

Проведений імуногістохімічний аналіз в трьох шарах ендометрію (поверхневому, проміжному та базальному) на наявність імунних клітин, продемонстрував, що макрофаги, В- та Т- лімфоцити знаходяться в ендометрії на всіх стадіях статевого циклу. Показано, що їх кількість значно вища під час пізньої інволюції. Т-лімфоцити були розкидані в стромі або серед залозистого епітелію, складаючи переважаючу імунну клітинну популяцію в анеструсі та проеструсі, але зменшувалась кількість на всіх інших стадіях. Кількість ендометріальних В-лімфоцитів була постійною протягом статевого циклу, хоча їх кількість була вищою під час пізньої інволюції. Кількість макрофагів була вищою під час анеструссу порівняно з іншими стадіями, клітини зміщувалися в поверхневий шар ендометрію [236]. Макрофаги можуть поляризуватися на M1 (класична активація, залучена до прозапальної відповіді Th1) і M2

(альтернативна активація) фенотипи, причому останній представляє M2a (приймає участь у імунній відповіді Th2), M2b приймає участь у прозапальних відповідях та імунній регуляції [41, 252].

При імуногістохімічному дослідженні локалізації *Toll-like receptor 2* (TLR2) у репродуктивному тракті собак, показано, що TLR2 експресувався в епітелії ендометрію, але був відсутній у стромі ендометрію здорових собак на всіх стадіях естрального циклу. Ці результати свідчать про диференціальну експресію TLR2 у клітинах ендометрію [52].

Був вивчений вплив неспецифічного гуморально-антимікробного фактору захисту - лактоферину, на регуляторні імунні механізми в репродуктивному тракті собак. Ці результати свідчать про те, що в матці собаки експресія лактоферину пов'язана з концентрацією естрогену в крові, і що різке зниження лактоферину, яке спостерігається на ранній стадії дієструсу, може погіршити антимікробний захист [155].

Присутність ембріона чітко модулює середовище матки, викликаючи контрольовану прозапальну сигналізацію в період до імплантації. Ця рання стадія, очевидно, відбувається під впливом Th-клітин, які переважають над цитотоксичними лімфоцитами, що супроводжується підвищеною присутністю макрофагів з прозапальними характеристиками M1 [252]. Крім того, підвищена присутність NK-клітин під час періодів до імплантації та імплантації свідчить про участь цієї популяції в ремоделюванні ендометрію. Treg клітини відіграють важливу роль під час імплантації, ймовірно, беручи участь у придушенні імунної відповіді на вторгнення ембріона. Все ще слід розглянути видоспецифічний вплив на матку високих рівнів ПГ в крові. Імуносупресивні властивості ПГ були описані у кількох ссавців, включаючи людей і гризунів. Потенційна роль ПГ у моделюванні місцевих імунних реакцій матки у собаки виглядає правдоподібною та має бути взята до уваги в майбутніх дослідженнях. Підвищена присутність NK-клітин і Treg-клітин на стадіях до імплантації та/або імплантації означає подібність між імунним середовищем матки собаки та ситуацією, що спостерігається у людей і гризунів [266]. Спостерігається висока

кореляція ембріон-індукованих ефектів у матці між собакою та людьми, ніж між собакою і іншими домашніми ссавцями [114].

З наведених літературних даних можна зробити висновок, що від гормонально опосередкованих змін в ендометрію сук під час статевого циклу та пов'язаних з цим змін в експресії імунотропних рецепторів в ендометрію та імунокомпетентних клітин, переважно вродженого імунітету, залежить адекватність перебігу тічки, а відповідно і розвиток дисфункції. Але разом з тим слід вказати на те, що спостерігається відсутність достатньої кількості досліджень щодо критеріїв клітинної і гуморальної ланок імунітету під час статевого циклу у сук, а відповідно і неможливість формування остаточних висновків щодо пускових механізмів розвитку дисфункцій.

1.3. Моніторинг дисфункцій статевого циклу у сук та методи їх корекції

Однією з причин неплідності є порушення нейроімуноендокринної регуляції статевого циклу. Його, в свою чергу, можна розділити на декілька категорій. За основу береться подовження, або скорочення його стадій та зміни послідовності його стадій. Судження власника суки про її клінічний стан та поведінку можуть не відповідати реальній «картині» перебігу процесів у організмі. Вищевказане визначає необхідність оцінки стану та процесу статевого циклу у суки, що проводиться на основі результатів цитологічного дослідження вагінальних мазків, вагіноскопії, аналізу поведінки тварини і визначенні в сироватці крові концентрації прогестерону і лютеїнізуючого гормону в період статевої охоти [272].

Порушення репродуктивного циклу можуть проявлятися у вигляді тривалого терміну між тічками (тривалий анеструс). Відповідне порушення спостерігаються у старих сук. Також воно може бути виражене у вигляді частих циклів (3-4 тічки на рік), що може спостерігатись у всіх сук. Останній тип порушення – ановуляторні цикли, що можуть бути і під час статевого дозрівання

і у статевозрілих сук. В цьому випадку сука спарюється нормально, але саме запліднення не відбувається. За низькою концентрацією прогестерона можна діагностувати відсутність овуляції [135].

Анестрія може проявлятися трьома варіаціями: збільшена тривалість інтерпроеструсу (більше 12 місяців для суки), або у самки у відповідному віці не почалась статева циклічна активність, або у тварини зупинилась циклічна активність яєчників. Патологія відповідного процесу обумовлена структурними чи функціональними порушеннями в системі гіпоталамус-гіпофіз-яєчник, або відсутністю явних ознак проеструсу та еструсу [316]. Причинами затяжного еструсу можуть бути аплазія чи гіпоплазія яєчників, сезонність циклу, фотоперіодизм, стрес, виснаження, перевтома, кісти і неоплазія, неадекватне спостереження та/або прояв симптомів еструсу, передчасна (стареча) дисфункція яєчників, імунообумовлений оофорит, оваріоектомія, порушення статевої диференціації, ятрогенні захворювання, гіпофункція гіпофізу, затяжний ідіопатичний анеструс [141, 318].

Порушення статевого циклу у сук можуть виявлятися у вигляді анестрального, більш короткого або довгого циклу, а також тривалого проеструсу, тривалої тічки, розділеної тічки або ановуляторних циклів [70]. Піометра собак – це поширене, небезпечне для життя дисфункція матки, яка вражає головним чином інтактних самок середнього та старшого віку в стадії діеструсу [273]. Вважається, що ендокринологічні аберації відіграють певну роль у патогенезі [226].

Дисфункція характеризується матковою інфекцією та запаленням, що супроводжується накопиченням гною в матці, у поєднанні з системними розладами [251]. *Escherichia coli* (*E. coli*) є найпоширенішим інфекційним агентом, пов'язаним із цією хворобою (приблизно від 50% до понад 90% випадків піометри) [73, 139]. Іноді з ураженої матки виділяють інші мікроорганізми (наприклад, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp.) [65, 258]. Незважаючи на те, що захворюваність на піометру у собак є високою, її патогенез досі не повністю

вивчений. Вважається, що хвороба включає багатофакторний вплив, включаючи дію стероїдних гормонів (прогестерону та естрогену) під час послідовних циклів тічки, факторів проліферації ендометрію, таких як інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1), і бактеріологічні фактори (головним чином *E. coli*) [189]. Вважається, що інфікування матки сприяє пригніченню механізмів імунного захисту [189] і зміни поверхні епітеліальних клітин ендометрію, що дозволяє *E. Coli* прилипати до ендометрію. Результати показують, що обробка епітеліальних клітин ендометрію собак ферментом, що розкладає глікопротеїн, збільшує кількість *E. Coli*, що прилипає до них [286]. Це свідчить про те, що зміни в глікопротеїнах матки також можуть відігравати певну роль у патогенезі піометри у собак [286]. Не було виявлено зв'язку між АМГ і захворюваннями матки [226].

Певними дослідженнями зазначено, що в першій половині стадії дієструсу пригнічена активність клітинного імунітету є результатом підвищення концентрації прогестерону та мінімального вивільнення естрогену. Коли досліджували проліферативну відповідь мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMNC) на PYO-252, тобто клон *Escherichia coli*, виділений з матки собаки, ураженої піометрою, відповідь PBMNCs значно зменшилася в першій половині (день 10) дієструсу. Протягом усього естрального циклу PBMNC собаки не реагували на ліпополісахариди, отримані з *E. Coli*. Реакція PBMNC, зібраних у анеструсі, на PYO-252 була значно посилена після додавання до культури естрадіолу-17бета. Навпаки, ці відповіді значно пригнічувалися в присутності прогестерону. Експресія гамма-інтерферону (IFN γ) у відповідь на PYO-252 також значно посилювалася естрадіолом-17бета, але пригнічувалася прогестероном. Це помітне зниження імунної резистентності сприяє поширенню кишкової палички, яка проникає в порожнину матки через розпушений цервікальний канал під час тічки, що призводить до появи піометри [284].

З певного дослідження можна зробити висновок, що посилення інгібітору секреторної лейкоцитарної протеази, як додаткового прогностичного біомаркера для піометри собаки в ендометрії та його підвищеної концентрації в периферичному кровообігу разом із загальною кількістю лейкоцитів та

концентрацією сечовини, може служити цінним індикатором для прогнозування піометри у сук [259]. Інші дослідження показали значно вищі концентрації протеїну гострої фази ($p < 0,01$) і нижчі концентрації альбуміну у сук з піометрою порівняно зі здоровими тваринами. Аналіз концентрації прогестерону та антимюлерового гормону безпосередньо перед операцією виявив значно вищі концентрації цих гормонів у сук з піометрою, ніж у контрольній групі ($p < 0,01$) [142].

Таким чином, екзогенна естрогенова терапія при неправильному спарюванні і терапія прогестероном для контрацепції пов'язані з підвищеним ризиком піометри [282]. Що стосується патогенезу піометри, багато дослідників вивчали експресію рецепторів статевих стероїдів, включаючи рецептор естрогену альфа ($ER\alpha$) і рецептор прогестерону (PR) у репродуктивному тракті собак у випадках піометри [38, 91, 140, 247]. Коли експресію статевих стероїдних рецепторів матки у випадках піометри порівнювали з експресією нормальних маток дієструсних сук, нижчий рівень експресії $ER\alpha$ у всіх шарах матки спостерігався у випадках піометри, тоді як експресія PR у більшості шарів тканин собаки за піометри матки, як правило, була вищою, ніж у нормальній матці [91, 140, 247]. Можна припустити, що зміни експресії $ER\alpha$ та PR у відділах матки беруть участь у патогенезі піометри. Окрім ролі статевих стероїдних гормонів у матці, дослідження на людях показало, що розширення шийки матки пов'язане з кількома механізмами, включаючи експресію рецепторів статевих стероїдів [253]. У пошуках нових біомаркерів високопродуктивне секвенування або секвенування наступного покоління стало ефективною технологічною платформою для таксономічної характеристики мікроорганізмів у клінічних зразках пацієнтів або хворих тварин. За допомогою цієї технології було виявлено, що і ендометрій, і піхва здорових собак мають багаті мікробні екосистеми, а мікроби ендометрію набагато різноманітніші, ніж мікроби піхви [163]. Крім того, раніше також повідомлялося про мікробіоту матки людей та інших тварин, і гомеостаз нормального резидентного мікробіому може підтримувати імунітет мікросередовища господаря, покращуючи здоров'я матки

[324]. Повідомляється, що знижена фагоцитарна здатність, можливо, сприяє вищій частоті захворювань, таких як піометра, протягом пізньої стадії лютеїнової фази [133]. Стерилізація (кастрація) є основним методом профілактики піометри [320]. Однак стерилізація може призвести до несприятливих побічних ефектів, включаючи хірургічні та анестезіологічні ускладнення, підвищену появу певних вад опорно-рухового апарату та ендокринологічних розладів, ожиріння та нетримання сечі у самок [250]. Важливо ретельно оцінити переваги та недоліки такої процедури в кожному конкретному випадку, враховуючи породу тварини [136, 179, 180].

Важливе клінічне значення у репродуктології сук мають гормонально активні кісти яєчників. Вони є цінним джерелом гіперестрогенії у сук, що може призвести до тривалої тічки та утеропатій [159]. Згідно з визначенням, кіста яєчника – це заповнена рідиною структура будь-якого розміру, присутня за межами фізіологічної тічки та тічки всередині яєчника [19]. Вона може виникнути як одна, так і у більшій кількості на одному або обох яєчниках і є ендокринно активною або неактивною. Існують різні типи кіст яєчників: фолікулярні кісти, кісти підповерхневих епітеліальних структур, лютеїнові кісти [148]. Відомо, що фолікулярні кісти є ендокринними (синтезують естрадіол-17 β і прогестерон, а також лютеїнові кісти та кістозні ЖТ (виробляють прогестерон). Кісти підповерхневих епітеліальних структур і кістозні Rete ovarii не пов'язані з продукцією гормонів [158], і клінічні ознаки захворювання є рідкісними. Однак вони можуть замінити навколишню фізіологічну тканину яєчника [158], що може вторинно призвести до функціональної втрати.

Репродуктивний стрес, який активує материнську вісь гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової (ГГНС) та симпатoadреалової систем, у гіпотезі [310] визначений як активний репродуктивний стрес. Базальна активність ГГНС варіюється залежно від коливань естрального циклу [106] і є найвищою в кінці фолікулярної фази або на початку лютеїнової фази у людей [15]. Це пов'язано з тим, що вміст адренкортикотропного гормону та кортизолу, а також вміст релізінг гормону у гіпоталамусі збільшується [24]. Крім того, під час проетрусу

рівень катехоламінів швидко збільшується перед овуляцією. Це свідчить, що тічка може бути стресором. Підвищена активність ГГНС під час проєструсу може бути захисним механізмом успішної репродуктивної активності під час естральних фаз [18]. Дійсно, вплив стресу посилює складну біологічну реакцію між нервовою, ендокринною та імунною системами [12]. Отже, у стресових умовах слід оцінювати поведінку та рівень кортизолу собак, оскільки рівні кортизолу в плазмі підвищуються у відповідь на стрес [51].

Стрес також асоціюється з підвищенням рівня пролактину, що призводить до пригнічення ГГНС системи, що призводить до кількох репродуктивних розладів. Пролактин, імовірно є маркером стресу у собак [117]. Функція щитовидної залози пригнічується під час хронічного стресу, тому вважається важливим регулятором репродуктивної функції. Через втручання в систему ГГНС, імунна дисрегуляція, викликана стресом, може мати несприятливий вплив на репродукцію. Крім того, окислювальний стрес і запалення були запропоновані як потенційні механізми, за допомогою яких хронічний стрес впливає на репродуктивну функцію. Це викликано збільшенням утворення активних форм кисню, що шкідливо впливає на клітини. Крім того, запалення може призвести до пошкодження тканин і рубців, що може вплинути на фертильність [141].

За даними інших авторів однією із причин виникнення кіст [53] є те, що фолікулярні ооцити собак мають низьку мейотичну здатність з естральним циклом, що характеризується тічкою, за якою слідує обов'язковий період анетрусу з міжестральним періодом близько 7 місяців [49, 85]. Тому визначити індукцію еструсу та синхронізацію самок складно, оскільки вони не реагують на стандартні протоколи гонадотропіну, що застосовуються в інших тварин [49, 178].

Інерція матки (ІМ) приблизно в 75% випадків є найбільш поширеною материнською причиною дистоції у вагітних сук [150].

У сук із діагнозом гіпотиреоз статевий цикл може нормалізуватися при замісній гормональній терапії протягом 3-6 місяців. З цією метою синтетичний

гормон щитоподібної залози (левотироксин) слід вводити перорально. Зазвичай достатньо дози 22 мкг/кг двічі на день.

У інтактних сук старшого або середнього віку піометра є найбільш частим захворюванням матки, що може виявитись після одного або кількох невагітних естральних циклів [305]. Патогенез піометрії у собаки до кінця не вивчений [215]. Багато досліджень на суках показали, що надмірна кількість прогестерону або надмірна чутливість матки до прогестерону можуть призвести до піометри [273, 71]. Більш того, піометра зазвичай виникає в період дієструсу, оскільки високі рівні прогестерону на цьому етапі сприяють проліферації ендометрію та активності залоз, одночасно пригнічуючи скорочення міометрію та інгібування лейкоцитів у матці [72]. Естроген також може бути регулятором піометри у собак, оскільки високі рівні естрогену під час проєструса і тічки можуть підвищити чутливість матки до прогестерону в наступних стадіях естрального циклу [177].

В протокол обов'язкових досліджувальних показників при встановленні причин неплідності у сук включені вміст в крові гормонів щитоподібної залози [147]. Існує непрямий і закономірний зв'язок між дисфункцією щитоподібної залози та репродуктивною функцією. Гіпотиреоз призводить до репродуктивних розладів, таких як тривалий анетрус, тиха течка, тривалий проєструс та проблеми з овуляцією. Рівень пролактину збільшується, що призводить до порушення або відсутності розвитку яєчників фолікулів за рахунок інгібування гонадотропін-релізінг-гормону у сук з недостатнім вивільненням гормонів щитовидної залози [48].

Підвищена частота уражень репродуктивних органів зафіксована у собак 5 років і старше. Макроскопічно виявлені кістозні зміни та крововилив в яєчнику, гіперемія, кровотеча та набряк матки. Детальна гістопатологічна оцінка виявила кістозний яєчник, фіброплазію, атрофовані фолікули та геморагічний яєчник а також кістозне розширення залоз шийки матки [268].

Кілька досліджень показали, що порода представляє собою важливий фактор ризику в схильності до захворювання, деякі породи більш сприйнятливі

до розвитку піометри, ніж інші, і це може статися через вплив генетичних факторів, що сприяють розвитку захворювання або внаслідок вікових особливостей кожної породи [175].

У відповідному огляді обговорювалися фізіологічні та патологічні аспекти, пов'язані з молекулярними механізмами розвитку дисфункцій та їх поширенням. Крім того, висвітлена роль багатьох факторів в індукції дисфункцій у домашніх сук. Хоча патологоанатомічні та клінічні особливості цього процесу добре відомі, але ще існує мало відомостей щодо молекулярних змін, які відбуваються під час розвитку піометри [154]. В доступній літературі практично відсутня інформація щодо можливості застосування фармакологічних засобів імуотропної дії для упередження розвитку дисфункцій в репродуктивній системі під час естрального циклу. Майбутні дослідження можуть з'ясувати вплив імунокорекції на ризик піометри, потенційно сприяючи розробці ефективніших протоколів профілактики дисфункції репродуктивної системи.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

Аналіз літературних джерел вказує на велику кількість наукових дискусій та даних щодо поширення дисфункцій у сук і особливостей їх прояву. На сучасному етапі достатньо велика кількість науковців вивчає зміни окремо в імунній та ендокринній системах за умов фізіологічно адекватного статевого циклу, а також механізми виникнення дизрегуляторних станів, які потенціюють виникнення та розвиток дисфункцій репродуктивної системи. Собаки, як хижаки, мають особливості ендокринної та імунної регуляції статевого циклу. Тому вивчення фізіологічних механізмів формування регуляторних відносин між імунною та ендокринною системами дасть можливість розробити оптимальні фармакологічні протоколи імунологічного контролю. Прояв дисфункцій в літературі описується як окремий процес, при цьому мало відомі механізми, що передують розвитку дизрегуляцій. Існує критично мало інформації щодо науково обґрунтованих способів імунологічних методів протекції розвитку дисфункцій репродуктивної системи у сук, особливо після природнього статевого циклу. В існуючій науковій літературі обмаль інформації щодо популяційного складу імунорегуляторних клітин в репродуктивних органах самки собак та активності поверхневих рецепторів за різного функціонального стану матки. Проведений нами огляд літературних джерел вказує на те, що сучасна наука розглядає статевий цикл сук як модель для вивчення регуляторних механізмів взаємодії між імунною та ендокринною системою у людини. Значне збільшення популяції собак в останні десятиріччя у нашій країні потребують принципово нових наукових підходів, які будуть направлені на упередження прояву дисфункцій репродуктивної системи та імунного контролю перебігу статевого циклу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Вибір напрямів досліджень, загальні етапи та методи досліджень

Експерименти для вирішення поставлених задач кваліфікаційної праці проведено з 2020 до 2024 рр. на кафедрі фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету та на базі багатoproфільної лабораторії ветеринарної медицини Одеського державного аграрного університету. При проведенні досліджень використовували тварин з приватного розпліднику «Fantasy Fly» та інших. Окремі види та етапи дослідження були виконані в умовах лабораторії імунології державного підприємства «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова», експертного патологоанатомічного центру та ветеринарних клінік «Долина», «Ексвет», «Айболіт» м.Одеси, ННВКЦ «Університетська ветеринарна клініка» Одеського державного аграрного університету. Загальна схема досліджень представлена на рисунку 2.1.

Етап I. Дослідження поширення прояву дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від зовнішніх та внутрішніх чинників

Даний етап передбачав проведення двох експериментів

Експеримент перший передбачав вивчення поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від року, сезону року, розміру, віку та способу утримання.

В рамках цього дослідження були проаналізовані амбулаторні журнали клінічного та ультразвукового дослідження ветеринарних клінік м. Одеси та Одеського району протягом 2021 – 2023 років. В дослідження були залучені собаки, які на підставі анамнестичних даних та за результатами ультразвукової діагностики мали дисфункції репродуктивної системи.

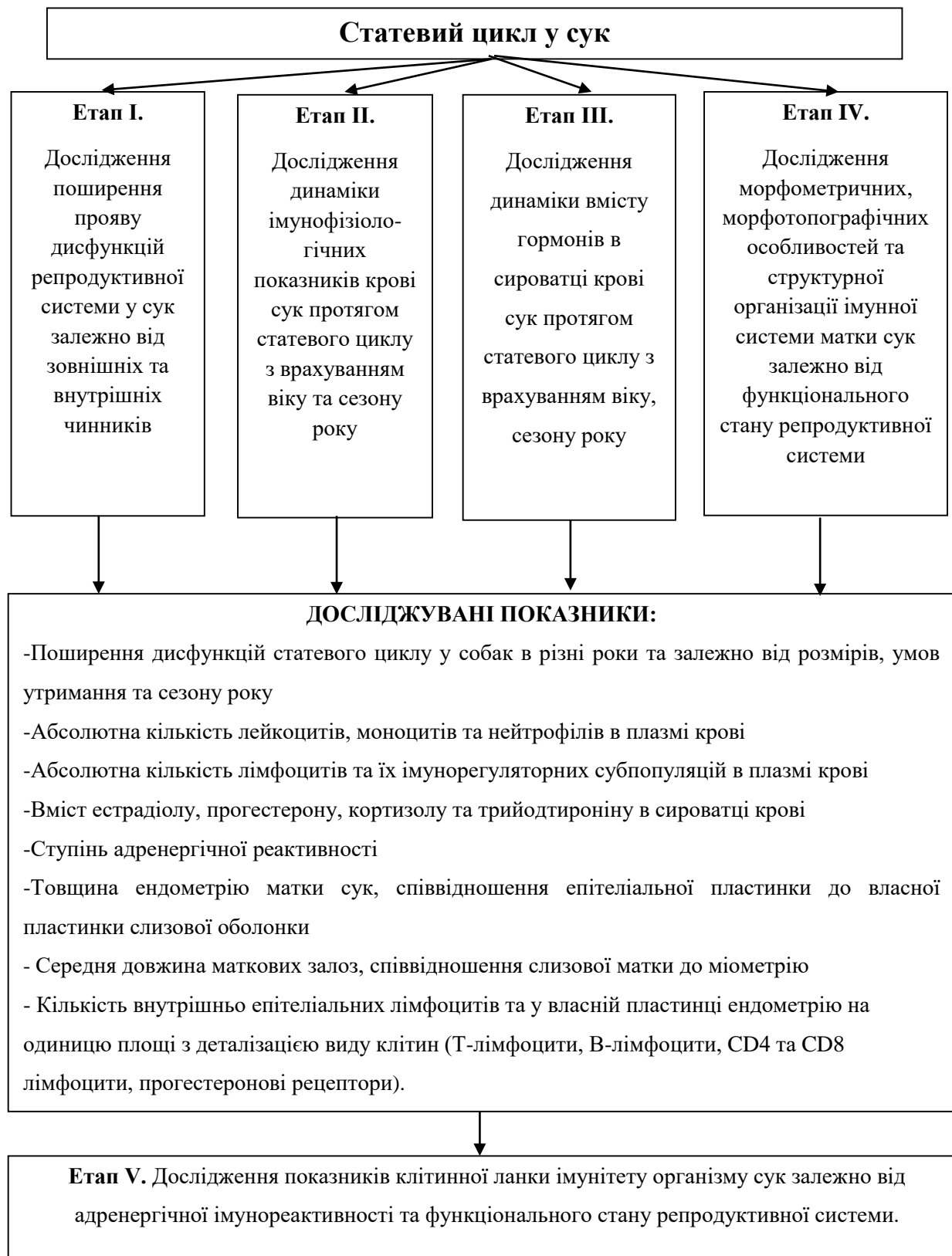


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

Тварини були систематизовані залежно від року дослідження (2021, 2022 та 2023 рік), віку (до 2-х, від 2-х до 6-ти та старші 6 років), розміру (дрібні – до 5

кг, середні – від 5 до 15 кг, великі – більші за 15 кг), способу утримання (квартирне чи у приватному будинку) та сезону року (весна, літо, осінь, зима). Відповідні дані наведені безпосередньо в розділі «Результати власних досліджень». Загальний розподіл тварин, які були досліджені з метою встановлення поширення дисфункція репродуктивної системи залежно від року дослідження наведений в таблиці 2.1. (I етап дослідження).

Таблиця 2.1

Розподіл собак зі встановленими дисфункціями репродуктивної системи залежно від року дослідження

Роки дослідження	Кількість тварин	% від загальної кількості
2021	154	31
2022	181	36,6
2023	160	32,4
Всього тварин	495	

Розподіл тварин, які безпосередньо були використані в експериментальних дослідженнях при виконанні дисертації (II –V етапи досліджень) приведені у таблиці 2.1.1.

Таблиця 2.1.1

Розподіл собак, які були залучені до проведення експериментальних досліджень залежно від року

Роки дослідження	Кількість тварин	% від загальної кількості
2021	28	35
2022	19	24
2023	33	41
Всього тварин	80	

Експеримент другий передбачав вивчення поширення основних видів дисфункцій репродуктивної системи у сук

При проведенні цього дослідження тварини були поділені залежно від встановленої дисфункції (таблиця 2.2), а саме: перша група – неплідність, яка була пов'язана з нерезультативними статевими циклами; друга група – суки, у яких за результатами обстеження встановлена піометра; третя група – суки, у яких спостерігалась відсутність статевого циклу більше року або наявність більше двох статевих циклів протягом року; четверта група – тварини, у яких за результатами обстеження встановлені кісти яєчників або матки.

Таблиця 2.2

Розподіл собак залежно від виду дисфункції репродуктивної системи

Вид дисфункцій	Кількість тварин	% від загальної кількості
Неплідність не встановленої етіології	41	8,3
Піометра	275	55,6
Ациклія або поліциклія	88	17,8
Кістозне переродження матки та яєчників	91	18,3
Всього тварин	495	

Етап II. Дослідження динаміки імунофізіологічних показників крові сук протягом статевого циклу з врахуванням віку та сезону року.

Даний етап передбачав проведення трьох експериментів

Експеримент перший передбачав дослідження динаміки показників клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу

В дослід було залучено 8 сук породи лабрадор віком від 3-ох до 5-ти років. Для проведення дослідження було використано плазму крові, яка відбиралась з латеральної підшкірної вени передпліччя на 1-у, 5-у, 10-у, 15-у, 20-у, 25-ту доби естрального циклу. Для отримання плазми кров переносили у вакуумні пробірки

Vacutest® (Італія) з антикоагулянтом ЕДТА. В плазмі крові визначали наступні імунофізіологічні показники: абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх імунорегуляторні субпопуляції, а також фагоцитарну активність нейтрофілів.

Експеримент другий проводили з метою встановлення залежності в динаміці показників клітинної ланки імунітету за статевого циклу у сук залежно від віку.

В дослід були залучені 10 собак породи золотистий ретривер. Тварини були розподілені на 2 групи. В першій групі були тварини (n=5) віком до 2-х років і в другій (n=5) – від 2 до 6 років. У тварин відбирали кров з ліктьової вени (натщесерце) на 1-у; 5-у; 10-у; 15-у; 20-у; 25-у доби естрального циклу у вакуумні пробірки Vacutest® (Італія) з ЕДТА. В плазмі крові визначали наступні імунофізіологічні показники: абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх імунорегуляторні субпопуляції, а також фагоцитарну активність нейтрофілів

При проведенні третього експерименту встановлювали особливості показників клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від сезону року.

В дослід були залучені 10 собак породи німецька вівчарка віком від 3 до 5 років. Тварини були поділені на дві групи залежно від сезону року, а саме у першій групі (n=5) знаходились тварини, у яких естральний цикл проявлявся в осінній сезон (вересень - листопад), а в другій (n=5) – у яких естральний цикл проявлявся навесні (березень-травень). У тварин відбирали кров з ліктьової вени (натщесерце) на 1-у; 5-у; 10-у; 15-у; 20-у; 25-у доби естрального циклу у вакуумні пробірки Vacutest® (Італія) з ЕДТА. В плазмі крові визначали наступні імунофізіологічні показники: абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх імунорегуляторні субпопуляції, а також фагоцитарну активність нейтрофілів.

Етап III. Дослідження динаміки вмісту гормонів в сироватці крові сук протягом статевого циклу з врахуванням віку та сезону року.

Даний етап передбачав проведення двох експериментів.

Експеримент перший передбачав дослідження динаміки прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові в різні фази статевого циклу.

Дослід було проведено на 4 суках породи золотистий ретривер, вік яких становив від 3-ох до 5-ти років. Для проведення дослідження використано сироватку крові. В усіх тварин проводили відбір крові натщесерце з латеральної підшкірної вени передпліччя в пробірку типу «Епіндорф» на 1-у; 5-у; 10-у; 15-у; 20-у; 25-у доби естрального циклу. Після центрифугування при 1500 об/хв відбирали сироватку за допомогою автоматичної піпетки. В сироватці крові визначався вміст прогестерону, естрадіолу та кортизолу.

При проведенні другого експерименту встановлювали вміст в сироватці крові прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну в динаміці протягом статевого циклу і залежно від віку тварин та сезону року.

Дослід є продовженням другого і третього експерименту другого етапу дослідження, де у дослідних тварин окрім показників клітинної ланки імунітету визначали вміст прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну. Для наочності висвітлення отриманих результатів, а відповідно і їх обговорення, відповідні дані виокремлені в третій етап. (Методика відбору крові аналогічна до вищевказаних розділів).

Етап IV. Дослідження морфометричних, морфотопографічних особливостей та структурної організації імунної системи матки суки залежно від функціонального стану репродуктивної системи.

Для дослідження гістологічних, морфометричних та імуногістохімічних показників матки було сформовано три групи помісних тварин (всього 15 тварин):

- 1 група – суки в анестральній стадії статевого циклу (n=5);
- 2 група – суки в стані статевого циклу (n=5);
- 3 група – суки з піометрою (n=5).

У всіх тварин була проведена оваріогістероектомія з дотриманням всіх вимог оперативного втручання за кетамінседазивної нейролептанальгезії. Перед

оперативним втручанням у собак відібрали кров з ліктьової вени в вакуумні пробірки Vacutest® (Італія) з ЕДТА. В плазмі крові визначали наступні імунофізіологічні показники: абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх імунорегуляторні субпопуляції, а також фагоцитарну активність нейтрофілів. Частину крові центрифугували при 1500 об/хв для отримання сироватки. В сироватці визначали вміст прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну.

Тканину матки поміщали в скляний посуд, який щільно закривався кришкою та консервували в 10 % розчині формаліну.

Етап V. Дослідження показників клітинної ланки імунітету організму сук залежно від адренергічної імунореактивності та функціонального стану репродуктивної системи.

Даний етап передбачав проведення двох експериментів.

Експеримент перший проводили з метою встановлення залежності між індивідуальною адренергічною реактивністю, показниками клітинної ланки імунітету та проявом дисфункції репродуктивної системи.

Експеримент проведено на 16-ти помісних суках віком від 2-х до 6-ти років, у яких в анестральний період була відібрана кров з ліктьової вени (натщесерце) у вакуумні пробірки Vacutest® (Італія) з ЕДТА одноразово. Після проведення дослідження показників імунограм, тварини були поділені залежно від індивідуального ступеня сенсibiliзації до адреналіну «активних» Т-лімфоцитів (рівень адренорецепції) на три групи:

- перша група – (6 сук) тварини з рівнем адренорецепції «активних» Т-лімфоцитів до 10%;

- друга група – (5 сук) тварини з рівнем адренорецепції «активних» Т-лімфоцитів від 10 до 14%;

- третя група – (5 сук) тварини з рівнем адренорецепції «активних» Т-лімфоцитів 14% і більше.

В крові дослідних тварин визначали відносну кількість лімфоцитів та їх імунорегуляторних субпопуляцій, а також моноцитів, нейтрофілів, їх здатність

до фагоцитозу. За тваринами було встановлено клінічне спостереження протягом року на предмет прояву дисфункцій репродуктивної системи.

Експеримент другий проводили з метою дослідження клітинної ланки імунітету у сук за різного стану репродуктивної системи.

Дослідження проведено на 17 -ти помісних суках віком від 2 до 5 років які були розділені на три групи:

- перша група – (6 сук) тварини які знаходилися в стані еструсу;
- друга група – (6 сук) тварини в анестральний період;
- третя група – (5 сук) тварини у яких діагностовано піометру.

У тварин відбирали кров з ліктьової вени (натщесерце) у вакуумні пробірки Vacutest® (Італія) з ЕДТА, одноразово в день звернення в клініку їх власників. В плазмі крові визначали наступні імунофізіологічні показники: абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх імунорегуляторні субпопуляції, фагоцитарну активність нейтрофілів.

2.2.Методи застосованих досліджень

2.2.1. Клінічні методи дослідження

Після звернення хазяїв тварин до ветеринарних клінік проводився збір анамнестичних даних, який включав дані про вік, умови утримання, наявність статевого циклу та вагітності. Проводився загальний огляд тварини з подальшим зосередженням на стані зовнішніх статевих органів з подальшою термометрією [10].

2.2.2. Методи дослідження показників імунограми

Визначення відносної кількості Т-лімфоцитів за допомогою методу розеткоутворення і використання еритроцитів барана в якості маркерів [3].

Підготовка системи Е-РУЛ для визначення загальних Т-лімфоцитів. До пробірки вносили 0,1 мл суспензії лімфоцитів і додавали 0,1 мл 0,5 %-ї зависі еритроцитів барана. Після цього суміш інкубували в термостаті протягом 7 хв за температури 37°C. Отриману суміш центрифугували 5 хв. при 1000 об./хв і ставили у холодильник за температури 4°C на 1 годину. Потім проводили

фіксацію суміші 0,3 %-м розчином глютарового альдегіду у кількості 0,1мл протягом 20 хвилин, після цього зупиняли реакцію додаванням 0,4 мл дистильованої води. Наступним етапом було центрифугування протягом 3 хвилин при 1000 об./хв, надосад відбирали, осад ресуспендували та робили на предметному склі мазок.

Підготовка системи для визначення Т-хелперів. Базисом відповідного методу визначення цієї субпопуляції Т-лімфоцитів є те, що Т-хелперні клітини на своїй поверхні переносять рецептори до імуноглобулінів класу М. В той же час Т-супресори переносять рецептори до імуноглобулінів G. Лімфоцити вважаються хелперними в тому випадку, якщо вони мають здатність формувати розетки після їх інкубації з теофіліном, що є теофілін-резистентними клітинами. При цьому необхідно готувати на забуференому ізотонічному розчині NaCl 0,09 %-й розчин теофіліну.

Одним з етапів є внесення у пробірку 0,1 мл суспензії лімфоцитів, потім додається 0,1 мл 0,09 %-го розчину теофіліну, далі – проводиться інкубування протягом 30 хвилин при температурі 37°C. Наступним етапом є дворазове відмивання забуференим фізіологічним розчином протягом 10 хвилин. Далі відбирають надосад, осад в свою чергу ресуспендується, додається 0,1 мл зависі еритроцитів, потім він інкубується протягом 7 хвилин при температурі 37°C та центрифугується 5 хвилин при 1000 об./хв. Пробірки ставляться у холодильник за температури 4°C на 1 годину. Наступним етапом є фіксація протягом 10 хвилин 0,3%-м розчином глютарового альдегіду. Він додається у кількості 0,1 мл. Далі фіксацію зупиняють шляхом додавання 0,4 мл дистильованої води, потім центрифугують 5 хвилин при 1000 об./хв, відбирають надосад, який утворився. Після цього осад ресуспендують і на предметному склі роблять мазок. Фіксують мазок метанолом протягом 3 хвилин, наступним етапом є його сушка на повітрі, після чого його фарбують за методом Романовського-Гімзи [3] впродовж 7 хвилин, змивають струменем дистильованої води, висушують і під мікроскопом проводять підрахунок кількості розеткоутворюючих клітин.

У мазку необхідно підрахувати кількість розеткоутворюючих лімфоцитів. Малодиференційованими вважають лімфоцити, які приєднали 3-5 еритроцитів. В свою чергу ті, які приєднали 6-10 еритроцитів – вважають лімфоцитами із середньою щільністю рецепторів; лімфоцити, які приєднали 11 і більше еритроцитів є високодиференційованими. Ті лімфоцити, що взагалі не приєднали жодного еритроцита є нульовими клітинами. За різницею, отриманою після віднімання із загальної кількості Е-РУЛ числа хелперів визначають кількість теофілінчутливих лімфоцитів-супресорів.

Визначення відносної кількості В-лімфоцитів методом розеткоутворення із використанням сенсibilізованих еритроцитів миші у якості маркерів [190]. В-лімфоцити характеризують гуморальну ланку імунітету у різні фази дозрівання. Метод ідентифікації В-лімфоцитів базується на наявності на цих клітинах мембранних рецепторів для третього компонента комплексу С₃ і Fc-фрагмента імуноглобуліну. Він забезпечує приєднання до В-лімфоцитів індикаторних клітин. Відповідні клітини на поверхні мають комплекс антиген-комплекс. Еритроцити миші, сенсibilізовані антитілами та комплексом використовують у якості індикаторних клітин. Можливість виявити так звані комплементарні розетки дає наявність у В-лімфоцитів поверхневих мембранних рецепторів до комплексу. Тобто це є ті лімфоцити, що утворюють розетки з аналогічними еритроцитами, які несуть на власних мембранах комплекс антитіло-комплемент-ЕАС-РУЛ.

В процесі аналізу імунофізіологічного стану собак враховували також інтегральні показники:

- Індекс навантажувальних тестів розеткоутворення, що є співвідношенням розеткоутворюючих лімфоцитів (Е-РУЛ) до показника розеткоутворюючих нейтрофілів (Е-РУН).

- Відносну кількість розеткоутворюючих нейтрофілів Е-РУН – показник, що характеризує стан біологічно активних структур, отже різноманітних рецепторів поверхні нейтрофілів, що переважно визначає резистентність до певної інфекції.

- Імунорегуляторний індекс (співвідношення Т-хелперів до Т-супресорів), що є одним з факторів ризику розвитку імунопатологічних реакцій та вказує, що зміна цього показника зазвичай трапляється при дисбалансі між імунорегуляторними субпопуляціями лімфоцитів.

2.2.3. Методика обчислення відсотку інверсії «активних» Т-лімфоцитів при встановленні індивідуальної адренергічної реактивності

Проведення скрінінгових імунологічних навантажувальних тестів здійснювалось наступним чином:

- відбір периферійної крові та її стабілізація;
- розкапування лейкоцитарно-лімфоцитарної суміші клітин по 0,05 мл в лунки імунологічних планшетів;
- додавання в дослідні лунки 0,05 антигену (адреналіну в розведенні 1:1000);
- проведення інкубації лейкоцитарно-лімфоцитарної суміші клітин в термостаті протягом 30 хвилин при $t=37^{\circ}\text{C}$;
- додавання в лунки імунологічної плати в усі проби по 0,05 мл еритроцитів барану в стандартній концентрації (0,02%);
- інкубація 5 хвилин при кімнатній температурі, і виготовлення відразу мазків.

Облік результатів полягає в підрахунку відносної кількості «активних» Е-РУК на 100 клітин лімфоїдного ряду в контрольних та дослідних зразках. Різниця в відсотку активних Т-клітин в контрольній і дослідних пробах відображає чутливість до адреналіну.

2.2.4. Метод визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

Реакцію щодо визначення ФАН регламентовано проводити в 96-коміркових планшетах для імунологічних реакцій з комірками, що мають місткість 0,2 мл та кругле дно. Відповідний тест проводять так само, як і Е-розеткоутворення, проте замість суспензії еритроцитів барана додається 0,06 мл

0,1%-вої суспензії клітин пекарських дріжджів, які попередньо мають бути вбиті нагріванням. В препаратах підраховується загальна кількість фагоцитуючих нейтрофілів на 50 нейтрофілів. Клітину-нейтрофіл вважають за фагоцитуючу, якщо вона поглинула 1 та більше дріжджову клітину.

2.2.5. Метод визначення абсолютної кількості природних кілерних клітин

Кількісний показник кілерних клітин вираховувався на підставі універсального методу морфологічного дослідження формених елементів крові [190]. Шляхом процентного підрахунку великих широкоплазменних лімфоцитів (з азурофільною зернистістю) із загальної кількості лімфоцитів визначалась відносна кількість лімфоцитів в 1 мкл крові. Розрахунок проводився з використанням імерсійного об'єктиву (окуляр $\times 15$, об'єktiv $\times 90$) та імерсійної олії.

2.2.6. Імуноферментне дослідження концентрації гормонів в сироватці крові

Дослідження сироватки крові виконували на мікропланшетному фотометрі Multiskan FC (Thermo Scientific, Нідерланди) методом конкурентного твердофазного імуноферментного аналізу з використанням тест-систем фірми ХЕМА (Україна). У сироватці крові собак визначали концентрацію естрадіолу (E2), прогестерону (Пг), трийодтироніну (Т3) та кортизолу (Кр):

- *Визначення концентрації Кр та Пг:* на внутрішній поверхні лунок мікропланшету іммобілізовані мишачі Кр/Пг моноклональні антитіла до Кр/Пг. Гормон (Кр, Пг) зі зразка конкурував з кон'югованим Кр/Пг за зв'язування з антитілами на поверхні лунки. У результаті утворювався зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містив пероксидазу. В процесі інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину рідина в лунках забарвлювалась. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації Кр/Пг в досліджуваному зразку. Концентрація Кр/Пг в досліджуваних зразках визначається за

калібрувальним графіком залежності оптичної густини від відповідного вмісту Кр/Пг в калібрувальних пробах.

- *Визначення концентрації E2 та T3:* на внутрішній поверхні лунок мікропланшету імібілізовані кролячі E2/T3 поліклональні антитіла до E2/T3. Гормон (E2, T3) зі зразка конкурував з кон'югованим E2/T3 за зв'язування з антитілами на поверхні лунки. В результаті утворювався зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. В процесі інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину рідина в лунках забарвлювалась. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації E2/T3 в досліджуваному зразку. Концентрацію E2/T3 в зразках, що досліджувались визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту кортизолу в калібрувальних пробах.

Референтні значення:

1. Прогестерон (нмоль/л):

- анеструс – <0.5-6;
- лютеїнова фаза – 10-80;
- овуляція – 25-60;

2. Естрадіол (нмоль/л):

- <0,073 – анеструс;
- 0,073-0,22 – проеструс;
- еструс <0,22

3. Кортизол (нмоль/л): 25-250

4. Трийодтиронін (нмоль/л): 0,5-2,8

2.2.7. Гематологічні методи дослідження

Визначення абсолютної кількості лейкоцитів проводили двома способами. Перший – за стандартною методикою в камері Горяєва з використанням реактиву Тюрка.

За допомогою другого способу визначали абсолютну кількість лейкоцитів, відносної кількості еозинофілів та моноцитів. В другому способі використовували автоматизований гематологічний аналізатор BC-2800Vet

фірми MINDRAY. Клітини підраховуються і вимірюються інпендансним методом.

Диференціювання лейкоцитів проводилось наступним чином. За допомогою розчинника і лізуючого реагенту аналізатор може розділити лейкоцити на три субпопуляції залежно від розміру: лімфоцити, моноцити і гранулоцити. За гистограмою аналізатор розраховує значення лімфоцитів (%), моноцитів (%) і гранулоцитів (%).

Таблиця 2.3.

Лейкограма крові у здорових собак,г%

Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
		Юнні	Паличко ядерні	Сегменто ядерні		
0-1	2,5-9,5	-	1-6	43-72	21-40	1-5

2.2.8. Гістологічні, морфометричні (МФМ) та імуногістохімічні (ІГХ) методи досліджень

Для гістологічних, ІГХ і МФМ досліджень тканину матки фіксували в 10% забуференому формаліні, обробку проводили у гістопроекторі Leica TP1020 V 3/3 RevK за стандартною методикою (висхідні спирти – від 72° до 99°, далі – ксилол), заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікротомі Leica RM (Німеччина) виготовляли серійні стандартні зрізи завтовшки 2 мкг? μм, які розміщали на предметні скельця для оглядового мікроскопічного дослідження та на адгезивні предметні скельця «SUPER FROST PLUS» («DAKO», Данія) для проведення ІГХ досліджень.

При мікроскопічному дослідженні зрізів, забарвлених гематоксиліном та еозином, визначали: поширення та стан залоз ендометрію, характер та склад строми, якісну та кількісну характеристику імунокомпетентних клітин у слизових оболонках (лімфоцитів загалом, Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, Т-хелперів, цитотоксичних Т-лімфоцитів, плазмоцитів, клітин гістіоцитарно-макрофагального ряду).

Морфометричними дослідженнями документували товщину слизової оболонки матки та відносний розподіл на функціональний і базальний шари, відношення товщини ендометрію до міометрію, діаметру залоз до товщини ендометрію.

В ІГХ дослідженнях депарафінізацію, регідратацію та високотемпературне демаскування антигенів проводили в РТ-модулі («ДАКО», США) з використанням NIER буферу (pH=9,0), після чого ІГХ реакція проводилась у автостейнері Autostainer Link 48 («ДАКО», США) за протоколом виробника кожного антитіла. Візуалізація ІГХ-реакції виконана за допомогою системи детекції DAKO EnVision+ System з діамінобензидином («ДАКО», США) без посилення. Зрізи додатково забарвлювали гематоксилином Майєра та заключали в канадський бальзам. Використовували антитіла, наведені у таблиці 2.4.

Оцінку результатів та фотофіксацію всіх оглядових забарвлень та ІГХ реакцій виконували в стандартизованому полі зору мікроскопа Leica DM2000 LED (Німеччина), при збільшенні $\times 40$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 4$), $\times 100$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 10$), $\times 200$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 20$), $\times 400$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 40$).

Таблиця 2.4

Перелік моноклональних антитіл, які застосовувались для виявлення рецепторної активності імунокомпетентних клітин в матці

№ п/п	Назва антитіла	Виробник	Клон	Термін придатності
1	CD68	«ДАКО», Данія	2B11+PD7/26	2024-07-31
2	CD138	«ДАКО», Данія	CD138/144B	2024-05-31
3	CD8	«ДАКО», Данія	CD8/144B	2024-02-29
4	CD4	«ДАКО», Данія	4B12	2024-10-31
5	CD20	«ДАКО», Данія	L26	2024-04-30
6	Progesterone receptor	«ДАКО», Данія	PgR 636	2023-12-31

Досліджували будову стінок матки сук, проводили замір та аналіз наступних параметрів: діаметр залоз ендометрію, співвідношення поперечного зрізу залоз до товщини ендометрію. Вимірювання лінійних показників проводили за допомогою програми ImageJ ver.1.48.

Вивчали будову та топографію лімфоїдної системи матки сук з деталізацією клітинних підтипів. Враховували щільність імунокомпетентних клітин у ендометрію матки, їх середню кількість в 10 полях зору при збільшенні $\times 100$ (площа поля зору $\times 100$ становить 202459,22 μm^2), співвідношення підтипів, тропність до судин та залоз.

Оцінка ІГХ реакцій проводилась при 400-кратному збільшенні шляхом підрахунку середньої кількості позитивних забарвлених клітин у 10 полях зору при збільшенні 100-кратному (площа поля зору $\times 100$ становить 202459,22 μm^2).

Препарати фотографували з використанням вбудованої камери мікроскопа, всі подальші дослідження проводились з первинними, нередагованими знімками.

2.3. Методи статистичної обробки даних

Одержані результати статистично обробили з використанням програмного забезпечення OpenEpi за Dean AG версія 3.01. Різницю між відповідними 2-ма величинами вважали вірогідною за $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили в програмному забезпеченні «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія № AXXR712D833214FAN5). Гіпотезу щодо нормальності розподілу досліджуваних показників перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлка. Обчислювали медіану, нижній та верхній квартилі, дані представляли у вигляді Me (Q1; Q3). Порівняння отриманих даних у 2 групах проводили за U-критерієм Манна-Уїтні, отриманих даних у 3 групах – з використанням однофакторного дисперсійного аналізу Краскела-Уоліса. Значимість різниці між частотою позитивної ІГХ реакції в 2 групах перевіряли за критерієм χ^2 . Для оцінки зв'язків між досліджуваними ознаками розраховували коефіцієнт кореляції Пірсона (r), значення якого від 0,1

до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак, від 0,3 до 0,69 – про середній зв'язок ознак, від 0,7 і вище – про сильний зв'язок ознак. Для всіх типів та видів аналізу відмінності вважали достовірними за умови $p < 0,05$.

Експериментальна складова наукової праці проводилась з урахуванням відповідного нормативного підґрунтя, зокрема «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», що затверджені та схвалені на Національному конгресі з біоетики [11] із дотриманням європейських вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [69] та чинних національних нормативно-правових актів, зокрема Закону України № 3447-IV від 22.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» [5].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Стан репродуктивної системи та її адекватне функціонування регулюється ендокринною системою і її дисбаланс призводить до порушень в імунній системі, що в свою чергу сприяє потенціюванню і розвитку дисфункцій в статевих органах та як наслідок неплідності. В Україні відсутня статистична інформація про поширення дисфункцій репродуктивної системи у собак, а також даних щодо особливостей їх функціонального прояву з урахуванням вікових, сезонних та інших особливостей.

3.1. Поширення дисфункцій репродуктивної системи у собак залежно від віку, розміру, способу утримання та сезону року

За період проведення моніторингових досліджень, а саме з 2021 по 2023 рік було обстежено 495 тварин власники, яких зверталися до ветеринарних клінік з причини дисфункції репродуктивної системи. В таблиці 3.1 представлені дані щодо особливостей поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук з врахуванням віку.

За результатами досліджень встановлена залежність відсотку поширення дисфункцій залежно від віку. Так, у сук до 2-х років лише в 12,2 % випадків серед інших дисфункцій відзначали неплідність, проти 39,0% - в зрілому віці та 48,8% - в старшому віці, після 6 років. Також найменший відсоток встановлений і серед сук до 2-х років, у яких виявлена піометра (19,3%) та кістозні утворення в яєчниках та матці (13,2%). При цьому слід зазначити, що серед сук до 2-х років частіше, ніж в дорослому віці (від 2-х до 6-ти років) встановлювали дисфункції, пов'язані с ациклією або поліциклією, відсоток таких тварин становив 34,1%.

У сук від 2-х то 6-ти років та старших за 6 років немає суттєвої різниці у прояві піометри, і відсоток таких тварин становив 39,6 та 40,1% відповідно. Аналізуючи тенденцію відсоткового співвідношення прояву усіх дисфункцій у сук старших 6-ти років слід вказати, що в цьому віці відсоток їх прояву є найбільшим в порівнянні з іншими віковими періодами. Так, у 60,4% тварин

відмічений прояв кістозного переродження яєчників і матки, у 48,8% - неплідність. Середній показник прояву дисфункцій у старшому віці (старші 6-ти років) становив 45,3%, проти 34,5% - в зрілому віці (від 2-х до 6-ти років) та 20,2% - у молодих (до 2-х років) сук.

Таблиця 3.1

Поширення дисфункцій у сук протягом трьох років та залежно від віку

Вік тварин	Види дисфункцій																
	Неплідність не встановленої етіології				Піометра				Ациклія або поліциклія				Кістозне переродження яєчників і матки				В середньому за віком, %
	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	
До 2-х років	0	2	3	12	15	23	15	19	10	16	4	34	2	6	4	14	
Від 2-х до 6-ти років	0	6	10	39	36	20	53	40	5	11	6	25	5	12	7	26	35
Старші за 6 років	6	11	3	49	48	50	15	41	7	17	12	41	20	8	27	60	45
Всього	6	19	16	100	99	93	83	100	22	44	22	100	27	26	38	100	100

В таблиці 3.2 представлений аналіз поширення дисфункцій сук залежно від розміру. Серед сук великих розмірів частіше всього (46,2%) діагностується кістозне переродження матки та яєчників, проте неплідність та ациклічні і поліциклічні статеві цикли у цієї групи тварин спостерігаються у найменшій кількості.

У 61,5% сук маленьких розмірів встановлено випадки піометри, проте як у собак середніх розмірів відповідний показник становить лише 13,5%, що в 4,6 разів менше. Також прояв ациклії та поліциклії в 50% випадків був встановлений у сук дрібних порід, в той час як у сук великих порід цей показник становив лише 15,9%.

Таблиця 3.2.

Поширення дисфункцій у сук протягом трьох років та залежно від розміру

Дані про тварин	Види дисфункцій																
	Неплідність не встановленої етіології				Піометра				Ациклія або поліциклія				Кістозне переродження яєчників і матки				В середньому за розміром, %
	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	
Великі	0	5	1	15	25	25	19	25	2	2	10	16	11	9	22	46	
Середні	6	10	2	44	16	10	11	13	8	15	7	34	13	6	7	29	22
Малі	0	4	13	41	58	58	53	62	12	27	5	50	3	11	9	25	51
Всього	6	19	16	100	99	93	83	100	22	44	22	100	27	26	38	100	100

У сук середніх розмірів відсутні виражені розбіжності у відсотках прояву дисфункцій в порівнянні з іншими групами собак, проте у цієї групи вищий за інші групи відсоток прояву неплідності – 43,9% проти 41,55% – у сук малих порід. Також у сук середніх розмірів більше, ніж у великих порід (але менше, ніж у малих порід) проявляється ациклія та поліциклія.

Аналіз впливу способу утримання собак на прояв дисфункції репродуктивної функції представлений в таблиці 3.3. Встановлено виражене збільшення відсотку сук з проявом дисфункції при їх утриманні в умовах квартири.

Так, за квартирної утримання неплідність встановлена у 68,3% тварин в умовах приватного будинку – 31,7%. Прояв піометри також частіше реєструється у сук в умовах квартири (65,1%) в порівнянні з утриманням в приватних будинках (34,9%). У 2,5 рази випадки ациклії та поліциклії та в 3,0 рази кістозного переродження матки та яєчників спостерігаються частіше у сук за квартирної

утримання. В середньому за квартирного способу утримання прояв дисфункцій становить 68,3%, а за утримання в умовах приватного будинку – 31,7%.

Таблиця 3.3

Поширення дисфункцій у сук протягом трьох років та залежно від способу утримання

Дані про спосіб утримання тварин	Види дисфункцій																В середньому залежно від способу утримання, %
	Неплідність не встановленої етіології				Піометра				Ациклія або поліциклія				Кістозне переродження яєчників і матки				
	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	
Квартира	2	12	14	68	57	67	55	65	14	33	16	72	19	20	29	75	68
Приватний будинок	4	7	2	32	42	26	28	35	8	11	6	28	8	6	9	25	32
Всього	6	19	16	100	99	93	83	100	22	44	22	100	27	26	38	100	100

В таблиці 3.4 представлені дані поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від сезону року. Аналізуючи середні показники поширення усіх дисфункцій, слід зазначити, що частіше всього, а саме у 33,3% досліджених тварин вони проявлялися у весняний період. Серед дисфункцій у весняний період 42,2% прояву пов'язано з піометрою, 26,8% – з неплідністю та

майже однаковий відсоток прояву пов'язаний з порушенням циклічності статевого циклу (21,6%) та кістозним переродженням матки та яєчників (20,9%).

Таблиця 3.4

Поширення дисфункцій у сук протягом трьох років та залежно від сезону року

Періоди року	Види дисфункцій																В середньому залежно від сезону, %
	Неплідність не встановленої етіології				Піометра				Ациклія або поліциклія				Кістозне переродження яєчників і матки				
	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	2021	2022	2023	% від загальної кількості	
Осіній	0	7	1	19	23	16	17	21	4	21	4	33	7	10	7	26	24
Зимовий	0	5	10	37	18	18	14	18	1	5	8	16	5	2	7	15	19
Весняний	5	3	3	27	46	28	42	42	10	5	4	22	6	8	5	22	33
Літній	1	4	2	17	12	31	10	19	7	13	6	29	9	6	19	37	24
Всього	6	19	16	100	99	93	83	100	22	44	22	100	27	26	38	100	100

Найменший відсоток (18,8%) тварин з дисфункцією репродуктивної системи встановлений в зимовий період. В цей період серед дисфункцій 36,6% випадків було пов'язано з неплідністю, 18,2% – з піометрою і 15,9% та 15,4% – з

порушеннями кратності статевих циклів та кістозним переродженням матки та яєчників, відповідно. В літній період у сук в 37,4% діагностувалося кісти на яєчниках та в матці, а в 29,5% – ациклічні та поліциклічні статеві цикли. В літній період року лише в 17,1% тварин встановлена неплідність, проти 36,6% – в зимовий період. Для осіннього періоду найбільш вираженим було прояв ациклічних та поліциклічних статевих циклів, в цей період відносна кількість таких тварин становила 33,0%, що є найбільшим показником в порівнянні з іншими сезонами року.

Отже, результати отриманих даних щодо поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від віку, способу утримання, розміру та сезону року вказують на залежність прояву вищевказаних чинників від тієї чи іншої форми дисфункції. Найбільш вираженим критерієм прояву дисфункції репродуктивної системи, за яким проявляється високий ступінь залежності і, ймовірно, прогностичності – це вік та розмір тварини та спосіб їх утримання. Слід зазначити, що сезон року також є впливовим чинником на прояв дисфункції, але переважно це пов'язано з піометрою у весняний період року.

3.2. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу

Адекватність перебігу статевого циклу у сук є фізіологічно важливим оскільки пов'язано з передачею геному від батьків, можливості зберегти вид та певні породні якості. Морфологічні зміни відбуваються не тільки в репродуктивних органах та гонадах, але і в цілому організмі, особливо, імунній системі, оскільки ембріон з точки зору імунітету розглядається як імуноген.

3.2.1 Результати дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів, абсолютної кількості лейкоцитів, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів протягом статевого циклу

Нейтрофіли є високорухливими фагоцитами, які служать початковими ефекторами проти патогенів і активно залучаються до місць запалення.

Хемоатрактанти направляють їх до запалення, а їх взаємодія з ендотеліальними клітинами направляє їх через посткапілярні венули в тканини [308]. Динаміка кількісних змін популяції нейтрофілів протягом дослідного періоду представлена на рисунку 3.1.

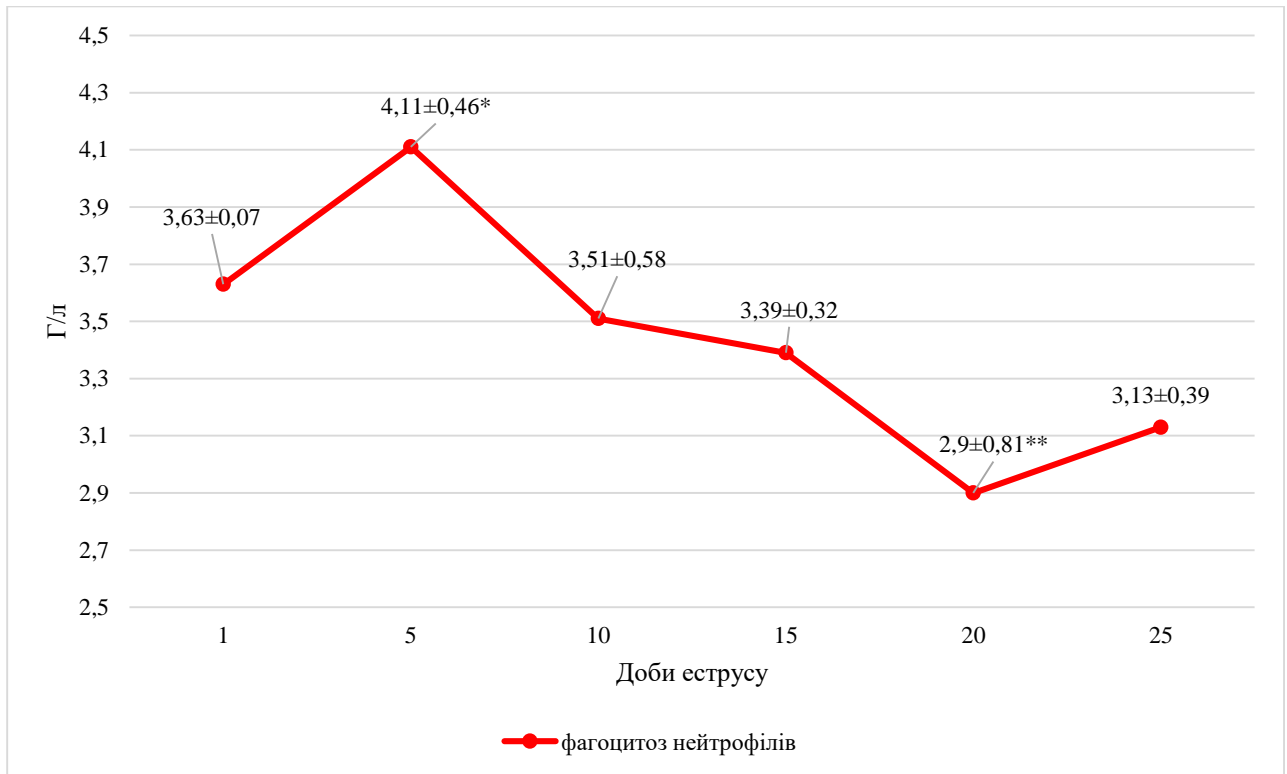


Рис. 3.1. Динаміка фагоцитарної активності нейтрофілів протягом статевого циклу у сук (n=8)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняно з першим днем еструсу

Фізіологічні межі ФАН у собак коливаються в межах 55-65 % від абсолютної кількості цих клітин. Здатність нейтрофілів до фагоцитозу змінювалась протягом естрального циклу наступним чином (Рисунок 3.1). Так, на 5-ту добу цей показник достовірно збільшився ($p < 0,05$) на 13% порівняно з першим днем і становив $4,11 \pm 0,46$ Г/л. Аналіз подальшої динаміки вказує на тенденцію до зниження ФАН, і в період з 15-ої до 20-ої доби встановлено значне його зниження, до 16%. За наступні 5 днів спостереження за ФАН визначено, що відповідний показник підвищився з $2,9 \pm 0,81$ до $3,13 \pm 0,39$ Г/л.

Протягом еструсу динаміка АКЛ мала тенденцію до зниження (рисунок 3.2). Так, з 1-ої по 25-ту добу цей показник зменшився на 2,6 Г/л (21%). Проте популяції різних клітин мали неоднакову закономірність. Так, на фоні загальної тенденції зниження АКЛ, на 5-ту добу вміст нейтрофілів мав тенденцію до

збільшення, а лімфоцитів – до зменшення. Також в незначній мірі встановлено зменшення популяції моноцитів. На 10-ту добу еструсу тенденцію до зниження мали всі популяції досліджуваних клітин, а на 15 добу кількість лімфоцитів збільшується на 13%, а у нейтрофілів зберігається тенденція зниження.

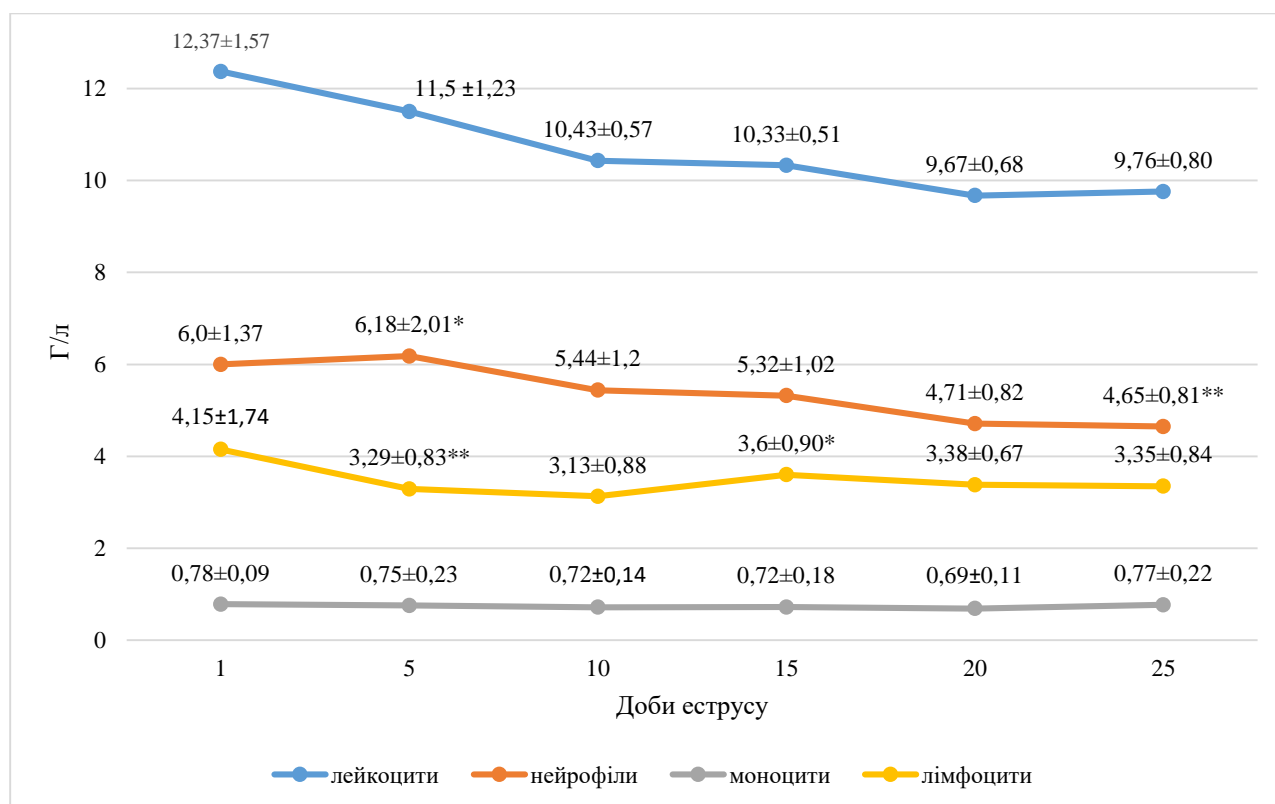


Рис. 3.2 Динаміка АКЛ, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів протягом статевого циклу у сук (n=8)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ в порівнянні з першим днем еструсу

Незначне збільшення АКЛ на 25-ту добу еструсу відбувається на фоні збільшення абсолютної кількості моноцитів. Хоча кількість нейтрофілів мала незначну (на 2%) тенденцію до зниження на 25-ту добу, при цьому показник ФАН навпаки на 7% збільшився.

3.2.2. Результати дослідження динаміки Т-лімфоцитів їх імунорегуляторних субпопуляцій, В-лімфоцитів, природних кілерних лімфоцитів та імунорегуляторного індексу протягом статевого циклу

Динаміка абсолютної кількості Т- та В-лімфоцитів, як основних представників адаптивного клітинного імунітету, представлена на рисунку 3.3.

Основні зміни показників протягом статевого циклу були характерні для Т-лімфоцитів. В перший день статевого циклу їх абсолютна кількість складала $2,41 \pm 0,11$ Г/л, що в 5,9 рази більше за абсолютну кількість В-лімфоцитів. Протягом перших 10-ти діб статевого циклу (цей період характерний для фолікулярної фази) абсолютна кількість Т-лімфоцитів мала достовірну ($p < 0,05$) тенденцію до зниження і на 10-ту добу становила $1,87 \pm 0,47$ Г/л, зменшення відбулося на 0,54 Г/л.

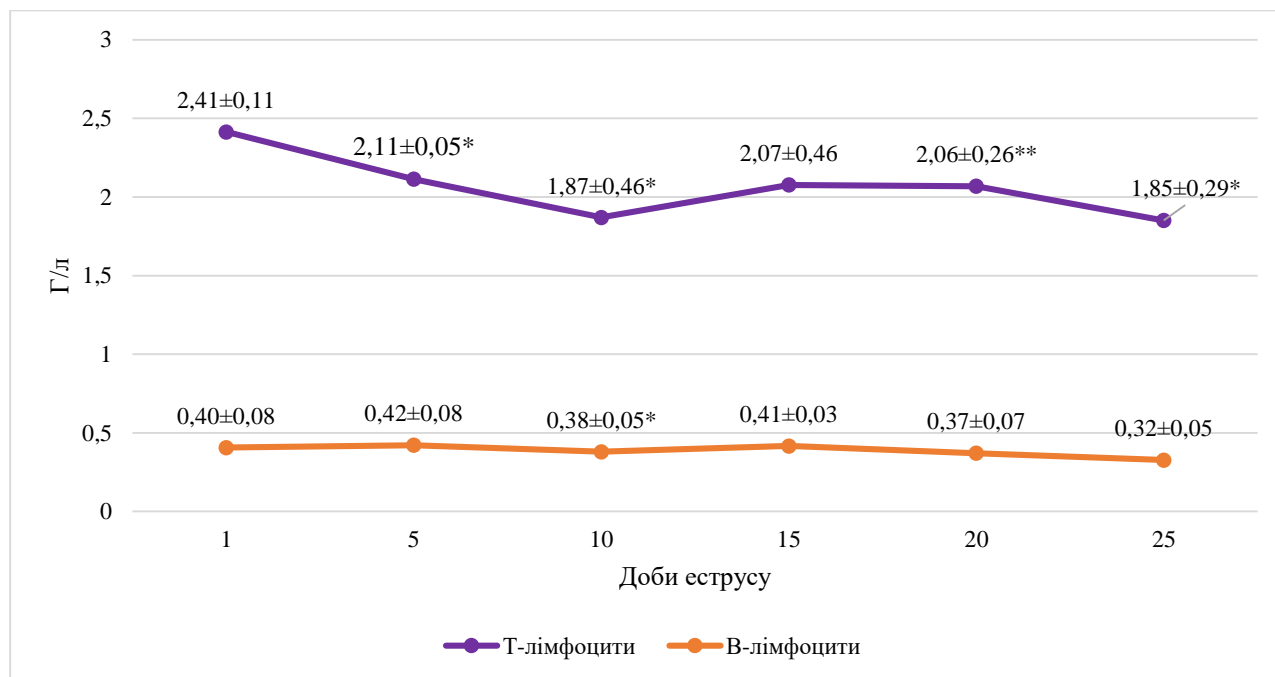


Рис. 3.3. Динаміка абсолютної кількості Т- та В-лімфоцитів протягом статевого циклу у сук (n=8)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ в порівнянні з першим днем еструсу

З 10-ї до 20-ї доби статевого циклу встановлена динаміка збільшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів з $1,87 \pm 0,47$ Г/л до $2,07 \pm 0,26$ Г/л з подальшим достовірним ($p < 0,05$) зменшенням до $1,85 \pm 0,29$ Г/л. Стосовно абсолютної кількості В-лімфоцитів, протягом фолікулярної фази (перші 10 діб) встановлено незначне збільшення на 5-ту добу – з $0,40 \pm 0,09$ Г/л до $0,42 \pm 0,84$ Г/л з подальшим зменшенням до $0,38 \pm 0,05$ Г/л на 10-ту добу. Під час лютеальної фази статевого циклу встановлено збільшення популяції В-лімфоцитів до $0,41 \pm 0,03$ Г/л на 15-ту добу з подальшим зниженням цього показника до $0,32 \pm 0,05$ Г/л на 25-ту добу.

На рисунку 3.4. відображена динаміка субпопуляції Т-лімфоцитів протягом статевго циклу. Протягом перших 10-ти діб, що характерні для фолікулярної фази статевго циклу, абсолютна кількість Т-хелперних та Т-супресорних лімфоцитів мали достовірну ($p < 0,05$) тенденцію до зниження. При цьому, слід зазначити, що абсолютна кількість Т-хелперних лімфоцитів знизилась на 16% (з $1,82 \pm 0,06$ Г/л до $1,52 \pm 0,04$ Г/л), а абсолютна кількість Т-супресорних лімфоцитів – на 36% (з $0,53 \pm 0,04$ Г/л до $0,34 \pm 0,07$ Г/л).

За лютеальної фази (після 10-ї доби) встановлена динаміка до збільшення абсолютної кількості Т-хелперних та Т-супресорних клітин. З 10-ї до 15-ї доби абсолютна кількість Т-хелперів збільшилась на $0,36$ Г/л (на 15%), а абсолютна кількість Т-супресорів – на $0,06$ Г/л, що також становило 15%.

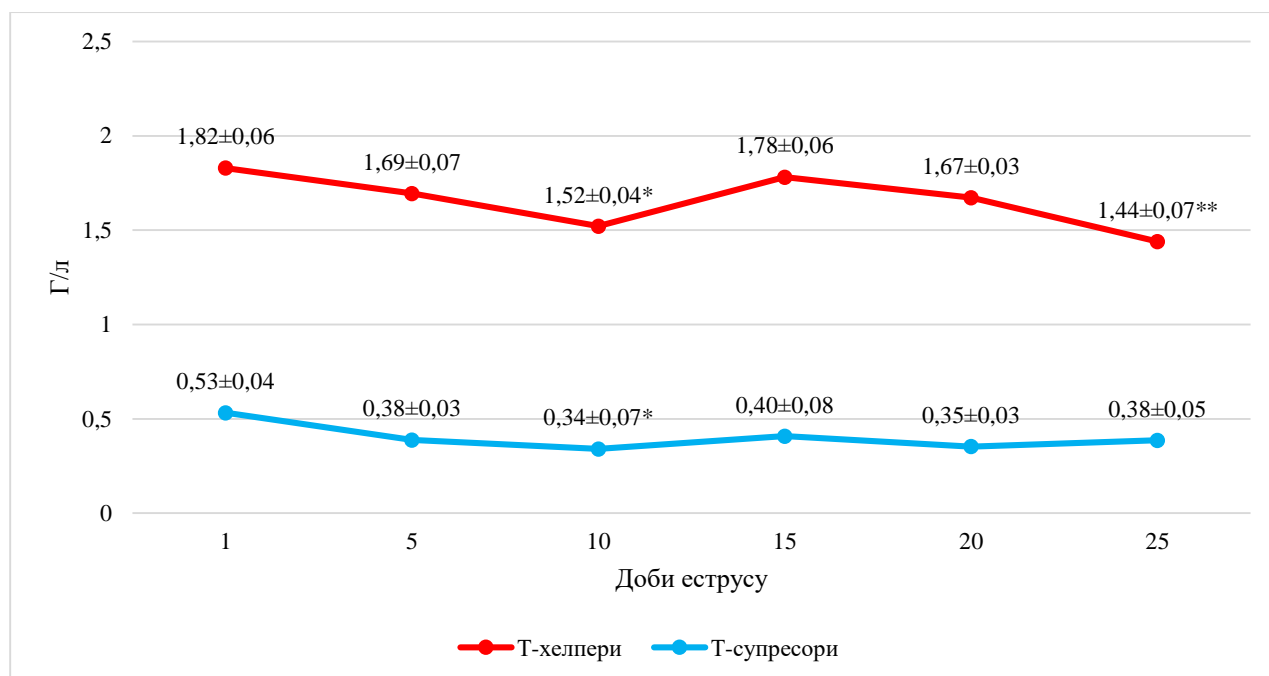


Рис. 3.4. Динаміка абсолютної кількості Т- хелперів та Т-супресорів протягом статевго циклу у сук (n=8)

*Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ в порівнянні з першим днем еструсу*

З 15-ої по 25-ту добу статевго циклу (лютеальна фаза) встановлена тенденція до зменшення ($p < 0,001$) субпопуляції Т-хелперних лімфоцитів з $1,78 \pm 0,06$ Г/л до $1,44 \pm 0,07$ Г/л (на 19%). Абсолютна кількість Т-супресорних лімфоцитів мала незначну тенденцію до зменшення, яка була в межах від 5 до 10%.

Оцінка динаміки інтегрального показника, а саме імунорегуляторного індексу (Тх/Тс) активності клітинної ланки імунітету протягом статевого циклу визначена на рисунку 3.5. Слід зазначити, що за фолікулярної фази встановлено збільшення цього показника з $3,43 \pm 0,36$ Г/л до $4,46 \pm 0,57$ Г/л ($p < 0,05$) на 5-у добу і протягом наступних 5-ти днів спостереження зменшення відбулося в межах 1 %. За лютеальної стадії статевого циклу до 15 доби встановлена динаміка до зменшення імунорегуляторного індексу, а з 15-ї до 25-ї – підвищення цього показника з $4,3 \pm 0,80$ Г/л до $4,7 \pm 0,64$ Г/л.

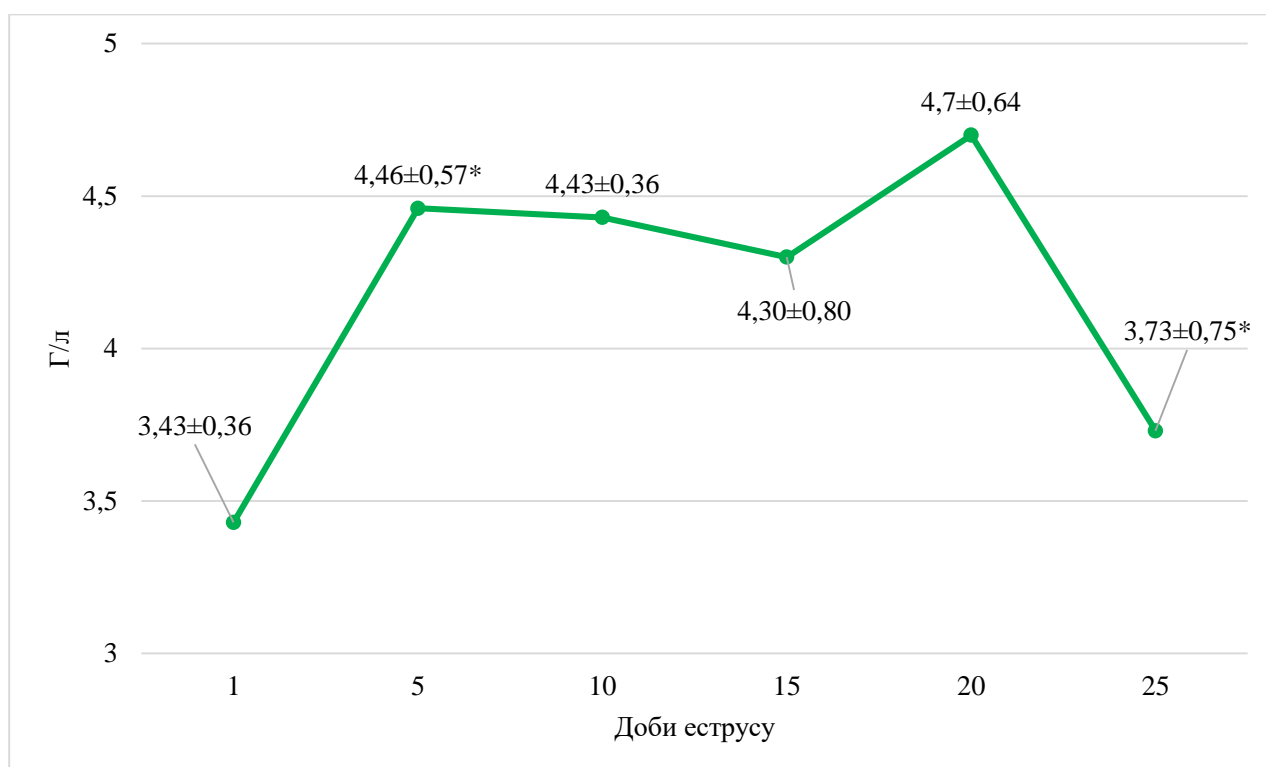


Рис. 3.5. Динаміка показника імунорегуляторного індексу протягом статевого циклу у сук (n=8)

Примітка: * $p < 0,05$; в порівнянні з першим днем статевого циклу

Подальше спостереження з 20-ої до 25-ої доби характеризувалось значним достовірним ($p < 0,05$) зниженням ІРІ з $4,7 \pm 0,64$ Г/л до $3,73 \pm 0,75$ Г/л.

На відміну від Т- та В-лімфоцитів, природні кілерні клітини (рисунок 3.6), які відображають вроджений клітинний імунітет, мали тенденцію до зниження в динаміці протягом фолікулярної фаз статевого циклу (перші 10 днів).

За лютеальної фази абсолютна кількість цих клітин в динаміці мала незначне збільшення з 10-ої до 20-ої доби (на 8%), а саме з $0,34 \pm 0,07$ Г/л до $0,37 \pm 0,04$ Г/л. Подальше спостереження встановило незначне зменшення (на 25-ту добу) абсолютної кількості цих клітин.

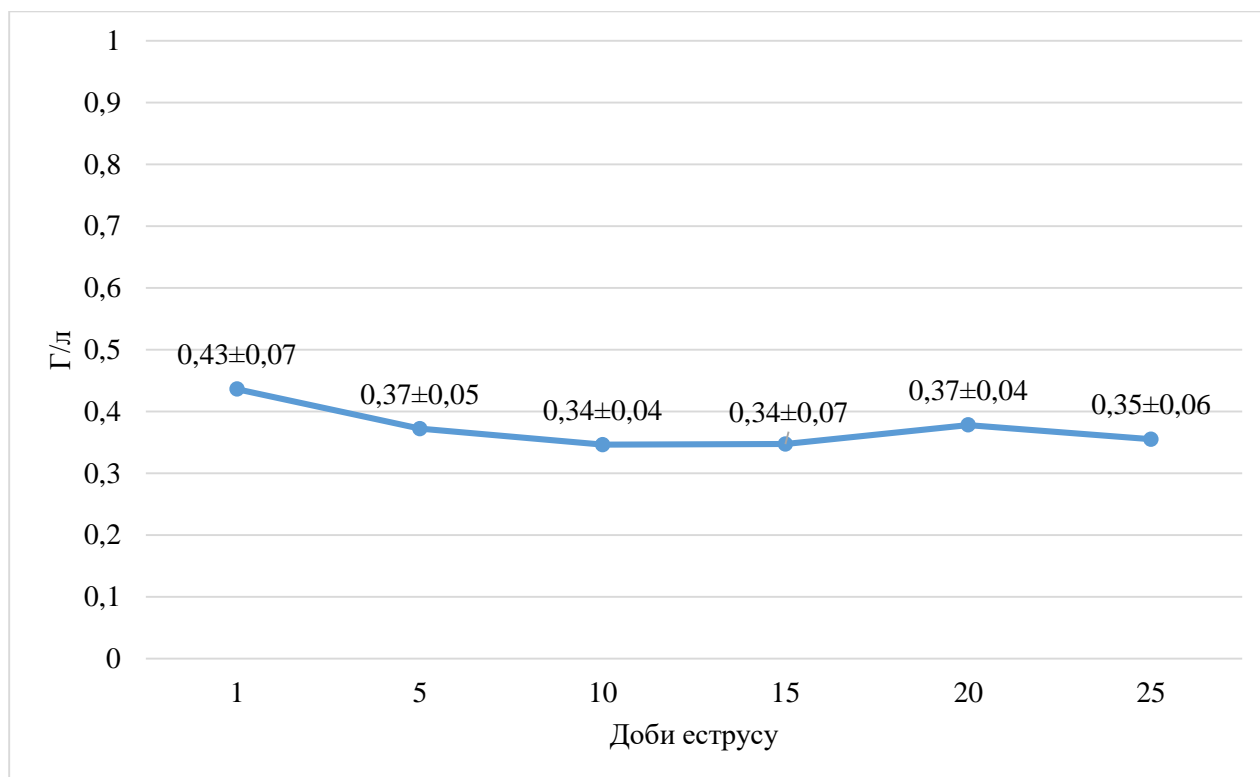


Рис. 3.6. Динаміка абсолютної кількості природних кілерних лімфоцитів протягом статевого циклу у сук (n=8)

*Примітка: * $p < 0,05$; в порівнянні з першим днем статевого циклу*

Отже за результатами аналізу динаміки показників клітинної ланки вродженого і адаптивного імунітету за умов статевого циклу у сук встановлено, що більш реактогенними є клітини адаптивного імунітету а саме Т- лімфоцити. Для фолікулярної фази характерним є зменшення абсолютної кількості цих клітин в основному за рахунок Т-хелперної субпопуляції. Для лютеїнової фази статевого циклу було характерним початкове збільшення популяції Т-лімфоцитів з подальшим зниженням їх абсолютної кількості.

3.3. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від віку та сезону року

Ендокринні порушення статевого циклу сук виявляються не тільки дисфункціональними розладами циклічності та відтворювальної функції, але і розладами в імунній системі, як в самих репродуктивних органах, так і в організмі в цілому. На прояв дисфункцій у відтворенні собак впливають порода та вік, але при цьому обмаль інформації щодо впливу сезону року на перебіг статевого циклу та можлива закономірність виникнення розладів в репродуктивній системі.

3.3.1 Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від віку

Аналіз отриманих результатів показав, що вміст абсолютної кількості лімфоцитів в крові сук на першу добу естрального циклу не мав достовірної різниці між групами. Подальший аналіз цього показника до 15-ої доби циклу показує зменшення його кількості у тварин обох груп. На 15-ту добу циклу встановлено тенденцію до збільшення абсолютної кількості лімфоцитів у сук віком до 2 років з $8,7 \pm 1,0$ Г/л до $9,12 \pm 0,91$ Г/л, проте у сук віком від 2 до 6 років зберіглась динаміка до зменшення цього показника. В подальшому спостереженні, до 25-ої доби циклу динаміка до зменшення цього показника була у тварин обох груп. За результатами визначення вмісту абсолютної кількості нейтрофільних гранулоцитів в крові сук за естрального циклу встановлено наступне: у тварин віком до 2-х років до 10-ої доби циклу включно, спостерігалось зменшення цього показника; в цій самій групі відповідний показник мав незначне збільшення на 15-ту добу, а в подальшому до 25-ої доби – була тенденція до зменшення; у тварин віком від 2-х до 6-ти років цей показник не мав чіткої тенденції протягом естрального циклу, а мав хвилеподібну динаміку.

Не встановлено закономірних змін протягом естрального циклу в крові сук при визначенні абсолютної кількості лімфоцитів. Достовірні результати ($p < 0,05$)

цього показника отримані на 25-ту добу циклу. Аналіз абсолютної кількості моноцитів, як попередників місцевого клітинного імунітету, протягом естрального циклу у сук залежно від віку показав, що на першу добу цей показник мав високі достовірні значення ($p < 0,001$). На 5-у добу встановлено достовірні зміни між групами тварин. Більше виражена зміна абсолютної кількості цих клітин встановлена у сук до 2-х років в період з 5-ої до 10-ої доби циклу.

Таблиця 3.5

Динаміка абсолютної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів та їх фагоцитарної активності у сук протягом статевого циклу залежно від віку, (n=10) (M±m)

Доби еструсу	Групи тварин залежно від віку	Імунологічні показники, Г/л				
		Лейкоцити	Нейтрофіли	Лімфоцити	Моноцити	Фагоцитоз нейтрофілів
1 доба	до 2-х років	11,52±1,00	5,22±0,76	3,57±0,78	0,81±0,06**	3,38±0,84
	від 2 до 6 років	12,82±1,72	6,16±1,05	4,76±1,04	0,79±0,1	4,08±0,54
5 доба	до 2-х років	10,58±0,60	5,08±0,51	3,77±0,64	0,89±0,11**	3,24±0,37
	від 2 до 6 років	11,80±0,90	6,62±0,95	3,68±0,88	0,74±0,06	4,51±1,31
10 доба	до 2-х років	8,70±1,00	4,0±0,25	2,79±0,02	0,61±0,15	2,80±0,17
	від 2 до 6 років	10,38±0,63	5,66±1,09	3,29±0,29	0,66±0,12	3,60±0,59
15 доба	до 2-х років	9,12±0,91	4,30±0,20	3,29±0,10	0,68±0,02**	2,74±0,21
	від 2 до 6 років	9,80±1,25	4,63±0,21	3,38±0,63	0,66±0,15	3,32±0,29
20 доба	до 2-х років	8,20±0,68	3,10±0,43	2,82±0,23	0,57±0,06	2,11±0,56
	від 2 до 6 років	9,02±2,03	4,94±0,56	3,14±0,68	0,69±0,13	3,26±0,43
25 доба	до 2-х років	8,54±0,35	4,01±0,095	3,07±0,04*	0,54±0,05	2,87±0,13
	від 2 до 6 років	8,94±1,09	4,69±0,91	2,77±0,67	0,67±0,09	3,13±0,45

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Фагоцитарна активність нейтрофілів протягом циклу у собак до 2-х років мала тенденцію до зниження. Так з 3,38±0,84 Г/л на 1-у добу циклу абсолютна

кількість активних нейтрофілів знизилась до $2,11 \pm 0,56$ Г/л на 20-ту добу. У тварин в віці від 2-х до 6-ти років з 1-ої по 5-ту добу цей показник мав тенденцію до збільшення, а при подальшому аналізі він знижувався.

В таблиці 3.6 представлені дані динаміки лімфоцитів та їх імунорегуляторних субпопуляцій протягом статевого циклу залежно від віку. В першу добу статевого циклу у сук до 2-х років встановлена менша кількість Т-лімфоцитів (на $0,81$ Г/л) в порівнянні дорослими тваринами.

Таблиця 3.6

Динаміка абсолютної кількості Т- та В-лімфоцитів, НК лімфоцитів у сук протягом статевого циклу, залежно від віку ($M \pm m$) (n=10)

Доби еструсу	Групи тварин залежно від віку	Імунологічні показники, Г/л				
		Т-лімфоцити	Т-хелпери	Т-супресори	В-лімфоцити	НК-лімфоцити
1 доба	до 2-х років (n=5)	$2,07 \pm 0,56$	$1,72 \pm 0,32$	$0,38 \pm 0,07^*$	$0,40 \pm 0,10^*$	$0,35 \pm 0,06$
	від 2 до 6 років (n=5)	$2,88 \pm 0,68$	$2,22 \pm 0,55$	$0,61 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,11$	$0,50 \pm 0,03$
5 доба	до 2-х років	$2,23 \pm 0,30$	$1,81 \pm 0,20$	$0,42 \pm 0,11$	$0,43 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,04$
	від 2 до 6 років	$2,37 \pm 0,53$	$1,88 \pm 0,40$	$0,44 \pm 0,10$	$0,51 \pm 0,11$	$0,41 \pm 0,11$
10 доба	до 2-х років	$1,70 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,03$
	від 2 до 6 років	$1,97 \pm 0,35$	$1,57 \pm 0,31$	$0,39 \pm 0,08$	$0,42 \pm 0,09^{**}$	$0,36 \pm 0,08$
15 доба	до 2-х років	$1,91 \pm 0,06$	$1,44 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,01$
	від 2 до 6 років	$1,89 \pm 0,4$	$1,59 \pm 0,54$	$0,37 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,07$
20 доба	до 2-х років	$1,84 \pm 0,27$	$1,43 \pm 0,21$	$0,35 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,06$
	від 2 до 6 років	$1,78 \pm 0,33$	$1,46 \pm 0,28$	$0,30 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,05$	$0,36 \pm 0,05$
25 доба	до 2-х років	$1,93 \pm 0,18^{**}$	$1,53 \pm 0,20^{**}$	$0,38 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,02^{**}$	$0,38 \pm 0,05^{**}$
	від 2 до 6 років	$1,47 \pm 0,3$	$1,12 \pm 0,20$	$0,33 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,05$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Достовірно ($p < 0,05$) в 1,6 рази менше було абсолютної кількості Т-супресорів та у 1,5 рази В-лімфоцитів – у сук до 2-х років. Різниця в абсолютній

кількості Т-лімфоцитів на 5-ту добу між суками до 2-х років та суками від 2-х до 6-ти років зменшилась до 6%, при цьому різниця в кількості Т-супресорів становила лише 0,02 Г/л.

На 10-ту добу статевого циклу встановлено зменшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів у сук в обох групах, відносно до 5-ї доби. У сук до 2-х років зменшення встановлено на 24%, а в дорослих – на 27%. Більш вираженим достовірне ($p < 0,001$) зменшення кількості лімфоцитів спостерігалось у субпопуляції Т-хелперів та В-лімфоцитів, на відміну від Т-супресорів та НК-лімфоцитів, де кількісне зменшення становило 0,09 Г/л та 0,04 Г/л у молодих, та 0,05 Г/л – у сук від 2-х до 6-ти років.

Подальша динаміка абсолютної кількості Т-лімфоцитів у молодих сук мала тенденцію до збільшення з 10-ї до 15-ї доби, з 15-ї до 20-ї доби встановлено зменшення і з 20-ї до 25-ї – тенденція до збільшення. У сук від 2-х до 6-ти років з 10-ї до 15-ї доби статевого циклу встановлена тенденція до збільшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів, в подальшому (до 25-ї доби) встановлена тенденція до зменшення. Більш виражені зміни в кількості лімфоцитів на 25-ту добу стосувалися Т-хелперних клітин та НК-лімфоцитів. Достовірна різниця між групами на 25-ту добу становила 27% ($p < 0,001$) для Т-хелперів та 29% ($p < 0,001$) – для НК-лімфоцитів.

Для характеристики динаміки імунорегуляторного індексу (Рисунок 3.7) варто відзначити, що цей показник підвищувався з 1-ї до 5-ту доби у тварин обох груп.

Подальше спостереження встановило значне зменшення ІРІ у сук до 2-х років з $4,52 \pm 0,70$ на 5-ту добу – до $3,34 \pm 0,05$ на 15-ту і достовірне ($p < 0,05$) збільшення до $4,02 \pm 0,10$, яке зберіглося до 25-ї доби. Для сук від 2-х до 6-ти років ІРІ з 5-ї до 15-ї доби був практично незмінним ($p < 0,001$), але з 15-ї до 20-ї доби встановлено значне збільшення – до $4,9 \pm 0,42$ і подальше різке зниження – до $3,44 \pm 0,24$.

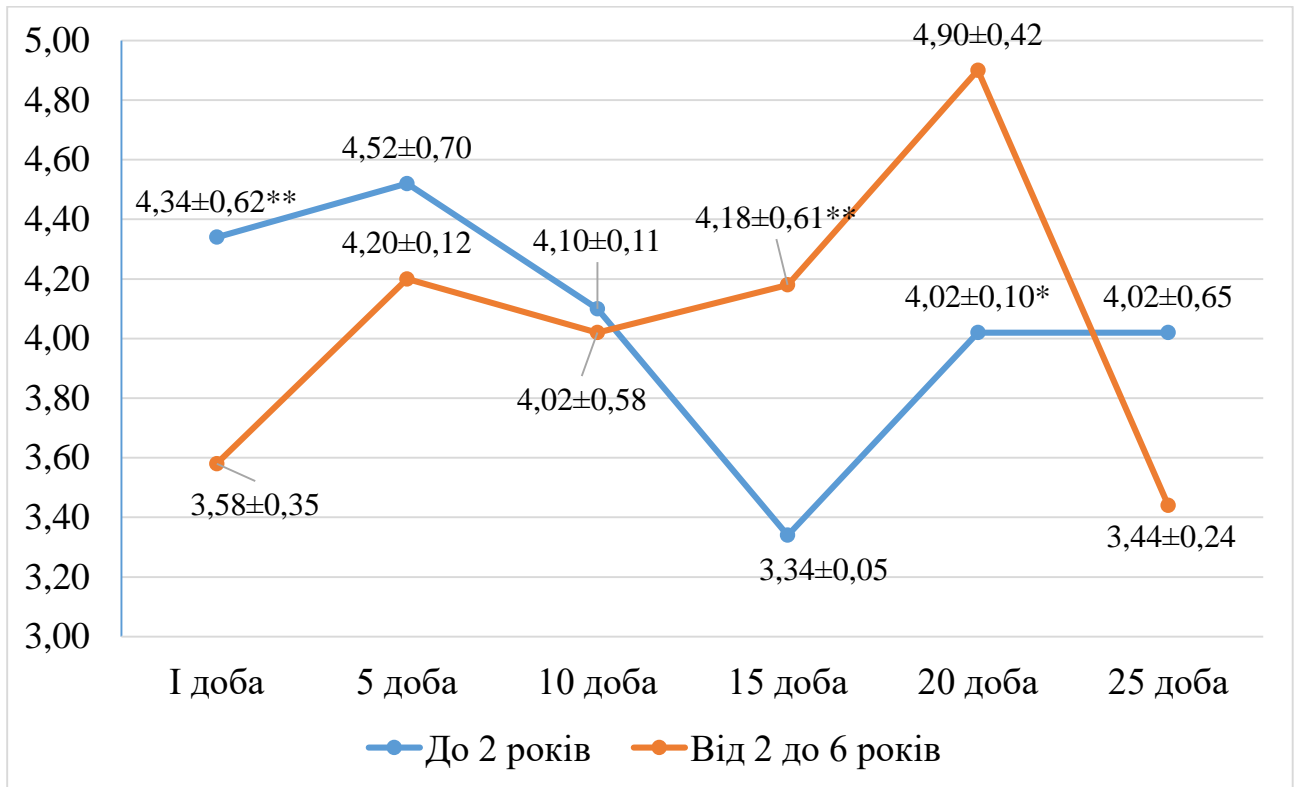


Рис. 3.7. Динаміка імунорегуляторного індексу у сук протягом естрального циклу залежно від віку (n=10)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Отже, за результатами проведених досліджень встановлено, що у сук залежно від віку основні відмінності в показниках клітинної ланки імунітету протягом естрального циклу відбуваються з 1-ої по 10-ту добу. Встановлені достовірні зміни в динаміці агрануляторних лейкоцитів в порівнянні між різними віковими групами. Найбільш реактогенними протягом статевого циклу серед популяції лімфоцитів є Т-хелперні лімфоцити. Більш виражена імуносупресія була встановлена у сук від 2-х до 6-ти років на 25-ту добу статевого циклу.

3.3.2. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від сезонів року

Аналіз отриманих результатів показав, що вміст абсолютної кількості лейкоцитів в крові сук у осінній період протягом перших п'яти діб естрального циклу мав тенденцію до зниження, а саме з $12,4 \pm 1,74$ Г/л до $10,96 \pm 0,91$ Г/л. В той самий період естрального циклу навесні зниження абсолютної кількості

лейкоцитів було значно меншим, а саме з $11,9 \pm 0,56$ Г/л до $11,68 \pm 0,94$ Г/л. Більш виражене зменшення (на $2,18$ Г/л) абсолютної кількості лейкоцитів у весняний сезон встановлено з 5-ої до 10-ту доби і достовірна ($p < 0,05$) тенденція до зменшення відмічалася до 20-ої доби, на 25-ту добу статевого циклу цей показник мав тенденцію до збільшення. У осінній сезон динаміка вмісту абсолютної кількості лейкоцитів протягом статевого циклу мала тенденцію лише до достовірного ($p < 0,05$) зменшення (таблиця 3.7.).

Таблиця 3.7

Динаміка абсолютної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів та їх фагоцитарної активності у сук протягом статевого циклу залежно від сезону року (n=10) (M±m)

Доби еструсу	Групи тварин залежно від сезону	Імунологічні показники, Г/л				
		Абсолютна кількість лейкоцитів	Абсолютна кількість нейтрофілів	Абсолютна кількість моноцитів	Абсолютна кількість лімфоцитів	Фагоцитоз нейтрофілів
1 доба	Осінній	$12,40 \pm 1,74$	$5,24 \pm 0,73$	$0,82 \pm 0,07$	$4,17 \pm 0,49$	$3,08 \pm 0,59$
	Весняний	$11,90 \pm 0,56$	$6,4 \pm 1,15$	$0,80 \pm 0,07$	$3,97 \pm 0,62$	$4,20 \pm 0,35^*$
5 доба	Осінній	$10,90 \pm 0,91$	$4,90 \pm 0,30$	$0,74 \pm 0,19$	$3,86 \pm 0,57$	$3,19 \pm 0,34$
	Весняний	$11,60 \pm 0,94$	$6,04 \pm 0,54$	$0,84 \pm 0,08$	$3,77 \pm 0,08$	$4,05 \pm 1,06$
10 доба	Осінній	$10,20 \pm 0,60$	$4,64 \pm 0,38$	$0,65 \pm 0,11$	$3,57 \pm 0,51$	$3,11 \pm 0,17$
	Весняний	$9,50 \pm 1,09$	$5,08 \pm 0,90$	$0,76 \pm 0,06$	$2,79 \pm 0,33^{**}$	$3,39 \pm 0,57$
15 доба	Осінній	$10,50 \pm 0,50$	$4,65 \pm 0,17$	$0,83 \pm 0,04$	$3,80 \pm 0,37$	$2,66 \pm 0,17$
	Весняний	$9,10 \pm 0,73^*$	$5,21 \pm 1,03$	$0,65 \pm 0,09^*$	$2,89 \pm 0,20^*$	$3,18 \pm 0,39^{**}$
20 доба	Осінній	$9,72 \pm 0,54$	$3,53 \pm 0,84$	$0,73 \pm 0,11$	$3,49 \pm 0,30$	$2,54 \pm 0,72$
	Весняний	$7,96 \pm 0,90^*$	$4,44 \pm 0,70$	$0,56 \pm 0,04^*$	$2,65 \pm 0,12^*$	$2,94 \pm 0,03$
25 доба	Осінній	$9,32 \pm 0,40$	$4,14 \pm 0,22$	$0,64 \pm 0,03$	$3,30 \pm 0,19$	$2,86 \pm 0,10$
	Весняний	$8,42 \pm 0,42$	$4,54 \pm 0,69$	$0,71 \pm 0,06$	$3,02 \pm 0,08$	$3,16 \pm 0,34$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

За результатами визначення вмісту абсолютної кількості нейтрофільних гранулоцитів в крові сук за естрального циклу залежно від сезону року констатовано наступне: у тварин в осінній сезон відбувалось зменшення цього показника з 1-ї до 20-ої доби з незначним (0,61 Г/л) збільшенням на 25-ту добу; у сук за весняного періоду тенденція до зменшення цього показника була встановлена з 1-ї до 10-ї доби, з 10-ї до 15-ї доби встановлено незначне збільшення абсолютної кількості нейтрофілів, в подальшому до 25-ї доби цей показник мав тенденцію до зниження.

Аналіз абсолютної кількості моноцитів протягом естрального циклу залежно від сезону року показав, що в період з 1-ї до 10-ї доби в осінній сезон цей показник мав тенденцію до зменшення, на 15-ту добу встановлено підвищення на 0,18Г/л і в подальшому знову цей показник мав тенденцію до зменшення. Динаміка абсолютної кількості моноцитів протягом статевого циклу у весняний період була дещо іншою в порівнянні з осіннім сезоном, а саме встановлено збільшення цього показника з 1-ї до 5-ї доби, а також з 20-ї до 25-ї доби, а в період з 5-ї до 20-ї добу абсолютна кількість нейтрофілів зменшувалась.

Фагоцитарна активність нейтрофілів в період статевого циклу у сук залежно від сезону року мала протилежні значення в порівнянні з динамікою абсолютної кількості моноцитів. Так вміст нейтрофілів здатних до фагоцитозу в осінній сезон збільшувався з 1-ї до 5-ї доби та з 20-ї до 25-ту добу а з 5-ї до 20 добу мав тенденцію до зменшення. У весняний сезон статевий цикл у сук характеризувався тенденцією до зменшення абсолютної кількості фагоцитуючих нейтрофілів з 1-ї до 20-ї добу та незначним збільшенням на 25-ту добу.

З 1-ї по 5-ту добу як у весняний (на 14 %). так в і осінній (на 7%) період встановлено зниження абсолютної кількості Т-лімфоцитів (таблиця 3.8). Популяція В-лімфоцитів у сук в осінній період мала тенденцію до збільшення з 1-ї по 5-у добу, а у весняний період – до зниження.

З 5-ї до 10-ї доби зберігалася тенденція до зменшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів в середньому на 15% як у осінній, так і у весняний періоди. Така тенденція була характерна для усіх субпопуляції лімфоцитів. Подальші

спостереження встановили, що з 10-ї по 15-ту добу абсолютна кількість Т-лімфоцитів у осінній період збільшилась на 11%, при цьому кількість цих клітин у весняний період була незмінною ($p < 0,05$).

Таблиця 3.8

Динаміка абсолютної кількості Т- та В-лімфоцитів, НК лімфоцитів у сук протягом статевого циклу, залежно від сезону року (n=10) (M±m)

Доби еструсу	Групи тварин залежно від сезону	Імунологічні показники, Г/л				
		Т-лімфоцити	Т-хелпери	Т-супресори	В-лімфоцити	НК - лімфоцити
1 доба	Осінній	2,61±0,17	2,04±0,08	0,57±0,05	0,45±0,09	0,49±0,02
	Весняний	2,44±0,50	1,90±0,38	0,50±0,07	0,50±0,08	0,42±0,08
5 доба	Осінній	2,42±0,50	1,93±0,32	0,44±0,12	0,50±0,06	0,44±0,10
	Весняний	2,10±0,55	1,68±0,43	0,40±0,10	0,42±0,09	0,34±0,09
10 доба	Осінній	2,06±0,39	1,71±0,35	0,38±0,04	0,40±0,02	0,40±0,06
	Весняний	1,73±0,25	1,37±0,18	0,34±0,08	0,33±0,07	0,30±0,06**
15 доба	Осінній	2,31±0,33	2,00±0,50	0,46±0,02	0,49±0,08	0,37±0,07
	Весняний	1,72±0,10*	1,35±0,05**	0,34±0,05*	0,34±0,09**	0,29±0,01**
20 доба	Осінній	2,21±0,14	1,79±0,14	0,37±0,02	0,39±0,07	0,38±0,04
	Весняний	1,63±0,13*	1,33±0,10*	0,30±0,03*	0,34±0,01	0,32±0,06
25 доба	Осінній	2,03±0,09	1,60±0,14	0,41±0,04	0,36±0,02	0,39±0,04
	Весняний	1,43±0,23*	1,10±0,15*	0,31±0,05**	0,31±0,05	0,27±0,05*

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

З 15-ї по 25-ту добу у сук обох груп встановлено зниження абсолютної кількості Т- лімфоцитів ($p < 0,05$) в середньому на 14% в осінній період та на 17% – у весняний. Більш вираженими у весняний період ($p < 0,001$) зниження були характерні для Т- хелперних клітин в порівнянні з Т- супресорами. За цей період практично не змінилась кількість НК- лімфоцитів як у весняний, так і осінній період.

На рисунку 3.8. представлена динаміка імунорегуляторного індексу у сук протягом статевого циклу залежно від сезону року. Так, протягом періоду спостереження встановлена синхронна зміна цього показника, яка виражалася у збільшенні ІРІ з 1-ї до 5-ї доби, в подальшому цей показник до 15-ї доби мав тенденцію до зменшення в обох групах тварин. З 15-ї до 20-ї доби ІРІ збільшується в осінній період на 10%, а у весняний період на 15%. Подальшим дослідженням встановлено зменшення цього показника на 25-ту добу.

Дослідженням динаміки показників клітинної ланки імунітету протягом статевого циклу встановлено, що абсолютна кількості лейкоцитів, нейтрофілів, моноцитів, фагоцитарна активність нейтрофілів протягом статевого циклу залежно від сезону року мала достовірні різниці в період з 1-ї по 5-ту доби та з 20-ї по 25-ту добу.

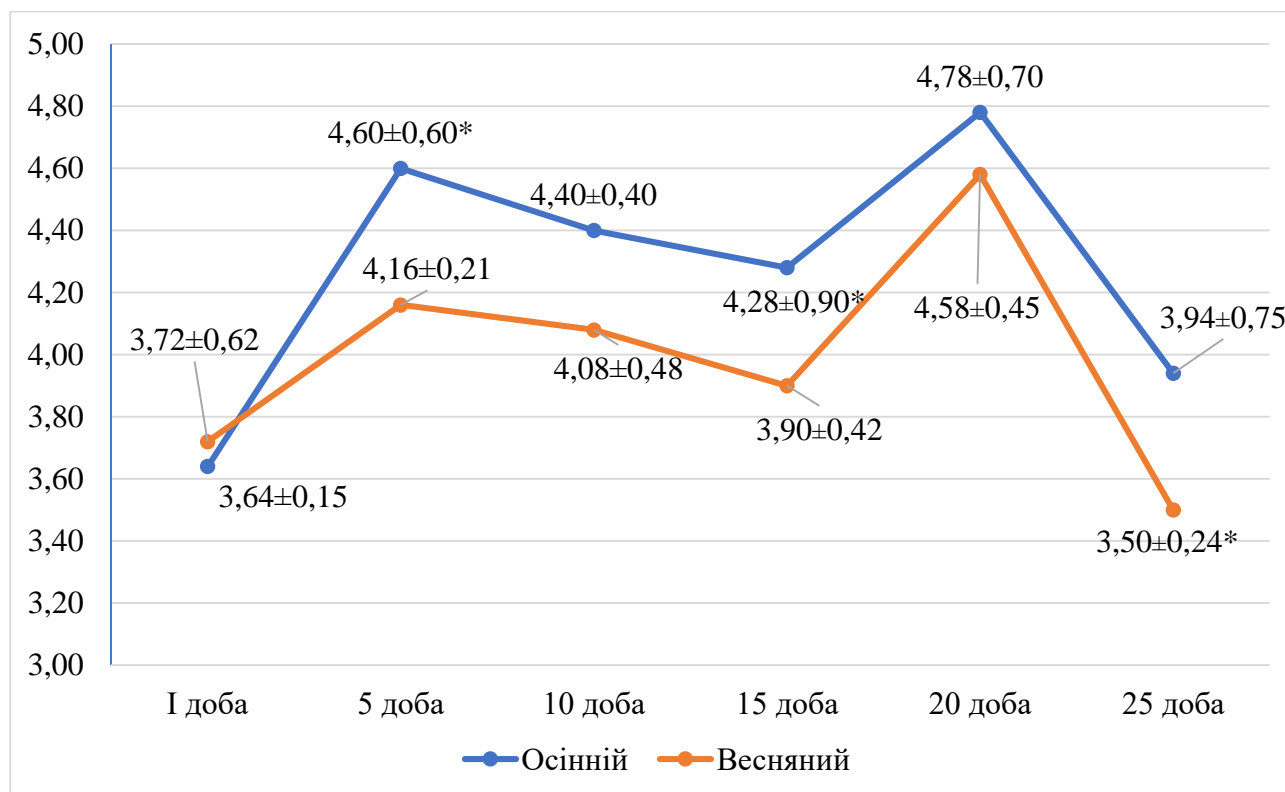


Рис. 3.8. Динаміка імунорегуляторного індексу у сук протягом статевого циклу залежно від сезону року (n=10)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Не встановлено суттєвої різниці в показниках абсолютної кількості Т- та В-лімфоцитів залежно від сезонів року, що мали синхронну тенденцію до зниження протягом фолікулярної та лютеальної фаз статевого циклу.

3.4. Дослідження динаміки гормональних показників у сук протягом статевого циклу

Перебіг статевого циклу у собак, як і у інших тварин, регулюється ендокринною системою. Основними регуляторними гормонами є статеві стероїди, синтез і активність яких знаходиться під контролем гіпоталамо-гіпофізарної системи. Фізіологічно протягом статевого циклу настає овуляція, яка за присутності чоловічої гамет переходить у вагітність. Для успішної вагітності недостатньо лише запліднення, а потрібна і метаболічна перебудова в організмі, яка регулюється не тільки статевими, але і іншими гормонами.

3.4.1. Дослідження вмісту прогестерону та естрадіолу в сироватці крові сук протягом статевого циклу та залежно від віку і сезону року

Аналіз вмісту прогестерону в сироватці крові сук мав обумовлені зміни протягом еструсу (Рисунок 3.9.).

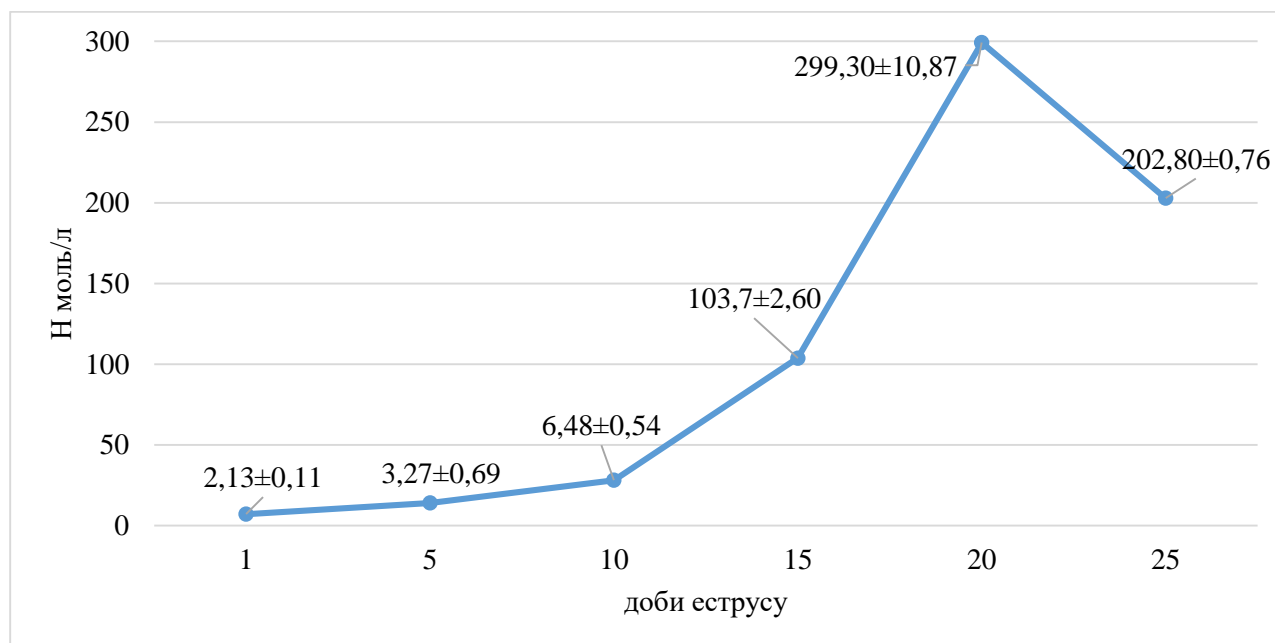


Рис. 3.9. Динаміка вмісту прогестерону в сироватці крові за статевого циклу (n=4)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняно з першим днем еструсу

Так, на 1-у добу циклу в середньому його концентрація була $2,13 \pm 0,11$ Нмоль/л, що є характерним для анеструсу. В процесі динаміки наступних п'яти днів відмічене незначне збільшення вмісту прогестерону до $3,27 \pm 0,69$ Нмоль/л.

На 10-ту добу еструсу вміст відповідного гормону достовірно збільшився ($P \leq 0,05$) до $6,48 \pm 0,54$ нмоль/л. Такий вміст характерний для початкової стадії лютеїнової фази еструсу. Процес визначення концентрації прогестерону в сироватці крові на 15-ту добу еструсу показав, що він значно (в 16 разів) збільшився, порівнюючи з 10-ою добою. Відповідна тенденція до збільшення вмісту прогестерону зберіглася і в наступні 5 діб спостереження. Тому вже на 20-ту добу цей показник становив $299,30 \pm 10,87$ нмоль/л. Після 20-ї доби еструсу відмічалось зниження концентрації в сироватці крові прогестерону, на 25-ту спостерігалось зменшення до $202,80 \pm 0,76$ нмоль/л.

Естрадіол є нейроактивним гормоном. Так як ліпофільні стероїдні молекули легко проходять через гематоенцефалічний бар'єр – то його концентрація в плазмі супроводжується паралельними змінами концентрації в мозку, що впливає на поведінкову реакцію у тварин в процесі еструсу. Вивчення концентрації естрадіолу в сироватці крові сук за еструсу дало можливість визначити його зміни, відображені на рисунку 3.10.

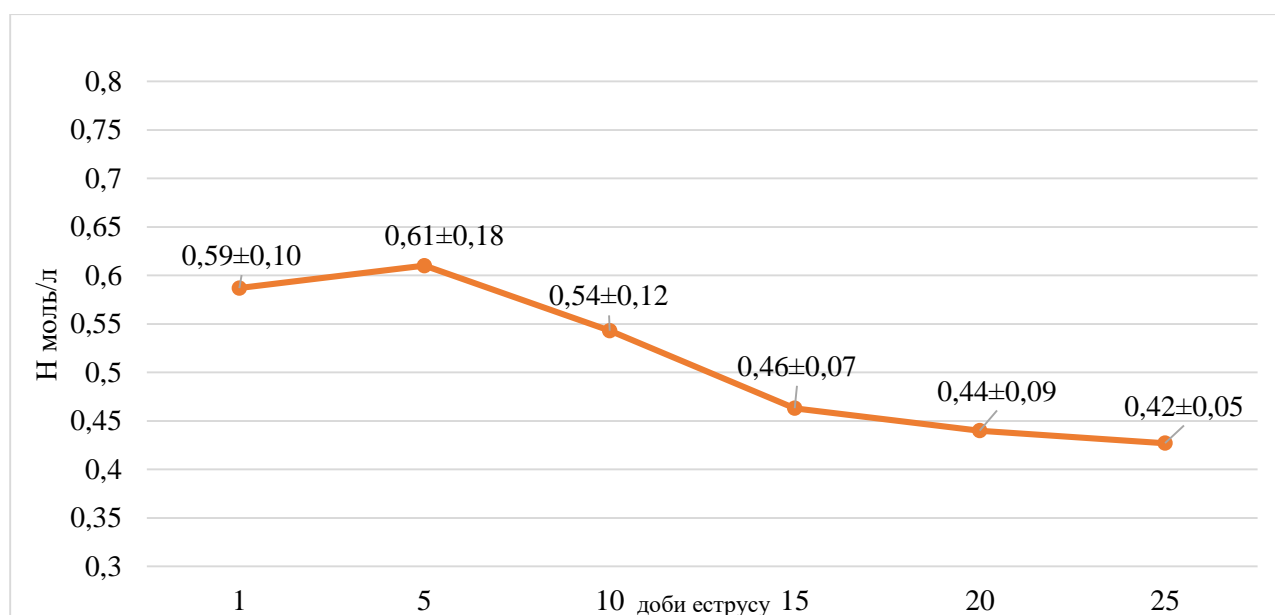


Рис 3.10. Динаміка вмісту естрадіолу в сироватці крові протягом статевих циклів (n=4)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняно з першим днем еструсу

Можна стверджувати, що в першу добу вміст відповідного гормону становив $0,59 \pm 0,10$ нмоль/л. Це характерно для фолікулярної фази статевого циклу. Вже на 5-ту добу відмічена недостовірною тенденція до збільшення його концентрації до $0,61 \pm 0,18$ нмоль/л, а вже на 10-ту – зменшення до $0,54 \pm 0,12$ нмоль/л. В подальшому за умови різкого збільшення вмісту прогестерону, концентрація естрадіолу продовжувала поступово знижуватися та на 15-ту добу знизилась до $0,46 \pm 0,07$ нмоль/л, на 20-ту – до $0,44 \pm 0,09$ нмоль/л і на 25-ту – до $0,42 \pm 0,05$ нмоль/л.

3.4.2. Дослідження вмісту кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові сук протягом статевого циклу

Глюкокортикоїди, які також відомі як гормони стресу, є головним фізіологічним інструментом в екологічних дослідженнях і допомагають в оцінці стану здоров'я організму.

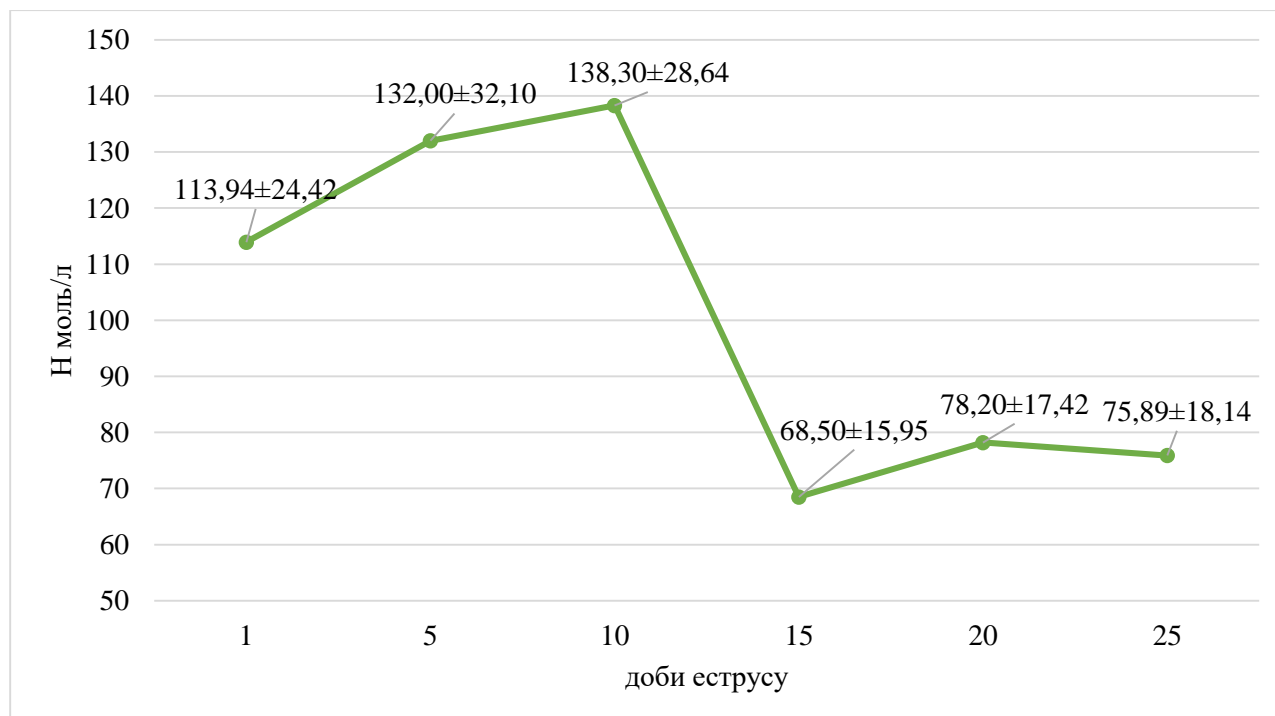


Рис 3.11. Динаміка вмісту кортизолу в сироватці крові протягом статевого циклу (n=10)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняно з першим днем еструсу

Аналіз динаміки вмісту кортизолу в сироватці крові протягом еструсу показав, що відповідний гормон знаходився у фізіологічних межах (рисунок 3.11). Так, з 1-ї по 10-ту добу відмічалось збільшення його концентрації з $113,94 \pm 24,42$ нмоль/л до $138,30 \pm 28,64$ нмоль/л. Вже з 15-ї доби спостерігалось суттєве зниження концентрації відповідного гормону в сироватці крові до $68,50 \pm 15,95$ нмоль/л. З 15-ї до 25-ї доби концентрація кортизолу мала тенденцію до збільшення, але в межах 10 нмоль/л.

Гормони щитоподібної залози також мають доведену дію на секрецію гормонів, що беруть участь у відтворенні та підтримці вагітності.

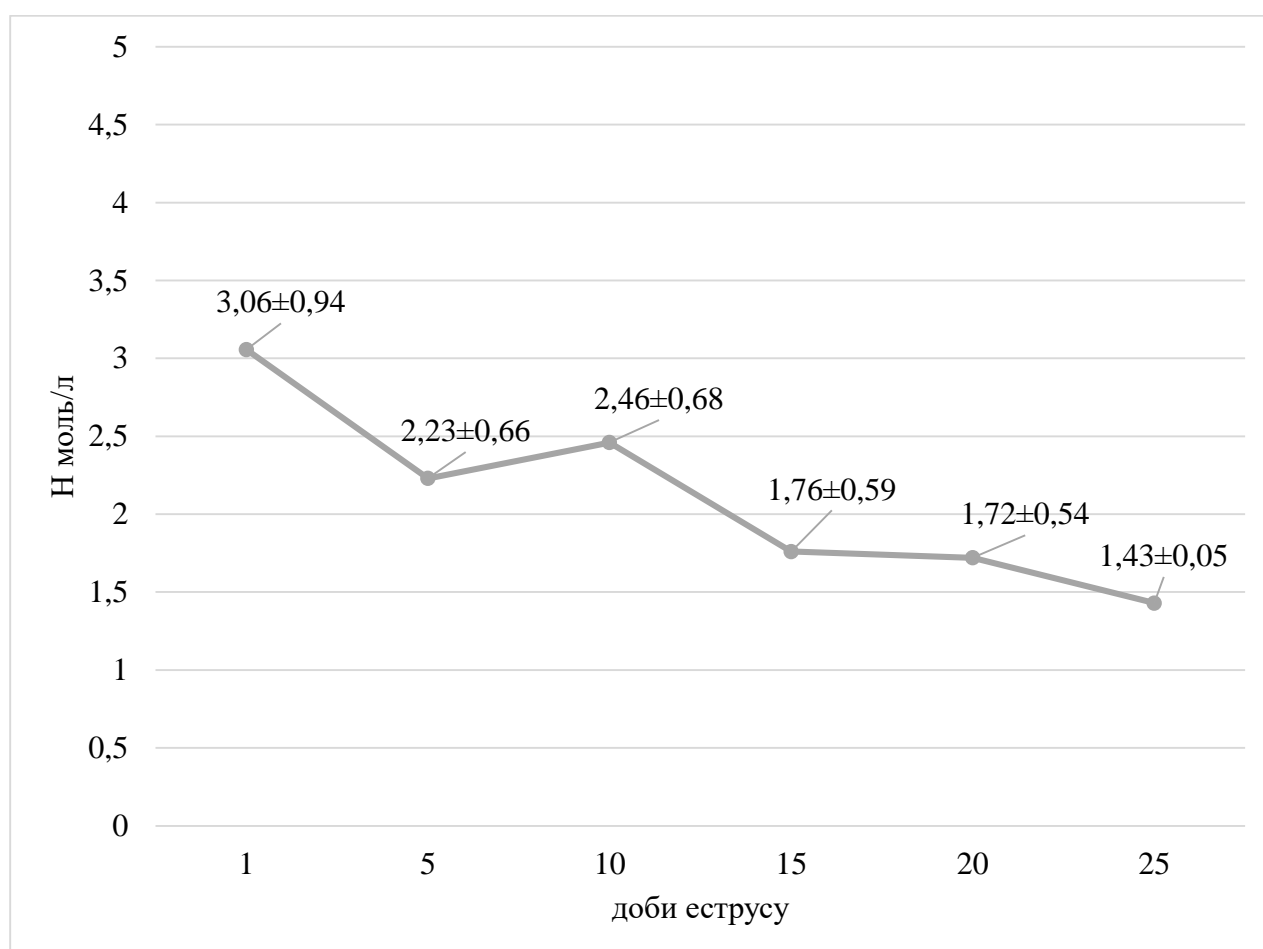


Рис. 3.12. Динаміка вмісту трийодтироніну в сироватці крові протягом статевого циклу (n=10)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняно з першим днем еструсу

У першу добу еструсу концентрація трийодтироніну в сироватці крові становила $3,06 \pm 0,94$ нмоль/л, що є дещо більшим за фізіологічні межі (рисунок 3.12). При подальшому аналізі спостерігалась тенденція до поступового

зниження відповідного гормону в сироватці крові протягом еструсу. Також відмічалось незначне збільшення концентрації Т3 на 10-ту добу циклу.

3.4.3. Дослідження вмісту прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові сук протягом статевого циклу, залежно від сезону року

Дані щодо аналітичних досліджень з визначення залежності між вмістом статевих стероїдів в крові сук протягом статевого циклу та сезонами року показано в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

Динаміка вмісту статевих стероїдів у сироватці крові сук протягом статевого циклу, залежно від сезону року (n=10), (M±m)

Періоди року		Осінній (n=5)		Весняний (n=5)	
Показники, нмоль/л		Прогестерон	Естрадіол	Прогестерон	Естрадіол
Доби статевого циклу	1-а	2,08±0,09	0,58±0,13	2,06±0,42	0,68±0,15
	5-а	3,72±0,92	0,71±0,13	6,42±0,60	0,67±0,13
	10-а	5,90±0,85*	0,80±0,21**	49,8±6,42	0,52±0,11
	15-а	42,40±3,87**	0,53±0,04	135,60±16,31	0,46±0,08
	20-а	293,60±7,76*	0,45±0,05	95,55±7,48	0,43±0,08
	25-а	182,68±24,2	0,56±0,13	155,33±19,77	0,47±0,08

Примітка: * p<0,05; **p<0,001 порівняння між групами

В першу добу циклу не встановлено різниці вмісту прогестерону в сироватці крові залежно від сезону року. На 5-ту добу дослідження відмічається, що у сук в весняний сезон вміст цього гормону в сироватці крові є в 1,7 рази більшим, ніж у осінній. Подальші визначення вмісту прогестерону показують, що з настанням лютеальної фази статевого циклу (в середньому на 10-ту добу після початку статевого циклу), вміст прогестерону в сироватці крові у сук у весняний сезон збільшився порівняно з 5-ю добою в 7,8 разів. На 10-ту добу

циклу у сук в осінній сезон вміст прогестерону становив $5,90 \pm 0,85$ Нмоль/л ($p < 0,05$), що у 8,4 рази менше, ніж у тварин у весняний сезон. В подальшому (на 15-ту добу статевого циклу) встановлено збільшення ($p < 0,001$) вмісту прогестерону в сироватці крові до $42,40 \pm 3,87$ Нмоль/л у сук в осінній та до $135,60 \pm 16,31$ Нмоль/л – у весняний сезон.

У сук в осінній сезон на 20-ту добу статевого циклу відмічається значне збільшення вмісту прогестерону (в 6,9 рази), проте у весняний сезон навпаки концентрація цього гормону в сироватці крові знижується з $135,6 \pm 16,31$ Нмоль/л до $95,55 \pm 7,48$ Нмоль/л. Подальші дослідження встановили зменшення концентрації прогестерону в сироватці крові сук в осінній сезон – з $293,60 \pm 7,76$ Нмоль/л до $182,68 \pm 24,20$ Нмоль/л, в той час як в крові у сук в весняний сезон, вміст цього гормону навпаки збільшився.

Дослідження вмісту естрадіолу у сироватці крові сук протягом статевого циклу за різного сезону показали, що його концентрація з 1-ї до 10-ї доби мала тенденцію до збільшення у сук в осінній сезон – з $0,58 \pm 0,13$ Нмоль/л до $0,80 \pm 0,21$ Нмоль/л ($p < 0,001$), при подальшому визначенні з 10-ї до 25-ї доби – тенденцію до зменшення.

Стосовно концентрації естрадіолу в крові у сук в весняний сезон варто зауважити, що з 1-ї до 20-ї доби показник мав тенденцію до зменшення і з незначним збільшенням на 25-ту добу.

Порівнюючи динаміку вмісту кортизолу в сироватці крові сук за різного сезону (рисунк 3.13) слід зазначити, що у сук в весняний період на першу добу статевого циклу він був на 26% більший, ніж у сук в осінній період. Подальші спостереження встановили тенденцію до збільшення концентрації цього гормону в крові до 5-ї доби статевого циклу. Після 5-ї до 10-ї доби у весняний період зберіглася тенденція до збільшення вмісту кортизолу в сироватці крові, а в осінній період – навпаки динаміка мала тенденцію до зниження ($p < 0,05$).

З 10 до 15-ї доби у сук обох груп концентрація в сироватці крові кортизолу мала тенденцію до зниження, при цьому встановлено, що у сук в осінній сезон в 1,5 рази його вміст був меншим. Після 15-ї доби у тварин як в осінній, так і у

весняний період вміст кортизолу в крові збільшувався. При цьому встановлено, що у весняний період це збільшення було більш вираженим – з $72,76 \pm 13,37$ Нмоль/л до $106,18 \pm 15,82$ Нмоль/л ($p < 0,05$)

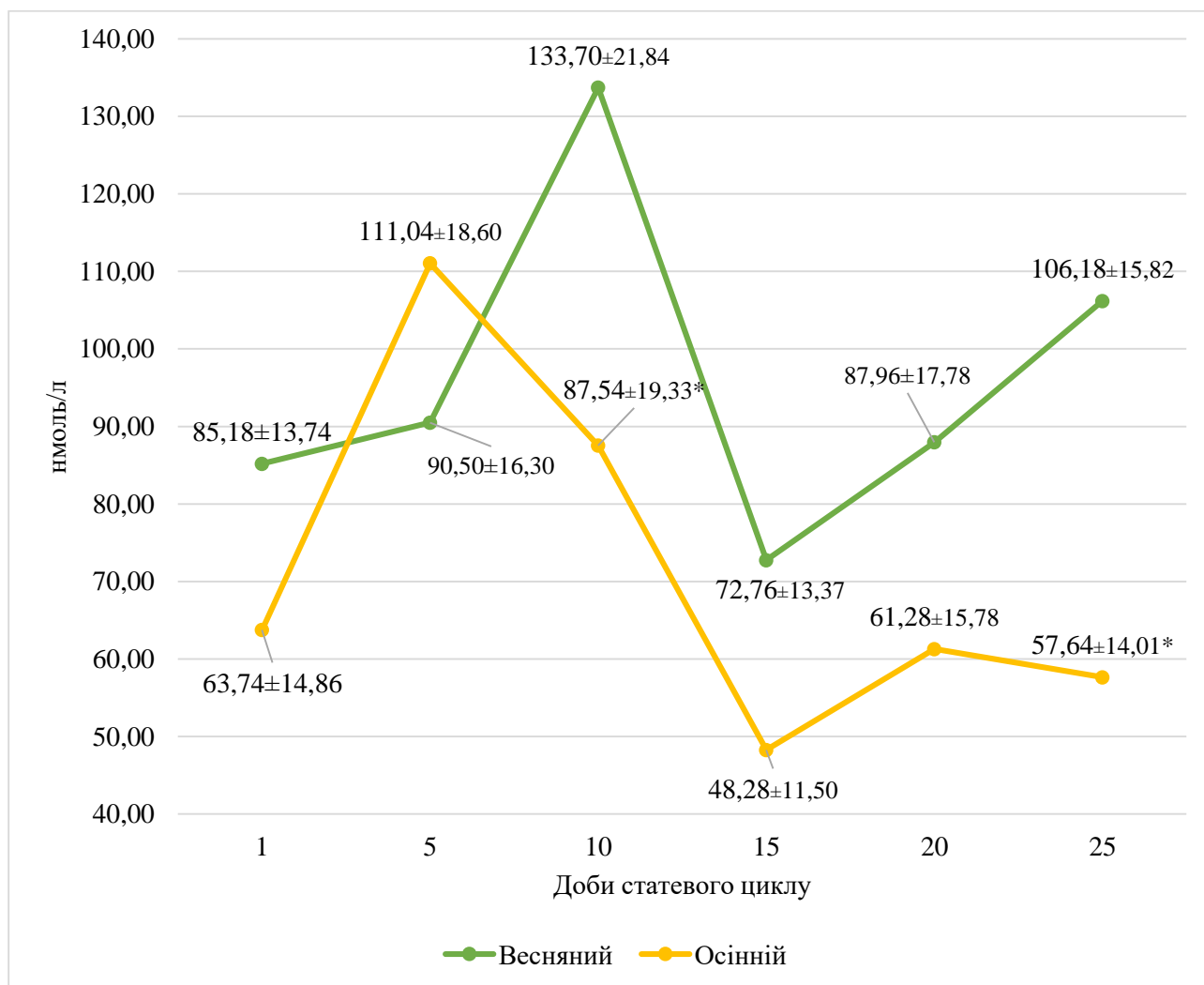


Рис. 3.13. Динаміка концентрації кортизолу в сироватці крові протягом статевого циклу в різні сезони року (n=10)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Не встановлено вираженої різниці у вмісті трийодтироніну в сироватці крові у сук протягом статевого циклу залежно від сезону року (рисунок 3.14). Так, протягом перших 10-ти діб статевого циклу у тварин обох груп концентрація цього гормону не мала суттєвої різниці і зменшувалась в динаміці.

Подальші визначення концентрації цього гормону в сироватці крові протягом статевого циклу також не встановили вірогідної різниці між сезонами року. Динаміку вмісту відповідного гормону до 20-ї доби мала тенденцію до

зниження у весняний період і з незначним збільшенням (на 0,1 Нмоль/л) з 15-ї до 20-ї доби у осінній період.

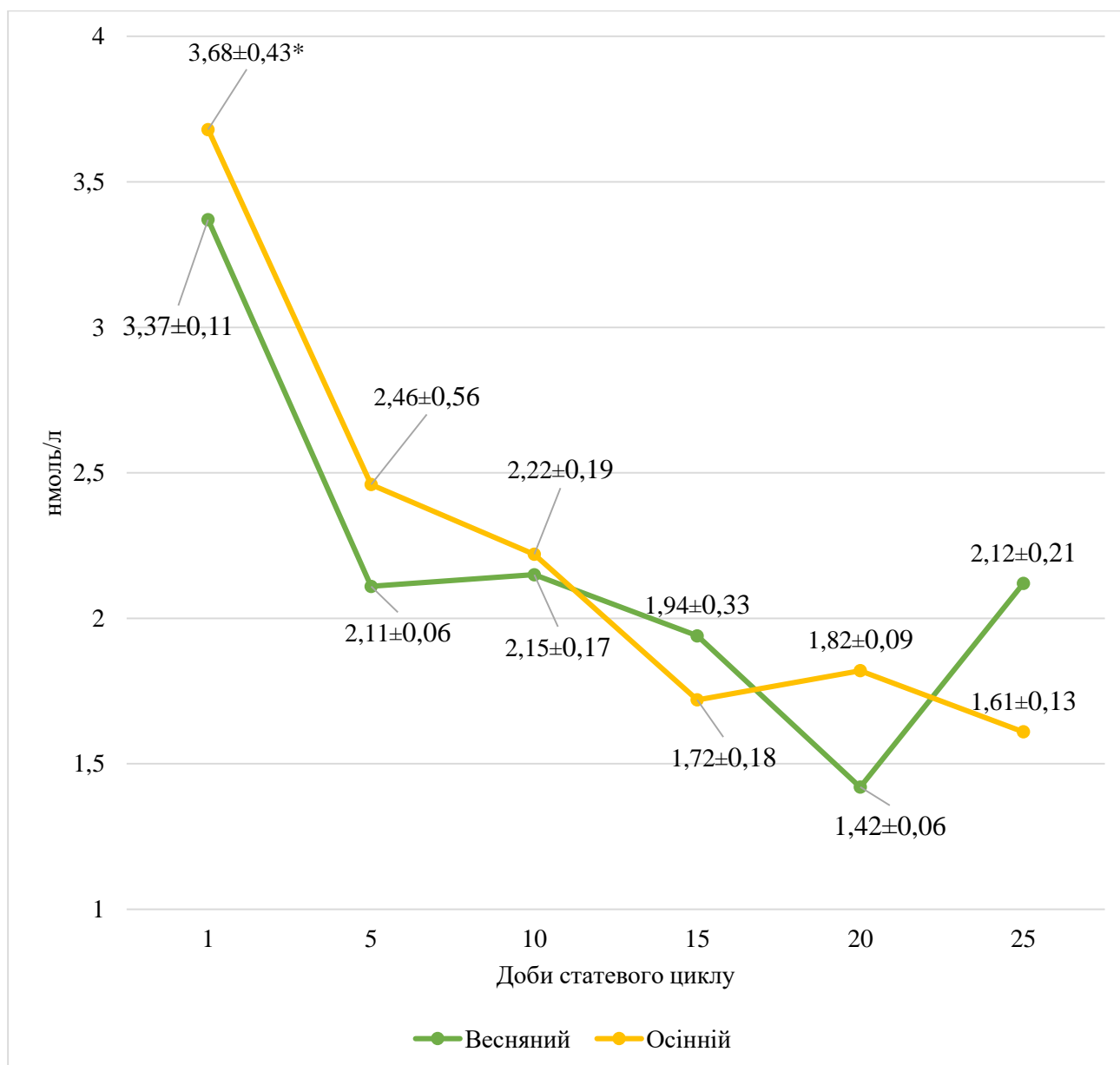


Рис. 3.14. Динаміка вмісту трийодтироніну в сироватці крові протягом статевого циклу в різні сезони року

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Отже, дослідження вмісту статевих стероїдів, а також кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові у сук протягом статевого циклу за різних сезонів показав, що в осінній період фолікулярна фаза статевого циклу має триваліший період, ніж у весняний, а лютеальна фаза перебігає з більшим вмістом прогестерону в сироватці крові. Вміст кортизолу в сироватці крові був

вищий у сук в весняний період, при цьому не встановлено достовірної різниці у концентрації трийодтироніну в сироватці крові сук за різного сезону року.

3.4.4. Дослідження вмісту прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові сук протягом статевого циклу, залежно від віку

Дані щодо аналітичних досліджень з визначення залежності між вмістом статевих стероїдів у крові сук протягом статевого циклу та їх віком наведено в таблиці 3.10.

У першу добу циклу не встановлено різниці вмісту прогестерону в сироватці крові залежно від віку. На 5-ту добу дослідження відмічається, що у сук до 2-років вміст цього гормону в сироватці крові в 1,8 рази став більшим, ніж від 2-ої до 6-ти років. Подальші визначення вмісту прогестерону показують, що на 10-ту добу статевого циклу, вміст прогестерону в сироватці крові у сук від 2-ох до 6-ти років збільшився в порівнянні з 5-ою добою в 3,7 рази, проте у сук до 2-х років – у 2,2 рази. На 15-ту добу циклу у сук до 2-х років вміст прогестерону становив $43,00 \pm 3,40$ Нмоль/л ($p < 0,001$), що у 3,2 рази менше, ніж у тварин віком від 2-х до 6-ти років. В подальшому (на 20-ту добу статевого циклу) встановлено збільшення ($p < 0,001$) вмісту прогестерону в сироватці крові до $153,00 \pm 18,88$ Нмоль/л у сук до 2- років та до $282,60 \pm 45,17$ Нмоль/л – у сук в у віці від 2-х до 6-ти років.

Таблиця 3.10

Динаміка вмісту статевих стероїдів у сироватці крові сук протягом статевого циклу залежно віку (n=10), (M±m)

Вік		До 2-х років (n=5)		Від 2-х до 6-ти років (n=5)	
Показники, нмоль/л		Прогестерон	Естрадіол	Прогестерон	Естрадіол
Доби статевого циклу	1-а	$1,89 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,12$	$2,42 \pm 0,49$	$0,59 \pm 0,13$
	5-а	$6,54 \pm 0,86$	$0,78 \pm 0,05$	$3,60 \pm 0,32$	$0,56 \pm 0,13^{**}$
	10-а	$14,56 \pm 1,90$	$0,84 \pm 0,13$	$13,34 \pm 1,56$	$0,44 \pm 0,07^*$
	15-а	$43,00 \pm 3,40$	$0,58 \pm 0,03$	$135,00 \pm 16,68^{**}$	$0,44 \pm 0,04^*$
	20-а	$153,00 \pm 18,88$	$0,51 \pm 0,06$	$282,60 \pm 45,17^{**}$	$0,41 \pm 0,04^{**}$
	25-а	$165,88 \pm 25,92$	$0,52 \pm 0,10$	$182,18 \pm 28,70$	$0,47 \pm 0,09$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

У сук до 2-х років на 25-ту добу статевого циклу відмічається незначне збільшення вмісту прогестерону на 7%, проте у віці від 2-х до 6-ти років навпаки концентрація цього гормону в сироватці крові знижується з $282,60 \pm 45,17$ Нмоль/л до $182,18 \pm 28,70$ Нмоль/л.

Дослідження вмісту естрадіолу у сироватці крові сук протягом статевого циклу за різного віку показали, що його концентрація з 1-ї до 10-ї доби мала тенденцію до збільшення у сук до 2-х років з $0,70 \pm 0,12$ Нмоль/л до $0,84 \pm 0,13$ Нмоль/л ($p < 0,05$), при подальшому визначені з 10-ї до 25-ї доби – тенденцію до зменшення. Стосовно концентрації естрадіолу в крові сук у віці від 2-х до 6-ти років варто зазначити, що з 1-ї до 20-ї доби відповідний показник мав тенденцію до зменшення і з незначним збільшенням на 25-ту добу.

Порівнюючи динаміку вмісту кортизолу в сироватці крові сук за різного віку (рисунок 3.15) слід зазначити, що у сук до 2-х років на першу добу статевого циклу він був в 2,9 рази менший, ніж у сук від 2-х до 6-ти років.

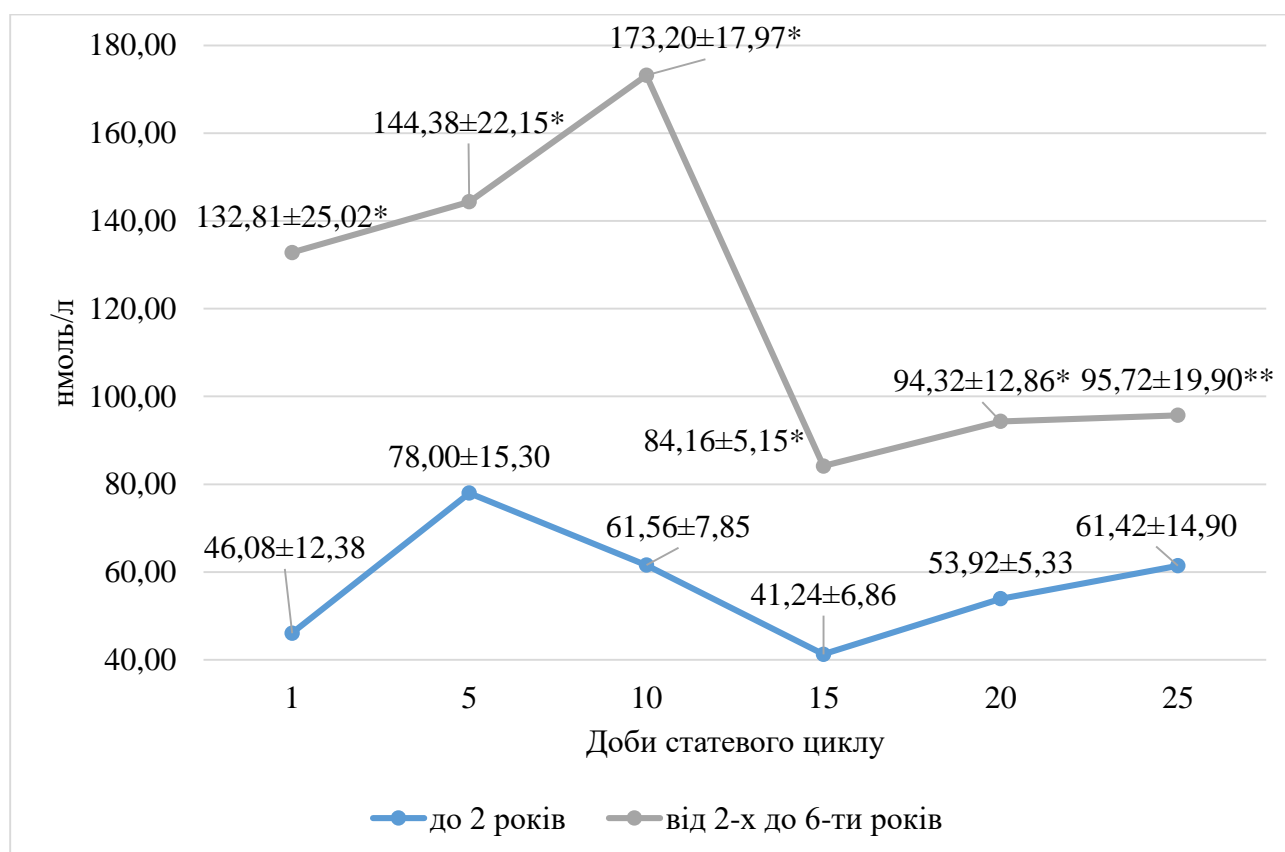


Рис 3.15. Динаміка вмісту кортизолу в сироватці крові протягом статевого циклу за різного віку (n=10)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Подальшими дослідженнями також встановлено, що протягом всього статевого циклу у сук до 2-ох років вміст кортизолу був меншим, ніж в групі від 2-х до 6-ти років. До 5-ї доби статевого циклу вміст кортизолу збільшувався у тварин обох груп. Подальші дослідження встановили, що у сук до 2-х років концентрація кортизолу зменшувалася з 5-ї до 15-ї доби на 48%, проте в групі від 2-х до 6-ти років з 5-ї до 10-ту добу встановлено збільшення його концентрації на 17%, але з 10-ї до 15-ї доби його концентрація зменшилась на 46%. З 15-ї до 25-ї доби у тварин обох груп була тенденція до незначного збільшення концентрації кортизолу.

На рисунку 3.16 відображено динаміку вмісту концентрації трийодтироніну в крові сук протягом статевого циклу за різного віку.

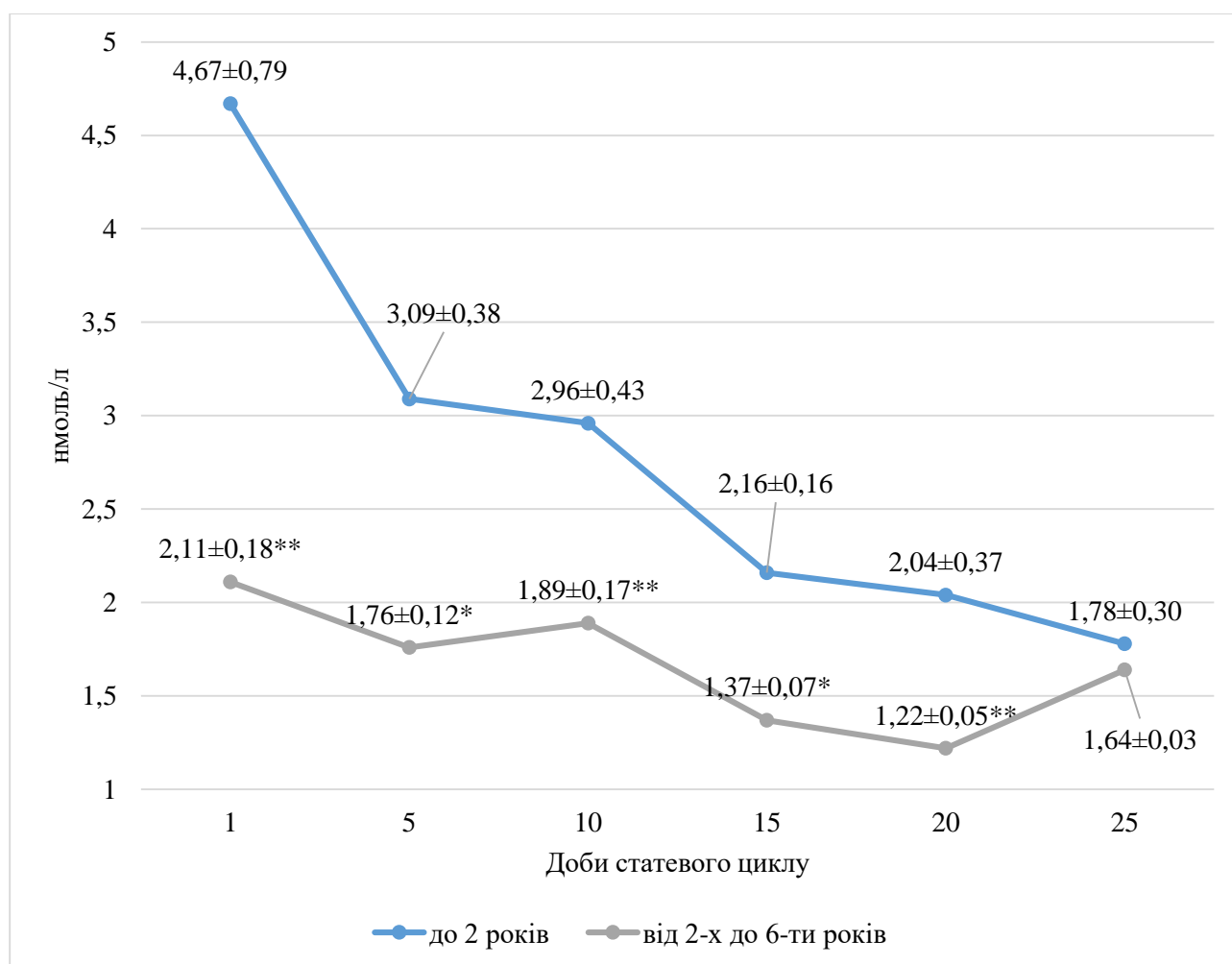


Рис. 3.16. Динаміка вмісту трийодтироніну в сироватці крові протягом статевого циклу за різного віку (n=10)

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння між групами

Дослідженнями встановлено, що протягом статевого циклу динаміка концентрації трийодтироніну в сироватці крові мала тенденцію до зниження ($p < 0,001$). При цьому слід зазначити, що в перший день статевого циклу у сук до 2- років його концентрація в 2,2 рази ($p < 0,001$) була більшою, ніж у сук від 2-х до 6-ти років.

Протягом статевого циклу зберіглася тенденція більш високої концентрації трийодтироніну в сироватці крові у сук до 2-х років порівняно з групою віком від 2- х до 6-ти років. На 25-ту добу статевого різниця між вмістом в крові трийодтироніну в дослідних групах була мінімальною і становила $1,78 \pm 0,30$ Нмоль/л у сук до 2-х років проти $1,64 \pm 0,03$ Нмоль/л – в групі віком від 2-х до 6-ти років.

Отже, дослідження вмісту статевих стероїдів, а також кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові у сук протягом статевого циклу за різного віку показало, що у сук віком до 2-х років овуляція відбувається після 15-ої доби статевого циклу, порівняно з тим, що у сук від 2-х до 6-ти років вона настає до 15 доби, про що свідчить збільшення концентрації прогестерону. Вміст кортизолу в сироватці крові був вищий у сук від 2-х до 6 ти років, проте вміст трийодтироніну навпаки був вищим в групі з тваринами до 2-х років.

3.5. Гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження стінки матки за різного стану репродуктивної системи

Фізіологічні зміни, які відбуваються в організмі сук за статевого циклу безпосередньо запускаються нейроендокринною за контролю імунної систем. При цьому основним органом, який піддається впливу усіх трьох систем є безпосередньо матка. Саме від її функціонально адекватного стану буде залежати можливість запліднення, під час статевого циклу і в подальшому – вагітність. Регуляція функції матки відбувається біологічно активними речовинами, що синтезуються ендокринною та імунною системами за загальним принципом позитивного і негативного зворотного зв'язку. Порушення балансу між регуляторними системами і особливо на рівні самого органу, призводять до

розвитку дисфункцій репродуктивної системи, що часто закінчується оваріогістероектомією.

3.5.1. Результати морфометричних та гістологічних досліджень стінки матки залежно від стану репродуктивної системи

Досліджені зразки маток у сук мали два роги з розміщенням в кінці кожного рогу яєчників овоїдно-округлої форми. Дистальні кінці рогів матки зливаються та формують тіло матки. Тканини матки, що досліджувались, взяті в середній третині рогу, для цього виконували поперечний зріз через всі шари стінки рогу матки.

За результатами досліджень (рисунок 3.17) при забарвленні гематоксилін-еозином встановлено, що в анемстральний період (рисунок 3.17, а) та за статевого циклу (рисунок 3.17, б) просвіт порожнини матки був щільним, поверхня слизової оболонки майже рівна (червона стрілка). Гістологічні дослідження шарів матки за піометри показали, що просвіт порожнини матки має хвилясту форму, з численними сосочкоподібними вип'ячуваннями покривного залозистого епітелію ендометрію (рис 3.17, в).

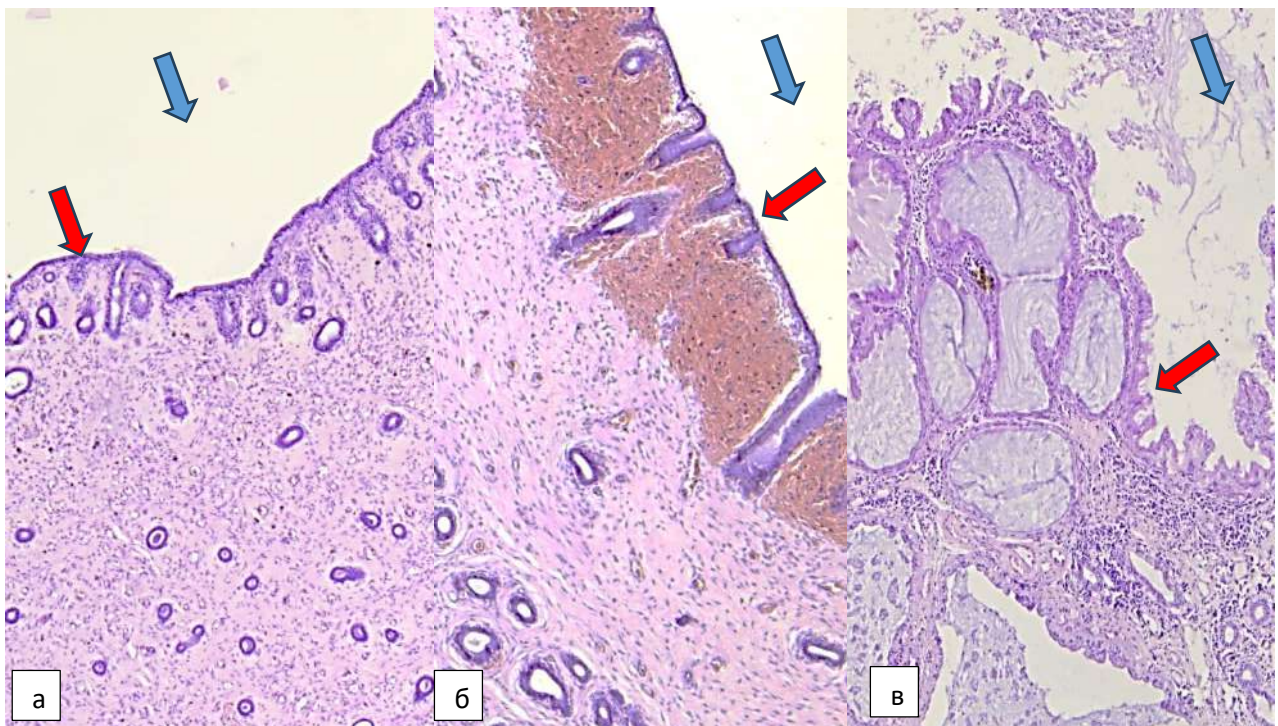


Рис. 3.17. Просвіт порожнини рогу матки (синя стрілка) та поверхня слизової (червона стрілка). Зб.: x40. Забарвлення гематоксиліном-еозином

За результатами мікроскопічних досліджень просвіту порожнини матки (синя стрілка) у сук в анестральний період та у лютеальну фазу статевого циклу не встановлено присутність домішок, слизу та імунокомпетентних клітин.

За піометри (рис. 3.17, в – синя стрілка) в просвіті порожнини рогу матки була виявлена велика кількість неоднорідної безклітинної злегка базофільної маси з домішкою нейтрофільних гранулоцитів та ознаками дегенерації та розпаду.

Покривний епітелій та епітелій залоз ендометрію у сук в анестральний період (рис. 3.18, а) був призматичним, однорядним з парацентрально розташованим округлим ядром з щільним хроматином, з рівним співвідношенням ядра до еозинофільної цитоплазми (ядерно-цитоплазматичний індекс близький до 1).

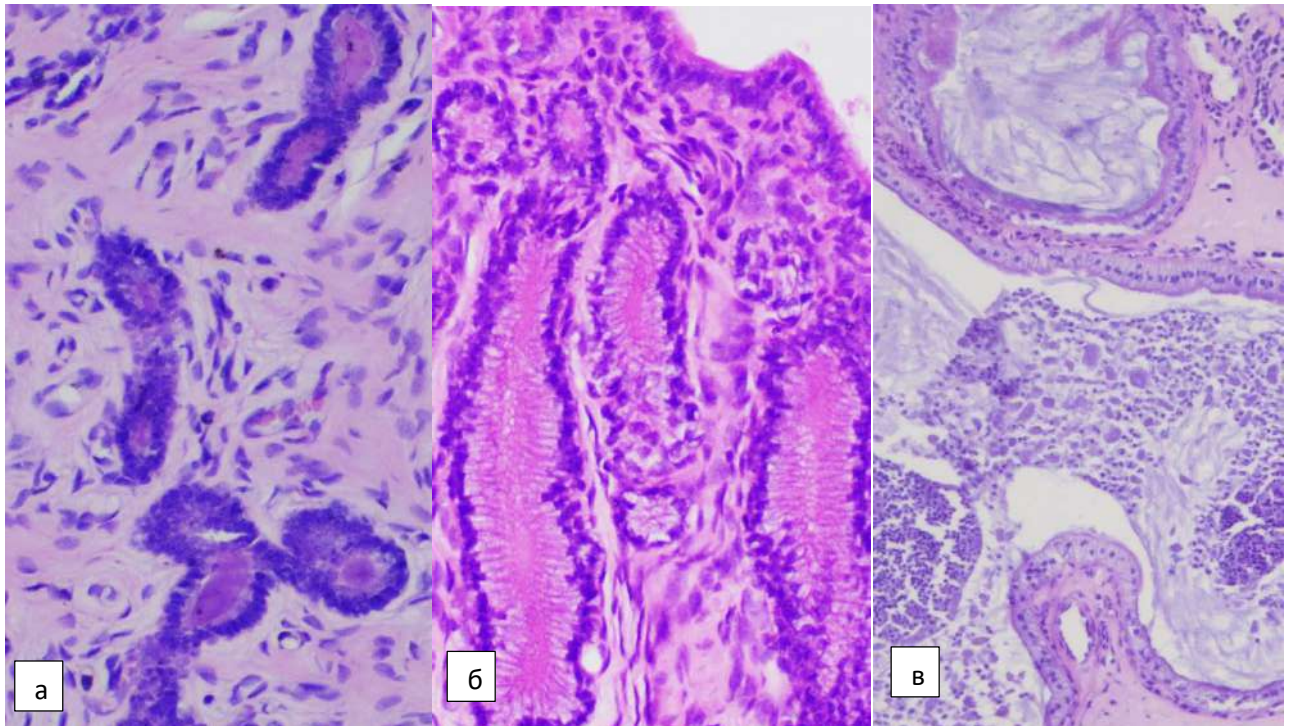


Рис. 3.18. Порівняльна характеристика покривного епітелію та епітелію залоз слизової рогів матки у сук в анестральний період (а), за статевого циклу (б) та з піометрою (в). Зб.: x200. Забарвлення гематоксиліном-еозином

Ендометрій матки сук за статевого циклу дещо відрізнявся: він був вже циліндричним, висота епітелію була більшою, овоїдної форми ядра епітелію були парабазально чи базально розміщені майже в один ряд, злегка амфіфільні з

глибчастим хроматином, ядерно-цитоплазматичні співвідношення (індекс) був зміщений у сторону цитоплазми, в цитоплазмі у кожній клітині над ядром зона більш світлого однорідного кольору (рис.3.18, б).

У сук за піометри покривний епітелій був циліндричним однорядним, з округлим некрупним ядром у центральній частині клітини, в більшості ядер чітко видно виступаюче ядрце (рис. 3.18, в). Цитоплазма базофільна, рясна, фокусно пінява, з широким нерівним краєм, звернутим у просвіт залози чи порожнини матки.

Вивідні протоки залоз ендометрію відкриваються у просвіт рогу матки, у перших двох груп форма залоз трубчаста, просвіти їх не розширюються (рисунок 3.19, а та 3.19, б). У зразках тканин матки в групі з піометрою (рисунок 3.19, в) просвіт залоз був збільшений, в певних місцях кістозно розширений, форма від округлої до зубчастої. Дно залоз у всіх групах тварин залягає глибоко у ендометрію, на межі з м'язовим шаром та впритул до лейоміоцитів. Чіткого візуально визначеного поділу на функціональний та базальний шари у ендометрію не визначається, загалом вважається, що базальний шар – глибокий, що містить донні частини залоз та прилягає до міометрію.

Просвіт залоз у всіх зразках ендометрію маток в анестральний період та за статевого циклу був вільний від секрету та клітинних елементів. У просвіті залоз слизової матки сук за піометрію була велика кількість базофільного секрету зі значною домішкою лейкоцитарного ексудату (нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити), причому переважна більшість клітин з дегенеративними змінами.

Ендометрій містить також строму, що складається з продовгуватих округлими епітеліоїдноподібними клітинами, пухкої сполучної тканини та значної кількості судин переважно мікроциркуляторного русла. Міжклітинний матрикс має значну сітку ретикулінових волокон.

У тварин в анестральний період строма була щільна, клітинна та мала виразну сітку еозинофільних ретикулінових волокон (рисунок 3.19, а, синя стрілка).

Міометрій рогів маток сук у всіх досліджуваних зразках мав поздовжній та циркулярний шари (таблиця 3.11). Причому товщина шарів була різною. Лейоміоцити у всіх групах були однакового розміру, продовгуватої форми, з виразною гомогенною еозинофільною цитоплазмою, центрально розташованим овоїдної форми ядром з глибоким хроматином.

Пучки волокон формували стрічки з однією направленістю. Периметрій представлений мезотелієм, однорядним кубічним епітелієм, та пухкою сполучною тканиною з судинами та нервовими волокнами під ним.

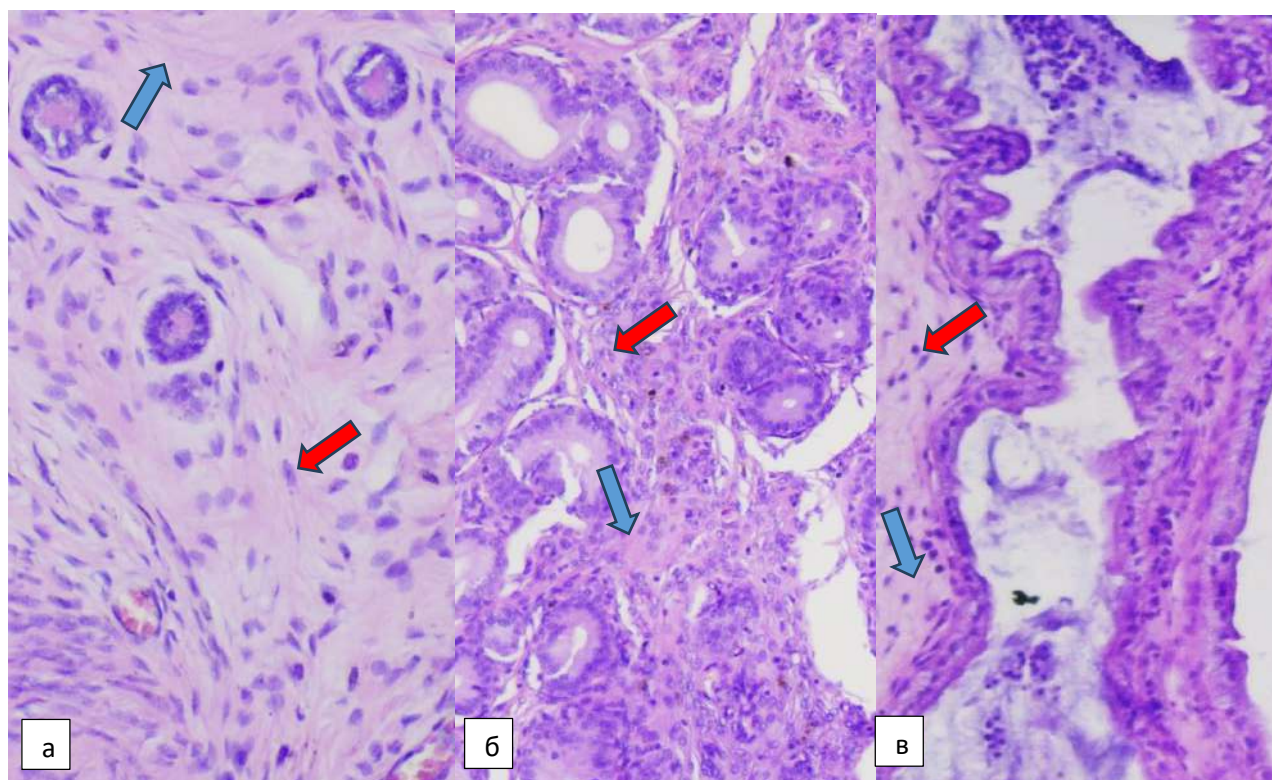


Рис. 3.19. Строма ендометрію з епітеліоподібними клітинами (червона стрілка) та ретикуліновими волокнами (синя стрілка) у трьох групах дослідження відповідно. Зб.: x200. Зabarвлення гематоксиліном-еозином

При дослідженні товщини слизової оболонки рогів маток тварин встановлено, що найбільшою товщина була у третій групі з піометрою, найменшою ж у тварин в анестральній період (таблиця 3.11).

Аналіз отриманих даних щодо товщини міометрію за різного стану репродуктивної системи показав, що найбільшим він був в третій групі сук і

становив $3518,0 \pm 44,0$ мкм, проте в анемстральний період товщина міометрію суттєво не відрізнялась і була на $102,0$ мкм меншою.

За статевого циклу встановлена найменша товщина міометрію яка становила в середньому $2975,0 \pm 56,0$ мкм.

Таблиця 3.11

Результати морфометричного дослідження ендометрію та міометрію рогів матки сук залежно від стану репродуктивної системи

Група	Товщина ендометрію, мкм	Товщина міометрію, мкм	Відсоткове співвідношення товщини ендометрію до загальної товщини
1-а група; анемстральний період (n=7)	$1874,0 \pm 32,0$	$3416,0 \pm 48,0$	35,3%
2-а група; стан статевої охоти (n=5)	$2458,0 \pm 44,0$	$2975,0 \pm 56,0$	45,5%
3-а група; за піометри (n=5)	$4216,0 \pm 38,0$	$3518,0 \pm 44,0$	54,6%
Результат перевірки достовірності	$p=0,001$ $t=1,88$	$p<0,001$ $t=5,35$	$p<0,001$ $\chi^2=17,22$

Примітки: p – точне значення p, t – точне значення t для незалежних груп, χ^2 - точне значення критерію ксі-квадрат Пірсона

Отже, можна зробити висновок, що цілком логічним було й те, що відсоткове співвідношення товщини ендометрію до загальної товщини стінки матки найбільшим виявилось у третій групі, а найменшим – у зразках тканин матки у анемстральній період.

Нами предметно було досліджено морфометричні дані структурних елементів ендометрію – залози та строма. Встановлений середній діаметр залоз (заміри проводились на поперечних зрізах залоз, у 10 різних полях значення).

Верифіковано, що найменший діаметр залоз був у гістологічних зразках рогів маток сук в анестральний період, і становив в середньому 34,12 мкм, дещо більший – у ендометрії групи за статевого циклу (41,35 мкм) та найбільший – у тварин з піометрою (62,8 мкм) (таблиця 3.12).

За умови визначення співвідношення діаметру залоз до вже відомої товщини слизової матки варто зазначити, що найбільший показник виявився у групі за статевого циклу, а у групі ж з піометрою – найменшим.

Таблиця 3.12

Результати морфометричного дослідження тканин ендометрію сук залежно від стану репродуктивної системи

Група	Діаметр залоз, мкм	Товщина ендометрію, мкм	Співвідношення діаметру залоз до товщини ендометрію, %
1-а група; анестральний період (n=7)	34,12±2,40	1874,00±32,00	1,82
2-а група; Стан статевої охоти (n=5)	41,35±3,10	2458,00±44,00	1,90
3-а група; За піометри (n=5)	62,80±8,60	4216,00±38,00	1,49
Результат перевірки достовірності	p=0,001 t=1,88	p<0,001 t=5,35	p<0,001 $\chi^2=17,22$

Примітки: p – точне значення p, t – точне значення t для незалежних груп, χ^2 - точне значення критерію ксі-квадрат Пірсона.

Отже, за результати морфометричних та гістологічних досліджень стінки матки залежно від стану репродуктивної системи показали, що зміни верифіковано як у ендометрію, так і у міометрію. Виявлено, що найменша товщина ендометрію була у групі анестрального періоду, що цілком логічно з огляду на фізіологію статевого циклу. У тварин з стані статевої охоти було

документовано суттєве збільшення і товщини ендометрію (на 31,2% в порівнянні з 1 групою, анестральний період), і збільшення діаметру залоз ендометрію (на 21,6% в порівнянні з відповідним показником 1 групи).

Встановлено, що за піометри матка має найбільшу товщину ендометрію та міометрію, що вочевидь вплинуло і на діаметр залоз, які в середньому в 1,84 рази були більші, ніж у сук в анестральний період (більші на 84,3%) та в 1,52 рази, ніж у сук в період статевого циклу (на 52,3% відповідно).

Також звернуло увагу те, що міометрій мав найменшу товщину у 2 групі, в тварин в стані статевої охоти, та суттєво не відрізнявся у зразках 1 та 3 груп. Проте при порівнянні співвідношення товщини ендометрію до товщини міометрію встановлено, що найменший показний був у групі в анестральний період, збільшився у 2 групі (тварини в стані статевої охоти) та найбільший – у тварин з піометрою.

Підсумовуючи, можна стверджувати, що по мірі збільшення ступеня залучення матки у статевий цикл збільшується й товщина ендометрію (а надалі, логічно, і його абсолютна кількість), і кількість та діаметр залоз, що відображає функціональну залученість вказаних елементів.

3.5.2. Результати імуногістохімічних досліджень стінки матки залежно від стану репродуктивної системи

За результатами власних досліджень встановлено, що у гістологічних препаратах ендометрію в усіх досліджуваних групах виявлена інфільтрація круглоклітинними елементами, які були розташовані поодинокі, розсіяні у стромі перигландулярно, а також у вигляді інфільтратів. Причому спостерігалась інфільтрація імунокомпетентними клітинами як у стромі, так і навколо судин, впритул до залоз, чи навіть внутрішньоепітеліально (рисунок 3.20).

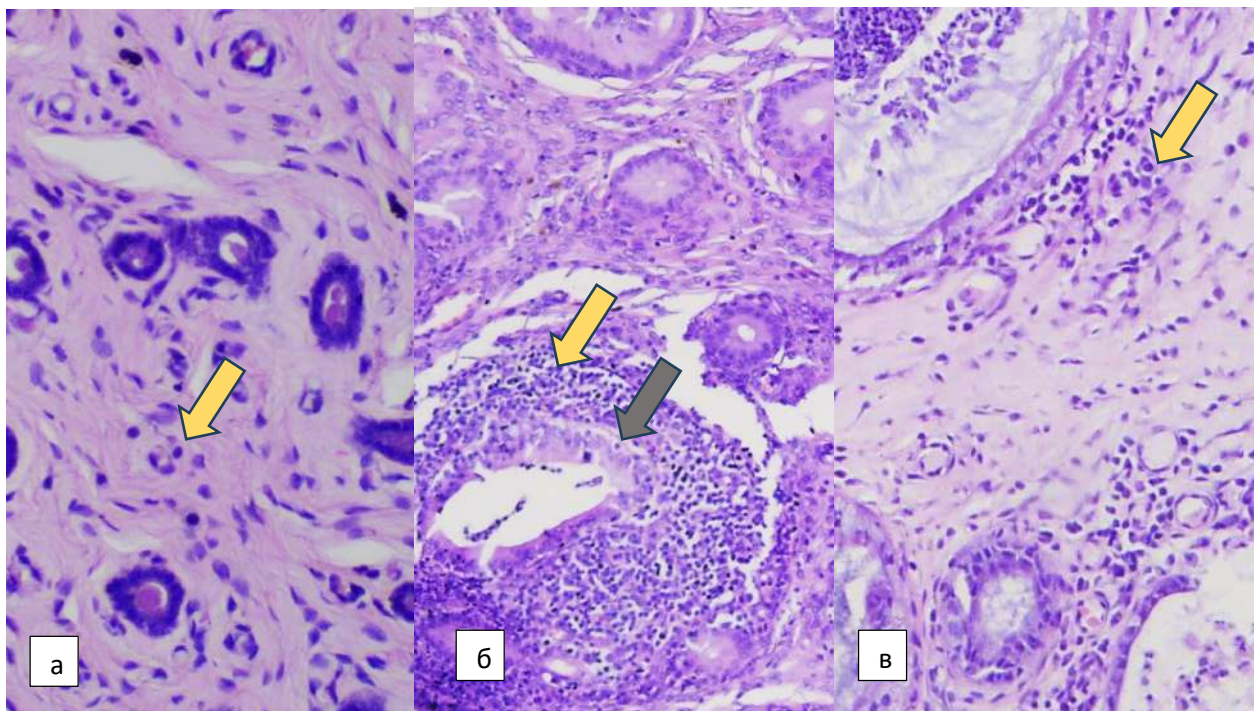


Рис. 3.20. Розсіяні клітини, інфільтрації у стромі (а, жовта стрілка) слизової рогів матки у тварин в анестральній період, перигландулярна муфтоподібна (б, жовта стрілка) та інтраепітеліальна (б, сіра стрілка) інфільтрація у другій групі тварин, стромальна інфільтрація (в, жовта стрілка) у зразках тварин з піометрою. Зб.: x200. Забарвлення гематоксиліном-еозином

Клітини інфільтрації представляють імунокомпетентні клітини, які залежно від типу виконують певну функцію для забезпечення місцевого імунного захисту. Застосовуючи імуногістохімічний метод проводиться типування цих клітин з використанням моноклональних антитіл. Відомо, що для диференціювання підтипу лімфоцитів використовуються кластери диференціювання (CD), де CD45 – загальнолімфоцитарний рецептор, CD4 характерний для Т-хелперів, CD8 – для цитотоксичних лімфоцитів, CD20 – маркер всіх В-клітин, з них зрілі В-клітини мають CD138. Маркер гістіоцитарних, макрофагальних клітин – CD 68. Інтерпретація результатів імуногістохімічних реакцій базується на появі специфічного фарбування (залежить від типу хромогену, нами використано DAB – хромоген коричневого кольору) у різних частинах клітин. Слід також зазначити, що вирізняють ядерне, цитоплазматичне і мембранне фарбування.

Лімфоцити були виявлені в усіх зразках досліджуваних груп (рисунок 3.21), що підтверджено імуногістохімічною реакцією з CD45, найбільше їх було виявлено у випадках 3-ї групи у складі запального інфільтрату стромі (рисунок 3.21 в, жовта стрілка) та перигландулярно (Рис. 3.21 в, сіра стрілка), менше – у 1-й групі, де лімфоцити були розсіяні поодинокі у стромі (рисунок 3.21 а, жовта стрілка), не мали тропності ні до судин, ані до залоз. Щодо 2-ї групи, то слід зазначити, що встановлена наявність значної кількості лімфоцитів (CD45) з розташуванням впритул до залоз, або ж навіть інтраепітеліально (рисунок 3.21 б, жовта стрілка).

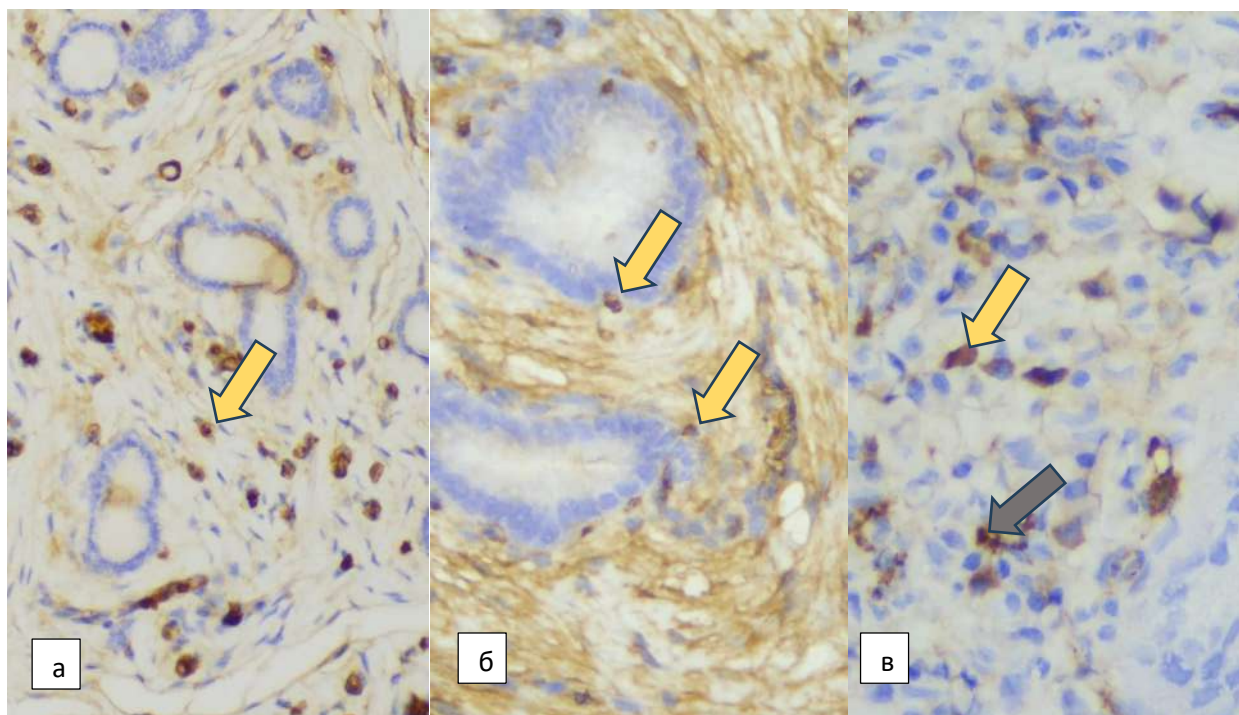


Рис. 3.21. Лімфоцити, розсіяні поодинокі у стромі (а, жовта стрілка) слизової рогів матки у тварин в анестральний період та перигландулярно (б, жовта стрілка) за статевого циклу, лімфоцити у складі запального інфільтрату стромі (в, жовта стрілка) та перигландулярно (в, сіра стрілка) у слизовій матки тварин з піометрою. Зб.: x200. Імуногістохімічна реакція з CD45

Через таку виразну неоднорідність морфотопографічних особливостей розташування лімфоцитів CD45 у ендометрії маток тварин, нами було прийнято рішення про уточнення типу лімфоцитів в кожному випадку. Т-лімфоцити були верифіковані з двох популяцій - Т-хелперів (мають рецептори CD4, що стало

підґрунтям для підбору відповідних моноклональних антитіл) та Т-цитотоксичних лімфоцитів (мають рецептори CD8).

Лімфоцити з характерним коричневим фарбуванням цитоплазми з мембранною акцентуацією (позитивна реакція з моноклональним антитілом CD4) верифіковані як Т-хелпери. Т-хелпери були розташовані як у стромі, розсіяні одиничні (без зв'язку з судинами та епітелієм залоз), що було характерно для зразків з 1-ї групи (рисунок 3.22 а, жовта стрілка), так і на межі залоз та стромы у зразках 2-ї групи (рисунок 3.22 б, жовта стрілка) зі значним розташуванням CD4 позитивних лімфоцитів внутрішньоепітеліально. Серед препаратів матки 3-ї групи (рисунок 3.22 в, жовта стрілка) позитивні клітини CD4 були у стромі, проте більшість з них – як значна складова запального змішаноклітинного інфільтрату.

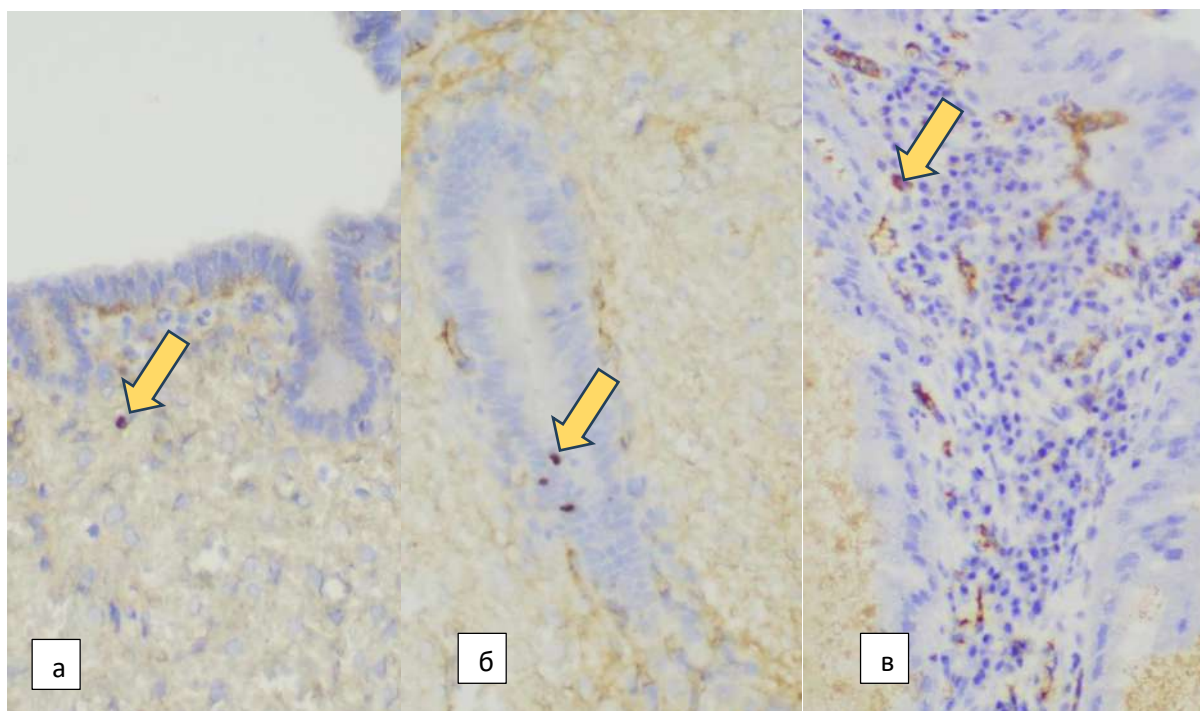


Рис. 3.22. Локалізація та щільність розташування Т-лімфоцитів у стромі (а, жовта стрілка) слизової рогів матки у тварин в анестральний період, перигландулярна та інтраепітеліальна (б, жовта стрілка) інфільтрація в зразках матки за статевого циклу та стромальна (в, жовта стрілка) у запальному інфільтраті слизової матки тварин з піометрою. Імуногістохімічна реакція з CD4. Зб.: x200

Наявність на поверхні мембрани лімфоцитів рецептору CD8⁺ характерно для Т-супресорів та цитотоксичних Т-лімфоцитів. Позитивним є фарбування ядра клітини у результаті імуногістохімічної реакції з відповідним моноклональним антитілом.

Присутність цитотоксичних лімфоцитів (тобто тих, що мають рецептори CD8) в різній кількості виявлена в зразках тканин матки усіх груп (рисунок 3.23). При цьому встановлено у 2-ій (рисунок 3.23 а) та 3-ій (рисунок 3.23 б) групах – одиничні клітини, що розсіяні у стромі. У групі за анестрального періоду (рисунок 3.23 в) цитотоксичні лімфоцити були розсіяні у функціональному шарі слизової в частині, що ближча до просвіту матки, лімфоцити розташовані поодинокі, у стромі довкола вивідних частин залоз та серед епітеліоцитів.

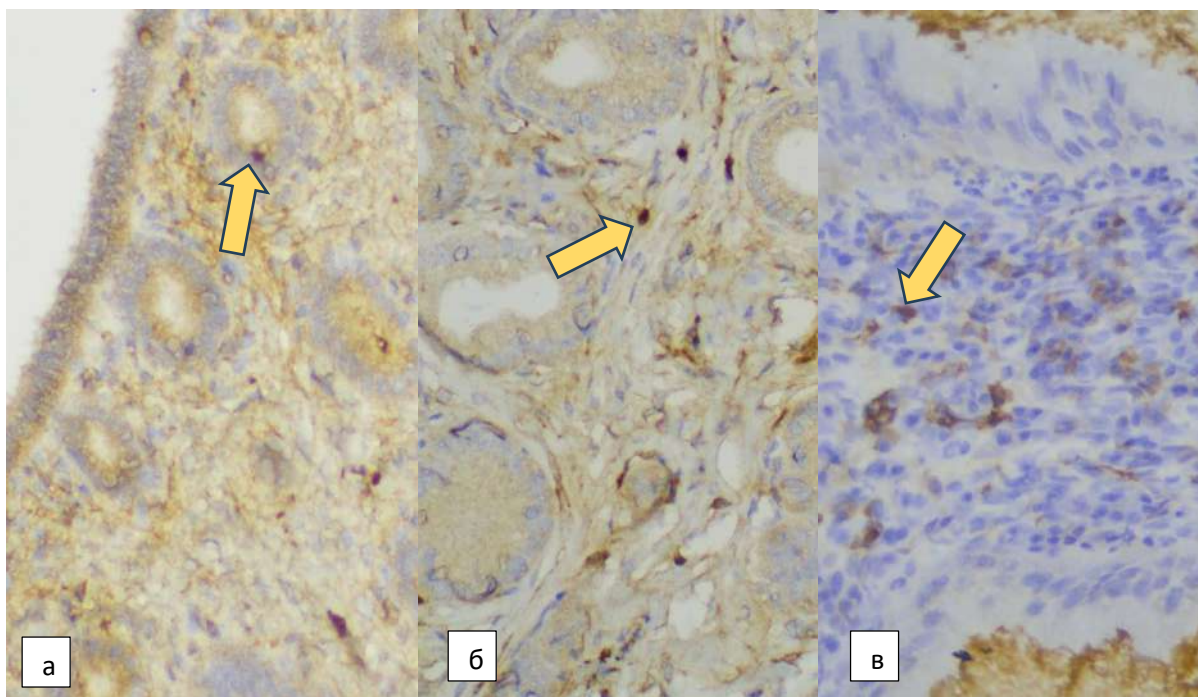


Рис. 3.23. Розташування Т-цитотоксичних лімфоцитів між епітеліоцитами залоз ендометрію у тварин в анестральній період (а, жовта стрілка) слизової рогів маток, стромальна інфільтрація у другій групі (б, жовта стрілка) та у зразках тварин з піометрою (в, жовта стрілка). Імуногістохімічна реакція з CD8. Зб.: x200

Окрім визначення присутності в тканині матки Т-лімфоцитів, проведені нами дослідження встановили і наявність В-лімфоцитів. Загальним В-клітинним маркером є CD20, він виявляється у всіх В-лімфоцитах до моменту їх

диференціювання у плазматичні клітини. Було верифіковано не лише кількість В-лімфоцитів та їх топографія (з використанням моноклональних антитіл до CD20, позитивною була цитоплазматична та мембранна реакція), а і уточнено такі ж показники щодо зрілих форм В-лімфоцитів, а саме плазмоцитів за допомогою імуногістохімічної реакції з антитілами до CD138.

Загалом значна присутність В-лімфоцитів (рисунок 3.24) виявлена як в зразках 3-ї групи сук за піометри (рисунок 3.24 в), так і у слизовій 1-ї групи тварин (рисунок 3.24 а).

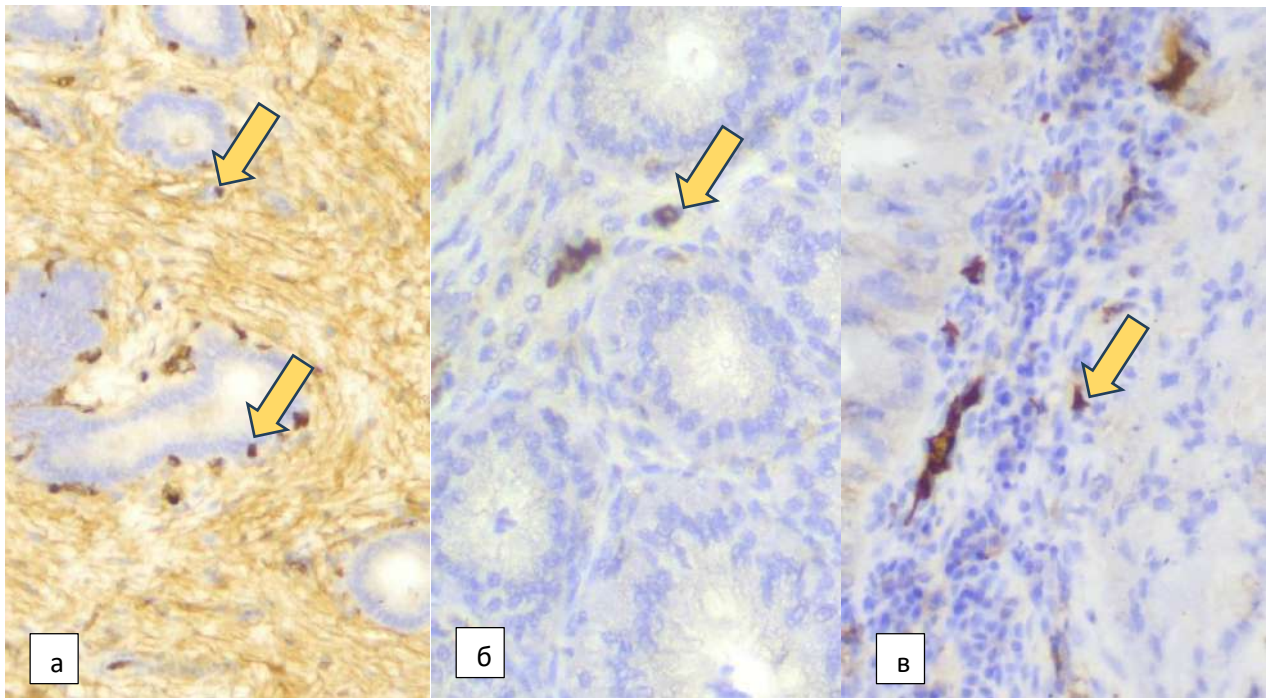


Рис. 3.24. В-лімфоцити довкола залоз ендометрію 1-а групи тварин (а), розсіяні клітини у стромі зразків матки тварин за статевого циклу (б) та у зразках матки тварин з піометрою (в). Імуногістохімічна реакція з CD20. Зб.: x200

Зрілі В-лімфоцити мають позитивну реакцію з моноклональними антитілами CD138, тож ми предметно дослідили наявність таких позитивних клітин зі специфічним фарбуванням у досліджуваних зразках. Слід зазначити, що для CD138 моноклональних антитіл позитивним вважається фарбування мембранного типу з варіативним цитоплазматичним компонентом (коричневі дрібні гранули, що розташовані у цитоплазмі клітини). Прогнозовано, були виявлені зрілі В-лімфоцити в інфільтраті у матках з піометрою (рисунок 3.25 в).

В зразках матки сук за анестрального періоду виявлені поодинокі лімфоцити з імунофенотипуванням CD138 (рисунок 3.25 а). Виявлення зрілих В-лімфоцитів (CD138) в зразках маток сук за статевого циклу (друга група) показало, що вони зустрічаються у вигляді поодиноких позитивних клітин, що ілюстровано на рисунку 3.25 б.

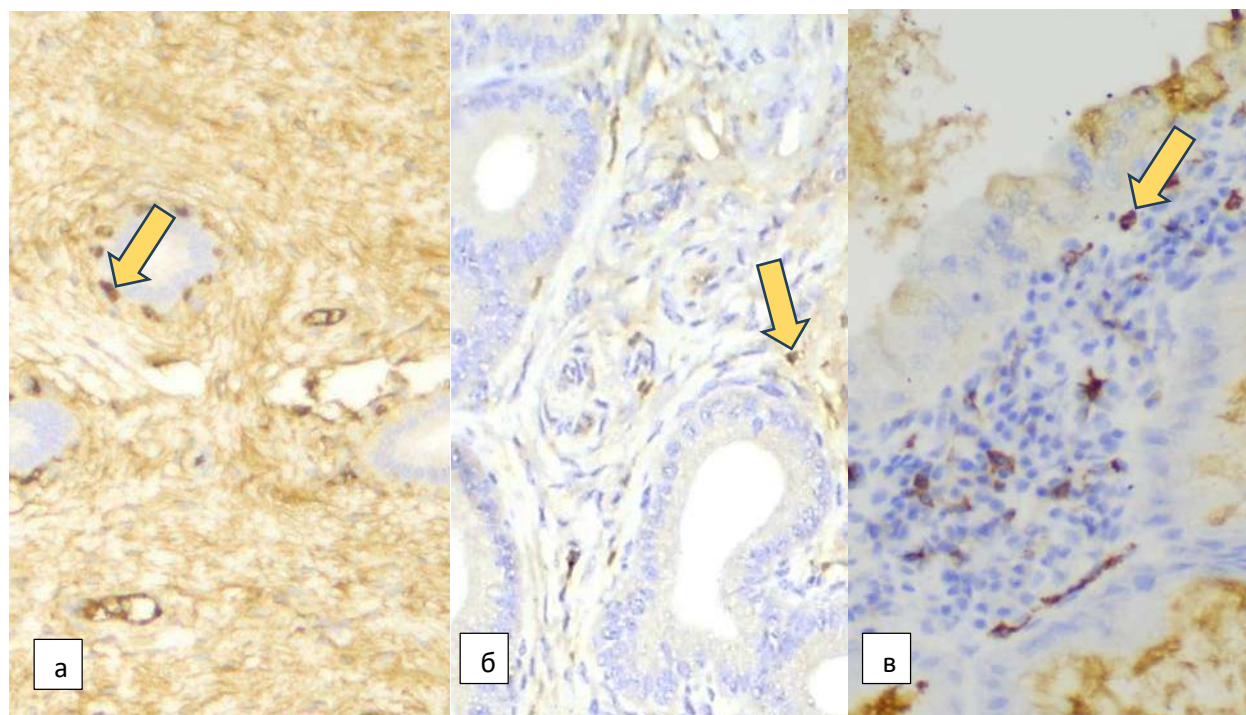


Рис. 3.25. Зрілі В-лімфоцити у стромі ендометрію у тварин в анестральний період (а) та за статевого циклу (б), домішок зрілих В-лімфоцитів у стромі слизової маток сук з піометрою (в). Імуногістохімічна реакція з CD138. Зб.: x200

Маркером клітин гістіоцитарно-макрофагального ряду прийнято вважати CD68, причому він характерний не тільки для функціонально активних клітин, але і для клітин у фазі апоптозу. Дослідження популяції цих клітин має значення для характеристики стану тканинного імунітету та перебігу імунної відповіді на запальні стимули, що проявляється посиленням макрофагальної відповіді лізосомального маркеру CD68. Позитивним вважається точкове зернисте та дифузне фарбування цитоплазми.

Встановлено значне скупчення CD68-позитивних клітин макрофагального ряду у стромі, у складі інфільтрату та у просвіті залоз серед слизу та ексудату у групі тварин з піометрою (рисунок 3.26 в). Аналіз зразків

матки сук в анестральний період виявив скупчення CD68-позитивних клітин на поверхні слизової матки, як одиночних, так і у невеликих групах (рисунок 3.26. а). У групі тварин за статевого циклу (друга група) в зразках вказані клітини були виявлені у незначній кількості, топографічно локалізувались у стромі. (рисунок 3.26. б)

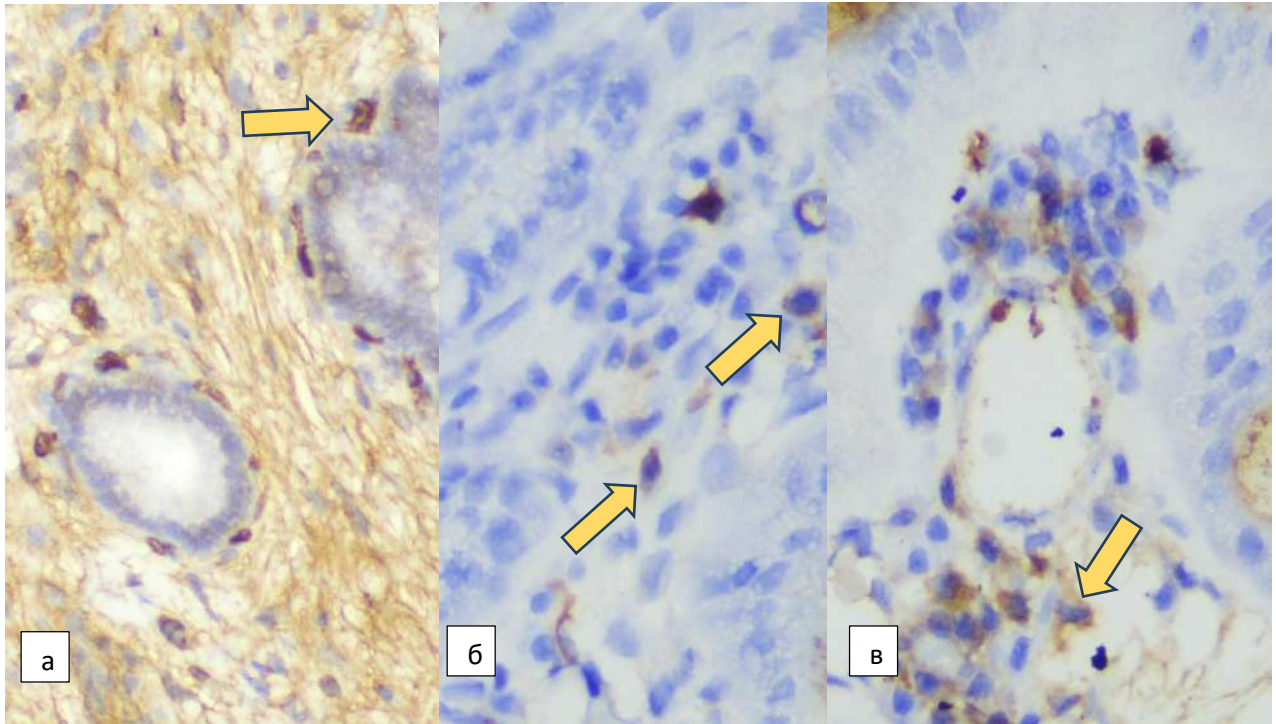


Рис. 3.26. Одиночні та у групах CD68-позитивні клітини під епітеліальною пластинкою (а, жовта стрілка) слизової рогів матки у тварин в анестральний період, у стромі ендометрію (б, жовта стрілка) зразків тварин 2 групи, стромальна (в, жовта стрілка) у зразках тварин з піометрою. Імуногістохімічна реакція з CD68. Зб.: x200

Окремо зазначимо, що в цитоплазмі макрофагів, виявлених у стромі слизової матки всіх груп, не встановлено пігменту золотаво-бурого кольору, що вказувало б на присутність гемосидерину, а клітини можна було б назвати гемосидерофагами. Наявність такого пігменту у макрофагах вказує на крововиливи у минулому, оскільки після розпаду еритроцитів відбувається резорбція цього пігменту. Отже, в жодному з досліджуваних зразків усіх груп тварин нами не виявлено непрямих ознак попередніх крововиливів або гематом.

Кількісні показники щодо верифікації та обліку підтипів лімфоцитів узагальнено у таблиці 3.13. Встановлено, що за піометри середня кількість лімфоцитів CD4 становила $13,40 \pm 4,20$ клітин, що є найбільшим показником в порівнянні з іншими групами. Популяція CD8 лімфоцитів навпаки, за піометри була найменшою ($0,75 \pm 0,2$ клітин). Достатньо велика кількість цих клітин виявлена в анестральний період.

Таблиця 3.13

Аналіз кількісного складу підтипів (CD) лімфоцитів залежно від функціонального стану репродуктивної системи

Група	Середня кількість виявлених підтипів лімфоцитів (в 10 -ти полях зору)				
	CD4	CD8	CD138	CD20	CD68
1-а група; анестральний період (n=7)	4,60±1,10	5,20±2,30	3,40±0,60	1,30±0,60	0,60±0,30
2-а група; Стан статевої охоти (n=5)	7,20±2,40	0,80±0,30	0,20±0,10	0,40±0,20	0,10±0,10
3-а група; За піометри (n=5)	13,40±4,20	0,75±0,20	9,80±2,20	4,50±1,40	10,30±3,60

Примітка: результат перевірки достовірності – $p=0,043$, $t=2,07$

Імунокомпетентні клітини з фенотипом CD138, CD20 та CD68 також за піометри виявлені в більшій кількості, ніж за статевого циклу та в анестральний період. За статевого циклу популяція клітин з фенотипами CD138, CD20 та CD68 була найменшою, порівняно з групою за піометри та в анестральний період.

Дослідження активності та топографії рецепторів прогестерону у структурах матки досліджуваних тварин показав, що у залозистому епітелії всіх досліджуваних груп вкрай низька прогестеронова реактивність клітин. Строма в гістологічних зразках як першої групи (рисунок 3.27 а), так і у зразках, в меншому ступені другої групи (рисунок 3.27 б), мала виразну позитивну реакцію (як внутрішній контроль якості реакції – позитивне фарбування волокон міометрію). Також варто відмітити виразну позитивна реакція (присутність рецепторів прогестерону) у ендотелії капілярів ендометрію у всіх досліджуваних зразках.

Порівнюючи між собою зразки тканин досліджуваних груп тварин, встановлена низька реактивність залозистого епітелію слизової рогів матки

(одиначні позитивні клітини) та помірна позитивна реакція у частині клітин строми у першій (рисунок 3.27 а) та другій (рисунок 3.27 б) групах. У тварин з піометрою (третья група) епітелій залоз ендометрію був мікрофокусно слабопозитивним, а у стромі була значна частина прогестерон-позитивних клітин (рисунок 3.27 в).

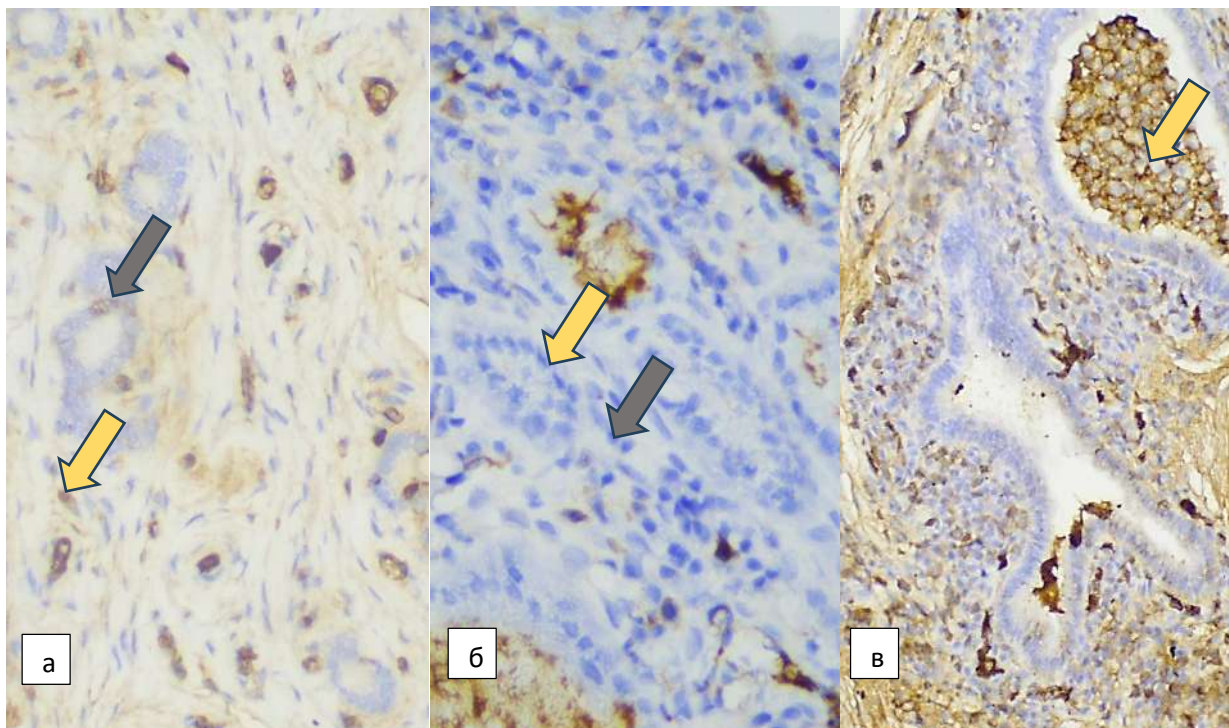


Рис. 3.27. Позитивна реакція на рецептори прогестерону строми (а, сіра стрілка) одиничних клітин ендометрію та клітин строми (а, жовта стрілка) слизової рогів матки у тварин в анестральному періоді, негативна реакція на рецептори прогестерону у залозистому епітелії (б, сіра стрілка) та клітин строми (б, жовта стрілка) у тварин в стані статевої охоти, позитивна реакція частини клітин строми ендометрію у тварин з піометрою (в, жовта стрілка). Імуногістохімічна реакція з Pr. 3б.: x200

Проведені імуногістохімічні дослідження рецепторної активності імунокомпетентних клітин показали їх неоднорідність залежно від функціонального стану репродуктивної системи. Потребує більш детального дослідження фізіологічне значення активності лімфоцитів CD 8 в анестральний період та CD4 за статевої охоти та піометри. Встановлена особливість поширення прогестеронових рецепторів в різних структурах матки та залежно від функціонально стану репродуктивної системи підтверджує значну роль

прогестерону в генезі розвитку дисфункцій та, імовірно, є сенсibiliзуючим чинником.

3.6. Дослідження показників клітинної ланки імунітету організму сук залежно від адренергічної імунореактивності та функціонального стану репродуктивної системи

Швидке (короткодистантне і далекодистантне) реагування як нервових, так і імунокомпетентних клітин на будь-які зміни гомеостазу під впливом чинників зовнішнього і внутрішнього середовища організму опосередковуються спільними для нейроендокринної та імунної систем організму месенджеровими молекулами та їх рецепторами. Зміна реактивності організму має надзвичайно важливе значення у виникненні хвороби.

Зважаючи на це, визначення функціонального стану рецепторного апарату найбільш лабільної у функціональному відношенні субпопуляції «активних» Т-лімфоцитів, зокрема їх рецепції до катехоламінів, має бути доцільним як з теоретичних позицій, так і з позицій клінічної фізіології з метою впровадження адекватних фізіологічноорієнтованих заходів впливу на адаптаційні механізми імунного гомеостазу.

3.6.1. Дослідження показників клітинної ланки імунітету організму сук залежно від адренергічної імунореактивності

Рецепція активних Т-лімфоцитів до нейромедіатора адреналіну може дозволити оцінити стресорну реакцію організму за відсотком інверсії, і, як наслідок, імовірність прогнозування розвитку дисфункцій систем, в т.ч. і репродуктивної, протягом певного періоду.

В таблиці 3.14 представлені результати досліджень клітинної ланки імунітету у сук за різного ступеня сенсibiliзації організму до нейромедіатора адреналіну. За низького ступеня, до 10% інверсії, встановлено на 10,6% ($p < 0,01$)

більшу відносну кількість лімфоцитів порівняно з 3-ю групою і на 6,8% порівняно з 2-ю групою.

Відносна кількість моноцитів вищою була в групі де відсоток інверсії «активних» Т-лімфоцитів знаходився в межах 10-12%. За отриманими даними показано, що у тварин, де ступінь сенсibilізації до адреналіну була 14 % і вище, кількість нейтрофілів становила $52,8 \pm 14,19\%$ але при цьому у сук цієї групи відносна кількість нейтрофілів здатних до фагоцитозу на 22% була меншою ніж у тварин 1- групи і 26% менша ніж у тварин 2-ї групи.

Таблиця 3.14

Відносна кількість лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів та їх фагоцитарної активності у сук залежно від відсотку інверсії Т-«активних» лімфоцитів у навантажувальному тесті з адреналіном; (n=16), (M±m)

Показники	Стан клітинного імунітету залежно від % інверсії		
	1-а група – до 10%, (n=6)	2-га група – 10-12%, (n=5)	3-я група – 14 % і вище, (n=5)**
Лімфоцити, %	43,00±3,39	35,2±7,57	32,40±9,22*
Моноцити, %	6,00±0,08	7,80±1,30	6,40±0,55
Нейтрофіли, %	49,80±4,38	49,20±10,27	52,80±14,19*
Фагоцитарна активність нейтрофілів, %	77,2±7,53	81,20±5,40	55,20±6,98*

Примітка: * $p < 0,01$ вірогідність порівняно з тваринами II групи; ** у трьох тварин протягом року проведена оваріогістеректомія внаслідок встановленої піометри

Проведеними дослідженнями також встановлено, що за високого ступеня сенсibilізації до адреналіну (14% і більше) у сук в крові нижча за інші групи відносна кількість Т-лімфоцитів (таблиця 3.15).

При цьому, в третій групі тварин відносна кількість Т-хелперів складала $48,2 \pm 0,84\%$, що є вищим показником порівняно з іншими групами, інша тенденція встановлена відносно до Т-супресорних лімфоцитів, а саме в 3-ій групі тварин цей показник є нижчим в порівнянні з 1-ою та 2-ою групами. Така відносна кількість Т-хелперних та Т-супресорних клітин відобразилася на

показнику імунорегуляторного індексу, який за високого ступеня сенсibilізації до адреналіну (14% і більше) становив $4,70 \pm 0,84$ і був найбільшим. Також за результатами досліджень в 3-ій групі тварин встановлена найнижча відносна кількість природних кілерних (NK) лімфоцитів.

Таблиця 3.15

Відносна кількість Т- та В-лімфоцитів, NK - лімфоцитів у сук залежно від відсотку інверсії Т-«активних» лімфоцитів у навантажувальному тесті з адреналіном; (n=16),(M±m)

Показники	Стан клітинного імунітету залежно від % інверсії		
	1-а група – до 10%,(n=6)	2-га група – 10-12%,(n=5)	3-я група – 14% і вище, (n=5)**
Т-лімфоцити, %	$61,00 \pm 1,00$	$59,40 \pm 1,14^*$	$53,80 \pm 6,42$
Т-хелпери, %	$46,80 \pm 1,09$	$44,80 \pm 2,68$	$48,20 \pm 0,84^*$
Т-супресори,%	$12,00 \pm 1,00$	$12,80 \pm 2,78$	$10,60 \pm 2,42$
В-лімфоцити, %	$14,40 \pm 1,95$	$12,40 \pm 1,67$	$12,60 \pm 2,19$
NK -клітини, %	$15,20 \pm 2,82$	$11,80 \pm 2,28$	$10,20 \pm 1,64^*$
Імунорегуляторний індекс	$4,11 \pm 0,33$	$3,60 \pm 0,88$	$4,70 \pm 0,84$

Примітка: * $p < 0,01$ вірогідність порівняно з тваринами II групи; ** у трьох тварин протягом року проведена оваріогістеректомія внаслідок встановленої піометри

Оцінка відносних показників клітинної ланки імунітету у сук за різного ступеня сенсibilізації до адреналіну показала, що за високого ступеня (14% і більше) у тварин встановлена нижча здатність до фагоцитозу нейтрофілів, високий імунорегуляторний індекс через високу відносну кількість Т-хелперних та низьку кількість Т-супресорних лімфоцитів.

3.6.2. Дослідження клітинної ланки імунітету у сук за різного стану репродуктивної системи

Імунна система розпізнає чужорідні мікроорганізми та внутрішні зміни, які призводять до порушення функцій клітин і тканин, і протистоїть їм. Протягом життя собаки імунна система повинна адаптуватися до різних фізіологічних умов, забезпечуючи ретельний і контрольований нагляд і захист.

В таблиці 3.16. наведені показники клітинної ланки імунітету за різного функціонального стану. Порівнюючи абсолютну кількість лейкоцитів встановлено, що в анеструсі цей показник становив $5,86 \pm 0,89$ Г/л в порівнянні з $5,43 \pm 1,53$ Г/л в період статевої охоти та $5,68 \pm 0,08$ Г/л – за піометри. Абсолютна кількість нейтрофілів, як найбільш реактогенних клітин вродженої ланки клітинного імунітету мала інакшу тенденцію і в групі тварин з піометрою цей показник був більшим, ніж в групі тварин за статевого циклу – на $0,51$ Г/л та на $0,84$ Г/л – у сук в анеструсі.

Таблиця 3.16

Показники абсолютної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів та їх фагоцитарної крові сук активності залежно від функціонального репродуктивної системи (n=17), (M±m)

Досліджувані показники (абсолютна кількість), Г/л	Функціональний стан репродуктивної системи		
	Анестральний період (n=7)	Стан статевої охоти (n=5)	За піометри (n=5)
Лейкоцити	$5,86 \pm 0,89$	$5,43 \pm 1,53$	$5,68 \pm 0,08$
Нейтрофіли	$2,67 \pm 1,10$	$3,00 \pm 0,44$	$3,51 \pm 0,32$
Лімфоцити	$2,40 \pm 0,54$	$2,11 \pm 0,62$	$1,48 \pm 0,35^*$
Моноцити	$0,40 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,01^{**}$
Фагоцитоз нейтрофілів	$2,02 \pm 0,06$	$2,33 \pm 0,51$	$2,32 \pm 0,58^{**}$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння з групою в анестральний період

При цьому варто відмітити, що незважаючи на більшу абсолютну кількість нейтрофілів у сук за піометри, відносна (відсоткова) їх кількість здатних до

фагоцитозу була найменшою. Так, абсолютна кількість фагоцитарно активних нейтрофілів за піометри становила $2,32 \pm 0,58$ Г/л ($p < 0,001$), але у відсотковому відношенні до абсолютної кількості нейтрофілів цей показник дорівнював 66%. За статевого циклу абсолютна кількість нейтрофілів, здатних до фагоцитозу, складала $2,33 \pm 0,51$ Г/л, що становить 78% від абсолютної кількості усіх нейтрофільних лейкоцитів. За анеструсу абсолютний показник фагоцитозу був найменшим в порівнянні з іншими групами тварин, $2,02 \pm 0,61$ Г/л, що дорівнює 76% від абсолютної кількості нейтрофілів.

Показник абсолютної кількості лімфоцитів достовірно ($p < 0,05$) меншим був в групі сук з піометрою і становив $1,48 \pm 0,35$ Г/л, що на $0,92$ Г/л менше в порівнянні з групою тварин в анестральний період. Аналіз абсолютної кількості моноцитів показав, що цей показник був однаковим у сук за піометри та анестральний період і на $0,07$ Г/л був менший під статевого циклу.

Окрім абсолютної кількості лейкоцитів та їх основних гранулярних та агранулярних видів, було досліджена і абсолютна кількість регуляторних субпопуляцій лімфоцитів (таблиця 3.17.).

Таблиця 3.17

Показники абсолютної кількості Т- та В-лімфоцитів, НК лімфоцитів крові сук залежно від функціонального репродуктивної системи (n=17), (M±m)

Досліджувані показники (абсолютна кількість), Г/л	Функціональний стан репродуктивної системи		
	Анестральний період (n=7)	Стан статевої охоти (n=5)	За піометри (n=5)
Т-лімфоцити	$1,42 \pm 0,30$	$1,31 \pm 0,35$	$0,85 \pm 0,14^*$
Т-хелпери	$1,11 \pm 0,26$	$0,98 \pm 0,26$	$0,65 \pm 0,12^*$
Т-супресори	$0,28 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,04^*$
В-лімфоцити	$0,30 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,03^*$
НК -лімфоцити	$0,28 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,02^{**}$
Імунорегуляторний індекс	$4,08 \pm 0,37$	$3,85 \pm 0,29$	$3,00 \pm 0,58^{**}$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ порівняння з групою в анестральний період

Дослідженнями встановлено, що за піометри абсолютна кількість Т-лімфоцитів, як основної ланки адаптивного клітинного імунітету, була достовірно ($p < 0,05$) в 1,67 рази меншою, ніж у сук в анестральний період і в 1,54 рази меншою, ніж у сук під час статевої охоти. Така тенденція встановлена і при визначенні абсолютної кількості субпопуляцій Т-хелперів та Т-супресорів. Більш виражена імуносупресія за піометри в порівнянні з групою тварин в анестральний період встановлена по відношенню до Т-хелперів (зменшення на 42%), ніж до Т-супресорів (зменшення на 32%).

Абсолютна кількість В-лімфоцитів, як гуморальної ланки адаптивного імунітету у сук в анестральний та естральний період, була однаковою і становила 0,30 Г/л. В групі сук за піометри встановлено достовірне зменшення цього показника на 33% ($p < 0,05$). Популяція природних кілерних лімфоцитів також була найменшою у сук за піометри, майже вдвічі в порівнянні з тваринами в період статевого циклу.

Проведені дослідження з визначення абсолютних кількісних показників клітинної ланки імунітету показала їх залежність від функціонального стану репродуктивної системи. Встановлено, що за піометри абсолютна кількість нейтрофілів була більшою, ніж у тварин в анеструсі, але при цьому їх відносна кількість, здатних до фагоцитозу, була найменшою. За піометри встановлена найменша кількість лімфоцитів та їх основних субпопуляцій.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

Аналіз результатів власних досліджень вказує на те, що вираженими критеріями прояву дисфункції репродуктивної системи, за яким проявляється високий ступінь залежності і, ймовірно, прогностичності є вік та розмір тварини і спосіб їх утримання. Слід зазначити, що для фолікулярної фази характерним є зменшення абсолютної кількості імунокомпетентних клітин в основному за рахунок Т-хелперної субпопуляції. Для лютеїнової фази статевого циклу було характерним початкове збільшення популяції Т-лімфоцитів з подальшим зниженням їх абсолютної кількості. Встановлено, що найбільш реактогенними протягом статевого циклу серед популяції лімфоцитів є Т-хелперні лімфоцити.

Більш виражена імуносупресія була встановлена у сук від 2-х до 6-ти років на 25-ту добу статевого циклу. Дослідження вмісту статевих стероїдів, а також кортизолу та трийодтироніну в сироватці крові у сук протягом статевого циклу за різного віку показало, що у сук віком до 2-х років овуляція відбувається після 15-ої доби статевого циклу, порівняно з тим, що у сук від 2-х до 6-ти років вона настає до 15 доби, про що свідчить збільшення концентрації прогестерону.

Встановлена особливість поширення прогестеронових рецепторів в різних структурах матки та залежно від функціонально стану репродуктивної системи підтверджує значну роль прогестерону в генезі розвитку дисфункцій та, ймовірно, є сенсibiliзуючим чинником.

Описані вищевказані дані дозволяють зробити висновки про залежність прояву активності клітинної ланки імунітету від концентрації гормонів в т.ч. статевих стероїдів в крові сук. Встановлені регуляторні механізми дозволяють розробити ефективні фармакологічні протоколи імунологічного контролю адекватності перебігу статевого циклу у сук та упередження прояву дисфункцій репродуктивної системи.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розлади фертильності собак зазвичай створюють додаткові виклики для практикуючого ветеринарного лікаря, які пов'язані з необхідністю розуміння нейроімуноендокринної регуляції статевого циклу. Можна вважати, що репродуктивний потенціал у цього виду нижчий, ніж у сільськогосподарських тварин і має тенденцію до зменшення. Ця ситуація дотична до гуманної медицини, де спостерігається різке падіння народжуваності, що призвело до необхідності впровадження допоміжних репродуктивних технологій. Дослідженнями з вивчення поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук, а відповідно і впливом на ці показники зовнішніх та внутрішніх чинників, займаються дослідники різних країн. У дослідженні шведських лікарів ветеринарної медицини щодо діагностики хвороб собак найпоширенішим ураженням репродуктивної системи самок була піометра [82]. За даними інших авторів [119] найбільша частота гінекологічних випадків була виявлено у молодих сук віком до 3 років (46,84 %), потім у тварин 4-6 років (23,75 %), 7-9 років (14,29 %) і старших сук 10-12 років (11,30 %) і найнижчий – у дуже старих сук >12 років (3,82 %). Отримані нами дані мають дещо інший розподіл залежно від віку. Так, у сук до 2-х років лише у 12,2 % випадків серед інших дисфункцій встановлювали неплідність, проти 39,0% – в зрілому віці та 48,8% – в старшому (після 6 років) віці. Також найменший відсоток встановлений і серед сук віком до 2-х років, у яких виявлена піометра (19,3%) та кістозні утворення в яєчниках та матці (13,2%). При цьому слід зазначити, що серед сук віком до 2-х років частіше, ніж в дорослому віці (від 2-х до 6-ти років) встановлювали дисфункції, пов'язані з ациклією або поліциклією, відсоток таких тварин становив 34,1%. Розбіжності з встановленими іншими авторами та нашими результатами можуть бути пов'язані з особливістю власників щодо вибору інших порід в різних країнах та варіаціями в геокліматичних регіонах. Деякі автори також визначають, що піометра здебільшого виникає у сук старших 5 років [67].

Аналізуючи середні показники поширення усіх дисфункцій, слід зазначити, що частіше всього, а саме у 33,3% вони проявлялися у весняний період. Серед дисфункцій у весняний період 42,2% прояву пов'язано з піометрою, 26,8% – з неплідністю та майже однаковий відсоток прояву пов'язаний з порушенням циклічності статевого циклу (21,6%) та кістозним переродженням матки та яєчників (20,9%). В цьому отримані нами дані кореспондуються з даними інших дослідників, за дослідженнями яких [36] характерністю сезонних появ репродуктивних розладів було показано, що найвища частота захворюваності була зареєстрована навесні, а найнижча – восени (36,52 проти 18,80%). Екологічні фактори відіграють вирішальну роль у впливі на репродуктивну ефективність у собак. Протягом теплого сезону в певних регіонах клімат може змінити естральний цикл у собак. Механізм, відповідальний за негативний вплив тепла на циклічну активність собаки до кінця не вивчений, але це може бути наслідком теплового стресу у відповідний період [50].

В науковій літературі відсутні дані щодо залежності умов утримання і розвитку дисфункцій у репродуктивній системі. За нашими даними встановлено виражене збільшення відсотку сук з проявом дисфункції при їх утриманні в умовах квартири. Так, за квартирною утримання неплідність встановлена у 68,3% тварин, у в умовах приватного будинку – 31,7%. Прояв піометри також частіше реєструється у сук в умовах квартири (65,1%) порівняно з утриманням в приватних будинках (34,9%). Імовірно, розвиток дисфункцій репродуктивної системи за умов квартирної утримання слід розглядати в розрізі загального розвитку патологій організму за впливу гіподинамії. Оскільки квартирні помешкання зазвичай обмежують пересування тварин, знижують повноцінність впливу природних кліматичних чинників (температура, довжина світлового дня). Такі твердження припускають і дослідники що, вивчали вплив гіподинамії на найпоширеніші патологічні стани дрібних домашніх тварин, такі як ортопедичні та ендокринні захворювання, порушення обміну речовин, а також ожиріння та надмірна маса тіла [9, 68, 315]. Нашими дослідженнями також встановлена

залежність від розміру собаки та поширенням дисфункцій, які виражалися тим, що серед сук великих розмірів частіше всього (46,2%) діагностується кістозне переродження матки та яєчників, проте неплідність та ациклічні і поліциклічні статеві цикли у цієї групи тварин найменш поширені. У сук маленьких розмірів в 61,5% серед інших груп тварин встановлено випадки піометри, проте як у собак середніх розмірів, лише 13,5%, що в 4,6 разів менше. Також прояв ациклії та поліциклії в 50% випадків був встановлений у сук дрібних порід, в той час як у сук великих порід цей показник становив лише 15,9%. Наші результати розбігаються з дослідженнями інших дослідників, за даними яких захворюваність на піометру, мацерацію плода та псевдовагітність були вищими у собак породи лабрадор (35,92%, 26,92 і 23,33% відповідно), ніж у німецького шпіца (по 15,38%). Автори припускають, що ці результати, імовірно, пов'язані з частішим розведенням великих порід собак серед місцевого населення [36]. Отримані дані щодо поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від віку, способу утримання, розміру та сезону року характеризуються високим ступенем залежності і, імовірно, прогностичності від віку і розміру тварини та способу їх утримання. Слід зазначити, що сезон року також є впливовим чинником на прояв дисфункції, але переважно це пов'язано з піометрою у весняний період року.

Окрім зовнішніх факторів, що впливають на особливості функціонування організму собак, важливим є імуніфізіологічний статус і особливо в період статевого циклу, від адекватності перебігу якого залежить розвиток дисфункцій. Досліджені нами показники клітинної ланки як вродженого, так і адаптивного імунітету в динаміці протягом статевого циклу показали, що здатність нейтрофілів до фагоцитозу змінювалась протягом циклу наступним чином: на 5-ту добу (фолікулярна фаза) цей показник достовірно збільшився ($p < 0,05$) на 13% порівняно з першим днем і становив $4,11 \pm 0,46$ Г/л. Аналіз подальшої динаміки показує тенденцію до зниження ФАН, і в період з 15 до 20 доби встановлено значне зниження відповідного показника – до 16%. За наступні 5 діб спостереження ФАН підвищився з $2,90 \pm 0,81$ Г/л до $3,13 \pm 0,39$ Г/л. Дані щодо

збільшення фагоцитарної активності нейтрофілів у період очікуваної овуляції отримані також іншими дослідниками [256]. Збільшення кількості нейтрофілів, а відповідно і їх здатність до фагоцитозу у фолікулярну фазу пояснюються інфільтрацією цих клітин разом з макрофагами у преовуляторний фолікул [37]. На 15-ту добу (лютеальна фаза статевого циклу) абсолютна кількість лімфоцитів збільшується на 13%, в свою чергу моноцитів – на 10%. Таку тенденцію можна пояснити тим, що лімфоцити та макрофаги (моноцити є їх попередниками) мають лютеотропний ефект. Цей ефект продемонстрований в дослідженнях при спільному культивування цих клітин з гранульозними клітинами [146]. Щоб встановити особливості динаміки лімфоцитів протягом статевого циклу нами досліджено їх імунорегуляторні субпопуляції. Після 10-ї доби (після закінчення фолікулярної фази) встановлено збільшення кількості Т-лімфоцитів, яке тривало до 20-ї доби включно. Слід зазначити, що саме на цей період припадає і значне збільшення вмісту прогестерону з $6,48 \pm 0,54$ нмоль/л (10-та доба) до $299,30 \pm 10,87$ нмоль/л (20-та доба). Імовірно синхронне підвищення Т-лімфоцитів та прогестерону під час статевого циклу є взаємозалежним процесом. Пряма дія прогестерону на Т-клітини вже давно обговорюється [243, 287]. За даними деяких авторів Т-клітини можуть інгібувати ефекторні Т-клітини (T-eff) за допомогою різних механізмів, таких як секреція імуносупресивного цитокіну IL-10. Т-лімфоцит пригнічує відторгнення плода і також сприяє полегшенню аутоімунних захворювань, що спостерігаються під час вагітності [276]. Також було висловлено припущення, що прогестерон може модулювати функцію Т-клітин через зв'язування з мембранозв'язаним прогестероновим рецептором, експресованим на Т-клітинах, або впливає на Т-клітини через зв'язування з глюкокортикоїдним рецептором [191]. У наших дослідженнях не встановлено синхронних змін вмісту прогестерону та кортизолу, а навпаки у фолікулярну фазу встановлено збільшення кортизолу, а у лютеальну – його зменшення. Саме на фолікулярну фазу припадає і зменшення Т-лімфоцитів, що підтверджує ряд даних про спричинену глюкокортикоїдами загибель Т-клітин, перш за все в

контексті позитивної та негативної селекції тимоцитів [124]. Підвищення концентрації кортизолу, може бути індикатором стресорності статевого циклу у сук [300]. Нові дані свідчать про те, що прогестерон може індукувати апоптоз звичайних Т-хелперних клітин, тоді як Т-супресорні стійкі до спричиненої прогестероном загибелі [86, 126]. Нашими дослідженнями підтверджено зниження Т-хелперних клітин у лютеальну фазу статевого циклу, але при цьому концентрація прогестерону перевищувала $103,7 \pm 2,60$ нмоль/л, в той самий час кількість Т-супресорних клітин була майже незмінною. Практично незмінна абсолютна кількість В-лімфоцитів протягом статевого циклу у сук, що показана в наших дослідженнях підтверджена й іншими дослідниками [236].

Динаміка НК-клітин, які відображають вроджений клітинний імунітет, мала тенденцію до зниження в динаміці фолікулярної фази статевого циклу (перші 10 діб), на відміну від Т- та В-лімфоцитів. Така тенденція описана абсолютно фізіологічною і закономірною в інших дослідженнях [89, 187]. Підвищення популяції цих клітин в лютеальну фазу статевого циклу автори пов'язують з вирішальною роллю цих клітин в імплантації ембріону і в подальшому підтриманні вагітності [196]. Підвищення рівня трийодтироніну на 10-ту добу статевого циклу співпадає з високими концентраціями естрадіолу, така естрагенозалежність узгоджується з даними літератури [32, 210]. Вважається, що коливання рівнів естрогенів і прогестерону під час естрального циклу та пов'язані з цим зміни в імунній функції впливають на реакцію на патогенні мікроорганізми слизової оболонки. Дослідження, проведені на мишах, виявили знижений захист від бактеріальної інфекції в статевих шляхах у відповідь на прогестерон [153].

Нами спостерігалось зниження концентрації естрадіолу, починаючи з 10-ї доби статевого циклу і до 25-ї доби. У сук початок піометри, інфекції матки, характерні для першої половини лютеальної стадії естрального циклу, під час якої концентрація прогестерону в крові досягає максимуму, а концентрація естрадіолу-17 бета є найнижчою [285]. Про протизапальний ефект естрадіолу під час фолікулярної фази повідомляється і іншими авторами [231].

Дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від віку показало, що фагоцитарна активність нейтрофілів протягом статевого циклу у собак до 2-х років мала тенденцію до зниження з 1-ї до 20-ї доби на відміну від собак у віці від 2-ох до 6-ти років, у яких ФАН мала спочатку тенденцію до збільшення (з 1-ї по 10-ту добу), а в подальшому – до зниження. Імовірним фактором, який може впливати на ці особливості є концентрація статевих стероїдів рецепторно опосередкованим шляхом. Так, у сук до 2-х років фізіологічне підвищення вмісту прогестерону почалося з 10-ї доби, а у сук від 2-х до 6-ти років – з п'ятої доби. При цьому слід зазначити, що концентрація статевих стероїдів у сук від 2-х до 6-ти років була значно вищою. Нижчу концентрацію статевих стероїдів у сук до 2-х років можна пояснити меншою кількістю овуляторних фолікулів. Вікові зміни оваріальної активності тісно пов'язані з ендокринними змінами, насамперед з коливаннями циркулюючих рівнів гонадотропінів і статевих стероїдів [44]. Дослідження на щурах показало, що преовуляторні фолікули більші, і проліферативна активність гранульозних клітин вища у літніх щурів, ніж у молодих [185]. Вплив сезону року на показники крові було показано в низці досліджень [192]. Проведена нами оцінка впливу сезону року на динаміку імунофізіологічних та ендокринних показників за статевого циклу показала, що в осінній період триваліша фолікулярна фаза, а відповідно і пізніша овуляція, про що свідчить вміст статевих стероїдів в сироватці крові. Окрім цього ми спостерігали вищу концентрацію прогестерону, на 20-ту добу в сироватці крові у сук в осінній період. Аналогічні спостереження були зроблені і іншими авторами [209], які встановили вплив коливання річного репродуктивного циклу, які відбуваються через зміни тривалості дня та секреції мелатоніну і класифікований, як негативний або позитивний фотоперіод для тварин.

Зміна гомеостазу під впливом імунної та ендокринної системи є невідворотним процесом за статевого циклу у самок тварин. Між імунною та ендокринною системою існує рецепторно-опосередкований зв'язок за принципом позитивного та негативного зворотного зв'язку, що дозволяє

сформувані баланс між цими системами [281]. В наших дослідженнях встановлена знижена активність до фагоцитозу за піометри, іншими дослідниками цей факт пов'язується, з можливим сприянням вищій захворюваності на дисфункцію у другій половині лютеїнової фази [133]. Також в групі сук за піометри концентрація в сироватці крові прогестерону, естрадіолу, кортизолу та трийодтироніну була вищою, ніж у тварин в інших групах, що імовірно пов'язано з інтенсивною експресією імунокомпетентними клітинами біологічних молекул та рецепторів для посилення імунологічного захисту під час дисфункцій. Той факт, що майже всі імунні клітини експресують рецептори естрогену та прогестерону, що забезпечує гормональну імуномодуляцію та інтеграцію імунної, ендокринної та репродуктивної систем показано і в інших дослідженнях [81, 164]. На сьогоднішній день немає чіткої визначеності щодо впливу статевих стероїдів на популяцію Т-лімфоцитів [55]. Нашими даними також не встановлено чіткої закономірності в кількісних показника Т-лімфоцитів та їх імунорегуляторних субпопуляціях в естральний та анестральний періоди. При цьому виражена імуносупресія за піометри, хоча при цьому імунорегуляторний індекс (Th1/Th2) є оптимальним і дорівнює $3,00 \pm 0,58$. Ці дані свідчать про те, що баланс Th1/Th2 має вирішальне значення для імплантації та успішної вагітності на ранніх термінах, а естроген і прогестерон можуть регулювати цей баланс. Це припущення збігається з думкою інших авторів [182]. Одним з цікавих результатів цього дослідження було встановлений високий вміст кортизолу у сук за піометри, що показує стресорний вплив дисфункцій на організм та може бути пов'язаний з біллю, а можливо і додатковим психологічним впливом за умов ветеринарної клініки. В деяких дослідженнях кортизол запропонований у якості індикатору стресу, пов'язаного з болем [160]. Дані що вмісту трийодтироніну в сироватці крові сук у більшості досліджень представлені за умов вагітності та за оцінки функціональної активності самої щитоподібної залози [204, 293, 294]. В наших дослідження збільшення кількості трийодтироніну у сук за піометри, імовірно, можна пояснити підвищенням мобілізаційних функцій організму за запальної реакції і пов'язаним з цим

синтезом протеїну. Це припущення підтверджується іншими дослідниками

Післянатальний онтогенез пов'язаний з впливом загального адаптаційного синдрому, під час якого відбувається значне збудження вищих вегетативних центрів з активацією симпато-адреналової системи (САС) [112]. За цими даними статевий цикл також слід вважати як фактор стресорності організму [248]. Включення САС у реакцію відповіді на вплив стресорного фактору досліджують рівень екскреції адреналіну сечею [92], аналізу концентрації кортизолу у шести собак [202], або в слині [51]. На думку інших авторів вміст стресорних гормонів в крові і сечі біологічно активних речовин не дає достовірної інформації про їх функціональну активність, але доки не встановлена щільність рецепторів до цих біологічно активних речовин на клітинній мембрані спеціалізованих клітин (клітин -мішеней) [265]. Як відомо, поверхневі рецептори на клітинній мембрані певної специфічності функціонально активних клітин крові відображають і здатність їх виконувати функції, які контролюються даними лігандами [302]. Як свідчать дані літератури, тест розеткоутворення лімфоцитів з облігатним антигеном (для Т-клітин є еритроцити барана), дозволяє не тільки ідентифікувати Т-клітини, які несуть певні специфічні рецептори, але і опосередковано стверджувати про ступінь їх активації [4]. Як показали результати проведених досліджень [2], застосування навантажувального тесту з адреналіном дозволяє оцінити ступінь стресованості організму.

Нашими спостереженнями показано, що у тварин, де ступінь сенсibilізації до адреналіну (за % інверсії) був 14% і вище, кількість нейтрофілів становила здатних до фагоцитозу на 22% була меншою, ніж у собак, у яких ступінь сенсibilізації був меншим за 10%. Це можна пояснити тим, що клітини імунної системи експресують адренорецептори, які є мішенню для норадреналіну та адреналіну, а ці медіатори в свою чергу інгібують міграцію і окислювальний метаболізм у нейтрофілах [261]. Слід відмітити, що в групі тварин з найвищим ступенем сенсibilізації (14% і вище) відносна кількість Т-хелперів складала

48,2±0,84%, що є найбільшим показником порівняно з іншими групами. Інша тенденція встановлена відносно Т-супресорних лімфоцитів, а саме в 3-ій групі тварин цей показник є нижчим в порівнянні з 1-ю та 2-ю групами. Така відносна кількість Т-хелперних та Т-супресорних клітин відобразилася на показнику імунорегуляторного індексу, який за високого ступеня сенсibilізації до адреналіну (14% і більше) становив 4,70±0,84 і був найбільшим, порівняно з групами тварин за ступеня сенсibilізації лімфоцитів до адреналіну нижче за 14%.

Відомим фактом є те що, підвищений ІРІ свідчить про дисбаланс між імунорегуляторними субпопуляціями лімфоцитів (переважанням Т-хелперної активності над Т-супресорною) і може бути одним з факторів ризику розвитку імунопатологічних реакцій [47]. У взаємодії між субпопуляціями Т-лімфоцитів лежить механізм, при якому активовані Т-супресори пригнічують активність Т-хелперів. У свою чергу, Т-хелпери при різкому збільшенні їх кількості стимулюють утворення Т-супресорів, які пригнічують активність Т-хелперів [66].

Для оцінки факторів, які можуть бути біомаркерами в прогнозуванні розвитку дисфункцій репродуктивної системи слід розуміти і стан місцевого імунітету на рівні органів мішеней, які частіше всього уражаються за патофізіологічних процесів. На думку багатьох авторів найбільш помітні зміни відбуваються в яєчнику та ендометрію матки [58, 260, 298]. Проведені нами гістологічні дослідження стінки матки за різного стану репродуктивної системи встановили зміни, особливо помітні на епітеліальних клітинах, епітеліальних криптах і залозистих клітинах, що виробляють слиз. Ендометрій матки сук за статевого циклу дещо відрізнявся: він був вже циліндричним, висота епітелію була більшою, овоїдної форми, ядра епітелію були парабазально чи базально розміщені майже в один ряд, злегка амфoфільні з глибоким хроматином, ядерно-цитоплазматичний індекс був зміщений у сторону цитоплазми, в цитоплазмі у кожній клітині над ядром зона більш світлого однорідного кольору.

У сук за піометри покривний епітелій був циліндричним однорядним, з округлим некрупним ядром у центральній частині клітини, в більшості ядер чітко видно виступаюче ядрерце. Цитоплазма була базофільна, рясна, фокусно пінява, з широким нерівним краєм, звернутим у просвіт залози чи порожнини матки. Отримані нами дані при гістологічному дослідженні матки за піометри узгоджуються з результатами отриманими в дослідженнях Грищук Г.П. з співавторами [134].

Покривний епітелій та епітелій залоз ендометрію у сук в анестральний період був призматичним, однорядним з парацентрально розташованим округлим ядром з щільним хроматином, з рівним співвідношенням ядра до еозинофільної цитоплазми (ядерно-цитоплазматичний індекс близький до 1). Усі описані зміни характерні до тих, що встановлені іншими авторами [27].

Окрім гістологічних змін на ендометрію, різні фази циклу тічки також характеризуються циклічними змінами концентрації рецепторів прогестерону на клітинах матки, що було підтверджено за допомогою імуногістохімічного методу. Звертає на себе увагу виразна позитивна реакція (присутність рецепторів прогестерону) у ендотелії судин ендометрію. Фізіологічний вплив прогестерону на ендометрій судин матки пов'язаний з необхідністю фізіологічної проникності матки перед імплантацією [111]. Зміни, викликані цими стероїдним гормонам, готують ендометрій до імплантації та залишаються важливими протягом наступних постімплантаційних фаз для забезпечення успішної вагітності [101]. Вкрай низька реактивність клітин виявлена нами у залозистому епітелії всіх досліджуваних груп. Ці результати узгоджуються з дослідженнями, що згадуються в літературі [263, 303]. Відповідні літературні дані свідчать про те, що надмірна кількість прогестерону або надмірна чутливість матки до прогестерону через кількість рецепторів прогестерону, може призвести до піометри. Багато авторів досліджували експресію рецепторів прогестерону у матці сук з піометрою [237, 255]. Отримані нами результати показують, що у залозистому епітелії всіх досліджуваних груп вкрай низька прогестеронова реактивність клітин. У тварин з піометрою епітелій залоз ендометрію був мікрофокусно слабопозитивним, а у стромі була значна частина прогестерон-позитивних клітин. Таким чином, наші результати досліджень підтверджують

значну активність прогестеронових рецепторів за піометри. Дискусійним залишається питання, чи впливає попередня сенсibilізація прогестероном за статевого циклу на пусковий механізм розвитку піометри, або персистенція прогестеронової рецепторної активності навіть за малої концентрації прогестерону сприятиме розвитку дисфункцій матки.

Загальновідомо, що рецептори CD4 важливі для активації Т-клітин, ці клітини підтримують периферичну імунну толерантність, запобігають аутоімунним процесам і навіть є прогностичним фактором щодо неоплазій. Встановлено, що за піометри середня кількість лімфоцитів CD4 становила $13,4 \pm 4,2$ клітин, що є найбільшим показником в порівнянні з іншими групами. Популяція CD8 лімфоцитів навпаки за піометри була найменшою ($0,75 \pm 0,2$ клітин). Достатньо велика кількість цих клітин виявлена в анестральний період. Ці клітини можуть знищувати клітини-мішені шляхом продукції цитокінів, перетворюватись у клітини імунологічної пам'яті, а також сприяти ініціації, розвитку аутоімунних реакцій та регулювати їх. Значний приплив Т-лімфоцитів у зразках піометри, головним чином через залучення CD8Т-лімфоцитів, встановлено в дослідженнях інших авторів [28]. Можливим фактором розбіжностей в отриманих результатах, є інший мікробіологічний склад порожнини матки або наявність додаткового вірусного імуногену.

Імунокомпетентні клітини з фенотипом CD138, CD20 та CD68 за піометри виявлені в більшій кількості, ніж за статевого циклу та в анестральний період. За статевого циклу популяція клітин з фенотипами CD138, CD20 та CD68 була найменшою, порівняно з групою за піометри та в анестральний період.

Наразі обмаль досліджень щодо зміни домінування різних субпопуляцій лейкоцитів, які визначаються гормональними та мікросередовищними змінами модуляторних факторів [242]. Разом з тим, на підставі наших досліджень, можна припустити, що розвиток дисфункцій в репродуктивній системі сук починається в період після статевого циклу і чинники, які на це впливають потребують подальшого дослідження. Цілком очевидним є те, що ключовим в цьому є взаємодія між ендокринною та імунною системами через активацію рецепторів імунних клітин й сенсibilізації до прогестерону клітин матки.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

Нашими дослідженнями проведена системна оцінка імунологічних, ендокринних, гістологічних показників крові та репродуктивної системи у сук, що дає змогу стверджувати про імунозалежність перебігу статевого циклу. Отримані результати поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук чітко вказують на вплив зовнішніх (сезону року та умови утримання) та внутрішніх (вік та розмір) чинників на імовірність її виникнення. Високий вміст Т-лімфоцитів в тканинах матки за піометри с CD 4 фенотипом вказує на активні проліферативні процеси в клітинній ланці адаптивного імунітету і потребує уваги при призначенні фармакологічних засобів імуноотропної дії.

При оцінці клінічного стану сук обов'язковим є встановлення показників клітинної ланки імунітету і особливо ступінь сенсibiliзації рецепторів Т-«активних» лімфоцитів до нейромедіатору адреналіну, що надасть можливість прогнозувати імовірність розвитку дисфункцій репродуктивної системи та упереджувати прояв патологічних процесів. Для лікарів ветеринарної медицини обов'язковим є розуміння, що статевий цикл є стресорним фактором для сук і визначення вмісту кортизолу в сироватці крові може надати додаткову інформацію про імовірність запальної реакції в репродуктивних органах.

Потребує подальшої оцінки впливу естрадіолу на генез виникнення дисфункцій репродуктивної системи в період після статевого циклу і застосування його як профілактичного засобу за відсутності парування.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлені нові наукові, експериментально доведені та узагальнені дані щодо поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук в умовах м. Одеси, залежності їх прояву від зовнішніх (сезони року та умови утримання) та внутрішніх (вік та розмір тварини) чинників. Встановлено особливості імунного та ендокринного статусу у сук за статевого циклу і за різного стану репродуктивної системи. Запропоновано науково-обґрунтований спосіб прогнозування розвитку дисфункцій репродуктивної системи у сук за різного ступеня сенсibiliзації рецепторів Т-«активних» лімфоцитів до нейромедіатору адреналіну.

1. Встановлено, що у сук до 2-х років лише в 12,2 % випадків серед інших дисфункцій діагностували неплідність, проти 39,0% – в зрілому віці, та 48,8% – в старшому (після 6-ти років) віці. Найменший відсоток встановлений і серед сук віком до 2-х років, у яких виявлена піометра (19,3%) та кістозні утворення в яєчниках та матці (13,2%). У сук маленьких розмірів в 61,5% встановлено випадки піометри, проте як у собак середніх розмірів – лише 13,5%, що є в 4,6 разів менше.

2. Серед дисфункцій навесні 42,2% прояву пов'язано з піометрою, 26,8% – з неплідністю та майже однаковий показник прояву пов'язаний з порушенням циклічності естрального циклу (21,6%) і кістозним переродженням матки та яєчників (20,9%). Прояв піометри також частіше реєструється у сук в умовах квартири (65,1%) порівняно з утриманням в приватних будинках (34,9%). В середньому, за квартирною способу утримання прояв дисфункцій становить 68,3%, а за утримання в умовах приватного будинку – 31,7%.

3. За результатами досліджень клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу обґрунтованим є визначення здатності нейтрофілів до фагоцитозу. Цей показник достовірно збільшився ($p < 0,05$) на 13% порівняно з першим днем і становив $4,11 \pm 0,46$ Г/л. В динаміці з 15-ої до 20-ої доби встановлено значне зниження цього показника (на 16%).

4. Доведено, що основні зміни показників протягом статевого циклу були характерні для Т-лімфоцитів. В перший день статевого циклу їх абсолютна кількість становила $2,41 \pm 0,11$ Г/л, що в 5,9 разів більше за абсолютну кількість В-лімфоцитів. Протягом перших 10-ти днів статевого циклу (цей період характерний для фолікулярної фази) абсолютна кількість Т-лімфоцитів мала достовірну ($p < 0,05$) тенденцію до зниження і на 10-ту добу становила $1,87 \pm 0,47$ Г/л, зменшення відбулося на 0,54 Г/л.

5. Встановлена залежність стану клітинної ланки імунітету у сук за естрального циклу залежно від віку та сезону року. У сук до 2-х років встановлено зменшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів на 24%, а в дорослих – на 27%. Більше вираженим достовірне ($p < 0,001$) зменшення кількості лімфоцитів було у субпопуляції Т-хелперів та В-лімфоцитів, на відміну від Т-супресорів та НК-лімфоцитів, де кількісне зменшення становило 0,09 Г/л та 0,04 Г/л у сук до 2-х років та 0,05 Г/л – у віці від 2-х до 6-ти років. Не встановлено суттєвої різниці в показниках абсолютної кількості Т- та В-лімфоцитів залежно від сезонів року, що мали синхронну тенденцію до зниження протягом фолікулярної та лютеальної фаз статевого циклу.

6. При дослідження вмісту гормонів в сироватці крові сук за статевого циклу показано, що на 15-ту добу еструсу концентрація прогестерону в сироватці крові значно (в 16 разів) достовірно ($P \leq 0,05$) збільшилась, порівнюючи з 10-ою добою. Тенденція до збільшення концентрації відповідного гормону зберіглася і в наступні 5 днів спостереження та вже на 20-ту добу його концентрація становила $299,30 \pm 10,87$ ($P \leq 0,05$) нмоль/л. Собаки у віці до 2-х років, а також у осінній сезон, мають тривалішу фолікулярну фазу статевого циклу, що проявляється у більш пізньому збільшенні концентрації прогестерону в крові.

7. Доведено достовірну різницю в показниках клітинної ланки імунітету у сук залежно від адренергічної імунореактивності їх організму. За низького ступеня, до 10% інверсії, встановлено на 10,6% ($p < 0,01$) більшу відносну кількість лімфоцитів, ніж у сук зі ступенем сенсibiliзації лімфоцитів більше, ніж 14%, а також на 6,8% порівняно з групою, де сенсibiliзація лімфоцитів

встановлена від 10 до 14%. Показано, що у тварин, де ступінь сенсibilізації до адреналіну була 14% і вище, кількість нейтрофілів становила $52,8 \pm 14,19\%$, але при цьому у сук цієї групи відносна кількість нейтрофілів, здатних до фагоцитозу, на 22% була меншою, ніж у тварин з ступенем сенсibilізації лімфоцитів до адреналіну до 10%.

8. Встановлено, що за піометри середня кількість лімфоцитів CD4 становила $13,40 \pm 4,20$ клітин, що є найбільшим показником в порівнянні з іншими групами. Популяція CD8 лімфоцитів навпаки за піометри була найменшою ($0,75 \pm 0,20$ клітин). Достатньо велика кількість відповідних клітин виявлена в анестральний період. Імуногістохімічне дослідження показало низьку активність прогестеронових рецепторів клітин залозистого епітелію матки, натомість ендотелій капілярів та строми за піометри мали значну кількість прогестерон-позитивних клітин.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1.3 метою прогнозування розвитку дисфункцій репродуктивної системи у сук рекомендується визначати рецепцію «активних» Т-лімфоцитів до нейромедіатору адреналіну, що дозволить оцінити стресорну реакцію організму за відсотком інверсії.

2. Під час клінічного обстеження сук слід враховувати вік і розмір тварини, а також умови її утримання та сезон року, що дозволить встановити ризики виникнення запальних реакцій в органах репродуктивної системи.

3. Для зниження ризику виникнення запальних процесів в матці після статевого циклу рекомендованим є визначення показників клітинної ланки імунітету і фагоцитарної активності нейтрофілів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Брошков, М.М., & Кириченко, В.В. (2023). Стан клітинної ланки імунітету та вміст стероїдних гормонів у сук за різного стану репродуктивної системи. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*, 25(112), 175-180. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11228>
2. Брошков, М. М. (2016). *Імунний статус організму собак залежно від фізіологічних особливостей його корекції*. [Неопубл. дис. д-ра вет. наук]. Національний університет біоресурсів та природокористування
3. Влізло, В. В., Федорук, Р. С., Ратич, І. Б., Віщур, О. І., Шаран, М. М., Вудмаска, І. В., Федорович, Є. І., Остапів, Д. Д., Стапай, П. В., Бучко, О. М., Гунчак, А. В., Салига, Ю. Т., Стефанишин, О. М., Гевкан, І. І., Лесик, Я.В., Сімонов, М. Р., Невоструєва, І. В., Хомин, М. М., Смолянінов, К. Б., ... Мартин, Ю.В. (2012). *Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: Довідник* (Влізло, В.В., ред.). СПОЛОМ
4. Дегтяренко, Т. В., Макулькін, Р.Ф. (1997). *Біогенні стимулятори та імунореактивність: Біогенні стимулятори – універсальні адаптагени*. Маяк
5. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (2006, 22 лютого). *Відомості Верховної Ради України*, (27), 230. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>
6. Кириченко, В.В. (2023). Поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від віку, розміру, умов утримання та сезону року. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 109, 110-116. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2023.109.17>
7. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка відносних показників імунограми у сук за еструсу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 105, 5-12. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.105.01>
8. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка статевих стероїдних гормонів, кортизолу та трийодтиронину у собак за естрального циклу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 104, 18-25. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.104.03>

9. Локес-Крупка, Т. П., Бурда, Т. Л., & Цвіліховський, М. І. (2019). Вплив раціонів на розвиток надмірної маси тіла собак порід середнього розміру. *Scientific Progress & Innovations*, 4, 224-232. <https://doi.org/10.31210/visnyk2019.04.29>
10. Лумедзе, І. Х., Кот, С. П., Мельник, В. О., Кириченко, В. А. & Лумедзе, Т. С. (2021). *Клінічна діагностика хвороб тварин: методичні рекомендації до лабораторно-практичних занять для здобувачів вищої освіти ступеня «Магістр» спеціальності 212*, МНАУ, 46 с.
11. Резніков, О. Г. (2003). Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики. Ендокринологія, Т. 8, № 1., С. 142–145
12. Agorastos, A., & Chrousos, G. P. (2022). The neuroendocrinology of stress: the stress-related continuum of chronic disease development. *Molecular psychiatry*, 27(1), 502–513. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01224-9>
13. Ahn, S., Bae, H., Kim, J., Kim, S., Park, J., Kim, S. K., Jung, D. I., & Yu, D. (2021). Comparison of clinical and inflammatory parameters in dogs with pyometra before and after ovariohysterectomy. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 85(4), 271–278.
14. Alm, H., & Holst, B. S. (2018). Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH). *Theriogenology*, 106, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.028>
15. Altemus, M., Rao, B., Dhabhar, F. S., Ding, W., & Granstein, R. D. (2001). Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *The Journal of investigative dermatology*, 117(2), 309–317. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01373.x>
16. Amos, M. R., Healey, G. D., Goldstone, R. J., Mahan, S. M., Düvel, A., Schubert, H. J., Sandra, O., Zieger, P., Dieuzy-Labaye, I., Smith, D. G., & Sheldon, I. M. (2014). Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytotoxin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biology of reproduction*, 90(3), 54. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115972>

17. Andersen, A. C. (1970). *Reproduction*. Iowa State University Press.
18. Arcuri, G. B., Pantoja, M. H. A., Titto, C. G., & Martins, D. D. S. (2022). Preliminary analysis of reproductive, behavioral and physiological characteristics of military working dogs. *Animal reproduction*, *v19*(1), e20210092. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0092>
19. Arlt, S. P., Spankowsky, S., & Heuwieser, W. (2011). Follicular cysts and prolonged oestrus in a female dog after administration of a deslorelin implant. *New Zealand veterinary journal*, *59*(2), 87–91. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.552858>
20. Arruvito, L., Giulianelli, S., Flores, A. C., Paladino, N., Barboza, M., Lanari, C., & Fainboim, L. (2008). NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(8), 5746–5753. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5746>
21. Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A. H., & Fainboim, L. (2007). Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(4), 2572–2578. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2572>
22. Asikainen, J., Mustonen, A. M., Hyvärinen, H., & Nieminen, P. (2003). Seasonal reproductive endocrine profile of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*)—effects of melatonin and food deprivation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *299*(2), 180-187
23. Aspinall, V. (2011). Reproductive system of the dog and cat- Part 3. Reproductive physiology of the bitch by Victoria Aspinall. *Veterinary Nursing Journal*, *26*, 53-157. <https://doi.org/10.1111/j.2045-0648.2010.00042.x>
24. Atkinson, H. C., & Waddell, B. J. (1997). Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*, *138*(9), 3842–3848. <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5395>

25. Atli, M. O., Kose, M., Hitit, M., Kaya, M. S., & Bozkaya, F. (2018). Expression patterns of Toll-like receptors in the ovine corpus luteum during the early pregnancy and prostaglandin F_{2α}-induced luteolysis. *Theriogenology*, *111*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.010>
26. Axné, E., & Ström Holst, B. (2015). Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. *Theriogenology*, *83*(5), 817–821. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.016>
27. Bartel, C., Tichy, A., & Walter, I. (2014). Characterization of foamy epithelial surface cells in the canine endometrium. *Anatomia, histologia, embryologia*, *43*(3), 165–181. <https://doi.org/10.1111/ahe.12059>
28. Bartoskova, A., Turanek-Knotigova, P., Matiasovic, J., Oreskovic, Z., Vicenova, M., Stepanova, H., Ondrackova, P., Vitasek, R., Leva, L., Moore, P. F., & Faldyna, M. (2012). $\gamma\delta$ T lymphocytes are recruited into the inflamed uterus of bitches suffering from pyometra. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, *194*(3), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.024>
29. Beceriklisoy, H. B., Schäfer-Somi, S., Kücükaslan, I., Agaoglu, R., Gültiken, N., Ay, S. S., Kaya, D., & Aslan, S. (2009). Cytokines, growth factors and prostaglandin synthesis in the uterus of pregnant and non-pregnant bitches: the features of placental sites. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *44 Suppl 2*, 115–119. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01443.x>
30. Beijerink, N. J., Buijtel, J. J., Okkens, A. C., Kooistra, H. S., & Dieleman, S. J. (2007). Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrus versus ovariectomized bitches. *Theriogenology*, *67*(5), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.003>
31. Bellavance, M. A., & Rivest, S. (2014). The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Frontiers in immunology*, *5*, 136. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00136>

32. Benvenga S. (2013). When thyroid hormone replacement is ineffective?. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 20(5), 467–477. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000003>

33. Berbic, M., Hey-Cunningham, A. J., Ng, C., Tokushige, N., Ganewatta, S., Markham, R., Russell, P., & Fraser, I. S. (2010). The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(4), 900–907. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq020>

34. Bergeron, L. H., Nykamp, S. G., Brisson, B. A., Madan, P., & Gartley, C. J. (2013). An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology*, 79(2), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.016>

35. Besedovsky, L., Born, J., & Lange, T. (2014). Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(1), 67–75. <https://doi.org/10.1096/fj.13-237958>

36. Bhuyan, M.; Baruti, M.; Deka, R.; Deka, A.; Phungshubapu, H.; Pachoni, S. & Das, C.(2022). Canine Reproductive Disorders at Veterinary Clinical Complex, College of Veterinary Science, Guwahati, India: A Retrospective Study from 2016 to 2021. *Indian Journal of Animal Research*, 0(0), 1-5. <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-4920>

37. Brännström, M., & Norman, R. J. (1993). Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Human reproduction (Oxford, England)*, 8(10), 1762–1775. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137929>

38. Brinkhof, B., Spee, B., Rothuizen, J., & Penning, L. C. (2006). Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Analytical biochemistry*, 356(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.06.001>

39. Broshkov, M., Fedkalova, T., Kyrychenko, V. & Kot V. (2022). *Methods for regulation of immune reactivity in dogs*. OSAU
40. Broshkov, M.M., & Kyrychenko, V.V. (2023). Dynamics of progesterone, estradiol, cortisol, triiodothyronine and indicators of adaptive immunity concentrations in female dogs during estrus. *Journal of Biometry Studies*, Vol. 3(1), 2-11. <https://doi.org/10.29329/JofBS.2023.501.03>
41. Brown, M. B., von Chamier, M., Allam, A. B., & Reyes, L. (2014). M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Frontiers in immunology*, 5, 606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00606>
42. Buhi, W. C., Thatcher, M. J., Shille, V. M., Alvarez, I. M., Lannon, A. P., & Johnson, J. (1992). Synthesis of uterine endometrial proteins during early diestrus in the cyclic and pregnant dog, and after estrogen and progesterone treatment. *Biology of reproduction*, 47(3), 326–336. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.3.326>
43. Bulmer, J. N., Longfellow, M., & Ritson, A. (1991). Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 622, 57–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb37850.x>
44. Burger, H. G., Dudley, E., Mammers, P., Robertson, D., Groome, N., & Dennerstein, L. (2002). The ageing female reproductive axis I. *Novartis Foundation symposium*, 242, 161–171.
45. Cardinali, L., Troisi, A., Verstegen, J. P., Menchetti, L., Elad Ngonput, A., Boiti, C., Canello, S., Zelli, R., & Polisca, A. (2017). Serum concentration dynamic of energy homeostasis hormones, leptin, insulin, thyroid hormones, and cortisol throughout canine pregnancy and lactation. *Theriogenology*, 97, 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.040>
46. Cecere, J., Purswell, B., & Panciera, D. (2020). Levothyroxine supplementation in hypothyroid bitches during pregnancy. *Theriogenology*, 142, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.036>
47. Chaplin D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>

48. Chastain C. B. (1990). Canine pseudohypothyroidism and covert hypothyroidism. *Problems in veterinary medicine*, 2(4), 693–716
49. Chastant-Maillard, S., Viaris de Lesegno, C., Chebrout, M., Thoumire, S., Meylheuc, T., Fontbonne, A., Chodkiewicz, M., Saint-Dizier, M., & Reynaud, K. (2011). The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reproduction, fertility, and development*, 23(3), 391–402. <https://doi.org/10.1071/RD10064>
50. Chatdarong, K., Tummaruk, P., Sirivaidyapong, S., & Raksil, S. (2007). Seasonal and breed effects on reproductive parameters in bitches in the tropics: a retrospective study. *The Journal of small animal practice*, 48(8), 444–448. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00342.x>
51. Chmelíková, E., Bolechová, P., Chaloupková, H., Svobodová, I., Jovičić, M., & Sedmíková, M. (2020). Salivary cortisol as a marker of acute stress in dogs: a review. *Domestic animal endocrinology*, 72, 106428. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106428>
52. Chotimanukul, S., & Sirivaidyapong, S. (2012). The localization of Toll-like receptor 2 (TLR2) in the endometrium and the cervix of dogs at different stages of the oestrous cycle and with pyometra. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47, 351–355. <https://doi.org/10.1111/rda.12104>
53. Ciani, F., Maruccio, L., Cocchia, N., d'Angelo, D., Carotenuto, D., Avallone, L., Namagerdi, A. A., & Tafuri, S. (2021). Antioxidants in assisted reproductive technologies: An overview on dog, cat, and horse. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 8(1), 173–184. <https://doi.org/10.5455/javar.2021.h500>
54. Claaßen, S., Aurich, J., Walter, I., Gautier, C., & Aurich, C. (2023). Abundance of Anti-Muellerian hormone in cat ovaries and correlation of its plasma concentration with animal age, weight and stage of the estrous cycle. *Theriogenology*, 212, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.08.028>
55. Collins, M. K., McCutcheon, C. R., & Petroff, M. G. (2022). Impact of Estrogen and Progesterone on Immune Cells and Host-Pathogen Interactions in the

Lower Female Reproductive Tract. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 209(8), 1437–1449. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200454>

56. Concannon P. W. (1993). Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 3–27

57. Concannon P. W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 2, 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x>

58. Concannon P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>

59. Concannon P. W. (2012). Research challenges in endocrine aspects of canine ovarian cycles. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, 6–12. <https://doi.org/10.1111/rda.12121>

60. Concannon, P. W., Hansel, W., & Visek, W. J. (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of reproduction*, 13(1), 112–121. <https://doi.org/10.1095/biolreprod13.1.112>

61. Concannon, P. W., Me, P., Holder, W., & Hansel, W. (1977). *Pregnancy and parturition in the bitch*

62. Concannon, P. W., Temple, M., Montanez, A., & Newton, L. (2006). Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release. *Theriogenology*, 66(6-7), 1488–1496. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.007>

63. Concannon, P., Cowan, R., & Hansel, W. (1979). LH releases in ovariectomized dogs in response to estrogen withdrawal and its facilitation by progesterone. *Biology of reproduction*, 20(3), 523–531. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.3.523>

64. Concannon, P., Hansel, W., & McEntee, K. (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the

- bitch. *Biology of reproduction*, 17(4), 604–613.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod17.4.604>
65. Connelly, M. A., Gruppen, E. G., Otvos, J. D., & Dullaart, R. P. F. (2016). Inflammatory glycoproteins in cardiometabolic disorders, autoimmune diseases and cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 459, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.06.012>,
66. Corthay A. (2009). How do regulatory T cells work?. *Scandinavian journal of immunology*, 70(4), 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>
67. Costa, A.S., Silva, M.E., Santos, T.R., Bisinoto, M.B., Tsuruta, S.A. & Borges, S.B. (2019). A retrospective study of reproductive disorders in female dogs from the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 40, 2299-2308
68. Courcier, E. A., Thomson, R. M., Mellor, D. J., & Yam, P. S. (2010). An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *Journal of Small Animal Practice*, 51 (7), 362–367. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00933.x>
69. Council of Europe (1986). European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. *European Treaty Series*, No. 123. <https://rm.coe.int/168007a67b>
70. Da Silva, M. L. M., de Oliveira, R. P. M., & de Oliveira, F. F. (2020). Evaluation of sexual behavior and reproductive cycle of bitches / Avaliação do comportamento sexual e ciclo reprodutivo de cadelas. *Brazilian Journal of Development*, 6(10), 84186–84196. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-743>
71. De Bosschere, H., Ducatelle, R., & Tshamala, M. (2003). Uterine oestrogen and progesterone receptor expression in experimental pyometra in the bitch. *Journal of comparative pathology*, 128(2-3), 99–106. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0610>
72. De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P., & Coryn, M. (2002). Estrogen-alpha and progesterone receptor expression in cystic endometrial

hyperplasia and pyometra in the bitch. *Animal reproduction science*, 70(3-4), 251–259.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(02\)00013-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00013-1)

73. De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., & Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. *Theriogenology*, 55(7), 1509–1519.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00498-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00498-8),

74. De Gier, J., Kooistra, H. S., Djajadiningrat-Laanen, S. C., Dieleman, S. J., & Okkens, A. C. (2006). Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, 65(7), 1346–1359.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.010>

75. De Lorenzo, B. H., de Oliveira Marchioro, L., Greco, C. R., & Suchecki, D. (2015). Sleep-deprivation reduces NK cell number and function mediated by β -adrenergic signalling. *Psychoneuroendocrinology*, 57, 134–143.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.04.006>

76. De Los Reyes, M., Palomino, J., Araujo, A., Flores, J., Ramirez, G., Parraguez, V. H., & Aspee, K. (2021). Cyclooxygenase 2 messenger RNA levels in canine follicular cells: interrelationship with GDF-9, BMP-15, and progesterone. *Domestic animal endocrinology*, 74, 106529.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106529>

77. De Los Reyes, M., Palomino, J., Villagra, A., Ramirez, G., Peralta, O. A., Parraguez, V. H., & Aspee, K. (2023). Effect of progesterone on in vitro meiotic maturation of canine oocytes associated with Cx37 and Cx43 gene expression. *Theriogenology*, 204, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.04.005>

78. De Vito, P., Incerpi, S., Pedersen, J. Z., Luly, P., Davis, F. B., & Davis, P. J. (2011). Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 21(8), 879–890.
<https://doi.org/10.1089/thy.2010.0429>

79. Devillers, M. M., François, C. M., Chester, M., Corre, R., Cluzet, V., Giton, F., Cohen-Tannoudji, J., & Guigon, C. J. (2023). Androgen receptor signaling regulates follicular growth and steroidogenesis in interaction with gonadotropins in the ovary during mini-puberty in mice. *Frontiers in endocrinology*, *14*, 1130681. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1130681>
80. Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Poortman, J., & van Tol, H. T. (1983). Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *Journal of reproduction and fertility*, *69*(2), 641–649. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690641>
81. Dressing, G. E., Goldberg, J. E., Charles, N. J., Schwertfeger, K.L., & Lange, C. A. (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids*, *76*, 11–17. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.35>
82. Egenvall, A., Bonnett, B. N., Olson, P., & Hedhammar, A. (2000). Gender, age and breed pattern of diagnoses for veterinary care in insured dogs in Sweden during 1996. *The Veterinary record*, *146*(19), 551–557. <https://doi.org/10.1136/vr.146.19.551>
83. Ehrchen, J., Steinmüller, L., Barczyk, K., Tenbrock, K., Nacken, W., Eisenacher, M., Nordhues, U., Sorg, C., Sunderkötter, C., & Roth, J. (2007). Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood*, *109*(3), 1265–1274. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001115>
84. Einspanier, A., Jurdzinski, A., & Hodges, J. K. (1997). A local oxytocin system is part of the luteinization process in the preovulatory follicle of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biology of reproduction*, *57*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.1.16>
85. England, Gary C.W. (2010). Physiology and endocrinology of the female. *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*, 1-12. <https://doi.org/10.22233/9781905319541.1>

86. Engler, J. B., Kursawe, N., Solano, M. E., Patas, K., Wehrmann, S., Heckmann, N., Lühder, F., Reichardt, H. M., Arck, P. C., Gold, S. M., & Friese, M. A. (2017). Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(2), E181–E190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617115114>
87. Erlebacher A. (2013). Immunology of the maternal-fetal interface. *Annual review of immunology*, *31*, 387–411. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100003>
88. Evans, J., & Salamonsen, L. A. (2012). Inflammation, leukocytes and menstruation. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, *13*(4), 277–288. <https://doi.org/10.1007/s11154-012-9223-7>
89. Faas, M., Bouman, A., Moesa, H., Heineman, M. J., de Leij, L., & Schuiling, G. (2000). The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response?. *Fertility and sterility*, *74*(5), 1008–1013. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01553-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01553-3)
90. Fairweather, D., Frisancho-Kiss, S., & Rose, N. R. (2008). Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *The American journal of pathology*, *173*(3), 600–609. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071008>
91. Falchi, L., & Scaramuzzi, R. J. (2013). The expression of ER α , OTR, cPLA(2), COX-2, and PPAR γ in the cervix of the ewe during the estrous cycle. *Theriogenology*, *79*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.006>
92. Faucheux, B. A., Bourlière, F., Baulon, A., & Dupuis, C. (1981). The effects of psychosocial stress on urinary excretion of adrenaline and noradrenaline in 51- to 55- and 71- to 74-year-old men. *Gerontology*, *27*(6), 313–325. <https://doi.org/10.1159/000212491>
93. Fernandez, T., Palomino, J., Parraguez, V. H., Peralta, O. A., & De los Reyes, M. (2016). Differential expression of GDF-9 and BMP- 15 during follicular development in canine ovaries evaluated by flow cytometry. *Animal reproduction science*, *167*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.005>

94. Fieni, F., Topie, E., & Gogny, A. (2014). Medical treatment for pyometra in dogs. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 49 Suppl 2, 28–32. <https://doi.org/10.1111/rda.12302>
95. Fleming, R., Fairbairn, C., Blaney, C., Lucas, D., & Gaudoin, M. (2013). Stability of AMH measurement in blood and avoidance of proteolytic changes. *Reproductive biomedicine online*, 26(2), 130–132. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.11.005>
96. Fontbonne A. (2008). *In vivo ovulation, oocyte maturation and fertilisation in the bitch* [PhD thesis, Life Sciences, Paris Institute of Technology for Food]. HAL. <https://pastel.hal.science/pastel-00004418/document>
97. Fontbonne A. (2020). Small animal reproduction: Scientific facts versus dogmas or unverified beliefs. *Theriogenology*, 150, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.014>
98. Forsberg, M., & Madej, A. (1990). Effects of melatonin implants on plasma concentrations of testosterone, thyroxine and prolactin in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *Journal of reproduction and fertility*, 89(1), 351–358. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890351>
99. Forsberg, M., Fougner, J. A., Hofmo, P. O., Madej, M., & Einarsson, E. J. (1989). Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). *Reproduction*, 87(1), 115–123
100. Franchimont D. (2004). Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, 124–137. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.009>
101. Franco, H. L., Rubel, C. A., Large, M. J., Wetendorf, M., Fernandez-Valdivia, R., Jeong, J. W., Spencer, T. E., Behringer, R. R., Lydon, J. P., & Demayo, F. J. (2012). Epithelial progesterone receptor exhibits pleiotropic roles in uterine development and function. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(3), 1218–1227. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193334>

102. Frank, L. A., Rohrbach, B. W., Bailey, E. M., West, J. R., & Oliver, J. W. (2003). Steroid hormone concentration profiles in healthy intact and neutered dogs before and after cosyntropin administration. *Domestic animal endocrinology*, 24(1), 43–57. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(02)00204-7)
103. Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>,
104. Galac, S., Kooistra, H. S., Butinar, J., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Voorhout, G., & Okkens, A. C. (2000). Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology*, 53(4), 941–950. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00241-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00241-7),
105. Galina, C., Valencia, J. (2008). *Reproducción de animales domésticos*. Ed. Limusa
106. Gallelli, M.F., Monachesi, N., Miceli, D.D., Blatter, M.F., Gómez, N.V., Meikle, A., & Castillo, V.A. (2016). Plasma ACTH, α -MSH and cortisol variations in the dog during the oestrous cycle in different photoperiods. *Veterinarni Medicina*, 60, 567-577.
107. Gallichan, W. S., & Rosenthal, K. L. (1996). Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract. *Virology*, 224(2), 487–497. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0555>
108. Garcia, M. R., Patel, M. V., Shen, Z., Fahey, J. V., Biswas, N., Mestecky, J., & Wira, C. R. (2015). Mucosal immunity in the human female reproductive tract. *Mucosal Immunology*, 2097-2124
109. Gaynor, L. M., & Colucci, F. (2017). Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice. *Frontiers in immunology*, 8, 467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467>
110. Geron-X., Bell, E. T., & Christie, D. W. (1971). Duration of proestrus, oestrus and vulval bleeding in the beagle bitch. *The British veterinary journal*, 127(8), xxv–xxvii. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)37435-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)37435-3)

111. Goddard, L. M., Murphy, T. J., Org, T., Enciso, J. M., Hashimoto-Partyka, M. K., Warren, C. M., Domigan, C. K., McDonald, A. I., He, H., Sanchez, L. A., Allen, N. C., Orsenigo, F., Chao, L. C., Dejana, E., Tontonoz, P., Mikkola, H. K., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). Progesterone receptor in the vascular endothelium triggers physiological uterine permeability preimplantation. *Cell*, *156*(3), 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.025>
112. Goldstein D. S. (2010). Adrenal responses to stress. *Cellular and molecular neurobiology*, *30*(8), 1433–1440. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9606-9>
113. Gram, A., Trachsel, A., Boos, A., & Kowalewski, M. P. (2016). Elevated utero/placental GR/NR3C1 is not required for the induction of parturition in the dog. *Reproduction*, *152*(4), 303-311
114. Graubner, F. R., Gram, A., Kautz, E., Bauersachs, S., Aslan, S., Agaoglu, A. R., Boos, A., & Kowalewski, M. P. (2017). Uterine responses to early pre-attachment embryos in the domestic dog and comparisons with other domestic animal species. *Biology of reproduction*, *97*(2), 197–216. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox063>
115. Groppetti, D., Aralla, M., Bronzo, V., Bosi, G., Pecile, A., & Arrighi, S. (2015). Perioovulatory time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. *Animal reproduction science*, *152*, 108–116.
116. Gudermann, T., Birnbaumer, M., & Birnbaumer, L. (1992). Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *The Journal of biological chemistry*, *267*(7), 4479–4488
117. Gutiérrez, J., Gazzano, A., Pirrone, F., Sighieri, C., & Mariti, C. (2019). Investigating the Role of Prolactin as a Potential Biomarker of Stress in Castrated Male Domestic Dogs. *Animals: an open access journal from MDPI*, *9*(9), 676. <https://doi.org/10.3390/ani9090676>

118. Haas, G.G., Galle, P.C. (1984). The Cervix in Reproduction. In: Aiman, J. (eds) Infertility. *Clinical Perspectives in Obstetrics and Gynecology*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8265-2_7
119. Hadiya, H.D., Patel, D.M., & Parmar, J.J. (2021). Prevalence of Major Reproductive Disorders in Canines with Reference to Age, Sex and Breed in Central Gujarat. *Ind J Vet Sci and Biotech*, 17(1), 23-25. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.17.1.6>
120. Hagman R. (2022). Pyometra in Small Animals 2.0. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 52(3), 631–657. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.01.004>
121. Hagman, R., Rönnberg, E., & Pejler, G. (2009). Canine uterine bacterial infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors. *PloS one*, 4(11), e8039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008039>
122. Hao, S., Zhao, J., Zhou, J., Zhao, S., Hu, Y., & Hou, Y. (2007). Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *International immunopharmacology*, 7(13), 1765–1775. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.09.017>
123. Hatırnaz, Ş., Ata, B., Hatırnaz, E. S., Dahan, M. H., Tannus, S., Tan, J., & Tan, S. L. (2018). Oocyte *in vitro* maturation: A sytematic review. *Turkish journal of obstetrics and gynecology*, 15(2), 112–125. <https://doi.org/10.4274/tjod.23911>
124. Herold, M. J., McPherson, K. G., & Reichardt, H. M. (2006). Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(1), 60–72. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5390-y>
125. Hewitt, D. A., & England, G. C. (1997). Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *Journal of reproduction and fertility*. 51, 83–91
126. Hierweger, A. M., Engler, J. B., Friese, M. A., Reichardt, H. M., Lydon, J., DeMayo, F., Mittrücker, H. W., & Arck, P. C. (2019). Progesterone modulates the T-cell response via glucocorticoid receptor-dependent pathways. *American journal of*

reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), 81(2), e13084.

<https://doi.org/10.1111/aji.13084>

127. Hill, L., Jeganathan, V., Chinnasamy, P., Grimaldi, C., & Diamond, B. (2011). Differential roles of estrogen receptors α and β in control of B-cell maturation and selection. *Molecular medicine* (Cambridge, Mass.), 17(3-4), 211–220.

<https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00172>

128. Hinderer, J., Lüdeke, J., Riege, L., Bartel, A., Kohn, B., Müller, E., & Arlt, S. P. (2023). Thyroid hormones in canine pregnancy and lactation. *Theriogenology*, 203, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.03.005>

129. Hoffmann, B., Büsges, F., Engel, E., Kowalewski, M. P., & Papa, P. (2004). Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 39(4), 232–240. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00508.x>

130. Hoffmann, B., Höveler, R., Hasan, S. H., & Failing, K. (1992). Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *Journal of reproduction and fertility*, 96(2), 837–845. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960837>

131. Hollinshead, F. K., & Hanlon, D. W. (2017). Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology*, 101, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.021>

132. Hollinshead, F., & Hanlon, D. (2019). Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology*, 125, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.018>

133. Holst, B. S., Gustavsson, M. H., Lilliehöök, I., Morrison, D., & Johannisson, A. (2013). Leucocyte phagocytosis during the luteal phase in bitches. *Veterinary immunology and immunopathology*, 153(1-2), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.02.005>

134. Hryshchuk, H., Kovalyova, L., Huralska, S., Yevtukh, L., & Kovalyov, P. (2023). Histological changes in the uterine and ovarian walls in pyometra. *Scientific*

Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences, 25(109), 59-66. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10910>

135. Holumbiovská, T., & Stefanyk, V. (2018). Disorders of reproductive function in female dogs and methods of diagnostic. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20(83), 385-395. <https://doi.org/10.15421/nvlvet8376>

136. Howe L. M. (2015). Current perspectives on the optimal age to spay/castrate dogs and cats. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, 6, 171–180. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S53264>

137. Hughes, G. C., Thomas, S., Li, C., Kaja, M. K., & Clark, E. A. (2008). Cutting edge: progesterone regulates IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(4), 2029–2033. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2029>

138. Hunzeker, J. T., Elftman, M. D., Mellinger, J. C., Princiotta, M. F., Bonneau, R. H., Truckenmiller, M. E., & Norbury, C. C. (2011). A marked reduction in priming of cytotoxic CD8⁺ T cells mediated by stress-induced glucocorticoids involves multiple deficiencies in cross-presentation by dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(1), 183–194. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001737>

139. Ishiguro, K., Baba, E., Torii, R., Tamada, H., Kawate, N., Hatoya, S., Wijewardana, V., Kumagai, D., Sugiura, K., Sawada, T., & Inaba, T. (2007). Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased Escherichia coli adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 173(2), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.11.009>

140. Ivell, R. & Walther, N. (1999). The role of sex steroids in the oxytocin hormone system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151(1–2), 95-101. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00025-8),

141. Jaillardon, L., & Kaiser, M. (2023). Pathogenesis of the crosstalk between reproductive function and stress in animals - part 2: Prolactin, thyroid, inflammation

and oxidative stress. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 58 Suppl 2, 137–143. <https://doi.org/10.1111/rda.14445>

142. Janković, D., Norrman, J., Aronsson, M., Vojvodić, D., Mirilović, M., Vejnović, B., Stanišić, L., Nedić, S., Maletić, M., Đurić, M., Magaš, V., & Vakanjac, S. (2022). Analysis of the concentrations of some haematological parameters, C-reactive protein and anti-Müllerian hormone in bitches affected by pyometra. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 57(10), 1156–1164. <https://doi.org/10.1111/rda.14186>

143. Janowski, T., Fingerhut, J., Kowalewski, M. P., Zduńczyk, S., Domosławska, A., Jurczak, A., Boos, A., Schuler, G., & Hoffmann, B. (2014). In vivo investigations on luteotropic activity of prostaglandins during early diestrus in nonpregnant bitches. *Theriogenology*, 82(6), 915–920. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.005>

144. Jeffcoate, I.A. (1993) Endocrinology of anoestrous bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47. 69–76

145. Jia, M. , Dahlman-Wright, K. , & Gustafsson, J. A. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29 (4), 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>

146. Jiemtaweeboon, S., Shirasuna, K., Nitta, A., Kobayashi, A., Schuberth, H. J., Shimizu, T., & Miyamoto, A. (2011). Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 9, 79. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-79>

147. Johnston S. D. (1991). Clinical approach to infertility in bitches with primary anestrus. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 21(3), 421–425. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50051-6](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50051-6)

148. Johnston, S.D., Kustritz, M.V.& Olson, P.N.(2001). Disorders of canine ovary. *Canine and Feline Theriogenology*.193–205.

149. Jonker, F. H. (2022). A personal view on basic education in reproduction: Where are we now and where are we going?. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 7-15. <https://doi.org/10.1111/rda.13769>

150. Jungmann, C., Houghton, C. G., Nielsen, F. G., Packeiser, E. M., Körber, H., Reichler, I. M., Balogh, O., & Goericke-Pesch, S. (2022). Involvement of Oxytocin and Progesterone Receptor Expression in the Etiology of Canine Uterine Inertia. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 13601. <https://doi.org/10.3390/ijms232113601>

151. Kalinski P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(1), 21–28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>

152. Karpuzoglu, E., & Zouali, M. (2011). The multi-faceted influences of estrogen on lymphocytes: toward novel immuno-interventions strategies for autoimmunity management. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 40(1), 16–26. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8188-0>

153. Kaushic, C., Murdin, A. D., Underdown, B. J., & Wira, C. R. (1998). Chlamydia trachomatis infection in the female reproductive tract of the rat: influence of progesterone on infectivity and immune response. *Infection and immunity*, 66(3), 893–898. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.3.893-898.1998>

154. Kempisty, B., Bukowska, D., Woźna-Wysocka, M., Piotrowska, H., Jackowska, M., Zuraw, A., Ciesiolka, S., Antosik, P., Maryniak, H., Ociepa, E., Porowski, S.Z., Brüßow, K., Jaskowski, J.M. & Nowicki, M. (2013). Endometritis and pyometra in bitches: A review. *Veterinarni Medicina*, 58, 289-297. <https://doi.org/10.17221/6864-VETMED>

155. Kida, K., Baba, E., Torii, R., Kawate, N., Hatoya, S., Wijewardana, V., Sugiura, K., Sawada, T., Tamada, H., & Inaba, T. (2006). Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. *Theriogenology*, 66(5), 1325–1333. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.028>

156. Kim, M. K., Fibrianto, Y. H., Oh, H. J., Jang, G., Kim, H. J., Lee, K. S., Kang, S. K., Lee, B. C., & Hwang, W. S. (2005). Effects of estradiol-17beta and

progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 63(5), 1342–1353. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.019>

157. Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J., & Okayama, H. (1992). Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature*, 356(6369), 526–529. <https://doi.org/10.1038/356526a0>

158. Knauf, Y., Bostedt, H., Failing, K., Knauf, S., & Wehrend, A. (2014). Gross pathology and endocrinology of ovarian cysts in bitches. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 49(3), 463–468. <https://doi.org/10.1111/rda.12311>

159. Knauf, Y., Failing, K., Knauf, S., & Wehrend, A. (2013). Therapie von Hündinnen mit Ovarialzysten durch humanes Choriongonadotropin und Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analogen. Eine Fallserie von 30 Hündinnen [Treatment of bitches with ovarian cysts using human chorionic gonadotropin-releasing hormone analogue. A case series of 30 bitches]. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 41(2), 93–100

160. Koh, D., Ng, V., & Naing, L. (2014). Alpha amylase as a salivary biomarker of acute stress of venepuncture from periodic medical examinations. *Frontiers in public health*, 2, 121. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00121>

161. Kooistra, H. S., & Okkens, A. C. (2002). Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Molecular and cellular endocrinology*, 197(1-2), 167–172. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00271-x](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00271-x)

162. Kooistra, H. S., Okkens, A. C., Bevers, M. M., Popp-Snijders, C., van Haften, B., Dieleman, S. J., & Schoemaker, J. (1999). Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. *Biology of reproduction*, 60(1), 65–71. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.1.65>

163. Kovács, Z., Glover, L., Reidy, F., MacSharry, J., & Saldova, R. (2021). Novel diagnostic options for endometriosis - Based on the glycome and microbiome. *Journal of advanced research*, 33, 167–181. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.01.015>

165. Kowalewski M. P. (2012). Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: a review. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, 19–24. <https://doi.org/10.1111/rda.12036>

166. Kowalewski M. P. (2014). Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reproductive biology*, 14(2), 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.11.004>

167. Kowalewski M. P. (2023). Advances in understanding canine pregnancy: Endocrine and morpho-functional regulation. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 58 Suppl 2, 163–175. <https://doi.org/10.1111/rda.14443>

168. Kowalewski, M. P. (2018). Selected comparative aspects of canine female reproductive physiology. *Encyclopedia of reproduction*, 682-691

169. Kowalewski, M. P., Beceriklisoy, H. B., Aslan, S., Agaoglu, A. R., & Hoffmann, B. (2009). Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogesterin induced luteolysis in the bitch. *Animal reproduction science*, 116(1-2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.12.011>

170. Kowalewski, M. P., Ihle, S., Siemieniuch, M. J., Gram, A., Boos, A., Zduńczyk, S., Fingerhut, J., Hoffmann, B., Schuler, G., Jurczak, A., Domośławska, A., & Janowski, T. (2015). Formation of the early canine CL and the role of prostaglandin E2 (PGE2) in regulation of its function: an in vivo approach. *Theriogenology*, 83(6), 1038–1047. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.006>

171. Kowalewski, M. P., Michel, E., Gram, A., Boos, A., Guscetti, F., Hoffmann, B., ... & Reichler, I. (2011). Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 1-11

172. Kowalewski, M. P., Mutembei, H. M., & Hoffmann, B. (2008). Canine prostaglandin F2alpha receptor (FP) and prostaglandin F2alpha synthase (PGFS):

molecular cloning and expression in the corpus luteum. *Animal reproduction science*, 107(1-2), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.026>

173. Kowalewski, M. P., Schuler, G., Taubert, A., Engel, E., & Hoffmann, B. (2006). Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. *Theriogenology*, 66(6-7), 1423–1430. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.039>

174. Kowalewski, M.P., Tavares Pereira, M., Kazemian, A. (2020). Canine conceptus-maternal communication during maintenance and termination of pregnancy, including the role of species-specific decidualization. *Theriogenology*, 150. 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.082>

175. Kumar, A. & Saxena, A. (2018). Canine Pyometra: Current Perspectives on Causes and Management – A Review. *The indian journal of veterinary sciences and biotechnology*, 14. <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.v14i1.12998>

176. Kumar, S., Sharma, A., & Kshetrimayum, C. (2019). Environmental & occupational exposure & female reproductive dysfunction. *The Indian journal of medical research*, 150(6), 532–545. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1652_17

177. Kunkitti, P., Srisuwatanasagul, S., & Chatdarong, K. (2011). Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. *Theriogenology*, 75(6), 979–987. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.004>

178. Kutzler M. A. (2007). Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, 68(3), 354–374. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.014>

179. Kutzler M. A. (2020). Gonad-Sparing Surgical Sterilization in Dogs. *Frontiers in veterinary science*, 7, 342. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00342>

180. Kutzler M. A. (2023). Understanding the effects of sustained supraphysiologic concentrations of luteinizing hormone in gonadectomized dogs: What we know and what we still need to learn. *Theriogenology*, 196, 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.007>

181. Kutzler, M. A., Mohammed, H. O., Lamb, S. V., & Meyers-Wallen, V. N. (2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, *60*(6), 1187–1196. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00109-2)

182. Lan, Y., Li, Y., Yang, X., Lei, L., Liang, Y., & Wang, S. (2021). Progesterone-induced blocking factor-mediated Th1/Th2 balance correlates with fetal arrest in women who underwent in vitro fertilization and embryo transfer. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, *232*, 108858. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108858>

183. Laskarin, G., Strbo, N., Sotosek, V., Rukavina, D., Faust, Z., Szekeres-Bartho, J., & Podack, E. R. (1999). Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *42*(5), 312–320. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1999.tb00107.x>

184. Lastra, G., & Sowers, J. R. (2013). Obesity and cardiovascular disease: role of adipose tissue, inflammation, and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, *15*(2), 49–57. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0025>

185. Lebedeva, I. Y., Lebedev, V. A., Grossmann, R., & Parvizi, N. (2010). Age-dependent role of steroids in the regulation of growth of the hen follicular wall. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *8*, 15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-15>

186. Lee, J. H., Ulrich, B., Cho, J., Park, J., & Kim, C. H. (2011). Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *187*(4), 1778–1787. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003919>

187. Lee, S., Kim, J., Jang, B., Hur, S., Jung, U., Kil, K., Na, B., Lee, M., Choi, Y., Fukui, A., Gilman-Sachs, A., & Kwak-Kim, J. Y. (2010). Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *185*(1), 756–762. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904192>;

188. Lee, W. M., Kooistra, H. S., Mol, J. A., Dieleman, S. J., & Schaefer-Okkens, A. C. (2006). Ovariectomy during the luteal phase influences secretion of prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the bitch. *Theriogenology*, 66(2), 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.002>
189. Lewis, W. G., Robinson, L. S., Perry, J., Bick, J. L., Peipert, J. F., Allsworth, J. E., & Lewis, A. L. (2012). Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *The Journal of biological chemistry*, 287(3), 2079–2089. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278135>
190. Liddell, E., Weeks, I. (1995). *Antibody Technology*. BIOS Scientific Publisher. 8, 40–103
191. Lissauer, D., Eldershaw, S. A., Inman, C. F., Coomarasamy, A., Moss, P. A., & Kilby, M. D. (2015). Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *European journal of immunology*, 45(10), 2858–2872. <https://doi.org/10.1002/eji.201445404>
193. Luo, C. Y., Wang, L., Sun, C., & Li, D. J. (2011). Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cellular & molecular immunology*, 8(1), 50–58. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.54>
194. Luther, C., Adamopoulou, E., Stoeckle, C., Brucklacher-Waldert, V., Rosenkranz, D., Stoltze, L., Lauer, S., Poeschel, S., Melms, A., & Tolosa, E. (2009). Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(2), 841–848. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802046>
195. Lutz, M. B., & Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology*, 23(9), 445–449. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02281-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02281-0)

196. Luu, T, Alsubki, L, Wolf,, K, Thees A, Ganieva, U, Dambaeva, S, Beaman, R., & Kwak-Kim, J. (2022) Natural killer cell-mediated immunopathology in recurrent pregnancy losses. *Explor Immunol.*, 2, 693–722. <https://doi.org/10.37349/ei.2022.00077>
197. Luz, M. R., Bertan, C. M., Binelli, M., & Lopes, M. D. (2006). Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F2-alpha (PGFM), progesterone and estradiol in pregnant and nonpregnant diestrus cross-bred bitches. *Theriogenology*, 66(6-7), 1436–1441. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.036>
198. Maia, O. B., & Gouveia, A. M. G. (2002). Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. *Brazilian Journal of Biology*, 62, 25-32.
199. Marino, F., & Cosentino, M. (2013). Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino acids*, 45(1), 55–71. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1186-6>
200. McClelland, E. E., & Smith, J. M. (2011). Gender specific differences in the immune response to infection. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 59(3), 203–213. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0124-3>
201. McLaughlin, M., Bromfield, J. J., Albertini, D. F., & Telfer, E. E. (2010). Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Molecular human reproduction*, 16(9), 644–653. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq021>
202. Mesarcova, L., Kottferova, J., Skurkova, L., Leskova, L., & Kmecova, N. (2017). Analysis of cortisol in dog hair - a potential biomarker of chronic stress: a review. *Veterinární medicína*, 62(7), 363-376. <https://doi.org/10.17221/19/2017-VETMED>
203. Milani, C., Boscato, E. L., Gabai, G., Badon, T., Schrank, M., Sontas, H. B., Romagnoli, S., & Mollo, A. (2022). Analytical and clinical performance of a fluorescence enzyme immunoassay for progesterone and determination of ovulation day in bitches. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of*

the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 34(6), 977–982. <https://doi.org/10.1177/10406387221125466>

204. Miller, A. B., Nelson, R. W., Scott-Moncrieff, J. C., Neal, L., & Bottoms, G. D. (1992). Serial thyroid hormone concentrations in healthy euthyroid dogs, dogs with hypothyroidism, and euthyroid dogs with atopic dermatitis. *The British veterinary journal*, 148(5), 451–458. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90032-V](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90032-V)

205. Miller, W. L. (2017). Steroidogenesis: Unanswered questions. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(11), 771–793. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.09.002>

206. Miyaura, H., & Iwata, M. (2002). Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(3), 1087–1094. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1087>

207. Mold, J. E., & McCune, J. M. (2012). Immunological tolerance during fetal development: from mouse to man. *Advances in immunology*, 115, 73–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394299-9.00003-5>

208. Montague, B., Summers, A., Bhawal, R., Anderson, E. T., Kraus-Malett, S., Zhang, S., & Goggs, R. (2022). Identifying potential biomarkers and therapeutic targets for dogs with sepsis using metabolomics and lipidomics analyses. *PloS one*, 17(7), e0271137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271137>

Influence of Seasonality on Mammals Reproduction. *Research & Reviews: Journal of Zoological Sciences*, 4 (1), 43-50

210. Morris J. C. (2009). How do you approach the problem of TSH elevation in a patient on high-dose thyroid hormone replacement?. *Clinical endocrinology*, 70(5), 671–673. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03536.x>

211. Nagashima, J. B., & Songsasen, N. (2021). Canid Reproductive Biology: Norm and Unique Aspects in Strategies and Mechanisms. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(3), 653. <https://doi.org/10.3390/ani11030653>

212. Nagashima, J. B., Hansen, B. S., Songsasen, N., Travis, A. J., & Place, N. J. (2016). Anti-Müllerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to

Oestrous Transition. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 51(1), 158–164. <https://doi.org/10.1111/rda.12660>

213. Nagashima, J. B., Wildt, D. E., Travis, A. J., & Songsasen, N. (2019). Activin promotes growth and antral cavity expansion in the dog ovarian follicle. *Theriogenology*, 129, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.018>

214. Nagashima, J.B., Songsasen, N. (2021). Canid Reproductive Biology: Norm and Unique Aspects in Strategies and Mechanisms. *Animals*, 11. 653. <https://doi.org/10.3390/ani11030653>

215. Nelson, R.W., Feldman, E.C. (1986). Pyometra. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 16(3). 561-576. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(86\)50061-9](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(86)50061-9)

216. Nieminen, P., Pyykönen, T., Asikainen, J., Mononen, J., & Mustonen, A. M. (2004). Effects of fasting and exogenous melatonin on annual rhythms in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 139(2), 183-197

217. Noakes, D. E., Dhaliwal, G. K., & England, G. C. (2001). Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 57, 395–406

218. Nohr, B., Hoffmann, B., & Steinetz, B. E. (1993). Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 542-543

219. Nöthling, J. O., & De Cramer, K. G. M. (2019). Comparison of progesterone assay by chemiluminescence or radioimmunoassay for clinical decision-making in canine reproduction. *Journal of the South African Veterinary Association*, 90(0), e1–e6. <https://doi.org/10.4102/jsava.v90i0.1730>

220. Nowak, M., Rehrauer, H., Ay, S. S., Findik, M., Boos, A., Kautz, E., & Kowalewski, M. P. (2019). Gene expression profiling of the canine placenta during normal and antigestagen-induced luteolysis. *General and Comparative Endocrinology*, 282, 113194.

221. Okkens, A. C., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., & Willemse, A. H. (1990). Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. *The veterinary quarterly*, 12(4), 193–201. <https://doi.org/10.1080/01652176.1990.9694266>
222. Oktay, K., Newton, H., Mullan, J., & Gosden, R. G. (1998). Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(5), 1133–1138. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.5.1133>
223. Onclin, K., & Verstegen, J. P. (1997). Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*, 51, 203-208
224. Onclin, K., Murphy, B., & Verstegen, J. P. (2002). Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology*, 57(8), 1957–1972. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00644-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00644-1)
225. Ortega-Pacheco, A., Gutiérrez-Blanco, E., & Jiménez-Coello, M. (2012). Common lesions in the female reproductive tract of dogs and cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 42(3), 547–vii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.011>
226. Ottosson, M. (2017). *Anti-Müllerian hormone in canine pyometra*. Swedish University of Agricultural Sciences
227. Palomino, J., & De Los Reyes, M. (2016). Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology*, 86(6), 1541–1549. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.013>
228. Panciera, D. L., Purswell, B. J., & Kolster, K. A. (2007). Effect of short-term hypothyroidism on reproduction in the bitch. *Theriogenology*, 68(3), 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.026>
229. Papa, P. C. , & Hoffmann, B. (2011). The corpus luteum of the dog: Source and target of steroid hormones? *Reproduction in Domestic Animals*, 46(4), 750–756. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01749.x>

230. Papa, P. C., & Kowalewski, M. P. (2020). Factors affecting the fate of the canine corpus luteum: Potential contributors to pregnancy and non-pregnancy. *Theriogenology*, *150*, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.081>
231. Parisi, F., Fenizia, C., Introini, A., Zavatta, A., Scaccabarozzi, C., Biasin, M., & Savasi, V. (2023). The pathophysiological role of estrogens in the initial stages of pregnancy: molecular mechanisms and clinical implications for pregnancy outcome from the periconceptional period to end of the first trimester. *Human reproduction update*, *29*(6), 699–720. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad016>
232. Pennell, L. M., Galligan, C. L., & Fish, E. N. (2012). Sex affects immunity. *Journal of autoimmunity*, *38*(2-3), J282–J291. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.11.013>
233. Pereira, M., Valério-Bolas, A., Saraiva-Marques, C., Alexandre-Pires, G., Pereira da Fonseca, I., & Santos-Gomes, G. (2019). Development of Dog Immune System: From *in Uterus* to Elderly. *Veterinary sciences*, *6*(4), 83. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040083>
234. Phillippe M. (1994). Protein kinase C, an inhibitor of oxytocin-stimulated phasic myometrial contractions. *Biology of reproduction*, *50*(4), 855–859. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.4.855>
235. Pido-Lopez, J., Imami, N., & Aspinall, R. (2001). Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clinical and experimental immunology*, *125*(3), 409–413. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01640.x>
236. Pires, M. A., & Payan-Carreira, R. (2015). Resident Macrophages and Lymphocytes in the Canine Endometrium. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *50*(5), 740–749. <https://doi.org/10.1111/rda.12567>
237. Prapaiwan, N., Manee-In, S., Olanratmanee, E., & Srisuwatanasagul, S. (2017). Expression of oxytocin, progesterone, and estrogen receptors in the reproductive tract of bitches with pyometra. *Theriogenology*, *89*, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.016>

238. Pratschke, K. (2015). *Pyometra. Complications in Small Animal Surgery*. University of Health Sciences in Pomona
239. Pretzer S. D. (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. *Theriogenology*, 70(3), 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.028>
240. Procaccini, C., Pucino, V., Mantzoros, C. S., & Matarese, G. (2015). Leptin in autoimmune diseases. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(1), 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.014>
241. Purton, J. F., Monk, J. A., Liddicoat, D. R., Kyparissoudis, K., Sakkal, S., Richardson, S. J., Godfrey, D. I., & Cole, T. J. (2004). Expression of the glucocorticoid receptor from the 1A promoter correlates with T lymphocyte sensitivity to glucocorticoid-induced cell death. *Journal of Immunology*, 173(6), 3816-3824. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3816>
242. Radović Janošević, D., Trandafilović, M., Krtinić, D., Čolović, H., Milošević Stevanović, J., & Pop-Trajković Dinić, S. (2020). Endometrial immunocompetent cells in proliferative and secretory phase of normal menstrual cycle. *Folia morphologica*, 79(2), 296–302. <https://doi.org/10.5603/FM.a2019.0095>
243. Raghupathy, R., Al-Mutawa, E., Al-Azemi, M., Makhseed, M., Azizieh, F., & Szekeres-Bartho, J. (2009). Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *Journal of reproductive immunology*, 80(1-2), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.01.004>
244. Rautela, R., Katiyar, R. (2019). Review on Canine Pyometra, Oxidative Stress and Current Trends in Diagnostics. *Asian Pac. J. Reprod*, 8. 45.
245. Reichler, I. M., Pfeiffer, E., Piché, C. A., Jöchle, W., Roos, M., Hubler, M., & Arnold, S. (2004). Changes in plasma gonadotropin concentrations and urethral closure pressure in the bitch during the 12 months following ovariectomy. *Theriogenology*, 62(8), 1391–1402. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.011>

246. Rettew, J. A., Huet-Hudson, Y. M., & Marriott, I. (2008). Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of reproduction*, 78(3), 432–437. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063545>
247. Richard, S., & Zingg, H. H. (1990). The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *The Journal of biological chemistry*, 265(11), 6098–6103.
248. Rincón-Cortés, M., Herman, J. P., Lupien, S., Maguire, J., & Shansky, R. M. (2019). Stress: Influence of sex, reproductive status and gender. *Neurobiology of stress*, 10, 100155. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100155>
249. Robertson S. A. (2000). Control of the immunological environment of the uterus. *Reviews of reproduction*, 5(3), 164–174. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050164>
250. Root Kustritz M. V. (2012). Effects of surgical sterilization on canine and feline health and on society. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 4, 214–222. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02078.x>
251. Ros, L., Holst, B. S., & Hagman, R. (2014). A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. *Theriogenology*, 82(9), 1281–1286. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.011>
252. Röszer T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of inflammation*, 2015, 816460. <https://doi.org/10.1155/2015/816460>
253. Ruiz-González, I., Sánchez, M.A., García-Palencia, P., Sánchez, B., García-Fernández, R.A., González-Bulnes, A. & Flores, J.M. (2012). Differences in uterine immunoexpression of PR, ER α and OTR when comparing prostaglandin- to progestagen-based protocols for ovine estrus synchronization. *Animal Reproduction Science*, 133(1–2). 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.015>
254. Russell, D. L., Gilchrist, R. B., Brown, H. M., & Thompson, J. G. (2016). Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players?. *Theriogenology*, 86(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.019>

255. Rybska, M., Billert, M., Skrzypski, M., Kubiak, M., Woźna-Wysocka, M., Łukomska, A., Nowak, T., Błaszczyk-Cichoszewska, J., Pomorska-Mól, M., & Wąsowska, B. (2022). Canine cystic endometrial hyperplasia and pyometra may downregulate neuropeptide phoenixin and GPR173 receptor expression. *Animal reproduction science*, 238, 106931. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106931>

256. Saikia, T. C., Pramanik, T., & Thapa, M. (2003). Phagocytic activities of neutrophilic leukocytes in women in various phases of menstrual cycle, and in pregnancy. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 34(4), 877–880

257. Sakiani, S., Olsen, N. J., & Kovacs, W. J. (2013). Gonadal steroids and humoral immunity. *Nature reviews. Endocrinology*, 9(1), 56–62. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.206>

258. Sanderson, R. D., Bandari, S. K., & Vlodevsky, I. (2019). Proteases and glycosidases on the surface of exosomes: Newly discovered mechanisms for extracellular remodeling. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 75-76, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.007>

259. Sasidharan, J.K., Patra, M.K., Khan, J.A., Singh, A.K., Karikalan, M., De, U.K., Saxena, A.C., Dubal, Z.B., Singh, S.K., Kumar, H. & Krishnaswamy, N. (2023). Differential expression of inflammatory cytokines, prostaglandin synthases and secretory leukocyte protease inhibitor in the endometrium and circulation in different graded CEH-pyometra in bitch. *Theriogenology*, 197, 139-149. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.017>

260. Sato, J., Nasu, M., & Tsuchitani, M. (2016). Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals. *Journal of toxicologic pathology*, 29(3), 155–162. <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0021>

261. Scanzano, A., & Cosentino, M. (2015). Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Frontiers in pharmacology*, 6, 171. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00171>

262. Schäfer-Somi, S., Beceriklisoy, H. B., Budik, S., Kanca, H., Aksoy, O. A., Polat, B., Cetin, Y., Ay, S. S., & Aslan, S. (2008). Expression of genes in the canine

pre-implantation uterus and embryo: implications for an active role of the embryo before and during invasion. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 43(6), 656–663. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00966.x>

263. Schäfer-Somi, S., Deichsel, K., Beceriklisoy, H., Korkmaz, D., Walter, I., & Aslan, S. (2017). Morphological, histological and molecular investigations on canine uterine tissue after ovariectomy. *Theriogenology*, 102, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.016>

264. Schumacher, A., Costa, S. D., & Zenclussen, A. C. (2014). Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Frontiers in immunology*, 5, 196. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00196>

265. Segerstrom, S. C., & Miller, G. E. (2004). Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological bulletin*, 130(4), 601–630. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601>

266. Shah, N. M., Lai, P. F., Imami, N., & Johnson, M. R. (2019). Progesterone-Related Immune Modulation of Pregnancy and Labor. *Frontiers in endocrinology*, 10, 198. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00198>

267. Sheldon, I. M., Rycroft, A. N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., Roberts, M. H., Price, S. B., Gilbert, R. O., & Simpson, K. W. (2010). Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PloS one*, 5(2), e9192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009192>

268. Shiyamala, S., Ramesh, S., & Hemalatha, S.V. (2020). A case study of reproductive pathology in bitches. *Journal of entomology and zoology studies*, 8, 1527-1531

269. Shu, C. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2012). The immune system's involvement in obesity-driven type 2 diabetes. *Seminars in immunology*, 24(6), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.12.001>

270. Silva, A. W., Bezerra, F., Costa, J., Rossi, R.O.D.S., Passos, M.J., Vasconcelos, G.L., Rossetto, R., Donato, M., Padilha, M., Campello, C.C., Saraiva, M.V.A., Figueiredo, J., Peixoto, C., Hurk, R., Silva, J. (2013). Differential effects of

activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. *Livestock Science*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.12.003>

271. Silva, E., Henriques, S., Brito, S., Ferreira-Dias, G., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2012). Oestrous cycle-related changes in production of Toll-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium. *Journal of reproductive immunology*, 96(1-2), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.07.003>

272. Simpson, G., England, G.C., & Harvey, M. (1998). *BSAVA manual of small animal reproduction and neonatology*. British Small Animal Veterinary Association

273. Smith F. O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66(3), 610–612. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.023>

274. Smith, B. P., Cairns, K. M., Adams, J. W., Newsome, T. M., Fillios, M., Déaux, E. C., Parr, W. C. H., Letnic, M., VAN Eeden, L. M., Appleby, R. G., Bradshaw, C. J. A., Savolainen, P., Ritchie, E. G., Nimmo, D. G., Archer-Lean, C., Greenville, A. C., Dickman, C. R., Watson, L., Moseby, K. E., Doherty, T. S., ... Crowther, M. S. (2019). Taxonomic status of the Australian dingo: the case for *Canis dingo* Meyer, 1793. *Zootaxa*, 4564(1), zootaxa.4564.1.6. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4564.1.6>

275. Sokolowski, J. H., & Zimbelman, R. G. (1974). Canine reproduction: effects of multiple treatments of medroxyprogesterone acetate on reproductive organs of the bitch. *American journal of veterinary research*, 35(10), 1285–1287

276. Solano, M. E., Kowal, M. K., O'Rourke, G. E., Horst, A. K., Modest, K., Plösch, T., Barikbin, R., Remus, C. C., Berger, R. G., Jago, C., Ho, H., Sass, G., Parker, V. J., Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Hecher, K., Karimi, K., & Arck, P. C. (2015). Progesterone and HMOX-1 promote fetal growth by CD8+ T cell modulation. *The Journal of clinical investigation*, 125(4), 1726–1738. <https://doi.org/10.1172/JCI68140>

277. Solano-Gallego, L., & Masserdotti, C. (2016). Reproductive System. *Canine and Feline Cytology*, 313–352. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4083-3.00012-7>

278. Srisuwatanasagul, K., Sukjumlong, S., Sirivaidyapong, S., & Pianchop, S. (2005). An immunohistochemical study of the progesterone receptor (PR) expression in pyometra cases and normal uteri at the time of dioestrus in the bitch. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 35(2), DOI: <https://doi.org/10.56808/2985-1130.2005>

279. Steckler, D., Nöthling, J. O., & Harper, C. (2013). Prediction of the optimal time for insemination using frozen-thawed semen in a multi-sire insemination trial in bitches. *Animal reproduction science*, 142(3-4), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.013>

280. Steinetz, B. G., Goldsmith, L. T., Harvey, H. J., & Lust, G. (1989). Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *American journal of veterinary research*, 50(1), 68–71

282. Stjernholm, Y., Sahlin, L., Åkerberg, A., Elinder, A., Eriksson, H., Malmström, A. & Ekman, G. (1996). Cervical ripening in humans: Potential roles of oestrogen, progesterone, and insulin-like growth factor-I. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(3). 1065-1071. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(96\)70352-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(96)70352-6)

H
v
P
L
283. Su, L., Sun, Y., Ma, F., Lü, P., Huang, H., & Zhou, J. (2009). Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunology letters*, 125(2), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.07.003>

L
N
K
284. Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R., Hatoya, S., Wijewardana, V., Kumagai, D., Tamada, H., Sawada, T., Ikehara, S., & Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209(8), 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.09.003>

h
t
t
p

285. Sugiura, K., Wijewardana, V., Fujimoto, M., Akazawa, T., Yahata, M., Mito, K., Hatoya, S., Inoue, N., & Inaba, T. (2010). Effect of IL-12 on canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Veterinary immunology and immunopathology*, *137*(3-4), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.06.006>
286. Szczubiał, M., Wawrzykowski, J., Dąbrowski, R., Bochniarz, M., Brodzki, P., & Kankofer, M. (2019). The effect of pyometra on glycosylation of proteins in the uterine tissues from female dogs. *Theriogenology*, *131*, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.020>
287. Szekeres-Bartho J. (2018). The Role of Progesterone in Feto-Maternal Immunological Cross Talk. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, *27*(4), 301–307. <https://doi.org/10.1159/000491576>
288. Tanriverdi, F., Silveira, L. F., MacColl, G. S., & Bouloux, P. M. (2003). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *The Journal of endocrinology*, *176*(3), 293–304. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1760293>
289. Tavares Pereira, M., Graubner, F. R., Rehrauer, H., Janowski, T., Hoffmann, B., Boos, A., & Kowalewski, M. P. (2019). Global Transcriptomic Analysis of the Canine *corpus luteum* (CL) During the First Half of Diestrus and Changes Induced by *in vivo* Inhibition of Prostaglandin Synthase 2 (PTGS2/COX2). *Frontiers in endocrinology*, *10*, 715. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00715>
290. Tavares Pereira, M., Nowaczyk, R., Payan-Carreira, R., Miranda, S., Aslan, S., Kaya, D., & Kowalewski, M. P. (2021). Selected Uterine Immune Events Associated With the Establishment of Pregnancy in the Dog. *Frontiers in veterinary science*, *7*, 625921. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.625921>
291. Tavares Pereira, M., Papa, P., Reichler, I. M., Aslan, S., & Kowalewski, M. P. (2022). Luteal expression of factors involved in the metabolism and sensitivity to oestrogens in the dog during pregnancy and in non-pregnant cycle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *57*(1), 86–97. <https://doi.org/10.1111/rda.14032>

292. Themmen, A. P. N., Kalra, B., Visser, J. A., Kumar, A., Savjani, G., de Gier, J., & Jaques, S. (2016). The use of anti-Müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs. *Theriogenology*, 86(6), 1467–1474. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.004>
293. Thuróczy, J., Müller, L., Kollár, E., & Balogh, L. (2016). Thyroxin and progesterone concentrations in pregnant, nonpregnant bitches, and bitches during abortion. *Theriogenology*, 85(6), 1186–1191. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.035>
294. Thuróczy, J., Szilágyi, J., Müller, L., & Balogh, L. (2017). Development of the independent function of fetal thyroid glands in the dog in connection with iodothyronine concentrations in pregnant bitches, fetal fluids, and fetal serum. *Domestic animal endocrinology*, 58, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.07.004>
295. Turner, M. L., Healey, G. D., & Sheldon, I. M. (2012). Immunity and inflammation in the uterus. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 4, 402–409. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02104.x>
296. Ucar, E. H., Cetin, H., & Atli, M. O. (2018). Effect of multiple low-dose PGF₂ α injections on the mature corpus luteum in non-pregnant bitches. *Theriogenology*, 113, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.018>
297. Valor, L., Teijeiro, R., Aristimuño, C., Faure, F., Alonso, B., de Andrés, C., Tejera, M., López-Lazareno, N., Fernández-Cruz, E., & Sánchez-Ramón, S. (2011). Estradiol-dependent perforin expression by human regulatory T-cells. *European journal of clinical investigation*, 41(4), 357–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02414.x>
298. Van Cruchten, S., Van den Broeck, W., D'haeseleer, M., & Simoens, P. (2004). Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*, 62(3-4), 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.015>
299. Van den Berghe, F., Paris, D. B., Van Soom, A., Rijsselaere, T., Van der Weyde, L., Bertschinger, H. J., & Paris, M. C. (2012). Reproduction in the endangered

African wild dog: basic physiology, reproductive suppression and possible benefits of artificial insemination. *Animal reproduction science*, 133(1-2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.003>

300. Van der Laan, J. E., Vinke, C. M., & Arndt, S. S. (2022). Evaluation of hair cortisol as an indicator of long-term stress responses in dogs in an animal shelter and after subsequent adoption. *Scientific reports*, 12(1), 5117. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09140-w>

301. Van Soom, A., Rijsselaere, T., & Filliers, M. (2014). Cats and dogs: two neglected species in this era of embryo production in vitro?. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 49 Suppl 2, 87–91. <https://doi.org/10.1111/rda.12303>

302. Vauquelin, G., & Packeu, A. (2009). Ligands, their receptors and ... plasma membranes. *Molecular and cellular endocrinology*, 311(1-2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.022>

303. Vermeirsch, H., Van den Broeck, W., Coryn, M., & Simoens, P. (2002). Immunohistochemical detection of androgen receptors in the canine uterus throughout the estrus cycle. *Theriogenology*, 57(9), 2203–2216. [https://doi.org/10.1016/s0093-6999\(02\)0093-6](https://doi.org/10.1016/s0093-6999(02)0093-6)

304. Veronesi, M. C., Battocchio, M., Marinelli, L., FAUSTINI, M., Kindahl, H., & Cairoli, F. (2002). Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin F_{2α} of the periparturient bitch. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 49(5), 264-268.

305. Ververidis, H. N., Boscós, C. M., Stefanakis, A., Saratsis, P., Stamou, A. I., & Krambovitis, E. (2004). Serum estradiol-17 beta, progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology*, 62(3-4), 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.011>

306. Voorwald, F. A., Marchi, F. A., Villacis, R. A., Alves, C. E., Toniollo, G. H., Amorim, R. L., Drigo, S. A., & Rogatto, S. R. (2015). Molecular Expression Profile Reveals Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Canine Endometrial Lesions. *PloS one*, 10(7), e0133894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133894>

307. Walton, J. C., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2011). Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function. *Frontiers in neuroendocrinology*, *32*(3), 303-319

308. Waner, T., Bomzon, A., Dank, G., Elad, D., Freidman, S., Galon, N., Harrus, S., Klement, E., Leitner, G., Keren, E.S., Orgad, U., Rosner, A., Segev, G., Shahar, R., Simon, S.G., Spiegel, N.B., Steinman, A., Trainin, Z., & Veterinary, I. (2013). Neutrophil Counts and Morphology in Cats: A Retrospective Case-Control Study of 517 Cases. **p**

309. Wang, C., Dehghani, B., Li, Y., Kaler, L. J., Vandembark, A. A., & Offner, H. (2009). Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. *Immunology*, *126*(3), 329–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03051.x>

310. Wen, L., Li, R., Wang, J., & Yi, J. (2019). The reproductive stress hypothesis. *Reproduction (Cambridge, England)*, *158*(6), R209–R218. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0592>

311. White, H. D., Crassi, K. M., Givan, A. L., Stern, J. E., Gonzalez, J. L., Memoli, V. A., Green, W. R., & Wira, C. R. (1997). CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *158*(6), 3017–3027

312. Wijewardana, V., Sugiura, K., Oichi, T., Fujimoto, M., Akazawa, T., Hatoya, S., Inaba, M., Ikehara, S., Jayaweera, T. S., & Inaba, T. (2006). Generation of canine dendritic cells from peripheral blood monocytes without using purified cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, *114*(1-2), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.07.002>

313. Wijewardana, V., Sugiura, K., Wijesekera, D. P., Hatoya, S., Nishimura, T., Kanegi, R., Ushigusa, T., & Inaba, T. (2015). Effect of ovarian hormones on maturation of dendritic cells from peripheral blood monocytes in dogs. *The Journal of veterinary medical science*, *77*(7), 771–775. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0558>

314. Wijewardana, V., Sugiura, K., Yahata, M., Akazawa, T., Wijesekera, D. P., Imamoto, S., Hatoya, S., Inoue, N., & Inaba, T. (2013). Production of canine soluble

CD40 ligand to induce maturation of monocyte derived dendritic cells for cancer immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology*, 156(1-2), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.016>

315. Witzel, A. (2016). Current Concepts in Preventing and Managing Obesity. *August's Consultations in Feline Internal Medicine*, 7, 612–621. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-22652-3.00064-5>

316. Wilborn, R. R., & Maxwell, H. S. (2012). Clinical approaches to infertility in the bitch. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 42(3), 457–v. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.016>

317. Wildt, D. E., Chakraborty, P. K., Panko, W. B., & Seager, S. W. (1978). Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biology of reproduction*, 18(4), 561–570. <https://doi.org/10.1095/biolreprod18.4.561>

318. Wildt, D. E., Panko, W. B., Chakraborty, P. K., & Seager, S. W. (1979). Relationship of serum estrone, estradiol-17beta and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biology of reproduction*, 20(3), 648–658. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.3.648>

319. Wira, C.R., Rodriguez-Garcia, M., Patel, M.V., Biswas, N., & Fahey, J.V. (2015). Endocrine regulation of the mucosal immune system in the female reproductive tract. *In Mucosal Immunology*, 2. 2141–2156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00110-5>.

320. Xavier, R. G. C., Santana, C. H., da Silva, P. H. S., Paraguassú, A. O., Nicolino, R. R., Freitas, P. M. C., Santos, R. L., & Silva, R. O. S. (2024). Association between bacterial pathogenicity, endometrial histological changes and clinical prognosis in canine pyometra. *Theriogenology*, 214, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.007>

321. Xavier, R.G.C., Santana, C.H., de Castro, Y.G., de Souza, T.G.V., do Amarante, V.S., Santos, R.L., Silva, R.O.S. (2023). Canine Pyometra: A Short Review of Current Advances. *Animals*, 13. 3310. <https://doi.org/10.3390/ani13213310>

322. Zhao, M., Lee, S., Kim, D. H., No, J., Nam, Y., Ock, S. A., Ko, Y. G., & Hur, T. Y. (2018). Dog cloning with in vivo matured oocytes obtaining using serum estradiol levels for predicting time of ovulation. *Theriogenology*, *107*, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.030>

323. Zhelavskiy, M. (2019). Study of innate factors in the local immune defense of the genital organs of dogs and cats. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, *21*(93), 98-102. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9317>

324. Zheng, H. H., Du, C. T., Zhang, Y. Z., Yu, C., Huang, R. L., Tang, X. Y., & Xie, G. H. (2023). A study on the correlation between intrauterine microbiota and uterine pyogenesis in dogs. *Theriogenology*, *196*, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.003>

ДОДАТКИ

УЗГОДЖЕНО
Проректор з наукової роботи
Державного біотехнологічного університету

«1» березня 2024 р.

Валерій МИХАЙЛОВ



ЗАТВЕРДЖЕНО
Проректор з науково-педагогічної роботи
Державного біотехнологічного університету

Максим СЕРІК

«11» березня 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і технологічних робіт в освітній процес закладів вищої освіти

Замовник Одеський державний аграрний університет

Дійсним актом підтверджується, що результати науково-дослідної роботи: Кириченко Віроніки Вікторівни на тему: ІМУННИЙ СТАТУС ЗА РІЗНОГО РІВНЯ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ У ОРГАНІЗМІ СОБАК

виконаної на кафедрі фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету

впроваджено в освітній процес кафедри: фізіології та біохімії тварин Державного біотехнологічного університету

1. Вид впроваджених результатів: обґрунтовано теоретико-методологічні та методичні узагальнення з проблеми нових наукових даних щодо впливу віку, розміру, умов утримання та сезону року на поширення дисфункцій репродуктивних органів у сук, дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів, абсолютної кількості лейкоцитів, нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів протягом статевого циклу показали, що здатність нейтрофілів до фагоцитозу змінювалась протягом естрального циклу. Доведено дані, що до клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від віку та сезону року, фагоцитарна активність нейтрофілів протягом циклу у молодих собак мала тенденцію до зниження. Дані дослідження є результатами дисертаційної роботи Кириченко В.В., що впроваджено у навчальний процес Державного біотехнологічного університету.

2. Форма впровадження: наповнення лекційного матеріалу та практичних занять з тем: фізіологія кліток крові та фізіологія репродуктивної системи у тварин.

3. Новизна результатів науково-дослідних робіт: модифікація та модернізація існуючих розробок.

4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких впроваджено результати дисертаційного дослідження: по кафедрі фізіології та біохімії тварин (спеціальність 211 Ветеринарна медицина): фізіологія тварин.

5. Соціальний і науково-економічний ефект: підвищення якості освіти та ознайомлення майбутніх фахівців з рекомендаціями щодо дослідження клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу залежно від віку та сезону року, фагоцитарної активності нейтрофілів протягом циклу у молодих собак, клітинної ланки імунітету у сук за різного стану репродуктивної системи.

Завідувач кафедри фізіології та біохімії
тварин, к.б.н., доцент

«29» лютого 2024 р.
Ольга ДЕНИСОВА

Погоджено
Проректор з науково-педагогічної
роботи та розвитку

Затверджую
Проректор з науково-педагогічної
роботи, міжнародної діяльності та
розвитку


(підпис)

Сергій КВАША
(Прізвище, ініціали)

« »

р.



Вадим ТКАЧУК
(Прізвище, ініціали)

р.

АКТ
про впровадження/використання результатів
докторської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему:
«Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак».

(назва теми)

що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – «Ветеринарна медицина», виконаної Кириченко Веронікою Вікторівною

(ПІБ здобувача)

впроваджено у навчальну програму при викладанні дисциплін(и):
фізіологія тварин

(назва дисципліни)

розділи «Фізіологія ендокринної системи», «Фізіологія крові» та «Фізіологія обміну речовин» доповнені новими науковими даними щодо особливостей фізіолого-біохімічних процесів та ендокринного профілю організму собак з врахуванням сезону року і віку тварин.

(необхідно конкретизувати, які результати дисертаційної роботи і яким чином (способом) використані при викладанні дисциплін(и))

на кафедрі біохімії і фізіології тварин ім. акад. М.Ф. Гулого

назва кафедри

у підготовці фахівців ОР «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина із спеціальності ветеринарна медицина

назва спеціальності

у Національному університеті біоресурсів і природокористування України

назва ВНЗ

Декан факультету
д-р. біол. наук, академік НААН України

 Микола ЦВІЛХОВСЬКИЙ

Завідувач кафедри
д-р. вет. наук, професор

 Віктор ТОМЧУК

ЗАТВЕРДЖЕНО:Проректор з науково-педагогічної,
наукової роботи,
Дніпропетровського державного аграрного
університету


Олег ГОРБ

2024 р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

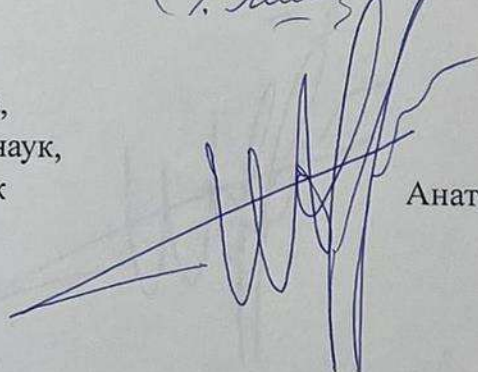
Представлені в інформаційному листі матеріали дисертаційної роботи Кириченко Вероніки Вікторівни на тему: «Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак», що подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина», використовуються у навчальному процесі при викладанні навчальних дисциплін «Етологія тварин», «Зоопсихологія» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», а також у науковій роботі кафедри біології продуктивності тварин імені академіка О. В. Квасницького.

Завідувач кафедри
біології продуктивності тварин
імені академіка О. В. Квасницького
доктор сільськогосподарських
наук, старший науковий співробітник



Світлана УСЕНКО

Декан факультету технологій
тваринництва та продовольства,
доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник



Анатолій ШОСТЯ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Львівського національного
університету ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького
кандидат сільськогосподарських наук,
доцент



Олег Федець
Олег ФЕДЕЦЬ

_____ 2024 р.

ПОГОДЖЕНО

Проректор з науково-педагогічної
роботи Львівського національного
університету ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького
кандидат ветеринарних наук, доцент

Ігор Двильюк

Ігор ДВИЛЮК

« _____ » 2024 р.

АКТ

про впровадження результатів дисертації у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак», що представлена на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 21 «Ветеринарія» та спеціальності 211 «Ветеринарна медицина», виконаної аспіранткою кафедри фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету Кириченко Веронікою Вікторівною, розглянуто на засіданні кафедри нормальної та патологічної фізіології імені С. В. Стояновського (протокол № 8 від 22 лютого 2024 року) Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького.

Результати дослідження впроваджено у навчальну програму кафедри для викладання дисциплін: «Фізіологія тварин», «Ветеринарна патофізіологія», під час підготовки фахівців з ступеня вищої освіти «Магістр» та третього освітньо-наукового рівня PhD доктора філософії із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького.

Декан факультету
ветеринарної медицини,
к. вет. наук, доцент

Юрій Стронський

Юрій СТРОНСЬКИЙ

В.о. завідувачки кафедри нормальної
та патологічної фізіології
ім. С. В. Стояновського, д. вет. наук

Ірина Ковальчук

Ірина КОВАЛЬЧУК

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. директора Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
доктор вет. наук, професор

« _____ » 2024 р.

Анатолій ПАЛІЙ



А К Т
про використання результатів
дисертаційної роботи у навчальному процесі/науковій діяльності

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Кириченко Вероніки Вікторівни** на тему «Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак» (галузь 21 Ветеринарія), а саме спосіб прогнозування розвитку дисфункцій репродуктивних органів у сук залежно від ступеня стресованості організму, який включає визначення відсотку інверсії Т-«активних» лімфоцитів під час навантаження (in vitro) нейромедіатором адреналіном, впроваджено у освітню програму при викладанні освітніх компонентів для здобувачів ступеню доктора філософії третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти ОНП Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

Вчений секретар ННЦ «ІЕКВМ»,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник



Лариса КОВАЛЕНКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи Сумського
національного аграрного
університету



Ігор КОВАЛЕНКО

03

2024 р.

А К Т

про впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Кириченко Вероніки Вікторівни** на тему «Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак» (галузь 21 Ветеринарія) впроваджено в освітній процес при викладанні освітніх компонентів «Акушерство та гінекологія» та «Акушерство, гінекологія, біотехнологія» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти факультету ветеринарної медицини на кафедрі акушерства та хірургії.

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри акушерства та хірургії (протокол № 9 від « 25 » березня 2024 р.).

Завідувач кафедри акушерства та хірургії,
доктор ветеринарних наук, професор

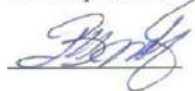
Оксана ШКРОМАДА

Декан
факультету ветеринарної медицини,
доктор ветеринарних наук, професор

Олександр НЕЧИПОРЕНКО

«ПОГОДЖЕНО»

Проректор з наукової роботи та міжнародних зв'язків

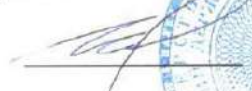


Тетяна НЕБОГА

«__» березня 2024 р.

«ЗАТВЕРДЖЕНО»

Проректор з науково-педагогічної та методичної роботи



Інна МАЛЕЦЬКА

«__» березня 2024 р.

**АКТ****про впровадження/використання результатів докторської дисертаційної роботи у навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Імунний статус за різного рівня статевих гормонів у організмі собак». Що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – «Ветеринарна медицина», виконаної Кириченко Веронікою Вікторівною впроваджено у навчальну програму при викладанні освітнього компоненту «Фізіологія тварин» (для здобувачів другого освітнього рівня «Магістр», за напрямом ветеринарна медицина, 211 спеціальності «Ветеринарна медицина») розділи «Фізіологія ендокринної системи», «Фізіологія крові» та «Фізіологія обміну речовин», а також освітнього компоненту «Ветеринарна імунологія» (для здобувачів другого освітнього рівня «Магістр», за напрямом ветеринарна медицина, 211 спеціальності «Ветеринарна медицина») розділ «Вроджений та адаптивний клітинний імунітет», що викладаються на кафедрі фізіології, патофізіології та біохімії. Ці розділи доповнені новими науковими даними щодо особливостей фізіолого-біохімічних процесів та ендокринного профілю організму собак з врахуванням сезону року і віку тварин. Питання щодо впровадження результатів у навчальний процес було розглянуто та прийнято на засіданні кафедри фізіології, патофізіології та біохімії, протокол № 7, від 04.03.2024.

Декан факультету
к. вет. н., доцент



Катерина РОДІОНОВА

Завідувач кафедри
фізіології, патофізіології та біохімії
к. б. н., доцент



Юрій БОЙКО

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА:**Основні наукові результати дисертації:**

- *Статті у наукових фахових виданнях України:*

1. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка статевих стероїдних гормонів, кортизолу та трийодтиронину у собак за естрального циклу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 104, 18-25. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.104.03> (особистий внесок - аспірантка самостійно провела аналіз літературних джерел з напрямку досліджень, представлених в науковій статті, відібрала проби крові та самостійно визначила вміст гормонів в сироватці крові)

2. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022) Динаміка відносних показників імунограми у сук за еструсу. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 105, 5-12. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2022.105.01> (особистий внесок – здобувачка провела пробовідбір зразків крові та визначила відносний вміст лімфоцитів та їх імунорегуляторних субпопуляцій, а також провела аналіз наукової літератури з зазначеного напрямку)

3. Брошков, М.М., & Кириченко, В.В. (2023). Стан клітинної ланки імунітету та вміст стероїдних гормонів у сук за різного стану репродуктивної системи. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*, 25(112), 175-180. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11228>. (особистий внесок – аспірантка провела порівняльний аналіз отриманих даних з іншими літературними джерелами, відпрацювала методику визначення вмісту гормонів в сироватці крові та сформувала мету досліджень)

4. Кириченко, В.В. (2023). Поширення дисфункцій репродуктивної системи у сук залежно від віку, розміру, умов утримання та сезону року. *Аграрний вісник Причорномор'я. Сер. Ветеринарні науки*, 109, 110-116. <https://doi.org/10.37000/abbsl.2023.109.17> (особистий внесок – аспірантка самостійно проаналізувала амбулаторні журнали ветеринарних клінік та систематизувала отримані дані залежно від віку, умов утримання, розміру та періоду року, а також побудувала графіки та сформувала висновки)

- *Статті у наукових виданнях інших держав:*

5. Broshkov, M.M., & Kyrychenko, V.V. (2023). Dynamics of progesterone, estradiol, cortisol, triiodothyronine and indicators of adaptive immunity concentrations

in female dogs during estrus. *Journal of Biometry Studies*, Vol. 3(1), 2-11. <https://doi.org/10.29329/JofBS.2023.501.03> (особистий внесок – провела аналіз наукових джерел з даного напрямку за останні п'ять років та порівняння їх з отриманими даними в результаті власних досліджень, сформовано самостійно мету досліджень та висновки)

- *Монографії*:

6. Broshkov, M., Fedkalova, T., Kyrychenko, V. & Kot V. (2022). *Methods for regulation of immune reactivity in dogs*. OSAU (особистий внесок – приймала участь у дослідженнях пов'язаних з визначенням вмісту статевих стероїдів в організмі сук та показників клітинної ланки імунітету, проаналізувала літературні джерела з вказаного напрямку)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

- *Тези наукових доповідей на конференціях та конгресах*:

7. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 12-13 жовтня). Динаміка статевих стероїдних гормонів та кортизолу у собак за естрального циклу. *Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присв. 35-річчю заснування факультету вет. медицини (с.68-70)*. Поліський національний університет. <https://polissiauniver.edu.ua/wp-content/uploads/2022/11/Збірник-праць-до-35-річчя-факультету-ветеринарної-медицини.pdf> (особистий внесок – самостійно провела лабораторні дослідження сироватки крові на вміст гормонів, написала тези та відповідно сформулировала висновки)

8. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 8-12 грудня). Динаміка показників імунограм у сук за еструсу. *Актуальні аспекти розвитку науки і освіти: зб. тез доп. II міжнар. наук.-практ. конф. НПП та молодих науковців. (с.73-76)*. Одеський державний аграрний університет. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2023/01/Zbirnuk_II_Mignarodnoi_nauk-prakt_konferencii_8-9.12.pdf (особистий внесок – самостійно провела відбір проб та лабораторні дослідження плазми крові, проаналізувала динаміку показників клітинної ланки імунітету у сук протягом статевого циклу)

9. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2023, 31 січня). Концентрація прогестерону, естрадіолу, кортизолу, трийодтироніну та показників клітинної ланки адаптивного імунітету у сук за піометри. *Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Євразії: зб.наук.праць. III міжнар. наук.-*

практ.інтернет-конф. (с. 14-16). Університет Григорія Сковороди в Переяславі. <http://conferences.neasmo.org.ua/uk/art/7189> (особистий внесок – провела діагностування дисфункції у сук, відібрала проби крові та приймала участь у оперативному втручанні під час оваріогістероектомії, також були сформовані самостійно мета та результати досліджень)

10. Кириченко, В.В., & Брошков, М.М. (2022, 9-11 листопада). Динаміка показників клітинної ланки імунітету та прогестерону у сук за естрального циклу. *Молодіжна наука заради миру та розвитку*: зб. Мат. I Міжнар. Наук.-пр. конф. (с. 44-47). Чернівецький національний університет. ім. Ю. Федьковича. https://drive.google.com/drive/folders/1pkUUKn_HQeBSnkueerSCvn6MdEDFw3Bo (особистий внесок – самостійно провела лабораторні дослідження сироватки та плазми крові, проаналізувала динаміку серологічних та імунологічних показників протягом статевого циклу).

11. Кириченко, В.В., Брошков, М.М., & Найда, В.В. (2023, 14-15 вересня). Динаміка імунофізіологічних показників у сук протягом естрального циклу залежно від віку. *Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах Євроінтеграції*: зб. Мат. Міжнар. Наук.-пр. конф. наук.-пед.працівників та молод.науковців. (с. 86-88). Одеський державний аграрний університет. https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/01/Progr_Mizhnarodnoyi-konf-FVM_85-2023.pdf (особистий внесок – самостійно провела відбір проб крові у сук протягом статевого циклу, визначила показники клітинної ланки імунітету з врахуванням віку. Провела аналіз літературних джерел з вказаного напрямку та сформулювала висновки).

12. Кириченко, В.В., Брошков, М.М., & Найда, В.В. (2023, 9-10 листопада). Динаміка імунофізіологічних показників у сук протягом естрального циклу залежно від сезону року. *Актуальні аспекти розвитку освіти і науки*: зб. Мат. III Міжнар. Наук.-пр. конф. наук.-пед.працівників та молод.науковців. (с. 60-61). Одеський державний аграрний університет. https://drive.google.com/file/d/1ViB68uhzkYjDm2B2IYiOsyqs_gAhmOwg/view (особистий внесок – самостійно провела відбір проб крові у сук протягом статевого циклу, визначила показники клітинної ланки імунітету з врахуванням сезону року та систематизувала отримані дані в таблиці. Провела аналіз літературних джерел з вказаного напрямку та сформулювала висновки).