

Aus der ehemaligen Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. R. Stolla

**Untersuchungen über den uterinen Blutfluss und die endometriale
Echostruktur während der Frühgravidität des Rindes unter
Berücksichtigung der Stickstoffmonoxid-Synthase-mRNA-Expression**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Jasmin Bertmann
aus
Tacherting

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Für Christian

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	2
2.1.	Physiologie der Frühgravidität des Rindes	2
2.1.1.	Frühgravidität bis zur Implantation	2
2.1.2.	Ernährung des Konzeptus während der frühen Trächtigkeit	3
2.1.3.	Implantation – Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel	5
2.1.3.1.	Mikroskopisch-anatomische Veränderungen am Trophoblasten	5
2.1.3.2.	Mikroskopisch-anatomische Veränderungen am Endometrium	6
2.1.4.	Steroidhormonkonzentration im Blutplasma	8
2.1.5.	Endokrine Aktivität von Blastocyste und Endometrium	9
2.1.6.	Maternale Erkennung der Trächtigkeit	12
2.1.6.1.	Interferon π – Trächtigkeitssignal der Wiederkäuer	12
2.1.6.2.	Verhinderung der Luteolyse	14
2.1.6.3.	Verhinderung der Abstoßungsreaktion durch das Muttertier	16
2.2.	Sonographisches Erscheinen des bovinen Konzeptus in den ersten drei Graviditätswochen	18

2.3.	Messung des uterinen Blutflusses mit Hilfe der Dopplersonographie	21
2.3.1.	Dopplersonographische Grundlagen	22
2.3.2.	Gerätetechnologie	23
2.3.3.	Auswertungsmethoden	23
2.3.4.	Uteriner Blutfluss während der Frühgravidität bei verschiedenen Tierarten	24
2.4.	Computergestützte Echostrukturanalyse	26
2.4.1.	Prinzip der computergestützten Echostrukturanalyse	26
2.4.2.	Echostrukturparameter	27
2.4.2.1.	Eindimensionales Histogramm der ersten Ordnung	27
2.4.2.2.	Gradientenstatistiken der ersten Ordnung	28
2.4.2.3.	Co-occurrence-Matrizen der zweiten Ordnung	30
2.4.3.	Einsatz der Echostrukturanalyse in der Gynäkologie	33
2.5.	Bedeutung von Stickstoffmonoxid in der Gravidität	38
2.5.1.	Stickstoffmonoxid-Synthese	38
2.5.2.	Wirkungsmechanismus von Stickstoffmonoxid	39
2.5.3.	NO als Mediator der Sexualsteroiden während des Zyklus und sein Zusammenhang mit der uterinen Perfusion	41
2.5.4.	Vorkommen und Bedeutung von Stickstoffmonoxid im graviden Uterus	45

3.	MATERIAL UND METHODEN	52
3.1.	Tiere	52
3.2.	Versuchsordnung	52
3.3.	Sonographische Untersuchungen	53
3.3.1.	Verwendete Geräte und Sonden	53
3.3.2.	B-Bild-Sonographie und Auswertung der sonographischen B-Bilder mittels computergestützter Echostrukturanalyse	54
3.3.3.	Dopplersonographische Untersuchungen	56
3.3.4.	Auswertung der Dopplerwellen	56
3.4.	Blutprobenentnahme und -untersuchung	56
3.4.1.	Blutprobenentnahme und Plasmagewinnung	56
3.4.2.	Gesamtöstrogenbestimmung im Blutplasma	57
3.4.3.	Progesteronbestimmung im Blutplasma	57
3.5.	Biopsieprobenentnahme und -analyse	57
3.5.1.	Biopsieprobenentnahme	57
2.5.5.	Expressionsanalytik	57
3.6.	Uterustupfer	59
3.7.	Statistische Auswertung	60

4.	ERGEBNISSE	61
4.1.	Klinisch-gynäkologische Befunde	61
4.2.	Uteriner Blutfluss und Steroidhormonkonzentrationen während der Frühgravidität	62
4.2.1.	Änderungen im uterinen Blutfluss während der Frühgravidität	62
4.2.2.	Korrelation zwischen den Blutflussparametern während der Frühgravidität	67
4.2.3.	Steroidhormonkonzentrationen während der Frühgravidität und Zusammenhang mit der uterinen Perfusion	68
4.3.	Endometriale Echostruktur während der Frühgravidität	69
4.3.1.	Ergebnisse der Echostrukturanalyse	71
4.3.2.	Korrelationen zwischen den Echostrukturparametern	79
4.3.3.	Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Echostrukturanalyse und der Konzentration der Steroidhormone	81
4.3.4.	Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Echostrukturanalyse und der uterinen Perfusion	82
4.4.	Stickstoffmonoxid-Synthase-mRNA-Expression während des Zyklus und der frühen Trächtigkeit	82
4.4.1.	RNA-Expression der Haushaltsgene	82
4.4.2.	mRNA-Expression der Zielgene iNOS und eNOS	83

5.	DISKUSSION	85
5.1.	Uteriner Blutfluss während der Frühgravidität und Zusammenhang mit der peripheren Steroidhormonkonzentration	86
5.2.	Endometriale Echostruktur während der Frühgravidität	89
5.3.	Zusammenhang zwischen endometrialer Echostruktur, uteriner Perfusion und der Konzentration der Steroidhormone	95
5.4.	Endometriale NO-Synthase-Expression während der Frühgravidität	96
5.5.	Schlussfolgerungen	96
6.	ZUSAMMENFASSUNG	98
7.	SUMMARY	100
8.	LITERATURVERZEICHNIS	102
9.	ANHANG	141

1. EINLEITUNG

In der Gynäkologie der Tiermedizin konnten bisher beim Rind mittels der transrektalen Farbdopplersonographie der A. uterina spezifische Blutflussmuster sowohl im Verlauf des Zyklus (BAUMGARTNER, 1998; SCHMAUDER, 2003), nach artfizieller Auslösung inflammatorischer Prozesse am Endometrium (SCHMAUDER, 2003) als auch während der frühen Trächtigkeit (BAUMGARTNER, 1998) nachgewiesen werden.

Einige Autoren führen diese Durchblutungsschwankungen auf den direkten Einfluss von wechselnden Sexualsteroidhormonkonzentrationen zurück (FORD et al., 1979; GOSWAMY und STEPTOE, 1988). Andererseits wurde in den letzten Jahren auch eine Beteiligung des Vasodilatators Stickstoffmonoxid an der Regulation der uterinen Durchblutung aufgezeigt (VAN BUREN et al., 1992; ROSENFELD et al., 1996). So konnte beim zyklischen Rind bereits ein positiver Einfluss der induzierbaren NO-Synthase auf das Durchblutungsmuster des Uterus nachgewiesen werden (SCHMAUDER, 2003).

Eine neue Methode zur Gewebedifferenzierung, die computergestützte Echostrukturanalyse, spielt in der Onkologie der Humanmedizin seit einigen Jahren eine große Rolle. In der Gynäkologie der Veterinärmedizin konnten durch dieses Verfahren u. a. bereits morphologische Veränderungen am Endometrium während des Zyklus bei der Stute (LORBER, 1999), und beim Rind dokumentiert werden (SCHMAUDER, 2003). Während der frühen Trächtigkeit war es durch Untersuchungen der endometrialen Echostruktur beim europäischen Reh möglich, deutliche Unterschiede zu nichttragenden Tieren aufzuzeigen (HERMES, 1997).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu überprüfen, ob beim Rind in den ersten drei Wochen der Frühgravidität Zusammenhänge zwischen Änderungen im uterinen Blutfluss, der Morphologie des Endometriums, dem Stickstoffmonoxid-System und den peripheren Konzentrationen der Steroidhormone Östrogen und Progesteron bestehen. Daneben sollte untersucht werden, ob mittels der computergestützten Echostrukturanalyse des sonographischen B-Bildes des Endometriums und der Farbdopplersonographie der A. uterina bereits vor dem Sichtbarwerden des Embryos eine Gravidität diagnostiziert werden kann.

2. LITERATUR

2.1. Physiologie der Frühgravidität des Rindes

2.1.1. Frühgravidität bis zur Implantation

Nach der Befruchtung finden die ersten drei Teilungen der Zygote im Eileiter statt. Der Konzeptus erreicht nach 65 bis 72 Stunden im 8-Zellstadium (RÜSSE und SINOWATZ, 1991), bzw. nach 4 bis 5 Tagen im Morulastadium (GUILLOMOT, 1995) die gleichseitige Uterushornspitze. Am 8. Tag post ovulationem ist das frühe Blastocystenstadium erreicht: der Keimling teilt sich in eine innere Zellmasse („inner cell mass“, Embryonalknoten) und in eine äußere Zellschicht, den Trophoblasten, der einen inneren Hohlraum, die Blastocoele, umgibt (CHANG, 1952; BETTERIDGE und FLECHON, 1988; RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Der Konzeptus besteht jetzt aus etwa 100 Zellen (RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Nach etwa 8 bis 10 Tagen schlüpft die Blastocyste aus der Zona pellucida (CHANG, 1952; FLECHON und RENARD, 1978; BETTERIDGE et al., 1980; BETTERIDGE und FLECHON, 1988; RÜSSE und SINOWATZ, 1991; GUILLOMOT, 1995). Zu diesem Zeitpunkt produzieren bovine Embryonen eine große Menge an Plasminogenaktivator, einer Serin-Protease (MENINO und WILLIAMS, 1987). Diese Autoren vermuten, dass die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin von der bovinen Blastocyste benutzt wird, um eine partielle Lyse der Zona pellucida einzuleiten und dadurch den Schlupf zu erleichtern. Dagegen konnten FLECHON und RENARD (1978) keine Strukturveränderung der Zona pellucida im Sinne einer Lyse feststellen: demnach arbeitet sich die Blastocyste anfangs aktiv durch ein kleines Loch der durch die Expansion des Embryos verdünnten Zona, schließlich reißt diese ein und entlässt die Blastocyste. Die Tatsache, dass bis zum 16. Tag post oestrum leere Zonae pellucidae im Uterus gefunden werden können (BETTERIDGE et al., 1980), spricht ebenfalls gegen eine völlige enzymatische Auflösung der Zona.

Die noch kugelige Blastocyste wird nun vom Entoderm ausgekleidet, die Zellen des Embryonalknotens sind als einschichtige Keimscheibe (Ektoderm) in den Trophoblasten eingegliedert (RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Um den 11./12.Tag reißt der Trophoblast, der die Keimscheibe bedeckt („Rauber´s layer“), ein: die Keimscheibe liegt nun auf der Oberfläche des Konzeptus und kommt mit dem uterinen Milieu in direkten Kontakt (BETTERIDGE und

FLECHON, 1988; MADDOX-HYTTEL et al., 2003). Ab dem 13. Tag beginnt das Elongationsstadium (GUILLOMOT, 1995): bei Wiederkäuern wird die Blastocyste zunächst ovoid und wächst dann zu einem schlauchförmigen, später zu einem langgestreckten, fadenförmigen Gebilde heran, das die ganze Uterushöhle ausfüllt (RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Dabei ist das Längenwachstum der Blastocysten sehr unterschiedlich: in einer Studie von GREENSTEIN und FOLEY (1958) schwankt die Länge von 17 Tage alten Blastocysten zwischen 70 und 240 mm. BETTERIDGE et al. (1980) konnten zwischen dem 10. und 16. Tag nach dem Östrus enorme Größenunterschiede zwischen den Embryonen nachweisen, so waren 14 Tage alte Blastocysten zwischen 4 bis 40 mm lang. Diese Autoren vermuten, dass sich die Embryonen zum Gewinnungszeitpunkt in verschiedenen Stadien ihrer logarithmischen Elongationsphase befanden. In einer anderen Studie wurden 16 und 17 Tage alte Embryonen von erstmals und bereits wiederholt belegten Kühen miteinander verglichen (GUSTAFSSON und PLOEN, 1986): ein Großteil der Embryonen von „repeat breeders“ war deutlich kleiner und in der Entwicklung zurückgeblieben. Die Autoren nehmen an, dass das uterine Milieu von „repeat breeders“ die normale Entwicklung des Embryos nicht begünstigt.

An Tag 12/13 ist die Blastocyste 1,5 bis 3,3 mm, an Tag 13/14 bereits 10 mm lang und innerhalb eines Tages wird die Länge auf 18 mm fast verdoppelt. Zwischen den Tagen 16 und 18 wächst die Blastocyste von 50 auf 160 mm heran, ohne dass der Durchmesser von etwa 1,5 mm zunimmt (CHANG, 1952). Am 15. Tag füllt der Konzeptus zwei Drittel des Uterushorns aus, am 18. und 19. Tag, während des Implantationsbeginns, wächst die Blastocyste in das nichtgravide Uterushorn ein und füllt dieses am 22. Tag ganz aus (LEISER, 1975; RÜSSE und SINOWATZ, 1991).

2.1.2. Ernährung des Konzeptus während der frühen Trächtigkeit

Während der Präimplantationsphase liegt der Konzeptus ohne jegliche Verbindung zum Endometrium frei im Uteruslumen und wird durch die sog. Uterinmilch, ein Sekretionsprodukt des Endometriums, ernährt (GUILLOMOT, 1995). Diese Uterinmilch ist vom frühen Blastocystenstadium bis etwa Tag 24 reichlich im Uteruslumen vorhanden (CHANG, 1952). BARTOL et al. (1981) konnten am 19. Tag der Trächtigkeit 18 verschiedene Proteine aus intrauteriner Flüssigkeit nachweisen: vier dieser Proteine waren bei zyklischen Tieren in keiner Zyklusphase vorhanden. Die Autoren vermuten, dass sich das intrauterine Proteinmilieu während einer frühen Trächtigkeit sowohl quantitativ, als auch qualitativ laufend verändert, um den Ansprüchen eines sich entwickelnden Konzeptus gerecht zu werden. Obwohl in vielen Studien

beschrieben wurde, dass das uterine Milieu eine Schlüsselrolle bei der embryonalen Entwicklung spielt, konnten bis vor wenigen Jahren nur wenige uterine Proteine isoliert werden (GUILLOMOT et al., 1988). Vieler dieser Proteine stammen aus dem Serum (ROBERTS und PARKER, 1974). LIU und GODKIN (1992), HARNEY et al. (1993) und MACKENZIE et al. (1997) konnten ein „retinol-binding-protein“ (RBP) als Hauptsekretionsprodukt des bovinen Endometriums nachweisen, letztgenannter Autor auch in Konzepten während der Präimplantationsphase. RBP soll eine wichtige Rolle im Vitamin-A-Transport zwischen maternalem Gewebe und rasch heranwachsenden Embryo spielen (LIU und GODKIN, 1992). In neueren Studien konnten verschiedene Faktoren isoliert werden, die während der frühen Gravidität des Rindes unter Einfluss des Trächtigkeitshormons Interferon π u. a. vom Endometrium verstärkt sezerniert werden, darunter GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (EMOND et al., 1998; EMOND et al., 2000), bGCP-2 (bovine granulocyte chemotactic protein-2) (TEIXEIRA et al., 1997; STAGGS et al., 1998) und bUCRP (bovine ubiquitin cross-reactive protein) (AUSTIN et al., 1996; JOHNSON et al., 1998; STAGGS et al., 1998; HANSEN et al., 1999). Diese unterstützen nicht nur das Wachstum des Konzeptus, sondern sind auch maßgebend an der Aufrechterhaltung der Trächtigkeit beteiligt, indem sie die Funktion von Zellen des Immunsystems und den Prostaglandinstoffwechsel des Endometriums beeinflussen.

Die Zellen des bovinen Trophoblasten zeigen eine Ultrastruktur, die eine hohe Absorptionskapazität von Stoffen aus der extrazellulären Matrix anzeigen: so ist vom 10. bis zum 18. Graviditätstag die Oberfläche mit zahlreichen, 1-2 μm langen Mikrovilli bedeckt, an denen zahlreiche Vesikel und extrazelluläres Material anhaften. Die Plasmamembran zeigt endocytotische Invaginationen und im Zytoplasma können elektronendichte Körperchen nachgewiesen werden. Mit Beginn der Implantation verschwinden die Mikrovilli wieder vom apikalen Trophoblasten (GUILLOMOT und GUAY, 1982). Dies stimmt mit den Beobachtungen von LEISER (1975) und WATHES und WOODING (1980) überein, die während des frühen Appositionsstadiums auf dem bovinen Trophoblasten keine Mikrovilli nachweisen konnten. Der Verlust der apikalen Mikrovilli am Trophoblasten ist auch bei anderen Tierarten zu Beginn der Implantationsphase beschrieben: Maus (BERGSTROM und NILSSON, 1970), Ratte (MAYER et al., 1967), Hamster (PARKENING, 1976), europäisches Reh (AITKEN et al., 1973) und Schaf (GUILLOMOT et al., 1981).

2.1.3. Implantation – Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel

Bei Wiederkäuern kann der Implantationsvorgang in drei Phasen unterteilt werden: Vorkontakt-, Appositions- und Adhäsionsstadium. Die ersten Verbindungen erfolgen im Bereich des Embryos und setzen sich anschließend gegen die Spitzen der schlauchförmigen Blastocyste zeitlich verzögert fort (LEISER, 1975; RÜSSE und SINOWATZ, 1991; GUILLOMOT, 1995).

2.1.3.1. Mikroskopisch-anatomische Veränderungen am Trophoblasten

Am Ende der Präimplantation kann beim Rind ein Stadium abgegrenzt werden, in dem der Trophoblast sein Längenwachstum eingestellt hat, aber noch keine Verbindung zum Uterusepithel vorhanden ist: dies bezeichnet LEISER (1975) als Vorkontaktstadium. Der Trophoblast ist dem Uterusepithel nur angelagert, Drüsenmündungen und Einsenkungen des Endometriums werden von ihm überspannt. Dieses Stadium ist beim Rind am 17. Tag p.i. im Embryobereich, an Tag 22 in den Uterushornspitzen anzutreffen. Der „freie“ Trophoblast ist einschichtig und besteht aus platten bis kubischen Zellen, außerdem werden zu diesem Zeitpunkt Trophoblast-Riesenzellen in Ausbildung angetroffen (GREENSTEIN et al., 1958; LEISER, 1975), die etwa 6% der Zellpopulation ausmachen (WATHES und WOODING, 1980). In beiden Zelltypen können Fetttropfchen nachgewiesen werden. Apikale Mikrovilli sind bereits nicht mehr vorhanden (LEISER, 1975; WATHES und WOODING, 1980).

Die eigentliche Implantation beginnt mit dem Appositionsstadium: zwischen embryonalem und mütterlichem Epithel wird eine Verbindung entwickelt, die lichtmikroskopisch als eine dunkle, unregelmäßig verlaufende Kontaktzone erscheint und bis in die Drüsenmündungen hinein zu verfolgen ist (LEISER, 1975). Im Bereich des Rinderembryos beginnt die Appositionsphase zwischen 18. und 20. Tag p.i. (LEISER, 1975; WATHES and WOODING, 1980; KING et al., 1981; KING et al., 1982; RÜSSE und SINOWATZ, 1991; GUILLOMOT, 1995). Der Trophoblast besteht meistens aus zwei, iso- bis hochprismatischen Zellschichten, zwischen ihnen liegen runde bis ovale Trophoblast-Riesenzellen, die jetzt einen Zellanteil von 10 bis 20% ausmachen (LEISER, 1975; WATHES und WOODING, 1980). Die Oberfläche des Trophoblasten, der den Karunkeln gegenüberliegt, ist stark gefurcht mit Erhabenheiten, die sich in die zentralen Eindellungen der Karunkel einsenken (GUILLOMOT, 1995). In interkarunkulären Bereichen entwickelt der Trophoblast fingerähnliche Papillen, die in die Öffnungen der Uterindrüsen vordringen (GUILLOMOT et al., 1981; GUILLOMOT und GUAY,

1982; WOODING et al., 1982). Später verschwinden diese Papillen wieder, sie tragen demnach zeitlich begrenzt zur zusätzlichen Verankerung des Konzeptus und zur Absorption der histotropen Sekretionsprodukte aus den Uterindrüsen bei (GUILLOMOT et al., 1981; GUILLOMOT, 1995). Die Anforderungen des Konzeptus an einen optimalen Stoffwechsel beanspruchen mit fortschreitender Trächtigkeit eine Zunahme der an das Uterinmilch-enthaltende Uteruslumen grenzenden Oberfläche: sie wird vergrößert, indem sich vom Uteruslumen her ein Hohlraumssystem senkrecht zwischen die Trophoblastzellen einschleibt und sich verzweigt, zusätzlich mit dort sprossenden Mikrovilli, die an ihrer Basis Anzeichen enzytotischer Aktivität aufweisen (LEISER, 1975).

Am 22. Tag p.i. befindet sich der Konzeptus im Bereich des Embryos im Adhäsionsstadium (LEISER, 1975; RÜSSE und SINOWATZ, 1991), am 24. Tag p.i. kann man solche Verhältnisse auch im Mittelbereich der Uterushörner feststellen, die peripheren Enden des Chorions zeigen Adhäsionen mit dem Uterusepithel am 27. Tag p.i. (LEISER, 1975). Der Trophoblast besteht aus mehreren Zellschichten, Trophoblast-Riesenzellen machen jetzt fast die Hälfte aller Zellen aus. Diese liegen mit fortschreitender Implantation lumenseitig, gleichmäßig dicht verteilt, zwischen ihnen liegende Trophoblastzellen sind vielgestaltig verformt. Fetteinschlüsse im Chorionepithel erreichen jetzt im Adhäsionsstadium ein Maximum (LEISER, 1975). Die Kontaktzone ist jetzt durchwegs undeutlich geworden. Das Mittel der Verankerung ist die Interdigitation: die meisten Trophoblastzellen haben einen dichten Mikrovillisaum entwickelt, der mit dem des maternalem Epithels ineinandergreift (LEISER, 1975; WATHES und WOODING, 1980; KING et al., 1981; GUILLOMOT, 1995). Sie wird ergänzt durch stützende Filamente, die nun auch in den Mikrovilli des Trophoblasten auftreten (LEISER, 1975). Trophoblast-Riesenzellen präsentieren dagegen eine glatte Oberfläche (BJORKMAN, 1968; WATHES und WOODING, 1980; KING et al., 1981). Das Lumen zwischen embryonalem und maternalem Epithel verringert sich zunehmend, darin enthaltene Austauschsubstanzen dicken mehr und mehr ein und führen letztendlich zu einer Verklebung bzw. Adhäsion der benachbarten Zellmembranen (LEISER, 1975).

2.1.3.2. Mikroskopisch-anatomische Veränderungen am Endometrium

Das Uterusepithel in der Vorkontaktphase weist nach LEISER (1975) im Vergleich zur Luteinphase im Zyklus lichtmikroskopisch keine Unterschiede auf. Dies stimmt mit BJORKMAN (1956) überein, nach denen das endometriale Epithel vor der Implantation demjenigen des nicht-graviden Uterus entspricht: ein hochprismatisches Epithel mit

undeutlichem Bürstensaum. KING et al. (1981) konnten am 18. Tag der Gravidität bereits Änderungen der endometrialen Morphologie nachweisen: im Vergleich zu zyklischen Tieren ist bei trächtigen Kühen eine deutliche Abnahme der Höhe des maternalen Epithels zu verzeichnen, hochprismatische Zellen werden fortschreitend durch isoprismatische ersetzt. Dagegen ist nach WATHES und WOODING (1980) das uterine Epithel an Tag 18 bei trächtigen Kühen als hochprismatisch und im Vergleich zu zyklischen Kühen regelmäßig. GUILLOMOT und GUAY (1982) beschreiben zwischen Tag 12 und 16 knollige Ausstülpungen des apikalen Zytoplasmas sowohl bei zyklischen, als auch bei trächtigen Tieren. Im Gegensatz zu zyklischen Tieren sind diese Ausstülpungen bei graviden Kühen auch noch bis Tag 21 am uterinen Epithel nachweisbar, ähnliche Strukturen konnten zu Beginn der Implantation auch bei anderen Tierarten nachgewiesen werden (NILSSON, 1972; AITKEN, 1975). Ihre Funktion ist unklar: darin enthaltene apikale Vakuolen deuten auf eine Sekretion vom apokrinen Typ (AITKEN, 1975) bzw. merokrinen Typ (KOJIMA und SELANDER, 1970) hin. Der Verlust der apikalen Mikrovilli des Trophoblasten im Vorkontaktstadium ermöglicht einen engeren Kontakt zu den Uteruszellen, welche ihre starren Mikrovilli gegen die Oberfläche des Trophoblasten zu pressen scheinen (GUILLOMOT et al., 1981; KING et al., 1981), dadurch werden erste punktförmige Kontaktstellen ausgebildet (LEISER, 1975).

Die Oberfläche des dunklen, noch nicht transformierten Uterusepithels, die durch einen dichten Mikrovillisaum gekennzeichnet ist, verändert sich im beginnenden Appositionsstadium vorerst wenig (LEISER, 1975). In Kontaktzonen mit dem Trophoblasten erfährt das Uterusepithel eine tiefgreifende Umwandlung: mehrkernige, helle, unregelmäßig geformte Uterus-Riesenzellen treten oft in Gruppen zunächst im basalen Teil des Epithels auf (LEISER, 1975; WATHES und WOODING, 1980; KING et al., 1981). Dabei ist der Übergang von unbeeinflusstem zu trophoblastinduziertem Uterusepithel häufig abrupt. Mit fortschreitender Apposition verlagern sich diese Riesenzellen zur Epitheloberfläche. Sie tragen keine oder nur sehr wenige Mikrovilli, so dass sich ihre Zellmembranen flach an die der Trophoblastzellen anlegen können (LEISER, 1975). Um den 24. Tag machen sie etwa 50% des Uterusepithels aus (WATHES und WOODING, 1980). Diese Uterus-Riesenzellen sind nach BJORKMAN und BLOOM (1957), BJORKMAN (1968) und LEISER (1975) mütterlichen, nach WATHES und WOODING (1980), WOODING und WATHES (1980), KING et al. (1981) und WOODING (1982) aber fetalen Ursprungs: binukleäre Riesenzellen wandern vom Chorion in das maternale Epithel ein und verschmelzen mit den Epithelzellen, so dass auf diese Weise vielkernige Riesenzellen entstehen. Durch diese Zellfusion werden Inhaltsstoffe aus binukleären, fetalen

Zellen dem maternalem Organismus zugeführt (WATHES und WOODING, 1980; WOODING und WATHES, 1980; WOODING, 1992).

Zwischen dem 24. und 28. Tag gehen fast alle hochprismatischen, dunklen Zellen und annähernd die Hälfte aller Riesenzellen des Uterusepithels zugrunde (WATHES und WOODING, 1980). Das umgewandelte Uterusepithel wird bedeutend niedriger und setzt sich ausschließlich aus kubischen bis platten, ein- oder mehrkernigen hellen Zellen zusammen (BJORKMAN, 1956; LEISER, 1975). Es finden sich aber auch noch vereinzelt Bereiche, wo hochprismatisches Epithel anzutreffen ist (WATHES und WOODING, 1980; KING et al., 1981).

2.1.4. Steroidhormonkonzentration im Blutplasma

Im Vergleich mit zyklischen Tieren zeigen trächtige Kühe etwa ab dem 10. bis 12. Tag post inseminationem eine deutlich höhere Plasma- bzw. Milchprogesteronkonzentration (HENRICKS et al., 1970; HENRICKS et al., 1971; HENRICKS et al., 1972; ERB et al., 1976; BULMAN und LAMMING, 1978; HANSEL et al., 1978; LUKASZEWSKA und HANSEL, 1980; LAMMING et al., 1989; MANN et al., 1995). Nach LUKASZEWSKA und HANSEL (1980) sind Corpora lutea von graviden Tieren auch deutlich schwerer. Die Reanalyse der Daten von MANN et al. (1995) zeigt außerdem, dass trächtige Tiere bereits am 6. Tag post inseminationem eine signifikant höhere Milchprogesteronkonzentration aufweisen (MANN et al., 1999). Ein schnellerer postovulatorischer Progesteronanstieg innerhalb der ersten 6 bis 11 Tage wird bei graviden Kühen ebenfalls von HENRICKS et al. (1971), WETTEMANN und HAFS (1973), THOMPSON et al. (1980) und BUTLER et al. (1996) beschrieben. Nach LAMMING und DARWASH (1995) führt ein verzögertes postovulatorisches Ansteigen des Progesteronspiegels zu einer deutlichen Reduktion der Trächtigkeitsrate bei belegten Tieren. Obwohl der bovine Embryo ab Tag 13 in der Lage ist Progesteron zu produzieren (SHEMESH et al., 1979), unterscheidet sich die Progesteronkonzentration in der Uterusvene bei trächtigen Tieren nicht von zyklischen Kühen (LUKASZEWSKA und HANSEL, 1980). Demnach ist der höhere periphere Progesteronspiegel bei trächtigen Tieren ausschließlich auf eine gesteigerte Sekretion durch das Corpus luteum zurückzuführen (LUKASZEWSKA und HANSEL, 1980). Während der ersten 15 Trächtigkeitstage ist so die periphere Progesteronkonzentration etwa 1,7 mal höher als bei zyklischen Tieren (HENRICKS et al., 1971).

Im Gegensatz dazu besteht zwischen trächtigen und nichtgraviden Kühen kein Unterschied in der peripheren Östradiolkonzentration (LUKASZEWSKA und HANSEL, 1980; GYAWU und POPE, 1992; MANN et al., 1995; MANN und LAMMING, 1995). In einer Studie von

PRITCHARD et al. (1994) wird jedoch eine geringere Trächtigkeitsrate bei Kühen beschrieben, welche zwischen Tag 14 und 17 eine höhere Plasmaöstradiolkonzentration aufweisen: da bei einigen Tieren zu diesen Zeitpunkt die Luteolyse bereits eingesetzt hatte, ist es unklar, ob die hohe Östradiolkonzentration Ursache des Trächtigkeitsverlustes war, oder aber das Ergebnis einer fehlgeschlagenen embryonalen Verhinderung der Luteolyse. THATCHER et al. (1991) konnten belegen, dass sowohl das Follikelwachstum, als auch die folliculäre Östradiolproduktion bei trächtigen Kühen deutlich reduziert ist.

Die frühe embryonale Mortalität kann bei Kühen sehr oft mit einer niedrigen Milch- bzw. Plasmaprogesteronkonzentration in Verbindung gebracht werden (LUKASZEWSKA und HANSEL, 1980; LAMMING et al., 1989; MANN et al., 1995). Zusätzliche Progesterongaben während der frühen Lutealphase dagegen führen zu einer gesteigerten Weiterentwicklung des Embryos: durch Progesteronzufuhr zwischen den Tagen 2 und 5 wächst der Konzeptus bis Tag 14 auf das 10-fache seiner zu diesem Zeitpunkt physiologischen Länge heran (GARRETT et al., 1988). Progesteron induziert Veränderungen des uterinen Milieus, welches im Falle einer Gravidität die Entwicklung eines Embryos fördern soll (GEISERT et al., 1992). Wenn ein Embryo nur einen ungenügenden Progesteron-Stimulus erhält, ist es nach MANN et al. (1995) möglich, dass dieser nicht nur in seiner Entwicklung zurückbleibt, sondern dadurch auch nur ein unterschwelliges antiluteolytisches Signal produziert und letztendlich die Trächtigkeit nicht aufrechterhalten werden kann. Progesteron und Östradiol beeinflussen darüber hinaus die Entwicklung der Luteolyse auch direkt: demnach kann eine niedrige Progesteronkonzentration bzw. eine hohe Östradiolkonzentrationen zu einem vorzeitigen und stärkeren luteolytischen Signal führen (SILVIA und TAYLOR, 1989; LAU et al., 1992; BEARD et al., 1994; MANN und LAMMING, 1995, MANN und LAMMING, 1995). Die Zerstörung von Follikeln dagegen führt beim Wiederkäuer zu einer verzögerten Luteolyse und dadurch längeren Zyklusdauer (KARSCH et al., 1970; VILLA-GODOY et al., 1985).

2.1.5. Endokrine Aktivität von Blastocyste und Endometrium

Ab dem 13. Trächtigkeitstag ist der bovine Embryo in der Lage, 17- β -Östradiol zu produzieren (SHEMESH et al., 1979; CHENAULT, 1980). WILSON et al. (1992) untersuchten ebenfalls in vitro die Hormonsekretion von bovinen Embryonen und konnten eine Sekretion von Östradiol bereits ab Tag 11 bis einschließlich Tag 16 nachweisen. Im Vergleich zum Schwein ist die in vitro Produktion von Östrogenen durch den bovinen Konzeptus jedoch sehr gering (HEAP et al., 1979; CHENAULT, 1980; GADSBY et al., 1980). Während beim Schwein die

embryonale Östrogensynthese luteotrope Wirkung hat und der Erhaltung des Corpus luteum graviditatis dient (PERRY et al., 1976; BAZER et al., 1986), wirken beim Rind hohe Östrogenkonzentrationen einerseits luteolytisch (GREENSTEIN et al., 1958; WILTBANK et al., 1961; ELEY et al., 1979), andererseits vasodilatatorisch: intravenös appliziert sind Östrogene in der Lage, den uterinen Blutfluss zu stimulieren (ROMAN-PONCE et al., 1978; KNICKERBOCKER et al., 1986). Während der frühen Trächtigkeit ist bei bovinen Embryonen des weiteren eine hohe 5β -Reduktase Aktivität nachzuweisen (CHENAULT, 1980; ELEY et al., 1983): 5β -reduzierte Steroide sollen stimulierend auf Erythropoese und Hämoglobinsynthese des Embryos wirken (CHENAULT, 1980), in welchem ab dem 18. Tag ein Zirkulationssystem vorhanden ist (GREENSTEIN und FOLEY, 1958). Eine weitere Aufgabe des 5β -Reduktase-Systems könnte sein, die Substratverfügbarkeit für die Aromatisierung zu Östrogenen durch den bovinen Embryo zu reduzieren (THATCHER et al., 1984). KUBLI-GARFIAS et al. (1979) und KUBLI-GARFIAS et al. (1980) konnten bei den meisten 5β -reduzierten Steroiden außerdem eine hemmende Wirkung auf die uterine Motilität nachweisen. Nach ELEY et al. (1983) arbeiten Östrogene und 5β -reduzierte Steroide eng zusammen und beeinflussen sowohl das maternale, als auch das embryonale Gefäßsystem.

Bovine Blastocysten mit einem Alter von 13, 15 und 16 Tagen besitzen darüber hinaus nicht nur die Fähigkeit, Progesteron und Testosteron zu produzieren, sondern auch die enzymatische Kapazität, um Prostaglandine vom Typ F und E_2 herzustellen (SHEMESH et al., 1979). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen LEWIS et al. (1982), welche aus 16 und 19 Tage alten Blastocysten sieben verschiedene Arachidonsäuremetaboliten isolieren konnten, darunter PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ und PGFM. Die Produktion dieser Prostaglandine steigt mit jedem Trächtigkeitstag an, dabei produziert die Blastocyste in vitro wesentlich mehr $PGF_{2\alpha}$ als PGE_2 (SHEMESH et al., 1979; LEWIS et al., 1982). Ko-Inkubation boviner Embryonen mit Endometrium jedoch verändert deren Arachidonsäure-Metabolismus, indem wesentlich mehr PGE_2 als $PGF_{2\alpha}$ hergestellt wird (LEWIS und WATERMAN, 1983). WILSON et al. (1992) inkubierten bovine Embryonen ohne Zusatz von endometrialem Gewebe und konnten zwischen dem 10. und 18. Tag eine kontinuierlich ansteigende PGE_2 -Sekretion nachweisen, wobei diese 10 mal größer war als die Produktion von 6-keto- $PGF_{1\alpha}$.

Neben der Blastocyste ist die wichtigste PGE_2 -Quelle das Endometrium: die endometriale PGE_2 -Synthese wird während einer Trächtigkeit sowohl bei Kühen (LEWIS und WATERMAN, 1983), als auch bei Schafen gesteigert (ELLINWOOD et al., 1979; LACROIX und KANN, 1982). Des weiteren soll der Embryo oxydative Kofaktoren produzieren, die uterines $PGF_{2\alpha}$ in

PGE₂ umwandeln können (LEE und LEVINE, 1974). ASSELIN et al. (1997) und ASSELIN et al. (1998) konnten in in vitro Versuchen unter Einfluss des Trächtigkeitshormons Interferon π ebenfalls eine Reorientierung der endometrialen Prostaglandinproduktion hin zu PGE₂ belegen. So ist ab dem 12. Tag der Gravidität im trächtigem Horn ein etwa zweifach höherer, ab Tag 18/19 sogar ein dreifach höherer PGE₂-Gehalt als im nichtgravidem Horn nachzuweisen (SHELTON et al., 1990). GROSS et al. (1988) konnte in seinen Studien belegen, dass in vitro die endometriale PGF_{2 α} -Produktion bei trächtigen Kühen an Tag 17 deutlich niedriger, die PGE₂-Sekretion dagegen unverändert oder erhöht ist. Mehrere nachfolgende in vivo als auch in vitro Studien bei Wiederkäuern konnten bestätigen, dass sowohl die Konzentration von PGF_{2 α} als auch die von PGFM, seinem stabilen Metaboliten, zum Zeitpunkt der Trächtigkeitserkennung bei Vorhandensein eines lebensfähigen Konzeptus reduziert sind (THATCHER et al., 1984; SALAMONSEN et al., 1989; BAZER et al., 1991; BAZER, 1992; ROBERTS et al., 1992). Nach DANET-DESNOYERS et al. (1994) wird im Falle einer Gravidität nur die epitheliale PGF_{2 α} -Produktion gedrosselt, die von PGE₂, welche auch bei zyklischen Tieren fast ausschließlich im Stroma stattfindet (FORTIER et al., 1988), bleibt dagegen unverändert. Das daraus resultierende höhere PGE₂ : PGF_{2 α} Verhältnis wirkt sich nach DANET-DESNOYERS et al. (1994) fördernd auf den Erhalt des Corpus luteum aus.

PGE₂ ist in vitro in der Lage, die Progesteronsynthese von bovinen Lutealgewebe zu steigern (SPEROFF und RAMWELL, 1970; GODKIN et al., 1977). Bei Schafen verhindern PGE₂-Gaben sowohl die spontane Luteolyse des Corpus luteum (PRATT et al., 1977; MAGNESS et al., 1981), als auch die induzierte durch exogen zugeführtes PGF_{2 α} (HENDERSON et al., 1977; REYNOLDS et al., 1981). Bei zyklischen Kühen kann intrauterin infundiertes Prostaglandin E₂ die Corpus luteum Phase verlängern (GIMENEZ und HENRICKS, 1983; THIBODEAUX et al., 1992). Deshalb liegt es nahe, dass PGE₂ während der frühen Gravidität als luteotropes Agens wirken könnte (SHELTON et al., 1990; BAZER et al., 1991) und einen potentiellen luteolytischen Effekt von PGF_{2 α} antagonisiert. Nach REYNOLDS et al. (1983) agieren PGE₂ und 17- β -Östradiol synergistisch, um die Corpus luteum Phase während einer frühen Trächtigkeit aufrecht zu erhalten: Östradiol-17- β bewirkt einen Anstieg der uterinen Perfusion und Lymphdrainage und verstärkt dadurch den Transport von Metaboliten wie PGE₂ aus dem Uteruslumen zum Ovar über den von MAPLETOFT et al. (1976), GINTHER (1981) und THATCHER et al. (1984) für PGF_{2 α} beschriebenen utero-ovariellen Weg. PGE₂ könnte so einen direkten Effekt auf die Luteinzellen ausüben und die Progesteronsekretion aufrechterhalten (REYNOLDS et al., 1983).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass PGE₂ bei verschiedenen Tierarten vor der Implantation beteiligt ist an einer gesteigerten Gefäßpermeabilität (HOFFMAN et al., 1977; KENNEDY, 1977; EVANS und KENNEDY, 1978; HOOS und HOFFMAN, 1980; KENNEDY, 1980; KENNEDY, 1985; EMOND et al., 1998; NI et al., 2003), Vasodilatation (BERGSTROM et al., 1968; STILL und GREISS, 1978; COLEMAN et al., 1994), Sekretion von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen (EMOND et al., 1998), einer lokalen Suppression des Immunsystems (EMOND et al., 1998; LEUNG et al., 2000) und Regulation der uterinen Kontraktion (DOUALLA-BELL et al., 1995). Eine Blockade der Prostaglandinsynthese mit nichtsteroidalen Antiphlogistika wie Indomethacin hebt diese Veränderungen auf und verhindert eine Trächtigkeit (POYSER, 1995).

2.1.6. Maternale Erkennung der Trächtigkeit

2.1.6.1. Interferon π – Trächtigkeitssignal der Wiederkäuer

Die Erkennung einer Trächtigkeit erfolgt bei Kühen zwischen dem 15. und 17. Graviditätstag (NORTHEY und FRENCH, 1980; HUMBLLOT und DALLA PORTA, 1984): wird der Konzeptus vor dem 15. Tag aus dem Uterus entfernt, bleibt das Inter-Östrus Intervall gleich und die Kühe kommen entsprechend ihres Zyklus wieder pünktlich in Brunst. Wenn der Embryo jedoch erst an Tag 16 oder 17 entfernt wird, führt dies zu einer deutlichen Verzögerung der Luteolyse. Demnach schließen diese Autoren, dass der Embryo einen antiluteolytischen Effekt ausübt und der antiluteolytische bzw. luteotrope Faktor erst mit dem 16. Graviditätstag ausreichend ist, um die Luteolyse zu verhindern und somit die Trächtigkeit aufrecht zu erhalten. BETTERIDGE et al. (1980) konnten nachweisen, dass ein erfolgreicher Embryotransfer bis einschließlich Tag 16 durchgeführt werden kann. Wird der Embryo zu einem späteren Zeitpunkt übertragen, kann dieser die Luteolyse nicht mehr verhindern.

Ein Protein, nämlich das „bovine trophoblast protein-1“ (bTP-1), anfangs auch als „Trophoblastin“ bezeichnet, konnte bei Kühen als das antiluteolytische Agens nachgewiesen werden (HELMER et al., 1989; THATCHER et al., 1989; BAZER et al., 1991). Dieses Protein wurde als Typ I Interferon identifiziert und später durch die International Interferon Society als Interferon tau (INF π) bezeichnet (ROBERTS et al., 1992; MARTAL et al., 1998). Die Existenz von INF π ist auf die Subfamilien der Bovidae, Cervidae, Giraffidae und Tragulidae beschränkt (ROBERTS et al., 1998).

Die Produktion von INF π findet nur in den mononukleären Zellen des embryonalen Trophektoderms statt (FARIN et al., 1990; ROBERTS et al., 1992; BAZER et al., 1996). Bovine Interferon π mRNA kann zwischen dem 12. und 38. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden. Die Sekretion von Interferon π ist jedoch zwischen dem 16. und 19. Trächtigkeitstag am höchsten, also während der Elongationsphase des Konzeptus (BAZER, 1992). Dabei tritt es nicht über die venösen oder lymphatischen Gefäßen des Uterus in die maternale Zirkulation über, INF π verlässt also den Uterus nicht, um auf das Corpus luteum zu wirken (GODKIN et al., 1984; BAZER, 1992; BAZER et al., 1997). Es wirkt vielmehr indirekt, indem es am Endometrium die Protein- und Prostaglandinsynthese beeinflusst (HELMER et al., 1989; BARROS et al., 1991; CHELMONSKASOYTA, 2002). Der Beginn der INF π Expression ist genetisch programmiert und unabhängig vom maternalen, uterinen Milieu, da INF π auch in vitro exprimiert wird. Allerdings wird die embryonale INF π Produktion sehr wohl vom uterinen Milieu beeinflusst, da diese in vitro höher ist, wenn Konzepten zusammen mit endometrialen Gewebe kultiviert werden (THATCHER et al., 1997; DEMMERS et al., 2001). Darüber hinaus besteht eine positive Korrelation zwischen peripherer, maternaler Plasmalogestronkonzentration, Entwicklungsgrad und INF π -Produktion des Embryos (KERBLER et al., 1997; MANN et al., 1999; MANN and LAMMING, 2001).

Im Gegensatz zu anderen Typ 1 Interferonen zeichnet sich INF π durch einige besondere Eigenschaften aus: Interferon tau zeigt eine hohe antivirale (ROBERTS et al., 1990; BAZER, 1992; BAZER et al., 1996; STARK et al., 1998) als auch antiproliferative Aktivität (ROBERTS et al., 1992; ASSAL-MELIANI et al., 1993; BAZER et al., 1996; STARK et al., 1998). Da es im Vergleich zu INF- α , INF- β oder INF- γ weniger zytotoxisch ist (SOOS und JOHNSON, 1999), hat seine Bedeutung aufgrund dieser Eigenschaften in den letzten Jahren als nützliches Therapeutikum bei Retrovirusinfektionen und Autoimmunerkrankungen sowohl in der Human-, als auch in der Tiermedizin zugenommen (PONTZER et al., 1997; MUJTABA et al., 1998). Abgesehen von seiner Rolle als Antiluteolysin hat INF π zudem eine hohe immunregulatorische Aktivität (ROBERTS et al., 1992; BAZER et al., 1996; DEMMERS et al., 2001; CHELMONSKASOYTA, 2002): INF π beeinflusst die Proliferation und Cytokinproduktion von Lymphozyten und ermöglicht dadurch ein Überleben und Heranwachsen des Konzeptus.

2.1.6.2. Verhinderung der Luteolyse

Bei zyklischen Kühen wird die Luteolyse durch Ausschüttung einer luteolytischen Konzentration von $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelöst, die überwiegend aus luminalen epithelialen Zellen des Endometriums stammt (FORTIER et al., 1988). Dabei spielt die Entwicklung von epithelialen Oxytocinrezeptoren eine wichtige Rolle (MCCRACKEN et al., 1984). Oxytocin, das sowohl vom Corpus luteum (WATHES und DENNING-KENDALL, 1992), als auch von der Neurohypophyse sezerniert wird (HOOPER et al., 1986; BAZER, 1992), bindet an endometriale Oxytocinrezeptoren und bewirkt dadurch eine anfangs pulsatile, dann jedoch luteolytische Ausschüttung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ (FLINT und SHELDRIK, 1983; FLINT und SHELDRIK, 1986).

Der Oxytocinrezeptor wird im Verlauf eines Zyklus in unterschiedlicher Konzentration exprimiert: während der ersten 10 bis 12 Tage des Zyklus verhindert Progesteron die Synthese von Östrogen- als auch Oxytocinrezeptoren durch das Endometrium – dies wird als sog. „Progesteron Block“ bezeichnet (MCCRACKEN et al., 1984). Anschließend bewirkt Progesteron durch eine negative Autoregulation den Rückgang der Expression seines eigenen Rezeptors (MEYER et al., 1988; BOOS et al., 1996; ROBINSON et al., 1998). Dieser erreicht beim Rind an Tag 13 seine geringste Expression, der inhibitorische Effekt auf die Entstehung von Östrogen- und Oxytocinrezeptoren ist damit aufgehoben (MEYER et al., 1988). Der erste, kleinere Anstieg von Oxytocinrezeptoren ist zwischen Tag 15 und 17 zu verzeichnen (MEYER et al., 1988; FUCHS et al., 1990; JENNER et al., 1991; MANN and LAMMING, 1994), der größere zweite zwischen Tag 17 und 21 (FUCHS et al., 1990; MANN und LAMMING, 1994). Diese erscheinen zunächst auf dem luminalen Epithel des Endometriums (ROBINSON et al., 1999), später auch im glandulärem Epithel und karunkulärem Stroma (WATHES und DENNING-KENDALL, 1992). Zur gleichen Zeit entwickelt der Uterus die Fähigkeit, auf Oxytocin zunächst pulsatile Mengen an $\text{PGF}_{2\alpha}$ auszuschütten (MANN und LAMMING, 1993). Dies führt zu einer weiteren Ausschüttung von Oxytocin aus großen Luteinzellen des Corpus luteum, welches letztendlich die Freisetzung einer luteolytischen Dosis von $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus dem Endometrium bewirkt (FLINT und SHELDRIK, 1986).

Beim Schaf wird die Entstehung von Östradiolrezeptoren während der Lutealphase durch Progesteron vollkommen unterdrückt. Erst zum Zeitpunkt der Luteolyse ist ein Anstieg dieser Rezeptoren zu verzeichnen, deshalb wird vermutet, dass sich Östradiol über seine Rezeptoren stimulierend auf die Entstehung von Oxytocinrezeptoren auswirkt (MCCRACKEN et al., 1984; SPENCER et al., 1996). Die Konzentration der endometrialen Östrogenrezeptoren steigt beim Rind ebenfalls zum Östrus hin auf Maximalwerte an und fällt innerhalb der ersten Tage der

Lutealphase wieder stark ab (MEYER et al., 1988). Lokalisiert man die Rezeptoren, so trifft dieses Expressionsmuster zwar auf das Stroma zu, nicht jedoch auf das luminale Epithel: hier sind Östrogenrezeptoren während des gesamten Zyklus präsent (BOOS et al., 1996; ROBINSON et al., 1998). Ihre Konzentration ist positiv korreliert mit der Plasmaöstradiolkonzentration (ROBINSON et al., 1998). Im Gegensatz zum Schaf ist beim Rind also die initiale Hochregulation der Oxytocinrezeptoren für die Einleitung der Luteolyse nicht an Östradiol und seine Rezeptoren gekoppelt (MANN et al., 1999; ROBINSON et al., 1999).

Für die Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit ist also die Hauptaufgabe eines Embryos, die Entstehung von Oxytocinrezeptoren am Endometrium und dadurch die Ausschüttung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu verhindern. Eine Möglichkeit die Entwicklung dieser Rezeptoren zu verhindern, wäre die anhaltende Expression von Progesteronrezeptoren, um damit den „Progesteron Block“ aufrecht zu erhalten (MANN et al., 1999). Beim Schaf konnte diese Vermutung jedoch eindeutig widerlegt werden (SPENCER et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Kühen erzielt, wo die Konzentration des Progesteronrezeptors an Tag 16 bei trächtigen und nicht-graviden Kühen gleich niedrig war (ROBINSON et al., 1999).

Beim Schaf konnten mehrere Studien nachweisen, dass $\text{INF } \pi$ die Entstehung von endometrialen Östrogenrezeptoren, und dadurch nachfolgenden Anstieg der Oxytocinrezeptoren, für die Induktion der Luteolyse verhindert: SPENCER und BAZER (1995) konnten an Tag 13 und 15 Östrogenrezeptoren auf dem luminalen Epithel bei zyklischen Schafen, nicht jedoch bei tragenden Tieren nachweisen. Dies deutet nach Meinung dieser Autoren auf eine direkte Suppression des Rezeptors durch $\text{INF } \pi$ hin. In einer weiteren Studie von SPENCER et al. (1995) wurde die Luteolyse durch Verabreichung von Östradiol induziert: dies führte zu einem Anstieg der Konzentration von Östrogenrezeptoren, gefolgt von Oxytocinrezeptoren. Durch gleichzeitige intrauterine Verabreichung von rekombinantem $\text{INF } \pi$ jedoch konnte dieser Rezeptoranstieg, und damit die Luteolyse, verhindert werden.

Im Gegensatz dazu scheint beim Rind, wie schon erwähnt, die Entwicklung von Oxytocinrezeptoren nicht an Östradiol und seine Rezeptoren gekoppelt zu sein (ROBINSON et al., 1999): die Konzentration der Östradiol-Rezeptor-mRNA als auch des Östradiol-Rezeptor-Proteins unterscheidet sich an Tag 16 bei trächtigen Kühen nicht von derjenigen von zyklischen Tieren, wohingegen die Konzentration der endometrialen Oxytocin-Rezeptor-mRNA bei graviden Kühen deutlich geringer ist. FUCHS et al. (1990) konnten ebenfalls nachweisen, dass in Gegenwart eines Konzeptus im Uterus sowohl der erste Anstieg von Oxytocinrezeptoren zwischen Tag 14 und 17, als auch der zweite zwischen Tag 17 und 21 vollständig verhindert

wird. Demnach ist INF π bei Kühen in der Lage, unabhängig von Östradiol und seinen Rezeptoren, die Entstehung von Oxytocinrezeptoren und damit die Sekretion von PGF_{2 α} zu verhindern (MANN et al., 1999).

Darüber hinaus gibt es bei trächtigen Kühen eine zweite Möglichkeit, um die Freisetzung von PGF_{2 α} unter Kontrolle zu halten: INF π stimuliert die Bildung eines endometrialen Inhibitors der Prostaglandinsynthese, der als „endometrial prostaglandin synthesis inhibitor“ (EPSI) bezeichnet wird (BASU und KINDAHL, 1987; GROSS et al., 1988; HELMER et al., 1989; DANET-DESNOYER et al., 1993; THATCHER et al., 1995). Dieser Inhibitor ist auch während des Zyklus vorhanden, die inhibitorische Aktivität ist jedoch während der frühen Trächtigkeit am größten (BASU und KINDAHL, 1987; GROSS et al., 1988; DANET-DESNOYER et al., 1993), v. a. zwischen dem 16. und 31. Trächtigkeitstag (BAZER et al., 1997). Es handelt sich dabei um Linolsäure, einem kompetitiven Inhibitor der Prostaglandinsynthese (PACE-ASCIAK und WOLFE, 1968; THATCHER et al., 1994; THATCHER et al., 1995). So findet man bei trächtigen Kühen in endometrialen Mikrosomen eine höhere Konzentration an Linolsäure, aber auch eine niedrigere Konzentration an freier Arachidonsäure als bei zyklischen Tieren (THATCHER et al., 1995). Deshalb vermuten THATCHER et al. (1997), dass Arachidonsäure, als Ausgangsprodukt der Prostaglandinsynthese, während der frühen Trächtigkeit ebenfalls nur begrenzt zur Verfügung steht. EPSI reduziert über Hemmung der Prostaglandinsynthese nicht nur die Produktion von PGF_{2 α} , sondern auch in geringerem Maße die von PGE₂ (GROSS et al., 1988). Um die unterschiedliche Regulation von PGF_{2 α} und PGE₂ während der Frühgravidität beim Rind zu erklären, wird vermutet, dass INF π die Prostaglandinsekretion durch EPSI nur in epithelialen Zellen, die hauptsächlich PGF_{2 α} produzieren (FORTIER et al., 1988), senkt. In Stromazellen dagegen, welche v. a. PGE₂ sezernieren (FORTIER et al., 1988), ist nach GROSS et al. (1988), GROSS et al. (1988), HELMER et al. (1989) und BAZER et al. (1991) ein endometrialer Inhibitor der Prostaglandinsynthese weniger präsent.

2.1.6.3. Verhinderung der Abstoßungsreaktion durch das Muttertier

Die befruchtete Eizelle enthält genetisches Material, das sowohl aus einem maternalen, als auch aus einem paternalen Anteil zusammengesetzt wird. In bestimmten Entwicklungsphasen, wird das embryonale Genom aktiviert und bewirkt die Synthese eines Proteinsortiments, das sich von dem unterscheidet, das bis zu diesem Zeitpunkt durch die maternale mRNA codiert worden ist. Beim Rind ist dies im 8- bis 16-Zell-Stadium der Fall, also zu einem Zeitpunkt, wo der Konzeptus in den Uterus übertritt (KING et al., 1988; FREI et al., 1989). Der Embryo hat damit

antigene Komponenten, die vom Immunsystem des Muttertieres erkannt werden und damit zu einer Abstoßungsreaktion führen müssten. GIL et al. (2001) machten Beobachtungen, dass es dadurch zu einer Stresssituation des Organismus kommt. Sie konnten in ihrer Studie nachweisen, dass sowohl die Körper-, als auch die Milchttemperatur bei trächtigen Kühen meist zwischen dem 5. und 7. Tag post inseminationem signifikant ansteigt, gefolgt bzw. überlappt von einem sehr hohen Serumcortisolspiegel.

Nach Ansicht von WARNER et al. (1988) ist in der frühen Gravidität die Zona pellucida als eine Art physikalische Schutzbarriere in der Lage, den Konzeptus vor der Zerstörung durch Antikörper oder cytotoxische T-Lymphozyten zu bewahren. Nach dem Schlupf tragen verschiedene Faktoren dazu bei, eine Abstoßungsreaktion zu verhindern:

Zum einen exprimiert der Konzeptus auf seiner Oberfläche atypische MHC (major histocompatibility complex) Moleküle wie HLA-G (ELLIS, 1990; KOVATS et al., 1990). Diese schützen den Trophoblasten vor dem Angriff cytotoxischer T-Zellen (SCHMIDT et al., 1997) und NK (natural killer)-Zellen (SODERSTROM et al., 1997). Solche MHC-Klasse-I-Moleküle werden während der Reifungsphase der T-Lymphozyten auch im Thymus exprimiert, wodurch später dieses Oberflächenmolekül nicht als fremdes Antigen bekämpft wird (SCHMIDT et al., 1997).

Zum anderen produziert der Konzeptus Faktoren, die eine Aktivierung von cytotoxischen Zellen verhindern und eine Veränderung des Phänotyps der Leukozyten induzieren (LINNEMEYER und POLLACK, 1993; OUELLETTE et al., 1997): so findet im Falle einer Gravidität ein Shift von TH (T-Helfer) 1- zu TH-2-Zellen statt (LIN et al., 1993; WEGMANN et al., 1993). Dadurch wird am feto-maternalem Berührungspunkt die Produktion von Wachstumsfaktoren und benignen Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 induziert, welche ein Überleben und Heranwachsen des Embryos ermöglichen (FORTIN et al., 1997; EMOND et al., 1998).

Beim Rind wurde die Beziehung zwischen Konzeptus, Endometrium und maternalem Immunsystem von EMOND et al. (1998) näher beschrieben: INF π , welches vom Konzeptus, und PGE₂, das sowohl vom Konzeptus als auch vom Endometrium produziert wird, bewirken gemeinsam durch Inhibition der Proliferation von Lymphozyten (LOW und HANSEN, 1988; SKOPETS et al., 1992) eine lokale Suppression des maternalen Immunsystems. Während die Expression von Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2), welche proinflammatorisch und stimulierend auf NK-Zellen wirken (MARTAL et al., 1997), zurückgeht (EMOND et al., 1998), wird die von benignen Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (siehe 2.1.2.) in Lymphozyten

gesteigert (EMOND et al., 1998; EMOND et al., 2000). Demnach besitzt der Konzeptus die Fähigkeit, die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Uterus lokal zu seinem Vorteil zu modellieren (EMOND et al., 2000).

2.2. Sonographisches Erscheinen des bovinen Konzeptus in den ersten drei Graviditätswochen

Die Trächtigkeitsdiagnose beim Rind mittels B-Mode-Sonographie war zunächst nicht vor Tag 25 möglich und stützte sich auf den direkten Nachweis einer echoarmen Amnionblase und des Embryos: WHITE et al. (1985) und CHAFFAUX et al. (1986) konnten eine Gravidität an Tag 30 bzw. 28 durch Nachweis einer intrauterinen, echoarmen Flüssigkeitsansammlung belegen und führten ihre Untersuchungen an 201 Kühen bzw. 100 Kühen und Kalbinnen ab der dritten Graviditätswoche durch. In beiden Studien wurden 3,5 MHz Sonden verwendet. FISSORE et al. (1986) konnten mittels einer 5 MHz Sonde bereits am 22. Trächtigkeitstag eine Flüssigkeitsansammlung und an Tag 27 den Embryo entdecken. Ihre sonographischen Untersuchungen wurden an einer begrenzten Anzahl von 22 Kühen durchgeführt. HANZEN und DELSAUX (1987) benutzten eine 3 MHz Sonde und konnten eine Trächtigkeit bereits am 25. Tag p.i. durch Nachweis einer echoarmen Amnionblase feststellen. Hierfür wurden 320 Kühe und Kalbinnen auf 15 verschiedenen Farmen mittels eines tragbaren Ultraschallgeräts vom Typ 560 E zwischen der 3. Woche und dem 3. Monat nach der Besamung untersucht.

In einer Studie von PIERSON und GINTHER (1984) wurden 12 Kalbinnen zwischen 2,5 und 3 Jahren täglich zwischen den 5. Tag vor bis zum 50. Tag nach der Ovulation mittels eines Ultraschallgeräts der Marke Fischer Vetscan und einer 5 MHz Sonde untersucht. Diese Autoren waren in der Lage, bereits zwischen Tag 12 und 14 einen umschriebenen echoarmen Bereich mit einem Durchmesser von 2-3 mm im Uterus zu lokalisieren. Dieses Bläschen konnte nur in dem ipsilateral zum Corpus luteum gelegenen Uterushorn nachgewiesen werden und nur bei den 6 Tieren, bei denen zu einem späteren Zeitpunkt auch eine Gravidität diagnostiziert wurde. Zwischen Tag 26 und 29 konnte ein ca. 10 mm großer Embryo mit positiver Herzaktion entdeckt werden; dieser stellte sich sonographisch als echogener, also weißer Bereich mit rhythmischen Pulsationen in der echoarmen, schwarzen Amnionblase dar.

CURRAN et al. (1986) untersuchten 40 Kalbinnen im Alter zwischen 1,5 und 2 Jahren, davon wurden 19 Tiere belegt. Sie benutzten eine 5 MHz Sonde und das Ultraschallgerät „Equisonics 210“. Die Tiere wurden von zwei Untersuchern unabhängig voneinander täglich geschallt und auf Trächtigkeitsanzeichen beurteilt. Ein sog. „embryonic vesicle“ konnte durchschnittlich an

Tag 11,7 im ipsilateral zum Corpus luteum gelegenen Uterushorn entdeckt werden: 73% dieser Bläschen hatten kugelige Gestalt mit einem Durchmesser von 2 bis 4 mm, 27 % konnten bereits als länglich eingestuft werden mit einer Höhe von 2 mm und einer Länge zwischen 3 und 7 mm. Zwischen Tag 16 und 17 füllte das Bläschen das ipsilaterale Horn aus, das contralaterale Horn war zwischen 19. und 20. Trächtigkeitstag vollständig durchwachsen. Zwischen Tag 13 und 18 betrug die Höhe des Konzeptus ca. 2 mm, dieser erschien ultrasonographisch als echoarmer Flüssigkeitsfilm im Uteruslumen. Mit dem 20. Tag nahm die Höhe in einem lokalisierten Bereich stetig zu, in welchem durchschnittlich an Tag 21,1 der Embryo (ca. 3,8 mm lang) mit Herzaktion entdeckt werden konnte.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen BOYD et al. (1988), die mittels einer 7,5 MHz Sonde 22 multipare Kühe zwischen dem 7. und 35. Tag nach der Besamung (20 Kühe: KB; 2 Kühe: Natursprung) täglich auf Trächtigkeitsanzeichen untersuchten. Die genannten Autoren konnten ein echoarmes, im Durchmesser ca. 2 mm großes Bläschen bereits an Tag 9 im Uteruslumen entdecken, am 13. Tag sogar eine kommaartige, echoreiche Struktur, lokalisiert in diesem echoarmen Bläschen. Mit dem 14. Tag wuchs das elongierte Bläschen bereits in das contralaterale Horn ein. Am 19. Tag erweiterte sich der Durchmesser der Blastocyste lokal von 2 auf etwa 4 mm, eine positive Herzaktion konnte an Tag 22 festgestellt werden.

Intrauterine Flüssigkeit ist bei Kühen allerdings nicht immer auf eine Gravidität zurückzuführen: geringe Mengen an normaler, echoarmer, intrauteriner Flüssigkeit können auch bei zyklischen Kühen auftreten (KASTELIC et al., 1988). Auch muss streng darauf geachtet werden, ob sich die sichtbare Flüssigkeitsansammlung im Uteruslumen und nicht außerhalb befindet. Die an der Uterusoberfläche verlaufenden Blutgefäße können intraluminal gelegene Flüssigkeitsansammlungen vortäuschen (TAVERNE et al., 1985). KASTELIC et al. (1991) konnten sowohl bei 12 trächtigen, als auch bei 6 zyklischen Kalbinnen, zwischen dem 10. und 12. Tag nach der Ovulation 3 bis 5 rundliche, echoarme Strukturen im kranialen Horn ipsilateral zum Corpus luteum mittels einer 7,5 MHz Sonde feststellen. Dabei unterschieden sich trächtige Kalbinnen mit durchschnittlich 5,1 Flüssigkeitsansammlungen im gravidem Horn allerdings signifikant von zyklischen Tieren, bei denen im Schnitt 3,5 echoarme Strukturen im Uteruslumen entdeckt werden konnten. Demzufolge schließen diese Autoren, dass das frühembryonale Bläschen zwar entdeckt, aber nicht von freier intrauteriner Flüssigkeit unterschieden werden kann. Ähnliche multiple Flüssigkeitsansammlungen wurden jedoch von früheren Autoren nicht beschrieben (PIERSON und GINTHER, 1984; CURRAN et al., 1986; BOYD et al., 1988). Nach KASTELIC et al. (1989) und KASTELIC et al. (1991) beträgt

demnach die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Trächtigkeitsdiagnose allein mittels Ultraschall zwischen Tag 10 und 16 nur 50 % und stützt sich in diesen Zeitraum auf den Nachweis intrauteriner Flüssigkeit, zwischen Tag 20 und 22 dagegen steigt die Wahrscheinlichkeit mit Sichtbarwerden des eigentlichen Embryos auf 100 % an.

Geringgradige intrauterine Flüssigkeitsansammlungen im Falle einer Endometritis, Muco- oder Hydrometra können ebenfalls zu einer falschen Trächtigkeitsdiagnose führen (KASTELIC et al., 1988): allerdings enthält diese im Falle eines entzündlichen Geschehens echogene Flecken und ist somit deutlich von einer Gravidität zu unterscheiden (FISSORE et al., 1986; SIRKKOLA, 1988).

Für milcherzeugende Betriebe ist die Optimierung der Günstzeit von größter Wichtigkeit. Ziel verschiedener Studien war es deshalb, zu zeigen, ab wann die Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall genaue Diagnosen liefern kann. Im Falle einer Nichtträchtigkeit kann das Tier dann so früh wie möglich wieder besamt werden (MÜLLER et al., 1999).

In einer Studie von BOYD et al. (1990) wurde die Genauigkeit einer ultrasonographischen Trächtigkeitsdiagnose mittels einer 7,5 MHz Sonde in zwei verschiedenen Versuchen getestet. Eine positive Trächtigkeitsdiagnose wurde bei Vorhandensein eines frühembryonalen Bläschens gestellt, welches im Lumen des ipsilateral zum Corpus luteum gelegenen Uterushorns um den 9. Tag der Trächtigkeit entdeckt werden konnte und mit dem 14. Trächtigkeitstag in das contralaterale Horn überwuchs, das mit Tag 18 von der Blastozyste vollständig ausgefüllt wurde. Zwischen dem 18. und 20. Tag der Trächtigkeit begann sich im Falle einer Trächtigkeit die Fruchtblüssigkeit an einer Stelle des langgezogenen Emryonalsäckchens im ipsilateralen Horn zu vermehren. Im ersten Versuch wurden 17 multipare Kühe besamt und einmalig zwischen Tag 14 und 17 auf Trächtigkeitsanzeichen untersucht. Dabei wurden alle Kühe richtig entweder als trächtig (10 Tiere) oder nicht trächtig (7 Tiere) eingestuft. Im zweiten Versuch wurden 22 besamte Kühe und 14 zyklische Kühe in einer gemischten Gruppe zwischen Tag 10 und 24 einmalig ultrasonographisch untersucht. Alle nichtgraviden Kühe wurden richtig als solche erkannt. Die Genauigkeit einer positiven Trächtigkeitsdiagnose betrug zwischen Tag 11 und 16 nur 25 %, stieg jedoch ab dem 17. Trächtigkeitstag auf 100 % an.

PIETERSE et al. (1990) untersuchten 148 Kühe, welche zwischen 2 und 10 Jahre alt waren, auf insgesamt vier verschiedenen Farmen zwischen dem 21. und 33. Tag post inseminationem. Sie benutzten für diese Studie ein Ultraschallgerät (Pie Data Medical), welches mit einer 5 MHz Sonde ausgestattet war. Als Trächtigkeitsanzeichen wurden echoarme, intrauterine Flüssigkeitsansammlungen und das Sichtbarwerden des Konzeptus an sich gewertet. Zwischen

Tag 21 und 25 konnte eine korrekte Diagnose bei 44,8 % der trächtigen Tiere und bei 82,3 % der nichtgraviden Kühe gestellt werden. Von Tag 26 bis 33 stieg die richtige Einstufung der trächtigen Tiere deutlich auf 97,7 % und die der nichtträchtigen auf 87,8 % an.

BADTRAM et al. (1991) prüften die Genauigkeit einer Trächtigkeitsuntersuchung an 200 Kühen und Färsen zwischen dem 16. und 31. Trächtigkeitstag mittels einer 5 MHz Sonde. Die Diagnose trächtig wurde hier ebenfalls durch den Nachweis des Embryos oder echoarmer, intrauteriner Flüssigkeit gestellt. Die Genauigkeit einer richtigen Trächtigkeitsuntersuchung betrug zwischen Tag 16 und 22 nur 50 %, stieg aber zwischen Tag 23 und 31 auf 70,2 % an. Vom 16. bis 22. Tag post inseminationem konnten 25 % der trächtigen und 82 % der nichtgraviden Tiere als solche eingestuft werden. Zwischen Tag 23 und 31 wurden 68,8 % der Graviditäten und 71,7 % der güst gebliebenen Tiere erkannt. Die Autoren konnten keinen Einfluss von verschiedenen Untersuchern oder primiparen bzw. multiparen Kühen auf die Genauigkeit der sonographischen Trächtigkeitsdiagnose aufdecken.

MÜLLER et al. (1999) untersuchten 800 Milchkühe und 1150 Färsen auf insgesamt 3 Betrieben zwischen dem 20. und 34. Tag nach der Besamung. Sie benutzten für ihre Studien ein akkubetriebenes, tragbares Ultraschallgerät der Fa. Pie Data, welches mit einer 5 MHz Sonde ausgestattet war. Die Genauigkeit der frühen Graviditätsdiagnostik mittels Ultraschall stieg mit zunehmendem zeitlichen Intervall zwischen künstlicher Besamung und Trächtigkeitsuntersuchung an. Bei Kühen wurde eine Genauigkeit von 98 % ab dem 29. Tag post inseminationem, bei Färsen bereits ab dem 25. Tag erreicht. Demnach werden bei Kalbinnen durch die transrektale Sonographie bereits in früheren Trächtigkeitsstadien weniger Fehldiagnosen gestellt als bei Kühen. Die Untersuchung von HUGHES und DAVIES (1989) bestätigt dieses Ergebnis. Nach MÜLLER et al. (1999) ist der Uterus einer Färse im Verhältnis zu dem einer älteren Kuh kleiner und hat eine feinere Gewebestruktur. Diese anatomischen Unterschiede ermöglichen bei Kalbinnen eine genauere und frühere Diagnose als bei Kühen.

2.3. Messung des uterinen Blutflusses mit Hilfe der Dopplersonographie

Im folgenden Kapitel wird nur auf die wichtigsten Grundlagen der Dopplersonographie eingegangen, soweit es für das Verständnis dieser Arbeit erforderlich ist. Ausführlichere Angaben sind den Dissertationen von BAUMGARTNER (1998), BÜHLMAYER (1999) und MAYER (1999) zu entnehmen.

2.3.1. Dopplersonographische Grundlagen

Ultraschallwellen werden von einem in Schwingung versetzten piezoelektrischen Kristall ausgesendet, treffen im Körper auf Gewebe unterschiedlicher Dichte und werden an dessen Grenzflächen reflektiert. Treffen diese hochfrequenten Schallwellen jedoch auf sich bewegende Strukturen, wie z. B. in einem Blutgefäß strömende Erythrozyten, werden sie ebenfalls reflektiert, erfahren dabei aber eine Änderung ihrer Frequenz. Diese Frequenzverschiebung wird als „Dopplershift“ bezeichnet und ist die Grundlage der Blutflussmessung.

Der Dopplershift hängt ab von der Sendefrequenz des Schallkopfes, dem Winkel zwischen Ultraschallstrahl und Blutflussrichtung, der Geschwindigkeit des Ultraschalls im Körpergewebe (ca. 1540 m/s) und der Geschwindigkeit des Reflektors, also der Blutflussgeschwindigkeit (DUDWIESUS et al., 1993; MARSÁL, 1993).

Die Dopplerfrequenzverschiebung ist nicht nur hörbar, sie kann auch in einem Koordinatensystem in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen und dadurch sichtbar gemacht werden. Dabei entstehen Wellenformen, wobei der zur Sonde hinströmende Blutfluss oberhalb der Nulllinie, der von der Sonde wegfließende Blutstrom unterhalb der Nulllinie angezeigt wird. Bei arteriellen Gefäßen lässt sich der Herzzyklus außerdem durch die zeitlichen Schwankungen der Blutflussgeschwindigkeit in Systole und Diastole unterteilen (DUDWIESUS et al., 1993).

Die folgende „Dopplergleichung“ wird zur Berechnung des Dopplershifts herangezogen:

$$f_d = f_0 - f_e = \frac{2 * f_0 * v * \cos\alpha}{c}$$

f_d	=	Frequenzverschiebung = Dopplershift (Hz)
f_0	=	Sendefrequenz des Ultraschallkopfes (Hz)
f_e	=	Empfangsfrequenz (Hz)
v	=	Blutflussgeschwindigkeit (m/s)
c	=	Schallgeschwindigkeit im Weichteilgewebe (ca. 1540 m/s)
α	=	Winkel zwischen Ultraschallstrahl und der Richtung des Blutflusses

2.3.2. Gerätetechnologie

Heutzutage werden vorwiegend sog. pulsed-wave (PW)-Dopplergeräte verwendet. Bei Geräten dieser Bauart wird sowohl das Senden, als auch das Empfangen von einem einzigen piezoelektrischen Kristall zeitlich alternierend übernommen. Registriert werden nur Signale, die nach einem bestimmten Zeitintervall zurückkehren. Der Vorteil gegenüber continuous-wave (CW)-Dopplergeräten besteht darin, dass dadurch ein tiefenselektives Arbeiten möglich ist, wobei die Messtiefe vom Untersucher eingestellt werden kann. Zusätzlich kann bei Farbdopplergeräten die Frequenzverschiebung farbcodiert in ein normales B-Bild hineinprojiziert werden: üblicherweise wird der Blutfluss zur Sonde hin rot, der Blutfluss von der Schallquelle weg blau dargestellt (DUDWIESUS et al., 1993).

2.3.3. Auswertungsmethoden

Dopplerwellen können auf drei verschiedene Arten analysiert werden:

1. Qualitative Beurteilung:

Bei dieser Auswertungsmethode werden die Dopplerwellen descriptiv beurteilt hinsichtlich des Vorhandenseins von diastolischem Blutfluss, dessen Richtung sowie Kontinuität des Blutflusses während einer Herzaktion (GOSWAMY und STEPTOE, 1988; TEKAY et al., 1996).

2. Semiquantitative Beurteilung:

Zur semiquantitativen Beurteilung werden die sogenannten Dopplerindices herangezogen, welche ein Maß für den in der Peripherie des untersuchten Gefäßes herrschenden Blutflusswiderstand darstellen. Diese Indices lassen sich aus der systolischen (S), enddiastolischen (D), minimalen (M) und der mittleren Frequenzverschiebung (TAMF) eines Herzzyklus berechnen. Gebräuchlich sind v. a. die S/D-Ratio (STUART et al., 1980), der Resistance Index (POURCELOT, 1974) und der Pulsatility Index (GOSLING und KING, 1975).

$$\text{S/D-Ratio} = \frac{S}{D}$$

$$\text{Resistance Index (RI)} = \frac{S - D}{S}$$

$$\text{Pulsatility Index (PI)} = \frac{S - M}{\text{TAMF}}$$

3. Quantitative Erfassung des Blutflussvolumens:

Das Blutflussvolumen ergibt sich aus folgender Formel:

$$Q = v * A$$

Dabei ist:

$$A = r^2 * \pi \quad \text{und} \quad v = \frac{f_d * c}{2 * f_0 * \cos\alpha}$$

Q	=	Blutflussvolumen (L/s)
A	=	Gefäßquerschnitt (m ²)
v	=	Blutflussgeschwindigkeit (m/s)
r	=	Gefäßradius (m)
f _d	=	Frequenzverschiebung (Hz)
f ₀	=	Sendefrequenz des Ultraschallkopfes (Hz)
c	=	Schallgeschwindigkeit im Weichteilgewebe (ca. 1540 m/s)
α	=	Winkel zwischen Ultraschallstrahl und der Richtung des Blutflusses

Die Blutflussgeschwindigkeit v wird durch Umstellen der bereits oben angegebenen Dopplershift-Gleichung errechnet.

2.3.4. Uteriner Blutfluss während der Frühgravidität bei verschiedenen Tierarten

FORD et al. (1979) untersuchten die uterine Durchblutung bei Rindern während der Frühgravidität mittels implantierter elektromagnetischer Blutflusssonden: bis Tag 13 post inseminationem unterschied sich der Blutfluss sowohl auf der ipsilateralen, zum Corpus luteum gelegenen Seite, als auch auf der contralateralen Seite nicht von dem während des Zyklus. Zwischen Tag 14 und 18 der Gravidität war auf der ipsilateralen Seite ein Anstieg im uterinen Blutflussvolumen um das zwei- bis dreifache festzustellen, wogegen auf der gegenüberliegenden Seite keine Veränderungen auftraten. Zwischen Tag 19 und 25 entsprach der Blutfluss beider

Uterusarterien wieder demjenigen an Tag 13. Ähnliche Ergebnisse erzielte BAUMGARTNER (1998) durch farbdopplersonographische Untersuchungen der rechten und linken Arteria uterina nach dem von BOLLWEIN et al. (2000) beschriebenen Verfahren an einer begrenzten Anzahl von drei Tieren: an Tag 13 post ovulationem konnte in der ipsilateral zum Konzeptus gelegenen Uterinarterie ein vorübergehender Anstieg des uterinen Blutflusses festgestellt werden, während auf der gegenüberliegenden Seite keine Blutflussänderungen im Vergleich zum Zyklus zu beobachten waren. Nach Ansicht der genannten Autoren lässt dies eine lokale Regulation des uterinen Blutflusses durch den Konzeptus vermuten, da im Gegensatz zum Zyklus keine Korrelation zwischen peripherer Steroidhormonkonzentration und uteriner Perfusion besteht.

REYNOLDS et al. (1984) führten Blutflussmessungen bei frühgraviden Schafen an den Tagen 9, 11, 13 und 15 ebenfalls durch Implantation elektromagnetischer Blutflusssonden durch: an Tag 9 entsprach der uterine Blutfluss beider Seiten demjenigen von nichtgraviden Tieren. An den Tagen 11, 13 und 15 stieg das Blutflussvolumen in der ipsilateral zum Corpus luteum gelegenen Uterinarterie auf etwa das zweifache der contralateralen Seite an, allerdings nur bei einseitig graviden Tieren, deren Konzeptus sich in dem ipsilateralen Uterushorn befand und bei Mehrlingsträchtigkeiten, wo alle Corpora lutea auf dem ipsilateralen Ovar lokalisiert waren. Der Blutfluss der contralateralen Seite war in diesem Zeitraum konstant niedrig und entsprach demjenigen während des Zyklus.

Beim graviden Schwein unterscheidet sich der uterine Blutfluss bis zum 11. Tag post inseminationem nicht von demjenigen des Zyklus. Zwischen den Tagen 12 und 13 steigt das uterine Blutflussvolumen beidseits auf das drei- bis vierfache an, fällt zum 14. Tag wieder deutlich ab und bleibt bis zum 19. Tag auf diesem Niveau. Bei einseitig trächtigen Sauen steigt die uterine Durchblutung nur auf der ipsilateralen Seite an (FORD und CHRISTENSON, 1979).

MAYER (1999) dokumentierte den uterinen Blutfluss bei Stuten mittels Farbdopplersonographie der Arteria uterina: innerhalb der ersten 10 Tage nach der Ovulation unterscheidet sich die uterine Perfusion bei trächtigen Tieren nicht von derjenigen während des Zyklus. Ab dem 11. Tag steigt die uterine Durchblutung sowohl ipsi-, als auch contralateral des Corpus luteum an, ab dem 15. Trächtigkeitstag jedoch ist das Blutflussvolumen in der ipsilateral zum Konzeptus gelegenen Uterinarterie im Vergleich zur contralateralen Seite deutlich gesteigert und bleibt bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 29 konstant hoch.

2.4. Computergestützte Echostrukturanalyse

Die Echostrukturanalyse wird meist auf anatomisch homogene Ausschnitte aus Ultraschallbildern von Weichteilen angewendet. Das empfangene Ultraschallsignal, das als Basis zum Aufbau des Ultraschall-B-Bildes dient, ist das Resultat komplexer Wechselwirkungen (Reflexion, Absorption, Streuung) des Gewebes mit dem eingesetzten Signal. Die Wirkung all dieser Prozesse spiegelt sich in dem daraus resultierenden B-Bild wieder. Dieses erhält dadurch eine komplexe Informationsstruktur. Die lokalen Eigenschaften des B-Bildes, welche durch kaum oder nicht mehr auflösbare anatomische Details bedingt sind, definieren dabei die sog. „Ultraschalltextur“ eines Organs. Die Textur in einem bestimmten Bereich des Bildes ist gekennzeichnet durch die Helligkeit der Bildpunkte sowie durch ihre Kontraste und Homogenität. Da die Texturinformation sehr komplex ist, ist eine Quantifizierung allein aufgrund einer subjektiven Abschätzung des Bildeindrucks durch einen Untersucher nicht zuverlässig. Deshalb wurden quantitative, computergestützte B-Bild-Auswerteverfahren als Hilfe bei der Diagnose entwickelt (DELORME und ZUNA, 1995).

2.4.1. Prinzip der computergestützten Echostrukturanalyse

Die komplexe Informationsstruktur des B-Bildes setzt sich aus vielen, unregelmäßig angeordneten, hellen oder dunklen Flecken („Speckels“) zusammen, deren Charakteristika und Anordnung (Textur) vom untersuchten Organ, dem durchschallten Medium, dem Gerät und seiner Einstellung sowie von zufälligen Faktoren abhängen (DELORME und ZUNA, 1995). Das Pixel ist das kleinste Bildelement, das durch das Auflösungsvermögen des Bildschirms bestimmt wird. Ein „Speckel“ umfasst mehrere benachbarte Pixel und wird vom Betrachter als Fleck wahrgenommen. Es ergibt sich aus der Wechselwirkung von Schall und Gewebe sowie dem Bildrekonstruktionsprozess im Rechner. Während der Untersucher ohne Probleme ein „Speckel“ erkennen kann, fehlt dem Computer in der Texturanalyse allerdings die erforderliche Intelligenz, die Pixel zu identifizieren, aus denen das jeweilige „Speckel“ zusammengesetzt ist. Daher werden die „Speckel“, welche die eigentlich interessierenden Bildkomponenten darstellen, bei der Texturanalyse nicht als eine Einheit erkannt bzw. berücksichtigt. Die Texturanalyse geht deshalb notwendigerweise von der Verteilung aller Pixel innerhalb der zu analysierenden Region (**Region of interest = ROI**) aus, um damit unmittelbar die Struktur und Verteilung der einzelnen „Speckel“ zu beschreiben (DELORME und ZUNA, 1995).

2.4.2. Echostrukturparameter

Das Muster der Graustufenvarianten eines sonographischen B-Bildes wird als Textur bezeichnet (LIEBACK et al., 1991). So basiert die Texturanalyse von Ultraschallbildern einerseits auf der quantitativen Beschreibung der Helligkeit, andererseits auf der Analyse der räumlichen Anordnung der Pixel in der untersuchten Bildregion (DELORME und ZUNA, 1995). Es werden sechs Hauptgruppen der Texturanalyse zur Beschreibung der Echotextur herangezogen: Eindimensionales Histogramm, Gradientenstatistiken, Grauwertlauflängen-Matrizen (run-length-matrix), Co-occurrence-Matrizen, Autoregressive Modelle und Wavelet-Modelle (SZCZYPINSKI et al., 2001). Im Folgenden wird nur auf diejenigen Echostrukturparameter näher eingegangen, welche für das Verständnis dieser Arbeit wichtig sind.

2.4.2.1. Eindimensionales Histogramm der ersten Ordnung

Die Parameter des eindimensionalen Histogramms beschreiben die relative Häufigkeit des Auftretens der 256 verschiedenen Graustufen einzelner Pixel in dem zu analysierenden Bildausschnitt (schwarz = 0; weiß = 255). Die räumliche Anordnung dieser Pixel wird dabei jedoch nicht berücksichtigt. Sie liefern demnach eine globale Beschreibung der Textur in der untersuchten ROI und machen lediglich eine Aussage über die **Gesamthelligkeit** des sonographischen B-Bildes (RAETH et al., 1985; HABERKORN et al., 1991; LIEBACK et al., 1991; BADER et al., 1994; DELORME und ZUNA, 1995; MAZZONE et al., 1995; LIEBACK et al., 1996; BLECK et al., 2000; HUBER et al., 2000; LEFEBVRE et al., 2000; SZCZYPINSKI et al., 2001). Hierzu gehört auch der *mittlere Grauwert*.

Der *mittlere Grauwert* beschreibt die mittlere Helligkeit der ROI. Daraus ergibt sich, dass für zwei Bilder mit unterschiedlicher Gewebetextur (Abb. 2.1) im Einzelfall identische mittlere Grauwerte berechnet werden können (HABERKORN et al., 1991; LIEBACK et al., 1991; DELORME und ZUNA, 1995; GERTSCH, 1997; HERMES, 1997; LORBER, 1999).

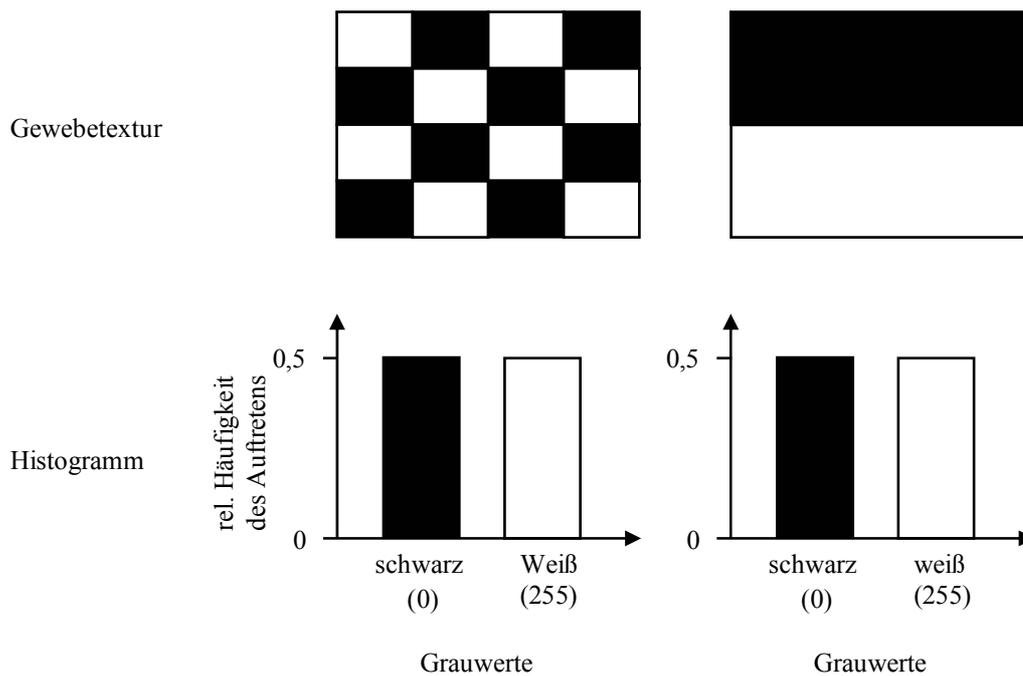


Abb. 2.1: Darstellung der eindimensionalen Histogramme zweier unterschiedlicher Schwarz-Weiß-Bilder. Der Farbe Schwarz ordnet der Rechner den Wert 0 zu, der Farbe Weiß 255. Der mittlere Grauwert beträgt in diesem Beispiel in beiden Bildern 127,5 (modifiziert nach HERMES, 1997).

Der mittlere Grauwert ist definiert als:

$$\text{Mean} = \frac{1}{N} * \sum_{(x,y) \in \text{ROI}} g(x,y)$$

mit:

Mean: Mittlerer Grauwert

N: Pixelzahl innerhalb ROI

$g(x, y)$: Grauwert an der Stelle (x, y)

x, y : Reihen- bzw. Spaltenindex

2.4.2.2. Gradientenstatistiken der ersten Ordnung

Die Parameter der Gradientenstatistik der ersten Ordnung erfassen Grauwertunterschiede in einem definierten Bereich. Sie liefern Informationen über die Struktureigenschaften der zu untersuchenden Textur und erfassen vor allem die mikrostrukturelle Anordnung der Bildtextur.

Gradienten erfassen somit die **räumliche Variation der Grauwerte** in einer kleinen Umgebung und beschreiben die räumliche Anordnung der Pixel in der untersuchten Region (RAETH et al., 1985; HABERKORN et al., 1991; DELORME und ZUNA, 1995; GERTSCH, 1997; HUBER et al., 2000). Zu den Gradientenstatistiken der ersten Ordnung gehört u. a. der Parameter *mittlerer Gradientenbetrag*.

Beim *mittleren Gradientenbetrag* werden die Unterschiede in den Grauwerten benachbarter Pixel berechnet (DELORME und ZUNA, 1995). Für die Gradientenstatistik wird zunächst ein zentraler Bildpunkt (Z) definiert (Abb. 2.2). Von diesem ausgehend werden benachbarte Pixel aufgesucht und die Grauwertdifferenzen zwischen diesen berechnet. Der Gradientenbetrag in Punkt Z, wie er in Abb. 2.2 dargestellt ist, ergibt sich demzufolge aus:

$$\text{Gr}_{Z(x,y)} = \sqrt{(N - S)^2 + (W - O)^2} = \sqrt{(i_{x,y+1} - i_{x,y-1})^2 + (i_{x-1,y} - i_{x+1,y})^2},$$

wobei $i_{x,y}$ die Pixelhelligkeit an der Stelle $Z(x, y)$ definiert. Bei 256 verschiedenen Grauwerten (0 – 255) beträgt der Maximalwert demnach $\sqrt{2} * 255 = 360,62$. Den Wert 0 nimmt der mittlere Gradientenbetrag bei einem vollständig homogenen Bild an. Indem diese Berechnung für alle Bildpunkte als Zentrum Z wiederholt wird, ergibt sich der mittlere Gradientenbetrag (DELORME und ZUNA, 1995; SZCZYPINSKI et al., 2001).

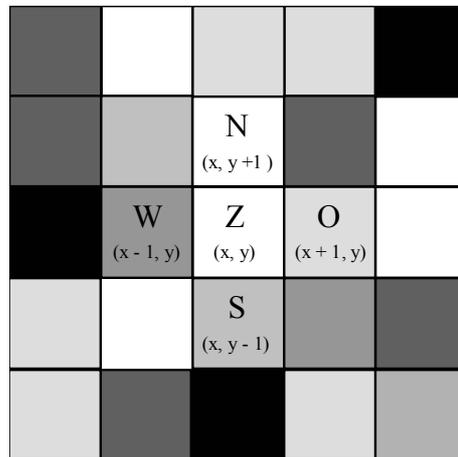


Abb. 2.2: Bildhafte Darstellung zur Berechnung des Gradienten (modifiziert nach DELORME und ZUNA, 1995).

Der mittlere Gradientenbetrag ist definiert als:

$$\text{GrMean} = \frac{1}{N} * \sum_{(x,y) \in \text{ROI}} G(x,y)$$

mit:

GrMean: mittlerer Gradientenbetrag

N: Anzahl der Pixel innerhalb der ROI, für die ein Gradient berechnet wird

G(x, y): Gradient an der Stelle (x, y)

x, y: Reihen- bzw. Spaltenindex

2.4.2.3. Co-occurrence-Matrizen der zweiten Ordnung

Die Co-occurrence-Matrize basiert auf einem zweidimensionalen Histogramm, der sog. Grauwertabhängigkeitsmatrix. In diesem 2-D-Histogramm wird die **Häufigkeit von verschiedenen Grauwertkombinationen** zwischen definierten Pixelpaaren ermittelt, die in einer durch einen Verschiebevektor genau festgelegten räumlichen Beziehung zueinander stehen. Dieser Verschiebevektor ist gekennzeichnet durch den Pixelabstand $d(x, y)$ und dem Winkel θ ($= \arctan$), welcher die Richtung bestimmt (Abb. 2.3) (RAETH et al., 1985; LIEBACK et al., 1989; HABERKORN et al., 1991; LIEBACK et al., 1991; BADER et al., 1994; DELORME und ZUNA, 1995; VALCKX und THIJSEN, 1997; LEFEBVRE et al., 2000; SZCZYPINSKI et al., 2001).

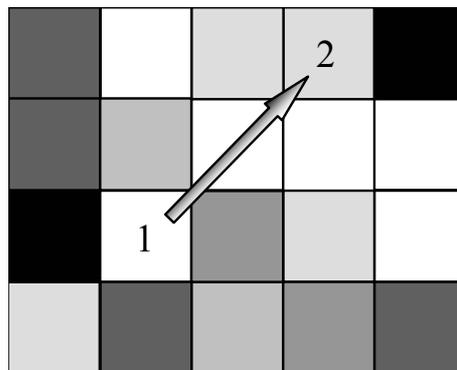
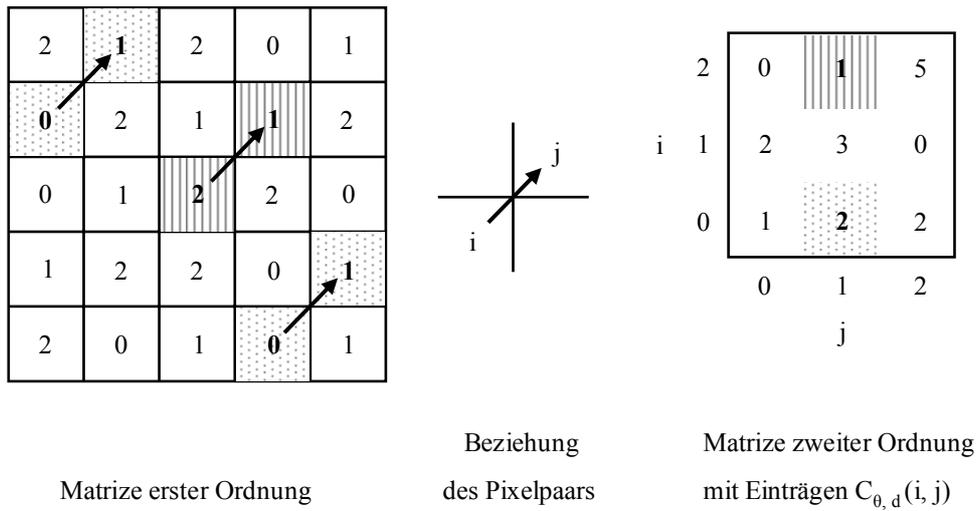


Abb. 2.3: Bildhafte Darstellung zur Erstellung einer Grauwertabhängigkeitsmatrix: das aktuelle zentrale Pixel ist das Pixel mit dem Grauwert 1. Der Verschiebevektor mit der Anweisung Pixelabstand $d(2, 2)$ und Winkel $\theta = 45^\circ$ führt zum Pixel mit dem Grauwert 2 und definiert ein Pixelpaar, dessen Grauwertkombination ermittelt wird (modifiziert nach DELORME und ZUNA, 1995).

Diese Paare werden für alle Pixel der ROI gebildet und die ermittelte Grauwertkombination mit einem Eintrag versehen. Dadurch entsteht in der Matrix eine zweidimensionale Häufigkeitsverteilung von Grauwertkombinationen. Diese Verteilung wird einer statistischen Auswertung unterzogen (DELORME und ZUNA, 1995; HUBER et al., 2000).

Zum Beispiel erscheinen in einer ROI 25 Pixel mit mittleren Grauwerten von 0, 1 und 2. Die Beziehungsvorschrift $d(1, 1)$ und $\theta = 45^\circ$ kann demnach für 16 Pixelpaare angewendet werden:



Da es nur drei Graustufen gibt, wird der nach der Grauwertkombination ermittelte Matrizeneintrag $C_{\theta, d}(i, j)$ in einer 3×3 Matrize zweiter Ordnung festgehalten. Für jedes Pixelpaar ergibt sich ein Eintrag in die Matrize zweiter Ordnung. Das Erstellen einer Matrize zweiter Ordnung beschränkt sich folglich auf das Zählen bestimmter Grauwertkombinationen, die in vorgegebener Beziehung zueinander stehen.

Beispiel: Die Grauwertkombination $i = 2$ und $j = 1$ (längs schraffiert hinterlegt) kommt in der Matrize erster Ordnung nur einmal vor, deshalb erfolgt in die Matrize zweiter Ordnung der Eintrag 1. Eine weitere Grauwertkombination $i = 0$ und $j = 1$ (gepunktet hinterlegt) ist in der Matrize erster Ordnung zweimal vorhanden, demnach wird in der Matrize zweiter Ordnung der Eintrag 2 festgehalten.

Letztlich wird bei diesem Verfahren also das Ursprungsbild (= Matrize erster Ordnung) in eine andere Darstellungsform transformiert (= Matrize zweiter Ordnung), welche einer statistischen Auswertung unterzogen wird, die Daten zur Beschreibung der Textur liefert (BADER et al., 1994). Die statistische Analyse ist mit verschiedenen computergestützten

Echostrukturprogrammen möglich, in dieser Arbeit wurde das Softwareprogramm MaZda (Institute of Electronics, Technical University of Lodz/Polen) verwendet (siehe 3.3.2.). Aus diesem Verfahren resultieren verschiedene Texturparameter (HARALICK et al., 1973), die Informationen über Mikro- und Makrostrukturen im Bild erfassen (DELORME und ZUNA, 1995; HUBER et al., 2000). Die normalerweise benutzten Parameter sind Angular-second-moment (*AngScMom*), Contrast (*Contrast*), Correlation (*Correlat*) und Entropy (*Entropy*) (RAETH et al., 1985; HABERKORN et al., 1990; BASSET et al., 1993; THIJSSSEN et al., 1993; DELORME und ZUNA, 1995).

AngScMom charakterisiert die Homogenität, *Contrast* die Intensitätsschwankung, *Entropy* die Unordnung innerhalb der interessierenden Bildregion (ROI) und *Correlat* die Linearität der Beziehung zwischen einem Pixelpaar innerhalb der ROI (RAETH et al., 1985; GARRA et al., 1993; LEFEBVRE et al., 2000). Im folgendem wird nur auf diejenigen Parameter der Co-occurrence-Matrize der zweiten Ordnung näher eingegangen, welche im Rahmen der computergestützten Echostrukturanalyse dieser Arbeit verwendet wurden.

Die Homogenität (*AngScMom*) ist ein Parameter zur Beurteilung der Homogenität in der vorgegebenen ROI des Ultraschallbildes (GARRA et al., 1993; LEFEBVRE et al., 2000). Der Messwert der Homogenität liegt zwischen 0 und 1 und ist abhängig von der Zahl und Häufigkeit verschiedener Grauwertkombinationen: sind in einem Bild nur wenige Grauwertkombinationen vorhanden und diese relativ gleich verteilt, dann ist der Wert der Homogenität groß. Den maximalen Wert von 1 erreicht die Homogenität bei einem vollständig homogenen Bild. Befinden sich dagegen in einem Bild viele Grauwertkombinationen und kommen diese relativ ungleichmäßig verteilt vor, so ist der Messwert der Homogenität sehr klein (RAETH et al., 1985).

Die Homogenität ist definiert als:

$$\text{HOM} = \sum_{(i,j) \in \text{ROI}} p(i,j)^2$$

mit:

- HOM: Homogenität
- i, j: Reihen- bzw. Spaltenindex
- p (i, j): Eintrag in der Matrix an der Stelle (i, j)

Der Kontrast (*Contrast*) charakterisiert die Intensitätsschwankung der unterschiedlichen Grauwertstufen in einer vorgegebenen ROI (LEFEBVRE et al., 2000). Dieser Parameter liefert die größte Information über die Makrostruktur eines Ultraschallbildes (HUBER et al., 2000). Treten hohe Grauwertdifferenzen zwischen definierten Pixelpaaren einer ROI sehr häufig auf, desto größer ist der Wert des Parameters. Der Kontrast wird umso kleiner, je geringer die Grauwertunterschiede zwischen den vorgegebenen Pixelpaaren sind (RAETH et al., 1985; GARRA et al., 1993; MAZZONE et al., 1995).

Der Kontrast ist definiert als:

$$\text{KON} = \sum_{(i,j) \in \text{ROI}} (i - j)^2 * p(i, j)$$

mit:

KON: Kontrast
 i, j: Reihen- bzw. Spaltenindex
 p (i, j): Eintrag in der Matrix an der Stelle (i, j)

2.4.3. Einsatz der Echostrukturanalyse in der Gynäkologie

In der Gynäkologie der Humanmedizin hat die computergestützte Echostrukturanalyse in den letzten Jahren im Bereich der Brustkrebsdiagnostik Eingang gefunden. GARRA et al. (1993) und BADER et al. (1994) konnten mit Hilfe der Texturparameter der ersten und zweiten Ordnung signifikante Unterschiede zwischen Mammakarzinomen und anderen Gewebetypen wie proliferativ mastopathischen Veränderungen, Fettgewebsnekrosen, Narben, Zysten und Hämatomen feststellen. Während in den Untersuchungen von BADER et al. (1994) eine eindeutige Differenzierung zwischen Karzinom und Fibroadenom durch Statistiken der ersten und zweiten Ordnung nicht möglich war, gelang es GOLDBERG et al. (1992), GARRA et al. (1993) und LEFEBVRE et al. (2000) mit hoher Sensitivität zwischen gutartigen und bösartigen Tumoren zu unterscheiden. Die Anzahl der bisher erforderlichen Gewebebiopsien in der Brustkrebsdiagnostik könnte so nach Meinung von GOLDBERG et al. (1992), GARRA et al. (1993) und LEFEBVRE et al. (2000) um bis zu 80 % reduziert werden.

HUBER et al. (2000) konnten mittels der quantitativen Gewebedifferenzierung während Chemotherapien beim Mammakarzinom einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Texturparameter erster und zweiter Ordnung und den histopathologisch

nachgewiesenen sowie sonographisch sichtbaren Veränderungen darstellen. Nach Ansicht dieser Autoren eignet sich die computergestützte Echostrukturanalyse als eine nichtinvasive Methode zur Dokumentation der Tumorantwort im Verlauf von Chemotherapien.

In der Schwangerschaftsdiagnostik erlaubte der Einsatz der computergestützten Texturanalyse das frühzeitige Erkennen von Veränderungen an Plazenta (MORRIS, 1988) und Zervix (WISCHNIK et al., 1999). MORRIS (1988) konnte mit Hilfe von Parametern aus der Co-occurrence-Matrix neben Charakterisierung altersbedingter oder durch Tabakkonsum hervorgerufener Veränderungen an der Plazenta auch Aussagen über das Auftreten eines schwangerschaftsassozierten Bluthochdrucks treffen. Eine frühzeitige Diagnosestellung ist entscheidend, um durch entsprechende vorgeburtliche Therapie foetalen Schädigungen vorzubeugen. Durch Einsatz von Parametern der ersten und zweiten Ordnung am Sonogramm der graviden Cervix uteri konnten WISCHNIK et al. (1999) eine Vorhersage über eine mögliche Zervixinsuffizienz machen. Nach Ansicht dieser Autoren übertrifft die texturanalytische Auswertung des Zervixsonogramms die konventionelle palpatorische, vaginale Beurteilung der Zervixkonsistenz nicht nur in ihrer prädiktiven Aussagekraft, sondern ist auch angesichts des Infektionsrisikos bei der Entstehung einer vorzeitigen Wehentätigkeit im Vorteil.

In der Veterinärmedizin wurden computergesteuerte Bildanalyseverfahren bereits zur Beschreibung zyklusbedingter Veränderungen am Endometrium des Pferdes eingesetzt (GERTSCH, 1997; LORBER, 1999):

LORBER (1999) bestimmte mit einem relativ einfachen Computerprogramm nur die Helligkeit der einzelnen Pixel, indem er aus dem Grauwert histogramm der einzelnen ROIs den Median berechnete. Aus jedem seiner pro Untersuchungstag eingesetzten ROIs wurde danach der mittlere Medianwert gebildet. Pro Ultraschallbild setzte LORBER (1999) drei ROIs mit einer konstanten Pixelanzahl von 256 ein, um eine sichere Analyse von artefaktfrei dargestelltem Endometrium zu ermöglichen. Seine Untersuchungen deuten auf eine zyklussynchrone Texturveränderung des equinen Endometriums hin: vor der Ovulation zeigten die Stuten einen Abfall des mittleren Medians, der niedrigste Wert wurde durchschnittlich 3,27 Tage vor der Ovulation gemessen. Nach diesem Abfall stiegen die Werte bis etwa drei Tage nach der Ovulation an, um dann mehrere Tage annähernd konstant zu bleiben. Während des gesamten Zyklus bestand eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen der Progesteronkonzentration und dem mittleren Median, periovulatorisch zudem eine gute negative Korrelation zwischen der 17- β -Östradiolkonzentration und den Ergebnissen der Texturanalyse.

Im Vergleich seiner Untersuchungen an normalzyklischen Stuten konnte LORBER (1999) bei Endometritis-Stuten keinen präovulatorischen Abfall des mittleren Medians feststellen, zudem war der mittlere Median des Grauerthistogramms signifikant höher als der für ein physiologisches Endometrium ermittelte Wert.

GERTSCH (1997) setzte bei ihren Untersuchungen ein ambulantes Ultraschallgerät älteren Baujahres ein, das ein geringeres Auflösungsvermögen besaß. Sie beurteilte in ihrer Arbeit nicht nur den mittleren Grauwert, sondern auch den mittleren Gradientenbetrag sowie Homogenität und Kontrast als Texturparameter der zweiten Ordnung. Pro Ultraschallbild wurde eine einzige große ROI mit einer variablen Größe zwischen 2000 und 10000 Pixel analysiert. Im Gegensatz zu LORBER (1999) war es GERTSCH (1997) nicht möglich, zyklusabhängige Texturveränderungen des Endometriums darzustellen, noch bestanden Korrelationen zwischen den Echostrukturparametern und der peripheren Steroidhormonkonzentration.

Beim Rind wurde die computergestützte Echostrukturanalyse bisher im Zusammenhang mit zyklischen Veränderungen an Ovarien (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998; TOM et al., 1998) und Uterus (SCHMAUDER, 2003), sowie bei akuten inflammatorischen Prozessen am Endometrium (SCHMAUDER, 2003) beschrieben:

TOM et al. (1998) konnten in einer In-vivo-Studie zyklusabhängige Schwankungen des mittleren Grauwertes an der Follikelwand des Rindes nachweisen. So war der mittlere Grauwert des anovulatorischen, dominanten Follikels der ersten Follikelwelle zwischen Tag 0 und 6, also während der Wachstumsphase des Follikels, hoch, fiel zum 7. Tag deutlich ab und blieb während der gesamten Ruhephase des Follikels bis Tag 12 niedrig. Anschließend stiegen die Werte während der Regressionsphase des Follikels wieder an. Der mittlere Grauwert der Follikelwand des ovulatorischen Follikels zeigte einen ähnlichen Verlauf, allerdings war der Abfall der Werte zwischen dem 7. und 4. Tag vor der Ovulation ausgeprägter. Zur Ovulation hin stiegen die Werte wieder an. Die Autoren bringen den Abfall des mittleren Grauwertes mit einer gesteigerten Vaskularisation der Theca interna der Follikelwand in Verbindung.

In einer weiteren Studie konnten TOM et al. (1998) Schwankungen des mittleren Grauwertes auch am Corpus luteum des zyklischen Rindes nachweisen. Dieser war an Tag 0 und 1 hoch, fiel zum 2. Tag signifikant ab und blieb bis zum 14. Tag auf diesem Niveau. Zwischen Tag 14 und 16 kam es zu einem weiteren Abfall auf Minimalwerte. Nach dem 18. Tag stieg der Parameter wieder deutlich an. Dieser Verlauf stimmt bis auf den deutlichen Abfall des mittleren Grauwertes am Ende des Diöstrus mit den Ergebnissen der In-vitro-Studie von SINGH et al. (1997) überein: hier wurden Untersuchungen am Corpus luteum nach vorhergegangener

Ovariectomie nur an den Tagen 3, 6, 10 und 18 durchgeführt und nicht täglich, wie in den Untersuchungen von TOM et al. (1998). In beiden Arbeiten bestand eine negative Korrelation zwischen dem mittleren Grauwert und der Plasmaprogesteronkonzentration. SINGH et al. (1997) gelang es außerdem, einen engen Zusammenhang zwischen der Graustufenverteilung der Corpora lutea sowie der Morphologie der Lutealzellen und des lutealen Bindegewebes nachzuweisen.

SCHMAUDER (2003) fand mit Hilfe der computergestützten Echostrukturanalyse des sonographischen B-Bildes sowohl zyklische, als auch entzündungsbedingte Strukturveränderungen am Endometrium des Rindes. Pro Ultraschallaufnahme wurden 4 ROIs mit einer Mindestgröße von je 1000 Pixel zur Texturanalyse eingezeichnet. Sie verwendete in ihrer Arbeit den mittleren Grauwert als Parameter der ersten Ordnung, die Homogenität als Parameter der zweiten Ordnung und aus der Gradientenstatistik den mittleren Gradientenbetrag.

Bei allen drei Echostrukturparametern waren zyklusabhängige Verlaufsmuster festzustellen: der mittlere Grauwert war am Tag der Ovulation sehr niedrig und stieg bis Tag 4 deutlich an. Im weiteren Verlauf des Diöstrus blieb der Parameter bis Tag 10 relativ konstant auf hohem Niveau und fiel gegen Ende des Diöstrus wieder tendenziell ab. Im Proöstrus, an den Tagen -4 und -3, war ein signifikanter Abfall des mittleren Grauwertes zu verzeichnen, und der Parameter blieb bis zur Ovulation auf diesem basalen Niveau. Der mittlere Gradientenbetrag zeigte einen annähernd gleichen Verlauf wie der mittlere Grauwert. Die Veränderungen der Homogenität dagegen verliefen entgegengesetzt zu denen des mittleren Grauwertes: diese nahm im Metöstrus, zwischen den Tagen 0 und 2 deutlich ab und blieb auf diesem basalen Niveau bis zum Ende des Diöstrus. Im Proöstrus, ab Tag -4, stieg der Parameter wieder kontinuierlich bis Tag -2 auf Maximalwerte an. Während des Östrus jedoch waren bei der Homogenität, im Gegensatz zu den anderen beiden Echostrukturparametern, signifikante Änderungen zu beobachten: so fielen die Werte in den letzten beiden Tagen vor der Ovulation bereits wieder deutlich ab.

Im Verlauf des gesamten Zyklus bestand eine positive Korrelation zwischen der Plasmaprogesteronkonzentration und dem mittleren Grauwert sowie dem mittleren Gradientenbetrag. Die Homogenität dagegen war negativ mit der Progesteronkonzentration korreliert, ein geringer positiver Zusammenhang bestand mit dem Östrogenspiegel im Plasma. Der mittlere Gradientenbetrag korrelierte im Gegensatz zur Homogenität negativ mit den Östrogenkonzentrationen während des Gesamtzyklus.

Zur Untersuchung von akuten inflammatorischen Prozessen am Endometrium wurde in der Arbeit von SCHMAUDER (2003) eine intrauterine Lotagen®-Infusion durchgeführt. Auch hier

waren innerhalb der ersten 72 Stunden p. inf. charakteristische Veränderungen bei den einzelnen Echostrukturparametern festzustellen: bereits eine Stunde nach der Infusion fielen sowohl der mittlere Grauwert als auch der mittlere Gradientenbetrag deutlich ab, beide erreichten jedoch bereits 12 Stunden p. inf. wieder das ursprüngliche, vor der Infusion gemessene Niveau. Die Homogenität verhielt sich genau umgekehrt. Nach Ansicht der Autorin können diese Veränderungen auf eine entzündungsbedingte Ödematisierung des Endometriums zurückgeführt werden.

Während der Gravidität wurde ein computergesteuertes Bildanalyseverfahren bisher nur beim Europäischen Reh (*Capreolus capreolus*) in der embryonalen Diapause angewendet (HERMES, 1997). Für die Quantifizierung endometrialer Strukturveränderungen wurde eine eindimensionale Analyse der Graustufenverteilung durchgeführt. Die Auswertung der Graustufenanalyse ergab, dass die mittleren Mediane der Grauwertistogramme des Endometriums tragender Tiere im Vergleich zu nicht tragenden in den Monaten August bis Dezember, also während der embryonalen Diapause, ein unterschiedliches Niveau aufwiesen. Dabei war das Endometrium gravider Tiere stets durch einen größeren Anteil dunkler, flüssigkeitsassoziiertes Graustufen gekennzeichnet. Ab dem dritten Monat der embryonalen Diapause war der Unterschied zwischen den mittleren Medianen tragender Tiere und nichttragenden signifikant. Basierend auf der ultrastrukturellen Arbeit von AITKEN et al. (1973), der eine Anreicherung von Sekretvesikeln in Zellen des endometrialen Drüseneithels im letzten Monat der embryonalen Diapause beschreibt, vermutet HERMES (1997), dass die Zunahme des Flüssigkeitsgehaltes des Endometriums bei graviden Tieren auf eine gesteigerte Synthese und Akkumulation von endometrialen Drüsensekret zurückgeführt werden kann. Dadurch ist eine Unterscheidung zwischen graviden und nichtgraviden Tieren vor der Implantation und ohne Darstellung embryonaler Strukturen möglich.

2.5. Bedeutung von Stickstoffmonoxid in der Gravidität

2.5.1. Stickstoffmonoxid - Synthese

Stickstoffmonoxid (NO) wird bei der oxidativen Desaminierung der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin freigesetzt. Dieser Vorgang wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS), unter Beteiligung der Cofaktoren NADPH, Flavin-Mononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Tetrahydrobiopterin (THB), katalysiert (Abb. 2.4) (PALMER et al., 1988; PALMER und MONCADA, 1989; MORRIS und BILLIAR, 1994; KELLY et al., 1996; DIXIT und PARVIZI, 2001).

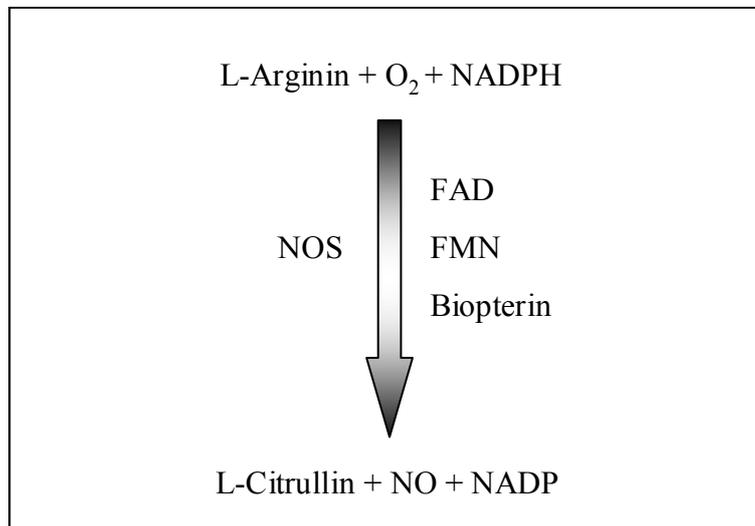


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der NO-Synthese aus L-Arginin (modifiziert nach DIXIT und PARVIZI, 2001)).

Die NO-Synthase existiert in drei Isoformen: die constitutiven, calciumabhängigen Formen (cNOS) kommen vor als endotheliale NOS (eNOS) in Gefäßendothelien und als neuronale NOS (nNOS) in Gehirn und Nervenzellen, beide Formen sorgen für eine kontinuierliche basale NO-Freisetzung. Sie werden durch das Calcium/Calmodulin-System aktiviert, d. h. ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt zu einer Aktivierung beider Enzyme (GRIFFITH und STUEHR, 1995; SNYDER, 1995). Dieser Calciuminflux wird entweder durch endogene, vasoaktive Substanzen ausgelöst, freigesetzt von Nervenzellen (Acetylcholin, Bradykinin, Histamin, Glutamat) und Thrombozyten (ADP, Thrombin, Serotonin), oder aber durch Hypoxie und Faktoren wie körperliche Arbeit und Blutdruck- bzw. Blutflussanstieg, wo aufgrund von ansteigenden Scherkräften auf der Oberfläche von Endothelzellen die Freisetzung von NO

gesteigert wird (FURCHGOTT und VANHOUTTE, 1989; IGNARRO, 1989; MONCADA et al., 1991; MONCADA und HIGGS, 1993; ÄNGGARD, 1994).

Die dritte Isoform ist calciumunabhängig und induzierbar (iNOS). Diese ist in vielen Zelltypen lokalisiert, u. a. in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen (NATHAN, 1992; NUSSLER und BILLIAR, 1993; FÖRSTERMANN et al., 1994). Ihre Bildung wird im Rahmen von Entzündungsprozessen, Gewebsschädigungen oder Infektionen durch bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide) oder verschiedene Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12), Leukotrien B₄, Interferon γ oder Tumornekrosefaktor α (TNF α), ausgelöst (NUSSLER und BILLIAR, 1993; MORRIS und BILLIAR, 1994; CHWALISZ und GARFIELD, 2000). Daneben sind auch Zytokine bekannt, die eine hemmende Wirkung auf die iNOS ausüben: dazu gehören Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10) und der Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β) (BERDEAUX, 1993; NUSSLER und BILLIAR, 1993; DAVIES et al., 1995). Einmal induziert ist die iNOS für Stunden, ja sogar Tage aktiv und produziert NO in 1000-fach größerer Menge als die constitutiven Isoformen (BERDEAUX, 1993; FÖRSTERMANN et al., 1994; BECK et al., 1999).

2.5.2. Wirkungsmechanismus von Stickstoffmonoxid

Eine Vielzahl von Studien belegt, dass Stickstoffmonoxid im Organismus zahlreiche Funktionen erfüllt (MONCADA et al., 1991; MORRIS und BILLIAR, 1994; ROSSELLI et al., 1998; DIXIT und PARVIZI, 2001): so übernimmt es in Gehirn und Nervenzellen die Funktion eines Neurotransmitters, im Gefäßsystem diejenige eines potenten Vasodilatators, darüber hinaus verhindert es die Plättchenaggregation und deren Adhäsion an Endothelien, unterdrückt die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Apoptosevorgängen. Eine große Rolle spielt Stickstoffmonoxid als „Killermolekül“ bei der Bekämpfung von Pathogenen: produziert von aktivierten Zellen der Immunsystems vermittelt es seine zytotoxische Wirkung durch freie Cu⁺⁺- und Fe⁺⁺-Ionen, freigesetzt aus Proteinen der zu eliminierenden Zelle, sowie durch toxische Hydroxylradikale (ÄNGGARD, 1994). So wirkt es als antimikrobielles Agens der Makrophagen bei Infektionen (MONCADA et al., 1991; ROSSELLI et al., 1998) und kann in hoher Konzentration Parasiten, Pilze und Tumorzellen bekämpfen (MONCADA et al., 1991). Es fungiert als Fänger für freie Radikale, wie O₂⁻, und hat damit auch zellschützende Funktion (COOKE und TSAO, 1993).

Eine Reihe von Untersuchungen konnten in den vergangenen Jahren bestätigen, dass NO auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des weiblichen Reproduktionsgeschehens spielt (ROSSELLI et al., 1998). Da in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ob in der frühen Trächtigkeit des Rindes ein Zusammenhang zwischen uteriner Perfusion und dem Stickstoffmonoxid-System besteht, wird im folgendem vor allem auf den vasodilatatorischen Effekt von NO am Uterus eingegangen.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein hochreaktives, kurzlebiges Radikal mit einer Halbwertszeit von weniger als 30 Sekunden, da es einerseits sehr schnell zu Nitrat und Nitrit metabolisiert wird (PALMER et al., 1987), andererseits eine hohe Reaktivität mit Sauerstoff, Superoxiden und anderen Sauerstoffradikalen sowie Oxyhämoproteinen wie Hämoglobin, Myoglobin oder Zytochrome aufweist (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1993; ROSSELLI et al., 1998). Deshalb vermuten STAMLER et al. (1992) und KEANEY et al. (1993), dass die vasodilatatorische Wirkung nicht auf einer direkten Diffusion von NO ins benachbarte Gewebe beruht, sondern es in vivo stabilisiert wird, indem es mit einem Trägermolekül reagiert und dadurch seine Halbwertszeit verlängert, aber seine biologische Aktivität bewahrt. So bildet Stickstoffmonoxid mit den Thiolgruppen der Albumine stabile S-Nitrosylverbindungen, welche letztendlich in die umgebende glatte Muskulatur gelangen. KEANEY et al. (1993) konnten nachweisen, dass derartig gebundenes NO in vivo, als auch in vitro, identische Wirkungen hervorruft wie ungebundenes NO.

Die durchblutungsfördernde Wirkung von Stickstoffmonoxid wird durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) übermittelt (GRUETTER et al., 1981; IGNARRO et al., 1984; BUSSE und MULSCH, 1990): die stabilen NO-Protein-Komplexe heften sich in der glatten Muskulatur an den Hämteil der löslichen Guanylatzyklase und aktivieren so über eine dadurch entstehende Konfigurationsänderung das Enzym (IGNARRO et al., 1986): dieses setzt zyklisches Guanosintriphosphat (cGTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) um, dabei sinkt freies zytosolisches Calcium ab (GRUETTER et al., 1981; IGNARRO et al., 1984; BERDEAUX, 1993). Dadurch werden in der glatten Muskulatur Proteinkinasen aktiviert: durch Dephosphorylierung der leichten Ketten von Myosin kommt es letztendlich zu einer Relaxation der glatten Muskelfasern und dadurch Vasodilatation (Abb. 2.5) (ÄNGGARD, 1994).

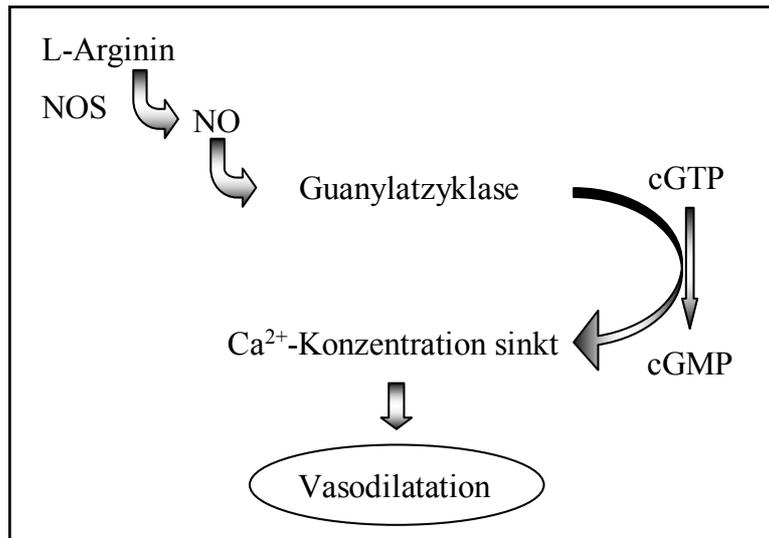


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Beteiligung von NO an der Vasodilatation (modifiziert nach RAGGLE, 1999).

2.5.3. NO als Mediator der Sexualsteroiden während des Zyklus und sein Zusammenhang mit der uterinen Perfusion

In mehreren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass sowohl Östrogene, als auch Progesteron eine vasodilatatorische Wirkung ausüben können und diese Gefäßrelaxation überwiegend durch Stickstoffmonoxid vermittelt wird (CHAN et al., 2001; MOLINARI et al., 2001; RUPNOW et al., 2001). Da das NOS-System bereits im Uterus bei verschiedenen Spezies nachgewiesen wurde (TELFER et al., 1995; TELFER et al., 1997; CAMERON und CAMPBELL, 1998; ROSSELLI et al., 1998; ZHANG et al., 1999) und zudem zyklusabhängige Veränderungen der NOS-Expression aufgedeckt wurden (TSENG et al., 1996; OTA et al., 1998; TSCHUGGUEL et al., 1998; KHORRAM et al., 1999; ROHR, 2003; SCHMAUDER, 2003), vermutet man, dass NO als Vermittler der Sexualsteroiden an der Regulation der uterinen Perfusion während des Zyklus beteiligt sein könnte.

Mittels immunhistochemischer Methoden gelang es KHORRAM et al. (1999), die endotheliale NOS als dominante Form im Uterus der Frau während des Zyklus zu identifizieren: sie konnten das Enzym im Drüsenepithel und in den Gefäßendothelien von Endometrium und Myometrium nachweisen, zusätzlich die induzierbare Form im Drüsenepithel, allerdings nur während der sekretorischen Phase. Aufgrund der Lokalisation der NO-Synthasen vermuteten die Autoren, dass NO an der Regulation der uterinen Drüsenfunktion und Durchblutung beteiligt sein könnte. Neben iNOS zeigte auch die endotheliale NOS ein zyklusabhängiges

Expressionsmuster: im Endometrium erreichte die Expression während der Sekretionsphase, also bei hoher Progesteronkonzentration, ein Maximum, im Myometrium dagegen stieg die eNOS-Expression während der Proliferationsphase, also bei hohen Östrogenkonzentrationen, stark an. Daraus schlossen die Autoren, dass nicht nur Östrogene an der Regulation des NOS-Systems mitwirken, sondern auch Progesteron am Endometrium maßgebend an der NOS-Expression beteiligt sein könnte.

Ein ähnliches zyklusabhängiges NOS-Expressionsmuster wird auch von TSENG et al. (1996), OTA et al. (1998) und TSCHUGGUEL et al. (1998) beschrieben: während von TSENG et al. (1996) und OTA et al. (1998) die größte eNOS Expression im Drüsenepithel in der sekretorischen Phase bestätigt wird, konnten TSCHUGGUEL et al. (1998) die endotheliale Form nur in Gefäßendothelien nachweisen. Die Lokalisation von iNOS im Drüsenepithel wurde bereits von TSCHUGGUEL et al. (1998) während der Sekretionsphase beschrieben, TSENG et al. (1996) fanden die mRNA der iNOS während der Menstruation. TELFER et al. (1997) beschrieben die eNOS und iNOS in gleicher Lokalisation wie KHORRAM et al. (1999), konnten aber kein zyklusabhängiges Expressionsmuster feststellen.

Einen indirekten Hinweis, dass Östradiol an der Regulation der NO-Synthese und -Freisetzung beteiligt ist, liefern die Untersuchungen von ROSSELLI et al. (1994) und CICINELLI et al. (1996), die bei zyklischen Frauen die NO-Konzentration im Serum bzw. Plasma indirekt über die Bestimmung der Nitrit- und Nitrat Spiegel gemessen haben. Während der Follikelphase war ein Anstieg der NO-Metaboliten zu verzeichnen, der mit der Zunahme der peripheren Östrogenkonzentration korrelierte. Während der Lutealphase fielen die Nitrit/Nitrat-Werte wieder ab, demnach folgerten die Autoren, dass Progesteron einen gegenteiligen Effekt auf die NO-Produktion oder -Freisetzung ausübt.

BOLLWEIN et al. (2002) und ROHR (2003) untersuchten bei der Stute, ob Zusammenhänge zwischen dem zyklusabhängigen Blutflussmuster (BOLLWEIN et al., 1998; MAYER, 1999), der Konzentration der Steroidhormone und der mRNA-Expression der eNOS und iNOS im Endometrium bestehen. Die mRNA-Konzentration der eNOS unterlag deutlichen zyklusabhängigen Schwankungen, mit hohen Konzentrationen an Tag 5 und in der Rosse und geringen Gehalten an den Tagen 0, 1, 11 und 15. Die Expression der iNOS zeigte dagegen weniger ausgeprägte Schwankungen, aber tendenziell einen ähnlichen Verlauf wie bei der endothelialen Form. Dieses biphasische Verlaufsmuster ähnelte auffällig demjenigen des uterinen Blutflusses: so war zwischen der eNOS-Expression und der uterinen Perfusion eine positive Korrelation nachzuweisen. Dagegen bestanden keine Korrelationen zwischen der

Konzentration der Steroidhormone und der mRNA-Expression der eNOS bzw. iNOS. Da die NO-Synthasen allerdings an den Tagen am stärksten exprimiert waren, an denen die höchsten Steroidhormonkonzentrationen gemessen wurden, nämlich in der Rosse mit maximaler Östrogenkonzentration, und an Tag 5 des Diöstrus mit maximaler Progesteronkonzentration, vermutete ROHR (2003) dennoch eine Beteiligung der Steroidhormone an der Steuerung der NOS-Expression. Demnach folgern BOLLWEIN et al. (2002) und ROHR (2003), dass vor allem eNOS eine zentrale Bedeutung in der Regulation der genitalen Durchblutung während des Zyklus der Stute zukommt.

In der Arbeit von SCHMAUDER (2003) wurde untersucht, ob beim Rind während des Zyklus Zusammenhänge zwischen der uterinen Blutzirkulation, der Steroidhormonkonzentration und dem NO-System bestehen. Erstmals konnte im Endometrium des Rindes die mRNA der endothelialen als auch der induzierbaren Form mittels „real-time“ PCR quantifiziert und nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Pferd (ROHR, 2003) folgte die mRNA-Expression der eNOS keinem einheitlichen zyklischen Muster - es war somit kein Zusammenhang zwischen endometrialer eNOS und uteriner Perfusion nachvollziehbar. Vielmehr scheint beim Rind die induzierbare NOS das entscheidende Enzym für die Durchblutung zu sein: zwischen der mRNA-Expression der iNOS, dem uterinen Blutfluss und der Plasmaöstrogenkonzentration war ein tendenziell ähnlicher Verlauf festzustellen. Deshalb vermutet SCHMAUDER (2003), dass beim Rind die endometriale iNOS als Mediator bei der vasodilatatorischen Wirkung der Östrogene fungiert. Die hohe Expression von iNOS während der Brunst und Ovulation bringt die Autorin zusätzlich mit einer antibakteriellen Wirkung der induzierbaren Form in Zusammenhang (NUSSLER und BILLIAR, 1993; MORRIS und BILLIAR, 1994), da in diesem Zyklusstadium eine erhöhte Abwehrbereitschaft des Uterus vorliegt. Es bestehen jedoch auch Hinweise, dass NO unabhängig von Östrogenen über seine vasodilatatorische Wirkung die uterine Perfusion steigern kann: so war zwischen dem ersten und dritten Tag nach der Ovulation ein fast paralleler Anstieg des uterinen Blutflusses und der iNOS-mRNA zu verzeichnen, wohingegen in diesem Zeitraum nur geringgradige Schwankungen der Östrogenkonzentration auftraten.

Die Funktion von Stickstoffmonoxid als Vermittler der vasodilatatorischen Wirkung von Östrogenen wurde auch beim Schaf bereits in mehreren Studien beschrieben:

VAN BUREN et al. (1992) konnten bei ovariektomierten Schafen eine durch 17- β -Östradiol hervorgerufene Steigerung der uterinen Perfusion durch L-Nitroarginin-Methyl-Ester (L-NAME), einen NOS-Inhibitor, dosisabhängig um bis zu $59\% \pm 6\%$ reduzieren. Die Autoren

vermuten deshalb, dass NO als Mediator bei der vasodilatatorischen Wirkung von Östrogenen fungiert, möglicherweise aber auch noch andere Faktoren bei der Östrogen-vermittelten Gefäßrelaxation beteiligt sind.

FIGUEROA und MASSMANN (1995) konnten im Uterus von nichtgraviden, ovariectomierten Schafen NO-Synthasen sowohl im Endo-, als auch Myometrium nachweisen und durch dreitägige, exogene Zufuhr von Östrogenen die calciumabhängige NOS steigern, allerdings nur im Myometrium. Diese Ergebnisse werden teilweise bestätigt durch die Arbeit von ZHANG et al. (1999): im Endo- und Myometrium sowie in den Karunkeln konnten die mRNA als auch das Protein der nNOS und eNOS nachgewiesen werden, die induzierbare Form fehlte vollständig. Durch intravenöse Applikation von 17- β -Östradiol konnte die Expression der nNOS nach 5 bzw. 8 Tagen in Myometrium und Karunkeln gesteigert werden, die der endothelialen Form nach 5 bis 8 Tagen außer im Myometrium und den Karunkeln auch im Endometrium. Die Autoren vermuten, dass die Expression der neuronalen und endothelialen NO-Synthase einer unterschiedlichen Östrogen-vermittelten Regulation unterliegen und deshalb im Uterus produziertes NO mehrere physiologische Aufgaben zu erfüllen hat: neben der Regulation des uterinen Blutflusses in Endo- und Myometrium könnte Stickstoffmonoxid im Myometrium zusätzlich am Glucosestoffwechsel und der Steuerung der Kontraktilität beteiligt sein.

In den Studien von ROSENFELD et al. (1996) wurden bei nichtgraviden, ovariectomierten Schafen die Ergebnisse von VAN BUREN et al. (1992) bestätigt: auch hier konnte die Östrogen-vermittelte Steigerung des uterinen Blutflusses durch den NOS-Inhibitor L-NAME dosisabhängig um bis zu etwa 70% gedrosselt werden. Zusätzlich wurde die NO-induzierte, uterine cGMP-Synthese in Abhängigkeit von der Östrogen- und L-NAME-Applikation untersucht: Östradiol-17- β bewirkte einen Anstieg der cGMP-Bildung, L-NAME dagegen eine vollständige Hemmung der Synthese. Gleiche Versuche wurden bei graviden Schafen zwischen dem 120. und 139. Trächtigkeitstag durchgeführt: während Östradiol-17- β sowohl den uterinen Blutfluss, als auch die cGMP-Synthese gleichermaßen steigerte, konnte L-NAME die uterinen cGMP-Bildung um 66% drosseln, nicht aber die uterine Perfusion. Deshalb vermuten die Autoren, dass außer NO auch noch andere Mechanismen an einer Östrogen-vermittelten Vasodilatation am Uterus beteiligt sein können, dies wird besonders deutlich während der Gravidität.

Versuche an ovariectomierten Ratten zeigten, dass auch bei dieser Spezies 17- β -Östradiol den endometrialen Blutfluss deutlich steigern kann, allerdings ohne die Expression oder Aktivität der NO-Synthasen zu beeinflussen (ZHANG et al., 1997). Auch hier vermuten die

Autoren, dass an der östrogeninduzierten Blutflusssteigerung am Uterus andere Mechanismen außer NO beteiligt sind.

YALLAMPALLI und DONG (2000) untersuchten bei ovariectomierten Ratten die Protein- und mRNA-Expression der uterinen eNOS und iNOS mittels Western Blot und RT-PCR. Sie konnten einerseits belegen, dass die exogene Zufuhr von 17- β -Östradiol die mRNA-Expression der induzierbaren Form unterdrückt, andererseits jedoch die endotheliale NOS in ihrer Expression deutlich gesteigert wird. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie von OGANDO et al. (2003): hier wurde ebenfalls der Einfluss der Sexualsteroiden auf die NOS-Protein-Expression in den Uteri von ovariectomierten Ratten mittels Western Blot untersucht. Demnach steigert Progesteron die eNOS- und iNOS-Protein-Expression gleichermaßen, wohingegen 17- β -Östradiol nur die Expression der induzierbaren Form erhöht.

2.5.4. Vorkommen und Bedeutung von Stickstoffmonoxid im graviden Uterus

In mehreren Studien mit Ratten und Kaninchen konnte nachgewiesen werden, dass die uterine NO-Produktion im Verlauf einer Gravidität gesteigert wird und erst wieder zur Geburt hin abfällt (NATUZZI et al., 1993; SLADEK et al., 1993; YALLAMPALLI et al., 1994; YALLAMPALLI et al., 1994; BUHIMSCHI et al., 1996; BUHIMSCHI et al., 2000). Mittels der Immunhistochemie konnten sowohl die induzierbare Form der NO-Synthase, als auch die endotheliale NOS im Uterus trächtiger Ratten nachgewiesen werden (BUHIMSCHI et al., 1996; DONG et al., 1996; RIEMER et al., 1997; FARINA et al., 2001). Die neuronale NO-Synthase konnte in diesen Studien nicht entdeckt werden, obwohl sie im Uterus von zyklischen Tieren von DONG et al. (1996) und RIEMER et al. (1997) beschrieben wird. Dagegen konnten ALI et al. (1997) mittels RT-PCR nicht nur die mRNA der eNOS und iNOS im trächtigen Uterus der Ratte nachweisen, sondern auch die der neuronalen Form. Im Vergleich der mRNA-Konzentration der drei NO-Synthasen im Verlauf der Gravidität fiel den Autoren auf, dass v.a. die Expression der iNOS stark gesteigert wird und gegen Ende der Trächtigkeit abrupt abfällt. Dieses Muster wird in Studien von BUHIMSCHI et al. (1996), DONG et al. (1996), RIEMER et al. (1997), DONG et al. (1998) und FARINA et al. (2001) bestätigt. Die Expression der eNOS (DONG et al., 1996; ALI et al., 1997) und nNOS (ALI et al., 1997) war dagegen kaum Schwankungen unterworfen und durchwegs niedrig.

Durch histochemische Methoden konnte die NOS-Aktivität in Untersuchungen von NATUZZI et al. (1993) und YALLAMPALLI et al. (1994) in allen Kompartimenten des Uterus, nämlich Endometrium, Myometrium, Nerven und Blutgefäße, nachgewiesen werden. Eine

Bestimmung der einzelnen Isoformen wurde von diesen Autoren jedoch nicht durchgeführt. RIEMER et al. (1997) gelang es mit Hilfe der Immunhistochemie, eine genaue Lokalisation der eNOS und iNOS in Uterus der Ratte anzugeben: die endotheliale Form konnte sowohl bei graviden, als auch bei zyklischen Tieren in Gefäßendothelien des gesamten Uterus entdeckt werden, die iNOS fand sich bei trächtigen Tieren in der glatten Muskulatur der Gefäße sowie im gesamten Myometrium, außerdem in den epithelialen Zellschichten der Drüsen und Decidua, dem spezialisierten, gut durchbluteten Anteil des endometrialen Stromas, welches den Embryo umgibt. Im nichtgraviden Uterus dagegen fehlte die induzierbare Form im Myometrium vollständig. DONG et al. (1998) führten eine Lokalisation der induzierbaren Form in graviden Rattenuteri mittels der Immunfluoreszenz durch und konnten die iNOS in den Decidua als auch zwischen den einzelnen Muskelbündeln des Myometriums nachweisen. Histologisch bezogen DONG et al. (1998) diese positive Fluoreszenz auf Makrophagen und Bindegewebszellen.

Aufgrund des Expressionsmusters des NOS-Systems (NATUZZI et al., 1993; SLADEK et al., 1993; BUHIMSCHI et al., 1996; DONG et al., 1996; ALI et al., 1997; DONG et al., 1998; FARINA et al., 2001) und dem graviditätsbedingten Auftreten der induzierbaren Form im Myometrium (RIEMER et al., 1997) vermuten die genannten Autoren, dass Stickstoffmonoxid eine bedeutende Rolle spielt, um Kontraktionen des Uterus während einer Trächtigkeit zu unterdrücken. So bewirken *in vitro* nicht nur gasförmiges NO (YALLAMPALLI et al., 1993), sondern auch L-Arginin und NO-Donoren (IZUMI et al., 1993; YALLAMPALLI et al., 1993; YALLAMPALLI et al., 1994; BUHIMSCHI et al., 1995) eine dosisabhängige Relaxation des graviden Uterus. Die Zufuhr eines NO-Inhibitors dagegen führt zu einer erhöhten Kontraktionsbereitschaft des Myometriums (YALLAMPALLI et al., 1994; BUHIMSCHI et al., 1995). Der Abfall der iNOS-mRNA-Konzentration im Uterus zur Geburt hin könnte damit eng mit dem Beginn der Wehentätigkeit verbunden sein (ALI et al., 1997; DONG et al., 1998). Auch bei der Frau konnte durch Immunhistochemie und Western Blot nachgewiesen werden, dass im Verlauf der Schwangerschaft nicht nur die myometriale Expression der iNOS (BANSAL et al., 1997), sondern auch die der cNOS (NORMAN et al., 1999) gesteigert wird und erst wieder zur Geburt hin abfällt. In der Humanmedizin wird Nitroglycerin, ein NO-Donor, der intravenös, transdermal oder sublingual appliziert werden kann, bereits seit einigen Jahren erfolgreich zur Tokolyse eingesetzt (PENG et al., 1989; DESIMONE et al., 1990; BAYHI et al., 1992; CHAN et al., 1995; AXEMO et al., 1998; SMITH und BRIEN, 1998).

An der Regulation der iNOS-Systems im Uterus der Ratte sind im Verlauf der Gravidität sowohl Steroidhormone, als auch Prostaglandine beteiligt (DONG et al., 1998): exogene Zufuhr

von Progesteron steigert die uterine iNOS-Gen-Expression um mehr als das Dreifache. Dagegen führt die Verabreichung eines Antiprogestins zu einem deutlichen Abfall der mRNA- und Protein-Konzentration der induzierbaren NOS im Uterus der Ratte (DONG et al., 1996; ALI et al., 1997; DONG et al., 1998). Östradiol-17- β scheint die iNOS-mRNA-Expression im trächtigen Uterus gleichermaßen zu unterdrücken, da Antiöstrogene die Expression der iNOS deutlich steigern (DONG et al., 1998). Ähnliches wird in einer Studie von YALLAMPALLI et al. (1994) beschrieben: die uterine Nitritproduktion und cGMP-Konzentration war bei Ratten, die mit Östradiol oder Östradiol + Progesteron behandelt wurden, deutlich niedriger als bei Tieren, denen entweder nur Progesteron oder der Trägerstoff allein zugeführt wurde. So vermuten DONG et al. (1998), dass der hohe Progesteronspiegel während der Gravidität die iNOS-Gen-Expression und dadurch NO-Produktion steigert, dagegen gegen Ende der Trächtigkeit ein Abfall des Progesterons mit einem gleichzeitigen Anstieg von Östradiol-17- β die iNOS-mRNA-Expression drosselt. Wie bereits erwähnt, besteht darüber hinaus auch eine enge Beziehung zwischen dem NOS-System und endogenen Prostaglandinen wie PGE₂ und PGF_{2 α} :

Stickstoffmonoxid ist in der Lage, die enzymatische Aktivität der Cyclooxygenase (COX) zu steigern, indem es an dem Eisen-Häm-Kern des Enzyms bindet. Demnach findet in allen Organen, wo sowohl das NOS-, als auch das COX-System vorhanden ist, eine NO-vermittelte Steigerung der Prostaglandinproduktion statt (SALVEMINI et al., 1993). Im Uterus der Ratte konnten derartige Beziehungen zwischen NO und uteriner PGE- bzw. PGF_{2 α} -Produktion bereits während der Implantation beschrieben werden (NOVARO et al., 1996). Von der Graviditätsmitte an stimuliert NO die uterine PG-Produktion dosisabhängig, eine Inhibition der NO-Synthese hat einen Abfall der PG-Konzentration zur Folge (DONG und YALLAMPALLI, 1996). Umgekehrt verhindern Prostaglandine in trächtigen Rattenuteri ein Zytokine-induziertes Ansteigen der NO-Produktion (DONG und YALLAMPALLI, 1996). Demzufolge schließen die Autoren, dass der Anstieg der PG-Produktion gegen Ende jeder Trächtigkeit die uterine NO-Produktion drosselt und die Kontraktionsbereitschaft des Uterus steigt.

Die Rolle von Stickstoffmonoxid während der Implantation wurde bisher nur bei wenigen Tierarten beschrieben:

Durch immunhistologische Methoden konnten SAXENA et al. (2000) bei Mäusen während der Prä- und Periimplantationsphase eine starke östrogeninduzierte iNOS-Expression in den apikalen Zellen des Endometriums nachweisen, die sich durch zusätzliche Progesteronapplikation steigern ließ. Die Autoren vermuten eine Beteiligung von NO an vasodilatatorischen und angiogenetischen Prozessen während der Implantation.

In einer Studie von PURCELL et al. (1999) konnten alle drei NOS Isoformen durch Western Blot und Immunhistochemie in trächtigen Mäuseuteri während der Implantationsphase quantifiziert und lokalisiert werden. An der Implantationsstelle wurde zwischen Tag 6 und 8 die Expression der iNOS deutlich gesteigert, gleichzeitig konnte sie in den Decidua und um myometriale Blutgefäße lokalisiert werden. Die endotheliale Form zeigte ein ähnliches Expressionsprofil, erreichte aber schon 1 bis 2 Tage früher ein Maximum. Während der Implantation zeigte eNOS ein auffälliges Expressionsmuster um die direkt an den Embryo angrenzenden Gefäße der Decidua. Zwischen den Implantationsstellen war die Expression beider NO-Synthasen deutlich geringer. Die neuronale NO-Synthase konnte in Meso- und Myometrium lokalisiert werden und zeigte kaum Schwankungen. Die Autoren vermuten eine aktive Beteiligung von NO an den Wechselwirkungen zwischen Trophoblast und Uterus während der Implantation: neben einer Steigerung der Angiogenese und Vasodilatation könnte Stickstoffmonoxid auch an einer Unterdrückung der gegen den Embryo gerichteten Immunantwort beteiligt sein und darüber hinaus durch seine relaxierende Wirkung am Uterus und Remodellierung der extrazellulären Matrix dem Embryo ein Verbindungsaufbau mit dem maternalem Gewebe ermöglichen.

In der gleichen Studie wurden die Auswirkungen von L-NAME (L-Nitroarginin-methylester), einem NOS-Inhibitor, überprüft: durch intraperitoneale Applikation des Inhibitors zwischen Tag 3 und 6 wurde die Trächtigkeitsrate dosisabhängig gesenkt. Bei einigen Tieren, bei denen die Trächtigkeit aufrechterhalten wurde, traten Anomalien an Uterus, Placenta und Neugeborenen auf.

Während der Implantation der Ratte quantifizierten NOVARO et al. (1996) die NOS-Enzym-Aktivität durch den Umwandlungsgrad von ^{14}C -Arginin zu ^{14}C -Citrullin. Die uterine NOS-Aktivität stieg an Tag 4, also während der Präimplantation, an und erreichte ein Maximum an Tag 5, zum Zeitpunkt der Implantation. Durch Applikation von Dexamethason konnte die NOS-Aktivität zwar an Tag 4, nicht aber an Tag 5 gesenkt werden, woraus die Autoren folgerten, dass während der frühen Trächtigkeit mindestens zwei verschiedene NO-Synthasen im Uterus der Ratte vorhanden sind.

In einer nachfolgenden Studie konnten NOVARO et al. (1997) den Anstieg der NOS-Aktivität am 5. Tag der Gravidität bestätigen. Zusätzlich wurde zwischen den Ca^{2+} -abhängigen (cNOS) und der Ca^{2+} -unabhängigen Isoform (iNOS) unterschieden: während die constitutive Form bereits einen Tag vor der Implantation anstieg, erreichte die iNOS ihr Maximum am Abend von Tag 5, zu Beginn der Implantation. Durch die exogene Zufuhr von Tamoxifen, einen Östradiol-Rezeptor-Antagonisten, an den Tagen 2 und 3 dagegen, konnte der Anstieg der

Enzymaktivität der eNOS, und im stärkeren Maß der der iNOS verhindert werden. Demzufolge schließen die Autoren, dass Östradiol v. a. die Expression der iNOS während der Implantation beeinflusst. Zusätzlich wurde in dieser Studie die Folge von L-NAME überprüft: durch intraluminale Injektion wurde die Anzahl erfolgreich implantierter Embryonen um 50 % gesenkt. Daraus wird nach Ansicht der Autoren deutlich, dass NO als wichtiger Regulator der Implantation nicht nur die endometriale Gefäßpermeabilität über zyklisches GMP, oder indirekt über Modulation der uterinen Prostaglandin-Produktion (NOVARO et al., 1996) beeinflusst, sondern auch an apoptotischen Vorgängen und am Umbau der extrazellulären Matrix während dieser Phase beteiligt sein könnte.

BISWAS et al. (1998) untersuchten ebenfalls die Auswirkungen des NOS-Inhibitors L-NAME an trächtigen Ratten: Folgen der intraluminalen Applikation des Inhibitors am 3. Graviditätstag waren eine Abschwächung des charakteristischen Anstiegs der uterinen Permeabilität in der Präimplantationsphase, Entwicklung von kleinen, zurückgebliebenen Embryonen und Verhinderung der Implantation.

PURCELL et al. (1999) beschrieben die Lokalisation der NO-Synthasen während der Implantation im Endometrium des Pavians. Eine hohe iNOS- und eNOS-Konzentration fand sich in dem die Spiralarteriolen umgebenden Bindegewebe des Endometriums, woraus die Autoren schließen, dass Stickstoffmonoxid während der Invasion des Trophoblasten vasodilatatorische Funktion besitzt.

CHWALISZ und GARFIELD (2000) vermuten, dass der Anstieg der NO-Synthasen an der Implantationstelle durch Signale embryonalen Ursprungs gesteuert werden. So produziert der Embryo während der Prä- und Periimplantationsphase viele Zytokine (MARTAL et al., 1997), von denen bekannt ist, dass sie die Expression der iNOS induzieren (siehe 2.5.1.).

In der Frühgravidität der Stute quantifizierte ROHR (2003) die endometriale Expression der eNOS und iNOS mittels RT-PCR, um zu überprüfen, ob Zusammenhänge zwischen frühgravidem Blutflussmuster (MAYER, 1999) und der Konzentration der Steroidhormone bestehen. Am 15. Trächtigkeitstag war bei hohem Plasmaprogesteronspiegel und einer gesteigerten uterinen Perfusion die Konzentration der eNOS-mRNA im Endometrium relativ gering. Dagegen konnte eine große Menge an iNOS-mRNA im Endometriumbiopat nachgewiesen werden. Die Autorin nimmt deshalb an, dass auch in der Trächtigkeit eine Abhängigkeit zwischen dem NOS-System und der uterinen Durchblutung besteht, allerdings scheint hier die iNOS, und nicht wie im Zyklus die eNOS (siehe 2.5.3.), die entscheidende Rolle

zu spielen. Die durch iNOS hervorgerufene Blutflusssteigerung könnte möglicherweise durch ein Signal des Embryos induziert werden.

Bei der Frau konnten TELFER et al. (1997) während des ersten Trimesters der Schwangerschaft und nach exogener Zufuhr von synthetischem Progesteron eine hohe iNOS-Immunreaktivität in endometrialen Stromazellen nachweisen, wohingegen während des Zyklus weder die induzierbare, noch die endotheliale NOS im Stroma vorhanden war. Darüber hinaus besteht beim Menschen in frühgravidem Stromazellen eine erhöhte Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD), ein Enzym, das die Wirkung von Stickstoffmonoxid verstärkt, indem es der Inaktivierung von NO durch Superoxide entgegenwirkt (SUGINO et al., 1996).

YOSHIKI et al. (2000) konnten die Ergebnisse von TELFER et al. (1997) bestätigen. Sie wiesen durch Northern Blot und Immunhistochemie sowohl die mRNA als auch das Protein der iNOS in endometrialen Stromazellen während des ersten Trimesters der Frau nach, nicht jedoch während des Zyklus. Die Autoren vermuten, dass die hohe iNOS-Expression durch verschiedene Zytokine beeinflusst wird, welche im humanen Endometrium während der frühen Schwangerschaft produziert werden (SAITO et al., 1993). Besonders auffallend war darüber hinaus eine hohe iNOS-Expression in Zellen des Syncytio- und Cytotrophoblasten. In vergleichenden Studien zur iNOS-Expression im zweiten (BAYLIS et al., 1999) und letzten Trimester (THOMSON et al., 1997) der Schwangerschaft, zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme der iNOS-Expression im Cytotrophoblast. Demnach deutet das Vorhandensein großer Mengen iNOS am feto-maternalem Berührungspunkt darauf hin, dass iNOS eine wichtige Rolle während der Implantation und Entwicklung des Embryos spielt, vermutlich durch Regulation des uterinen Blutflusses und Immunsuppression (YOSHIKI et al., 2000).

In einer Studie von URBAN et al. (2001) konnte iNOS während der frühen Schwangerschaft ebenfalls im endometrialen Stroma, als auch im Trophoblasten lokalisiert werden. Die Autoren konnten außerdem belegen, dass bei physiologisch verlaufender Frühgravidität wesentlich mehr NO produziert wird als bei spontanen Aborten: demnach ist während der Implantationsphase eine höhere iNOS-Expression vorhanden als bei inflammatorischen Prozessen.

Neben der blutflusssteigernden Wirkung von NO vermuten OKADA et al. (2001) auch eine direkte Beteiligung von Stickstoffmonoxid an morphologischen Veränderungen des Endometriums während der Implantationsphase: Ausgangssituation ist die Expression von iNOS vom gesamten endometrialen Gewebe mit der Produktion von NO in großen Mengen. Dieses führt neben Vasodilatation zur Interleukin-8 (IL-8) Produktion durch Mastzellen. IL-8 bewirkt eine Migration von neutrophilen Granulozyten ins endometriale Stroma wo Elastase, aus

intrazellulären Granulas sezerniert, zum Abbau von Typ III-Kollagen führt. Die dadurch entstandenen Defekte im Stroma werden überbrückt durch Anlagerung von Hyaluronsäure an CD 44, ein Proteoglykan, welches auf der Oberfläche von Stromazellen exprimiert wird. Hyaluronsäure hält intermolekular Wasser zurück - eine ödematöse Matrix ist entstanden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Tiere

Die Untersuchungen wurden an 5 nichtlaktierenden uniparen Kühen (A – E) der Rasse Deutsches Fleckvieh während jeweils drei Frühgraviditäten im Abstand von zwei bis dreizehn Monaten durchgeführt. Die Tiere waren zwischen 4 und 6 Jahre alt. Sie wurden in Anbindehaltung mit Stroheinstreu gehalten und bekamen Heu, Kraftfutter und Mineralfutter. Während des Untersuchungszeitraums zwischen September 2002 und Juli 2004 waren die Kühe klinisch gesund.

3.2. Versuchsanordnung

Vor Beginn der Untersuchungen in drei aufeinanderfolgenden Frühgraviditäten wurde einmalig bei allen Tieren im Östrus eine zytologische und bakteriologische Untersuchung einer Uterustupferprobe durchgeführt. Ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer Entzündung, wurde mit den Untersuchungen begonnen.

Die Kühe wurden im Östrus mit 0,5 ml Nativsperma eines fertilen Bullen inseminiert. Die Ejakulate wiesen einen Anteil von mindestens 70 % vorwärtsbeweglichen Spermien und eine Konzentration von mehr als 1 Mio. Spermien / μl auf. Unmittelbar nach der Insemination wurde für die Ovulationseinleitung ein GnRH-Analogon intramuskulär injiziert (Receptal®, Fa. Intervet GmbH, Unterschleißheim/Deutschland, Wirkstoff: Buserelinacetat, Dosierung: 20 μg /Tier). Bei erfolgreicher Besamung wurde diese Prozedur nach Trächtigkeitsabbruch (siehe unten) wiederholt.

Während der ersten zwei Frühgraviditäten wurden bei allen Kühen (A - E) sonographische Aufzeichnungen im B-Mode zur computergestützten Echostrukturanalyse des Endometriums nach folgendem zeitlichen Schema durchgeführt: Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 (Tag 0 = Tag der Ovulation). Parallel dazu erfolgten farbdopplersonographische Untersuchungen der A. uterina für die Bestimmung des uterinen Blutflusses an den Tagen 9, 11, 13, 15, 17 und 19. Alle Untersuchungen beinhalteten die Gewinnung einer Blutprobe zur Bestimmung der Plasmalogesteron- und -östrogenkonzentration. Die Trächtigkeit wurde bei jeder dieser 10

Graviditäten sonographisch an Tag 25 durch Nachweis der embryonalen Herzaktion bestätigt. Am gleichen Tag wurde die Trächtigkeit durch Verabreichung eines synthetischen Prostaglandinderivats (Genestran®, Fa. Albrecht GmbH + Co. KG, Aulendorf/Deutschland, Wirkstoff: (R)-(+)-Cloprostenol, Dosierung: 150 µg/Tier intramuskulär) abgebrochen.

An Tag 13 der dritten Frühgravidität wurde eine Uterusbiopsieprobe für die Bestimmung der endometrialen Expression der Stickstoffmonoxid-Synthasen entnommen. Bis zur Entnahme je eines Endometriumbiopsats pro Uterushorn wurden sonographische Untersuchungen im B- und Doppler-Modus, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach Einleitung der Luteolyse am Tag der Probenentnahme (Genestran®, Fa. Albrecht GmbH + Co. KG, Aulendorf/Deutschland, Wirkstoff: (R)-(+)-Cloprostenol, Dosierung: 150 µg/Tier intramuskulär) wurde an Tag 13 des darauffolgenden Diöstrus ein weiteres Endometriumbiopsat aus dem ipsilateral zum Corpus luteum gelegenen Uterushorn gewonnen.

Während der gesamten Untersuchungsreihe wurden in vier Fällen die Kühe nach der Besamung nicht trächtig und kamen nach 9, 15, 21 und 22 Tagen wieder in Brunst, in zwei Fällen entwickelten die Kühe innerhalb von 10 bzw. 14 Tagen post inseminationem eine Endometritis. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden nicht berücksichtigt. Bis zu einer erneuten Besamung wurde eine physiologisch ablaufende Brunst abgewartet. Waren in dem darauffolgenden Zyklus sonographisch keine pathologischen Veränderungen an Uterus oder Ovarien feststellbar, wurden die Kühe im nächsten Östrus erneut besamt.

3.3. Sonographische Untersuchungen

3.3.1. Verwendete Geräte und Sonden

Die sonographischen und dopplersonographischen Untersuchungen wurden mit dem Farbdopplersonograph SSH-140 A der Firma Toshiba (Tokyo/Japan) durchgeführt. Als Sonde wurde eine 7.0 MHz-Mikrokonvexsonde eingesetzt. Die Dokumentation der farbdopplersonographischen Untersuchungen erfolgte auf einem Videoband mittels SVHS-Videorekorder (Panasonic Ag 7350), der an das Gerät angeschlossen war.

Zur Digitalisierung der B-Bild-Aufnahmen vom Uterus diente ein direkt mit dem Farbdopplersonographen verbundenes MaviCap der Firma Sony (Tokyo/Japan).

3.3.2. B-Bild-Sonographie und Auswertung der sonographischen B-Bilder mittels computergestützter Echostrukturanalyse

Zur computergestützten Echostrukturanalyse des Endometriums wurden während jeder Untersuchung 4 B-Bilder vom Uterus mit einem festinstallierten Programm stets in identischer Einstellung angefertigt, und zwar von beiden Uterushörnern je ein Querschnitt im Bereich der Curvatura major und ein Längsschnitt kurz vor der Curvatura major. Die B-Bilder des Uterus wurden dadurch nicht direkt im Bereich des Embryos aufgenommen.

Die im „JPG“-Format digitalisierten Ultraschallbilder wurden zur Auswertung auf einem Computer mit Hilfe einer Graphik-Software (Adobe Photoshop 5.0, Fa. Adobe Systems Inc., San Jose/U.S.A.) übertragen und unbearbeitet im „BMP“-Format abgespeichert. Die computergestützte Echostrukturanalyse erfolgte mit dem Softwareprogramm MaZda (Institute of Electronics, Technical University of Lodz/Polen). Nach Identifizierung von Endometrium und Myometrium wurde der zu analysierende Bereich (ROI = Region of interest) markiert: an den Querschnitten das gesamte Endometrium (Abb. 3.1), an den Längsschnitten nur ein Anteil des sondenfern dargestellten Endometriums (Abb.3.2). Myometrium, Uteruslumen und Artefakte wurden ausgeschlossen. Die ROI waren dadurch unterschiedlich groß.

Pro Untersuchungstag wurden somit 4 ROIs je Tier analysiert. Zur weiteren Auswertung wurden die Mittelwerte aus je zwei ROIs pro Uterushorn herangezogen.

Als Echostrukturparameter wurden der mittlere Grauwert als Parameter des eindimensionalen Histogramms der ersten Ordnung, sowie die Homogenität und der Kontrast als Vertreter der Co-occurrence-Matrizen der zweiten Ordnung verwendet.

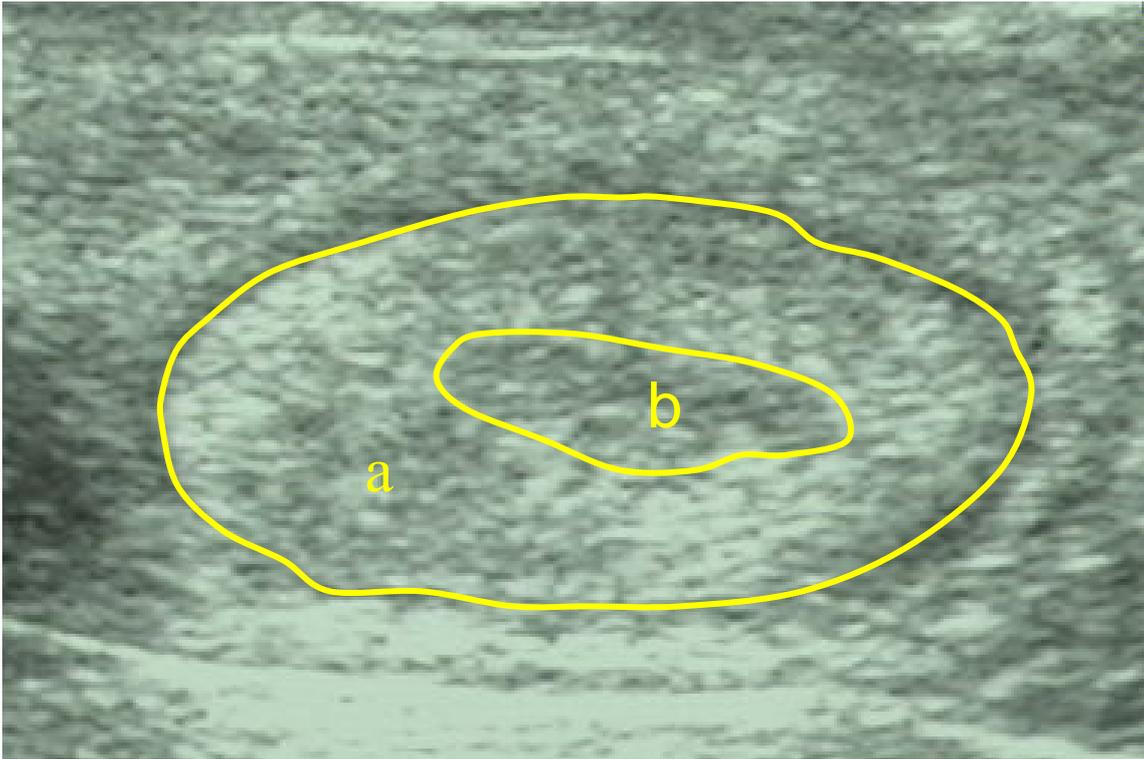


Abb. 3.1: Uterusquerschnitt mit: a = Region of interest (= ROI)
b = Uteruslumen, von der Analyse ausgeschlossen

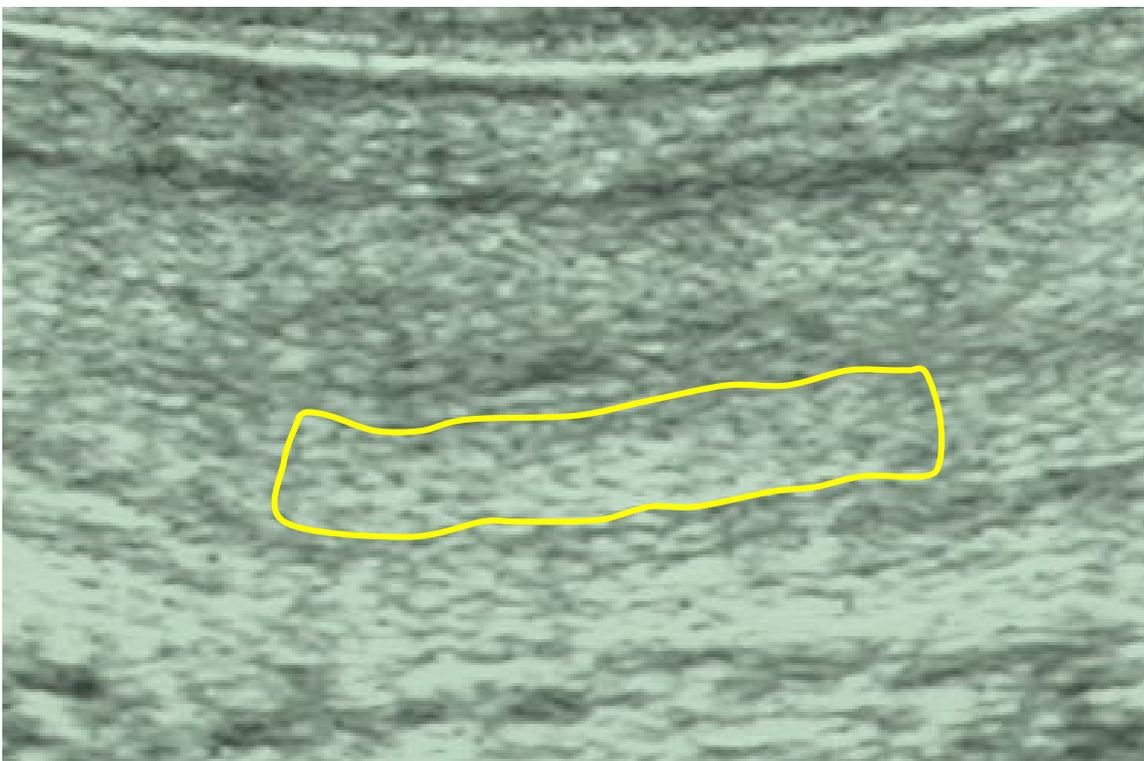


Abb. 3.2: Region of interest (= ROI) an einem Uteruslängsschnitt.

3.3.3. Dopplersonographische Untersuchungen

Die A. uterina der rechten und linken Seite wurde nach dem von BAUMGARTNER (1998) beschriebenen Verfahren transrektal dargestellt. Die dopplersonographischen Aufnahmen wurden mit einem Hochpassfilter von 50 Hz im sogenannten pulsed-wave-Modus durchgeführt.

3.3.4. Auswertung der Dopplerwellen

Die auf Videoband aufgezeichneten Dopplerwellen wurden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms „NIH-Image“ (Version 1.60, U.S. National Institute of Health, 1996) an einem Macintosh-Computer ausgewertet. Dabei wurden je zwei konsekutive, möglichst ähnliche Pulswellen herangezogen und daraus die systolische (S), die enddiastolische (D), die minimale (M) und die mittlere maximale Blutflussfrequenzverschiebung (TAMF) ermittelt. Des Weiteren wurde der Winkel zwischen Gefäßanschnitt und Dopplerstrahl berücksichtigt: in die Auswertung kamen nur Pulswellen mit einem Winkel zwischen 20 und 60°, um die Fehlerquote bei der Berechnung der Blutflussgeschwindigkeit unter 10 % zu halten. Mit Hilfe dieses Winkels und TAMF wurde die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit (TAMV = Time-Averaged Maximum Velocity) über dem Herzzyklus berechnet (Formel vgl. Kapitel 2.3.3.). Als zweiter Dopplerindex wurde der Pulsatility Index (PI), ein Maß für den Blutflusswiderstand, verwendet (Formel vgl. Kapitel 2.3.3.). Für die weitere statistische Auswertung wurde aus den Parametern beider Dopplerwellen der jeweilige Mittelwert herangezogen.

3.4. Blutprobenentnahme und –untersuchung

3.4.1. Blutprobenentnahme und Plasmagewinnung

Zur Bestimmung der Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentration im Blutplasma wurde den Kühen während der ersten beiden Graviditäten am Ende jeder Untersuchung mit Hilfe des Blutentnahmesystems S-MONOVETTE (Fa. Sarstedt AG Co., Nümbrecht/Deutschland) ca. 6 ml einer NH₄-Heparinblutprobe aus der V. jugularis entnommen. Die Blutproben wurden sofort in Eiswasser gekühlt und anschließend in einer Kühlzentrifuge (Hettich Universal 32 R, Fa. Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen/Deutschland) bei 4°C und 2000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -20°C bis zur Analyse eingefroren.

3.4.2. Gesamtöstrogenbestimmung im Blutplasma

Die Bestimmung des Gesamtöstrogengehaltes im Blutplasma erfolgte nach Hydrolyse (0,4%-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*) und Ether-Extraktion nach der von MEYER et al. (1997) beschriebenen Methode mittels eines Enzym-Immuno-Assays (EIA). Die Intra-Assay-Variation betrug 12%. Die Nachweisgrenze ($B_0 - 3 * SD$; B_0 : Nullwert, SD: Standardabweichung) lag bei 0,03 pmol/ ml.

3.4.3. Progesteronbestimmung im Blutplasma

Die Progesteronkonzentration im Blutplasma wurde nach dem von MEYER (1989) beschriebenen Verfahren mittels eines direkten Enzym-Immuno-Assays (EIA) unter Verwendung der Doppelantikörpertechnik ermittelt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (Sigma P1922; Antigen: Progesteron 7 α BSA; Marker: Progesteron-3-HRP) aus 5 μ l Plasma. Die Intra-Assay-Variation betrug 12%. Die Nachweisgrenze ($B_0 - 3 * SD$; B_0 : Nullwert, SD: Standardabweichung) lag bei 0,6 pmol/ml.

3.5. Biopsieprobenentnahme und –analyse

3.5.1. Biopsieprobenentnahme

Die Endometriumsbioptate wurden mit Hilfe einer Biopsiezange nach KEVORKIAN (Fa. Hauptner, Solingen/Deutschland) transvaginal entnommen und danach umgehend in eine Fixierlösung verbracht (RNAlater®, Fa. Ambion®, Austin/U.S.A.). Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

3.5.2. Expressionsanalytik

Die Analyse der Biopsieproben auf die endometriale Expression der eNOS und iNOS wurde am Institut für Physiologie der Technischen-Universität München-Weihenstephan durchgeführt.

RNA-Extraktion:

Aus den Endometriumsbioptaten wurde die Gesamt-RNA mit Tripur (siehe Anhang) extrahiert. Anschließend wurde die Konzentration der Gesamt-RNA photometrisch durch Vermessen bei

einer optischen Dichte von 260 nm ermittelt (Biophotometer, Fa. Eppendorf, Hamburg/Deutschland).

„Real-time“ PCR (RT-PCR):

Die cDNA wurde nach dem Protokoll von GABLER et al. (1997) aus jeweils 1 µg RNA in einem Thermogradientencycler (Fa. Eppendorf, Hamburg/Deutschland) synthetisiert. Zur Amplifikation der Haushaltsgene (18S rRNA und Ubiquitin) wurden ebenso wie für die Zielgene iNOS und eNOS speziesübergreifende Primerpaare eingesetzt. Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte analysiert und so die Identität sowie Spezifität der DNA-Sequenz bestätigt. Um eventuelle Kontaminationen ausschließen zu können, diente als Negativkontrolle Wasser anstatt von cDNA.

Light-Cycler-Ansatz:

Nach dem Master SYBR Green Protokoll (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim/Deutschland) wurden 1 µl cDNA sowie 9 µl Mastermix[®] (Roche Diagnostics, Mannheim/Deutschland) eingesetzt. Die Verifizierung der einzelnen Amplikons geschah mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse sowie durch die gelelektrophoretische Auftrennung der generierten PCR-Produkte in einem Agarosegel.

Bei der Methode der „real-time“ PCR wird mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs (SYBR Green I), der an die DNA bindet, nach jedem durchlaufenen Zyklus die amplifizierte DNA-Menge fluorometrisch erfasst und als exponentielle Wachstumskurve dargestellt. Bei einem bestimmten Fluoreszenzniveau ergeben sich Schnittpunkte mit dieser Kurve, sog. Crossing Points (CP), anhand derer man die durchlaufenen PCR-Zyklen ablesen kann (Abb. 3.3): je mehr Zyklen bzw. Crossing Points eine Probe durchlaufen muss, um ein vorgegebenes Fluoreszenzniveau zu erreichen, desto geringer ist die Ausgangsmenge an cDNA des Zielgens (RASMUSSEN, 2001).

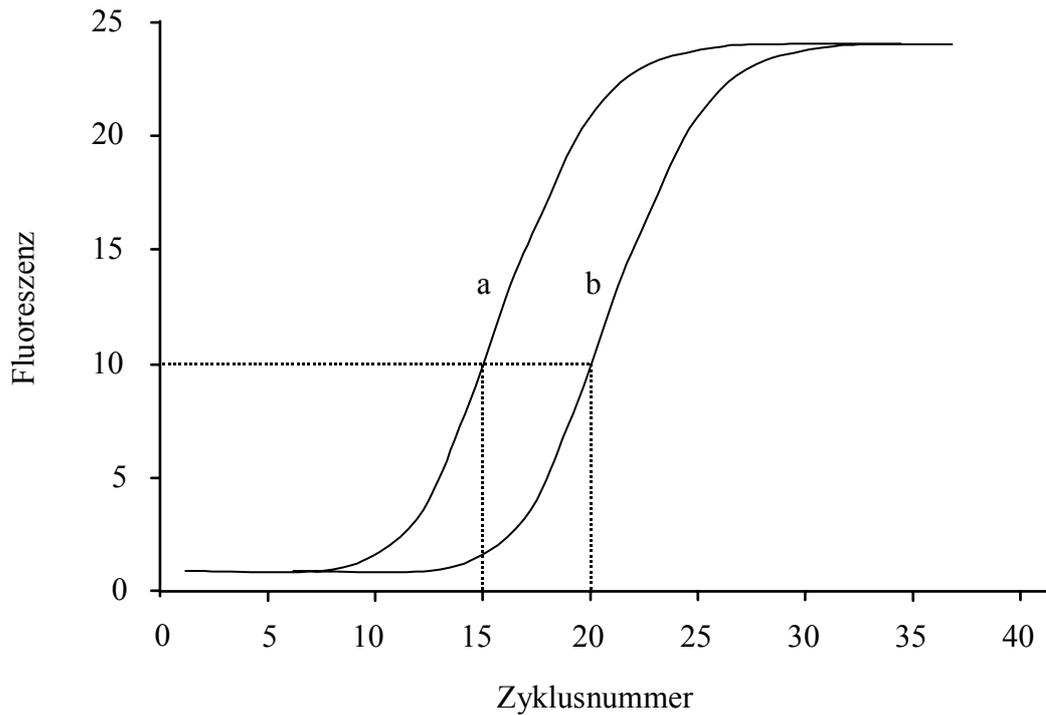


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der „real-time“ PCR: Probe a enthält mehr Ausgangsmenge an cDNA des Zielgens als Probe b, da letztere mehr Zyklen durchlaufen muss, um das gleiche Fluoreszenzniveau zu erreichen (mod. nach RASMUSSEN, 2001).

Im folgendem wird zur realen Darstellung die Anzahl der Crossing Points von der Zahl 50 subtrahiert. Demnach enthält man einen größeren Wert für Proben mit viel Ausgangsmaterial bzw. einer höheren mRNA-Expression und umgekehrt.

Weitere Angaben zum Nachweis und zur Quantifizierung des Stickstoffmonoxid-Systems im Endometrium des Rindes sind in der Arbeit von SCHMAUDER (2003) zu finden.

3.6. Uterustupfer

Für die Entnahme der Tupferproben wurde das Accu-Cul-Shure-System® (Fa. Accu-Med Corporation, N. Y./U.S.A.) verwendet. Die Tupfer wurden bakteriologisch und zytologisch nach dem bereits von SCHMAUDER (2003) beschriebenen Verfahren untersucht.

3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary/North Carolina, U.S.A., 1998) durchgeführt. Es wurden Mittelwerte, Standardfehler der Mittelwerte und Intra-Class-Korrelationskoeffizienten berechnet und die Varianzanalyse (ANOVA), post-hoc-Test (Fisher's PLSD-Test) und der nichtparametrische Test nach Wilcoxon angewendet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Klinisch-gynäkologische Befunde

Bei allen Kühen A bis E waren die zytologischen und bakteriologischen Befunde der einmalig vor Beginn der Untersuchungen entnommenen Uterustupfer unauffällig. Im Verlauf der 10 unbeeinflussten Frühgraviditäten waren keine pathologischen Veränderungen am inneren Genitale festzustellen. Die künstliche Besamung wurde in fünf Fällen in einer spontanen Brunst durchgeführt, in fünf Fällen wurde der Östrus durch ein synthetische Prostaglandinderivat (Genestran®, siehe 3.2.) eingeleitet und die Kühe durchschnittlich 3,2 Tage post injectionem besamt. In drei Fällen war 24 Stunden post inseminationem keine Ovulation festzustellen, weshalb eine Nachbesamung durchgeführt wurde. Die Ovulation trat in 50 % der Fälle am linken, in 50 % der Fälle am rechten Ovar auf. Darunter befand sich eine Doppelovulation, die einseitig am rechten Ovar auftrat. Ein Embryo mit Herzaktion konnte in jeder dieser 10 Trächtigkeiten sonographisch 25 Tage post inseminationem in dem ipsilateral zum Corpus luteum gelegenen Uterushorn lokalisiert werden.

In den 5 Frühgraviditäten, in denen Biopsieproben entnommen wurden, lagen bei den Tieren ebenfalls keine pathologischen Veränderungen am inneren Genitale vor. Eine Kuh wurde in einer spontanen Brunst inseminiert, bei den restlichen Kühen wurde die KB in einer induzierten Brunst im Schnitt 4,3 Tage nach Injektion des Prostaglandinderivats durchgeführt. In einem Fall erfolgte eine Nachbesamung, da es innerhalb von 24 Stunden zu keiner Ovulation kam. Diese lief in 4 Fällen am rechten, in einem Fall am linken Ovar ab.

In dem nachfolgenden Zyklus, in dem von jedem Tier nochmals eine Biopsieprobe vom Endometrium gewonnen wurde, waren ebenfalls keine Veränderungen am inneren Genitale feststellbar. Die Ovulation trat in drei Fällen am rechten, in zwei Fällen am linken Ovar spontan auf.

4.2. Uteriner Blutfluss und Steroidhormonkonzentrationen während der Frühgravidität

4.2.1. Änderungen im uterinen Blutfluss während der Frühgravidität

Die farbdopplersonographischen Untersuchungen zur Dokumentation des Blutflusses in der A. uterina wurden an fünf Kühen während je zwei Frühgraviditäten durchgeführt (siehe 3.2.).

Die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) der A. uterina zeigte das bereits von BAUMGARTNER (1998) beschriebene Muster während der Frühgravidität (Abb. 4.1): diese war an den Tagen 9 ($29,1 \pm 1,7^1$ cm/s) und 11 ($29,4 \pm 2,1$ cm/s) konstant niedrig. An Tag 13 kam es zu einem vorübergehenden Anstieg der TAMV ($37,8 \pm 2,8$ cm/s; $p < 0,05$). Zum 15. Trächtigkeitstag fiel die uterine Perfusion wieder ab ($32,1 \pm 2,3$ cm/s) und blieb bis Tag 19 ($32,1 \pm 2,7$ cm/s) auf nahezu gleichem Niveau.

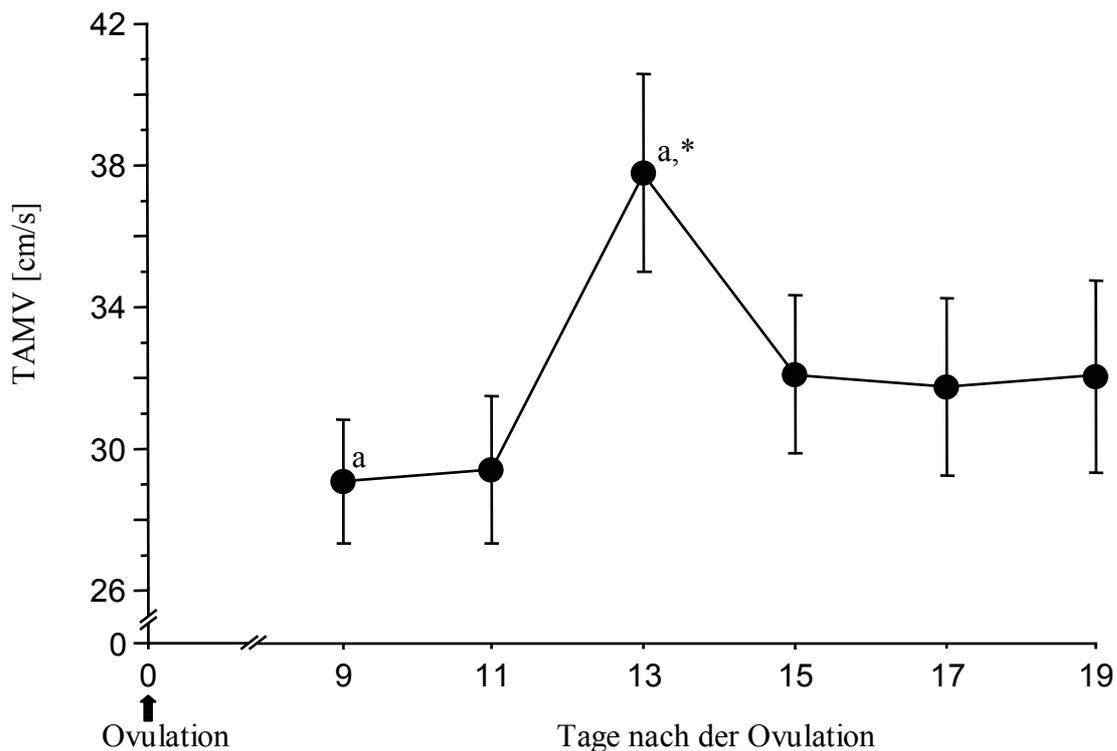


Abb. 4.1: Mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in der rechten und linken A. uterina während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Kühen während je zwei Frühgraviditäten ($n = 20$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

a signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen ($p < 0,05$).

¹ Mittelwerte \pm Standardfehler

Die Werte für den Pulsatility Index (PI), ein Maß für den Blutflusswiderstand, zeigten ein gegenläufiges Muster zum Verlauf der mittleren maximalen Blutflussgeschwindigkeit (Abb. 4.2): zwischen Tag 9 ($2,6 \pm 0,2$) und 11 ($2,7 \pm 0,2$) war der PI nahezu konstant hoch, am 13. Graviditätstag war ein vorübergehender Abfall des Parameters festzustellen ($2,1 \pm 0,1$; $p < 0,05$). Danach stieg der PI wieder kontinuierlich bis zum 19. Trächtigkeitstag an ($2,9 \pm 0,2$; $p < 0,05$).

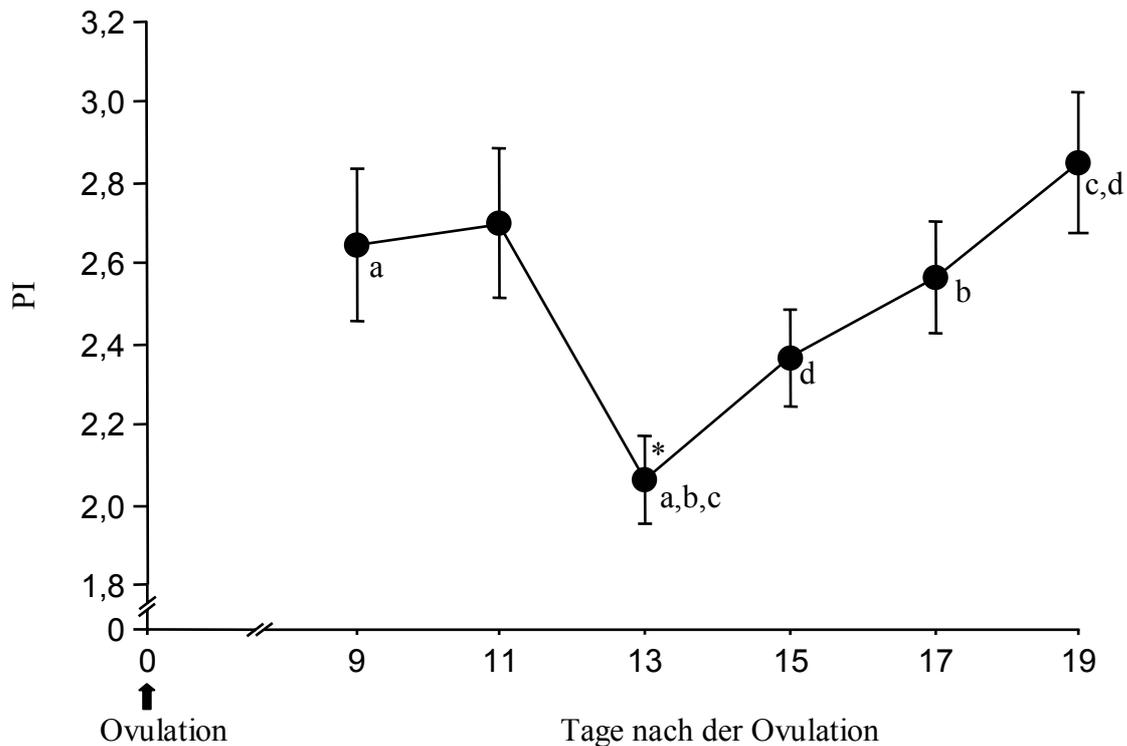


Abb. 4.2: Pulsatility Index (PI) in der rechten und linken A. uterina während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Kühen während je zwei Frühgraviditäten ($n = 20$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,01$).

a, b, c, d signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen (a,b,d: $p < 0,05$; c: $p < 0,01$).

Betrachtet man die beiden Blutflussparameter getrennt nach den einzelnen Kühen, so ist zu erkennen, dass das Blutflussprofil bei allen fünf Kühen einen ähnlichen Verlauf zeigt. So konnte am 13. Trächtigkeitstag bei allen Kühen ein Anstieg der TAMV (Abb. 4.3), bei vier Kühen auch ein Abfall des PI (Abb. 4.4) nachgewiesen werden. Beide Graphiken verdeutlichen die individuellen Unterschiede, die in der uterinen Perfusion während der Frühgravidität bestanden.

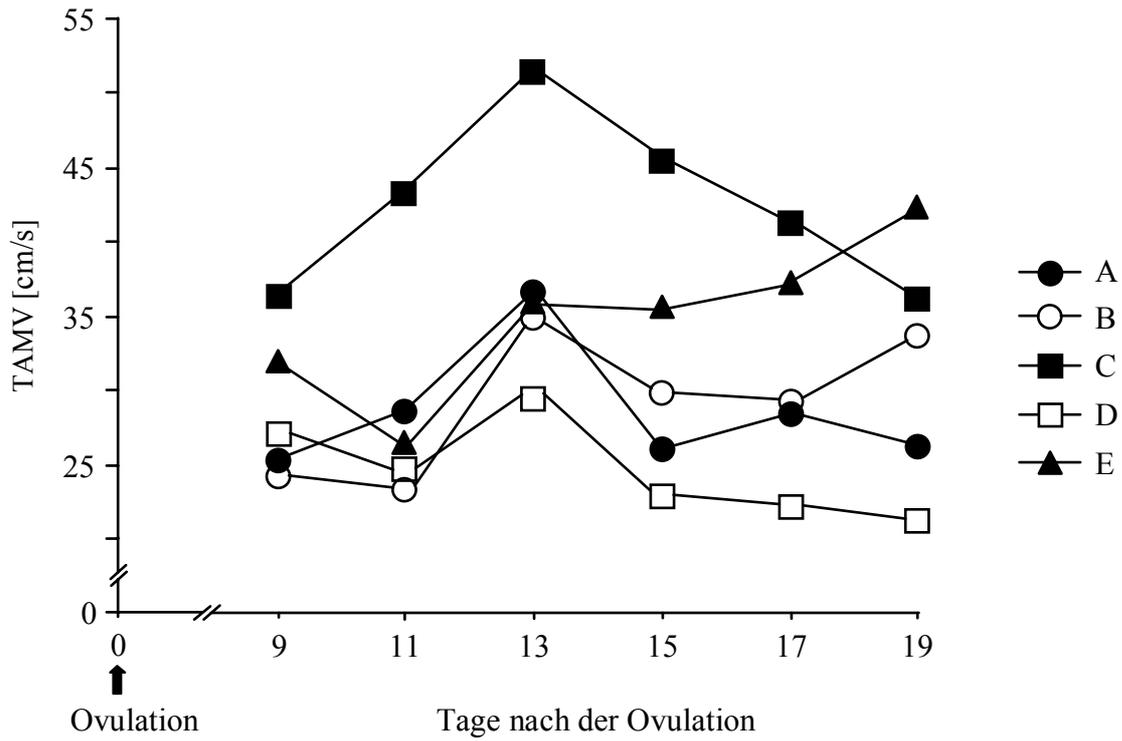


Abb. 4.3: Mittelwerte der TAMV (\bar{x}) der rechten und linken A. uterina von 5 Kühen (A – E) während je zwei Frühgraviditäten ($n = 4$).

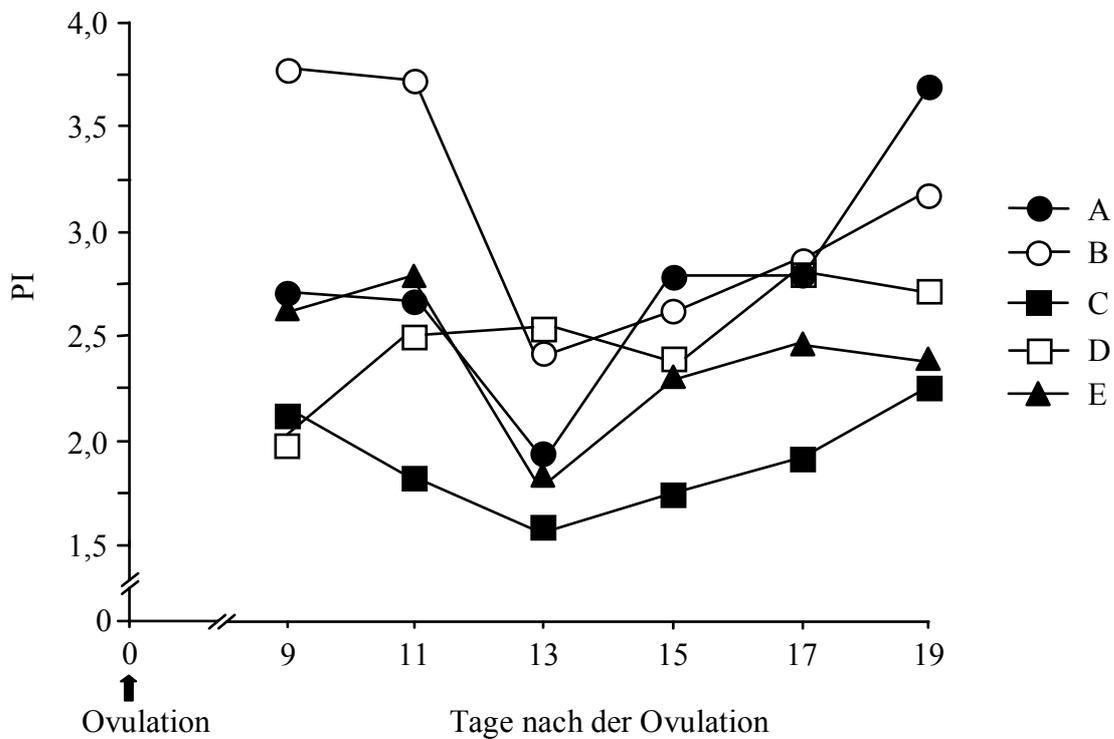


Abb. 4.4: Mittelwerte des PI (\bar{x}) der rechten und linken A. uterina von 5 Kühen (A – E) während je zwei Frühgraviditäten ($n = 4$).

Bei der statistischen Analyse des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Blutflussparameter TAMV und PI (Tab. 4.1) zeigte sich, dass neben den Unterschieden der uterinen Perfusion zwischen den einzelnen Kühen ($p < 0,0001$) auch ein sehr hoher Anteil der Schwankungen auf tierindividuelle Unterschiede zwischen den beiden Frühgraviditäten zurückzuführen ist (TAMV: $p < 0,01$; PI: $p < 0,05$). Daneben spielt auch das Trächtigkeitsstadium (Untersuchungstag) sowohl bei der TAMV ($p < 0,05$), als auch beim PI ($p < 0,01$) eine entscheidende Rolle.

Tab. 4.1: Abhängigkeit der Blutflussparameter TAMV und PI (p-Werte) von Tier, Untersuchungstag und erster bzw. zweiter Frühgravidität. Es wurden die Werte von 5 Kühen während je zwei Frühgraviditäten an 6 Untersuchungstagen (Tag 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen ($n = 60$).

	TAMV	PI
Tier	< 0,0001	< 0,0001
Untersuchungstag	0,02	0,0006
Erste bzw. zweite Frühgravidität	0,0003	0,03

Im Vergleich der Blutversorgung beider Seiten ist ein deutlicher Unterschied sowohl in der TAMV ($p < 0,01$; Abb. 4.5), als auch im PI ($p < 0,01$; Abb. 4.6) zu erkennen. Dabei wurde das Uterushorn, in dem später auch der Konzeptus sonographisch lokalisiert werden konnte, als gravid definiert. Dies befand sich bei allen Kühen ipsilateral zum Corpus luteum. Demzufolge wurde das kontralateral gelegene Horn als nichtgravid bezeichnet.

Zwischen Tag 9 und 13 war auf der graviden Seite ein deutlich höherer Blutfluss (Abb. 4.5) vorhanden als auf der nichtgraviden ($p < 0,05$). Dabei war der Anstieg der uterinen Perfusion in diesem Zeitraum nur auf der graviden Seite signifikant ($p < 0,05$). Zwischen dem 13. und 15. Trächtigkeitstag fiel die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit der trächtigen Seite wieder deutlich ab ($p < 0,05$), die der nichtgraviden Seite dagegen blieb von Tag 13 bis 19 auf nahezu gleichem Niveau. Ab Tag 15 unterschied sich die TAMV der graviden nicht mehr von der der nichtgraviden Seite ($p > 0,05$).

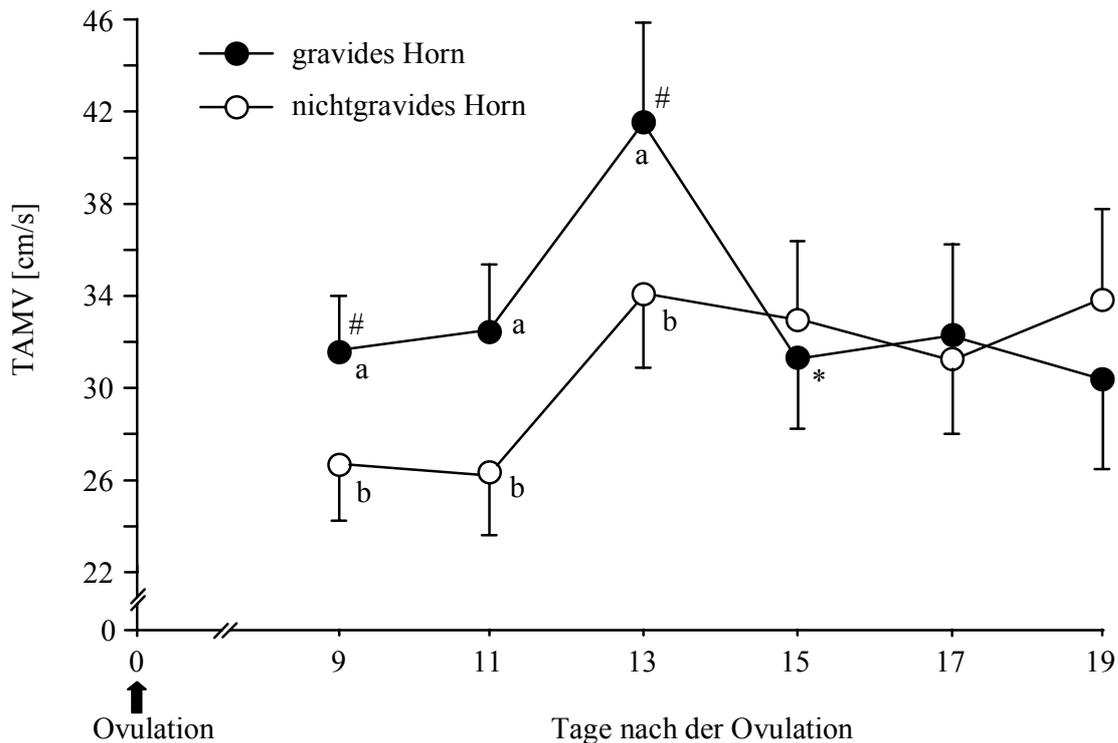


Abb. 4.5: Mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in der A. uterina der graviden und nichtgraviden Seite während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Kühen während je zwei Frühgraviditäten ($n = 10$).
 * signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).
 # signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen ($p < 0,05$).
 a, b signifikanter Unterschied zwischen gravidem und nichtgravidem Horn ($p < 0,05$).

Der Pulsatility Index (Abb. 4.6) war der TAMV entsprechend zwischen Tag 9 und 13 auf der graviden Seite auf deutlich niedrigerem Niveau als auf der nichtgraviden ($p < 0,01$), wobei zum 13. Trächtigkeitstag nur auf der nichtgraviden Seite ein signifikanter Abfall des Parameters zu verzeichnen war ($p < 0,05$). Der nachfolgende kontinuierliche Anstieg des PI bis zum 19. Trächtigkeitstag war besonders auf der graviden Seite deutlich ausgeprägt ($p < 0,05$). Ab Tag 15 unterschied sich der Blutflusswiderstand der trächtigen nicht mehr von dem der nichtträchtigen Seite ($p > 0,05$).

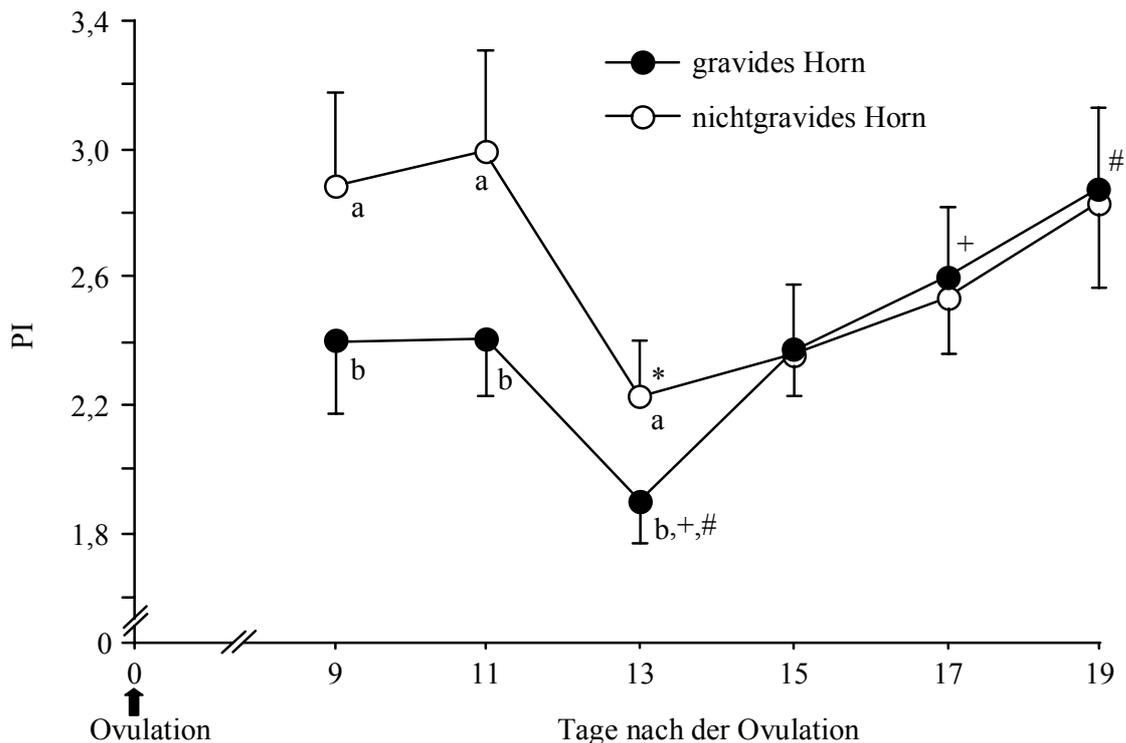


Abb. 4.6: Pulsatility Index (PI) in der A. uterina der graviden und nichtgraviden Seite während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Kühen während je zwei Frühgraviditäten ($n = 10$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

+, # signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen mit gleichen Symbolen (+: $p < 0,05$; #: $p < 0,01$).

a, b signifikanter Unterschied zwischen gravidem und nichtgravidem Horn ($p < 0,01$).

4.2.2. Korrelation zwischen den Blutflussparametern während der Frühgravidität

Zwischen dem Widerstandsparameter PI und der mittleren maximalen Blutflussgeschwindigkeit TAMV konnte in dem Zeitraum von Tag 9 bis 19 der Trächtigkeit ein deutlich negativer Zusammenhang nachgewiesen werden ($r = -0,63$; $p < 0,0001$).

4.2.3. Steroidhormonkonzentrationen während der Frühgravidität und Zusammenhang mit der uterinen Perfusion

Zwischen dem 3. und 13. Trächtigkeitstag kam es zu einem kontinuierlichem Anstieg der Progesteronkonzentration (Abb. 4.8) im Blutplasma ($p < 0,0001$). Danach blieb die Plasmaprogesteronkonzentration bis Tag 19 auf hohem Niveau ($p > 0,05$).

Die Plasmaöstrogenkonzentration (Abb. 4.8) war während des gesamten Untersuchungszeitraumes konstant niedrig mit geringgradigen Schwankungen zwischen 0,13 und 0,18 pmol/ml.

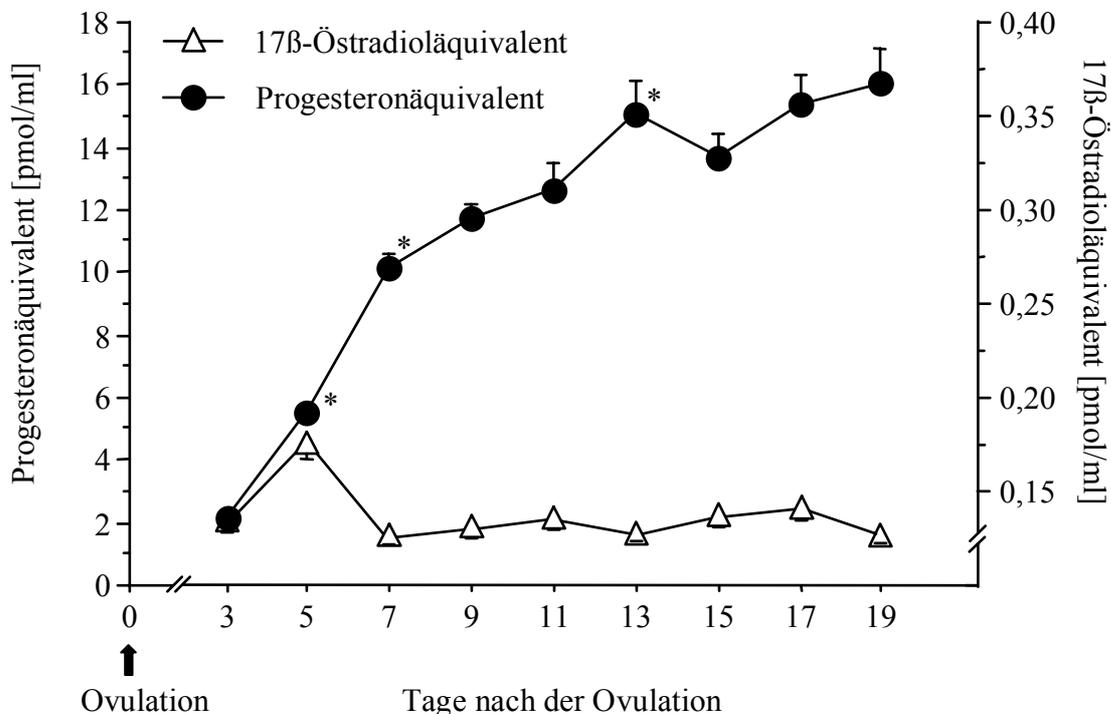


Abb 4.8: Plasmaöstrogen- und Progesteronkonzentrationen während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Kühen während je zwei Frühgraviditäten ($n = 10$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

Während der Frühgravidität bestand kein Zusammenhang zwischen dem PI bzw. der TAMV und den Plasmaöstrogenkonzentrationen ($-0,10 \leq r \leq 0,04$; $p > 0,05$). Für die Plasmaprogesteronkonzentrationen konnten dagegen geringgradige, aber hochsignifikante Zusammenhänge nachgewiesen werden (Tab. 4.2): eine positive Korrelation wurde zwischen

dem Progesteronspiegel im Plasma und der TAMV ermittelt ($r = 0,35$; $p < 0,0001$), der PI dagegen korrelierte negativ mit der Plasmaprogesteronkonzentration ($r = -0,34$; $p < 0,0001$).

Tab. 4.2: Korrelationen (r) zwischen den Blutflussparametern PI und TAMV und den Progesteron- und Östrogenkonzentrationen im Blutplasma. Es wurden die Mittelwerte von 5 Kühen während je zwei Frühgraviditäten mit je 6 Untersuchungstagen (Tag 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen ($n = 60$).

	TAMV	PI
Östrogene	0,04	-0,10
Progesteron	0,35 *	-0,34 *

* Korrelation $p < 0,0001$

4.3. Endometriale Echostruktur während der Frühgravidität

Als Echostrukturparameter wurden der mittlere Grauwert sowie die Homogenität und der Kontrast herangezogen. Von einer Frühgravidität (Kuh B, Frühgravidität 1) mussten die Ergebnisse der Echostrukturanalyse ausgeschlossen werden. Nachdem die Kuh frisch in den Bestand aufgenommen wurde, tolerierte diese längere Untersuchungszeiten nur schlecht, so dass es innerhalb kürzester Zeit aufgrund von starker Presstätigkeit zu einer Ödematisierung des Darms und dadurch Verfälschung der endometrialen Echostruktur kam. Im folgenden Kapitel konnten somit nur die Ergebnisse der Echostrukturanalyse von 9 Frühgraviditäten berücksichtigt werden.

Im Vergleich von Längs- und Querschnitten waren in dieser Arbeit Unterschiede nachzuweisen (mittlerer Grauwert und Homogenität: $p < 0,0001$; Kontrast: $p < 0,05$; Tab. 4.3). Obwohl diese Unterschiede statistisch betrachtet signifikant sind, bestanden absolut gesehen nur geringe Differenzen zwischen 3,5 und 12,5 %.

Tab. 4.3: Echostrukturparameter mittlerer Grauwert, Homogenität und Kontrast in Abhängigkeit von Längs- und Querschnitten. Pro Untersuchungstag wurden die Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von je zwei Längs- oder Querschnitten während 9 Frühgraviditäten mit jeweils 9 Untersuchungstagen (Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen ($n = 162$).

	Mittlerer Grauwert ¹	Homogenität [$\times 10^3$] ²	Kontrast ³
Längsschnitt (L + L)	163,8 \pm 0,7	4,2 \pm 0,06	26,6 \pm 0,3
Querschnitt (Q + Q)	157,2 \pm 0,8	3,6 \pm 0,04	27,4 \pm 0,3
	a	b	c

- a Statistischer Unterschied zwischen den Werten innerhalb der Spalte $p < 0,0001$, absoluter Unterschied 12 %.
- b Statistischer Unterschied zwischen den Werten innerhalb der Spalte $p < 0,0001$, absoluter Unterschied 12,5 %.
- c Statistischer Unterschied zwischen den Werten innerhalb der Spalte $p < 0,05$, absoluter Unterschied 3,5 %.

¹ Minimalwert: 129,7; Maximalwert: 184,5

² Minimalwert: 2,7; Maximalwert: 7,5

³ Minimalwert: 14,3; Maximalwert: 36,9

Zwischen den Mittelwerten aus je einem Längs- und Querschnitt, welche pro Uterushorn angefertigt wurden, bestanden dagegen bei keinem der drei aufgeführten Echostrukturparameter Unterschiede ($p > 0,05$; Tab. 4.4), d. h. die endometriale Echostruktur des graviden Horns unterschied sich nicht von derjenigen des nichtgraviden Horns.

Tab. 4.4: Echostrukturparameter mittlerer Grauwert, Homogenität und Kontrast in Abhängigkeit von gravidem und nichtgravidem Horn. Es wurden die Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von den pro Uterushorn angefertigtem Längs (L)- und Querschnitt (Q) während 9 Frühgraviditäten mit je 9 Untersuchungstagen (Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen ($n = 162$).

	Mittlerer Grauwert ¹	Homogenität [$\times 10^3$] ²	Kontrast ³
gravides Horn (L + Q)	160,7 \pm 0,7	3,9 \pm 0,05	27,1 \pm 0,3
nichtgravides Horn (L + Q)	160,3 \pm 0,8	3,9 \pm 0,06	26,9 \pm 0,3

Unterschiede zwischen den Werten innerhalb einer Spalte nicht signifikant ($p > 0,05$).

Da die Unterschiede zwischen Längs- und Querschnitten absolut gesehen nur gering waren und bei keinem der drei aufgeführten Echostrukturparameter Unterschiede zwischen gravidem und nichtgravidem Horn bestanden, wurden im folgenden bei allen Auswertungen pro Untersuchungstag die Mittelwerte (\bar{x}_4) aus je zwei Längs- und Querschnitten (= 4 B-Bilder à 1 ROI⁴) verwendet.

4.3.1. Ergebnisse der Echostrukturanalyse

Mittlerer Grauwert:

Der mittlere Grauwert kann Werte zwischen 0 und 255 annehmen und beschreibt die Gesamthelligkeit der ROI⁴ des sonographischen B-Bildes. Bezogen auf diese Arbeit stellt sich das Endometrium also umso heller dar, je größer der Wert des Parameters ist und umgekehrt.

¹ Minimalwert: 129,7; Maximalwert: 184,5

² Minimalwert: 2,7; Maximalwert: 7,5

³ Minimalwert: 14,3; Maximalwert: 36,9

⁴ Region of interest

Der mittlere Grauwert stieg zwischen den Tagen 3 und 7 um ca. 6 % an ($p < 0,0001$). Anschließend fiel er bis zum 11. Trächtigkeitstag wieder ab ($p < 0,0001$) und erreichte basale Werte wie an Tag 3. Zwischen Tag 11 und 13 stieg der mittlere Grauwert wieder um etwa 3 % an ($p < 0,05$) und blieb bis Tag 15 nahezu konstant. Am 17. Trächtigkeitstag war wiederum ein leichter Abfall des Parameters festzustellen ($p < 0,05$), und bis zum 19. Tag blieb dieser auf gleichem Niveau ($p > 0,05$).

Die Werte an den Tagen 11, 17 und 19 unterschieden sich nicht von denen, welche an Tag 3 bestimmt wurden ($p > 0,05$). Dagegen erreichte der mittlere Grauwert an Tag 7 höhere Werte als an Tag 15 ($p < 0,05$).

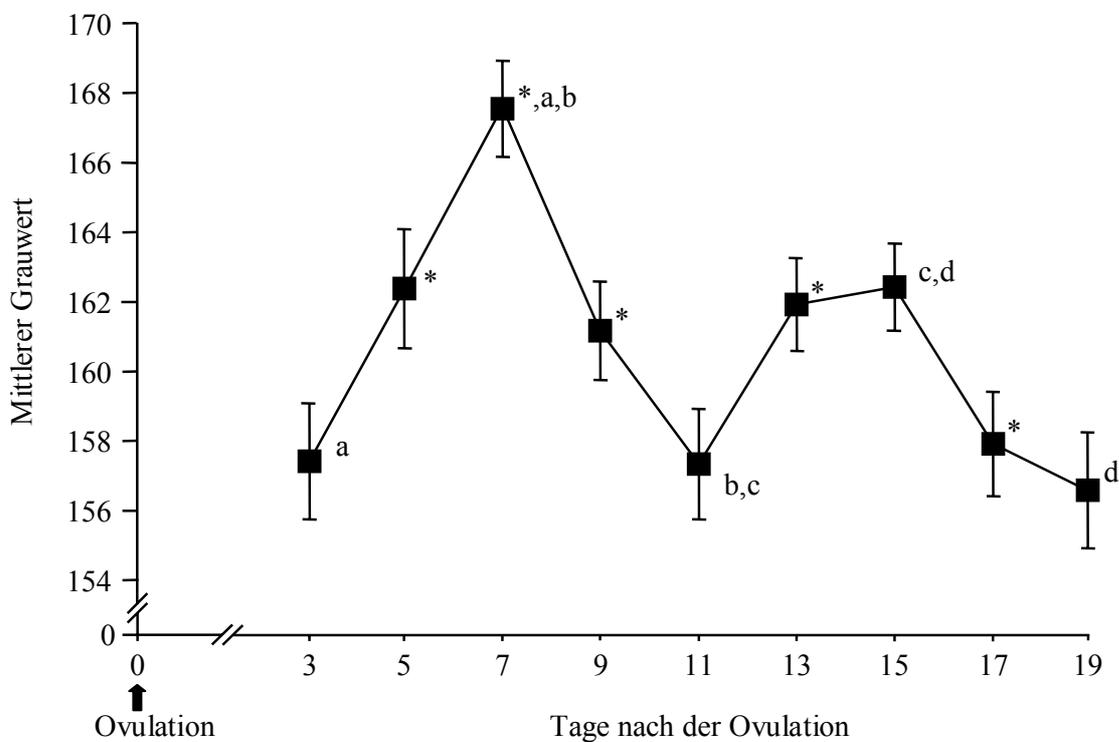


Abb. 4.9: Mittlerer Grauwert während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten ($n = 36$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

a, b, c, d signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen mit gleichen Symbolen (a, b: $p < 0,0001$; c: $p < 0,05$; d: $p < 0,01$).

Im Vergleich zweier Uterusquerschnitte vom 7. und 11. Trächtigkeitstag ist auch makroskopisch der signifikante Abfall des mittleren Grauwerts nachvollziehbar: während sich das Endometrium an Tag 7 sonographisch sehr hell darstellt (Ab. 4.10), erscheint es am 11. Graviditätstag deutlich dunkler (Abb. 4.11).

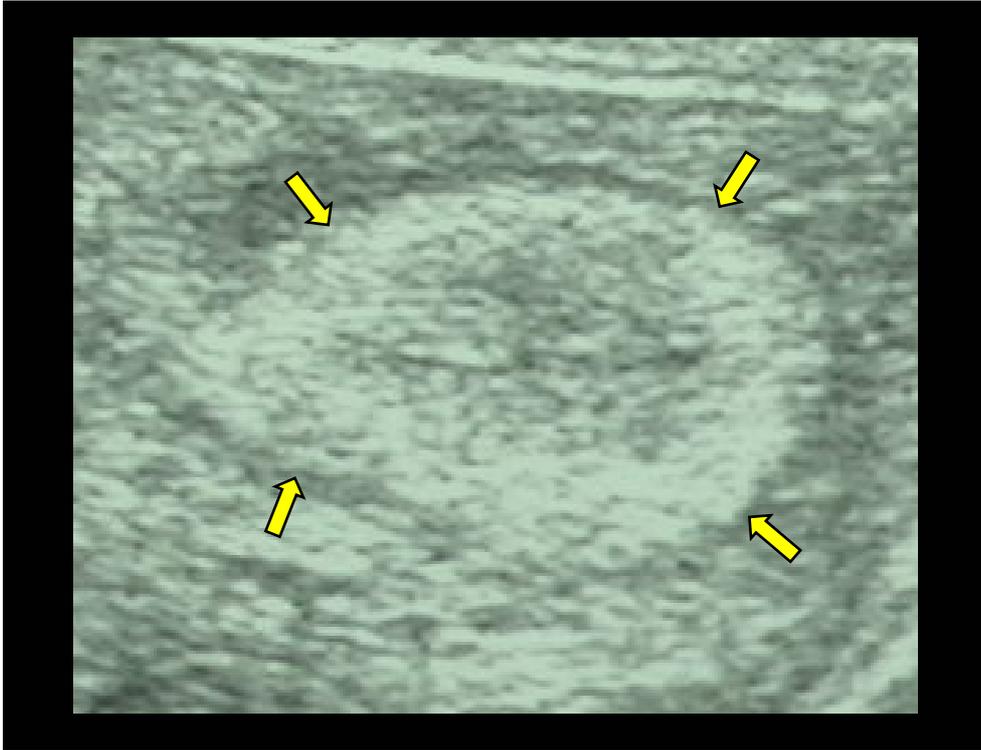


Abb. 4.10: Querschnitt durch ein Uterushorn von Kuh A am 7. Trächtigkeitstag. Die Pfeile markieren die äußere Begrenzung des Endometriums.

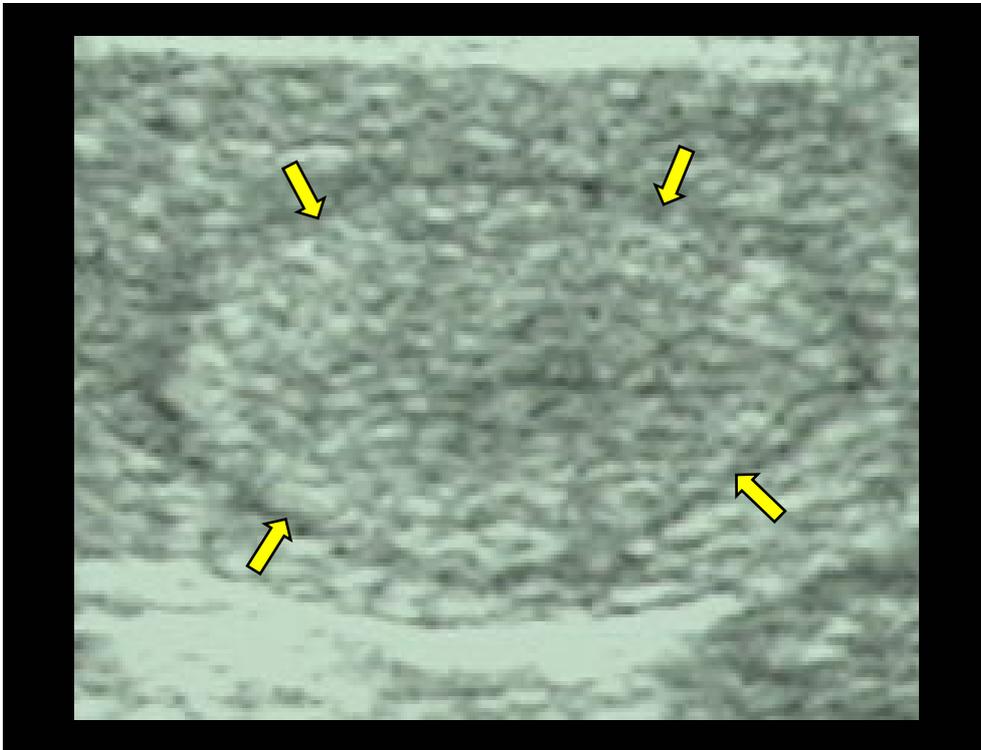


Abb. 4.11: Querschnitt durch ein Uterushorn von Kuh A am 11. Trächtigkeitstag. Die Pfeile markieren die äußere Begrenzung des Endometriums.

Homogenität:

Da die Werte der Homogenität sehr klein waren, wurden sie für die bessere Lesbarkeit mit 10^3 multipliziert. Der Messwert der Homogenität liegt zwischen 0 und 1 und ist abhängig von der Zahl und Häufigkeit verschiedener Grauwertkombinationen: sind in einem Bild nur wenige Grauwertkombinationen vorhanden und diese relativ gleich verteilt, dann ist der Wert der Homogenität groß. Den maximalen Wert von 1 erreicht die Homogenität bei einem vollständig homogenen Bild. Befinden sich dagegen in einem Bild viele Grauwertkombinationen und kommen diese relativ ungleichmäßig verteilt vor, so ist der Messwert der Homogenität sehr klein. In dieser Arbeit lag der kleinste gemessene Einzelwert bei 0,0027.

Die Homogenität war an den Tagen 5 und 7 relativ hoch, fiel jedoch zum 9. Trächtigkeitstag deutlich ab ($p < 0,05$). Auf diesem niedrigem Niveau blieb der Parameter bis Tag 13 ($p > 0,05$). Zum 15. Graviditätstag war ein deutlicher, aber nur vorübergehender Anstieg der Homogenität zu verzeichnen ($p < 0,05$), denn bis Tag 19 sank der Parameter wieder signifikant auf niedrige Werte ab ($p < 0,05$), welche sich nicht von denen zwischen den Tagen 9 bis 13 unterschieden.

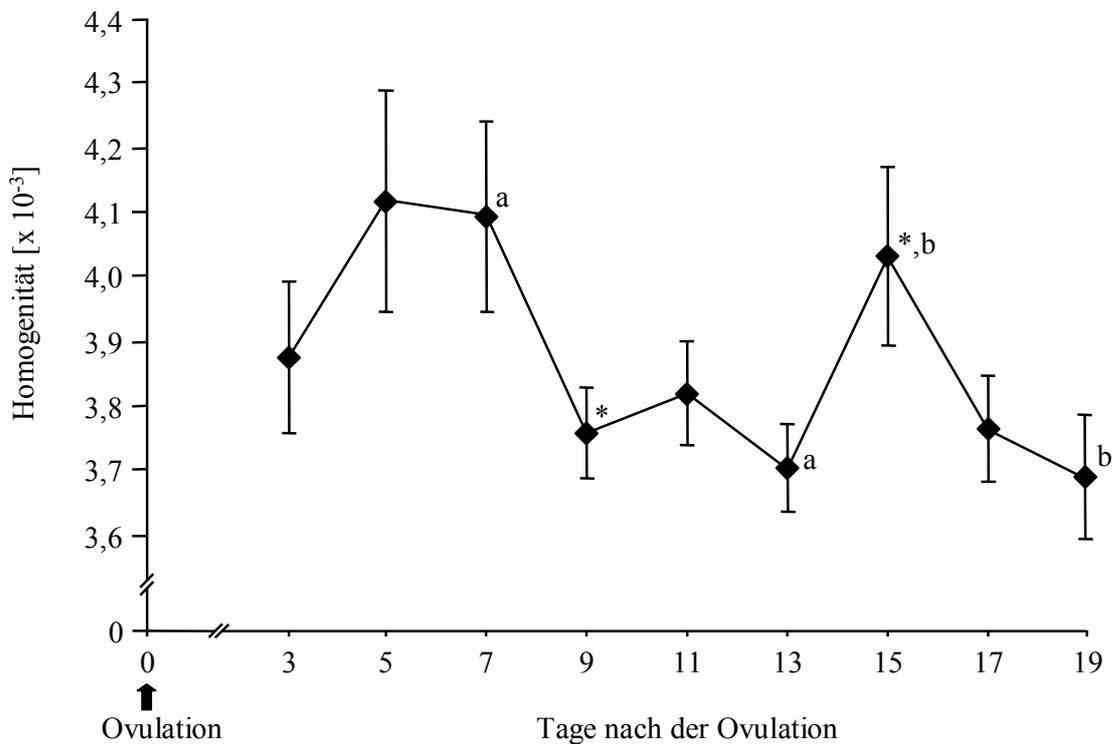


Abb. 4.12: Homogenität während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten ($n = 36$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

a, b signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen mit gleichen Symbolen (a, b: $p < 0,05$).

Kontrast:

Der Echostrukturparameter Kontrast ist abhängig von der Intensitätsschwankung zwischen den Grauwerten von definierten Pixelpaaren. Je häufiger große Grauwertdifferenzen zwischen den Pixelpaaren einer ROI auftreten, desto größer ist der Wert des Parameters.

Zwischen den Tagen 3 und 19 nahmen die Werte des Kontrasts kontinuierlich um etwa 10 % zu ($p < 0,01$). Während dieser Zeitspanne zeigte der Parameter einen vorübergehenden Anstieg der Werte um ca. 8 % zum 13. Trächtigkeitstag ($p < 0,05$), bis Tag 15 jedoch fiel der Kontrast ($p < 0,05$) wieder auf Werte ab, welche denen am 11. Graviditätstag entsprachen.

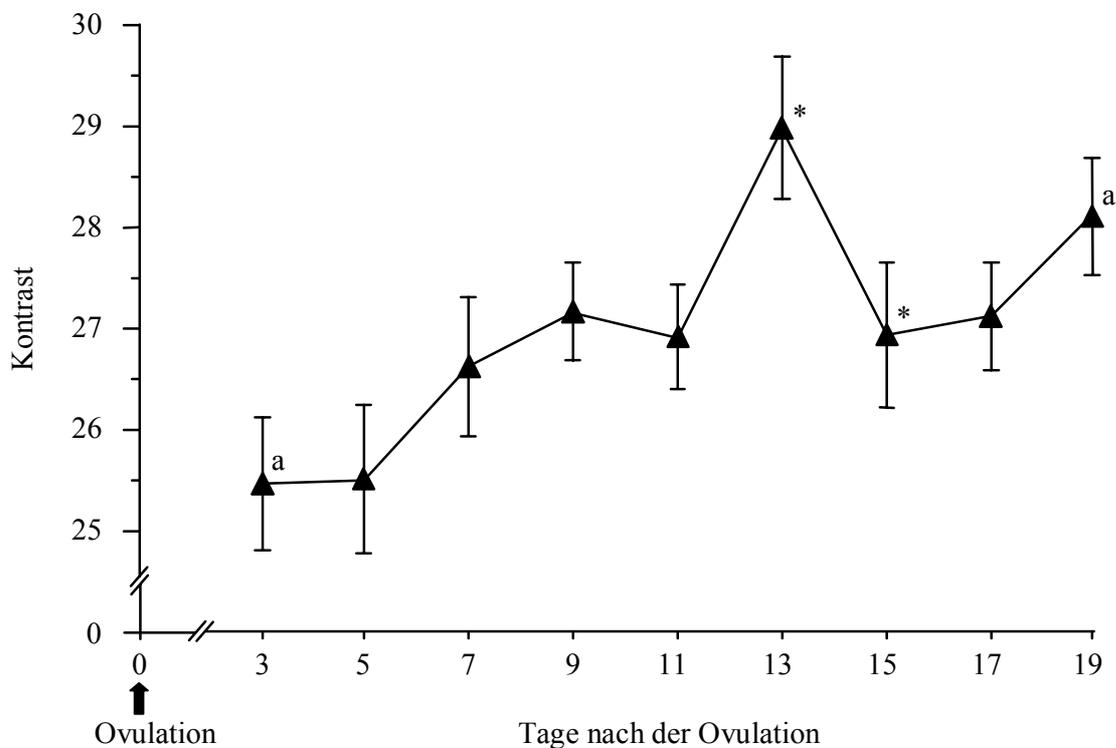


Abb. 4.13: Kontrast während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten ($n = 36$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

a signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen ($p < 0,01$).

Vergleich von gravidem und nichtgravidem Uterushorn:

Wie schon beschrieben, bestand zwischen der Echostruktur des graviden und nichtgraviden Horns kein Unterschied ($p > 0,05$; Tab. 4.4). Aus den drei folgenden Abbildungen wird der mehr oder weniger gleichartige Verlauf des mittleren Grauwerts (Abb. 4.14), der Homogenität (Abb. 4.15) und des Kontrasts (Abb. 4.16) in den beiden Uterushörnern deutlich.

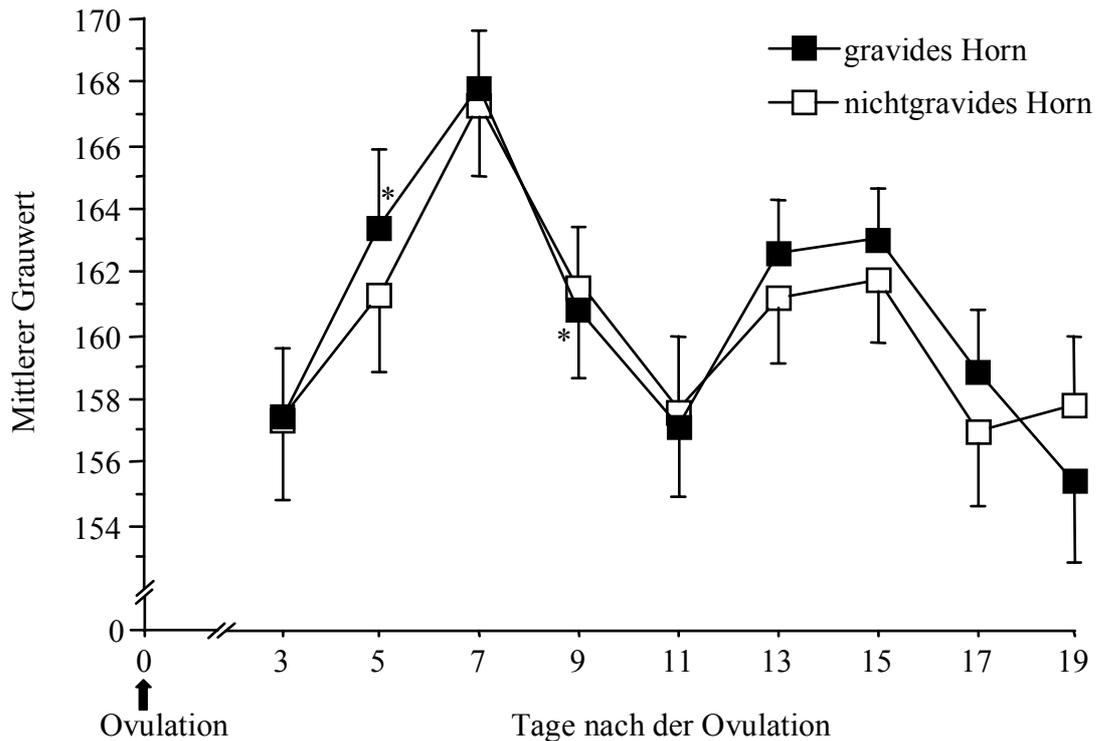


Abb. 4.14: : Mittlerer Grauwert des graviden und nichtgraviden Horns. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten ($n = 18$).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

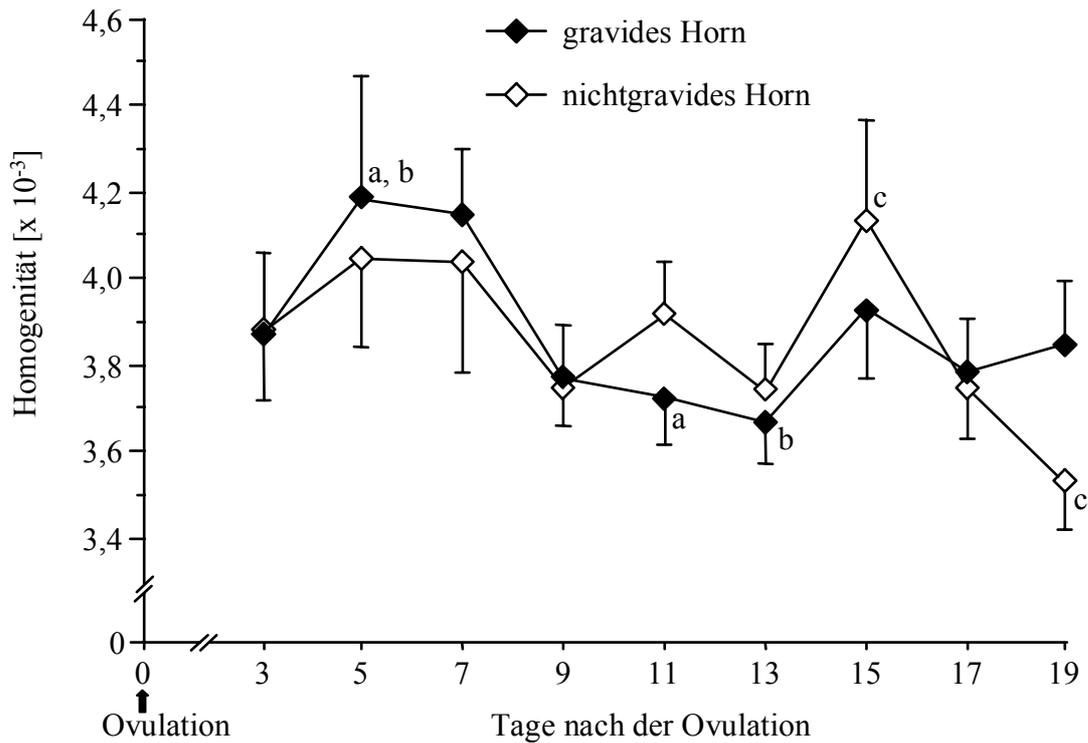


Abb. 4.15: Homogenität des graviden und nichtgraviden Horns. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten (n = 18).

a, b, c signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungstagen mit gleichen Symbolen (a, b, c: $p < 0,05$).

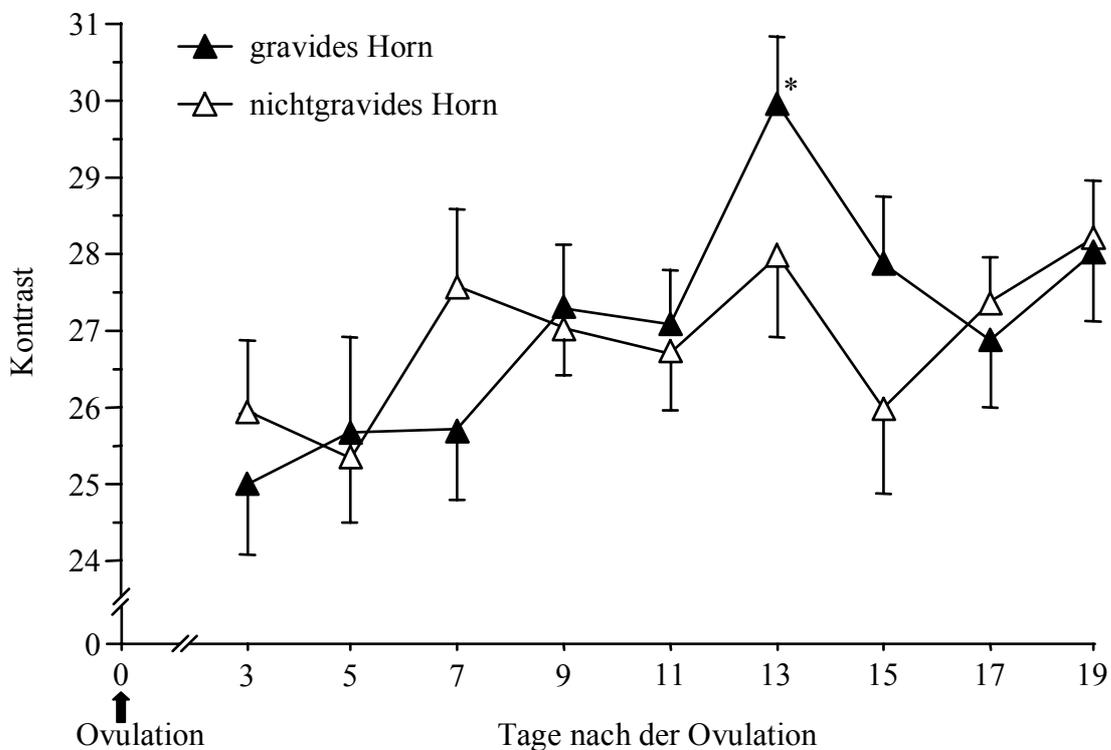


Abb. 4.16: Kontrast des graviden und nichtgraviden Horns. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten (n = 18).

* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$).

Einfluss der Faktoren Tier, Untersuchungstag und erste bzw. zweite Frühgravidität auf die Echostruktur:

Die Varianzanalyse zeigte, dass für alle drei Echostrukturparameter große, durch das Trächtigkeitsstadium (Untersuchungstag) bedingte Unterschiede bestanden (Tab. 4.5): dieser Einfluss war beim mittleren Grauwert am deutlichsten ($p < 0,0001$). Die Auswirkungen vom Untersuchungstag auf den Kontrast ($p < 0,01$) und die Homogenität ($p < 0,05$) waren geringer, aber dennoch signifikant. Während beim mittleren Grauwert ($p < 0,0001$) und der Homogenität ($p < 0,01$) auch hohe Unterschiede zwischen den einzelnen Kühen bestanden, unterschieden sich die Werte des Kontrasts von Tier zu Tier kaum ($p > 0,05$). Darüber hinaus waren Schwankungen beim mittleren Grauwert und beim Kontrast auch auf den Einfluss von tierindividuellen Unterschieden zwischen den beiden Frühgraviditäten zurückzuführen (mittlerer Grauwert: $p < 0,0001$; Kontrast: $p < 0,05$). Bei der Homogenität dagegen waren zwischen erster und zweiter Frühgravidität keine Differenzen feststellbar ($p > 0,05$).

Tab. 4.5: Abhängigkeit der Echostrukturparameter mittlerer Grauwert, Homogenität und Kontrast von Tier, Untersuchungstag und erster bzw. zweiter Frühgravidität (p-Werte). Es wurden die Mittelwerte von 9 Frühgraviditäten an jeweils 9 Untersuchungstagen (Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen ($n = 324$).

	Mittlerer Grauwert	Homogenität	Kontrast
Tier	< 0,0001	0,0099	0,09
Untersuchungstag	< 0,0001	0,03	0,002
Erste bzw. zweite Frühgravidität	< 0,0001	0,4	0,02

4.3.2. Korrelationen zwischen den Echostrukturparametern

Während zwischen den Echostrukturparametern mittlerer Grauwert und Kontrast keine Korrelation vorhanden war ($r = -0,02$; $p > 0,05$), konnte zwischen der Homogenität und den beiden genannten Parametern deutliche Zusammenhänge nachgewiesen werden (Tab. 4.6): zum mittleren Grauwert bestand bei der Homogenität eine schwache positive Korrelation ($r = 0,28$; $p < 0,0001$), zum Kontrast jedoch konnte ein ausgeprägter negativer Zusammenhang nachgewiesen werden ($r = -0,67$; $p < 0,0001$).

Tab. 4.6: Korrelationen zwischen den Echostrukturparametern mittlerer Grauwert, Homogenität und Kontrast. Es wurden die Werte 9 Frühgraviditäten an jeweils 9 Untersuchungstagen (Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen ($n = 324$).

	Mittlerer Grauwert	Homogenität	Kontrast
Mittlerer Grauwert	-	0,28*	-0,02
Homogenität	0,28*	-	-0,67*
Kontrast	-0,02	-0,67*	-

* Korrelation $p < 0,0001$

Betrachtet man die Homogenität im Vergleich mit dem mittleren Grauwert (Abb. 4.17) bzw. dem Kontrast (Abb. 4.18), wird der mehr oder weniger parallele bzw. gegensätzliche Verlauf zwischen den genannten Parametern deutlich.

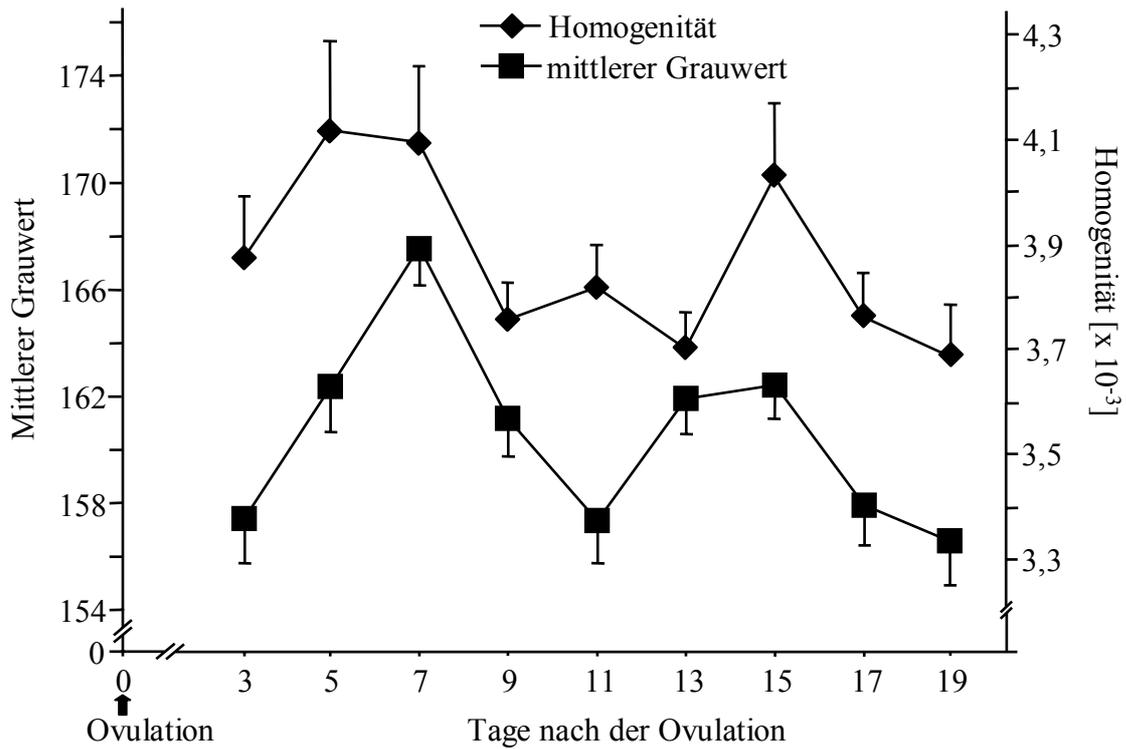


Abb. 4.17: Homogenität und mittlerer Grauwert während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten ($n = 36$).

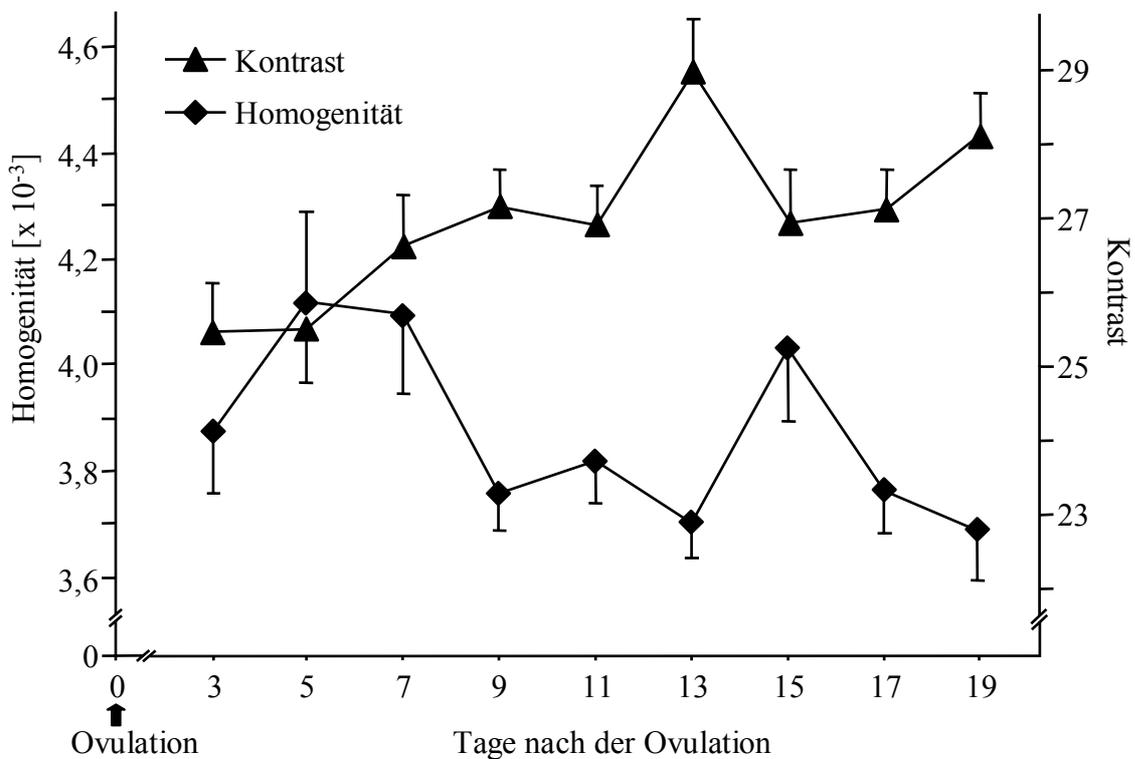


Abb. 4.18: Homogenität und Kontrast während der Frühgravidität. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) während 9 Frühgraviditäten ($n = 36$).

4.3.3. Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Echostrukturanalyse und der Konzentration der Steroidhormone

Im Verlauf der Frühgravidität bestanden keine Korrelationen zwischen der peripheren Plasmaöstrogenkonzentration und den Ergebnissen der Echostrukturanalyse ($-0,01 \leq r \leq 0,04$; $p > 0,05$). Nur ein schwacher, allerdings signifikanter negativer Zusammenhang war dagegen zwischen der Progesteronkonzentration und dem mittlerem Grauwert nachzuweisen ($r = -0,26$; $p < 0,0001$; Tab 4.6). Eine schwache positive Korrelation bestand des weiteren zwischen der Plasmaprogesteronkonzentration und dem Parameter Kontrast ($r = 0,12$; $p < 0,05$). Die Homogenität zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zu den Progesteronkonzentrationen in diesem Zeitraum ($r = -0,05$; $p > 0,05$).

Tab. 4.7: Korrelationen zwischen den Echostrukturparametern und den Progesteron- und Östrogenkonzentrationen im Blutplasma. Es wurden die Mittelwerte von 9 Frühgraviditäten an jeweils 9 Untersuchungstagen (Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen (n = 324).

	Mittlerer Grauwert	Homogenität	Kontrast
Progesteron	-0,26**	-0,05	0,12*
Östrogen	0,04	0,02	-0,01

** Korrelation $p < 0,0001$

* Korrelation $p < 0,05$

4.3.4. Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Echostrukturanalyse und der uterinen Perfusion

Während der Frühgravidität der Kuh bestand zwischen Tag 9 und 19 kein Zusammenhang zwischen den Parametern der Echostrukturanalyse und der uterinen Perfusion ($-0,08 \leq r \leq 0,10$; $p > 0,05$; Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Korrelationen zwischen den Echostrukturparametern (mittlerer Grauwert, Homogenität, Kontrast) und den Blutflussparametern TAMV und PI. Es wurden die Mittelwerte von 9 Frühgraviditäten an jeweils 6 Untersuchungstagen (Tag 9, 11, 13, 15, 17 und 19) herangezogen ($n = 108$).

	Mittlerer Grauwert	Homogenität	Kontrast
TAMV	-0,08	0,02	0,06
PI	0,10	-0,04	-0,07

4.4. Stickstoffmonoxid-Synthase-mRNA-Expression während des Zyklus und der frühen Trächtigkeit¹

4.4.1. RNA-Expression der Haushaltsgene

Um eine Fehlinterpretation zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine Normalisierung der beiden Zielgene iNOS und eNOS mit einem Haushaltsgen durchgeführt. Hierfür wurde in den Endometriumsbiopsaten zunächst die RNA-Expression zweier Haushaltsgene, nämlich die von Ubiquitin und der ribosomalen Untereinheit 18s, durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression von Ubiquitin an Tag 13 des Zyklus im Vergleich zum 13. Graviditätstag (gravidus als auch nichtgravidus Horn) relativ gleich exprimiert war ($p > 0,05$; Abb. 4.19). Die ribosomale Untereinheit 18s war dagegen leichten, aber statistisch gesehen nicht signifikanten Schwankungen unterworfen ($p > 0,05$; Abb. 4.19). Deshalb wurde im folgendem die Normalisierung der absoluten Werte der beiden Zielgene mit Ubiquitin durchgeführt.

¹ Die Analyse der Biopsieproben auf die endometriale Expression der eNOS und iNOS wurde am Institut für Physiologie der Technischen-Universität München-Weihenstephan durchgeführt.

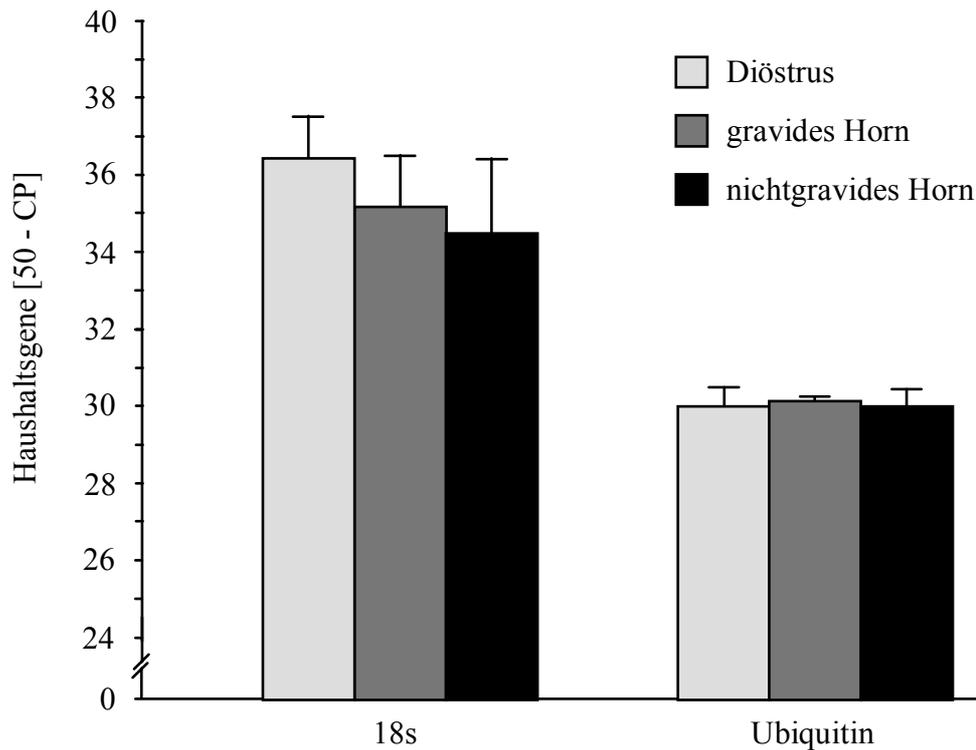


Abb. 4.19: Endometriale Expression der Ubiquitin-mRNA und 18s-rRNA an Tag 13 des Zyklus und der frühen Trächtigkeit. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Kühen während eines Zyklus und einer Frühgravidität (n = 5).

4.4.2. mRNA-Expression der Zielgene iNOS und eNOS

Die endometriale mRNA-Expression der Zielgene iNOS und eNOS wurde durch eine Trächtigkeit nicht beeinflusst, d.h. zwischen Zyklus und gravidem bzw. nichtgravidem Horn bestand an Tag 13 kein Unterschied in der mRNA-Konzentration dieser beiden NO-Synthasen ($p > 0,05$; Abb. 4.20). Des weiteren konnten in der frühen Gravidität keine Differenzen in der iNOS- und eNOS-mRNA-Expression zwischen den beiden Uterushörnern festgestellt werden ($p > 0,05$; Abb. 4.20).

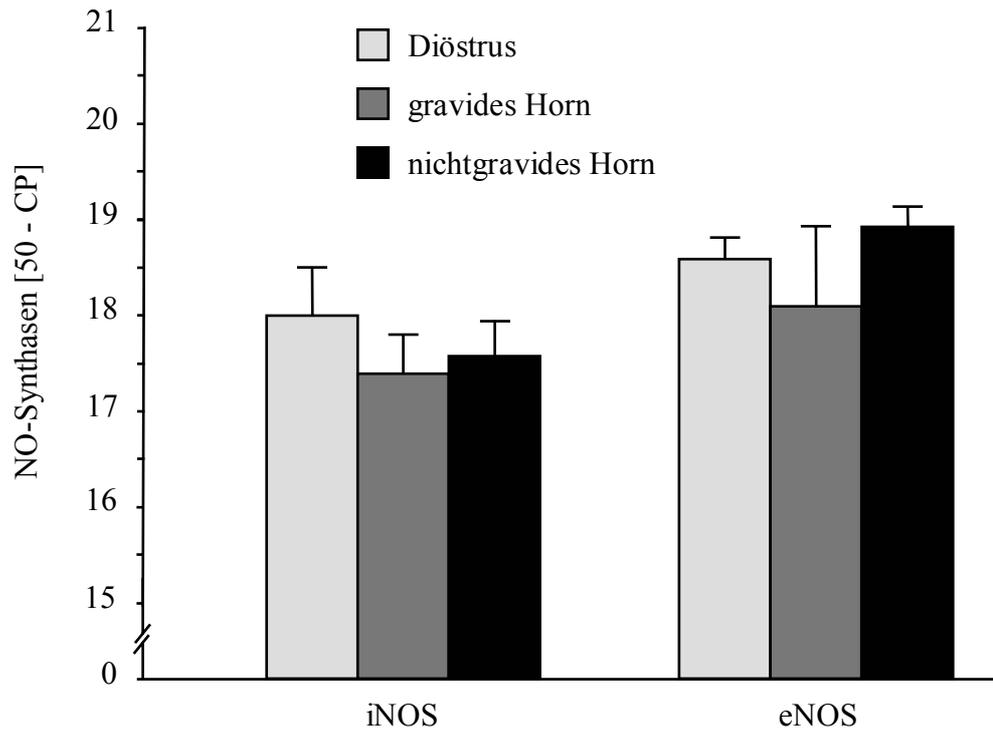


Abb. 4.20: Endometriale mRNA-Expression der Zielgene iNOS und eNOS an Tag 13 des Zyklus und der frühen Trächtigkeit. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Kühen während eines Zyklus und einer Frühgravidität (n = 5).

5. DISKUSSION

Seit Etablierung der Farbdopplersonographie als wertvolles diagnostisches Hilfsmittel in der Gynäkologie der Humanmedizin wird dieses Verfahren auch im veterinärmedizinischen Bereich verstärkt zur Dokumentation der Blutversorgung des inneren Genitales eingesetzt. So konnten bei der Kuh und bei der Stute typische Verlaufsmuster der uterinen Perfusion während des Zyklus (BAUMGARTNER, 1998; BOLLWEIN et al., 1998; MAYER, 1999; SCHMAUDER, 2003) und nach Auslösung inflammatorischer Prozesse am Endometrium (SOWADE, 2001; SCHMAUDER, 2003) nachgewiesen werden. Während der Frühgravidität der Stute war es mittels der Farbdopplersonographie möglich, ab Tag 11 einen deutlichen höheren uterinen Blutfluss im Vergleich zu zyklischen Tieren darzustellen (MAYER, 1999). Beim frühgraviden Rind konnte BAUMGARTNER (1998) in einer begrenzten Anzahl von drei Graviditäten einen vorübergehenden Blutflussanstieg an Tag 13 nachweisen, am gleichen Tag war die uterine Perfusion von zyklischen Tieren dagegen deutlich geringer. Diese Schwankungen der Durchblutung des inneren Genitales werden im Verlauf des Zyklus von vielen Autoren auf den direkten Einfluss der Steroidhormone zurückgeführt (FORD und CHENAULT, 1981; GOSWAMY und STEPTOE, 1988; BAUMGARTNER, 1998; MAYER, 1999; ROHR, 2003; SCHMAUDER, 2003). Einige Studien belegen darüber hinaus, dass die gefäßrelaxierende Wirkung von Östrogen als auch von Progesteron überwiegend von NO vermittelt wird (CHAN et al., 2001; MOLINARI et al., 2001; RUPNOW et al., 2001). Da das NOS-System bereits im Uterus bei verschiedenen Spezies nachgewiesen wurde (u. a. ROSSELLI et al., 1998) und zudem zyklus- und graviditätsabhängige Veränderungen der NOS-Expression aufgedeckt wurden (u. a. KHORRAM et al., 1999; YOSHIKI et al., 2000), vermutet man, dass NO als Vermittler der Sexualsteroiden an der Regulation der Perfusion des inneren Genitales beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob Zusammenhänge zwischen der farbdopplersonographisch untersuchten uterinen Durchblutung, den Sexualsteroidhormonen und dem Stickstoffmonoxid-System im Endometrium des Rindes während der frühen Trächtigkeit bestehen.

Die computergestützte Echostrukturanalyse von Ultraschallbildern stellt seit einigen Jahren in der Humanmedizin neben der subjektiven Beurteilung des sonographischen B-Bildes ein wertvolles Hilfsmittel in der Gewebedifferenzierung dar (GOLDBERG et al., 1992; GARRA et al., 1993; BADER et al., 1994; HUBER et al., 2000; LEFEBVRE et al., 2000). Während der Schwangerschaft können durch den Einsatz dieser Methode bereits frühzeitig Veränderungen an

Plazenta (MORRIS, 1988) und Zervix (WISCHNIK et al., 1999) erkannt werden. In der Gynäkologie der Tiermedizin wurde in den letzten Jahren die computergestützte Echostrukturanalyse ebenfalls für spezifische Fragestellungen eingesetzt. Demnach eignet sich dieses Verfahren zur Beschreibung zyklusbedingter Veränderungen am Ovar (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998; TOM et al., 1998) und Uterus (LORBER, 1999; SCHMAUDER, 2003), sowie zum Erfassen inflammationsbedingter Veränderungen am Endometrium (SCHMAUDER, 2003). Durch den Einsatz eines computergesteuerten Bildanalyseverfahrens am Endometrium des Europäischen Rehs war es möglich, bereits vor Darstellung von embryonalen Strukturen zwischen graviden und nichtgraviden Tieren zu unterscheiden (HERMES, 1997). Ein weiteres Ziel der hier vorgelegten Studie war es deshalb zu prüfen, ob sich beim Rind in den ersten drei Wochen der Frühgravidität Änderungen am Endometrium mittels der computergestützten Echostrukturanalyse erfassen lassen und so bereits vor dem Sichtbarwerden des Embryos eine Gravidität diagnostiziert werden kann. Darüber hinaus wurde geprüft, ob Änderungen der endometrialen Echostruktur möglicherweise im Zusammenhang stehen mit der uterinen Perfusion, der Konzentrationen der Steroidhormone oder der NO-Synthase-Expression im Endometrium.

5.1. Uteriner Blutfluss während der Frühgravidität und Zusammenhang mit der peripheren Steroidhormonkonzentration

Während der ersten drei Wochen der Frühgravidität konnte in dieser Arbeit ein ähnliches uterines Blutflussmuster ermittelt werden, wie es bereits in der Arbeit von BAUMGARTNER (1998) in einer begrenzten Anzahl von drei Trächtigkeiten beschrieben wurde. Die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit (TAMV; Abb. 4.1) war an den Tagen 9 und 11 relativ konstant und stieg zum 13. Trächtigkeitstag vorübergehend um etwa 30 % an, um anschließend wieder auf ein nahezu konstant bleibendes Niveau abzufallen. Der Pulsatility Index (PI; Abb. 4.2) zeigte ein dem Verlauf der TAMV entsprechend gegenläufiges Muster mit einem deutlichem Abfall der Werte am 13. Trächtigkeitstag, anschließend stieg der Blutflusswiderstand wieder kontinuierlich an. Zwischen beiden Parametern bestand eine hohe negative Korrelation ($r = -0,63$; $p < 0,0001$). Im Vergleich der Blutversorgung beider Seiten war an den Tagen 9, 11 und 13 auf der graviden Seite die TAMV deutlich höher ($p < 0,05$; Abb. 4.5) und dem entsprechend der PI signifikant geringer ($p < 0,01$; Abb. 4.6). Ein Unterschied in der Blutversorgung beider Seiten konnte auch von FORD et al. (1979) in den ersten 30 Tagen der Trächtigkeit bestätigt werden. Allerdings wird von diesen Autoren auf der graviden Seite ein

Blutflussanstieg um das 2- bis 3-fache 14 bis 18 Tage nach dem Östrus beschrieben, was in der vorliegenden Arbeit mit einem Anstieg um etwa 30 % nicht bestätigt werden konnte. Ursächlich könnte die invasive Methode der Blutflussmessung durch Implantation elektromagnetischer Blutflusssonden in den Studien von FORD et al. (1979) sein, wohingegen in dieser Arbeit mittels der transrektalen Farbdopplersonographie der A. uterina ein nichtinvasives Verfahren zur Dokumentation der uterinen Perfusion verwendet wurde.

Das hier während der Trächtigkeit beschriebene uterine Blutflussmuster (Abb. 5.1) unterscheidet sich deutlich von demjenigen bei zyklischen Kühen, wo die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit während der Lutealphase relativ konstant bleibt und erst zum Proöstrus hin deutlich ansteigt (BAUMGARTNER, 1998; SCHMAUDER, 2003).

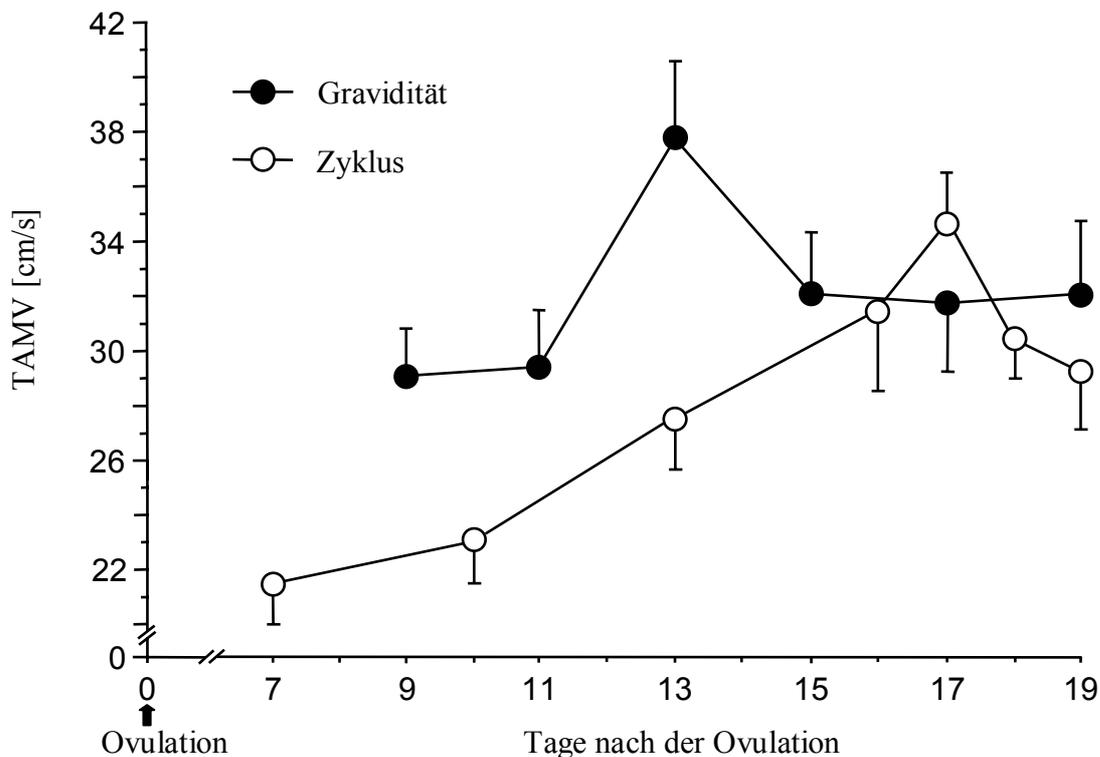


Abb. 5.1: Mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit während der Frühgravidität und während des Zyklus. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 graviden Kühen während je zwei Trächtigkeiten (eigene Studie) und 4 zyklischen Kühen während je zwei Zyklen (SCHMAUDER, 2003).

BAUMGARTNER (1998), der in seinen Studien Blutflussmessungen sowohl bei zyklischen, als auch bei trächtigen Kühen durchführte, konnte so im Vergleich seiner Ergebnisse deutliche Unterschiede zwischen Zyklus und Gravidität darstellen: so war die uterinen Perfusion an Tag 13 bei trächtigen Kühen deutlich höher, an Tag 18 der Gravidität dagegen signifikant geringer. Der

Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denen der vorhergegangenen Studie von SCHMAUDER (2003) bei zyklischen Kühen lässt allerdings vermuten, dass bei trächtigen Tieren die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit auch schon vor Tag 13 deutlich erhöht ist (Abb. 5.1). MAYER (1999) konnte in seinen Untersuchungen an frühgraviden Stuten belegen, dass der Uterus bereits ab dem 5. Trächtigkeitstag, an dem physiologischerweise die befruchtete Eizelle in den Uterus übertritt, besser durchblutet war als im Zyklus.

In mehreren Studien bei zyklischen Rindern wurde eine positive Beziehung zwischen der Östrogenkonzentration im Blutplasma und der uterinen Blutflussgeschwindigkeit nachgewiesen (FORD et al., 1979; FORD und CHENAULT, 1981; BAUMGARTNER, 1998; SCHMAUDER, 2003). Während der Frühgravidität war in der vorliegenden Arbeit jedoch ein Zusammenhang zwischen der peripheren Östrogenkonzentration und der TAMV bzw. dem PI nicht darstellbar ($p > 0,05$). Für die Plasmaprogesteronkonzentration konnten dagegen geringgradige, aber signifikante Zusammenhänge sowohl mit der TAMV ($r = 0,35$; $p < 0,0001$), als auch mit dem PI ($r = -0,34$; $p < 0,0001$) ermittelt werden. In den Untersuchungen von FORD et al. (1979) konnte diese Beziehung bei trächtigen Kühen ebenfalls nachgewiesen werden: demnach bestand kein Zusammenhang zwischen uterinem Blutfluss und systemischer Östrogenkonzentration, aber eine hohe Korrelation zwischen der Progesteronkonzentration im Blutplasma und der Durchblutung des graviden Uterushornes. Ähnliche Verhältnisse wurden von MAYER (1999) während der Frühgravidität der Stute beschrieben. Nach einer Hypothese von FORD et al. (1979) führt der Blutflussanstieg auf der graviden Seite sekundär zu einer gesteigerten Durchblutung und Progesteronsekretion des Corpus luteum, wodurch diese Zusammenhänge zwischen peripherer Progesteronkonzentration und uteriner Perfusion bestätigt werden.

Als Ursache des vorübergehenden Blutflussanstiegs wird beim Rind eine lokale Regulation durch den Embryo vermutet. FORD et al. (1979) und BAUMGARTNER (1998) führen diese Blutflusszunahme auf die Östrogenproduktion des Embryos zurück. Dieser ist zwischen dem 11. und 16. Graviditätstag in der Lage, 17- β -Östradiol zu produzieren (WILSON et al., 1992). Intrauterin bzw. intravenös appliziert sind Östrogene in der Lage, den uterinen Blutfluss vorübergehend zu steigern (ROMAN-PONCE et al., 1978; FORD et al., 1982; KNICKERBOCKER et al., 1986). Da die Östrogensynthese durch den bovinen Embryo jedoch sehr gering ist, ist auch eine Beteiligung anderer Faktoren an der Regulation der uterinen Perfusion zu vermuten, da während dieser Trächtigkeitsphase im Uteruslumen auch andere vasodilatatorisch wirksame Steroide wie Prostaglandin E₂ in weitaus höherer Konzentration

vorhanden sind. Demnach ist um den 12. Tag der Gravidität im graviden Horn ein etwa zweifach höherer PGE₂-Gehalt vorhanden als im nichtgravidem Horn (SHELTON et al., 1990). Da der Blutflussanstieg auch in der eigenen Studie nur auf der graviden Seite signifikant war, kann die Annahme, dass die Steigerung der uterinen Perfusion durch einen Faktor embryonalen Ursprungs ausgelöst wird, bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von FORD et al. (1979) konnte in der vorliegenden Arbeit zum 13. Trächtigkeitstag jedoch auch ein tendenzieller Anstieg des uterinen Blutflusses auf der nichtgraviden Seite festgestellt werden (Abb. 4.5). Dies stimmt mit den Ergebnissen von BAUMGARTNER (1998) überein. Man kann also davon ausgehen, dass die vom Embryo produzierten Steroide auch in das nichtgravide Horn gelangen und den uterinen Stoffwechsel beeinflussen, hier aber in weitaus geringerer Konzentration vorliegen.

5.2. Endometriale Echostruktur während der Frühgravidität

In der vorliegenden Studie wurden für die computergestützte Echostrukturanalyse im wesentlichen die gleichen methodischen Grundlagen herangezogen, wie sie bereits in der Arbeit von SCHMAUDER (2003) beschrieben wurden. Demnach wurden die mittels einer 7,0 MHz Sonde aufgenommenen Bilder in digitaler Form direkt auf einem Aufnahmegerät abgespeichert. Die Tatsache, dass die Verwendung von schlechteren Sonden bzw. eine Zwischenspeicherung von Aufnahmen auf einem analogen Videorekorder zu einem Qualitäts- und Informationsverlust der sonographisch aufgenommenen B-Bilder führt, ist durch SCHMAUDER (2003) ausführlich beschrieben und nach Ansicht der Autorin auch Ursache, dass Änderungen der endometrialen Echostruktur, wie in der Arbeit von GERTSCH (1997), nicht erfasst werden können. Die Reproduzierbarkeit der Methode der Echostrukturanalyse wurde ebenfalls in der Arbeit von SCHMAUDER (2003) überprüft und nachgewiesen.

Für die computergestützte Echostrukturanalyse wurden in dieser Arbeit je ein Längs- und ein Querschnitt pro Uterushorn ausgewertet. Die Querschnitte wurden im Bereich der Curvatura major, die Längsschnitte kurz vor der Curvatura major angefertigt. Im Gegensatz zu SCHMAUDER (2003), die pro Aufnahme 4 rechtwinklige ROI (= Region of interest) mit einer Mindestgröße von je 1000 Pixel zur Texturanalyse analysiert hat, wurde in dieser Arbeit pro sonographischem B-Bild eine einzige ROI ausgewertet: an den Querschnitten das gesamte Endometrium, an den Längsschnitten ein Anteil des sondenfern dargestellten Endometriums (siehe Abb. 3.1 und 3.2). Artefakte und das Uteruslumen konnten durch ein exaktes Markieren

des zu analysierenden Bereichs ausgeschlossen werden. Diese Methode ermöglicht eine objektivere Auswertung der B-Bilder, denn das Endometrium stellt sich nicht als eine einheitlich homogene Struktur dar: wie aus Abb. 3.1 deutlich wird, gibt es endometriale Bereiche, die sich dem Betrachter heller bzw. dunkler darstellen. Beim Setzen von mehreren rechtwinkligen ROIs, wie es in der Arbeit von HERMES (1997), LORBER (1999) und SCHMAUDER (2003) erfolgte, ist eine subjektive Beeinflussung durch den Untersucher also nicht völlig auszuschließen. GERTSCH (1997) analysierte am Pferdeendometrium ebenfalls nur eine einzige große ROI, diese konnte jedoch im Rahmen des verwendeten Echostrukturprogramms nur rechtwinklig in den zu analysierenden Bereich eingesetzt werden, weshalb eine artefaktfreie Darstellung des Endometriums nicht immer gewährleistet war. KRETZSCHMAR (2004), die in ihrer Arbeit die Abhängigkeit der Ergebnisse der Echostrukturanalyse von der Größe der einzelnen ROIs untersuchte, bewertete die Gesamtflächenauswertung des Endometriums als die Methode mit der geringsten Varianz.

Zu Beginn der Untersuchungen der endometrialen Echostuktur in der Tiermedizin wurde nur ein Parameter, nämlich der mittlere Grauwert, eingesetzt. In den Arbeiten von HERMES (1997) und LORBER (1999) wurde dieser Parameter erstmals zur Beschreibung graviditäts- bzw. zyklusbedingter Schwankungen der Helligkeit am Endometrium erfolgreich eingesetzt. In der hier vorgelegten Arbeit wurden drei verschiedene Echostrukturparameter verwendet: neben dem mittleren Grauwert als Parameter des eindimensionalen Histogramms der ersten Ordnung, die Homogenität und der Kontrast als Vertreter der Co-occurrence-Matrizen der zweiten Ordnung. Durch die beiden letztgenannten Parameter können zusätzlich Informationen über die Mikro- und Makrostruktur im Bild erfasst werden (DELORME und ZUNA, 1995; HUBER et al., 2000). SCHMAUDER (2003) verwendete neben den Parametern mittlerer Grauwert und Homogenität einen Parameter aus der Gradientenstatistik der ersten Ordnung, den mittleren Gradientenbetrag. Durch diesen konnte jedoch kein Informationszuwachs gegenüber der alleinigen Bestimmung der Bildhelligkeit, gemessen am mittleren Grauwert, erzielt werden.

Wie bereits erwähnt (siehe 4.3.), konnten für die Ergebnisse der Echostruktur nur die Auswertungen von 9 Frühgraviditäten berücksichtigt werden. Nachdem Kuh B frisch in den Bestand aufgenommen wurde, tolerierte diese längere Untersuchungszeiten nur sehr schlecht, so dass es innerhalb kürzester Zeit aufgrund von starker Presstätigkeit zu einer Ödematisierung des Darms und dadurch Verfälschung der endometrialen Echostruktur während der ersten Frühgravidität kam.

Im Vergleich der Ergebnisse der Echostruktur von Längs- und Querschnitten ergab sich in dieser Arbeit ein signifikanter, aber absolut gesehen nur geringer Unterschied (Tab. 4.3). Zum einen könnte dieser Unterschied hervorgerufen werden, indem Längs- oder Querschnitte vom Uterus bestimmte endometriale Strukturen unterschiedlich gut darstellen. Da in der Arbeit von SCHMAUDER (2003) zwischen diesen beiden Schnitten des Uterus kein Unterschied festgestellt werden konnte, lässt sich diese mögliche Ursache wohl auch in der frühen Trächtigkeit ausschließen. Zum anderen wurden in der eigenen Arbeit, im Gegensatz zu den Untersuchungen von SCHMAUDER (2003), die beiden sonographischen Schnitte nicht an der gleichen Stelle des Uterus angefertigt. Es ist also denkbar, dass das Endometrium während der frühen Trächtigkeit nicht als eine gesamte Einheit kodiert ist, sondern, ähnlich wie es während des Zyklus beschrieben ist (BAUERSACHS et al., 2004), von der Hornspitze bis zum Corpus uteri ein unterschiedliches Aktivitätsmuster von Genen und Proteinen vorliegt, das sich während der Trächtigkeit auch qualitativ und quantitativ laufend verändert (BARTOL et al., 1981) und so Veränderungen der endometrialen Echostruktur widerspiegeln könnte.

Zwischen gravidem und nichtgravidem Horn konnte in dieser Arbeit kein Unterschied in der endometrialen Echostruktur herausgefunden werden (Tab. 4.4; Abb. 4.14, Abb. 4.15 und Abb. 4.16). Im Gegensatz zum uterinen Blutfluss war demnach ein lokaler Einfluss des Konzeptus auf die Struktur des Endometriums nicht nachzuweisen. Vielmehr scheint es, dass das Endometrium als eine Einheit, unabhängig von der Lokalisation des Embryos, auf eine Trächtigkeit reagiert. Eine lokale Beeinflussung der direkt an den Konzeptus angrenzenden endometrialen Bezirke ist dennoch nicht ganz auszuschließen, da in dieser Studie die B-Bilder vom Uterus nicht direkt im Bereich des Embryos angefertigt wurden.

Während der Frühgravidität zeigte der mittlere Grauwert einen deutlichen Abfall der Werte am 11. Trächtigkeitstag (Abb. 4.9). Vergleichende Studien zum Verlauf des mittleren Grauwerts während der Trächtigkeit wurden bisher nur beim europäischem Reh (*Capreolus capreolus*) in der embryonalen Diapause von HERMES (1997) durchgeführt. Dieser konnte bei tragenden Tieren eine Zunahme dunkler Graustufen in der Echotextur des Endometriums feststellen, ab dem dritten Monat der embryonalen Diapause war dieser Unterschied im Graustufenhistogramm zwischen tragenden und nichtgraviden Tieren signifikant. Mit Beginn der Elongationsphase des Trophoblasten jedoch verlor das Endometrium wieder seine dunkle Echotextur. Beim bovinen Embryo wird der Beginn des Elongationsstadiums mit dem 13. Graviditätsstag angesetzt (GUILLMOT, 1995). Demnach kann ein Verlust der dunklen, endometrialen Echostruktur mit

Beginn des Längenwachstums der Blastocyste auch beim Rind nachvollzogen werden, da in dieser Arbeit zwischen Tag 11 und 13 wieder ein signifikanter Anstieg des mittleren Grauwertes beobachtet werden konnte ($p < 0,05$).

Als Ursache der Zunahme dunkler Graustufen im Endometrium des europäischen Rehs sah HERMES (1997) eine Anreicherung von Sekretvesikeln in Zellen des endometrialen Drüsenepithels, diese Strukturveränderungen sind in der ultrastrukturellen Arbeit von AITKEN et al. (1973) belegt. Beim Rind sind bisher keine Studien zur Morphologie des Endometriums in der frühen Gravidität bekannt, STROBAND et al. (1986) beschreiben jedoch beim Schwein eine ähnliche Anreicherung von Sekretvesikeln im glandulärem Epithel bis zum 11. Graviditätstag. Diese werden bei trächtigen Sauen nach Tag 11 plötzlich freigesetzt, möglicherweise ausgelöst durch die embryonale Östrogensynthese, die um diesen Zeitpunkt beginnt. Dies führt zu einem Anstieg der intraluminalen Proteinkonzentration. Die genannten Autoren vermuten, dass dadurch das Längenwachstum der Blastocyste, welches ab Tag 11 einsetzt, ermöglicht wird. Beim Rind wäre demnach ein ähnlicher morphologischer Hintergrund vor Einsetzen des Elongationsstadiums der Blastocyste um den 13. Trächtigkeitstag denkbar.

Der Vergleich der prozentualen Änderungen dieses Parameters in den vorliegenden Ergebnissen mit denen der vorhergegangenen Studie von SCHMAUDER (2003), wo Untersuchungen zur endometrialen Echostruktur bei zyklischen Rindern durchgeführt wurden, lässt einen deutlichen Unterschied im Verlauf des mittleren Grauwerts zwischen graviden und zyklischen Tieren erkennen (Abb. 5.2). Während in den ersten drei Wochen der Trächtigkeit der Verlauf des Parameters mit einem signifikanten Abfall der Werte zum 11. Graviditätstag als biphasisch umschrieben werden kann, ist während des Zyklus der mittlere Grauwert um diesen Zeitpunkt keinen deutlichen Schwankungen unterworfen. Sein Verlauf ist während der Lutealphase weitgehend konstant und fällt erst langsam gegen Ende des Diöstrus hin ab, im Östrus sind die Werte des Parameters am geringsten. Dadurch kann dieses Muster wohl eher als monophasisch bezeichnet werden. Ein direkter Vergleich der Werte des mittleren Grauwerts war zwischen diesen beiden Studien allerdings nicht möglich, da in den Untersuchungen von SCHMAUDER (2003) ein anderes computergestütztes Echostrukturprogramm verwendet wurde. Somit lassen sich keine Aussagen über die absolute Höhe bzw. Differenz der Echostrukturparameter zwischen zyklischen und graviden Tieren treffen.

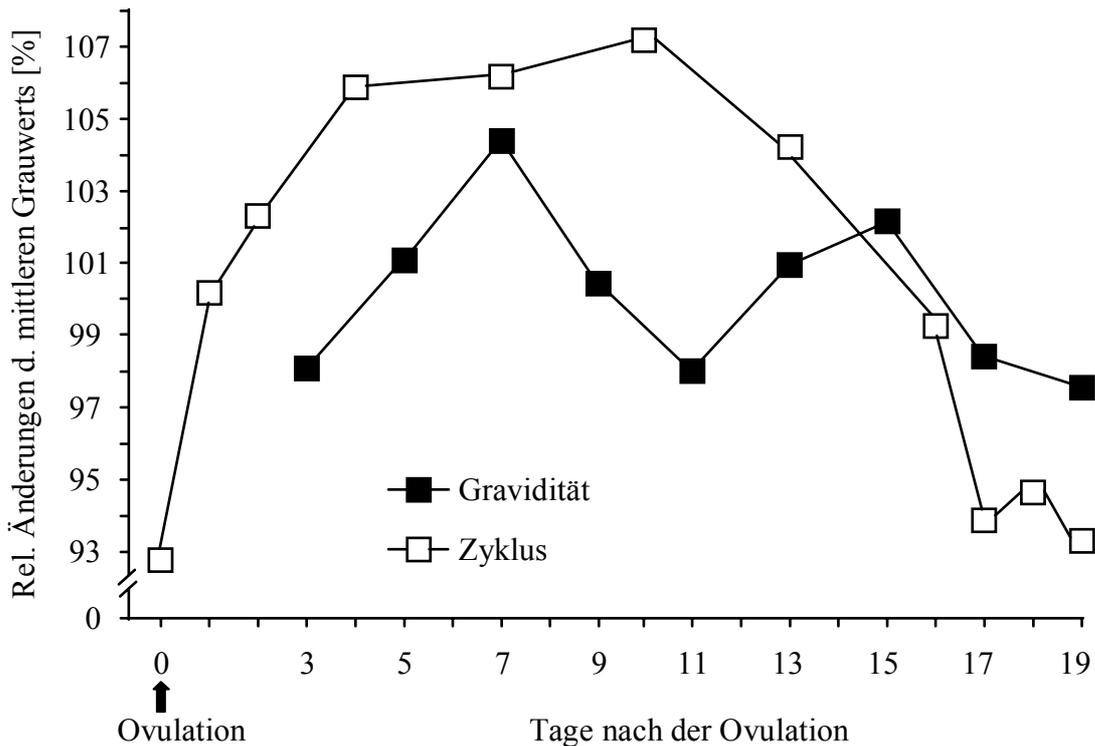


Abb. 5.2: Relative Änderungen des mittleren Grauwerts während der Frühgravidität (eigene Studie) und während des Zyklus (mod. nach SCHMAUDER, 2003). Es sind jeweils die Mittelwerte von 9 Frühgraviditäten (eigene Studie) bzw. 8 Zyklen (SCHMAUDER, 2003) dargestellt. Mittelwerte der Tage 3 bis 19 (Gravidität) bzw. 0 bis 19 (Zyklus) = 100%.

Die Homogenität des Endometriums war am 5. und 15. Trächtigkeitstag sehr hoch, während dazwischen, an den Tagen 9 bis 13, basale Werte zu verzeichnen waren (Abb. 4.12).

Vergleichende Studien zum Verlauf dieses Echostrukturparameters während der Trächtigkeit sind bisher in der Literatur nicht bekannt. Beim zyklischen Rind wurden Veränderungen in der Homogenität des Endometriums durch SCHMAUDER (2003) beschrieben: im Gegensatz zu der vorliegenden Studie verhielten sich die Werte der Homogenität während des Zyklus genau umgekehrt zum mittleren Grauwert und waren im Proöstrus und Östrus sehr hoch, während im Diöstrus durchwegs basale Werte ohne deutliche Schwankungen zu messen waren. Die Autorin bezog den Abfall des mittleren Grauwerts bzw. den Anstieg der Homogenität auf eine Ödematisierung des Endometriums während der Brunst.

Der Vergleich der relativen Veränderungen dieses Parameters lässt wieder einen deutlichen Unterschied zwischen Zyklus und früher Trächtigkeit erkennen (Abb. 5.3). Während bei graviden Tieren zwischen Tag 3 und 9 ein vorübergehender Anstieg der Homogenität vorhanden war, blieb bei zyklischen Tieren in diesem Zeitraum dieser Parameter konstant. Dieser Anstieg

könnte durch den Konzeptus ausgelöst werden, der nach einer Eileiterpassage von 4 bis 5 Tagen in den Uterus übertritt (GUILLOMOT, 1995) und hier morphologischen Veränderungen im Sinne einer endometrialen Ödematisierung hervorruft. SCHMAUDER (2003) konnte nach artifizierlicher Auslösung einer Entzündung im Uterus ebenfalls einen Anstieg der Homogenität beobachten. Im weiteren Verlauf ist nach dem 13. Tag sowohl bei zyklischen, als auch bei graviden Tieren ein Anstieg, zwischen Tag 15 und 19 allerdings während der Gravidität, im Gegensatz zum Zyklus, ein Abfall der Homogenität zu verzeichnen. Dies spiegelt in der Trächtigkeit das Ausbleiben des Brunstödems wider. Der vorübergehende Anstieg der Homogenität zum 15. Trächtigkeitstag könnte ebenso Ausdruck einer endometrialen Ödematisierung, ausgelöst durch den vorübergehenden Blutflussanstieg an Tag 13, sein. Auch in der Studie von SCHMAUDER (2003) folgten Maximalwerte der Homogenität während des Östrus (Tag -2) der maximalen uterinen Perfusion (Tag -3) mit einem Tag Verzögerung.

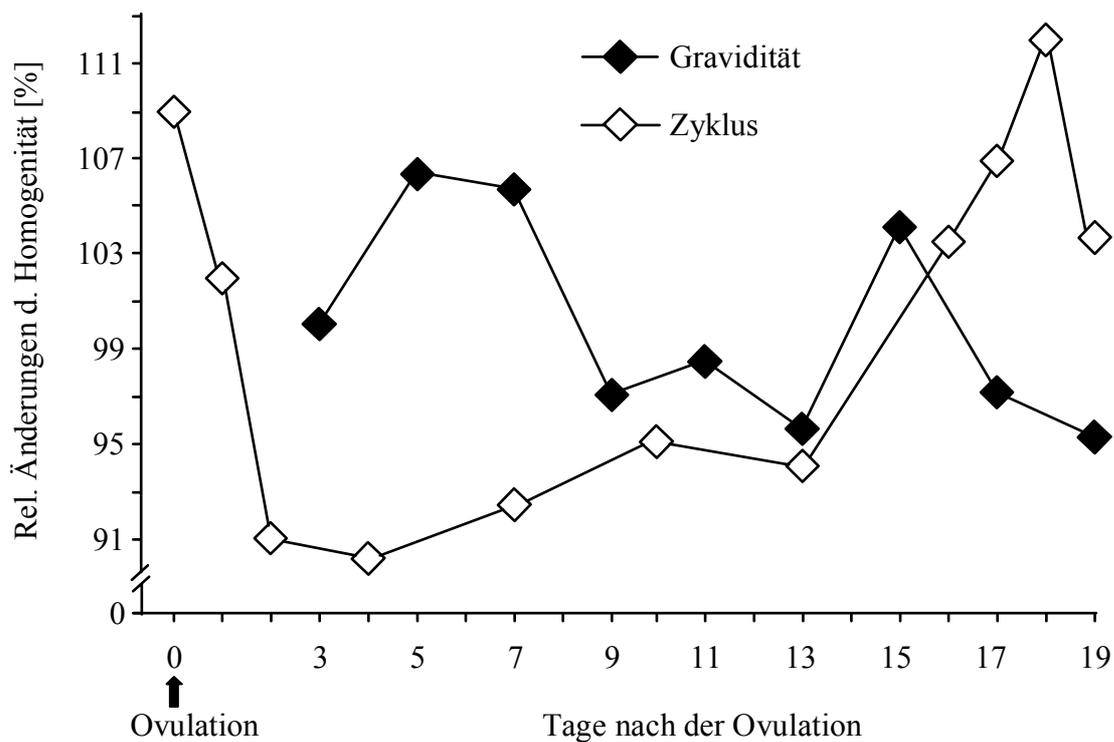


Abb. 5.3: Relative Änderungen der Homogenität während der Frühgravidität (eigene Studie) und während des Zyklus (mod. nach SCHMAUDER, 2003). Es sind jeweils die Mittelwerte von 9 Frühgraviditäten (eigene Studie) bzw. 8 Zyklen (SCHMAUDER, 2003) dargestellt. Mittelwerte der Tage 3 bis 19 (Gravidität) bzw. 0 bis 19 (Zyklus) = 100%.

Beim dritten Echostrukturparameter Kontrast stiegen die Werte zwischen Tag 3 und 19 kontinuierlich an, wobei ein vorübergehender, starker Anstieg des Parameters zum 13. Trächtigkeitstag zu verzeichnen war (Abb. 4.13). Das bedeutet, dass am 13. Tag sehr oft große Grauwertdifferenzen zwischen definierten Pixelpaaren zu messen waren. Betrachtet man die uterine Perfusion, war diese ebenfalls an Tag 13 am höchsten. Demnach kann man davon ausgehen, dass eine zeitlich begrenzte Dilatation von Blutgefäßen im Uterus vorhanden ist und diese stark gefüllten Gefäße auch in den B-Bildern des Endometriums dargestellt werden. Da sich Flüssigkeiten im Ultraschallbild echoarm darstellen, sind vermutlich aus diesem Grund große Grauwertdifferenzen im Endometrium vorhanden, welche zu einem Anstieg des Kontrasts am 13. Trächtigkeitstag führen könnten. Während des Zyklus oder der Gravidität wurden vergleichende Studien zum Verlauf dieses Parameters bisher nicht durchgeführt.

5.3. Zusammenhang zwischen endometrialer Echostruktur, uteriner Perfusion und der Konzentration der Steroidhormone

Zwischen der peripheren Plasmaöstrogenkonzentration und den Ergebnissen der Echostrukturanalyse konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang nachgewiesen werden ($-0,01 \leq r \leq 0,04$; $p > 0,05$; Tab. 4.7). Des Weiteren bestand keine Korrelation zwischen den Gestagenkonzentrationen und dem Echostrukturparameter Homogenität ($r = -0,05$; $p > 0,05$; Tab. 4.7). Vergleicht man die Änderungen der Progesteronkonzentration mit denjenigen des mittleren Grauwerts, so ergibt sich ein schwacher, allerdings signifikanter negativer Zusammenhang im Verlauf der frühen Trächtigkeit ($r = -0,26$; $p < 0,0001$; Tab. 4.7). Eine schwache positive Korrelation bestand des Weiteren zwischen der Plasmaprogesteronkonzentration und dem Parameter Kontrast ($r = 0,12$; $p < 0,05$; Tab. 4.7). SCHMAUDER (2003) konnte zwar in den einzelnen Zyklusphasen deutliche Zusammenhänge zwischen der Östrogenkonzentration und der Homogenität im Proöstrus und Östrus bzw. der Progesteronkonzentration und dem mittlerem Grauwert im Met- und Diöstrus erstellen, bezogen auf den gesamten Zyklus jedoch ergab sich eine deutliche positive Korrelation nur zwischen den Gestagenen und dem mittlerem Grauwert, aber nur geringgradige Zusammenhänge zwischen den Steroiden und der Homogenität.

In der frühen Trächtigkeit konnte darüber hinaus in der eigenen Arbeit kein Zusammenhang zwischen der uterinen Perfusion und der Echostruktur des Endometriums festgestellt werden

($-0,08 \leq r \leq 0,10$; $p > 0,05$; Tab. 4.8). SCHMAUDER (2003) konnte während des Zyklus ebenfalls nur eine schwache Korrelation zwischen diesen Parametern nachweisen. Demnach kann bestätigt werden, dass sowohl beim zyklischen Rind, als auch während der frühen Trächtigkeit weder das Blutflussmuster, noch die Konzentration der Steroidhormone den sonographisch erfassbaren Veränderungen der endometrialen Echostruktur entsprechen. An den Veränderungen des Endometriums müssen demnach während der frühen Trächtigkeit auch andere, in der vorliegenden Arbeit nicht erfasste Faktoren, maßgebend beteiligt sein.

5.4. Endometriale NO-Synthase-Expression während der Frühgravidität

In der hier vorliegenden Arbeit konnte an Tag 13 weder zwischen Zyklus und Gravidität, noch zwischen gravidem und nichtgravidem Horn ein Unterschied in der endometrialen mRNA-Expression der iNOS und eNOS festgestellt werden ($p > 0,05$; Abb. 4.20). Dies steht im Gegensatz zur Frühgravidität der Stute, wo ROHR (2003) im Vergleich zu zyklischen Tieren in der Trächtigkeit bei erhöhten uterinen und ovariellen Blutfluss auch große Mengen an iNOS-mRNA in den Endometriumsbiopaten nachweisen konnte. Die Autorin nahm deshalb an, dass die induzierbare Form der NO-Synthasen diese Blutflusssteigerung bei der frühgraviden Stute hervorruft. Beim Rind liegt deshalb die Vermutung nahe, dass der vorübergehende graviditätsbedingte Blutflussanstieg an Tag 13 nicht durch NO, sondern durch andere, in dieser Arbeit nicht berücksichtigte, vasodilatatorische Faktoren vermittelt wird. Da die Biopsieproben des Endometriums im graviden Horn allerdings nicht in unmittelbarer Nähe des Konzeptus entnommen wurden, ist eine lokale Beeinflussung des NOS-Systems durch den Embryo dennoch nicht ganz auszuschließen. Darüber hinaus ist durch eine transcervicale Entnahme von Endometriumsbiopaten nicht immer gewährleistet, den gleichen Gewebetyp (karunkulärer oder interkarunkulärer Bereich) zu gewinnen, wodurch die Analyse der Biopsieproben beeinflusst werden kann.

5.5. Schlussfolgerungen

Während der Frühgravidität des Rindes war es mit Hilfe der Farbdopplersonographie der A. uterina möglich, ein spezifisches Blutflussmuster zu ermitteln, das durch einem deutlichen Anstieg der TAMV bzw. Abfall des PI zum 13. Trächtigkeitstag charakterisiert war. Darüber hinaus konnten durch die Echostrukturanalyse des Endometriums Strukturveränderungen am graviden Uterus erfasst werden: der mittlere Grauwert zeigte einen deutlichen Abfall der Werte

zum 11. Trächtigkeitstag, der Verlauf der Homogenität war annähernd parallel dazu. Beim Parameter Kontrast stiegen die Werte vorübergehend zum 13. Graviditätstag an. Weder die Veränderungen der uterinen Perfusion noch die Schwankungen der Werte für die hier verwendeten Echostrukturparameter ließen sich auf die periphere Konzentration der Steroidhormone zurückführen. Des weiteren war kein deutlicher Zusammenhang zwischen dem uterinen Blutfluss und der endometrialen Echostruktur herzuleiten. Im Vergleich mit zyklischen Kühen (SCHMAUDER, 2003) zeigten die absoluten Veränderungen der uterinen Perfusion bzw. die relativen Veränderungen der Echostrukturparameter mittlerer Grauwert und Homogenität deutliche Unterschiede an. Bei graviden Kühen nahm die uterine Perfusion zum 13. Trächtigkeitstag vorübergehend um etwa 30 % zu, wohingegen bei zyklischen Tieren der Blutfluss zu diesem Zeitpunkt weitgehend konstant ist. Der mittlere Grauwert zeigte in der vorliegenden Studie einen wellenförmigen Verlauf mit einem deutlichen Abfall der Werte zum 11. Trächtigkeitstag, in den Ergebnissen von SCHMAUDER (2003) dagegen war dieser Parameter während des Diöstrus keinen Schwankungen unterworfen. Im Gegensatz zu zyklischen Tieren stiegen die Werte der Homogenität während der Trächtigkeit zwischen Tag 3 und 9 vorübergehend an und waren nach Tag 15 durch Ausbleiben der Brunst konstant niedrig. Demnach kann eine Gravidität durch die Farbdopplersonographie der A. uterina und die Echostrukturanalyse vom Endometrium bereits vor sonographischem Sichtbarwerden des Embryos diagnostiziert werden. Die Ergebnisse bilden somit möglicherweise die Basis für die Bearbeitung wissenschaftlicher Untersuchungen, die sich mit Fragestellungen in der Frühgravidität befassen. Für die Praxis ist die Aussagekraft einer positiven Trächtigkeitsdiagnose vor Sichtbarwerden des Embryos gering, da der Hauptteil der embryonalen Mortalität, welche mit ca. 30 % angesetzt wird, zwischen den Tagen 8 und 16 stattfindet (DISKIN und SREENAN, 1980). Darüber hinaus wird die Verwendung in der Routinediagnostik durch den hohen Arbeitsaufwand und die Variabilität der Messergebnisse eingeschränkt.

Des weiteren konnten in dieser Arbeit erstmals sowohl die endotheliale als auch die induzierbare Form der NO-Synthase im frühgraviden Endometrium des Rindes nachgewiesen werden. Da in ihrer Expression kein Unterschied zum zyklischen Endometrium bestand, ist daraus zu schließen, dass NO während der frühen Gravidität der Kuh vermutlich nicht an der Regulation der uterinen Perfusion beteiligt ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob beim Rind in den ersten drei Wochen der Frühgravidität Zusammenhänge zwischen Änderungen im uterinen Blutfluss, der Morphologie des Endometriums, dem Stickstoffmonoxid-System und der Konzentration der Steroidhormone Östrogen und Progesteron bestehen. Daneben sollte untersucht werden, ob mittels der computergestützten Echostrukturanalyse des sonographischen B-Bildes des Endometriums und der Farbdopplersonographie der A. uterina bereits vor dem Sichtbarwerden des Embryos eine Gravidität diagnostiziert werden kann.

Die Untersuchungen erfolgten an 5 Kühen der Rasse deutsches Fleckvieh in jeweils drei Graviditäten. Die Tiere wurden im Östrus mit 0,5 ml Nativsperma eines fertilen Bullen inseminiert. Unmittelbar danach wurde für die Ovulationseinleitung ein GnRH-Analogon intramuskulär injiziert. Während der ersten beiden Graviditäten wurden wiederholte sonographische Aufzeichnungen im B-Mode zur computergestützten Echostrukturanalyse des Endometriums nach folgendem zeitlichen Schema durchgeführt: Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 (Tag 0 = Tag der Ovulation). Parallel dazu erfolgten farbdopplersonographische Untersuchungen der A. uterina für die Bestimmung des uterinen Blutflusses an den Tagen 9, 11, 13, 15, 17 und 19. Alle Untersuchungen beinhalteten die Gewinnung einer Blutprobe zur Bestimmung der Plasmaprogesteron- und -östrogenkonzentration. Die Trächtigkeit wurde bei jeder dieser 10 Graviditäten sonographisch an Tag 25 durch Nachweis der embryonalen Herzaktion bestätigt. An Tag 13 der dritten Frühgravidität wurde eine Uterusbiopsieprobe für die Bestimmung der endometrialen Expression der Stickstoffmonoxid-Synthasen entnommen. Nach Einleitung der Luteolyse am Tag der Probenentnahme wurde an Tag 13 des darauffolgenden Diöstrus ein weiteres Endometriumbiopat gewonnen.

Die uterine Perfusion wurde anhand der mittleren maximalen Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) und des Pulstility Index (PI) beurteilt. Für die computergestützte Echostrukturanalyse der sonographischen B-Bilder wurden, unter Verwendung des Softwareprogramms MaZda (Institute of Electronics, Technical University of Lodz/Polen), die Parameter mittlerer Grauwert, Homogenität und Kontrast herangezogen. Die Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut wurden mittels Enzym-Immuno-Assay (EIA) bestimmt. Aus den Endometriumbiopataten erfolgte die Expressionsanalyse der mRNA der endothelialen und induzierbaren NO-Synthasen (eNOS und iNOS) mit Hilfe der „real-time“ PCR.

Die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit stieg zwischen Tag 9 und 13 vorübergehend an, dieser Anstieg war nur auf der graviden Seite signifikant ($p < 0,05$). Der Pulsatility Index zeigte ein gegensätzliches Verhalten und fiel zum 13. Trächtigkeitstag deutlich ab ($p < 0,01$). Zwischen den Tagen 9 und 13 war die TAMV auf der graviden Seite deutlich höher und der PI dementsprechend geringer ($p < 0,05$).

Bei allen Tieren konnten im Verlauf der Frühgravidität gleichförmige Veränderungen der Echostrukturparameter mittlerer Grauwert, Homogenität und Kontrast festgestellt werden. Dabei bestanden keine Unterschiede in der endometrialen Echostruktur zwischen gravidem und nichtgravidem Horn ($p > 0,05$). Der mittlere Grauwert zeigte einen wellenförmigen Verlauf mit hohen Werten an den Tagen 7 und 15 und einem vorübergehenden Abfall der Werte zum 11. Trächtigkeitstag ($p < 0,0001$). Der Verlauf der Homogenität war annähernd parallel mit hohen Werten an den Tagen 5 und 15, zwischen Tag 9 und 13 jedoch blieb dieser Parameter auf konstant niedrigem Niveau ($p > 0,05$). Der dritte Echostrukturparameter Kontrast stieg während des gesamten Untersuchungszeitraums zwischen Tag 3 und 19 kontinuierlich an ($p < 0,01$) und zeigte während dieser Zeitspanne einen vorübergehenden, deutlichen Anstieg der Werte zum 13. Trächtigkeitstag ($p < 0,05$). Zwischen den Änderungen der uterinen Durchblutung und den drei Echostrukturparametern konnte keine Korrelation nachgewiesen werden ($-0,08 \leq r \leq 0,10$; $p > 0,05$).

Die endotheliale und die induzierbare Form der Stickstoffmonoxid-Synthase konnte an Tag 13 im Endometrium sowohl während des Zyklus, als auch während der Gravidität nachgewiesen werden. Die Expression der NO-Synthasen unterschied sich während der Gravidität weder zwischen den beiden Uterushörnern, noch von derjenigen während des Diöstrus ($p > 0,05$).

Der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit entsprechenden Untersuchungen der vorhergegangenen Studie von SCHMAUDER (2003) bei zyklischen Kühen lässt einen deutlichen Unterschied erkennen. In der eigenen Studie stieg die uterine Perfusion zum 13. Trächtigkeitstag vorübergehend um etwa 30 % an, der mittlere Grauwert fiel zum 11. Trächtigkeitstag deutlich ab. Demnach scheinen sowohl die Farbdopplersonographie der A. uterina als auch die Echostrukturanalyse des Endometriums geeignet zu sein, um eine Gravidität beim Rind vor Sichtbarwerden des Embryos zu diagnostizieren.

7. SUMMARY

„Investigations on uterine blood flow and endometrial echostructure during early pregnancy of cows with consideration to the mRNA-expression of nitric oxide synthase“

The aim of this study was to examine if there are any relationships between changes of uterine blood flow, the morphology of the endometrium, the endometrial nitric oxide synthase system and the steroid concentrations oestrogen and progesterone during the first three weeks of pregnancy in the bovine. Another aim was to test if computer-assisted echotexture analysis of sonographic B-mode images and Doppler sonographic examination of the A. uterina are useful methods in diagnosis of early pregnancy in cows well before the sonographic appearance of the embryo.

Each of five Simmenthal cows was examined during three pregnancies. Artificial insemination was carried out during oestrus by using 0,5 ml native semen from a fertile bull. Immediately after AI ovulation was induced by a single i.m. injection of GnRH. During the first two pregnancies repeated endometrial B-mode-images were performed on days 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 and 19 (0 = Day of ovulation). In addition uterine perfusion was quantified by Doppler sonographic examination of the A. uterina on days 9, 11, 13, 15, 17 and 19. Blood samples to estimate the concentration of plasma oestrogen and progesterone were collected after each examination. On day 25 in all cows a conceptus showing a heart beat could be detected. During pregnancy three an endometrial biopsy sample was collected on day 13 in order to examine the endometrial expression of the nitric oxide synthases. After luteolysis on the day of biopsy another biopsy sample was collected on day 13 of the following dioestrus.

Uterine perfusion was quantified by the time-averaged maximum velocity (TAMV) and the pulsatility index (PI). For computer-assisted echotexture analysis of the endometrial B-mode images the computer software MaZda (Institute of Electronics, Technical University of Lodz/Polen) and the parameter mean grey level, homogeneity and contrast were used. Circulating peripheral hormone levels of oestrogen and progesterone were estimated using enzyme immunoassays (EIA). Endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) nitric oxide synthases of endometrial biopsy samples were quantified by real-time PCR.

TAMV increased temporarily between day 9 and 13, this rise was only significant on the pregnant side ($p < 0.05$). PI reacted contrary to TAMV and decreased distinctly until day 13 ($p < 0.01$). Between day 9 and 13 TAMV values were higher and therefore PI values lower on the pregnant side ($p < 0.05$).

A similar pattern of changes in the echotexture parameters mean grey level, homogeneity and contrast could be observed in all cows during early pregnancy. There were no differences in the endometrial echotexture between the pregnant and the non-pregnant horn ($p > 0.05$). The mean grey level showed wavelike changes with high values on day 7 and 15 and a temporary decline to basal values on day 11 ($p < 0.0001$). The changes of homogeneity were almost parallel with high values on day 5 and 15, between day 9 and 13 however, the parameter remained constant on basal values ($p > 0.05$). The third echotexture parameter contrast increased consistently during the whole examination time between day 3 and 19 ($p < 0.01$) and showed a temporary, significant rise to high values on day 13 ($p < 0.05$). There was no correlation between the uterine blood flow and the echotexture parameters ($-0.08 \leq r \leq 0.10$; $p > 0.05$).

On day 13 the endothelial and the inducible nitric oxide synthase could be localized in the endometrium during the cycle as well as during pregnancy. There were no differences in the expression of the nitric oxide synthases between the both uterine horns during pregnancy neither between cycle and pregnancy ($p > 0.05$).

The results of this study in comparison with a preceding examination of cycling cows by SCHMAUDER (2003) show distinct differences. In the own study during pregnancy there was a rise of about 30 % of uterine perfusion until day 13, whereas the mean grey level showed a significant decline of the values until day 11. Therefore, colour Doppler sonography of the A. uterina as well as texture analysis of the endometrium seem to be suitable methods for recognition of early pregnancy in cows.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AITKEN, R. J. (1975):

Ultrastructure of the blastocyst and endometrium of the roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation.

J. Anat. **119**(2): 369-84

AITKEN, R. J., J. BURTON, J. HAXKINS, R. KERR-WILSON, R. V. SHORT and D. H. STEVEN (1973):

Histological and ultrastructural changes in the blastocyst and reproductive tract of the roe deer, *Capreolus capreolus*, during delayed implantation.

J. Reprod. Fertil. **34**(3): 481-93

ALI, M., I. BUHIMSCHI, K. CHWALISZ and R. E. GARFIELD(1997):

Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition.

Mol. Hum. Reprod. **3**(11): 995-1003

ÄNGGARD, E. (1994):

Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine.

Lancet. **343**(8907): 1199-206

ASSAL-MELIANI, A., G. CHARPIGNY, P. REINAUD, J. MARTAL and G. CHAOUAT (1993):

Recombinant ovine trophoblastin (roTP) inhibits ovine, murine and human lymphocyte proliferation.

J. Reprod. Immunol. **25**(2): 149-65

ASSELIN, E., F. W. BAZER and M. A. FORTIER (1997):

Recombinant ovine and bovine interferons tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells.

Biol. Reprod. **56**(2): 402-8

ASSELIN, E., P. DROLET and M. A. FORTIER (1998):

In vitro response to oxytocin and interferon-Tau in bovine endometrial cells from caruncular and inter-caruncular areas.

Biol. Reprod. **59**(2): 241-7

AUSTIN, K. J., S. K. WARD, M. G. TEIXEIRA, V. C. DEAN, D. W. MOORE and T. R.

HANSEN (1996):

Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy.

Biol. Reprod. **54**(3): 600-6

AXEMO, P., X. FU, B. LINDBERG, U. ULMSTEN and A. WESSEN(1998):
Intravenous nitroglycerin for rapid uterine relaxation.
Acta. Obstet. Gynecol. Scand. **77**(1): 50-3

BADER, W., S. BÖHMER, W. R. OTTO, F. DEGENHARDT und J. SCHNEIDER(1994):
Texturanalyse: Ein neues Verfahren zur Beurteilung sonographisch darstellbarer Herdbefunde
der Mamma.
Bildgebung **61**(4): 284-90

BADTRAM, G. A., J. D. GAINES, C. B. THOMAS and W. T. K. BOSU(1991):
Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound
scanning of the uterus.
Theriogenology **35**(6): 1153-1167

BANSAL, R. K., P. C. GOLDSMITH, Y. HE, C. J. ZALOUDEK, J. L. ECKER and R. K.
RIEMER (1997):
A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery.
J. Clin. Invest. **99**(10): 2502-8

BARROS, C. M., C. PLANTE, W. W. THATCHER and P. J. HANSEN (1991):
Regulation of bovine endometrial secretion of prostaglandins and synthesis of 2',5'-
oligoadenylate synthetase by interferon-alpha molecules.
Am. J. Reprod. Immunol. **25**(4): 146-52

BARTOL, F. F., W. W. THATCHER, F. W. BAZER, F. A. KIMBALL, J. R. CHENAULT, C. J.
WILCOX and R. M. ROBERTS (1981):
Effects of the estrous cycle and early pregnancy on bovine uterine, luteal, and follicular
responses.
Biol. Reprod. **25**(4): 759-76

BASSET, O., Z. SUN, J. L. MESTAS and G. GIMENEZ (1993):
Texture analysis of ultrasonic images of the prostate by means of co-occurrence matrices.
Ultrason. Imaging **15**(3): 218-37

BASU, S. and H. KINDAHL (1987):
Prostaglandin biosynthesis and its regulation in the bovine endometrium: a comparison between
nonpregnant and pregnant status.
Theriogenology **28**: 175-193

BAUERSACHS, S., K. GROSS, S. SCHMIDT, H. WENIGERKIND, H. BLUM and E. WOLF (2004):

Spatial and temporal changes in gene expression patterns in the bovine endometrium - application of transcriptomics in reproductive biology.

37. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, München

BAUMGARTNER, U. (1998):

Farbdopplersonographische Untersuchung der Arteria uterina und des Corpus luteum beim Rind. Vet. med. Diss., München

BAYHI, D. A., C. D. SHERWOOD and C. E. CAMPBELL (1992):

Intravenous nitroglycerin for uterine inversion.

J. Clin. Anesth. **4**(6): 487-8

BAYLIS, S. A., P. J. STRIJBOS, A. SANDRA, R. J. RUSSEL, A. RIJHSINGHANI, I. G. CHARLES and C. P. WEINER (1999):

Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta.

Mol. Hum. Reprod. **5**(3): 277-86

BAZER, F. W. (1992):

Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **199**(4): 373-84

BAZER, F. W., T. E. SPENCER and T. L. OTT (1996):

Placental interferons.

Am. J. Reprod. Immunol. **35**(4): 297-308

BAZER, F. W., T. E. SPENCER and T. L. OTT (1997):

Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal.

Am. J. Reprod. Immunol. **37**(6): 412-20

BAZER, F. W., W. W. THATCHER, P. J. HANSEN, M. A. MIRANDO, T. L. OTT and C. PLANTE (1991):

Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **43**: 39-47

BAZER, F. W., J. L. VALLET, R. M. ROBERTS, D. C. SHARP and W. W. THATCHER (1986):

Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy.

J. Reprod. Fertil. **76**(2): 841-50

BEARD, A. P., M. G. HUNTER and G. E. LAMMING (1994):
Quantitative control of oxytocin-induced PGF₂ alpha release by progesterone and oestradiol in ewes.

J. Reprod. Fertil. **100**(1): 143-50

BECK K. F., W. EBERHARDT, S. FRANK, A. HUWILER, U. K. MESSMER, H. MUHL and J. PFEILSCHIFTER (1999):

Inducible NO synthase: role in cellular signaling.

J. Exp. Biol. **202**(6): 645-53

BERDEAUX, A. (1993):

Nitric oxide: an ubiquitous messenger.

Fundam. Clin. Pharmacol. **7**(8): 401-11

BERGSTROM, S., L. A. CARLSON and J. R. WEEKS (1968):

The prostaglandins: a family of biologically active lipids.

Pharmacol. Rev. **20**(1): 1-48

BERGSTROM, S. and O. NILSSON (1970):

Morphological changes of the trophoblast surface at implantation in the mouse.

J. Reprod. Fertil. **23**(2): 339-40

BETTERIDGE, K. J. and J.-E. FLECHON (1988):

The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos.

Theriogenology **29**(1): 155-187

BETTERIDGE, K. J., M. D. EAGLESOME, G. C. RANDALL and D. MITCHELL (1980):

Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus.

J. Reprod. Fertil. **59**(1): 205-16

BISWAS, S., S. N. KABIR and A. K. PAL (1998):

The role of nitric oxide in the process of implantation in rats.

J. Reprod. Fertil. **114**(1): 157-61

BJORKMAN, N. (1956):

Morphological studies on the epithelia of the intercotyledonary component of the bovine placenta.

Acta Morphol. Neerl. Scand. **1**(1): 41-50

BJORKMAN, N. and G. BLOOM (1957):

On the fine structure of the foetal-maternal junction in the bovine placentome.

Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **45**(6): 649-59

BJORKMAN, N. H. (1968):

Fine structure of cytotrophoblastic and trophoblastic giant cells in the bovine placenta.
J. Ultrastruct. Res. **24**(3): 249-58

BLECK, J. S., M. GEBEL und M. P. MANNES (2000):

Quantitative Sonographie: Bedeutung und Perspektive.
Internist (Berl) **41**(1): 10-6

BOLLWEIN, H., J. MAIERL, R. MAYER and R. STOLLA (1998):

Transrectal color Doppler sonography of the A. uterina in cyclic mares.
Theriogenology **49**(8): 1483-8

BOLLWEIN, H., H. H. MEYER, J. MAIERL, F. WEBER, U. BAUMGARTNER and R. STOLLA (2000):

Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow.
Theriogenology **53**(8): 1541-52

BOLLWEIN, H., R. STOLLA, S. ROHR, H. WELTER, F. WEBER and R. EINSPIANIER (2002):

Relationships between uterine blood flow, oestrogen and nitric oxide in cycling mares.
Theriogenology **58**: 575-578

BOOS, A., W. MEYER, R. SCHWARZ and E. GRUNERT (1996):

Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle.
Anim. Reprod. Sci. **44**: 11-21

BOYD, J. S., S. N. OMRAN and T. R. AYLIFFE (1988):

Use of a high frequency transducer with real time B-mode ultrasound scanning to identify early pregnancy in cows.
Vet. Rec. **123**(1): 8-11

BOYD, J. S., S. N. OMRAN and T. R. AYLIFFE (1990):

Evaluation of real time B-mode ultrasound scanning for detecting early pregnancy in cows.
Vet. Rec. **127**(14): 350-2

BUHIMSCHI, I., M. ALI, V. JAIN, K. CHWALISZ and R. E. GARFIELD (1996):

Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour.
Hum. Reprod. **11**(8): 1755-66

BUHIMSCHI, I., C. YALLAMPALLI, Y. L. DONG and R. E. GARFIELD (1995):
Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol. **172**(5): 1577-84

BUHIMSCHI, I. A., C. YALLAMPALLI, C. S. BUHIMSCHI, G. R. SAADE and R. E. GARFIELD (2000):
Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production by steroid hormones in the rat uterus.
Mol. Hum. Reprod. **6**(5): 404-14

BÜHLMAYER, M. (1999):
Farbdopplersonographische Untersuchung der Arteria uterina und der Arteria ovarica der Stute im Verlauf spontaner und hormonell induzierter Ovulationen.
Vet. med. Diss., München

BULMAN, D. C. and G. E. LAMMING (1978):
Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows.
J. Reprod. Fertil. **54**(2): 447-58

BUSSE, R. and A. MULSCH (1990):
Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells.
FEBS Lett. **275**(1-2): 87-90

BUTLER W. R., J. J. CALAMAN and S. W. BEAM (1996):
Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle.
J. Anim. Sci. **74**(4): 858-65

CAMERON, I. T. and S. CAMPBELL (1998):
Nitric oxide in the endometrium.
Hum. Reprod. Update **4**(5): 565-9

CHAFFAUX, S., G. N. S. REDDY, F. VALON and M. THIBIER (1986):
Transrectal real-time ultrasound scanning for diagnosis pregnancy and for monitoring embryonic mortality in diary cattle.
Animal Reproduction Science **10**(3): 193

CHAN, A. S., C. ANANTHANARAYAN and S. H. ROLBIN (1995):
Alternating nitroglycerin and syntocinon to facilitate uterine exploration and removal of an adherent placenta.
Can. J. Anaesth. **42**(4): 335-7

CHAN, H. Y., X. YAO, S. Y. TSANG, F. L. CHAN, C. W. LAU and Y. HUANG (2001):
Different role of endothelium/nitric oxide in 17beta-estradiol- and progesterone-induced
relaxation in rat arteries.
Life Sci. **69**(14): 1609-17

CHANG M. C. (1952):
Development of bovine blastocyst with a note on implantation.
Anat. Rec. **113**: 143-161

CHELMONSKASOYTA, A. (2002):
Interferon tau and its immunobiological role in ruminant reproduction.
Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) **50**(1): 47-52

CHENAULT, J. R. (1980):
Steroid metabolism by the early bovine conceptus-I. 5 beta-Reduction of neutral C19-steroids.
J. Steroid. Biochem. **13**(5): 499-506

CHWALISZ, K. and R. E. GARFIELD (2000):
Role of nitric oxide in implantation and menstruation.
Hum. Reprod. **15** Suppl **3**: 96-111

CICINELLI, E., L. J. IGNARRO, M. LOGRANO, P. GALANTINO, G. BALZANO and L. M. SCHONAUER (1996):
Circulating levels of nitric oxide in fertile women in relation to the menstrual cycle.
Fertil. Steril. **66**(6): 1036-8

COLEMAN, R. A., W. L. SMITH and S. NARUMIYA (1994):
International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties,
distribution, and structure of the receptors and their subtypes.
Pharmacol. Rev. **46**(2): 205-29

COOKE, J. P. and P. S. TSAO (1993):
Cytoprotective effects of nitric oxide.
Circulation **88**(5 Pt 1): 2451-4

CURRAN, S., R. A. PIERSON and O. J. GINTHER (1986):
Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20.
J. Am. Vet. Med. Assoc. **189**(10): 1289-94

DANET-DESNOYER, G., J. W. JOHNSON, S. F. O'KEEFE and W. W. THATCHER (1993):
Characterization of a bovine endometrial prostaglandin synthesis inhibitor (EPSI).
Biol. Reprod. **48**(Suppl. 1): 115, Abstract

- DANET-DESNOYERS, G., C. WETZELS and W. W. THATCHER (1994):
Natural and recombinant bovine interferon tau regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 alpha and E2 by epithelial cells and stromal cells in the endometrium.
Reprod. Fertil. Dev. **6**(2): 193-202
- DAVIES, M. G., G. J. FULTON and P. O. HAGEN (1995):
Clinical biology of nitric oxide.
Br. J. Surg. **82**(12): 1598-610
- DELORME, S. und I. ZUNA (1995):
Quantitative Auswerteverfahren in der B-Bild- und Farbdopplersonographie.
Ultraschall Klin. Prax. **10**: 50-61
- DEMMERS, K. J., K. DERECKA and A. FLINT (2001):
Trophoblast interferon and pregnancy.
Reproduction **121**(1): 41-9
- DESIMONE, C. A., M. C. NORRIS and B. L. LEIGHTON (1990):
Intravenous nitroglycerin aids manual extraction of a retained placenta.
Anesthesiology **73**(4): 787
- DISKIN, M. G. and J. M. SREENAN (1980):
Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination.
J. Reprod. Fertil. **59**(2): 463-8
- DIXIT, V. D. and N. PARVIZI (2001):
Nitric oxide and the control of reproduction.
Anim. Reprod. Sci. **65**(1-2): 1-16
- DONG, Y. L., L. FANG, P. R. GANGULA and C. YALLAMPALLI (1998):
Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression in pregnant rat uterus.
Biol. Reprod. **59**(4): 933-40
- DONG, Y. L., P. R. GANGULA and C. YALLAMPALLI (1996):
Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour.
J. Reprod. Fertil. **107**(2): 249-54
- DONG, Y. L. and C. YALLAMPALLI (1996):
Interaction between nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in pregnant rat uteri.
Am. J. Physiol. **270**(3 Pt 1): E471-6

DOUALLA-BELL, F., M. J. BONNEAU, F. LABRIE and M. A. FORTIER (1995):
Differential effects of a steroidal antiestrogen, EM-139, on prostaglandin and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in the circular and longitudinal layers of bovine myometrium.
Biol. Reprod. **52**(6): 1358-63

DUDWIESUS, H., R. KRIEG und K. J. SCHMIDT (1993):
Physikalisch-technische Grundlagen der Dopplersonographie.
In: Dopplersonographie in der Gynäkologie und Geburtshilfe: 1-11

ELEY, R. M., W. W. THATCHER and F. W. BAZER (1979):
Luteolytic effect of oestrone sulphate on cyclic beef heifers.
J. Reprod. Fertil. **55**(1): 191-3

ELEY, R. M., W. W. THATCHER, F. W. BAZER and M. J. FIELDS (1983):
Steroid metabolism by the bovine uterine endometrium and conceptus.
Biol. Reprod. **28**(4): 804-16

ELLINWOOD, W. E., T. M. NETT and G. D. NISWENDER (1979):
Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. II. Prostaglandin secretion by the endometrium in vitro and in vivo.
Biol. Reprod. **21**(4): 845-56

ELLIS, S. (1990):
HLA G: at the interface.
Am. J. Reprod. Immunol. **23**(3): 84-6

EMOND, V., E. ASSELIN, M. A. FORTIER, B. D. MURPHY and R. D. LAMBERT (2000):
Interferon-tau stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in bovine lymphocytes and endometrial stromal cells.
Biol. Reprod. **62**(6): 1728-37

EMOND, V., M. A. FORTIER, B. D. MURPHY and R. D. LAMBERT (1998):
Prostaglandin E2 regulates both interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in bovine lymphocytes.
Biol. Reprod. **58**(1): 143-51

ERB, R. E., H. A. GARVERICK, R. D. RANDEL, B. L. BROWN and C. J. CALLAHAN (1976):
Profiles of reproductive hormones associated with fertile and nonfertile inseminations of dairy cows.
Theriogenology **5**(5): 227-42

- EVANS, C. A. and T. G. KENNEDY (1978):
The importance of prostaglandin synthesis for the initiation of blastocyst implantation in the hamster.
J. Reprod. Fertil. **54**(2): 255-61
- FARIN, C. E., K. IMAKAWA, T. R. HANSEN, J. J. MCDONNEL, C. N. MURPHY, P. W. FARIN and R. M. ROBERTS (1990):
Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle.
Biol. Reprod. **43**(2): 210-8
- FARINA, M., M. L. RIBEIRO and A. FRANCHI (2001):
Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus.
Reproduction **121**(3): 403-7
- FIGUEROA, J. P. and G. A. MASSMANN (1995):
Estrogen increases nitric oxide synthase activity in the uterus of nonpregnant sheep.
Am. J. Obstet. Gynecol. **173**(5): 1539-45
- FISSORE, R. A., A. J. EDMONDSON, R. L. PASHEN and R. H. BONDURANT (1986):
The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. II. Non-pregnant, pregnant and pathological conditions of the uterus.
Animal Reproduction Science **12**(3): 167-177
- FLECHON, J. E. and J. P. RENARD (1978):
A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro.
J. Reprod. Fertil. **53**(1): 9-12
- FLINT, A. P. and E. L. SHELDRIK (1983):
Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep.
J. Reprod. Fertil. **67**(1): 215-25
- FLINT, A. P. and E. L. SHELDRIK (1986):
Ovarian oxytocin and the maternal recognition of pregnancy.
J. Reprod. Fertil. **76**(2): 831-9
- FORD, S. P., J. R. CHENAULT and S. E. ECHTERNKAMP (1979):
Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply.
J. Reprod. Fertil. **56**(1): 53-62

FORD, S. P. and J. R. CHENAULT (1981):

Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy.

J. Reprod. Fertil. **62**(2): 555-62

FORD, S. P. and R. K. CHRISTENSON (1979):

Blood flow to uteri of sows during the estrous cycle and early pregnancy: local effect of the conceptus on the uterine blood supply.

Biol. Reprod. **21**(3): 617-24

FORD, S. P., R. R. MAGNESS, D. B. FARLEY and D. E. VAN ORDEN (1982):

Local and systemic effects of intrauterine estradiol-17 beta on luteal function of nonpregnant sows

J. Anim. Sci. **55**(3): 657-64

FÖRSTERMANN, U., E. I. CLOSS, J. S. POLLOCK, M. NAKANE, P. SCHWARZ, I. GATH and H. KLEINERT(1994):

Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension **23**(6 Pt 2): 1121-31

FORTIER, M. A., L. A. GUILBAULT and F. GRASSO (1988):

Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows.

J. Reprod. Fertil. **83**(1): 239-48

FORTIN, M., M. J. OUELLETTE and R. D. LAMBERT (1997):

TGF-beta 2 and PGE2 in rabbit blastocoelic fluid can modulate GM-CSF production by human lymphocytes.

Am. J. Reprod. Immunol. **38**(2): 129-39

FREI, R. E., G. A. SCHULTZ and R. B. CHURCH (1989):

Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow.

J. Reprod. Fertil. **86**(2): 637-41

FUCHS, A. R., O. BEHRENS, H. HELMER, C. H. LIU, C. M. BARROS and M. J. FIELDS (1990):

Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy.

Endocrinology **127**(2): 629-36

FURCHGOTT, R. F. and P. M. VANHOUTTE (1989):

Endothelium-derived relaxing and contracting factors.

Faseb. J. **3**(9): 2007-18

GABLER, C., B. LAUER, A. EINSPANIER, D. SCHAMS and R. EINSPANIER (1997):
Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct.
J. Reprod. Fertil. **109**(2): 213-21

GADSBY, J. E., R. B. HEAP and R. D. BURTON (1980):
Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species.
J. Reprod. Fertil. **60**(2): 409-17

GARRA, B. S., B. H. KRASNER, S. C. HORII, S. ASCHER, S. K. MUN and R. K. ZEMAN (1993):
Improving the distinction between benign and malignant breast lesions: the value of sonographic texture analysis.
Ultrason. Imaging **15**(4): 267-85

GARRETT, J. E., R. D. GEISERT, M. T. ZAVY and G. L. MORGAN (1988):
Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle.
J. Reprod. Fertil. **84**(2): 437-46

GEISERT, R. D., G. L. MORGAN, E. C. SHORT and M. T. ZAVY (1992):
Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle.
Reprod. Fertil. Dev. **4**(3): 301-5

GERTSCH, U. (1997):
Bildanalytische Untersuchungen zur Bestimmung der Ödematisierung des Uterus bei der Stute.
Vet. med. Diss., Bern

GIL, Z., J. KURAL, J. SZAREK and E. WIERZCHOS (2001):
Increase in milk and body temperature of cows as a sign of embryo entry into the uterus.
Theriogenology **56**(4): 685-97

GIMENEZ, T. and D. M. HENRICKS (1983):
Prolongation of the luteal phase by prostaglandin E2 during the estrous cycle in the cow. A Preliminary Report.
Theriogenology **19**: 693-700

GINTHER, O. J. (1981):
Local versus systemic uteroovarian relationships in farm animals.
Acta. Vet. Scand. Suppl. **77**: 103-15

GODKIN, J. D., F. W. BAZER and R. M. ROBERTS (1984):
Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis.
Endocrinology **114**(1): 120-30

GODKIN, J. D., D. L. BLACK and R. T. DUBY (1977):
Stimulation of cyclic AMP and progesterone synthesis by LH, PGE₂ and isoproterenol in the bovine CL in vitro.
Biol. Reprod. **17**(4): 514-8

GOLDBERG, V., A. MANDUCA, D. L. EWERT, J. J. GISVOLD and J. F. GREENLEAF (1992):
Improvement in specificity of ultrasonography for diagnosis of breast tumors by means of artificial intelligence.
Med. Phys. **19**(6): 1475-81

GOSLING, R. G. and D. H. KING (1975):
Arteries and veins.
Ultrasonic angiology, 61-98
Eds.: Marcus A. W. and L. Adamson.
Churchill Livingstone, Edinburgh

GOSWAMY, R. K. and P. C. STEPTOE (1988):
Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles.
Hum. Reprod. **3**(6): 721-6

GREENSTEIN, J. S. and R. C. FOLEY (1958):
The early embryology of the cow with notes on comparable human development.
Int. J. Fertil. **3**: 67-79

GREENSTEIN, J. S. and R. C. FOLEY (1958):
Early embryology of the cow. I. Gastrula and primitive streak stages.
J. Dairy Sci. **41**: 409-421

GREENSTEIN, J. S., R. W. MURRAY and R. C. FOLEY (1958):
Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation.
Anat. Rec. **132**(3): 321-41

GREENSTEIN, J. S., R. W. MURRAY and R. C. FOLEY (1958):
Effect of exogenous hormones on the reproductive processes of the cycling dairy heifer.
J. Dairy Sci. **41**: 1834

- GRIFFITH, O. W. and D. J. STUEHR (1995):
Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism.
Annu. Rev. Physiol. **57**: 707-36
- GROSS, T. S., C. PLANTE, W. W. THATCHER, P. J. HANSEN, S. D. HELMER and D. J. PUTNEY (1988):
Secretory proteins of the bovine conceptus alter endometrial prostaglandin and protein secretion in vitro.
Biol. Reprod. **39**(4): 977-87
- GROSS, T. S., W. W. THATCHER, P. J. HANSEN, J. W. JOHNSON and S. D. HELMER (1988):
Presence of an intracellular endometrial inhibitor of prostaglandin synthesis during early pregnancy in the cow.
Prostaglandins **35**(3): 359-78
- GRUETTER, C. A., D. Y. GRUETTER, J. E. LYON, P. J. KADOWITZ and L. J. IGNARRO (1981):
Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **219**(1): 181-6
- GUILLOMOT, M. (1995):
Cellular interactions during implantation in domestic ruminants.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **49**: 39-51
- GUILLOMOT, M., J. E. FLECHON and S. WINTENBERGER-TORRES (1981):
Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study.
Placenta **2**(2): 169-82
- GUILLOMOT, M. and P. GUAY (1982):
Ultrastructural features of the cell surfaces of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in the cow.
Anat. Rec. **204**(4): 315-22
- GUILLOMOT, M., P. REINAUD, G. CHARPIGNY and J. MARTAL (1988):
Embryo-uterine interactions during early stages of pregnancy in domestic mammals.
Reprod. Nutr. Dev. **28**(6B): 1629-48
- GUSTAFSSON, H. and L. PLOEN (1986):
The morphology of 16 and 17 day old bovine blastocysts from virgin and repeat breeder heifers.
Anat. Histol. Embryol. **15**(3): 277-87

GYAWU, P. and G. S. POPE (1992):

Oestradiol-17 β in the milk of cows from 6 days before to 14 days after their insemination.
British Veterinary Journal **148**: 459-461

HABERKORN, U., G. LAYER, I. ZUNA, T. GEBREAMLACK und G. VAN KAICK (1991):

Der Einfluss unterschiedlicher Fettvorlaufstrecken auf das Ultraschall-B-Bild.
Ultraschall Klin. Praxis **6**: 21-25

HABERKORN, U., I. ZUNA, A. LORENZ, H. ZERBAN, G. LAYER, G. VAN KAICK and U. RATH (1990):

Echographic tissue characterization in diffuse parenchymal liver disease: correlation of image structure with histology.

Ultrason. Imaging **12**(3): 155-70

HANSEL, W., J. LUKASZEWSKA and W. BEAL (1978):

Maintenance of the bovine corpus luteum of early pregnancy.

Biol. Reprod. **18**(Suppl. 1, 27 A): Abstract 37

HANSEN, T. R., K. J. AUSTIN, D. J. PERRY, J. K. PRU, M. G. TEIXEIRA and G. A. JOHNSON (1999):

Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **54**: 329-39

HANZEN, C. and B. DELSAUX (1987):

Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis.

Vet. Rec. **121**(9): 200-2

HARALICK, R., K. SHANMUGAM and I. DINSTEN (1973):

Textural Features for Image Classification.

IEEE Transactions on Systems, Man and Cynernetics **3**(6): 610-621

HARNEY, J. P., T. L. OTT, R. D. GEISERT and F. W. BAZER (1993):

Retinol-binding protein gene expression in cyclic and pregnant endometrium of pigs, sheep, and cattle.

Biol. Reprod. **49**(5): 1066-73

HEAP, R. B., A. P. FLINT, J. E. GADSBY and C. RICE (1979):

Hormones, the early embryo and the uterine environment.

J. Reprod. Fertil. **55**(1): 267-75

HELMER, S. D., T. S. GROSS, G. R. NEWTON, P. J. HANSEN and W. W. THATCHER (1989):

Bovine trophoblast protein-1 complex alters endometrial protein and prostaglandin secretion and induces an intracellular inhibitor of prostaglandin synthesis in vitro.
J. Reprod. Fertil. **87**(2): 421-30

HELMER, S. D., P. J. HANSEN, W. W. THATCHER, J. W. JOHNSON and F. W. BAZER (1989):

Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend corpus luteum lifespan in cyclic cattle.
J. Reprod. Fertil. **87**(1): 89-101

HENDERSON, K. M., R. J. SCARAMUZZI and D. T. BAIRD (1977):

Simultaneous infusion of prostaglandin E2 antagonizes the luteolytic action of prostaglandin F2alpha in vivo.
J. Endocrinol. **72**(3): 379-83

HENRICKS, D. M., J. F. DICKEY, J. R. HILL and W. E. JOHNSTON (1972):

Plasma estrogen and progesterone levels after mating, and during late pregnancy and postpartum in cows.
Endocrinology **90**(5): 1336-42

HENRICKS, D. M., J. F. DICKEY and G. D. NISWENDER (1970):

Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows.
Biol. Reprod. **2**(3): 346-51

HENRICKS, D. M., D. R. LAMOND, J. R. HILL and J. F. DICKEY (1971):

Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer.
J. Anim. Sci. **33**(2): 450-4

HERMES, R. (1997):

Sonographie der Trächtigkeit beim Europäischen Reh (*Capreolus capreolus*) und Quantifizierung endometrialer Veränderungen während der Diapause mittels computergestützter Graustufen-Analyse.
Vet. med. Diss., Berlin

HOFFMAN, L. H., G. B. STRONG, G. R. DAVENPORT and J. C. FROLICH (1977):

Deciduogenic effect of prostaglandins in the pseudopregnant rabbit.
J. Reprod. Fertil. **50**(2): 231-7

HOOPER, S. B., W. B. WATKINS and G. D. THORBURN (1986):
Oxytocin, oxytocin-associated neurophysin, and prostaglandin F₂ alpha concentrations in the utero-ovarian vein of pregnant and nonpregnant sheep.
Endocrinology **119**(6): 2590-7

HOOS, P. C. and L. H. HOFFMAN (1980):
Temporal aspects of rabbit uterine vascular and decidual responses to blastocyst stimulation.
Biol. Reprod. **23**(2): 453-9

HUBER, S., M. MEDL, M. VESELY, H. CZEMBIREK, I. ZUNA and S. DELORME (2000):
Ultrasonographic tissue characterization in monitoring tumor response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer (work in progress).
J. Ultrasound Med. **19**(10): 677-86

HUGHES, E. A. and D. A. DAVIES (1989):
Practical uses of ultrasound in early pregnancy in cattle.
Vet. Rec. **124**(17): 456-8

HUMBLOT, P. and M. A. DALLA PORTA (1984):
Effect of conceptus removal and intrauterine administration of conceptus tissue on luteal function in the cow.
Reprod. Nutr. Dev. **24**(5A): 529-41

IGNARRO, L. J. (1989):
Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties.
Faseb. J. **3**(1): 31-6

IGNARRO, L. J., J. B. ADAMS, P. M. HORWITZ and K. S. WOOD (1986):
Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms.
J. Biol. Chem. **261**(11): 4997-5002

IGNARRO, L. J., T. M. BURKE, K. S. WOOD, M. S. WOLIN and P. J. KADOWITZ (1984):
Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **228**(3): 682-90

IGNARRO, L. J., J. M. FUKUTO, J. M. GRISCAVAGE, N. E. ROGERS and R. E. BYRNS (1993):
Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**(17): 8103-7

- IZUMI, H., C. YALLAMPALLI and R. E. GARFIELD (1993):
Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle.
Am. J. Obstet. Gynecol. **169**(5): 1327-37
- JENNER, L. J., T. J. PARKINSON and G. E. LAMMING (1991):
Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows.
J. Reprod. Fertil. **91**(1): 49-58
- JOHNSON, G. A., K. J. AUSTIN, E. A. VAN KIRK and T. R. HANSEN (1998):
Pregnancy and interferon-tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins.
Biol. Reprod. **58**(4): 898-904
- KARSCH, F. J., J. W. NOVEROSKE, J. F. ROCHE, H. W. NORTON and A. V. NALBANDOV (1970):
Maintenance of ovine corpora lutea in the absence of ovarian follicles.
Endocrinology **87**(6): 1228-36
- KASTELIC, J. P., D. R. BERGFELT and O. J. GINTHER (1991):
Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on Days 10 to 22 in heifers.
Theriogenology **35**(3): 569-581
- KASTELIC, J. P., S. CURRAN and O. J. GINTHER (1989):
Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers.
Theriogenology **31**(4): 813-820
- KASTELIC, J. P., S. CURRAN, R. A. PIERSON and O. J. GINTHER (1988):
Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus.
Theriogenology **29**(1): 39-54
- KEANEY, J. F., Jr., D. I. SIMON, J. S. STAMLER, O. JARAKI, J. SCHARFSTEIN, J. A. VITA and J. LOSCALZO (1993):
NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties.
J. Clin. Invest. **91**(4): 1582-9
- KELLY, R. A., J. L. BALLIGAND and T. W. SMITH (1996):
Nitric oxide and cardiac function.
Circ. Res. **79**(3): 363-80

KENNEDY, T. G. (1977):

Evidence for a role for prosaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat.
Biol. Reprod. **16**(3): 286-91

KENNEDY, T. G. (1980):

Estrogen and uterine sensitization for the decidual cell reaction: role of prostaglandins.
Biol. Reprod. **23**(5): 955-62

KENNEDY, T. G. (1985):

Evidence for the involvement of prostaglandins throughout the decidual cell reaction in the rat.
Biol. Reprod. **33**(1): 140-6

KERBLER, T. L., M. M. BUHR, L. T. JORDAN, K. E. LESLIE and J. S. WALTON (1997):

Relationship between maternal plasma progesteron concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle.
Theriogenology **47**: 703-714

KHORRAM, O., M. GARTHWAITE and R. R. MAGNESS (1999):

Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **84**(6): 2226-32

KING, G. J., B. A. ATKINSON and H. A. ROBERTSON (1981):

Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta.
J. Reprod. Fertil. **61**(2): 469-74

KING, G. J., B. A. ATKINSON and H. A. ROBERTSON (1982):

Implantation and early placentation in domestic ungulates.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **31**: 17-30

KING, W. A., A. NIAR, I. CHARTRAIN, K. J. BETTERIDGE and P. GUAY (1988):

Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos.
J. Reprod. Fertil. **82**(1): 87-95

KNICKERBOCKER, J. J., W. W. THATCHER, D. B. FOSTER, D. WOLFENSON, F. F. BARTOL and D. CATON (1986):

Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17 beta in cyclic cattle.
Prostaglandins **31**(4): 757-76

KOJIMA, Y. and U. SELANDER (1970):

Cyclical changes in the fine structure of bovine endometrial gland cells.
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **104**(1): 69-86

KOVATS, S., E. K. MAIN, C. LIBRACH, M. STUBBLEBINE, S. H. FISHER and R. DEMARS (1990):

A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts.
Science **248**(4952): 220-3

KRETZSCHMAR, J. (2004):

Einfluss biologischer und methodischer Faktoren auf die Ergebnisse der Echotexturanalyse am Endometrium der Stute.

Vet. med. Diss., München

KUBLI-GARFIAS, C., A. LOPEZ-FIESCO, M. T. PACHECO-CANO, H. PONCE-MONTER and A. BONDANI (1980):

In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility.
Steroids **35**(6): 633-41

KUBLI-GARFIAS, C., L. MEDRANO-CONDE, C. BEYER and A. BONDANI (1979):

In vitro inhibition of rat uterine contractility induced by 5 alpha and 5 beta progestins.
Steroids **34**(6 Spec no): 609-17

LACROIX, M. C. and G. KANN (1982):

Comparative studies of prostaglandins F2 alpha and E2 in late cyclic and early pregnant sheep: in vitro synthesis by endometrium and conceptus effects of in vivo indomethacin treatment on establishment of pregnancy.

Prostaglandins **23**(4): 507-26

LAMMING, G. E., A. O. DARWASH and H. L. BACK (1989):

Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **37**: 245-252

LAMMING, G. E. and A. O. DARWASH (1995):

Effect of inter-luteal interval on subsequent luteal phase length and fertility in post partum dairy cows.

Biol. Reprod., **53**(Suppl. 1): Abstract 63

LAU, T. M., C. B. GOW and R. J. FAIRCLOUGH (1992):

Differential effects of progesterone treatment on the oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha response and the levels of endometrial oxytocin receptors in ovariectomized ewes.

Biol. Reprod. **46**(1): 17-22

LEE, S. C. and L. LEVINE (1974):

Prostaglandin metabolism. I. Cytoplasmic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent and microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent prostaglandin E 9-ketoreductase activities in monkey and pigeon tissues.

J. Biol. Chem. **249**(5): 1369-75

LEFEBVRE, F., M. MEUNIER, F. THIBAUT, P. LAUGIER and G. BERGER (2000):

Computerized ultrasound B-scan characterization of breast nodules.

Ultrasound Med. Biol. **26**(9): 1421-8

LEISER, R. (1975):

Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind.

Zentralbl. Veterinarmed. [C] **4**(1): 63-86

LEUNG, S. T., K. DERECKA, G. E. MANN, A. P. FLINT and D. C. WATHES (2000):

Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows.

J. Reprod. Fertil. **119**(1): 25-33

LEWIS, G. S., W. W. THATCHER, F. W. BAZER and J. S. CURL (1982):

Metabolism of arachidonic acid in vitro by bovine blastocysts and endometrium.

Biol. Reprod. **27**(2): 431-9

LEWIS, G. S. and R. A. WATERMAN (1983):

Effects of endometrium on metabolism of arachidonic acid by bovine blastocysts in vitro.

Prostaglandins **25**(6): 881-9

LIEBACK, E., I. HARDOUIN, R. MEYER, J. BELLACH and R. HETZER (1996):

Clinical value of echocardiographic tissue characterization in the diagnosis of myocarditis.

Eur. Heart. J **17**(1): 135-42

LIEBACK, E., R. MEYER, P.ROMANIUK, J. VILSER, W. GEISLER, A. FORSTER, M. NAWROCKI and G. LINSS (1989):

Ultraschallsonographische Diagnostik der Myokarditis mittels quantitativer Texturanalyse von zweidimensionalen Echokardiographiebildern.

Z. Gesamte Inn. Med. **44**(16): 484-7

LIEBACK, E., M. NAWROCKI, R. MEYER, J. VILSER, J. BELLACH und R. HETZER (1991):

Erkennung einer Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation durch echokardiographische Gewebedifferenzierung.

Z. Herz-,Thorax-,Gefäßchir. **5**: 207-214

LIN, H., T. R. MOSMANN, L. GUILBERT, S. TUNTIPOIPAT and T. G. WEGMANN (1993):

Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface.

J. Immunol. **151**(9): 4562-73

LINNEMEYER, P. A. and S. B. POLLACK (1993):

Prostaglandin E2-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2-activated natural killer cells.

J. Immunol. **150**(9): 3747-54

LIU, K. H. and J. D. GODKIN (1992):

Characterization and immunolocalization of bovine uterine retinol-binding protein.

Biol. Reprod. **47**(6): 1099-104

LORBER, K. (1999):

Ultrasonographische Gewebetexturanalyse des equinen Endometriums mit Hilfe einer computergestützten Graustufenanalyse.

Vet. med. Diss., Hannover

LOW, B. G. and P. J. HANSEN (1988):

Actions of steroids and prostaglandins secreted by the placenta and uterus of the cow and ewe on lymphocyte proliferation in vitro.

Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. **18**(3): 71-5

LUKASZEWSKA, J. and W. HANSEL (1980):

Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow.

J. Reprod. Fertil. **59**(2): 485-93

MACKENZIE, S. H., M. P. ROBERTS, K. H. LIU, J. J. DORE and J. D. GODKIN (1997):

Bovine endometrial retinol-binding protein secretion, messenger ribonucleic acid expression, and cellular localization during the estrous cycle and early pregnancy.

Biol. Reprod. **57**(6): 1445-50

MADDOX-HYTTEL, P., N. I. ALEXOPOULOS, G. VAJTA, I. LEWIS, P. ROGERS, L.

CANN, H. CALLESEN, P. TVEDEN-NYBORG and A. TROUNSON (2003):

Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos.

Reproduction **125**(4): 607-23

- MAGNESS, R. R., J. M. HUIE, G. L. HOYER, T. P. HUECKSTEADT, L. P. REYNOLDS, G. J. SEPERICH, G. WHYSONG and C. W. WEEMS (1981):
Effect of chronic ipsilateral or contralateral intrauterine infusion of prostaglandin E2 (PGE2) on luteal function of unilaterally ovariectomized ewes.
Prostaglandins Med. **6**(4): 389-401
- MANN, G. E. and G. E. LAMMING (1993):
Monitoring endometrial oxytocin receptor development in the cow using a biopsy technique.
J. Reprod. Fertil.(Abstract Series 11): Abstract 172
- MANN, G. E. and G. E. LAMMING (1994):
Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow.
Vet. Rec. **135**(17): 403-5
- MANN, G. E. and G. E. LAMMING (1995):
Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows.
J. Reprod. Fertil. **104**(1): 1-5
- MANN G. E. and G. E. LAMMING (1995):
Effect of the level of oestradiol on oxytocin-induced prostaglandin_{F_{2α}} release in the cow.
J. Endocrinol. **145**(1): 175-180
- MANN, G. E. and G. E. LAMMING (2001):
Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows.
Reproduction **121**(1): 175-80
- MANN, G. E., G. E. LAMMING, R. S. ROBINSON and D. C. WATHES (1999):
The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **54**: 317-28
- MANN, G. E., G. E. LAMMING and M. D. FRAY (1995):
Plasma oestradiol during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin.
Anim. Reprod. Sci. **37**: 121-131.
- MAPLETOFT, R. J., M. R. DEL CAMPO and O. J. GINTHER (1976):
Local venoarterial pathway for uterine-induced luteolysis in cows.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **153**(2): 289-94

MARSÁL, K. (1993):
Doppler ultrasonography techniques.
The circulation: 296-32

MARTAL, J., N. CHENE, S. CAMOUS, L. HUYNH, F. LANTIER, P. HERMIER, R. L'HARIDON, G. CHARPIGNY, M. CHARLIER and G. CHAOUAT (1997):
Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy.
Reprod. Fertil. Dev. **9**(3): 355-80

MARTAL, J. L., N. M. CHENE, L. P. HUYNH, R. M. L'HARIDON, P. B. REINAUD, M. W. GUILLOMOT, M. A. CHARLIER and S. Y. CHARPIGNY (1998):
IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities.
Biochimie **80**(8-9): 755-77

MAYER, G., O. NILSSON and S. REINIUS (1967):
Cell membrane changes of uterine epithelium and trophoblasts during blastocyst attachment in rat.
Z. Anat. Entwicklungsgesch. **126**(1): 43-8

MAYER, R. C. (1999):
Farbdopplersonographische Untersuchung der Arteria uterina und des Corpus luteum während des Zyklus und der Frühgravidität der Stute
Vet. med. Diss., München

MAZZONE, A. M., M. P. URBANI, E. PICANO, M. PATERNI, E. BORGATTI, A. DE FABRITIIS and L. LANDINI (1995):
In vivo ultrasonic parametric imaging of carotid atherosclerotic plaque by videodensitometric technique.
Angiology **46**(8): 663-72

MCCRACKEN, J. A., W. SCHRAMM and W. C. OKULICZ (1984):
Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 alpha from the uterus and its abrogation in early pregnancy.
Anim. Reprod. Sci. **7**: 31-55

MENINO, A. R., Jr. and J. S. WILLIAMS (1987):
Activation of plasminogen by the early bovine embryo.
Biol. Reprod. **36**(5): 1289-95

MEYER, H. H., T. MITTERMEIER and D. SCHAMS (1988):
Dynamics of oxytocin, estrogen and progestin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle.
Acta Endocrinol. (Copenh.) **118**(1): 96-104

MEYER, H. H. D. (1989):
Enzymimmunologische Messverfahren zur Hormonanalytik.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

MEYER, H. H., M. ROHLER, W. J. STREICH, R. GOLTENBOTH und A. OCHS (1997):
Sexualsteroidprofile und Ovaraktivitäten des Pandaweibchens YAN YAN im Berliner Zoo.
Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr. **110**(4): 143-7

MOLINARI, C., A. BATTAGLIA, E. GROSSINI, D. A. MARY, N. SURICO and G. VACCA (2001):
Effect of progesterone on peripheral blood flow in prepubertal female anesthetized pigs
J. Vasc. Res. **38**(6): 569-77

MONCADA, S. and A. HIGGS (1993):
The L-arginine-nitric oxide pathway.
N. Engl. J. Med. **329**(27): 2002-12

MONCADA, S., R. M. PALMER and E. A. HIGGS (1991):
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.
Pharmacol. Rev. **43**(2): 109-42

MORRIS, D. T. (1988):
An evaluation of the use of texture measurements for the tissue characterisation of ultrasonic images of in vivo human placentae.
Ultrasound Med. Biol. **14**(5): 387-395

MORRIS, S. M., Jr. and T. R. BILLIAR (1994):
New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis.
Am. J. Physiol. **266**(6 Pt 1): E829-39

MUJTABA, M. G., W. J. STREIT and H. M. JOHNSON (1998):
IFN-tau suppresses both the autoreactive humoral and cellular immune responses and induces stable remission in mice with chronic experimental allergic encephalomyelitis.
Cell. Immunol. **186**(2): 94-102

MÜLLER, K., M. DRILLICH, B.-A. TENHAGEN und W. HEUWIESER (1999):
Genauigkeit und Wirtschaftlichkeit einer Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall zwischen dem 20. und 34. Tag nach der künstlichen Besamung beim Rind.
Praktischer Tierarzt **80**(12): 1095-1100

NATHAN, C. (1992):
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
Faseb. J. **6**(12): 3051-64

NATUZZI, E. S., P. C. URSELL, M. HARRISON, C. BUSCHER and R. K. RIEMER (1993):
Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **194**(1): 1-8

NI, H., T. SUN, X. H. MA and Z. M. YANG (2003):
Expression and regulation of cytosolic prostaglandin E synthase in mouse uterus during the peri-implantation period.
Biol. Reprod. **68**(3): 744-50

NILSSON, O. (1972):
Ultrastructure of the process of secretion in the rat uterine epithelium at preimplantation.
J. Ultrastruct. Res. **40**(5): 572-80

NORMAN, J. E., A. J. THOMPSON, J. F. TELFER, A. YOUNG, I. A. GREER and I. T. CAMERON (1999):
Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy.
Mol. Hum. Reprod. **5**(2): 175-81

NORTHEY, D. L. and L. R. FRENCH (1980):
Effect of embryo removal and intrauterine infusion of embryonic homogenates on the lifespan of the bovine corpus luteum.
J. Anim. Sci. **50**(2): 298-302

NOVARO, V., E. GONZALEZ, A. JAWERBAUM, V. RETTORI, G. CANTEROS and M. F. GIMENO (1997):
Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation.
Reprod. Fertil. Dev. **9**(5): 557-64

NOVARO, V., V. RETTORI, E. T. GONZALEZ, A. JAWERBAUM, A. FALETTI, G. CANTEROS and M. A. DE GIMENO (1996):
Interaction between uterine PGE and PGF₂ alpha production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat.
Prostaglandins **51**(6): 363-76

- NUSSLER, A. K. and T. R. BILLIAR (1993):
Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase.
J. Leukoc. Biol. **54**(2): 171-8
- OGANDO, D., M. FARINA, M. L. RIBEIRO, S. PEREZ MARTINEZ, M. CELLA, V. RETTORI and A. FRANCHI (2003):
Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus.
Reprod. Fertil. Dev. **15**(5): 269-74
- OKADA, Y., T. ASAHINA, T. KOBAYASHI, J. GOTO and T. TERA0 (2001):
Studies on the mechanism of edematous changes at the endometrial stroma for implantation.
Semin. Thromb. Hemost. **27**(2): 67-77
- OTA, H., S. IGARASHI, J. HATAZAWA and T. TANAKA (1998):
Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis.
Fertil. Steril. **69**(2): 303-8
- OUELLETTE, M. J., C. M. DUBOIS, D. BERGERON, R. ROY and R. D. LAMBERT (1997):
TGF beta 2 in rabbit blastocoelic fluid regulates CD4 membrane expression: possible role in the success of gestation.
Am. J. Reprod. Immunol. **37**(1): 125-36
- PACE-ASCIAK, C. and L. S. WOLFE (1968):
Inhibition of prostaglandin synthesis by oleic, linoleic and linolenic acids.
Biochim. Biophys. Acta **152**(4): 784-7
- PALMER, R. M., D. S. ASHTON and S. MONCADA (1988):
Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.
Nature **333**(6174): 664-6
- PALMER, R. M., A. G. FERRIGE and S. MONCADA (1987):
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.
Nature **327**(6122): 524-6
- PALMER, R. M. and S. MONCADA (1989):
A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **158**(1): 348-52

PARKENING, T. A. (1976):

An ultrastructural study of implantation in the golden hamster. I. Loss of the zona pellucida and initial attachment to the uterine epithelium.

J. Anat. **121**(1): 161-84

PENG, A. T., R. S. GORMAN, S. M. SHULMAN, E. DEMARCHIS, K. NYUNT and L. S. BLANCATO (1989):

Intravenous nitroglycerin for uterine relaxation in the postpartum patient with retained placenta. Anesthesiology **71**(1): 172-3

PERRY, J. S., R. B. HEAP, R. D. BURTON and J. E. GADSBY (1976):

Endocrinology of the blastocyst and its role in the establishment of pregnancy.

J. Reprod. Fertil. Suppl.(25): 85-104

PIERSON, R. A. and O. J. GINTHER (1984):

Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers.

Theriogenology **22**(2): 225-233

PIETERSE, M. C., O. SZENCI, A. H. WILLEMSE, C. S. A. BAJCSY, S. J. DIELEMAN and M. A. M. TAVERNE (1990):

Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesteron test.

Theriogenology **33**(3): 697-707

PONTZER, C. H., J. K. YAMAMOTO, F. W. BAZER, T. L. OTT and H. M. JOHNSON (1997):

Potent anti-feline immunodeficiency virus and anti-human immunodeficiency virus effect of IFN-tau.

J. Immunol. **158**(9): 4351-7

POURCELOT, L. (1974):

Applications cliniques de l'examen Doppler.

Ultrasono. Doppler **34**: 625-627

POYSER, N. L. (1995):

The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation.

Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids **53**(3): 147-95

PRATT, B. R., R. L. BUTCHER and E. K. INSKEEP (1977):

Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE₂ in ewes.

J. Anim. Sci. **45**(4): 784-91

- PRITCHARD, J. Y., F. N. SCHRICK and E. K. INSKEEP (1994):
Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesteron and oestradiol in beef cow.
Theriogenology **42**: 247-259
- PURCELL, T., A. T. FAZLEABAS and K. CHWALISZ (1999):
Localization of nitric oxide synthase in the endometrium during implantation in the baboon.
J. Soc. Gynecol. Invest. **6**: 215 A (Abstract)
- PURCELL, T. L., R. GIVEN, K. CHWALISZ and R. E. GARFIELD (1999):
Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse.
Mol. Hum. Reprod. **5**(5): 467-75
- RAETH, U., D. SCHLAPS, B. LIMBERG, I. ZUNA, A. LORENZ, G. VAN KAICK, W. J. LORENZ and B. KOMMERELL (1985):
Diagnostic accuracy of computerized B-scan texture analysis and conventional ultrasonography in diffuse parenchymal and malignant liver disease.
J. Clin. Ultrasound **13**(2): 87-99
- RAGGLE, C. A. (1999):
Nitroglycerin treatment of equine laminitis.
Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. **21**: 170-174
- RASMUSSEN, R. (2001):
Quantification on the Light Cycler.
In: *Rapid Cycle real-time PCR: Methods and Applications*, 21-34
Eds.: MEUER S., C. WITTNER und K. NAKAGAWARA
Springer Verlag, Heidelberg
- REYNOLDS, L. P., R. R. MAGNESS and S. P. FORD (1984):
Uterine blood flow during early pregnancy in ewes: interaction between the conceptus and the ovary bearing the corpus luteum.
J. Anim. Sci. **58**(2): 423-9
- REYNOLDS, L. P., D. A. ROBERTSON and S. P. FORD (1983):
Effects of intrauterine infusion of oestradiol-17 beta and prostaglandin E-2 on luteal function in non-pregnant heifers.
J. Reprod. Fertil. **69**(2): 703-9
- REYNOLDS, L. P., J. STIGLER, G. L. HOYER, R. R. MAGNESS, J. M. HUIE, T. P. HUECKSTEADT, G. L. WHYSONG, H. R. BEHRMAN and C. W. WEEMS (1981):
Effect of PGE1 on PGF2 alpha-induced luteolysis in nonbred ewes.
Prostaglandins **21**(6): 957-72

RIEMER, R. K., C. BUSCHER, R. K. BANSAL, S. M. BLACK, Y. HE and E. S. NATUZZI (1997):

Increased expression of nitric oxide synthase in the myometrium of the pregnant rat uterus.
Am. J. Physiol. **272**(6 Pt 1): E1008-15

ROBERTS, G. P. and J. M. PARKER (1974):

Macromolecular components of the luminal fluid from the bovine uterus.
J. Reprod. Fertil. **40**(2): 291-303

ROBERTS, R. M., J. C. CROSS, C. E. FARIN, T. R. HANSEN, S. W. KLEMANN and K. IMAKAWA (1990):

Interferons at the placental interface.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **41**: 63-74

ROBERTS, R. M., J. C. CROSS and D. W. LEAMAN (1992):

Interferons as hormones of pregnancy.
Endocr. Rev. **13**(3): 432-52

ROBERTS, R. M., L. LIU, Q. GUO, D. LEAMAN and J. BIXBY (1998):

The evolution of the type I interferons.
J. Interferon Cytokine Res. **18**(10): 805-1

ROBINSON, R. S., G. E. MANN, G. E. LAMMING and D. C. WATHES (1998):

Oxytocin, oestrogen and progesterone receptor mRNA expression in the bovine endometrium throughout the oestrous cycle.
J. Reprod. Fertil.(Abstract Series 21): Abstract 97

ROBINSON, R. S., G. E. MANN, G. E. LAMMING and D. C. WATHES(1999):

The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow.
J. Endocrinol. **160**(1): 21-33

ROHR, S. (2003):

Untersuchungen zur Regulation des uterinen und ovariellen Blutflusses sowie der Expression von Stickstoffmonoxid-Synthasen und Östrogenrezeptoren während des Zyklus und der Frühgravidität bei der Stute.
Vet. med. Diss., München

ROMAN-PONCE, H., W. W. THATCHER, D. CATON, D. H. BARRON and C. J. WILCOX (1978):

Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows.
J. Anim. Sci. **46**(1): 175-80

ROSENFELD, C. R., B. E. COX, T. ROY and R. R. MAGNESS (1996):
Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine uterine circulation.
J. Clin. Invest. **98**(9): 2158-66

ROSSELLI, M., B. IMTHURM, E. MACAS, P. J. KELLER and R. K. DUBEY (1994):
Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for
estradiol mediated NO release.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **202**(3): 1543-52

ROSSELLI, M., P. J. KELLER and R. K. DUBEY (1998):
Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction.
Hum. Reprod. Update **4**(1): 3-24

RUPNOW, H. L., T. M. PHERNETTON, C. E. SHAW, M. L. MODRICK, I. M. BIRD and R.
R. MAGNESS (2001):
Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VII. Estrogen and
progesterone effects on eNOS.
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **280**(4): H1699-705

RÜSSE, I. und F. SINOWATZ (1991):
Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.
Verlag Paul Parey; Hamburg, Berlin

SAITO, S., K. NISHIKAWA, T. MORII, M. ENOMOTO, N. NARITA, K. MOTOYOSHI and
M. ICHIJO (1993):
Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy
decidua.
Int. Immunol. **5**(5): 559-63

SALAMONSEN, L. A., J. MANIKHOT, D. L. HEALY and J. K. FINDLAY (1989):
Ovine trophoblast protein-1 and human interferon alpha reduce prostaglandin synthesis by ovine
endometrial cells.
Prostaglandins **38**(3): 289-306

SALVEMINI, D., T. P. MISKO, J. L. MASFERRER, K. SEIBERT, M. G. CURRIE and P.
NEEDLEMAN (1993):
Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**(15): 7240-4

SAXENA, D., S. B. PUROHIT, G. P. KUMER and M. LALORAYA (2000):
Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at implantation.
Nitric Oxide **4**(4): 384-91

SCHMAUDER, S. (2003):

Zyklus- und entzündungsbedingte Veränderungen der endometrialen Echostruktur beim Rind unter Berücksichtigung der Stickstoffmonoxid-Synthase-Expression.

Vet. med. Diss., München

SCHMIDT, C. M., E. GARRETT and H. T. ORR (1997):

Cytotoxic T lymphocyte recognition of HLA-G in mice.

Hum. Immunol. **55**(2): 127-39

SHELTON, K., T. J. PARKINSON, M. G. HUNTER, R. W. KELLY and G. E. LAMMING (1990):

Prostaglandin E-2 as a potential luteotrophic agent during early pregnancy in cattle.

J. Reprod. Fertil. **90**(1): 11-7

SHEMESH, M., F. MILAGUIR, N. AYALON and W. HANSEL (1979):

Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts.

J. Reprod. Fertil. **56**(1): 181-5

SILVIA, W. J. and M. L. TAYLOR (1989):

Relationship between uterine secretion of prostaglandin F₂ alpha induced by oxytocin and endogenous concentrations of estradiol and progesterone at three stages of the bovine estrous cycle.

J. Anim. Sci. **67**(9): 2347-53

SINGH, J., R. A. PIERSON and G. P. ADAMS (1997):

Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates.

J. Reprod. Fertil. **109**(1): 35-44

SIRKKOLA, H. (1988):

Trächtigkeitsdiagnose mit Ultraschallgerät bei Kühen und Sauen.

Praktischer Tierarzt **69**(10): 54-55

SKOPETS, B., J. LI, W. W. THATCHER, R. M. ROBERTS and P. J. HANSEN (1992):

Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (type I trophoblast interferon) and bovine interferon-alpha II.

Vet. Immunol. Immunopathol. **34**(1-2): 81-96

SLADEK, S. M., A. C. REGENSTEIN, D. LYKINS and J. M. ROBERTS (1993):

Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy.

Am. J. Obstet. Gynecol. **169**(5): 1285-91

SMITH, G. N. and J. F. BRIEN (1998):
Use of nitroglycerin for uterine relaxation.
Obstet. Gynecol. Surv. **53**(9): 559-65

SNYDER, S. H. (1995):
Nitric oxide. No endothelial NO.
Nature **377**(6546): 196-7

SODERSTROM, K., B. CORLISS, L. L. LANIER and J. H. PHILLIPS (1997):
CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by
decidual and peripheral blood NK cells.
J. Immunol. **159**(3): 1072-5

SOOS, J. M. and H. M. JOHNSON (1999):
Interferon-tau - prospects for clinical use in autoimmune disorders.
Biodrugs **11**: 125-135

SOWADE, C. (2001):
Einfluss von Sperma, Seminalplasma und Magermilchverdünner auf den uterinen und ovariellen
Blutfluss bei der Stute - Farbdopplersonographische Untersuchungen.
Vet. med. Diss., München

SPENCER, T. E. and F. W. BAZER (1995):
Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene
expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe.
Biol. Reprod. **53**(6): 1527-43

SPENCER, T. E., W. C. BECKER, P. GEORGE, M. A. MIRANDO, T. F. OGLE and F. W.
BAZER (1995):
Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in
cyclic ewes.
Endocrinology **136**(11): 4932-44

SPENCER, T. E., T. L. OTT and F. W. BAZER (1996):
tau-Interferon: pregnancy recognition signal in ruminants.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **213**(3): 215-29

SPEROFF, L. and P. W. RAMWELL (1970):
Prostaglandin stimulation of in vitro progesterone synthesis.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **30**(3): 345-50

STAGGS, K. L., K. J. AUSTIN, G. A. JOHNSON, M. G. TEIXEIRA, C. T. TALBOTT, V. A. DOOLEY and T. R. HANSEN (1998):

Complex induction of bovine uterine proteins by interferon-tau.

Biol. Reprod. **59**(2): 293-7

STAMLER, J. S., D. I. SIMON, J. A. OSBORNE, M. E. MULLINS, O. JARAKI, T. MICHEL, D. J. SINGEL and J. LOSCALZO (1992):

S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **89**(1): 444-8

STARK, G. R., I. M. KERR, B. R. WILLIAMS, R. H. SILVERMAN and R. D. SCHREIBER (1998):

How cells respond to interferons.

Annu. Rev. Biochem. **67**: 227-64

STILL, J. G. and F. C. GREISS, Jr. (1978):

The effect of prostaglandins and other vasoactive substances on uterine blood flow and myometrial activity.

Am. J. Obstet. Gynecol. **130**(1): 1-8

STROBAND, H. W., N. TAVERNE, K. LANGENFELD and P. M. BARENDIS (1986):
The ultrastructure of the uterine epithelium of the pig during the estrous cycle and early pregnancy.

Cell Tissue Res. **246**(1): 81-9

STUART, B., J. DRUMM, D. E. FITZGERALD and N. M. DUGNAN (1980):

Fetal blood velocity waveforms in normal pregnancy.

Br. J. Obstet. Gynaecol. **87**(9): 780-5

SUGINO, N., K. SHIMAMURA, S. TAKIGUCHI, H. TAMURA, M. ONO, M. NAKATA, Y. NAKAMURA, K. OGINO, T. UDA and H. KATO (1996):

Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy.

Hum. Reprod. **11**(5): 1073-8

SZCZYPINSKI, P., M. KOCIOLEK, A. MATERKA and M. STRZELECKI (2001):

Computer program for image texture analysis in PhD students laboratory.

International conference on signals and electronic systems, Lodz, Polen: 255-262

TAVERNE, M. A., O. SZENCI, J. SZETAG and A. PIROS (1985):

Pregnancy diagnosis in cows with linear-array real-time ultrasound scanning: a preliminary note.

Vet. Q. **7**(4): 264-70

TEIXEIRA, M. G., K. J. AUSTIN, D. J. PERRY, V. D. DOOLEY, G. A. JOHNSON, B. R. FRANCIS and T. R. HANSEN (1997):

Bovine granulocyte chemotactic protein-2 is secreted by the endometrium in response to interferon-tau (IFN-tau).

Endocrine **6**(1): 31-7

TEKAY, A., H. MARTIKAINEN and P. JOUPPILA (1996):

Comparison of uterine blood flow characteristics between spontaneous and stimulated cycles before embryo transfer.

Hum. Reprod. **11**(2): 364-8

TELFER, J. F., G. A. IRVINE, G. KOHNEN, S. CAMPBELL and I. T. CAMERON (1997):

Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium.

Mol. Hum. Reprod. **3**(1): 69-75

TELFER, J. F., F. LYALL, J. E. NORMAN and I. T. CAMERON (1995):

Identification of nitric oxide synthase in human uterus.

Hum. Reprod. **10**(1): 19-23

THATCHER, W. W., D. WOLFENSON, J. S. CURL, L. E. RICO, J. J. KNICKERBOCKER, F. W. BAZER and M. DROST (1984):

Prostaglandin dynamics associated with development of the bovine conceptus.

Anim. Reprod. Sci. **7**: 149-176

THATCHER, W. W., F. F. BARTOL, J. J. KNICKERBOCKER, J. S. CURL, D. WOLFENSON, F. W. BAZER and R. M. ROBERTS (1984):

Maternal recognition of pregnancy in cattle.

J. Dairy Sci. **67**(11): 2797-811

THATCHER, W. W., M. BINELLI, J. BURKE, C. R. STAPLES, J. D. AMBROSE and S. COELHO (1997):

Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium.

Theriogenology **47**: 131-140

THATCHER, W. W., M. A. DRIANCOURT, M. TERQUI and L. BADINGA (1991):

Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy.

Domest. Anim. Endocrinol. **8**(2): 223-34

THATCHER, W. W., P. J. HANSEN, T. S. GROSS, S. D. HELMER, C. PLANTE and F. W. BAZER (1989):

Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **37**: 91-9

THATCHER, W. W., M. D. MEYER and G. DANET-DESNOYERS (1995):

Maternal recognition of pregnancy.

J. Reprod. Fertil. Suppl. **49**: 15-28

THATCHER, W. W., C. R. STAPLES, G. DANET-DESNOYERS, B. OLDICK and E.-P. SCHMITT (1994):

Embryo health and mortality in sheep and cattle.

J. Anim. Sci. **72**: 16-30

THIBODEAUX, J. K., M. W. MYERS, J. D. ROUSSEL and R. A. GODKE (1992):

Intrauterine infusion of prostaglandin E2 and subsequent luteal function in cattle.

Prostaglandins **44**(6): 531-41

THIJSSSEN, J. M., B. J. OOSTERVELD, P. C. HARTMAN and G. J. ROSENBUSCH (1993):

Correlations between acoustic and texture parameters from RF and B-mode liver echograms.

Ultrasound Med. Biol. **19**(1): 13-20

THOMPSON F. N., T. CLEKIS, T. E. KISER, H. J. CHEN and C. K. SMITH (1980):

Serum progesterone concentrations in pregnant and nonpregnant heifers and after gonadotropin releasing hormone in luteal phase heifers.

Theriogenology **13**(6): 407-417

THOMSON, A. J., J. F. TELFER, G. KOHNEN, A. YOUNG, I. T. CAMERON, I. A. GREER and J. E. NORMAN (1997):

Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition.

Hum. Reprod. **12**(11): 2546-52

TOM, J. W., R. A. PIERSON and G. P. ADAMS (1998):

Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea.

Theriogenology **49**(7): 1345-52

TOM, J. W., R. A. PIERSON and G. P. ADAMS (1998):

Quantitative echotexture analysis of bovine ovarian follicles.

Theriogenology **50**(3): 339-46

- TSCHUGGUEL, W., C. SCHNEEBERGER, G. UNFRIED, K. CZERWENKA, W. WENINGER, M. MILDNER, J. R. BISHOP and J. C. HUBER (1998):
Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium.
Hum. Reprod. **13**(2): 436-44
- TSENG, L., J. ZHANG, T. YU. PERESLENI and M. S. GOLIGORSKY (1996):
Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial glands of human endometrium.
J. Soc. Gynecol. Investig. **3**(1): 33-8
- URBAN, G., E. MARINONI, R. DILORIO, C. LUCCHINI, P. ALO and U. DI TONDO (2001):
New placental factors: Between implantation and inflammatory reaction.
Early Pregnancy **5**(1): 70-1
- VALCKX, F. M. and J. M. THIJSEN (1997):
Characterization of echographic image texture by cooccurrence matrix parameters.
Ultrasound Med. Biol. **23**(4): 559-71
- VAN BUREN, G. A., D. S. YANG and K. E. CLARK (1992):
Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis.
Am. J. Obstet. Gynecol. **167**(3): 828-33
- VILLA-GODOY, A., J. J. IRELAND, J. A. WORTMAN, N. K. AMES, T. L. HUGHES and R. L. FOGWELL (1985):
Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers.
J. Anim. Sci. **60**(2): 519-27
- WARNER, C. M., M. S. BROWNELL and M. A. EWOLDSSEN (1988):
Why aren't embryos immunologically rejected by their mothers?
Biol. Reprod. **38**(1): 17-29
- WATHES, D. C. and P. A. DENNING-KENDALL (1992):
Control of synthesis and secretion of ovarian oxytocin in ruminants.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **45**: 39-52
- WATHES, D. C. and F. B. WOODING (1980):
An electron microscopic study of implantation in the cow.
Am. J. Anat. **159**(3): 285-306

WEGMANN, T. G., H. LIN, L. GUILBERT and T. R. MOSMANN (1993):
 Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?
Immunol. Today **14**(7): 353-6

WETTEMANN R. P. and H. D. Hafs (1973):
 LH, Prolaktin, Estradiol and Progesterone in bovine blood serum during early pregnancy.
J. Anim. Sci. **36**(1): 51-56

WHITE, I. R., A. J. RUSSEL, I. A. WRIGHT and T. K. WHYTE (1985):
 Real-time ultrasonic scanning in the diagnosis of pregnancy and the estimation of gestational age in cattle.
Vet. Rec. **117**(1): 5-8

WILSON, J. M., D. D. ZALESKY, C. R. LOONEY, K. R. BONDIOLI and R. R. MAGNESS (1992):
 Hormone secretion by preimplantation embryos in a dynamic in vitro culture system.
Biol. Reprod. **46**(2): 295-300

WILTBANK, J. N., J. E. INGALLS and W. W. ROWDEN (1961):
 Effects of various forms and levels of estrogen alone or in combinations with gonadotropins on the estrous cycle of beef heifers.
J. Anim. Sci. **20**: 341-346

WISCHNIK, A., R. STÖCKLEIN und T. WERNER (1999):
 Zur Beurteilung der graviden Cervix uteri im Sonogramm mittels computergestützter Texturanalyse.
Z. Geburtshilfe Neonatol. **203**(3): 115-9

WOODING, F. B. (1982):
 The role of the binucleate cell in ruminant placental structure.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **31**: 31-9

WOODING, F. B. (1992):
 Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production.
Placenta **13**(2): 101-13

WOODING, F. B., L. D. STAPLES and M. A. PEACOCK (1982):
 Structure of trophoblast papillae on the sheep conceptus at implantation.
J. Anat. **134**(Pt 3): 507-16

WOODING, F. B. and D. C. WATHES (1980):
Binucleate cell migration in the bovine placentome.
J. Reprod. Fertil. **59**(2): 425-30

YALLAMPALLI, C., M. BYAM-SMITH, S. O. NELSON and R. E. GARFIELD (1994):
Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus.
Endocrinology **134**(4): 1971-4

YALLAMPALLI, C. and Y. L. DONG (2000):
Estradiol-17beta inhibits nitric oxide synthase (NOS)-II and stimulates NOS-III gene expression
in the rat uterus.
Biol. Reprod. **63**(1): 34-41

YALLAMPALLI, C., R. E. GARFIELD and M. BYAM-SMITH (1993):
Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery.
Endocrinology **133**(4): 1899-902

YALLAMPALLI, C., H. IZUMI, M. BYAM-SMITH and R. E. GARFIELD (1994):
An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and
inhibits contractility during pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol. **170**(1 Pt 1): 175-85

YOSHIKI, N., T. KUBOTA and T. ASO (2000):
Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and early
pregnant endometrium.
Mol. Hum. Reprod. **6**(3): 283-7

ZHANG, J., G. A. MASSMANN, C. P. MIRABILE and J. P. FIGUEROA (1999):
Nonpregnant sheep uterine type I and type III nitric oxide synthase expression is differentially
regulated by estrogen.
Biol. Reprod. **60**(5): 1198-203

ZHANG, R. S., P. H. GUTH, O. U. SCREMIN, R. SINGH, S. PERVIN and G. CHAUDHURI
(1997):
Regulation of endometrial blood flow in ovariectomized rats: assessment of the role of nitric
oxide
Am. J. Physiol. **273**(4 Pt 2): H2009-17

9. ANHANG

RNA-Extraktion mit Tripur¹:

- Probe in Tripur homogenisieren (1ml Tripur/100 mg Gewebe).
- Homogenisat 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 200 µl Chloroform auf 1 ml Tripur, Gemisch 10 s vortexen. Probe 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zentrifugation: 4°C, 12000 rpm, 15 min.
- Obere wässrige Phase (RNA-haltig) abpipettieren und in ein neues Tube überführen . 500 µl Isopropanol zu ca. 500 µl wässriger Phase pipettieren und vorsichtig invertieren. Gemisch 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zentrifugation: 4°C, 12000 rpm, 10 min.
- Überstand abziehen und verwerfen. Pellet sichern und mit 250 µl Ethanol 70% waschen.
- Zentrifugation: 4°C, 7500 rpm, 5 min.
- Waschschritt mit Ethanol wiederholen.
- Überstand abpipettieren und Pellet bei 37°C ca. 10 min im Heizblock trocknen.
- Pellet in RNA-H₂O lösen, je nach Pelletgröße 50-100 µl.
- Zum vollständigen Lösen Proben für 10 min bei 55°C inkubieren.
- Proben anschließend sofort auf Eis stellen und vermessen oder bei -80°C einfrieren.

¹ Protokoll nach Susanne Ulbrich , RNA-Extraktion durchgeführt am Institut für Physiologie der Technischen-Universität München-Weihenstephan.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. R. Stolla möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Unterstützung und die geduldige Korrektur meiner Arbeit danken. Außerdem möchte ich mich für seinen Einsatz bei der Vermittlung der Tierpflegerstelle und der wissenschaftlichen Hilfskraftstellen am Oberwiesenfeld während der Anfertigung der Dissertation bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Stolla, Herrn Prof. Dr. W. Schmahl und Herrn Prof. Dr. R. Mansfeld möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Beantragung und bei der Ludwig-Maximilians-Universität für die Gewährung eines Stipendiums aus der Graduiertenförderung herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Bollwein möchte ich mich für die Ausarbeitung des Themas und für die wissenschaftlichen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. U. Matis möchte ich an dieser Stelle ebenfalls für die Vermittlung einer Anstellung als wissenschaftliche Assistentin am Oberwiesenfeld danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Weber für die Betreuung und sorgfältige Korrektur dieser Arbeit, für sein unermüdliches Engagement und persönlichen Einsatz, welche zu einem wesentlichen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Danke auch für die Motivation in schweren Zeiten.

Herrn Dr. L. Diaz möchte ich ebenfalls für die Betreuung und die wertvollen Ratschläge bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit und Analyse der dopplersonographischen Untersuchungen danken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Jenny für ihre geduldige Unterstützung bei allen Fragen rund um die Echostrukturanalyse und jeglichen Computerproblemen.

Vielen Dank auch Frau Heidi Mayrhofer und Herrn Dr. F. Weber für die Durchführung der hormonanalytischen Untersuchungen der Blutproben.

Bei Susanne Ulbrich und ihrem Team am Institut für Physiologie der Technischen-Universität München-Weihenstephan möchte ich mich für die Analyse der Biopsieproben und ihre Einweisung in diese Materie bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Karola, Sandra, Rainer und Lorenzo, die mich bei der Gewinnung der Biopsieproben unterstützten, wenn kein „Durchkommen“ mehr war.

Schließlich möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Aufmunterungen in schweren Zeiten bei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Tierpflegern vom OWF bedanken: Martina, Tanja, Stella, Caro, Katja, Karola, Sandra, Jenny, Sonni, Matthias, Inge, Frank, Lorenzo, Heidi, Alex, Maria, Alfred, Kaspar, Niko, Matthias und Roberto, vielen Dank für eure Hilfe! An dieser Stelle möchte ich auch auf die Hauptdarstellerinnen dieser Studie Elsa, Irene, Lea, Nuschl und Walli verweisen, durch deren meist geduldige Zusammenarbeit ich sehr viel gelernt habe.

Meiner Familie danke ich für ihre Geduld, Motivation und ihr Verständnis, ganz besonders aber danke ich Christian für seinen liebevollen Zuspruch und jegliche mir gegebene Unterstützung in den ganzen Jahren.

LEBENS LAUF

Name: Jasmin Bertmann
Geburtsdatum: 06.02.1976
Geburtsort: Trostberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Vater: Anton Bertmann; Busfahrer
Mutter: Hildegard Bertmann, geb. Mayer; Versandmitarbeiterin
Familienstand: ledig

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1982-1986 Grundschohle Tacherting
1986-1995 Hertzhaimer Gymnasium Trostberg
30.06.95 Allgemeine Hochschulreife
1995-1996 Freiwilliges Krankenpflegepraktikum
im Krankenhaus Trostberg
1996-2001 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
17.12.01 Staatsexamen
19.04.02 Approbation
April 2002 Beginn der Dissertation an der Gynäkologischen und
Ambulatorischen Tierklinik der Universität München
Mai-Juli 2002 Teilzeitbeschäftigung als Tierpflegerin an der Gynäkologischen
und Ambulatorischen Tierklinik München
Nov./Dez. 2002 und
Okt.-Dez. 2003 Teilzeitbeschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft an der
Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik München
Jan. 2003-Sept. 2004 Förderung durch ein Stipendium der LMU
Okt. 2004-März 2005 Teilzeitbeschäftigung als wissenschaftliche Assistentin an der
Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik München