

1

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. R. Stolla

**Untersuchungen zur Regulation der uterinen und ovariellen Durchblutung sowie der
Expression von Stickstoffmonoxidsynthasen und Östrogenrezeptoren im Endometrium
im Verlauf des Zyklus und der Frühgravidität bei der Stute**

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

von
Simone Kathrin Rohr
aus
Göppingen

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. E. Kienzle

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

INHALTSVERZEICHNIS

	ABKÜRZUNGEN	8
1	EINLEITUNG	9
2	LITERATUR	10
2.1	Funktionelle und hormonelle Charakteristika des Sexualzyklus und der Frühgravidität der Stute	10
2.1.1	Östrus	10
2.1.2	Ovulation	11
2.1.3	Diöstrus	11
2.1.4	Luteolyse	13
2.1.5	Frühgravidität	13
2.2	Steroidhormonrezeptoren im Endometrium	14
2.3	Gefäßversorgung im Genitale der Stute	15
2.3.1	Uterus	15
2.3.2	Ovarien	15
2.4	Dopplersonographie	15
2.4.1	Physikalische Grundlagen	16
2.4.2	Gerätetechnologie	16
2.4.3	Auswertungsmethoden	17
2.4.4	Blutflussmessungen bei Stuten während des Zyklus	18
2.4.4.1	Durchblutung des Uterus	18
2.4.4.2	Durchblutung der Ovarien	18
2.4.5	Blutflussmessungen in der Frühgravidität	19
2.4.5.1	Durchblutung des Uterus	19
2.4.5.2	Durchblutung der Ovarien	20
2.4.6	Der Einfluss von durchblutungsfördernden Medikamenten auf den Blutfluss im Genitale der Stute	20

2.5	Stickstoffmonoxid (NO)	21
2.5.1	Stickstoffmonoxid-Synthese	21
2.5.2	Wirkungsmechanismus von Stickstoffmonoxid	23
2.5.3	Methoden zum Nachweis von Stickstoffmonoxid	25
2.5.3.1	Nachweis der NOS-mRNA mit Hilfe der reversen Transkriptase-PCR (Polymerase chain reaction)	25
2.5.3.2	Nachweis der NO-Synthese mit immunhistologischen Methoden	26
2.5.3.3	Messung der NOS-Aktivität über den Nachweis von L-Citrullin	26
2.5.3.4	Nachweis der NO-Abbauprodukte im Plasma	26
2.5.4	Bedeutung von Stickstoffmonoxid im weiblichen Reproduktionsgeschehen	26
2.5.4.1	Vorkommen im Ovar und Bedeutung für dessen Funktionen	27
2.5.4.1.1	Vorkommen	27
2.5.4.1.2	Bedeutung für Follikelentwicklung und Ovulation	27
2.5.4.1.3	Bedeutung für die Luteolyse	30
2.5.4.2	Vorkommen im Uterus und Bedeutung für dessen Funktionen	30
2.5.4.2.1	Vorkommen	31
2.5.4.2.2	Bedeutung für die Blutflussregulation	31
2.5.4.2.3	Bedeutung für die Uteruskontraktilität	32
2.5.4.2.4	Bedeutung bei endometrialer Inflammation	32
2.5.5	Der NO-Donor Isosorbiddinitrat (ISDN): Eigenschaften und Pharmakokinetik	33
2.5.6	Anwendung von NO-Donoren in der Humanmedizin	34
2.5.7	Anwendung von NO-Donoren in der Tiermedizin	35
3	MATERIAL UND METHODEN	36
3.1	Tiere	38
3.2	Versuchsdurchführung	36
3.2.1	Kontrollzyklus	37
3.2.2	PGF2 α -Zyklus	37

3.2.3	ISDN-beeinflusste Zyklen	38
3.2.4	Frühgravidität	38
3.3	Sonographische Untersuchungen	38
3.3.1	Geräte	38
3.3.2	Ultrasonographische Untersuchungen	39
3.3.3	Farbdopplersonographische Untersuchungen	39
3.3.4	Auswertung der Dopplerwellen	39
3.4	Blutprobenentnahme und –untersuchung	40
3.4.1	Plasmagewinnung	40
3.4.2	Östrogenbestimmung	40
3.4.3	Progesteronbestimmung	40
3.4.4	Nitrat/Nitritbestimmung	41
3.5	Biopsieprobenentnahme und –untersuchung	41
3.5.1	Probengewinnung	41
3.5.2	Expressionsanalytik	41
3.6	Uterustupferproben	42
3.7.	Statistische Auswertung	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Kontrollzyklus	43
4.1.1	Klinisch-Gynäkologische Befunde	43
4.1.2	Farbdopplersonographische Befunde	44
4.1.2.1	Blutfluss in den Aa. uterinae	44
4.1.2.2	Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae	45
4.1.3	Zusammenhänge zwischen der uterinen und ovariellen Durchblutung und den Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentrationen	46
4.1.4	Zusammenhang zwischen der uterinen und ovariellen Durchblutung	

	und den Nitratspiegeln	47
4.1.5	Endometriale mRNA-Expression	48
4.1.5.1	NO-Synthasen	48
4.1.5.2	Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und der uterinen und ovariellen Durchblutung	49
4.1.5.3	Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen	50
4.1.5.4	Östrogenrezeptoren	52
4.1.5.5	Zusammenhänge zwischen den Östrogenrezeptorkonzentrationen und der uterinen und ovariellen Durchblutung	53
4.2	PGF2α-induzierter Zyklus	53
4.2.1	Klinisch-Gynäkologische Befunde	54
4.2.2	Farbdopplersonographische Befunde	54
4.2.2.1	Blutfluss in den Aa. uterinae	54
4.2.2.2	Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae	55
4.2.3	Zusammenhänge zwischen der uterinen und ovariellen Durchblutung und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen	56
4.2.4	Endometriale mRNA-Expression	58
4.2.4.1	NO-Synthasen	58
4.2.4.2	Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und der uterinen und ovariellen Durchblutung	59
4.2.4.3	Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen	60
4.2.4.4	Östrogenrezeptoren	61
4.2.4.5	Zusammenhänge zwischen den Östrogenrezeptorkonzentrationen und der uterinen und ovariellen Durchblutung	62
4.2.4.6	Zusammenhänge zwischen den Östrogenrezeptorkonzentrationen und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen	62
4.3	ISDN-Zyklen	63
4.3.1	Klinisch-Gynäkologische Befunde	64
4.3.2	Einfluss von ISDN auf die uterine und ovarielle Durchblutung	64

4.3.2.1	Blutfluss in den Aa. uterinae	64
4.3.2.2	Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae	66
4.3.2.3	Einfluss von ISDN auf die Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen	67
4.3.3	Einfluss von ISDN auf die endometriale mRNA-Expression	69
4.3.3.1	NO-Synthasen	69
4.3.3.2	Östrogenrezeptoren	70
4.4	Frühgravidität	72
4.4.1	Klinisch-Gynäkologische Befunde	72
4.4.2	Farbdopplersonographische Befunde	73
4.4.2.1	Blutfluss in den Aa. uterinae	73
4.4.2.2	Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae	74
4.4.3	Vergleich der untersuchten Parameter am Tag 15 der Frühgravidität und des Zyklus	74
5	DISKUSSION	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	SUMMARY	90
8	LITERATURVERZEICHNIS	92
9	ANHANG	108

ABKÜRZUNGEN

TAMV	time averaged mean velocity = mittlere Blutflussgeschwindigkeit
Vol	mittleres Blutflussvolumen
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ng	nanogramm = 10^{-9} g
fg	femtogramm = 10^{-12} g
ag	atogramm = 10^{-15} g

1 EINLEITUNG

Die Farbdopplersonographie ist in der Humanmedizin bereits ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik von Fertilitätsstörungen (GOSWAMY und STRPTOE 1988, RUBINSTEIN et al. 1999). Es hat sich herausgestellt, dass der uterine und ovarielle Blutfluss während des Menstruationszyklus einem charakteristischen Muster folgt. Eine Verringerung der Durchblutung im inneren Genitale wird mit Fertilitätsstörungen in Verbindung gebracht (TINKANEN et al. 1994, WADA et al. 1994, RUBINSTEIN et al. 1999).

Seit einigen Jahren wird die Farbdopplersonographie auch zur Untersuchung der Blutversorgung des Genitaltrakts der Stute eingesetzt, wobei ebenfalls charakteristische, zyklische Schwankungen beobachtet wurden (BOLLWEIN et al. 1998, MAYER 1999, KOLBERG 2000).

Unklar ist jedoch bislang, durch welche Einflüsse dieses typische Blutflussmuster entsteht.

Einige Autoren gehen davon aus, dass diese zyklischen Durchblutungsschwankungen auf die wechselnden Einflüsse der Sexualsteroidhormone zurückzuführen sind (GOSWAMY und STREPTOE 1988, FORD et al. 1989, KURJAK et al. 1991, TINKANEN et al. 1994). Auf der anderen Seite wird diskutiert, dass der Vasodilatator Stickstoffmonoxid eine Rolle in der Regulation der uterinen Durchblutung spielen könnte (VAN BUREN et al. 1992, ROSENFELD et al. 1996).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, welche Faktoren die uterine und ovarielle Durchblutung während des Zyklus und der Frühgravidität beeinflussen und damit zur Entstehung dieses charakteristischen Blutflussmusters beitragen. Insbesondere wurden dabei das uterine NOS-System und der Einfluss der Östrogen- und Progesteronäquivalente untersucht.

2 LITERATUR

2.1 Funktionelle und hormonelle Charakteristika des Sexualzyklus und der Frühgravidität der Stute

Die zyklusabhängigen Veränderungen im Reproduktionstrakt während des Rossezyklus unterliegen dem Einfluss der ovariellen Hormonproduktion (PINEDA 1989).

Bei der Stute beträgt die physiologische Zykluslänge 21 bis 24 Tage, wobei der Östrus 2 bis 12 Tage einnimmt und der Diöstrus 14 bis 18 Tage umfasst (ALLEN 1988, GINTHER 1992a, HUGHES et al. 1972).

2.1.1 Östrus

Im Östrus zeigt die Stute durch sogenanntes Blitzen und Dulden dem Hengst ihre Paarungsbereitschaft an. Sonographisch kann man am Ovar die Anbildung eines oder mehrerer Follikel verfolgen, von denen sich einer zum dominanten Follikel entwickelt. Dieser wächst zu einer Größe von 30 bis 60 mm heran und kommt schließlich zur Ovulation (GINTHER 1979). Der Tag der Ovulation wird als Tag 0 definiert. Die in den Granulosa- und Thekazellen der Follikel gebildeten Östrogene (KLINGA et al. 1987, BRECKWOLDT et al. 1990) bewirken eine deutliche Erhöhung der Plasmaöstrogenkonzentration, die für die Ödematisierung der Uterusschleimhaut in der Rosse verantwortlich ist (GREENHOFF und KENNEY 1975). Im Ultraschallbild stellt sich diese Ödematisierung als Radspeichenstruktur dar (GINTHER und PIERSON 1984).

Die wichtigsten Östrogene im Zyklus der Stute sind 17β -Östradiol und Östron, wobei der Östrongehalt in der Follikelflüssigkeit nur etwa 10% des Östradiolanteils beträgt (KNUDSEN und VELLE 1961). DAELS et al. (1991) beobachteten bei Untersuchungen zu zyklusabhängigen Schwankungen des Östradiolspiegels bei der Stute, dass es 8 bis 6 Tage vor der Ovulation, also zu Beginn der Rosse, zu einer deutlichen Steigerung der Plasmaöstradiolkonzentration kam, die etwa 2 Tage vor der Ovulation ihr Maximum erreichte, welches bei durchschnittlich 20 pg/ml (= 0,07 pmol/ml) lag. Noch vor der Ovulation nahmen die Werte

bereits wieder ab, um innerhalb von ein bis zwei Tagen auf diöstrische Basalwerte von ca. 14 pg/ml (= 0,05 pmol/ml) abzusinken. Diese Ergebnisse konnten durch Studien von HOPPEN et al. (1995) bestätigt werden. Bei ihnen lagen die Basalwerte mit etwa 10 pg/ml (= 0,04 pmol/ml) allerdings etwas niedriger. PALMER und TERQUI (1977) ermittelten die zyklusabhängigen Veränderungen der Gesamtöstrogenwerte, welche die konjugierten Formen, die den weitaus größeren Anteil der Östrogene im Blut ausmachen, miteinfassen. Die Konzentrationen lagen mit Werten von 0,5 ng/ml (= 1,8 pmol/ml) am Tag -10 bis 2,4 ng/ml (= 8,7 pmol/ml) zwei Tage vor der Ovulation etwa 100fach über denen von 17 β -Östradiol, wiesen ansonsten aber die gleichen zyklischen Schwankungen auf. Zu vergleichbaren Ergebnissen führten auch Untersuchungen von MAYER (1999) und KOLBERG (2000).

Während der Rosse werden Plasmaprogesteronwerte von 1 ng/ml (= 3,2 pmol/ml) nicht überschritten (ALLEN 1988, HOPPEN 1995, MAYER 1999, KOLBERG 2000).

2.1.2 Ovulation

Steht die Ovulation kurz bevor, stellt sich der dominante Follikel im Ultraschallbild oval bis unregelmäßig geformt dar und die Follikelwandstärke nimmt zu. Palpatorisch läßt sich eine Änderung der Konsistenz von prall zu weich-fluktuierend feststellen (HUGHES et al. 1972 und 1980, PIERSON und GINTHER 1985, KÄHN und LEIDL 1987, WILL 1988, TOWNSON et al. 1989).

Die zu Beginn der Rosse rasch ansteigende Östrogenproduktion des Graafschen Follikels induziert eine erhöhte Freisetzung von LH aus der Hypophyse, was schließlich die Ovulation auslöst. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus sinkt mit ansteigender LH-Konzentration die Östrogensynthese im Follikel ab (GINTHER 1992b, DAELS und HUGHES 1993).

2.1.3 Diöstrus

Durch die Umwandlung der Theka- und Granulosazellen in Luteinzellen entsteht nach der Ovulation das Corpus luteum, das in dieser Zyklusphase dominierende Funktionsgebilde (LIEBICH 1993). Aufgrund des Abfalls der Östrogenkonzentration und unter dem Einfluss des vom Gelbkörper produzierten Progesterons geht die Ödematisierung des Uterus so stark

zurück, dass sich das Organ im Ultraschallbild als homogenes, kompaktes Gebilde darstellt (GINTHER und PIERSON 1984).

Bereits 24 bis 36 Stunden nach der Ovulation ist bei der Stute ein Anstieg der Plasmaprogesteronkonzentration zu verzeichnen, der sich bis zum 5. bzw. 7. Tag des Diöstrus kontinuierlich fortsetzt und schließlich individuell verschiedene Höchstwerte zwischen 4 und 22 ng/ml erreicht (GINTHER 1992b). Etwa 3 Tage vor Beginn der nächsten Rosse sinken die Werte, als Folge der durch PGF 2α ausgelösten Luteolyse, dann wieder ab (HOPPEN 1995). TOWNSON et al. (1989) beschrieben einen signifikanten Anstieg des Progesteronspiegels vom Tag der Ovulation (= Tag 0) mit Werten um 2,5 ng/ml (= 7,9 pmol/ml) zum Tag 5 des Diöstrus mit Werten um 11 ng/ml (= 35,0 pmol/ml). Die Konzentrationen blieben bis zum Tag 11 auf diesem hohen Niveau und fielen dann bis zum Tag 17 wieder auf 2,5 ng/ml ab. Bei Untersuchungen von MAYER (1999) und KOLBERG (2000) blieb Progesteron ab Tag 5 mit Maximalwerten von 8 bis 10 ng/ml (= 25,4 - 31,8 pmol/ml) bis Tag 11 konstant auf einem hohen Niveau, danach begann der zunächst langsame Abfall der Werte. Mit der Luteolyse, die etwa am Tag 14 einsetzt, sank die Konzentration rasch wieder unter 1ng/ml (= 3,2 pmol/ml) ab.

Die Konzentrationen des Gesamtöstrogens liegen nach MAYER (1999) und KOLBERG (2000) im Diöstrus lediglich bei Basalwerten von 0,5 ng/ml (= 1,8 pmol/ml) bis 0,8 ng/ml (= 2,9 pmol/ml). Der 17 β -Östradiol-Spiegel liegt nach DAELS et al. (1991) bei 14 pg/ml (= 0,05 pmol/ml).

VERNON et al. (1979) fanden am Corpus luteum der Stute spezielle hochaffine Rezeptoren für Prostaglandin. Diese Rezeptoren nahmen von Tag 4 bis zum Tag 12 des Diöstrus zu, was dem Anstieg der Ansprechbarkeit des Corpus luteum auf PGF 2α in Vorbereitung auf die Luteolyse entspricht. Nach MATTIOLI et al. (1983) besitzen die Prostaglandin-Rezeptoren am Corpus luteum der Stute eine 23-fach höhere Affinität zu PGF 2α als die entsprechenden Rezeptoren beim Rind. Dies ermöglicht ihrer Meinung nach eine Luteolyse auch schon bei relativ geringen PGF 2α -Konzentrationen.

2.1.4 Luteolyse

Bei der Stute wird die Luteolyse durch die Einwirkung von uterinem $\text{PGF2}\alpha$ auf das Corpus luteum herbeigeführt. Welche Mechanismen im Einzelnen zur $\text{PGF2}\alpha$ -Synthese und Ausschüttung im Uterus führen, ist noch nicht genau bekannt (STABENFELDT et al. 1981, GINTHER 1979). Einige Autoren vermuten eine Induktion durch Oxytocin, da die stark erhöhte $\text{PGF2}\alpha$ -Ausschüttung zum Zeitpunkt der Luteolyse positiv korreliert ist mit einem Anstieg der Oxytocinrezeptorenexpression im Endometrium (TETZKE et al. 1987, SHARP et al. 1997, STARBUCK et al. 1998). Außerdem ließ sich in den Untersuchungen von SHARP et al. (1997) und STARBUCK et al. (1998) nur im späten Diöstrus, also zum Zeitpunkt der stärksten Oxytocinrezeptoren-Expression, die Prostaglandinsynthese durch die Applikation von Oxytocin deutlich steigern.

2.1.5 Frühgravidität

Die ersten 5 bis 6 Tagen verweilt der Konzeptus im Eileiter der Stute, dem Ort der Befruchtung (SCHNORR 1989, FLOOD 1993, WEBER et al. 1996) und wandert dann in den Uterus, wo er schnell an Größe zunimmt. Mit einem Durchmesser von 6 mm ist er im Ultraschallbild zwischen Tag 9 und 11 der Trächtigkeit erstmals darstellbar (GINTHER 1983a). Bis zum Tag 17 bewegt sich der Embryo frei im gesamten Uterus, dann erst setzt er sich an einer Stelle fest (GINTHER 1983b, GINTHER und PIERSON 1984).

Die Progesteronwerte steigen nach TERQUI und PALMER (1979) entsprechend zum Diöstrus auch in der Frühgravidität innerhalb der ersten 7 Tage auf Werte von 8 bis 10 ng/ml (= 25,4 bis 31,8 pmol/ml) an und bleiben aufgrund der ausbleibenden Luteolyse bis zum Tag 30 auf diesem Niveau. STOLLA et al. (1980) beobachteten dagegen bei trächtigen Stuten ab Tag 7 Progesteronkonzentrationen zwischen 8 und 9 ng/ml (= 25,4 und 28,7 pmol/ml), die damit deutlich über denen der zyklischen Stuten lagen, die lediglich 6 bis 7 ng/ml (= 19,1 bis 22,3 pmol/ml) erreichten. WEBER et al. (2000) fanden in der Trächtigkeit bereits ab Tag 3 mit 9,3 ng/ml (= 29,6 pmol/ml) signifikant höhere Werte als im Zyklus. Die Konzentrationen stiegen dann bis Tag 7 kontinuierlich weiter an bis auf Werte um 15 ng/ml (= 47,7 pmol/ml). Die Plasmaprogesteronspiegel blieben bis zur Beendigung der Untersuchungen am Tag 15 auf diesem Niveau und lagen damit signifikant höher als im Zyklus.

Mit Werten um 1ng/ml (= 3,7 pmol/ml) bleibt der Plasmaspiegel von 17 β -Östradiol während der Frühgravidität konstant auf einem niedrigen Niveau (TERQUI und PALMER 1979, DAELS et al. 1991, MAYER 1999).

2.2 Steroidhormonrezeptoren im Endometrium

Untersuchungen von TOMANELLI et al. (1991) zur Steroidrezeptorexpression im Endometrium der Stute mittels Tritium-markierten Steroiden ergaben eine erhöhte Dichte sowohl für Östrogen (ER)- als auch für Progesteronrezeptoren (PR) im Östrus und frühen Diöstrus, während im mittleren und späten Diöstrus eine geringere Konzentration zu verzeichnen war. In Studien an anderen Spezies hat sich außerdem gezeigt, dass die zyklusphasenspezifische Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren durch Progesteron gehemmt und durch Östrogen induziert wird (CLARK et al. 1977, COULSON und PAVLIK 1977, EVANS und LEAVITT 1980). Dies führte TOMANELLI et al. (1991) zu der Annahme, dass die Expression der Steroidrezeptoren bei der Stute, entsprechend den Verhältnissen bei anderen Tierarten, hormonell reguliert wird. McDOWELL et al. (1999) gehen ebenfalls von einer Steuerung durch die Steroidhormone aus. Sie wiesen im Gegensatz zu TOMANELLI et al. (1991) die mRNA, welche die genetische Information über die Aminosäuresequenz der Rezeptoren enthält, mit Hilfe der RT-PCR nach und fanden die stärkste Ausbildung von Progesteronrezeptor-mRNA im späten Diöstrus und im Östrus und die schwächste Ausprägung im frühen Diöstrus. Keine zyklusabhängigen Schwankungen beobachteten sie dagegen in der Expression der α -Östrogenrezeptor (ER α)-mRNA. Die β -Östrogenrezeptoren wurden nicht untersucht. McDOWELL et al. (1999) gehen davon aus, dass Progesteron seinen eigenen Rezeptor hemmt. Dafür spricht ihrer Meinung nach auch die geringe Menge an Progesteronrezeptoren in der frühen Trächtigkeit. Außerdem nehmen die letztgenannten Autoren an, dass sich ein anhaltend hoher Progesteronspiegel hemmend auf die Ausbildung des α -Östrogenrezeptors auswirkt, da am Tag 15 der Gravidität im Vergleich zum Zyklus signifikant geringere ER α -mRNA-Mengen zu finden waren. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch TOMANELLI et al. (1991) bei Untersuchungen an graviden Stuten, was die Autoren ebenfalls auf die erhöhte Progesteronsynthese zurückführten.

2.3 Gefäßversorgung im Genitale der Stute

2.3.1 Uterus

Für die Blutzufuhr des Uterus ist in erster Linie die A. uterina verantwortlich. Sie entspringt aus der A. iliaca externa, teilt sich dann in einen cranialen und einen caudalen Ast und kommuniziert sowohl mit dem Ramus uterinus der A. vaginalis als auch mit dem der A. ovarica (WILKENS und MÜNSTER 1984). Der größte Teil des venösen Abflusses erfolgt über den Ramus uterinus der V. ovarica, wobei der Verlauf der Venen dem der Arterien entspricht (GINTHER et al. 1972).

2.3.2 Ovarien

Auf Höhe des 4. Lendenwirbels zweigt die A. ovarica von der Aorta ab. Diese zieht im Mesovar bis zum Ovar hin, wo sie sich in zwei Äste aufteilt, die sich in engen Schleifen aneinander legen und so, nahe des Ovars, ein Arterienkonvolut bilden. Am Gekröseansatz treten die Gefäße in die Zona vasculosa des Ovars ein (WILKENS und MÜNSTER 1984). Die netzartig aufgeteilte V. ovarica zieht von der Ovulationsgrube ausgehend über die mediale Fläche des Ovars. Nach Austritt aus dem Ovar vereinigen sich die Äste zu einem Gefäß, welches dann in die V. cava caudalis mündet (KÖNIG und RIES 1987).

2.4 Dopplersonographie

Hier sollen nur die zum Verständnis wichtigsten Grundlagen erwähnt werden, da dieses Untersuchungsverfahren in vorangegangenen Dissertationen (BAUMGARTNER 1998, MAYER 1999, BÜHLMAYER 1999) bereits ausführlich erläutert wurde.

2.4.1 Physikalische Grundlagen

Als Grundlage für die Blutflussmessung dient die sogenannte Dopplerfrequenzverschiebung oder „Doppler-Shift“. Sie bezeichnet die Frequenzverschiebung zwischen den vom Schallkopf ausgesendeten und den vom Körpergewebe bzw. den Blutkörperchen reflektierten hochfrequenten Schallwellen. Die Höhe des Doppler-Shift ist abhängig von der Sendefrequenz des Schallkopfes, der Schallgeschwindigkeit im Gewebe (ca. 1540 m/s), dem Winkel zwischen auftreffenden Ultraschallstrahlen und Blutflussrichtung und der Blutflussgeschwindigkeit (DUDWIESUS et al. 1993).

Die Frequenzverschiebung kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$f_d = \frac{2 * f_o * TAMV * \cos\alpha}{c}$$

f_d = Frequenzverschiebung = Dopplershift (Hz)

f_o = Sendefrequenz des Schallkopfes (Hz)

TAMV = Blutflussgeschwindigkeit (m/s)

c = Ausbreitungswinkel des Ultraschalls im Körpergewebe (m/s)

α = Winkel zwischen Ultraschallstrahl und Blutflussrichtung

Diese akustisch wahrnehmbaren Frequenzverschiebungen können in Abhängigkeit von der Zeit auch in einem Koordinatensystem optisch sichtbar gemacht werden, wobei sich bei arteriellen Gefäßen Wellenformen mit deutlicher Unterteilung in Systole und Diastole ergeben (DICKY 1997).

2.4.2 Gerätetechnologie

Bei den heute verwendeten pulsed-wave (PW)-Dopplergeräten dient ein einziger piezoelektrischer Kristall im Schallkopf sowohl als Sender als auch als Empfänger der Schallwellen, d.h. es wird alternierend gesendet und empfangen. Dadurch wird ein tiefenselektives Arbeiten möglich, wobei die Messtiefe vom Untersucher eingestellt werden kann (DUDWIESUS et al. 1993).

2.4.3 Auswertungsmethoden

Zur Auswertung von Dopplerwellen stehen drei verschiedene Methoden zur Auswahl:

1. Qualitative Beurteilung:

Dabei werden die Dopplerwellen hinsichtlich der Flussrichtung, des Vorhandenseins eines diastolischen Blutflusses und dessen Kontinuität während einer Herzaktion deskriptiv beurteilt und klassifiziert (GOSWAMY und STEPTOE 1988, TEKAY et al. 1996).

2. Semiquantitative Beurteilung:

Für die semiquantitative Auswertung stehen verschiedene Blutflussparameter zur Verfügung, die sich aus der systolischen Frequenzverschiebung (S), der enddiastolischen Frequenzverschiebung (D), der minimalen diastolischen Frequenzverschiebung (Min) und der mittleren Frequenzverschiebung (M) berechnen lassen. Am gebräuchlichsten sind die S/D-Ratio (STUART et al. 1980), der Resistance Index (POURCELOT 1974) und der Pulsatility Index (GOSLING und KING 1975):

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

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

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

Diese Indices sind ein Maß für die Widerstandsverhältnisse in der Peripherie des betreffenden Gefäßes.

3. Quantitative Beurteilung des Blutflussvolumens:

Das Blutflussvolumen (Vol) kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Vol} = \text{TAMV} * A = \text{TAMV} * r^2 * \pi$$

Vol = Blutflussvolumen

A = Gefäßquerschnitt

TAMV = Blutflussgeschwindigkeit

r = Gefäßradius

Die Blutflussgeschwindigkeit „TAMV“, in Meter pro Sekunde (m/sec), ergibt sich durch Umstellen der Dopplergleichung:

$$\text{TAMV} = \frac{f_d * c}{2 * f_0 * \cos\alpha}$$

2.4.4 Blutflussmessungen bei Stuten während des Zyklus

2.4.4.1 Durchblutung des Uterus

Übereinstimmend fanden MAYER (1999) und KOLBERG (2000) durch tägliche bzw. alle zwei Tage durchgeführte dopplersonographische Messungen an der A. uterina ein zyklusabhängiges, wellenförmiges Blutflussmuster. Die uterine Perfusion war, gemessen am Resistance- (RI) bzw. Pulsatility Index (PI), um die Tage 1 und 11 verringert und im frühen Diöstrus und in der Rosse erhöht.

KOLBERG (2000) konnte im Östrus eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Blutflusswiderstand und der Gesamtöstrogenkonzentration im Plasma nachweisen. In dieser Zyklusphase steigerte sich die Durchblutung der A. uterina, gemessen am PI, und der Plasmaöstrogenspiegel erhöhte sich ebenfalls. In der frühen Lutealphase war die gute Uterusperfusion allerdings von sehr geringen Östrogenkonzentrationen begleitet.

Zwischen den Progesteronwerten und dem uterinen Blutfluss ermittelte KOLBERG (2000) keine Korrelation.

2.4.4.2 Durchblutung der Ovarien

Bei Untersuchungen des Blutflusses in der A. ovarica stellten KOLBERG (2000) ebenfalls zyklische Schwankungen fest, wobei die Arterie, die zum gelbkörpertragenden Ovar führte, einen deutlich besseren Blutfluss aufwies als die kontralaterale. Die Durchblutung der Arterie des Ovars mit dem C.l. war, gemessen an den PI-Werten, nach der Ovulation und am Tag 1 auf einem niedrigen Niveau, stieg dann wieder bis zu Maximalwerten am Tag 5 an, um

danach wieder langsam, aber kontinuierlich bis Tag 15 abzunehmen. Dieses Blutflussmuster entspricht in seinem Verlauf demjenigen, das MAYER (1999) bei seinen Untersuchungen zur lutealen Perfusion beobachtet hatte. KOLBERG (2000) vermutet daher, dass die Änderungen im Blutfluss der A. ovarica hauptsächlich auf die Vaskularisationsänderungen des Gelbkörpers zurückzuführen sind.

Während der Rosse gab es keine Unterschiede in den PI-Werten zwischen den beiden Aa. ovaricae, was darauf hinweist, dass keine Zusammenhänge zwischen der Follikelentwicklung und der ovarielle Perfusion bestehen. Beide Autoren konnten eine positive Korrelation zwischen dem Gestagenspiegel und der Durchblutung der dominanten A. ovarica bzw. der Gelbkörperdurchblutung nachweisen.

Die zyklusbedingten Änderungen in der Durchblutung der nichtdominanten A. ovarica entsprechen im wesentlichen denjenigen der A. uterina. Nach KOLBERG (2000) könnte diese Ähnlichkeit auf die Anastomose zwischen A. ovarica und A. uterina (GINTHER et al. 1972) zurückzuführen sein.

2.4.5 Blufflussmessungen in der Frühgravidität

2.4.5.1 Durchblutung des Uterus

Die Perfusion der A. uterina, gemessen an den RI- bzw. PI-Werten gleicht in ihrem wellenförmigen Verlauf während der ersten 15 Tage der Trächtigkeit weitgehend derjenigen des Zyklus (MAYER 1999, STEFFEN 2000). Allerdings beobachtete MAYER (1999) bereits ab Tag 5 der Trächtigkeit einen geringgradig deutlicheren Anstieg der uterinen Durchblutung im Vergleich zum Zyklus. Ab dem Tag 11 der Gravidität war dieser Unterschied signifikant. Außerdem wies ab Tag 11, d.h. ab dem Tag, an dem der Konzeptus erstmals per Ultraschall dargestellt werden konnte, die A. uterina des ipsilateralen Horns, also des Horns in dem sich der Konzeptus gerade befand, eine bessere Durchblutung auf als die der kontralateralen Seite. Dieser Unterschied war ab Tag 15 signifikant.

2.4.5.2 Durchblutung der Ovarien

Bei Untersuchungen der Corpus luteum-Perfusion in der Frühgravidität beobachtete MAYER (1999) einen Anstieg der Blutversorgung bis Tag 7, also nicht wie im Zyklus nur bis Tag 5. Danach verringerte sie sich wieder bis zum Tag 13, um dann bis zum Ende der Untersuchungen am Tag 30 auf relativ konstantem mittleren Niveau zu verbleiben.

Die Gelbkörperdurchblutung korrelierte bei MAYER (1999) in der Frühträchtigkeit wie schon im Zyklus positiv mit den Progesteronkonzentrationen im Plasma.

2.4.6 Der Einfluss von durchblutungsfördernden Medikamenten auf den Blutfluss im Genitale der Stute

STEFFEN (2000) und BOLLWEIN et al. (2001) führten Untersuchungen zur medikamentellen Beeinflussung der uterinen und ovariellen Durchblutung im Zyklus und in der Frühgravidität der Stute durch. Hierzu verabreichte sie 6 Traberstuten in jeweils einem Zyklus zweimal täglich den Prostaglandinsynthesehemmer Acetylsalicylsäure (2500 mg), den Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Hemmer Captopril (50 mg) und den NO-Donor Isosorbiddinitrat (30 mg und 60 mg). Die Untersuchungen wurden zwischen den Tagen 1 und 11 post ovulationem durchgeführt. In der Frühträchtigkeit applizierte sie 60 mg Isosorbiddinitrat. Während der Kontrollzyklen wurde Milchzucker (2500 mg) als Placebo verabreicht.

Die getesteten Pharmaka führten alle zu einer signifikanten Senkung des Blutflusswiderstandes der Aa. uterinae und der A. ovarica der dominanten Seite, wobei der deutlichste Effekt bei der Applikation von 30 mg Isosorbiddinitrat zu verzeichnen war.

Während der Anwendung waren erhöhte Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentrationen zu beobachten, welche aber nicht direkt proportional waren zum Anstieg der Durchblutung, d.h. die durch die Medikamente induzierte Durchblutungssteigerung ist nicht primär auf erhöhte Steroidhormonkonzentrationen im Plasma zurückzuführen.

2.5 Stickstoffmonoxid (NO)

In den letzten zwei Jahrzehnten rückte das freie Radikal Stickstoffmonoxid immer häufiger in das Interesse wissenschaftlicher Forschung. Es hat sich gezeigt, dass NO mehr biologische Funktionen im Organismus besitzt, als jedes andere bekannte Molekül (MORRIS et al. 1996). Von der Zeitschrift „Science“ wurde es 1992 sogar zum „Molekül des Jahres“ ernannt.

2.5.1 Stickstoffmonoxid-Synthese

NO wird synthetisiert (Abb. 2.1) von der NO-Synthase (NOS). Unterstützt von mehreren Co-Faktoren katalysiert diese die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO (PALMER et al. 1988, ROSSELLI et al. 1998, DIXIT und PARVIZI 2001). Die Verfügbarkeit von L-Arginin ist für die NO-Synthese essentiell, da diese Aminosäure der einzige physiologische NO-Donor für NOS-katalysierte Reaktionen ist (ROSSELLI et al. 1998). Es wird im Harnstoff-zyklus in zwei Schritten aus Citrullin mit Hilfe der beiden Enzyme Argininosuccinat-Synthetase und Arginino-Succinase gebildet (MORRIS 1992).

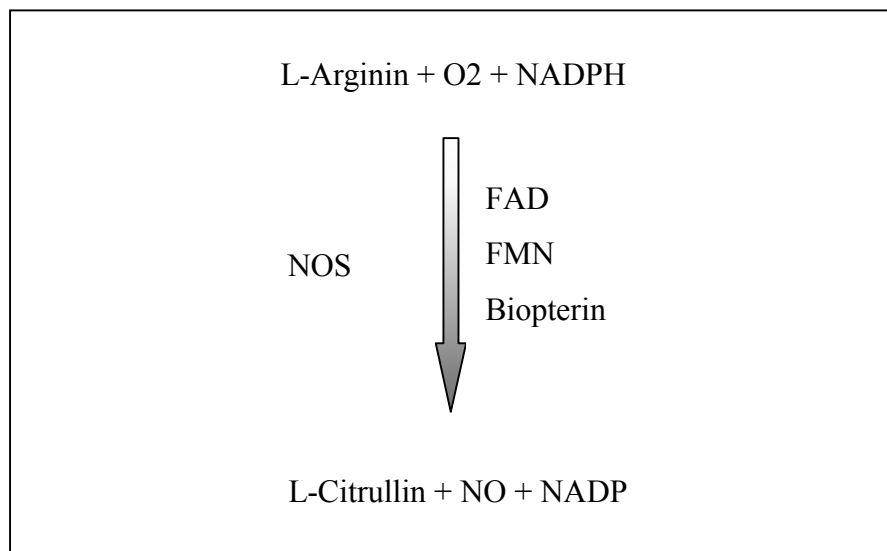


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der NO-Synthese aus L-Arginin (mod. nach DIXIT und PARVIZI 2001)

Daneben ist für die Aktivität der NOS das Vorhandensein verschiedener Co-Faktoren, wie NADPH, Flavin-Mononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-di-nucleotid (FAD) und Tetrahydrobiopterin (THB) wichtig (MORRIS und BILLIAR 1994, DAVIES et al. 1995, KELLY et al. 1996). So kann beispielsweise durch Glukose über den Pentose-Phosphatweg die NADPH-Synthese gesteigert werden, was wiederum eine erhöhte Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin, vermutlich über NOS, zur Folge hat (BLACHIER et al. 1991).

Die NO-Synthase (NOS) kommt in verschiedenen Isoformen vor. In Gehirn und Nervenzellen findet man eine neuronale NOS (nNOS), in Gefäßendothelien existiert eine endotheliale NOS (eNOS). Diese beiden Formen werden auch zusammengefasst als constitutive NOS (cNOS) bezeichnet, da sie beide für eine kontinuierliche basale NO-Freisetzung sorgen. Ihre Aktivität hängt von der Calciumkonzentration in der Zelle ab (GRIFFITH und STUEHR 1995, SNYDER 1995). Eine dritte nachgewiesene Isoform ist calciumunabhängig und induzierbar (iNOS), d.h. sie wird als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie im Rahmen von Entzündungen synthetisierten Zytokinen und bakteriellen Lipopolysaccharide ausgebildet (NUSSLER und BILLIAR 1993, MORRIS und BILLIAR 1994).

Man findet die NOS in verschiedenen Zellen, wie Endothelzellen (RADOMSKI et al. 1990), Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (BUSSE und MULSCH 1990, FLEMING et al. 1991), Herzmuskelzellen (SCHULZ et al. 1992), Macrophagen (HIBBS et al. 1988) und Neutrophilen (McCALL et al. 1989) sowie in Astrozyten (MOLLACE et al. 1990).

Die Expression der NOS kann unter pathologischen Bedingungen durch bakterielle Lipopolysaccharide, d.h. durch Bakterienendotoxine in der glatten Muskulatur (REES et al. 1990) und im Endothelium (RADOMSKI et al. 1990) induziert werden, was zu einer Relaxation der Gefäße (REES et al. 1990) und zu einer verminderten Empfänglichkeit für Vasokonstriktoren (JULOU-SCHAEFFER et al. 1990, REES et al. 1990) führt. Bestimmte Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor (TNF), können die Expression und Aktivität der iNOS induzieren. Andere Zytokine, wie Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β), hemmen die NOS-Aktivität (DAVIES et al. 1995).

Die Bildung von NO wird nach ASSREUY et al. (1993) offensichtlich über einen negativen Feedback-Mechanismus geregelt. Es hat sich gezeigt, dass NO-Donoren die NOS-Aktivität reversibel hemmen, während NO-Inhibitoren diese verlängern (ROGERS und

IGNARRO 1992, BUGA et al. 1993). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch VAZIRI und WANG (1999). Sie verabreichten Ratten zwei Tage lang den NO-Donor Isosorbiddinitrat (ISDN) und stellten im Aortaendothel gegenüber der Kontrollgruppe eine erhebliche Mindereexpression der eNOS fest. HINZ et al. (2000) konnten eine verminderte Transkription des iNOS-Gens bei Inkubation von Makrophagen mit dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) nachweisen und damit demonstrieren, dass auch die induzierbare NOS der Kontrolle durch einem negativen Feedback-Mechanismus unterliegt.

2.5.2 Wirkungsmechanismus von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid besitzt eine ultrakurze Halbwertszeit von unter 30 Sekunden, da es einerseits sehr schnell zu Nitrit und Nitrat metabolisiert wird (PALMER et al. 1987) und andererseits eine hohe Reaktivität mit Sauerstoffradikalen (GRYGLEWSKI et al. 1986) und Häm (PALMER et al. 1987, ROSSELLI et al. 1998), dem sauerstoffbindenden Porphyrinring von Hämoglobin, Myoglobin und der Zytochrome, aufweist.

Es liegt nach STAMLER et al. (1992) jedoch nicht nur in freier Form vor, sondern bildet zusammen mit Proteinen auch stabile zirkulierende und biologisch aktive S-Nitrosyl-Verbindungen. KEANEY et al. (1993) wiesen nach, dass an Albumin gebundenes NO in vivo und in vitro die identischen biologischen Wirkungen hervorruft wie ungebundenes NO. Die durchblutungsfördernde Wirkung von NO beruht hauptsächlich auf der Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (Abb. 2.2). Es bindet an den Hänteil der Guanylatzyklase und aktiviert so über eine Konformationsänderung das Enzym. Das von der Guanylatzyklase umgesetzte cGMP (3,5-Guanylmophosphat) fungiert als Mediator bei der Relaxation glatter Muskelzellen und hemmt deren Wachstum, verhindert die Plättchenaggregation und unterdrückt die Anheftung von Neutrophilen an Endothelzellen (ROSSELLI et al. 1998, MURAD 1994).

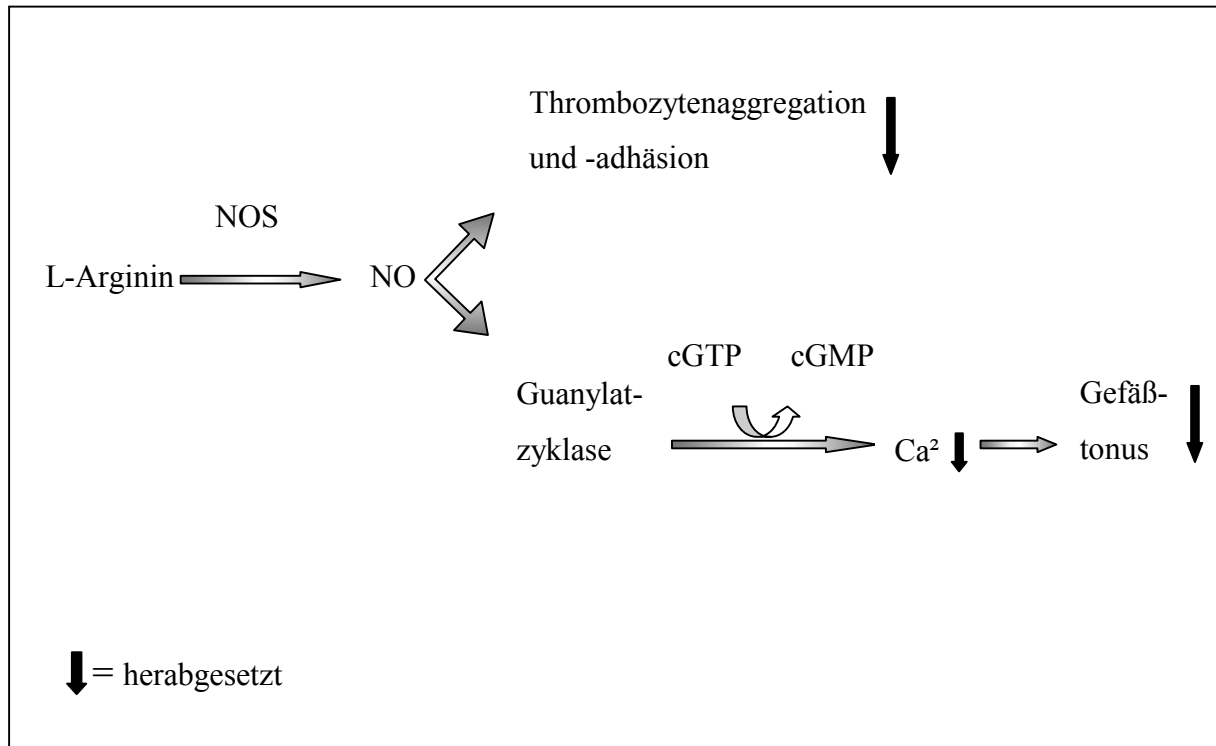


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Beteiligung von NO an der Blutflussregulation (modifiziert nach RAGGLE 1999)

NO ist aber auch noch als Mediator bei einer Vielzahl weiterer biologischer Prozesse beteiligt. So übernimmt es beispielsweise die Funktion eines Neurotransmitters, wirkt als antimikrobielles Agens der Makrophagen bei Infektionen (MONCADA et al. 1991) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Apoptosevorgängen (ROSSELLI et al. 1998).

Darüber hinaus ist NO imstande, mit einer Reihe von Metallkomplexen Nitrosokomplexe zu bilden und mit Häm-enthaltenden Proteinen, wie zum Beispiel Oxyhämoglobin, Verbindungen einzugehen. Außerdem bindet es an die Thiolgruppen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, wodurch es die glykolytische Aktivität senkt (MONCADA et al. 1991, KELLY et al. 1996), fungiert als Fänger für freie Radikale, insbesondere O_2^- und hat damit zellschützende Funktion (COOK und TSAO 1993).

2.5.3 Methoden zum Nachweis von Stickstoffmonoxid

Da ein direkter Nachweis von NO im Blut, aufgrund seiner hohen Reaktivität und schnellen Metabolisierung (PALMER et al. 1987, GRYGLEWSKI et al. 1986) sehr schwierig ist, behilft man sich mit indirekten Nachweismethoden.

Nachweismöglichkeiten bestehen in den verschiedenen Stadien der NO-Aktivierung: eine Quantifizierung der Transkription des Gens, welches die NOS kodiert (VAN VOORHIS et al. 1995, TELFER et al. 1995, ZHANG et al. 1997), die Bestimmung der NOS-Expression im Gewebe (ZACKRISSON et al. 1996, BANSAL et al. 1997, KHORRAM et al. 1999), die Messung der NO-Synthase-Aktivität (FALETTI et al. 1999) und schließlich die Erfassung von NO-Abbauprodukten im Plasma (ROSSELLI et al. 1994, ANTEBY et al. 1996).

2.5.3.1 Nachweis der NOS-mRNA mit Hilfe der reversen Transkriptase-PCR (Polymerase chain reaction)

Die Sequenz der Aminosäuren der NO-Synthase ist wie bei allen Proteinen genetisch festgelegt. Nach Aktivierung des zuständigen Gens wird von dessen DNA, welche die Information über die Protein-Primärstruktur enthält, eine komplementäre RNA, die sogenannte mRNA (messenger-RNA) erstellt. Diese Informationsübertragung wird als Transkription bezeichnet (KARLSON 1974).

Zum Nachweis der mRNA wird das Verfahren der PCR angewendet. Hierfür wird die mRNA zunächst extrahiert. Anschließend wird diese mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Die so entstandene doppelsträngige Nukleinsäure, bestehend aus je einem Strang mRNA und cDNA, wird dann durch Denaturierung in Einzelstränge zerlegt. Durch Zugabe von Oligonukleotiden, sogenannten „Primern“, und DNA-Polymerase entstehen im nächsten Schritt zwei neue Doppelstränge. Dieser Reaktionszyklus wird solange wiederholt bis eine nachweisbare Menge an mRNA amplifiziert worden ist (LÖFFLER 1997). Anhand der Anzahl benötigter Zyklen kann eine direkte Quantifizierung der ursprünglich im Gewebe vorhandenen mRNA-Menge vorgenommen werden.

2.5.3.2 Nachweis der NO-Synthase mit immunhistologischen Methoden

Dieses Verfahren dient dem Nachweis der Enzymexpression im Gewebe mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei werden spezifische Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Marker-Enzymen oder radioaktiven Isotopen markiert sind, auf das Gewebe aufgetragen. Kommt es zu einer Ankopplung an die antigenen Komponenten des nachzuweisenden Enzyms, kann dies mikroskopisch dargestellt werden (DENK 1989).

2.5.3.3 Messung der NOS-Aktivität über den Nachweis von L-Citrullin

Die Messung der Konzentration von L-Citrullin, das bei der Umsetzung von L-Arginin zu NO entsteht, gibt Aufschluss über die NO-Synthase-Aktivität. Nach Inkubation der Gewebeprobe mit C^{14} -markiertem L-Arginin, wird das gebildete L-(C^{14})Citrullin eluiert und die Radioaktivität des Eluats bestimmt (FALETTI et al. 1999).

2.5.3.4 Nachweis der NO-Abbauprodukte im Plasma

Die beim Abbau von NO entstehenden Endprodukte Nitrat und Nitrit können mit einem Verfahren auf Basis der GRIESS-Reaktion bestimmt werden (SCHMIDT et al. 1992, ROCKETT et al. 1994). Die Auswertung erfolgt photometrisch. Bei Anwendung dieser Methode sollte man allerdings berücksichtigen, dass Schwankungen in der Nitratkonzentration des Plasmas auch ernährungsbedingt sein können (KIRCHGESSNER 1975).

2.5.4 Bedeutung von Stickstoffmonoxid im weiblichen Reproduktionsgeschehen

Das Wissen über seine vielfältigen biologischen und physiologischen Leistungen legt die Vermutung nahe, dass NO auch einen Einfluss auf das Zyklusgeschehen haben könnte. Tatsächlich zeigte sich in einer Reihe von Untersuchungen, dass NO eine wichtige Rolle bei der Regulation sowohl des weiblichen als auch des männlichen Reproduktionsgeschehens spielt (ROSSELLI et al. 1998).

2.5.4.1 Vorkommen im Ovar und Bedeutung für dessen Funktionen

2.5.4.1.1 Vorkommen

Die zellspezifische Verteilung und Expression von eNOS und iNOS am Rattenovar wurde von VAN VOORHIS et al. (1995) untersucht. Mit immunhistologischen Methoden lokalisierten sie die eNOS in den Blutgefäßen des Ovars und die iNOS in Granulosazellen unreifer Follikel. Nach einer Gonadotropin-Injektion erfassten sie dann die Änderungen in der mRNA-Expression der beiden Isoformen mittels quantitativer PCR. Hierbei verhielten sich eNOS und iNOS genau gegensätzlich zueinander. Während die eNOS-mRNA zur Ovulation hin anstieg und danach wieder abfiel, sank die iNOS-mRNA im Laufe der Follikelentwicklung auf ein Minimum ab und stieg in der Lutealphase wieder an. Ähnliche Resultate erhielten auch JABLONKA-SHARIFF und OLSON (1997), welche die Expression der beiden Enzyme mit immunhistologischen Methoden semiquantitativ bestimmten. Zu genau gegensätzlichen Ergebnissen führte eine Studie von ZACKRISSON et al. (1996), welche ebenfalls die iNOS- und eNOS-Expression am Rattenovar mit immunhistologischen Methoden semiquantitativ erfassten. Bereits 6 Stunden nach der Gabe von hCG konnten sie einen Anstieg der iNOS-Expression in der Granulosazellschicht nachweisen, was sie auf die Einwanderung von iNOS-enhaltenden Leukozyten zurückführten. Des weiteren fanden sie im Gelbkörper eine weitaus höhere eNOS-Konzentration als im übrigen Ovargewebe, was sie mit der hohen Dichte an eNOS in den Blutgefäßen des Luteingewebes erklärten. Der scheinbare Widerspruch zu den Resultaten von VAN VOORHIS et al. (1995) kann nach ZACKRISSON et al. (1996) mit einem negativen Feedback-Mechanismus bei der Regulation der Translation der Enzyme begründet werden.

2.5.4.1.2 Bedeutung für Follikelentwicklung und Ovulation

Die Beobachtung von ROSSELLI et al. (1994), dass die NO-Synthese während der Follikelentwicklung ansteigt, lässt eine Beteiligung von NO an diesem Vorgang vermuten.

Auch ANTEBY et al. (1996) beschrieben einen positiven Zusammenhang zwischen der Follikelgröße und der Nitrit/Nitratkonzentration bei der Frau. Sie konnten nachweisen, dass die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat sowohl in der Follikelflüssigkeit als auch im Blut

mit steigendem Follikelvolumen zunahmen. Sie vermuteten, dass der NO-Anstieg um den Zeitpunkt der Ovulation zum einen zu einer Vasodilatation der ovariellen Gefäße führt und andererseits auf autokrinem oder parakrinem Wege auf die Granulosa- oder Thecazellen einwirkt, wodurch die Flüssigkeitsakkumulation im Follikel stimuliert und dessen Wachstum vorangetrieben wird.

Welche Auswirkungen eine Hemmung der NOS am Ovar auf die Ovulation hat, wurde von SHUKOWSKI und TSAFRIRI (1994) untersucht. Die intraperitoneale oder intrabursale Applikation des NOS-Inhibitors Aminoguanidin (AG), der selektiv die iNOS hemmt, resultierte bei 54% der Ratten in einer Unterdrückung der Ovulation. Im Gegensatz dazu konnten MITSUBE et al. (1999) nach der Verabreichung von AG keine Änderung in der Ovulationsrate feststellen, während nach der Applikation des nichtselektiven NOS-Inhibitors N(G)-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) deutlich weniger Tiere ovulierten. Auch HESLA et al. (1997), die den nichtselektiven NO-Inhibitor L-NAME an weibliche Kaninchen verabreichten, beobachteten danach einen Rückgang der Ovulationen. Zu einer signifikanten Verzögerung des Ovulationszeitpunktes bei Stuten kam es in einer Studie von PINTO et al. (2000) nach wiederholter intravenöser Applikation von NOS-Inhibitoren. Sowohl AG als auch L-NAME verlängerten den Zeitraum zwischen einer hCG-Applikation und der Ovulation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe um 12 bis 36 Stunden.

Dass die Hemmung der Ovulation nach Inhibition der NO-Synthese nicht nur auf einer dadurch bedingten verminderten ovariellen Durchblutung basiert, wiesen BONELLO et al. (1996) nach. Sie setzten mechanisch den ovariellen Blutfluss im gleichen Maße herab wie er nach Gabe von NO-Inhibitoren reduziert wird. Dabei stellten sie fest, dass dadurch die Ovulationsrate weit weniger beeinflusst wurde, als durch die Inhibition der NO-Synthese.

Weitere Untersuchungen zur Beteiligung von NO am Ovulationsgeschehen wurden von FALETTI et al. (1999) durchgeführt. Sie applizierten Ratten PMSG in Kombination mit hCG zur Ovulationsinduktion und bestimmten anschließend die NOS-Aktivität anhand der Menge an gebildetem Citrullin. Diese erreichte 10 Stunden nach hCG mit einer Steigerung um 75% gegenüber dem Ausgangswert ihr Maximum. Weiterhin wiesen sie immunhistologisch nach, dass allein eine vermehrte iNOS-Expression für diese Steigerung verantwortlich sein musste, da die eNOS-Expression unverändert blieb. Die gleichen Autoren stellten außerdem fest, dass durch die intrabursale Applikation der NOS-Inhibitoren L-NAME und L-NMMA nicht nur

die Ovulation, sondern auch die Prostaglandinsynthese unterdrückt wird. Sie folgerten, dass NO auch durch Stimulation der Cyklooxygenase (COX) zur Ovulation beiträgt und dass sowohl NOS als auch COX den die Ovulation stets begleitenden entzündlichen Prozess fördern. Diese Ergebnisse entsprechen denen einer *in vitro* Studie von YAMAUCHI et al. (1997), bei der durch die Zugabe von L-NAME die Synthese von PGE₂ und PGF₂ α am Kaninchenovar gehemmt und durch den NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) stimuliert werden konnte.

JABLONKA-SHARIFF et al. (1999) fanden heraus, dass NOS-Inhibitoren ausser der Ovulation auch die Oozytenmaturation beeinträchtigen. Sie verabreichten Ratten L-NAME bzw. L-NIL (L-N⁶-1-Iminoethyl-Lysin) und untersuchten nach der Ovulation die Qualität der Eizellen. Es fiel auf, dass bei diesen Ratten gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe deutlich mehr unreife und morphologisch veränderte Oozyten vorhanden waren. Daraus folgerten die Autoren, dass NO eine wichtige Rolle bei der Reifung der Eizelle spielen muss.

Versuche zur Klärung der Bedeutung der iNOS am Ovar wurden von MILLER et al. (1996) durchgeführt, indem sie über längere Zeit den NOS-Inhibitor NG-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) an Ratten und Meerschweinchen verabreichten. Sie konnten dabei aber keine anhaltende Abnahme des NO-Spiegels im Plasma feststellen, da durch die Behandlung die Expression des iNOS-Gens induziert wurde. Daraus folgerten sie, dass die iNOS für eine kompensatorische Erhöhung bzw. Normalisierung der NO-Konzentration bei anhaltender Hemmung der NOS-Aktivität verantwortlich sei.

Auch eine zytostatische Wirkung der iNOS auf die Granulosazellen wurde in Betracht gezogen. MATSUMI et al. (1998) fanden heraus, dass die iNOS ausschließlich von Granulosazellen unreifer Follikel exprimiert wird. Nach der Applikation von PMSG beobachteten die Autoren neben einem gesteigerten Follikelwachstum eine Abnahme der iNOS-mRNA-Dichte im Rattenovar. Dies deutet nach Ansicht der Autoren darauf hin, dass iNOS am Ovar in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Follikels unterschiedlich stark exprimiert wird.

2.5.4.1.3 Bedeutung für die Luteolyse

MOTTA et al. (1999) gelang es bei Versuchen an Ratten durch die Applikation von L-NAME in der späten, nicht aber in der frühen oder mittleren Lutealphase, die COX-Aktivität zu hemmen und die Progesteronsynthese zu steigern. Durch den NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) wurde die gegenteilige Wirkung erzielt. Sie schlossen aus diesen Ergebnissen auf einen positiven Feedback-Mechanismus zwischen NOS und COX und auf die Beteiligung von NO an der Luteolyse durch Steigerung der Prostaglandinsynthese und Inhibition der Steroidsynthese. In einer weiteren Studie (MOTTA et al. 2001a) konnten sie durch die Applikation von PGF 2α die ovarielle NOS-Aktivität steigern, während die COX-Inhibition mittels Indomethacin die NOS-Aktivität reduzierte. Außerdem stellten sie (MOTTA et al. 2001b) eine Beteiligung von NO an der im Zusammenhang mit der Involution des Corpus luteum stattfindenden Lipidperoxidation fest.

Die Rolle von NO bei der Luteolyse des Rindes wurde von JAROSZEWSKI und HANSEL (2000) untersucht. Nach intralutealer L-NAME-Applikation mittels eines Mikrodiälysesystems bei Rindern in der mittleren bzw. späten Lutealphase, wurden Blutproben aus dem Ovar und der Vena jugularis analysiert. In der mittleren Lutealphase war eine erhöhte Progesteronkonzentration im Perfusat, aber keine Veränderung in der Lebensdauer des Corpus luteum nachweisbar. Bei Rindern im späten Diöstrus konnten im Ovar erhöhte Progesteronwerte gemessen werden. Im peripheren Blut blieben die Konzentrationen bis zum Tag 25 des Zyklus auf einem hohen Niveau. Diese Resultate deuten nach Ansicht der Autoren darauf hin, dass NO als luteolytisch wirkender Faktor an der Corpus luteum-Involution beim Rind beteiligt ist.

2.5.4.2 Vorkommen im Uterus und Bedeutung für dessen Funktionen

Nicht nur bei der Regulation der Ovaraktivität, sondern auch bei der Kontrolle der Uterusfunktionen kommt NO eine zentrale Bedeutung zu (ROSSELLI et al. 1998).

2.5.4.2.1 Vorkommen

TELFER et al. (1995), welche das Vorkommen der mRNA der constitutiven NOS mit Hilfe der PCR im menschlichen Uterus untersuchten, fanden diese hauptsächlich im Drüsenepithel und Stroma des Endometriums sowie in den Blutgefäßen des Myometriums. Die Autoren differenzierten dabei nicht zwischen endothelialer und neuronaler NOS. Mit immunhistologischen Methoden gelang es KHORRAM et al. (1999) die eNOS im Endometrium der Frau während der Lutealphase zu identifizieren. Sie fanden das Enzym in Drüsen und um die Gefäße herum, was sie zu der Annahme führte, dass NO an der Regulation der uterinen Sekretion und Durchblutung beteiligt sein muss. Sie konnten, wie auch BANSAL et al. (1997), keine iNOS nachweisen.

Im Gegensatz zum Zyklus fand man während der Gravidität sowohl bei der Frau als auch bei der Ratte in den Myozyten eine starke Expression der iNOS (BANSAL et al. 1997, YOSHIKI et al. 2000, RIEMER et al. 1997, ALI et al. 1997). Das Myometrium ist damit, wie auch das Ovar, eines der wenigen Gewebe, die iNOS auch unter physiologischen Bedingungen exprimieren (ROSSELLI et al. 1998)

2.5.4.2.2 Bedeutung für die Blutflussregulation

Das Vorkommen von eNOS im Endo- und Myometrium (TELFER et al. 1995) legt die Vermutung nahe, dass NO eine Rolle bei der Regulation der uterinen Durchblutung spielt. In Studien von VAN BUREN et al. (1992) an Schafen stellte sich heraus, dass ein durch lokale oder systemische Östrogenapplikation erzeugter Anstieg in der uterinen Perfusion durch den NOS-Inhibitor L-NAME antagonisiert werden kann. Die Autoren schlossen aus dieser Beobachtung, dass die vasodilatatorischen Eigenschaften des Östrogens durch NO vermittelt sind. Sie nehmen außerdem an, dass NO möglicherweise sogar unabhängig von Östrogen direkt den uterinen Blutfluss erhöhen kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch ROSENFELD et al. (1996). Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von ZHANG et al. (1997), welche die Aktivität und mRNA-Expression der iNOS und eNOS nach 17 β -Östradiol induzierter Durchblutungssteigerung im Uterus ovariektomierter Ratten untersuchten. Sie konnten weder in der Aktivität, noch in der Expression der mRNA der beiden Enzyme

Änderungen dokumentieren, was sie zu der Annahme führte, dass noch andere Mechanismen involviert sein müssen.

2.5.4.2.3 Bedeutung für die Uteruskontraktilität

NO wird neben dem Einfluss auf die uterine Durchblutung auch eine Rolle bei der Regulation der Kontraktilität des Uterus zugesprochen. So betrachteten BANI et al. (1999), die Studien an Mäusen durchführten, dass Relaxin unter anderem im Myometrium die Expression von eNOS stimuliert. Außerdem stellten sie eine Abschwächung der erschlaffenden Wirkung des Relaxins auf den Uterus nach Zugabe des NOS-Inhibitor Nitro-L-Arginin fest. Sie vermuteten daher, dass der Anstieg des Relaxins während der Trächtigkeit auch der Erhöhung der NO-Synthese dient. NO scheint jedoch nicht nur in der Gravidität, sondern auch im Zyklus die Kontraktilität des Uterus hemmen zu können. BRADLEY et al. (1998) unterdrückten durch die Verabreichung des NO-Donors S-Nitroso-L-Cystein spontane Kontraktionen des Uterus nichtschwangerer Frauen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen KUENZLI et al. (1996) bei Versuchen an Meerschweinchen.

RIEMER et al. (1997), welche die Veränderungen in der myometrialen iNOS-Expression bei der Ratte während der Trächtigkeit und der Geburt untersuchten, dokumentierten einen Anstieg der iNOS während der Trächtigkeit und eine Verminderung bei Einsetzen der Geburt. Diese Ergebnisse, zusammen mit der Beobachtung von BANSAL et al. (1997), dass die iNOS bei der nichtschwangeren Frau nicht nachweisbar ist, lassen darauf schließen, dass die iNOS und nicht die eNOS die Schlüsselrolle bei der Regulation der kontraktilen Funktion des Uterus spielt. Durch die Verabreichung von NO-Donoren konnten Kontraktionen des graviden Uterus bei verschiedenen Tierarten und bei der Frau gehemmt werden (JENNINGS et al. 1993, YALLAMPALLI et al. 1993, HEYMANN et al. 1994, BUHIMSCHI et al. 1995).

2.5.4.2.4 Bedeutung bei endometrialer Inflammation

Zur Rolle von NO bei Entzündungen im weiblichen Genitale sind bislang nur in sehr wenigen Studien bekannt. FANG et al. (1999) injizierten bei Ratten pathogene E.coli in das linke Uterushorn und banden es dann ab. Bei der nachfolgenden Erfassung der NO-Produktion bzw. der NOS-Expression stellte sich heraus, dass nur im infizierten Horn

vermehrt NO gebildet worden war und dass die iNOS auch nur in diesem Horn nachgewiesen werden konnte, wohingegen die eNOS in beiden Uterushörnern gleich stark ausgebildet war. Aufgrund ihrer eigenen Ergebnisse und der Beobachtung, dass Defizite in der NOS-Aktivität in anderen Organen zu stärkerem Bakterienwachstum führen (OCHOA et al. 1991, WHEELER et al. 1997), nehmen FANG et al. (1999) an, dass NO eine Rolle bei der Infektionsbekämpfung spielt.

2.5.5 Der NO-Donor Isosorbiddinitrat (ISDN): Eigenschaften und Pharmakokinetik

Isosorbiddinitrat (ISDN) gehört zur Gruppe der organischen Nitrate und wirkt direkt relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur, wodurch es zu einer Vasodilatation kommt (KRAUPP et al. 1992, STADApHarm 2001).

Im Körper wird von ISDN zunächst das Nitrit-Ion reduktiv abgespalten, aus dem dann durch erneute Reduktion die eigentliche Wirksubstanz NO gebildet wird. Stickstoffmonoxid reagiert mit SH-Gruppen unter Bildung instabiler S-Nitrosothiole, welche die zytoplasmatische Guanylatzyklase aktivieren. Dadurch kommt es zu einem Absinken der intrazellulären Calciumionen-Konzentration und damit zur Abnahme des Gefäßtonus (KRAUPP et al. 1992, MUTSCHLER et al. 2001).

ISDN wird beim Menschen über die Mundschleimhaut sehr rasch resorbiert und entfaltet seine Wirkung bereits nach wenigen Minuten. Die Resorption über den Magen-Darmtrakt erfolgt deutlich langsamer, so dass hier erst nach etwa 20 Minuten mit dem Wirkungseintritt zu rechnen ist. Bereits bei der ersten Leberpassage wird der größte Teil des ISDN zu Isosorbid-2 (2-ISMN) - und Isosorbid-5-Mononitrat (5-ISMN) biotransformiert (Abb. 2.3).

Diese Mononitrate spalten ihrerseits noch ein NO-Molekül ab und besitzen eine längere Wirkungsdauer als ISDN (Abb. 2.3). So beträgt die Plasmahalbwertszeit von 5-ISMN beim Menschen etwa 4 bis 6 Stunden, die von 2-ISMN 1,5 bis 2 Stunden (STADApHarm 2001, MUTSCHLER et al. 2001).

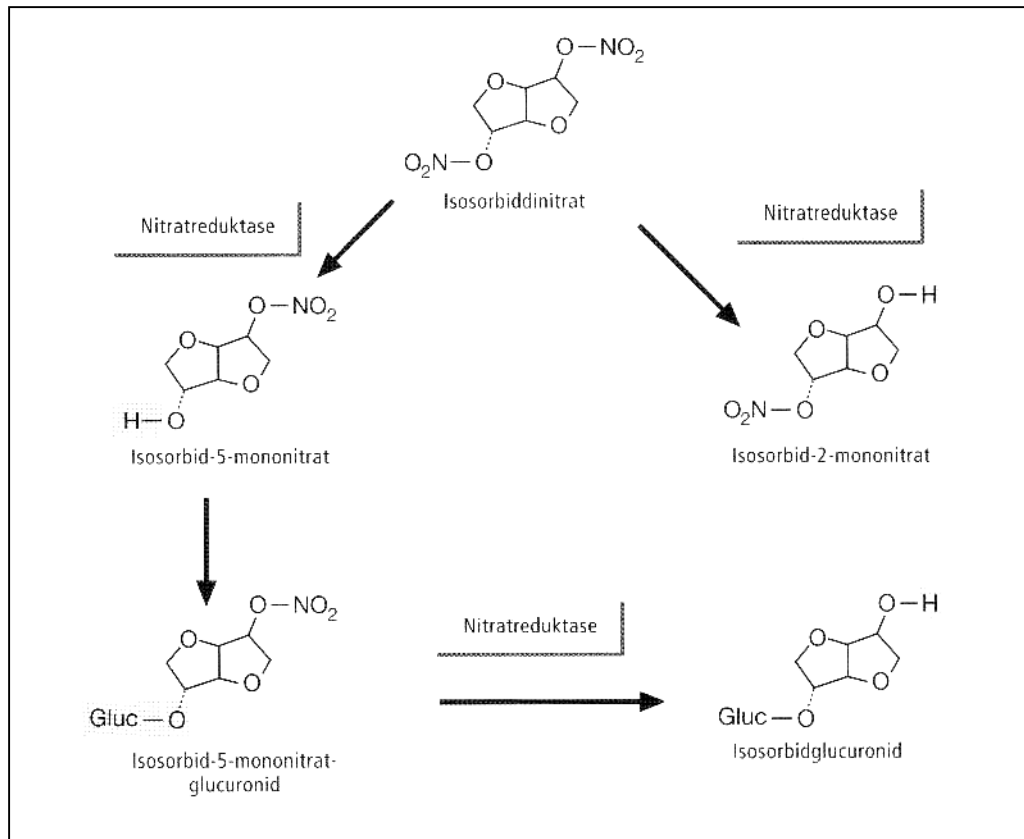


Abb. 2.3: Biotransformation von Isosorbiddinitrat
(aus: MUTSCHLER 2001, „Arzneimittelwirkungen“)

ISDN unterliegt einem erheblichen „First-pass-Effekt“, d.h. ein großer Teil des ISDN wird direkt wieder ausgeschieden, bevor es seine Wirkung entfalten kann. Dieser Effekt muss durch eine Erhöhung der Dosierung ausgeglichen werden (KRAUPP et al. 1992).

2.5.6 Anwendung von NO-Donoren in der Humanmedizin

In der Humanmedizin macht man sich bereits seit einiger Zeit vor allem die vasodilatatorischen Eigenschaften von NO zunutze. So wird der NO-Donor Isosorbiddinitrat (ISDN) zur Behandlung koronarer Herzerkrankungen, wie Durchblutungsstörungen der Herzkranzgefäße, chronischer Herzinsuffizienz und pulmonaler Hypertonie eingesetzt. Dabei kommt es durch Vasodilatation der Venen zu einer Verminderung des venösen Rückstroms und damit zur Herzentlastung (MUTSCHLER 1991, KRAUPP et al. 1992, SPONER et al. 1996).

Auch in der Gynäkologie wurde die durchblutungsfördernde Wirkung von NO bereits erfolgreich getestet. GILES et al. (1992) und RAMSAY et al. (1994) gelang es mit Hilfe verschiedener NO-Donoren den uteroplacentaren Blutfluss zu verbessern und NAKATSUKA et al. (1999) wendeten ISDN erfolgreich bei schwangerschaftsbedingter Hypertonie und intrauteriner Wachstumsretardierung an. Auch THALER et al. (1996 und 1999) kamen zu ähnlichen Ergebnissen.

2.5.7 Anwendung von NO-Donoren in der Tiermedizin

Organische Nitrate werden auch in der Tiermedizin zur Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt (KRAUPP et al. 1992, SPONER et al. 1996).

In der bereits erwähnten Untersuchung von STEFFEN (2000) führte der Einsatz des NO-Donors Isosorbiddinitrat zu einer signifikanten Steigerung der uterinen Durchblutung.

Daneben wurden NO-Donoren bereits erfolgreich bei der akuten Hufrehe des Pferdes angewendet. So konnte COGSWELL et al. (1995) NO auch in den Gefäßendothelien der digitalen Arterien des Pferdes nachweisen und ELLIOT et al. (1994) und HINKLEY et al. (1996) beobachteten, dass es bei der Rehe zu Schäden am Gefäßendothel der Hufe kommt, wodurch die NO-Synthese gestört wird. Dies führt nach Angabe der letztgenannten Autoren dann zu einer Vasokonstriktion der Gefäße des Hufes. Anhand von Infrarotuntersuchungen wiesen HINKLEY et al. (1996) außerdem nach, dass durch die intravenöse Applikation von L-Arginin bzw. die transdermale Anwendung des NO-Donors Glyceryltrinitrat die Durchblutung des Hufes deutlich verbessert und die bei Hufrehe typische Pulsation gemildert werden kann.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

Während des Untersuchungszeitraumes von März 2000 bis April 2001 standen 5 klinik-eigene Traberstuten im Alter von 8 bis 17 Jahren zur Verfügung (Tab. 3.1). Zwei Stuten waren multipar, eine Stute war unipar, die übrigen nullipar.

Tab. 3.1: Lebensalter und Reproduktionsstatus der Stuten:

Stute	Lebensalter	Reproduktionsstatus
A	17	multipar
B	15	multipar
C	11	nullipar
D	10	nullipar
E	8	unipar

Die Pferde wurden in Einzelboxen auf Stroheinstreu gehalten und erhielten tagsüber freien Auslauf in der Gruppe. Gefüttert wurde mit Kraftfutter und Heu ad libitum. Die Stuten waren während des Untersuchungszeitraumes klinisch gesund und zeigten regelmäßige Sexualzyklen.

3.2 Versuchsdurchführung

Die 5 Stuten wurden jeweils über insgesamt 4 Zyklen und während einer Frühgravidität untersucht. Bei den 4 Zyklen handelte sich um einen medikamentell unbeeinflussten Kontrollzyklus, einen Zyklus, bei dem artifiziell die Luteolyse induziert wurde, sowie 2 Zyklen, in denen der NO-Donor Isosorbiddinitrat (ISDN) verabreicht wurde. Die Reihenfolge, in der die einzelnen Versuche bei den 5 Stuten durchgeführt wurden, war beliebig.

Die Untersuchungen beinhalteten farbdoppler- und ultrasonographische Aufzeichnungen sowie die Gewinnung von Blutproben und Endometriumsbiopsaten.

3.2.1 Kontrollzyklus

In diesem Zyklus wurde Milchzucker (Edelweiß-Milchzucker, Edelweiß-Milchwerke/Kempton-Allgäu) als Placebo verabreicht. Davon wurden zweimal täglich 30 mg mit Weizenkleie gemischt verfüttert. Dieser Zyklus wird im folgenden als Kontrollzyklus bezeichnet.

Die oben genannten Untersuchungen erfolgten an den Zyklustagen 0 (Tag 0 = Ovulation, bei Doppelovulation = Tag der ersten Ovulation), 1, 5, 11 und 15. Während des Östrus wurden die sonographischen Untersuchungen und die Blutprobenentnahme täglich durchgeführt, die Biopsieprobenentnahme wurde einmalig am zweiten oder dritten Tag der Rosse vorgenommen. Der Östrus wurde als die Zeit definiert, in der die Stuten äußere Anzeichen der Rosse, wie Blitzen und Dulden, zeigten und sich eine Ödematisierung des Uterus sonographisch darstellen ließ.

3.2.2 PGF 2α -Zyklus

Bei diesem Versuch wurde am 5. Tag nach der Ovulation mit dem PGF 2α -Analogon Tiaprost (Iliren[®] 450mg i.m., Fa.Intervet/Wiesbaden) die Luteolyse eingeleitet. Zeigten die Stuten einige Tage später Rosseerscheinungen und wiesen sie eine Follikelgröße von mindestens 35 mm auf, wurde ihnen zur Ovulationsinduktion hCG (Choriolutin[®] 2500 IE i.v., Fa Albrecht/Aulendorf) appliziert. Blutflussmessungen und Blutprobenentnahmen wurden unmittelbar vor der PGF 2α -Injektion (= Zeitpunkt 0) und in der 1. Stunde nach der Applikation in Abständen von je 30 Minuten vorgenommen. Im folgenden wurde nach 3, 6, 12, 24, 36, 48 Stunden und schließlich alle 24 Stunden bis zur Ovulation untersucht. Die Biopsieprobenentnahmen erfolgten jeweils vor der Injektion, 12 und 36 Stunden danach, direkt vor der hCG-Injektion und nach Eintritt der Ovulation.

3.2.3 ISDN-beeinflusste Zyklen

Während jeweils zwei Zyklen wurde den Stuten zweimal täglich 30 mg ISDN oral verabreicht (ISDN 40[®], Stada). Die Tabletten wurden dazu in Wasser aufgelöst und mit Weizenkleie vermischt gefüttert, wobei die abendliche Applikation erst nach den Untersuchungen erfolgte. Da nach der Biopsieprobenentnahme an den Tagen 0, 1 und 5 bei allen Stuten am Tag 11 bereits eine Luteolyse bzw. Anzeichen der Rosse zu beobachten waren, wurden bei jeder Stute zwei Zyklen mit ISDN-Fütterung durchgeführt. In einem Zyklus (ISDN BI) wurden an den Tagen 0, 1 und 5 Biopate gewonnen, im nächsten Zyklus (ISDN BII) an den Tagen 11, 15 und an einem Tag der Rosse. Die Blutflussmessungen sowie Ultraschalluntersuchungen und Blutprobenentnahmen fanden nach dem gleichen Schema wie im Kontrollzyklus statt.

3.2.4 Frühgravidität

Wiesen die Stuten einen mittleren Follikeldurchmesser von 35 mm auf, wurden ihnen 2500 IE hCG intravenös injiziert. Die Besamung erfolgte 36 Stunden später mit Nativsperma eines klinikeigenen Haflingerhengstes (Inseminationsvolumen: 20 ml, Konzentration: 50 000-100 000 Spermien/ μ l).

Die Farbdoppler- und sonographischen Untersuchungen wurden an den Tagen 0, 1, 5, 11 und 15 der Gravidität durchgeführt und danach am Tag 15 eine Biopsieprobe entnommen.

3.3 Sonographische Untersuchungen

3.3.1 Geräte

Die transrektalen Farbdoppler- und Ultraschalluntersuchungen wurden mit Hilfe des Farbdopplersonographen SSH 140A der Firma Toshiba (Tokyo/ Japan), der mit einer 7,0 MHz Mikrokonvexsonde ausgestattet war, durchgeführt. Zur Aufzeichnung der Pulswellen und des Ultraschallbildes im B-Modus war an das Gerät ein VHS-Videorekorder (Panasonic Ag 7350) angeschlossen.

3.3.2 Ultrasonographische Untersuchungen

Die Befunderhebung an Uterus und Ovarien erfolgte bei jeder Untersuchung im B-Modus. Die Größe der Fruchtanlage wurde als arithmetisches Mittel aus dem größten Längs- und Querdurchmesser angegeben.

3.3.3 Farbdopplersonographische Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden im gepulsten Modus mit einem Hochpassfilter von 50 Hz durchgeführt. Die Aa. ovaricae wurden nach der von BÜHLMAYER (1999) beschriebenen Methode aufgesucht, die Identifizierung der Aa. uterinae erfolgte nach der von BOLLWEIN et al. (1998) beschriebenen Methode.

3.3.4 Auswertung der Dopplerwellen

Aus den aufgezeichneten Pulswellen wurden zwei konsekutive, möglichst ähnliche Wellen ausgewählt, welche dann an einem Macintosh-Computer mit Hilfe des Bildanalyseprogramms „NIH-Image“ (Version 1.6., U.S. National Institute of Health, 1996) ausgewertet wurden. Anhand des Winkels zwischen Dopplerstrahl und Gefäßanschnitt (α) und der maximalen Blutflussfrequenzverschiebung (TAMF) wurde die mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) der beiden Dopplerwellen berechnet und deren Mittelwert bestimmt. Anschließend wurde über den Gefäßdurchmesser (D) und TAMV das mittlere Blutflussvolumen (Vol) unter Anwendung folgender Formel ermittelt.

$$\text{Vol [ml/min]} = \text{TAMV [cm/s]} * \pi * (\text{D [cm]} * 0,5)^2 * 60$$

TAMV und Vol wurden zur weiteren statistischen Auswertung herangezogen.

3.4 Blutprobenentnahme und –untersuchung

3.4.1 Plasmagewinnung

Zur Bestimmung des Hormon- und Nitrat/Nitritgehaltes im Plasma wurde den Stuten am Ende jeder Untersuchung mit Hilfe des Venoject®-Vakuum-Blutentnahmesystems (Terumo Europe N. V. Leuven/Belgien) eine EDTA-Blutprobe aus der V. jugularis entnommen. Die Probe wurde zunächst auf Eis gelagert und dann 15 min in einer Kühlzentrifuge (Hettich Universal 32 R, Andreas Hettich GmbH und Co.KG, Tuttlingen) bei 4°C und 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

3.4.2 Östrogenbestimmung

Zur Bestimmung der Plasmaproben wurde der Gesamtöstrogentest-EIA (Antikörper: 1,3,5(10)-Östradiol-3,17 β -diol-17-HS-BSA Code 2/3Whst; Marker- Enzym: 1,3,5(10)-Östratrien-3,17 β -diol-17HS-HRP) verwendet. Die Testdurchführung erfolgte mit der Doppelantikörpertechnik in 96-Loch Mikrotiterplatten wie bei MEYER (1989) und MEYER et al. (1997) beschrieben.

Zu 100 μ l Plasma wurden 250 μ l Hydrolyselösung (Acetat-Puffer pH 4,8 mit 0,4% β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*) pipettiert und 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 ml Äthergemisch (30% tert. Butyl-Methyl-Äther und 70% Petroläther). Nach 50 min Schütteln wurden die Proben bei -60°C ausgefroren, der Überstand abgegossen und abgedampft. Die Lösung des Rückstandes erfolgte in 2 ml 30% Methanol. Von diesen Extrakten wurden 20 μ l pro well unverdünnt in die EIA-Tests eingesetzt.

3.4.3 Progesteronbestimmung

Zur Untersuchung der Progesteronäquivalente wurde die von BOLLWEIN et al. (2002) beschriebene Methode des EIA angewendet. Die Bestimmung erfolgte direkt aus dem Plasma

(5µl) mit einem monoklonalen Antikörper (Antigen: Progesteron 7 α BSA, Enzym: Progesteron-3-HRP). Dieser zeigte folgende Kreuzreaktionen: 50% mit Dihydroprogesteron, dem bei der Stute biologisch aktiven Gestagen, und 100% mit Progesteron.

3.4.4 Nitrat/Nitritbestimmung

Die Bestimmung von Nitrat und Nitrit wurde nach dem Protokoll von BLUM (2000) auf Basis der GRIESS-Reaktion, durchgeführt. Diese Methode wurde durch Kombination der von SCHMIDT et al. (1992) und ROCKETT et al. (1994) beschriebenen Verfahren entwickelt. Aus Sulfanilamid wird mit salpetriger Säure (HNO₂) das Diazoniumion gebildet. Durch anschließende Umsetzung mit NEDA, einem reaktionsfähigen Aromat, entsteht ein farbiges Molekül. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist von der Anzahl der Diazoniumionen und somit von der Nitrat-Konzentration direkt abhängig. Nach photometrischer Bestimmung der Extinktion bei 540 nm erfolgt die Auswertung anhand einer Standardkurve.

3.5 Biopsieprobenentnahme und -untersuchung

3.5.1 Probengewinnung

Mit Hilfe einer Biopsiezange nach KEVORKIAN (Fa. Hauptner, Solingen) wurde das Probenmaterial transvaginal vom Endometrium gewonnen. Die Proben wurden dann bis zur Bestimmung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.5.2 Expressionsanalytik

Im Institut für Physiologie des FML der TU-München-Weihenstephan wurde die mRNA-Expression von eNOS und iNOS sowie der Östrogenrezeptoren α und β mittels RT-PCR-Analyse quantifiziert.

Nach abgewandeltem Protokoll von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) wurde die total-RNA isoliert und anschließend der Nukleinsäuregehalt bestimmt (photometrisch bei

260 nm). Die cDNA-Synthese erfolgte dann durch Hexamer-Priming mit 750ng total-RNA pro Ansatz nach dem Protokoll von GABLER et al. (1997).

Über den Nachweis von etablierten Haushaltsgen-Gehalten (18S-rRNA) wurden die cDNA-Präparationen validiert. Zur anschließenden Amplifikation der Einzelkomponenten des NOS-Systems und der Östrogenrezeptoren wurden spezieübergreifende Primerpaare verwendet.

Zur quantitativen Erfassung des Gehaltes an mRNA der zu bestimmenden Faktoren kam die „real-time“-PCR (LightCycler [®], Roche, Mannheim) zur Anwendung. Eingesetzt wurden 1µl Probe mit 9µl Mastermix[®] (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Expressionsunterschiede wurden gegen cDNA-Standards gemessen.

3.6 Uterustupferproben

In jedem Zyklus wurde am Tag der Ovulation mit Hilfe eines Tupferprobenentnahmesystems (Accu Cul Shure[®], Accu-Med Corporation, N.Y.) eine Uterustupferprobe entnommen und untersucht, um eine mögliche Endometritis der Stute zu Beginn der Versuche ausschließen zu können. Die zytologische Beurteilung erfolgte an einem gefärbten Ausstrichpräparat (Dade[®] Diff-Quick-Schnellfärbelösung). Für die bakteriologische Untersuchung wurden die Proben jeweils auf Blut-, Gassner- und Edwardsagar kultiviert und bei 37° C für 24 h bebrütet. Bei fehlendem Koloniewachstum wurde weitere 24 Stunden inkubiert.

3.7 Statistische Auswertung

Zur statistische Analyse der Daten wurden die nichtparametrischen Tests nach Wilcoxon und Spearman sowie post-hoc-Tests (Fishers' PLSD-Test) angewendet. Außerdem wurden Mittelwerte und Standardfehler ermittelt. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary/NC, 1998) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

Während der Untersuchungen waren klinisch keine pathologischen Veränderungen am inneren Genitale festzustellen. Die bakteriologischen und zytologischen Befunde der im Östrus entnommenen Tupferproben waren unauffällig.

Zur Beurteilung der uterinen und ovariellen Perfusion wurde im Kontrollzyklus, Luteolyse-Versuch und in der Frühgravidität ausschließlich die mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) herangezogen, da sich in der vorliegenden sowie in vorangegangenen Studien (MAYER 1999, KOLBERG 2000) gezeigt hat, dass die Blutflussparameter TAMV, Vol (Blutflussvolumen) und PI (Pulsatility Index) bezüglich der zyklischen Schwankungen gut korrelieren ($r = 0,80$, $p < 0,0001$). Da im Kontrollzyklus zwischen den beiden uterinen Gefäßen keine signifikanten Unterschiede in der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) bestanden ($\bar{x} = 13,4$ cm/s und $\bar{x} = 13,2$ cm/s; $p = 0,87$) und die Werte korrelierten ($r = 0,44$; $p < 0,05$), wurden für die weiteren Auswertungen die Mittelwerte aus beiden Seiten herangezogen.

Das Blutflussmuster der nicht dominanten A. ovarica, zeigte entsprechend den Ergebnissen von KOLBERG (2000), im wesentlichen den gleichen Verlauf wie das der A. uterina. Daher wird im folgenden nur auf die Durchblutung des dominanten Gefäßes eingegangen.

4.1 Kontrollzyklus

4.1.1 Klinisch-gynäkologische Befunde

Bei 2 Stuten (A, B) folgte auf die erste Ovulation am Tag 0 noch eine zweite am Tag 1. Im Diöstrus war bei den Stuten A, D und E sowohl auf dem linken als auch auf dem rechten Ovar ein Gelbkörper sonographisch darstellbar. Die Stute B wies auf dem linken Ovar 2 Corpora lutea, Stute C ein Corpus luteum auf.

Die Zykluslänge betrug im Mittel $24,2 \pm 3,0$ Tage, wobei die Rosse durchschnittlich $4,8 \pm 0,2$ Tage andauerte.

4.1.2 Farbdopplersonographische Befunde

4.1.2.1 Blutfluss in den Aa. uterinae

Die TAMV der Aa. uterinae zeigt das bereits bei MAYER (1999) und KOLBERG (2000) beschriebene typische biphasische Verlaufsmuster (Abb. 4.1), mit Phasen niedriger Blutflussgeschwindigkeit an den Tagen 0 ($10,8 \pm 1,1$ cm/s), 1 ($9,3 \pm 0,3$ cm/s) und 11 ($10,4 \pm 1,3$ cm/s) sowie Phasen mit hoher Perfusion an den Tagen 5 ($15,9 \pm 2,2$ cm/s), 15 ($16,3 \pm 2,2$ cm/s) und -4 ($18,3 \pm 1,6$ cm/s). Am Tag -3 lag die TAMV mit $13,0 \pm 1,8$ cm/s signifikant ($p < 0,05$) unter der am Tag -4 gemessenen und fiel zur Ovulation hin tendenziell noch weiter ab.

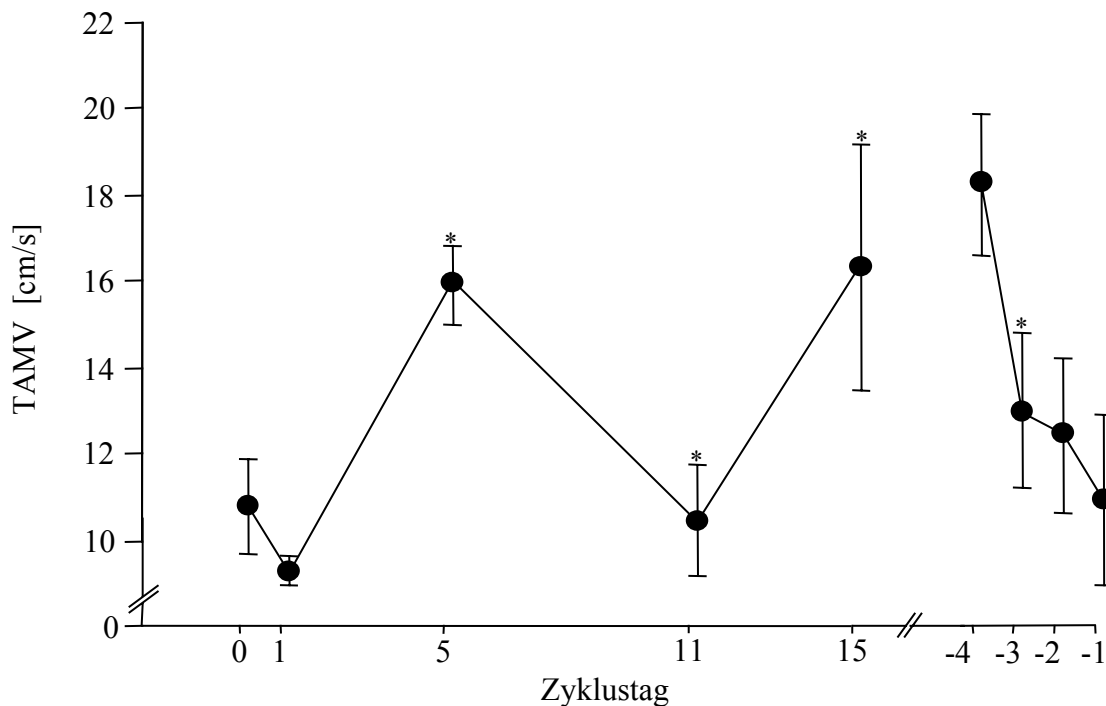


Abb. 4.1: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den Aa. uterinae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während des Kontrollzyklus; 0 = Tag der Ovulation.

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

4.1.2.2 Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae

Bei Stuten, die auf beiden Ovarien Funktionsgebilde aufwiesen, wurde hier, wie auch in den folgenden Untersuchungen, der Mittelwert aus beiden Gefäßen für die weiteren Auswertungen herangezogen. Die an den Tagen 0 und 1 ($5,3 \pm 0,2$ und $4,7 \pm 0,3$ cm/s) relativ niedrig liegenden TAMV-Werte der Aa. ovaricae stiegen ($p < 0,0001$) in der frühen Lutealphase am Tag 5 auf ein Maximum von $11,1 \pm 1,7$ cm/s an. Im späten Diöstrus, an den Tagen 11 und 15, war die mittlere Blutflussgeschwindigkeit wieder bis auf $7,6 \pm 1,7$ bzw. $6,2 \pm 1,0$ cm/s ($p < 0,05$) abgesunken. Während des Östrus war die Blutflussgeschwindigkeit der A. ovarica des follikeltragenden Ovars tendenziell noch weiter abgefallen und erreichte Minimalwerte von $3,9 \pm 0,5$ cm/s an den Tagen -3 und -2. Am Tag -1, d-h. kurz vor der Ovulation, stiegen die Werte wieder signifikant ($p < 0,05$) auf $6,4 \pm 0,6$ cm/s an (Abb. 4.2).

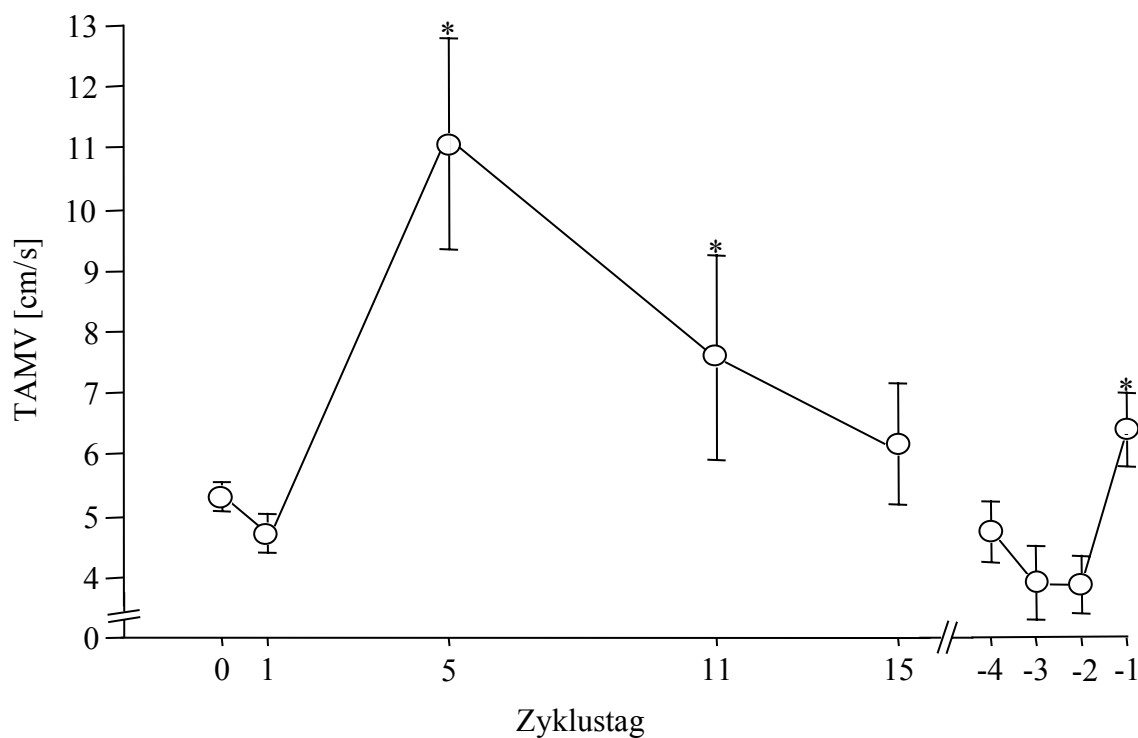


Abb. 4.2: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den dominanten Aa. ovaricae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während des Kontrollzyklus; 0 = Tag der Ovulation.

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

4.1.3 Zusammenhänge zwischen der uterinen und ovariellen Durchblutung und den Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentrationen

Bei der Auswertung der Gesamtöstrogen- und Progesteronspiegel im Plasma ergaben sich die bekannten zyklusabhängigen Verläufe mit niedrigen Östrogen- und hohen Progesteronwerten im Diöstrus sowie hohen Östrogen- und geringen Progesteronkonzentrationen im Östrus (Anhang: Tab. 9.1).

Zwischen der mittleren Blutflussgeschwindigkeit in der A. uterina und den Östrogenkonzentrationen war kein Zusammenhang ($r = 0,10$; $p = 0,58$) zu beobachten. Die Gestagenspiegel ebenfalls korrelierten nicht ($r = 0,00$; $p = 0,95$) mit der TAMV (Abb. 4.3).

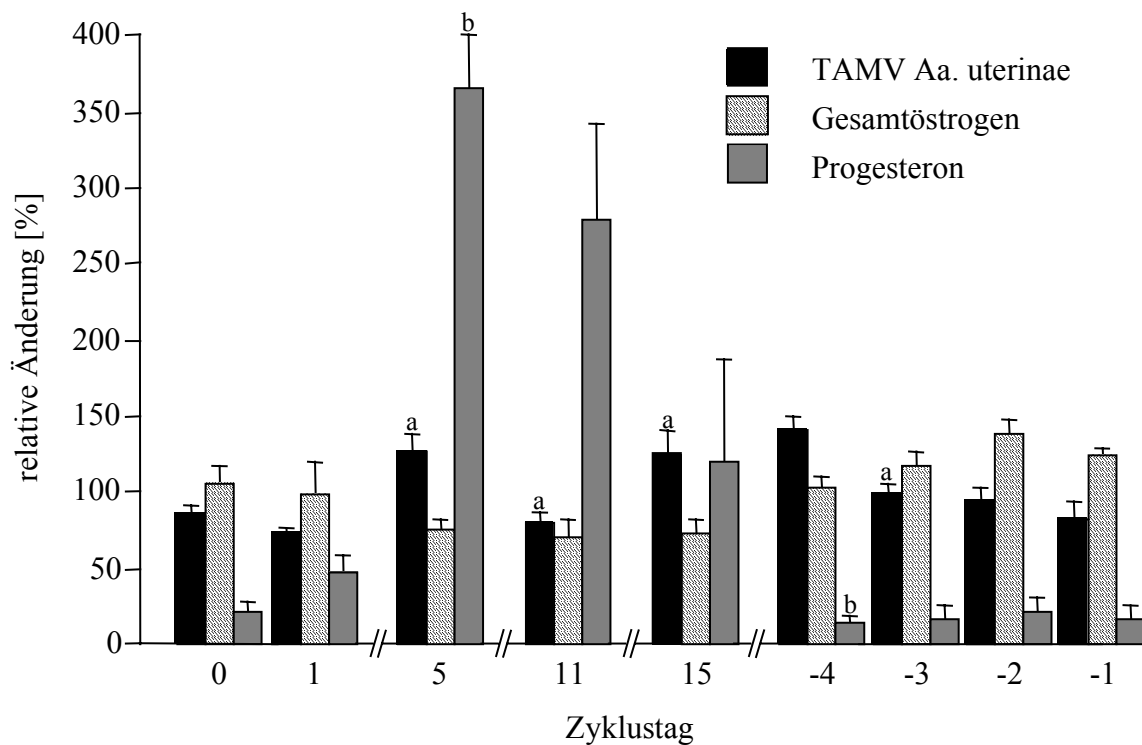


Abb. 4.3: Relative Änderungen der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den Aa. uterinae sowie der Gesamtöstrogen- und Progesteronspiegel im Plasma. Darstellung der Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während des Kontrollzyklus. Mw von 9 Untersuchungstagen (Ut) der einzelnen Stuten = 100%; 0 = Tag der Ovulation; a, b: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Ut ($p < 0,05$)

Die TAMV der dominanten Aa. ovaricae korrelierte signifikant mit den Progesterongehalten im Plasma ($r = 0,60$; $p < 0,05$). Zwischen den Östrogenspiegeln und der Blutflussgeschwindigkeit fand sich ebenfalls ein signifikanter ($r = -0,40$; $p < 0,05$) Zusammenhang (Abb. 4.4).

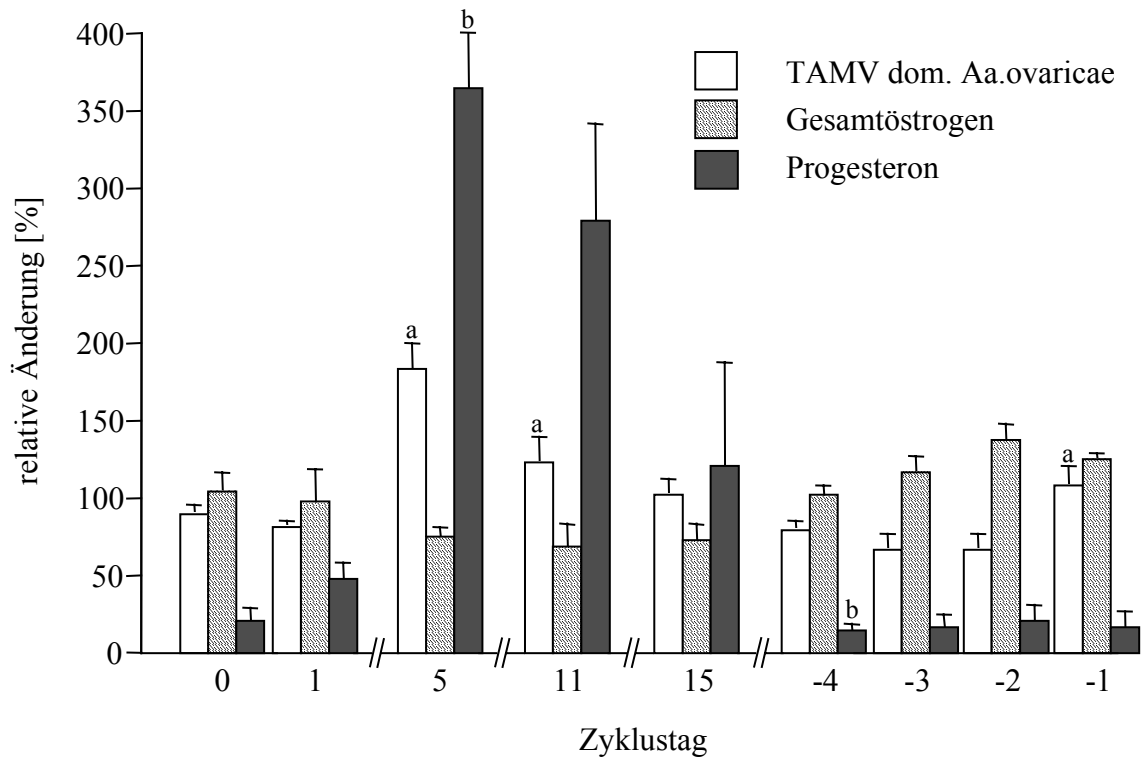


Abb. 4.4: Relative Änderungen der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den dominanten Aa. ovaricae sowie der Gesamtöstrogen- und Progesteronspiegel im Plasma. Darstellung der Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während des Kontrollzyklus. Mw von 9 Untersuchungstagen (Ut) der einzelnen Stuten = 100%; 0 = Tag der Ovulation; a, b: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Ut ($p < 0,05$)

4.1.4 Zusammenhänge zwischen der uterinen und ovariellen Durchblutung und den Nitratspiegeln

Die Konzentrationsänderungen der NO-Abbauprodukte ließen kein zyklusabhängiges Muster erkennen ($p = 0,87$). Außerdem ergaben sich sehr große individuelle Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Stuten (Abb. 4.5).

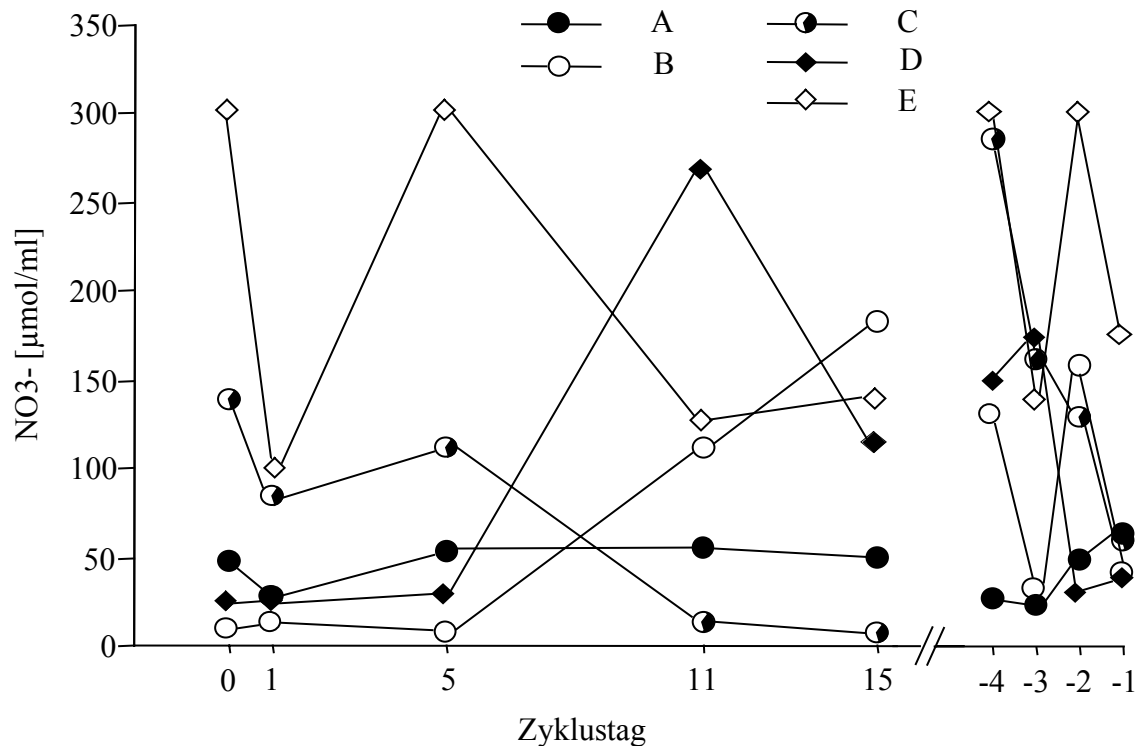


Abb. 4.5: Nitratkonzentrationen im Plasma bei 5 Stuten (A-E) während des Kontrollzyklus.

Zwischen den Nitratspiegeln im Plasma und der TAMV in den Aa. uterinae ließ sich, die zyklischen Schwankungen betreffend ($r = -0,15$; $p = 0,33$), kein Zusammenhang nachweisen.

Das zyklusabhängige Blutflussmuster der dominanten Aa. ovaricae korrelierte ebenfalls nicht mit den Änderungen der Nitratkonzentrationen im Plasma ($r = -0,12$; $p = 0,44$).

4.1.5 Endometriale mRNA-Expression

4.1.5.1 NO-Synthasen

Die mRNA-Expression der eNOS im Endometrium zeigte ein zyklusabhängiges ($p < 0,05$), biphasisches Muster. So lagen die Konzentrationen kurz nach der Ovulation an den Tagen 0 und 1 sowie im späten Diöstrus an den Tagen 11 und 15 im niedrigen bis mittleren Bereich. Am Tag 5 und im Östrus war dagegen eine sehr starke Expression der eNOS-mRNA zu beobachten (Abb. 4.6). Allerdings waren bei einzelnen Stuten (A, E) die zyklusabhängigen Schwankungen weitaus ausgeprägter als bei den übrigen Tieren (Anhang: Tab. 9.2).

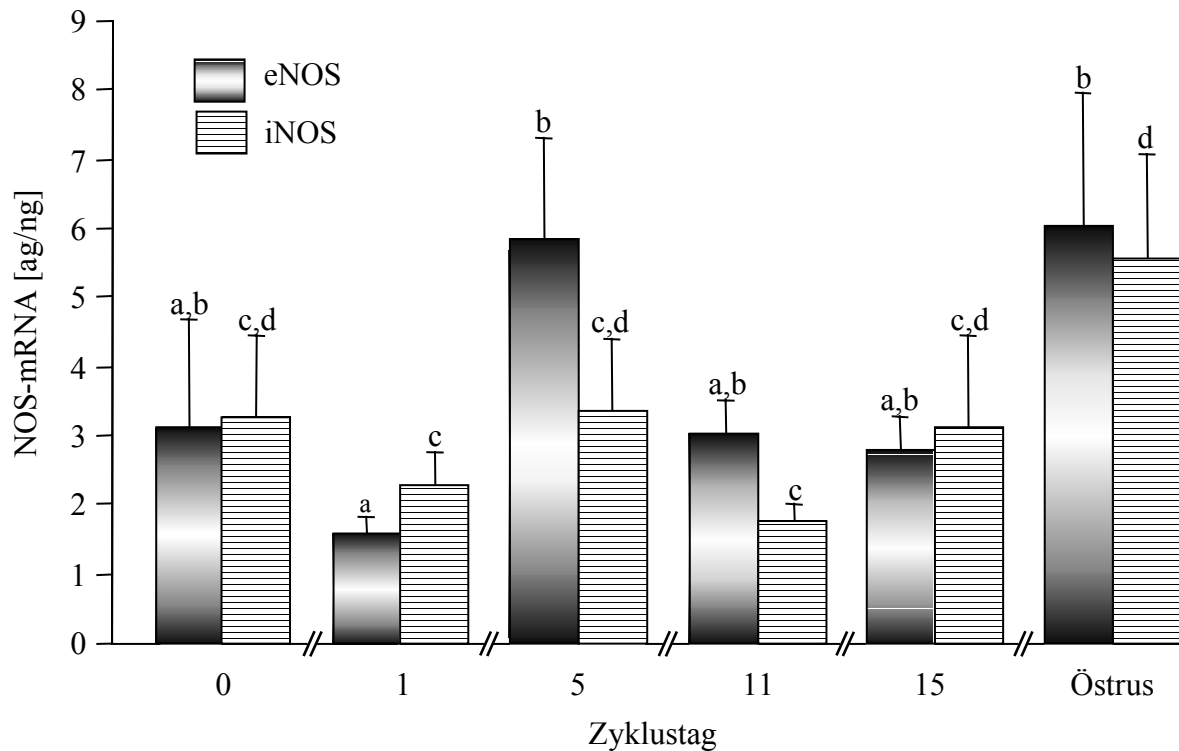


Abb. 4.6: Endometriale Expression der eNOS- und iNOS-mRNA. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler von 5 Stuten während des Kontrollzyklus. 0 = Tag der Ovulation, Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; a-d: Werte des gleichen Parameters mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$)

Für die Expression der iNOS-mRNA (Abb. 4.6) ließ sich kein zyklusabhängiges Muster ($p = 0,13$) nachweisen, jedoch war tendenziell ein ähnliches Expressionsmuster wie bei der eNOS-mRNA zu erkennen. So sah man auch bei der iNOS-mRNA Perioden geringer bis mittlerer Expression an den Tagen 0, 1, 11 und 15 und Phasen höherer Konzentrationen im frühen Diöstrus und im Östrus (Anhang: Tab. 9.3).

4.1.5.2 Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und der uterinen und ovariellen Durchblutung

Vergleicht man die relativen Änderungen der mRNA der beiden NO-Synthasen mit denen der mittleren Blutflussgeschwindigkeit in den Aa. uterinae, so ergibt sich für eNOS und TAMV (Abb. 4.7) eine signifikante positive Korrelation ($r = 0,54$; $p < 0,05$). Zwischen iNOS und TAMV war dagegen kein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,27$; $p = 0,15$) zu erkennen.

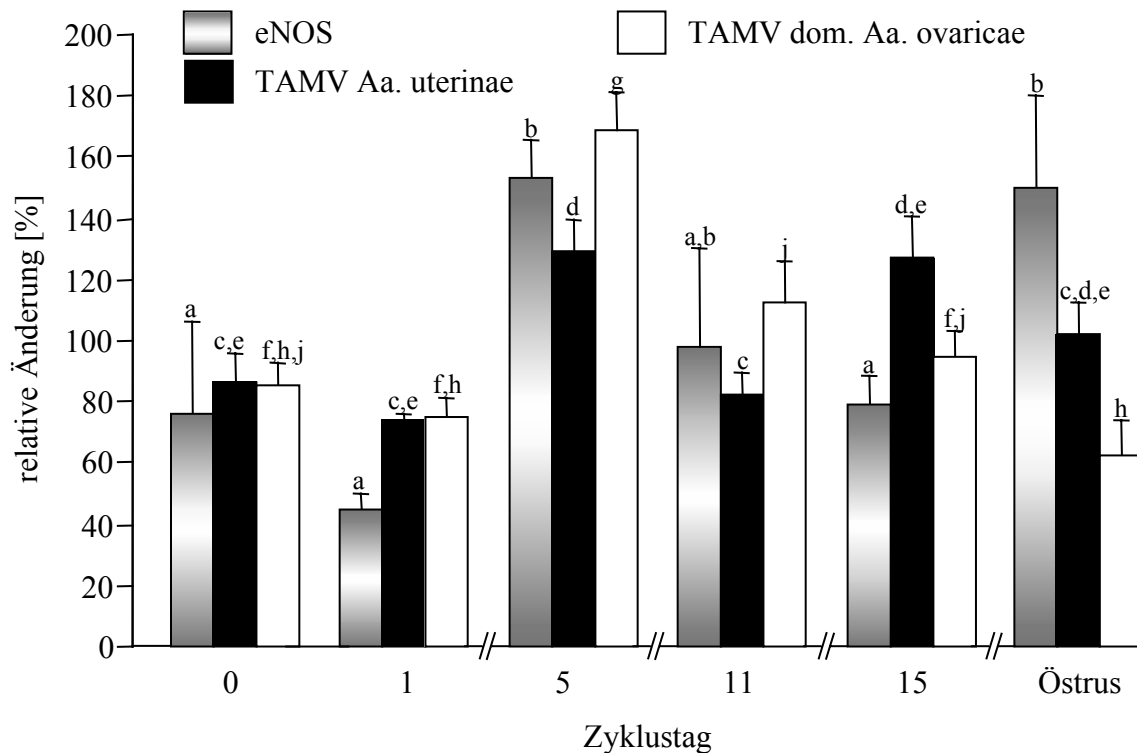


Abb. 4.7: Relative Änderungen der mRNA-Expression der eNOS sowie TAMV der Aa. uterinae und der dominanten Aa. ovaricae. Darstellung der Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) von 5 Stuten während des Kontrollzyklus. 0 = Tag der Ovulation, Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; Mw von 6 Untersuchungstagen der einzelnen Stuten = 100%; a-h: Werte des gleichen Parameters mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$)

Die relativen Änderungen der mittleren Blutflussgeschwindigkeit in den dominanten Aa. ovaricae (Abb. 4.7) zeigten ebenfalls signifikante Zusammenhänge mit der Expression der eNOS-mRNA ($r = 0,43$; $p < 0,05$), nicht aber mit der iNOS-mRNA ($r = -0,05$; $p = 0,79$).

4.1.5.3 Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen

Zwischen den relativen Änderungen der Konzentrationen von Östrogen, Progesteron und Nitrat und der uterinen mRNA-Expression der eNOS und iNOS waren keine signifikanten Korrelationen nachweisbar (Tab. 4.1).

Tab 4.1: Korrelationen zwischen der endometrialen mRNA-Expression von eNOS und iNOS und den Konzentrationen von Steroidhormonen bzw. Nitrat im Plasma:

	Progesteron		Östrogen		Nitrat	
	r	p	r	p	r	p
eNOS	0,32	0,08	0,01	0,94	0,20	0,29
iNOS	-0,23	0,21	0,21	0,25	0,25	0,18

Es fiel jedoch auf, dass die höchsten NOS-Konzentrationen an den Tagen gemessen wurden, an denen jeweils eines der beiden untersuchten Sexualsteroidhormone einen maximalen Plasmaspiegel erreichte. Das heißt, das Expressionsmaximum am Tag 5 wurde begleitet von maximalen Progesteronwerten, während das zweite Maximum im Östrus, also in der Zyklusphase mit der höchsten Östrogenausschüttung, erfasst wurde (Abb. 4.8).

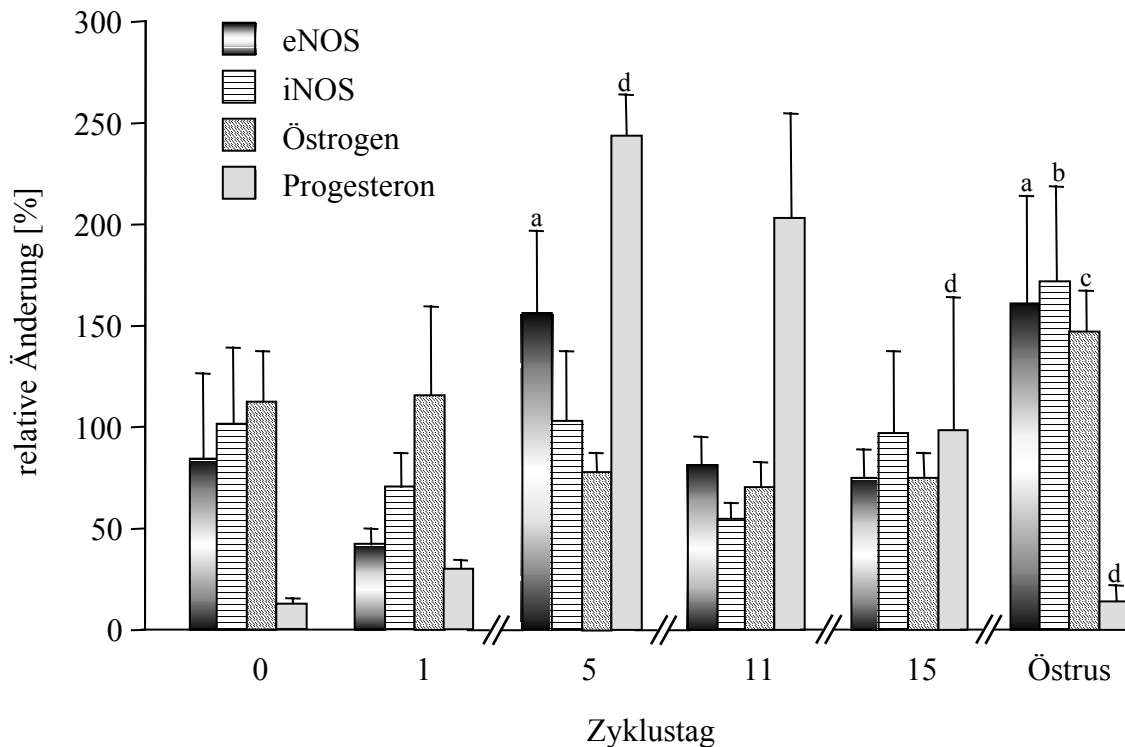


Abb. 4.8: Relative Änderungen der mRNA-Expression der eNOS- und iNOS, sowie der Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentrationen im Blutplasma. Darstellung der Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während des Kontrollzyklus. 0 = Tag der Ovulation, Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; Mw von 6 Untersuchungstagen der einzelnen Stuten = 100%; a-d: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$)

4.1.5.4 Östrogenrezeptoren

Sowohl die mRNA-Expression des Östrogenrezeptors α (ER α) als auch die des Östrogenrezeptors β (ER β) ließen ein zyklusphasenabhängiges Muster erkennen ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,05$). Im Kontrollzyklus bewegten sich die Werte von ER α im Femto(fg)- (0,65 bis $7,34 \cdot 10^{-12}$ g), die von ER β dagegen im Atogramm(ag)bereich (0,67 bis $9,88 \cdot 10^{-15}$ g). Die Konzentrationen der ER α -mRNA lagen damit etwa um das 1000-fache höher als die der ER β -mRNA (Anhang: Tab. 9.4 und 9.5). Zwischen den zyklischen Änderungen der beiden Rezeptoren bestand ein positiver Zusammenhang ($r = 0,69$; $p < 0,05$).

Die Konzentration der ER α -mRNA bewegte sich an den Tagen 0 bis 11 im niedrigen bis mittleren Bereich. Am Tag 15 und im Östrus wurde dagegen ein deutlicher Anstieg ($p < 0,0001$) in der Expression beobachtet (Abb. 4.9).

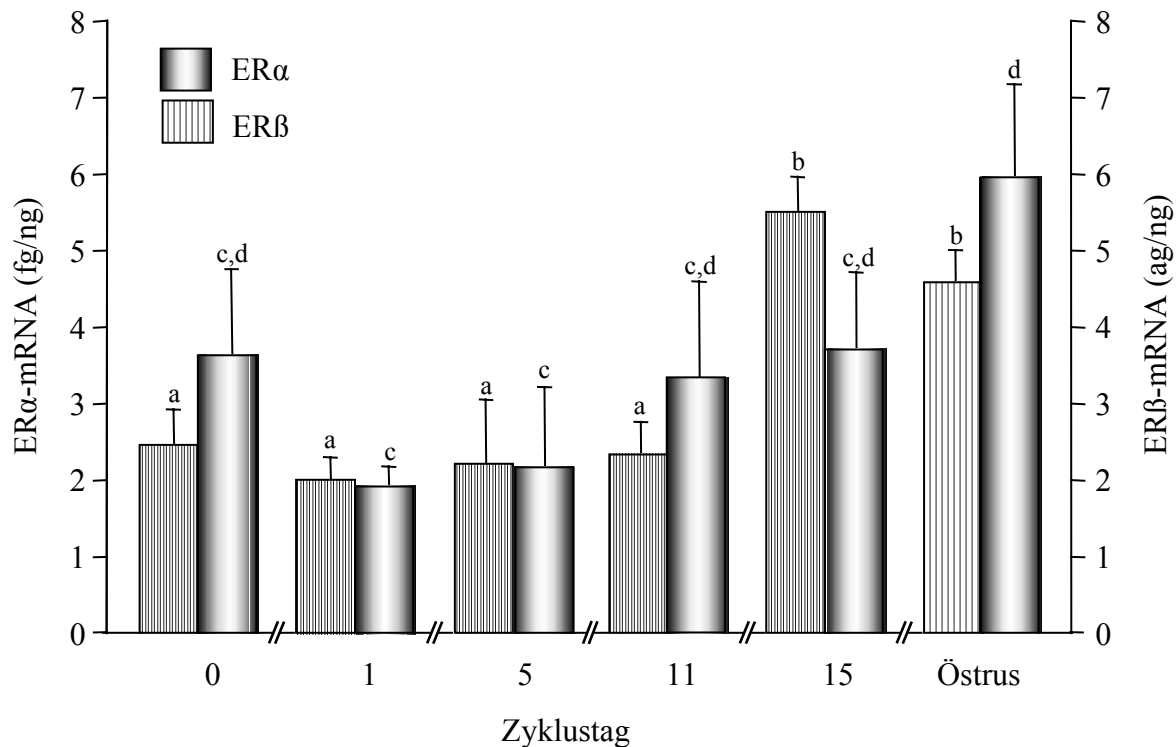


Abb. 4.9: Endometriale mRNA-Expression von ER α und ER β . Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler von 5 Stuten während des Kontrollzyklus. 0 = Tag der Ovulation, Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; a-d: Werte des gleichen Parameters mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$)

Die mRNA-Expression des ER β (Abb. 4.9) folgte weitgehend dem selben Muster wie die des ER α . Lediglich der starke Anstieg erfolgte hier nicht wie bei ER α bereits am Tag 15, sondern erst in der Rosse.

4.1.5.5 Zusammenhänge zwischen den Östrogenrezeptorkonzentrationen und der uterinen und ovariellen Durchblutung

Die relativen Änderungen der Konzentration an ER α -mRNA zeigten im Verlauf des Zyklus keinen signifikanten, aber einen tendenziellen Zusammenhang mit der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in der Aa. uterinae ($r = 0,33$; $p = 0,08$). Für ER β ließ sich kein Zusammenhang ($r = -0,04$; $p = 0,83$) nachweisen.

Beim Vergleich der relativen Änderungen der endometrialen Östrogenrezeptoren mit der Durchblutung der dominanten A.ovarica waren ebenfalls keine Zusammenhänge nachweisbar (ER α : $r = -0,26$; $p = 0,17$; ER β : $r = -0,26$; $p = 0,15$).

4.2 PGF 2α -induzierter Zyklus

Bei den Untersuchungen während des Kontrollzyklus hatten sich Hinweise auf Zusammenhänge zwischen dem NOS-System und den Sexualsteroidhormonen ergeben. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher überprüft, ob diese Zusammenhänge nur auf zeitlich kolinearen Änderungen der einzelnen Parameter beruhen oder ob tatsächliche Abhängigkeiten bestehen. Hierzu wurde die Luteolyse artifiziell mit PGF 2α ausgelöst, um etwaige Veränderungen in der NOS-mRNA- bzw. der Östrogenrezeptorkonzentration in Abhängigkeit von einem abrupten Progesteronabfall zu überprüfen.

4.2.1 Klinisch-gynäkologische Befunde

Vor dem Einleiten der Luteolyse mit PGF2 α am Tag 5 des Zyklus war bei 4 Stuten (A, B, C, D) ein Corpus luteum ausgebildet, bei einer Stute (E) waren zwei Gelbkörper darstellbar. Äußerliche Anzeichen des Östrus mit Blitzen und Dulden waren im Durchschnitt 5 (3-7) Tage nach der PGF2 α -Applikation zu beobachten, wobei die Rosse im Mittel 3 (2-4) Tage andauerte.

Die Anzahl der im Östrus angebildeten und ovulierenden Follikel war unterschiedlich: während bei 3 Stuten (B, D, E) 2 präovulatorische Follikel heranwuchsen, reiften bei einer Stute (C) sogar 3 Follikel heran. Eine Stute (A) bildete nur einen sprungreifen Follikel an. Die hCG-Applikation erfolgte im Durchschnitt 6 (5-8) Tage nach der PGF2 α -Injektion, worauf die Stuten innerhalb von 24 bis 48 Stunden ovulierten.

4.2.2 Farbdopplersonographische Befunde

4.2.2.1 Blutfluss in den Aa. uterinae

Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit in den Aa. uterinae blieb bis 6 Stunden nach dem Einleiten der Luteolyse auf hohem Niveau. In dieser Zeit waren lediglich geringgradige, aber nicht signifikante ($p > 0,05$) Schwankungen zwischen $15,4 \pm 1,2$ und $20,5 \pm 3,3$ cm/s zu beobachten. So kam es 30 Minuten nach der Luteolyseinduktion zu einem Anstieg auf $19,3 \pm 2,4$. Erst 12 Stunden nach der PGF2 α -Applikation war die TAMV auf $13,1 \pm 1,4$ cm/s abgefallen ($p < 0,05$). Der Blutfluss verringerte sich 24 Stunden nach PGF2 α zunächst noch weiter auf $9,8 \pm 0,9$ cm/s und stieg ab dem Zeitpunkt 36 Stunden wieder kontinuierlich an. Nach 72 Stunden lagen die Werte signifikant ($p < 0,05$) höher als 24 Stunden nach der PGF2 α -Injektion. Zur Ovulation hin nahm die Blutflussgeschwindigkeit dann wieder kontinuierlich, aber nicht signifikant ($p > 0,05$) ab, bis auf Werte um $11,9 \pm 1,0$ cm/s (Abb. 4.10).

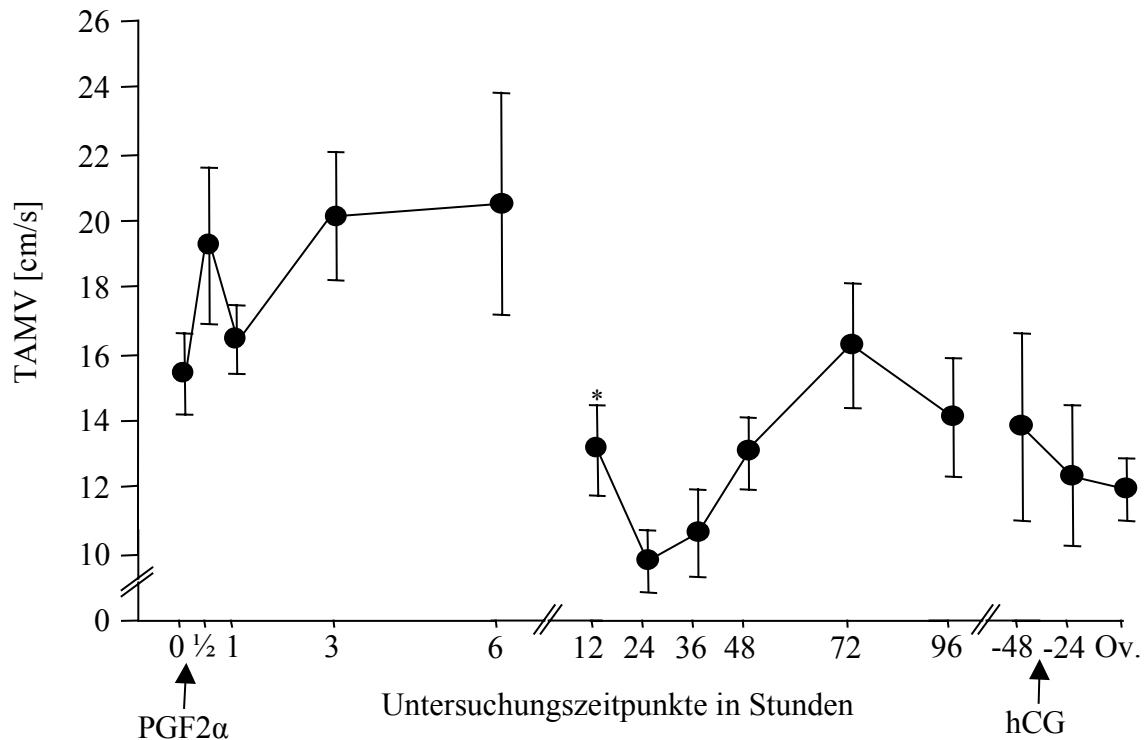


Abb. 4.10: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den Aa. uterinae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten nach Induktion der Luteolyse. Untersuchungszeitpunkte (Uz) = Stunden nach der PGF2 α -Injektion bzw. vor der Ovulation (Ov). *signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Uz ($p < 0,05$)

4.2.2.2 Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae

Die TAMV der Aa. ovaricae des gelbkörpertragenden Ovars zeigte 30 min nach dem Einleiten der Luteolyse einen Anstieg ($p < 0,05$) der mittleren Blutflussgeschwindigkeit von $11,5 \pm 1,3$ cm/s auf $15,0 \pm 3,3$ cm/s. Diese Zunahme war tendenziell auch schon in den Aa. uterinae beobachtet worden. Eine Stunde nach der PGF 2 α -Injektion war die TAMV in den Aa. ovaricae auf $10,5 \pm 1,4$ cm/s abgefallen ($p < 0,05$), blieb aber bis zur Stunde 12 auf relativ hohem Niveau ($p > 0,05$). Während der Blutfluss in den Aa. uterinae bereits 12 Stunden post applikationem abgefallen waren, nahm die ovarielle Durchblutung erst zur Stunde 24 bis auf TAMV-Werte von $6,9 \pm 0,7$ cm/s ($p < 0,05$) ab. Bis 48 Stunden vor der Ovulation blieb die TAMV auf diesem niedrigen Niveau. Zur Ovulation hin stieg die Blutflussgeschwindigkeit wieder tendenziell, aber nicht signifikant ($p > 0,05$) auf $6,4 \pm 1,0$ cm/s an (Abb. 4.11).

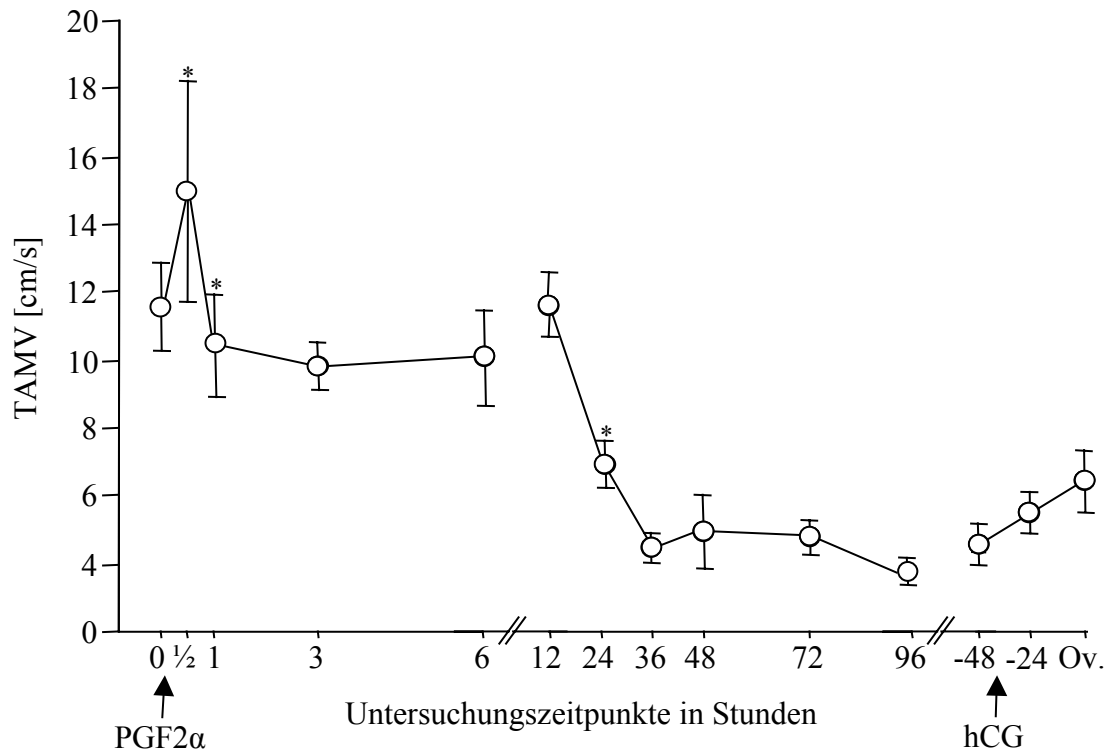


Abb. 4.11: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den dom. Aa. ovaricae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) von 5 Stuten nach Induktion der Luteolyse. Untersuchungszeitpunkte (Uz) = Stunden nach der PGF2 α -Injektion bzw. vor der Ovulation (Ov). * signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Uz ($p < 0,05$)

4.2.3 Zusammenhänge zwischen der uterinen und ovariellen Durchblutung und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen

Zu Beginn der Untersuchungen lag der Gesamtöstrogenspiegel bei $1,7 \pm 0,2$ pmol/ml und blieb bis zum Einsetzen des Östrus konstant auf diesem niedrigen Niveau. In der Rosse stiegen die Werte dann bis auf ein Maximum von $3,4 \pm 0,6$ pmol/ml am Tag -1 ($p < 0,05$) an und fielen am Tag der Ovulation nur geringfügig ($p > 0,05$) wieder ab (Abb. 4.12).

Die Konzentration der Progesteronäquivalente blieb zunächst bis 1 Stunde nach Induktion der Luteolyse auf ähnlichem Niveau und sank dann innerhalb der folgenden 2 Stunden von $56,2 \pm 7,2$ pmol/ml auf $37,7 \pm 3,5$ pmol/ml ab ($p < 0,05$). Nach 6 Stunden waren die Werte nur noch geringgradig auf $29,7 \pm 6,6$ pmol/ml abgefallen. Zwölf Stunden nach der PGF2 α -Applikation hatten die Progesteronspiegel gegenüber den nach 6 Stunden gemessenen Konzentrationen nochmals etwa um die Hälfte auf $14,4 \pm 1,8$ pmol/ml abgenommen

($p < 0,05$). Basale Werte um $2,6 \pm 0,3$ pmol/ml wurden schließlich 48 Stunden nach dem Einleiten der Luteolyse erreicht (Abb. 4.12).

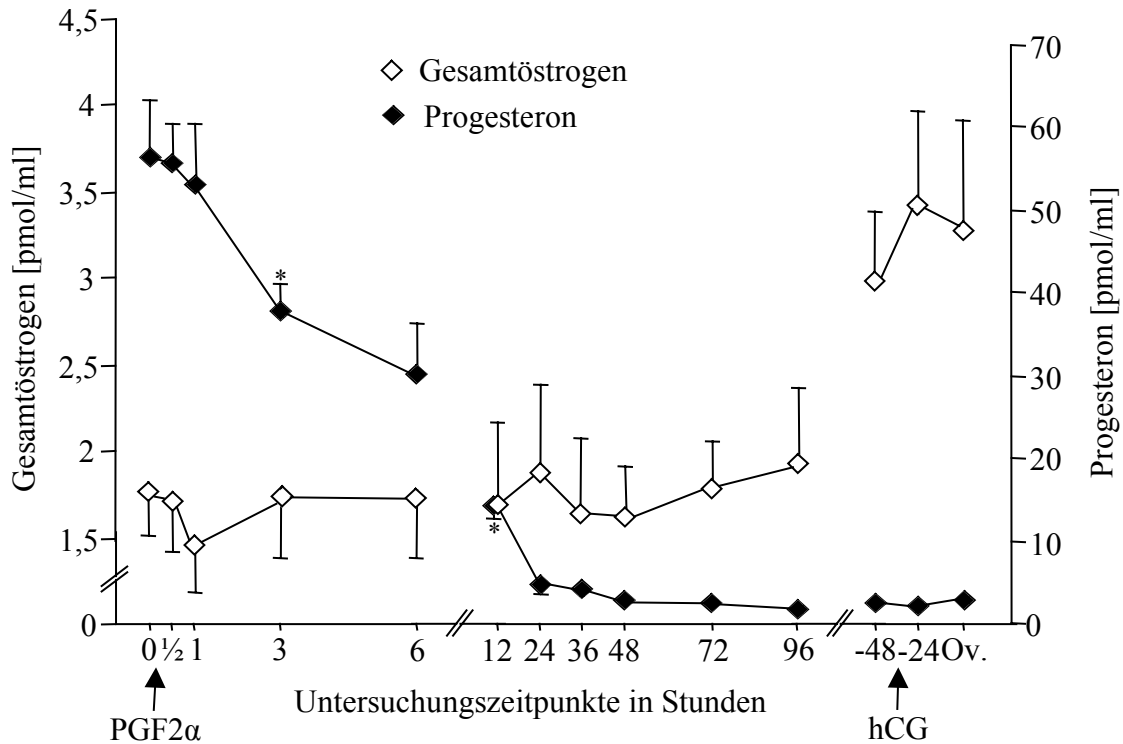


Abb. 4.12: Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten nach Induktion der Luteolyse. Untersuchungszeitpunkte (Uz) = Stunden nach der PGF2 α -Injektion bzw. vor der Ovulation (Ov).
* signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Uz ($p < 0,05$)

Die Blutflussgeschwindigkeit sowohl der Aa. uterinae ($r = 0,49$; $p < 0,05$) als auch die der dominanten Aa. ovaricae ($r = 0,78$; $p < 0,0001$) korrelierte signifikant mit der Konzentration der Progesteronäquivalente im Plasma, wobei auffiel, dass die Progesteronspiegel bereits vor dem Absinken des Blutflusses (Abb. 4.10 bis 4.12) abfielen. Ein Zusammenhang mit dem Östrogen- oder Nitratspiegel ließ sich dagegen weder für den uterinen noch für den ovariellen Blutfluss nachweisen ($p > 0,05$).

4.2.4 Endometriale mRNA-Expression

4.2.4.1 NO-Synthasen

Nach Induktion der Luteolyse kam es bei allen Stuten zu charakteristischen Änderungen in der mRNA-Expression der eNOS ($p < 0,0001$) sowie der iNOS ($p < 0,05$). Diese waren für beide Enzyme ähnlich ($p < 0,05$).

Entsprechend den Beobachtungen im Kontrollzyklus wurde die stärkste Expression der eNOS-mRNA mit $5,5 \pm 0,7$ ag/ng zum Zeitpunkt 0, also am Zyklustag 5, gemessen. Zwölf Stunden nach Induktion der Luteolyse waren die Werte auf $2,5 \pm 0,3$ ag/ng abgefallen ($p < 0,0001$). Bei der folgenden Untersuchung zur Stunde 36 waren die Konzentrationen der eNOS-mRNA wieder auf $5,3 \pm 0,8$ ag/ng angestiegen ($p < 0,0001$). Im Östrus, unmittelbar vor der Ovulationsinduktion mit hCG, lagen die Werte mit $1,9 \pm 0,3$ ag/ng wieder niedriger ($p < 0,0001$) als bei der vorangegangenen Untersuchung und blieben bis zum Zeitpunkt der Ovulation auf diesem niedrigen Niveau ab (Abb. 4.13).

Die Expression der iNOS-mRNA zeigte bis 48 Stunden vor der Ovulation das gleiche Muster wie die eNOS-mRNA, wenngleich ihre Konzentrationen wesentlich geringer waren. So lagen die Werte zum Zeitpunkt 12 mit $0,08 \pm 0$ ag/ng niedriger ($p < 0,05$) als zum Zeitpunkt 0, an dem sie $0,16 \pm 0$ ag/ng betragen. Zur Stunde 36 wurden dann mit $0,13 \pm 0$ ag/ng deutlich ($p < 0,05$) höhere Konzentrationen gemessen. Im Östrus war die iNOS im Vergleich zur Stunde 36 schließlich wieder auf $0,08 \pm 0$ ag/ng abgefallen ($p < 0,05$). Im Gegensatz zur eNOS-mRNA folgte zum Zeitpunkt der Ovulation ein deutlicher, wenn auch nicht signifi-kanter Anstieg auf $0,12 \pm 0$ ag/ng (Abb. 4.13).

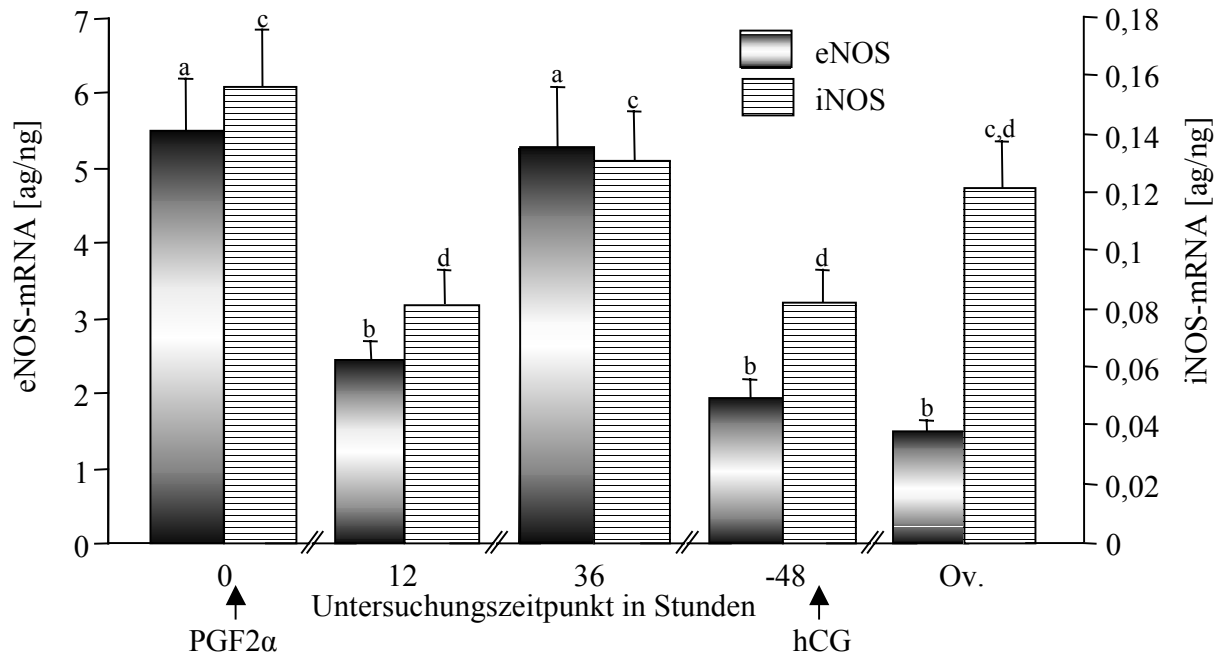


Abb. 4.13: eNOS- und iNOS-mRNA. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten nach Induktion der Luteolyse. Untersuchungszeitpunkte = Stunden nach der PGF2 α -Injektion bzw. vor der Ovulation (Ov); a - d: Werte des gleichen Parameters mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$)

4.2.4.2 Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und der uterinen und ovariellen Durchblutung

Weder für die Durchblutung der A. uterina (eNOS: $r = 0,14$, $p = 0,49$; iNOS: $r = 0,14$, $p = 0,49$) noch für die der dominanten A. ovarica (eNOS: $r = 0,23$, $p = 0,26$; iNOS: $r = 0,10$, $p = 0,64$) konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der Expression der mRNA der beiden NO-Synthasen nachgewiesen werden.

Es fällt allerdings auf, dass 12 Stunden nach Induktion der Luteolyse sowie 48 Stunden vor der Ovulation und am Tag der Ovulation, als die eNOS-mRNA nur schwach exprimiert war, auch die uterine Durchblutung reduziert war. Dagegen folgte auf die hohe mRNA-Expression 36 Stunden nach Induktion der Luteolyse auch ein Anstieg der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (Abb. 4.14).

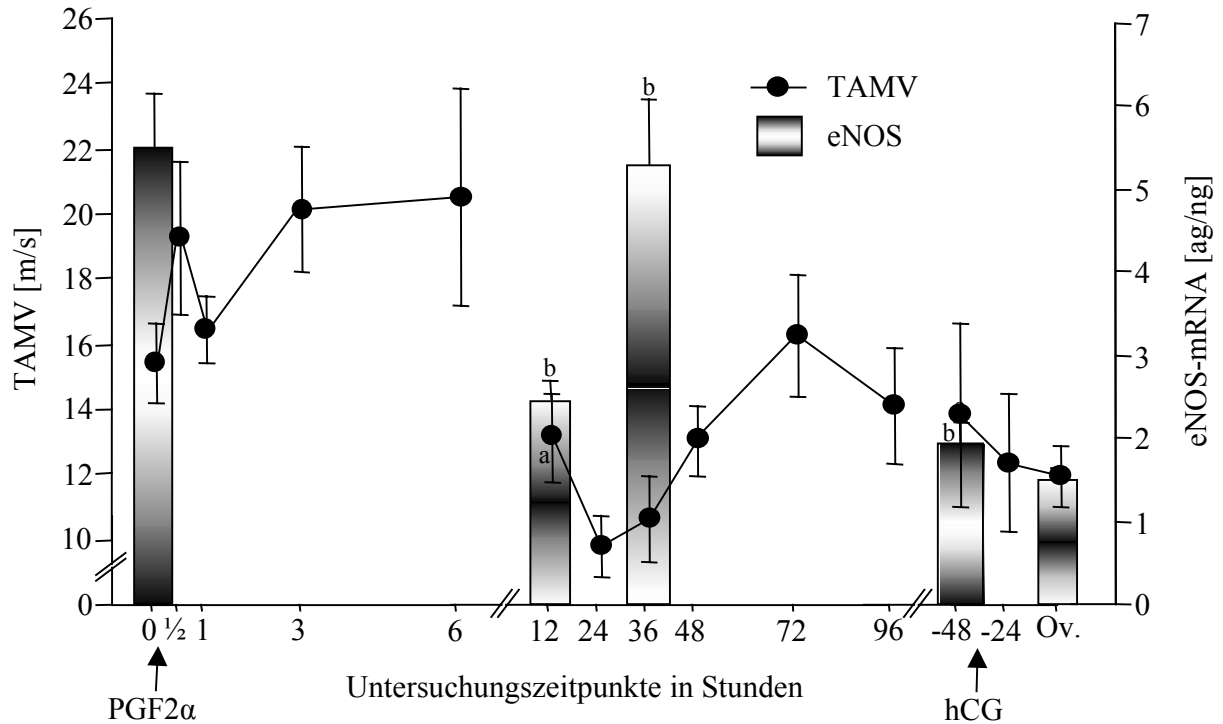


Abb. 4.14: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den Aa. uterinae und endometriale eNOS-mRNA. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten nach Induktion der Luteolyse. Untersuchungszeitpunkte (Uz) = Stunden nach der PGF2 α -Injektion bzw. vor der Ovulation (Ov).

a, b: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Uz ($p < 0,05$)

4.2.4.3 Zusammenhänge zwischen den NO-Synthasen und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen

Die mRNA-Expression der eNOS korrelierte ($p < 0,05$) mit der Konzentration der Progesteronäquivalente im Plasma. Weitere signifikante Zusammenhänge der NO-Synthasen-mRNA mit den Steroidhormon- oder den Nitratspiegeln waren nicht nachweisbar (Tab. 4.2).

Tab 4.2: Korrelationen zwischen der endometrialen mRNA-Expression von eNOS und iNOS und den Konzentrationen von Steroidhormonen bzw. Nitrat im Plasma:

	Progesteron		Östrogen		Nitrat	
	r	p	r	p	r	p
eNOS	0,51	< 0,05	-0,34	0,09	-0,06	0,78
iNOS	0,26	0,20	-0,21	0,42	0,06	0,78

4.2.4.4 Östrogenrezeptoren

Auch die Höhe der mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren war stark abhängig vom jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ($p < 0,0001$), wobei sich ihre zyklusabhängigen Veränderungen sehr ähnlich verhielten ($r = 0,64$; $p < 0,05$).

Zwölf Stunden nach Induktion der Luteolyse hatte die Expression von ER α im Vergleich zum Zeitpunkt 0 von $6,9 \pm 0,3$ fg/ng auf $5,5 \pm 0,3$ fg/ng abgenommen ($p < 0,05$) und lag auch 36 Stunden nach der PGF 2α -Injektion noch in diesem Bereich. Zum Zeitpunkt der nächsten Biopsieprobenentnahme, 48 Stunden vor der Ovulation, waren dann mit $9,1 \pm 0,4$ fg/ng deutlich ($p < 0,0001$) höhere Werte zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt der Ovulation zeigte sich ein weiterer tendenzieller, aber nicht signifikanter, Anstieg bis auf $9,9 \pm 0,5$ fg/ng (Abb. 4.15).

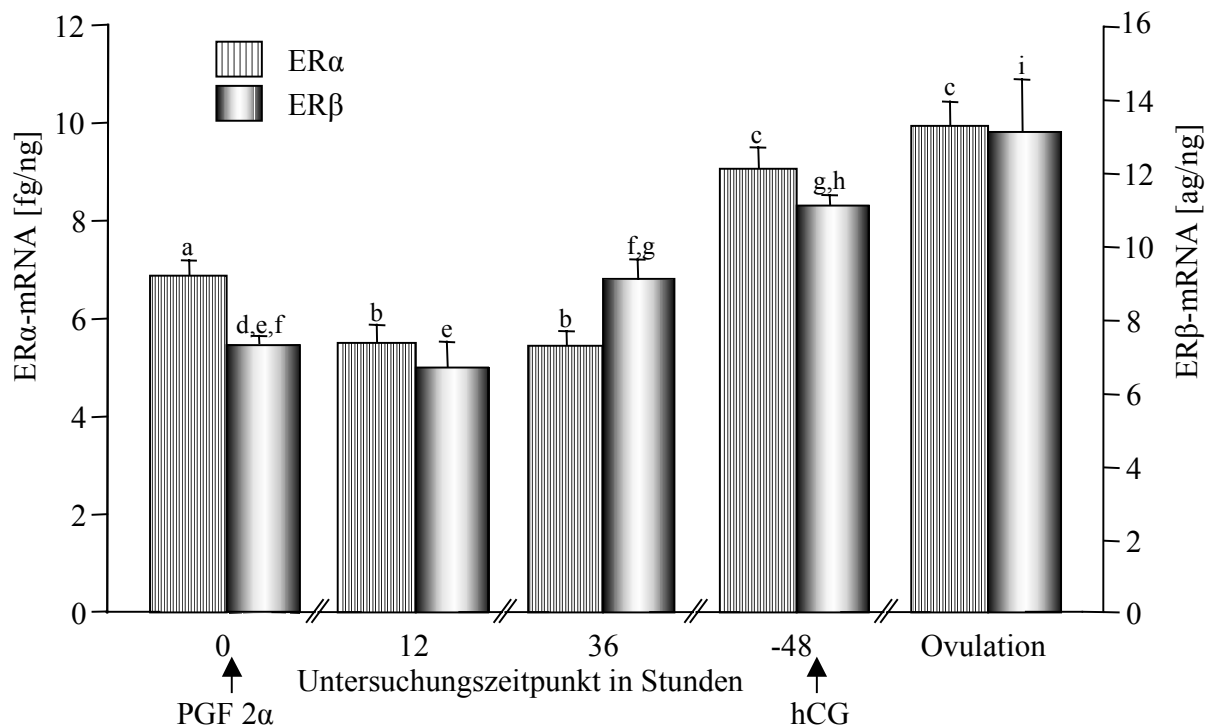


Abb. 4.15: ER α - und ER β -mRNA. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten nach Induktion der Luteolyse. Untersuchungszeitpunkte = Stunden nach der PGF 2α -Injektion bzw. vor der Ovulation.

a-i: Werte des gleichen Parameters mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$)

Die Konzentration von ER β (Abb. 4.15) blieb nach der PGF 2 α -Applikation zunächst konstant und stieg 24 Stunden später ($p < 0,05$) auf $9,1 \pm 0,6$ ag/ng an. Vor der hCG-Injektion, 48 Stunden vor der Ovulation, wurde eine Expression von $11,1 \pm 0,4$ ag/ng gemessen, die zwar deutlich, aber nicht signifikant höher lag als zum Zeitpunkt 36. Die höchsten Werte wurden mit $13,1 \pm 1,4$ ag/ng am Tag der Ovulation erfasst.

4.2.4.5 Zusammenhänge zwischen den Östrogenrezeptorkonzentrationen und der uterinen und ovariellen Durchblutung

Die Änderungen in der mRNA-Expression des ER α (Abb. 4.15) hingen weder mit dem uterinen ($r = 0,12$; $p = 0,56$) noch mit dem ovariellen ($r = -0,13$; $p = 0,54$) Blutfluss zusammen. ER β korrelierte, entgegen den Ergebnissen im Kontrollzyklus, negativ ($r = -0,60$; $p < 0,05$) mit der mittleren Blutflussgeschwindigkeit in der dominanten A. ovarica (Abb. 4.11). Mit der TAMV in der A. uterina (Abb. 4.10) war lediglich ein tendenzieller, aber nicht signifikanter Zusammenhang ($r = -0,37$; $p = 0,07$) nachweisbar.

4.2.4.6 Zusammenhänge zwischen den Östrogenrezeptorkonzentrationen und den Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen

Zwischen der Östrogenkonzentration im Blutplasma und ER α bestand eine signifikante positive Korrelation ($r = 0,63$; $p < 0,05$). Außerdem war ein tendenzieller negativen Zusammenhang mit dem Progesteronspiegel ($r = -0,37$; $p = 0,07$) zu beobachten.

Für das Expressionsmuster von ER β konnte sowohl mit den Östrogen- ($r = 0,66$; $p < 0,05$) als auch mit den Progesteronwerten ($r = -0,78$; $p < 0,0001$) ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Abb. 4.16).

Weder ER α ($r = 0,19$; $p = 0,36$) noch ER β ($r = 0,08$; $p = 0,68$) korrelierten mit der Nitratkonzentration im Plasma.

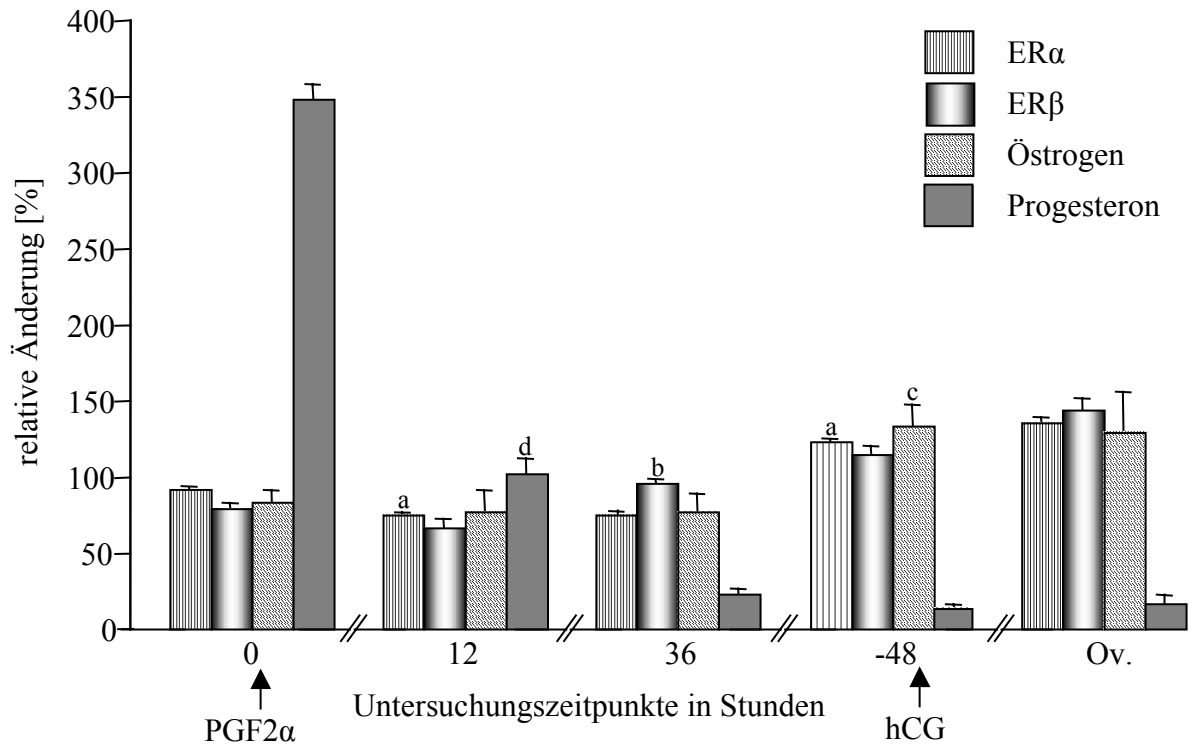


Abb. 4.16: Relative Änderungen der mRNA-Expression von ER α und ER β sowie der Steroidhormonkonzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten nach Induktion der Luteolyse. Untersuchungszeitpunkte = Stunden nach der PGF2 α -Injektion bzw. vor der Ovulation. Mittelwerte von 6 Untersuchungstagen der einzelnen Stuten = 100%

a - d: sign. Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungszeitpunkt ($p < 0,05$)

4.3 ISDN-Zyklen

In diesem Versuch wurde der Einfluss des exogen zugeführten NO-Donors Isosorbiddinitrat (ISDN) auf die Durchblutung, die Steroidhormonspiegel sowie das NOS-System und die Östrogenrezeptoren untersucht.

Im ISDN-Zyklus I kam es nach der Biopsieprobenentnahme am Zyklustag 5 zu einer vorzeitigen Luteolyse, d.h. bei der folgenden Untersuchung am Tag 11 waren die Progesteronspiegel deutlich abgefallen und die Stuten zeigten Anzeichen der Rosse. Aus diesem Grund wurde noch ein zweiter ISDN-beeinflusster Zyklus untersucht, bei dem die Biopsieprobenentnahme an den Tagen 11, 15 und am dritten Tag der Rosse vorgenommen wurde. Für die folgenden Auswertungen wurden die Ergebnisse aus beiden ISDN-Zyklen zusammengefasst, um sie mit dem Kontrollzyklus vergleichen zu können. Die Daten der Zyklustage 0, 1

und 5 stammen demnach aus dem ersten ISDN-Zyklus (ISDN I), die der Zyklustage 11, 15 und der Rosse wurden in einem zweiten Versuch (ISDN II) gewonnen.

4.3.1 Klinisch-Gynäkologische Befunde

Die durchschnittliche Länge des Zyklus I belief sich auf $13,8 \pm 1,1$ Tage, wobei der Östrus $3,0 \pm 0,5$ Tage davon einnahm. Vier Stuten hatten am Tag 5 einen oder mehrere diöstrische Follikel angebildet. Bei 3 Stuten (A, B, E) ovulierten am Ende der Rosse 2, bei einer Stute (D) sogar 3 Follikel.

Der Zyklus II dauerte im Mittel $22,8 \pm 1,3$ Tage mit einer durchschnittlichen Rosselänge von $4,0 \pm 0,6$ Tagen. Bei bei einer Stute (C) kam es am Ende der Rosse zu einer Doppelovulation.

4.3.2 Einfluss von ISDN auf die uterine und ovarielle Durchblutung

Da es durch die vasodilatatorischen Wirkung von ISDN möglicherweise auch zu einer Veränderung des Blutflussvolumens kommt, wurde in diesem Versuch nicht nur die mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV), sondern auch das Blutflussvolumen (Vol) berücksichtigt.

4.3.2.1 Blutfluss in den Aa. uterinae

Beim Vergleich der mittleren Blutflussgeschwindigkeit in den Aa. uterinae des Kontrollzyklus und der ISDN-Zyklen, waren während des gesamten Untersuchungszeitraums keine ($p = 0,92$) Unterschiede festzustellen (Abb 4.17).

Auch beim Blutflussvolumen waren in den ISDN-Zyklen keine Veränderungen ($p = 0,65$) gegenüber dem Kontrollzyklus zu beobachten (Abb. 4.18).

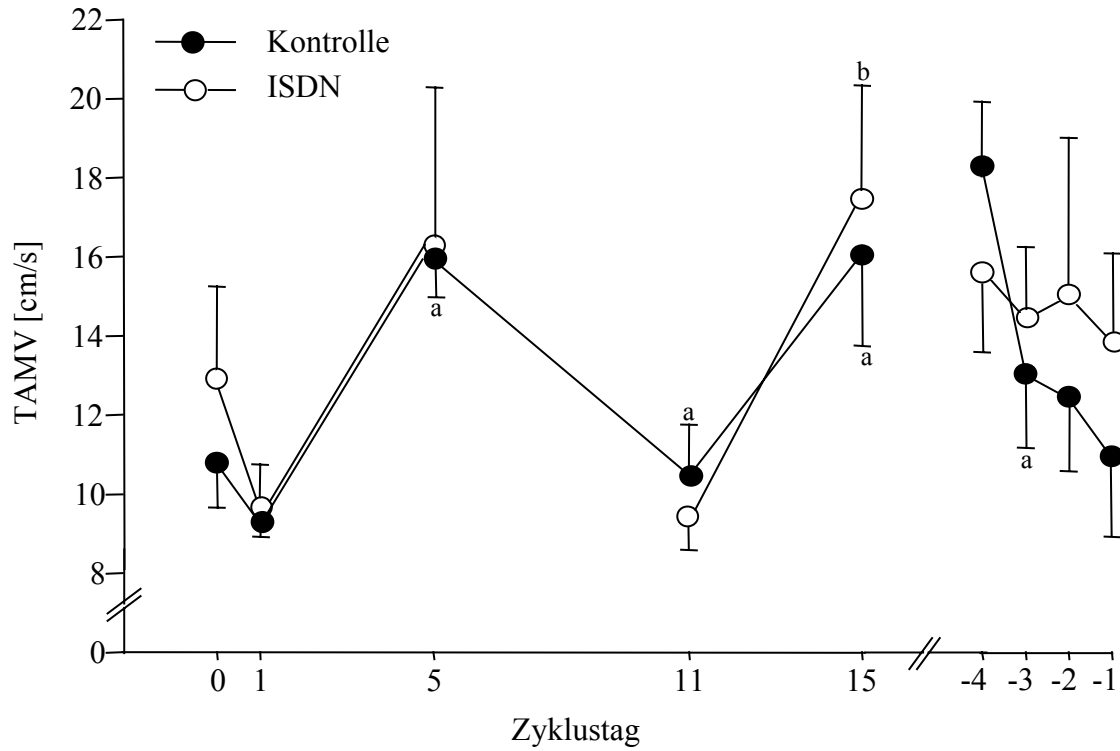


Abb. 4.17: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den Aa. uterinae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen. a, b,: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$)

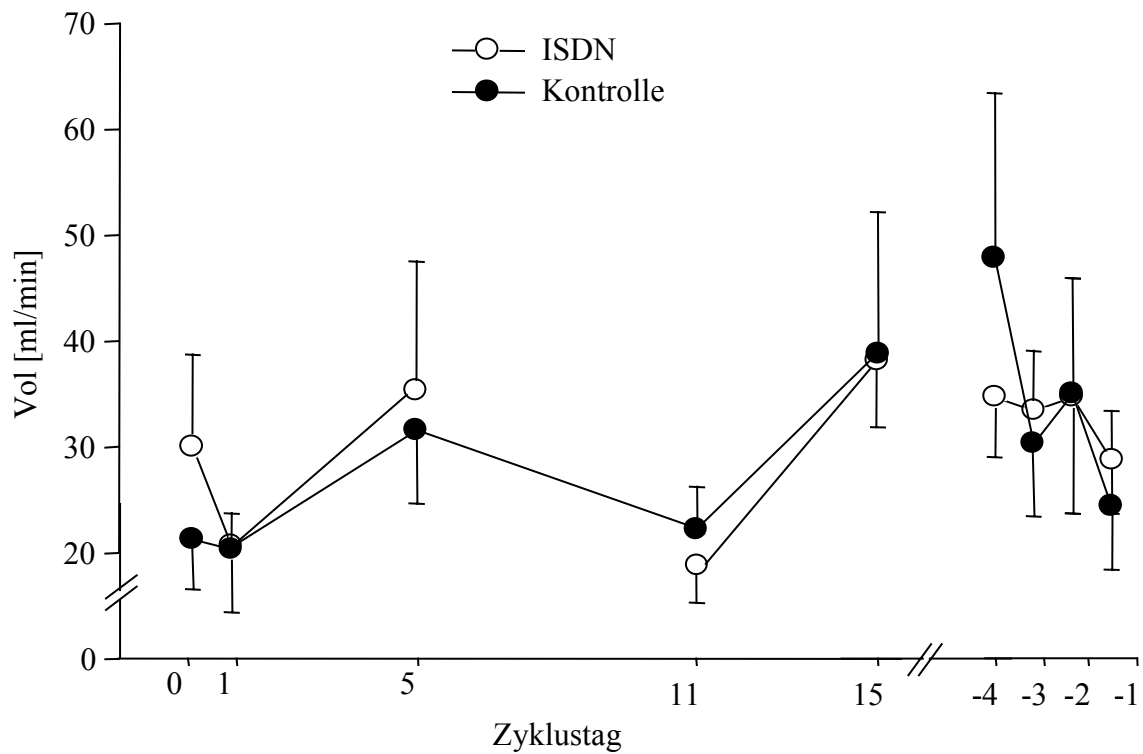


Abb. 4.18: Blutflussvolumen (Vol) in den Aa. uterinae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen.

4.3.2.2 Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae

Die ovarielle Blutflussgeschwindigkeit der ISDN-Zyklen zeigte ebenfalls keine Unterschiede ($p = 0,92$) gegenüber dem Kontrollzyklus (Abb. 4.19).

Auch bei Betrachtung des Blutflussvolumen der Aa. ovaricae waren keine signifikanten ($p = 0,43$) Veränderungen gegenüber dem Kontrollzyklus festzustellen (Abb. 4.20).

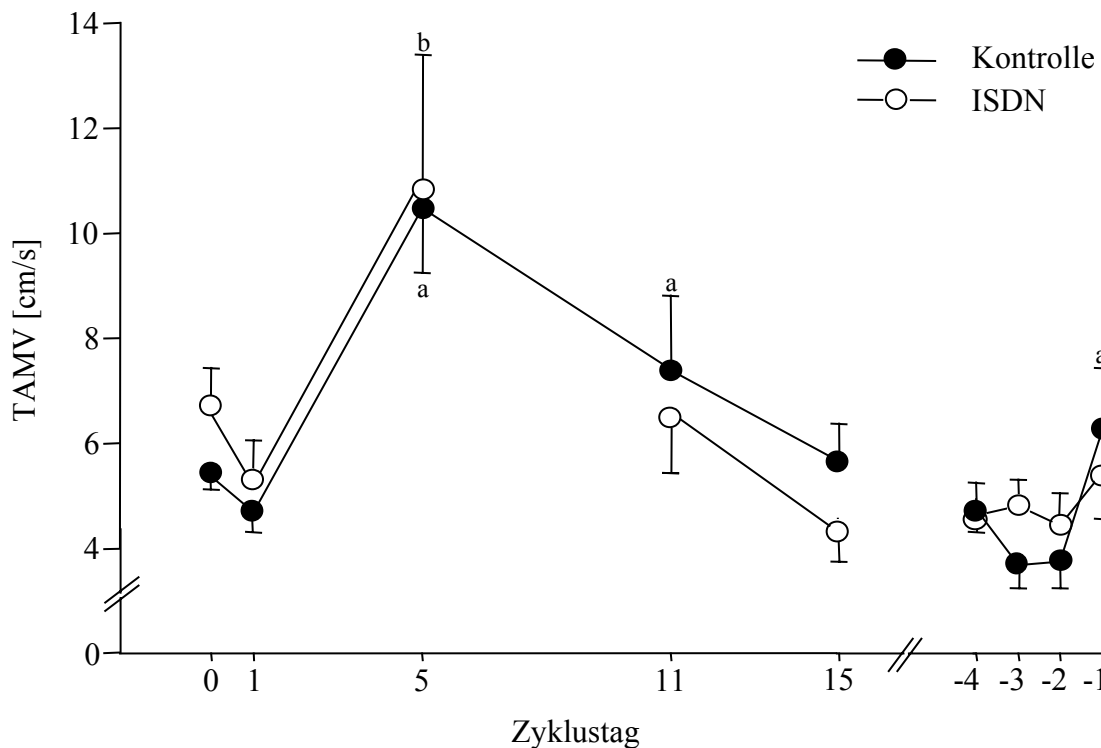


Abb. 4.19: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den dominanten Aa. ovaricae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen.

a, b,: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$)

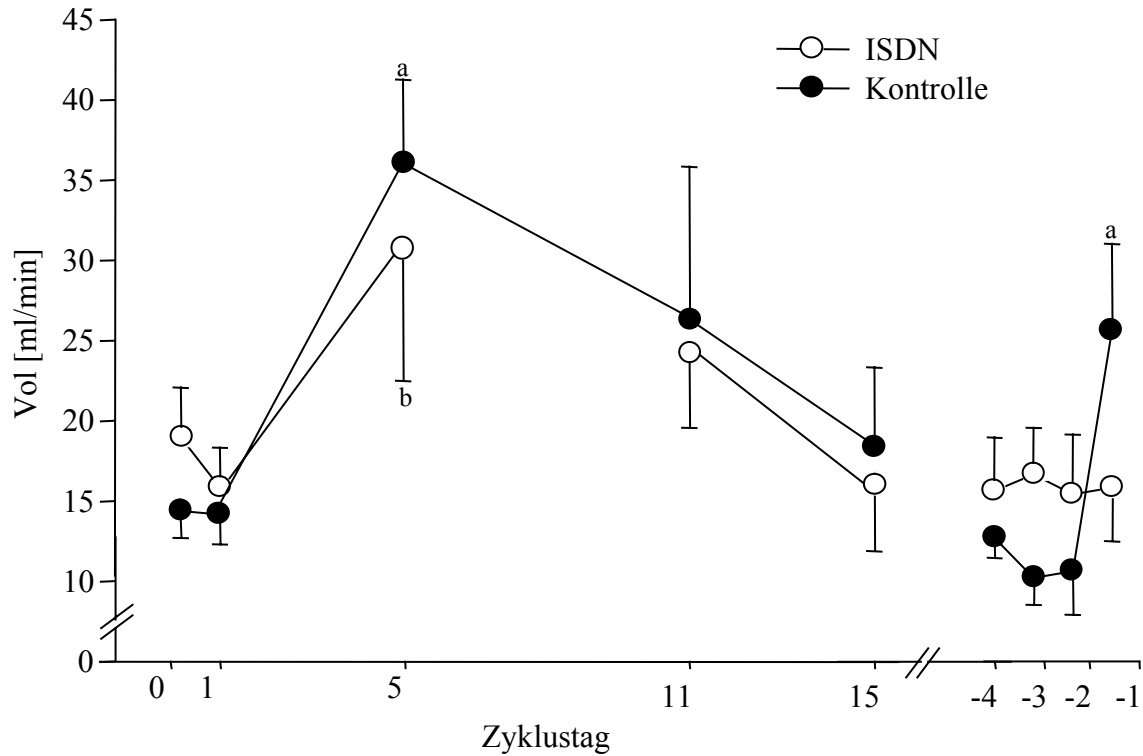


Abb. 4.20: Blutflussvolumen (Vol) in den dominanten Aa. ovaricae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen. a, b,: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$)

4.3.2.3 Einfluss von ISDN auf die Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen

Obwohl keine signifikanten Unterschiede an den einzelnen Untersuchungstagen zwischen ISDN- und Kontrollzyklen bestanden, lagen die Progesteronspiegel über den gesamten Diöstrus gesehen im Kontrollzyklus über den in den ISDN-Zyklen gemessenen (Abb. 4.21, Tab. 4.3).

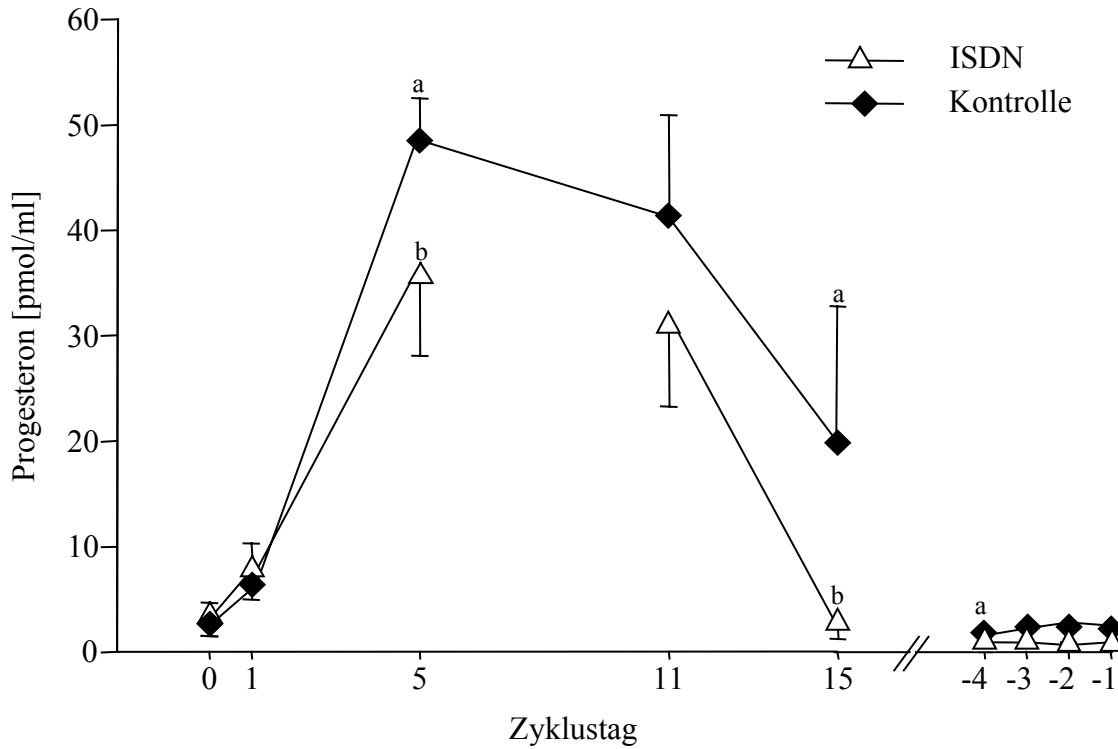


Abb. 4.21: Progesteronkonzentrationen im Plasma. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen.

a, b, : signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$)

Ein Einfluss von ISDN auf die Östrogenspiegel und Nitratspiegel war nicht festzustellen (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) der Konzentrationen von Östrogen, Progesteron und Nitrat im Plasma in den Kontroll- und ISDN-Zyklen von 5 Stuten:

	Progesteron (pmol/ml)	Östrogen (pmol/ml)	Nitrat ($\mu\text{mol/ml}$)
ISDN	$9,54 \pm 2,21$	$2,61 \pm 0,18$	87 ± 15
Kontrolle	$13,97 \pm 3,14$	$2,77 \pm 0,19$	112 ± 15

4.3.3 Einfluss von ISDN auf die endometriale mRNA-Expression

4.3.3.1 NO-Synthasen

Die Konzentration der eNOS-mRNA sowie diejenige der iNOS-mRNA lag im den ISDN-Zyklen niedriger ($p < 0,0001$) als im Kontrollzyklus. Es fällt allerdings auf, dass die mRNA-Expression bereits am Tag 0, d.h. vor Beginn der ISDN-Applikation, geringer war als im Kontrollzyklus. Bei beiden NO-Synthasen bewegten sich die absoluten Werte (Abb. 4.22, 4.23) an allen Untersuchungstagen auf ähnlich niedrigem Niveau.

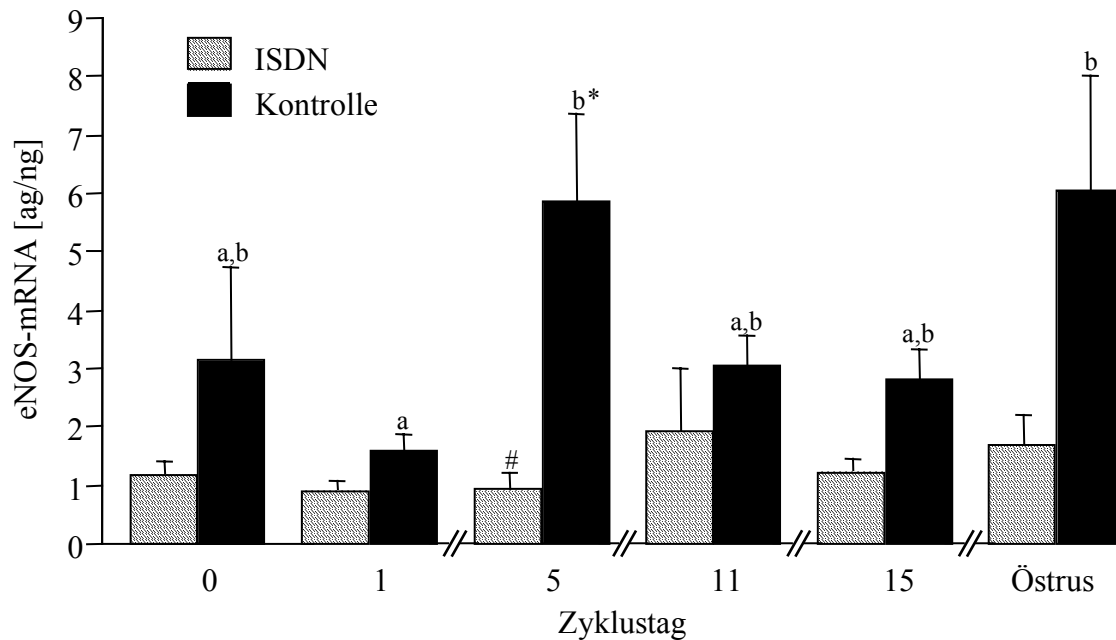


Abb. 4.22: mRNA-Expression der eNOS. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen.

a, b: Werte des gleichen Zyklus mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$); #, *: Werte des gleichen Untersuchungstages aus unterschiedlichen Zyklen unterscheiden sich ($p < 0,05$)

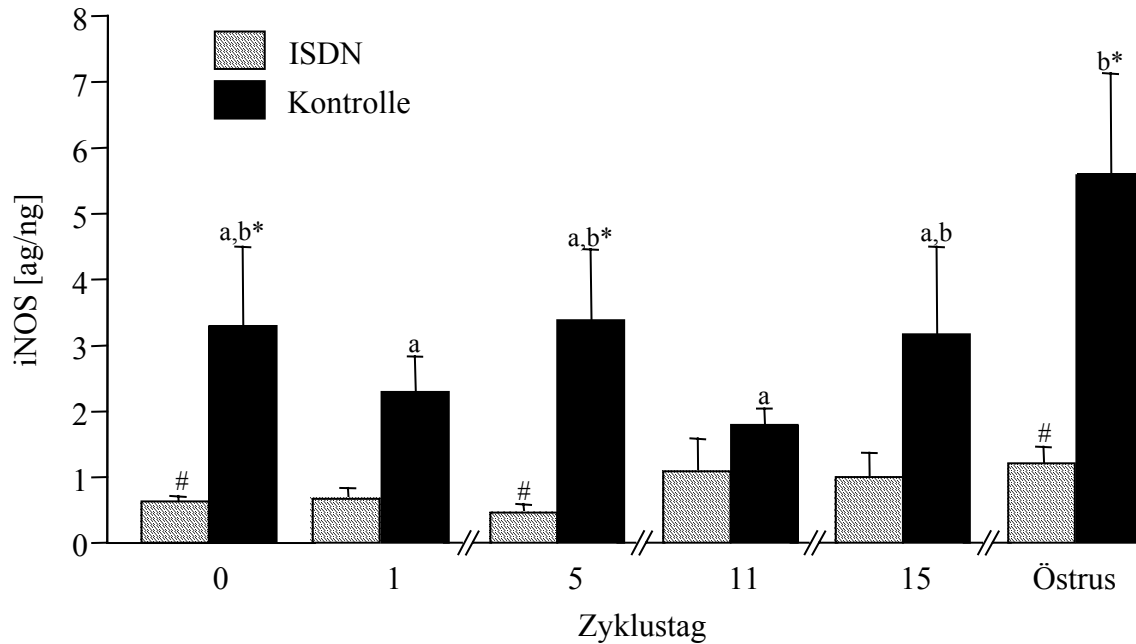


Abb 4.23: mRNA-Expression der iNOS. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen.

a, b,: Werte des gleichen Zyklus mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$); #, *: Werte des gleichen Untersuchungstages aus unterschiedlichen Zyklen unterscheiden sich ($p < 0,05$)

Eine Abhängigkeit der mRNA-Expression vom Zyklusstag war weder für eNOS noch für iNOS nachweisbar ($p > 0,05$). Es fiel aber auf, dass die mRNA-Konzentration beider Synthasen am Zyklusstag 11 und im Östrus am höchsten war. Das im Kontrollzyklus beobachtete Expressionsmaximum der eNOS-mRNA am Tag 5 blieb aus. Die iNOS-mRNA wies am Tag 5 des ISDN-Zyklus sogar die geringsten Konzentrationen des ganzen Zyklus auf (Abb. 4.22 und 4.23).

4.3.3.2 Östrogenrezeptoren

Die Absolutwerte der mRNA-Expression von $ER\alpha$ waren während des Diöstrus (Tag 1, 5, 11) der ISDN-Zyklen tendenziell, wenn auch nicht signifikant ($p = 0,09$), erhöht. Dagegen lagen die Konzentrationen am Tag 15 und im Östrus deutlich ($p < 0,05$) niedriger als im Kontroll-zyklus (Abb. 4.24).

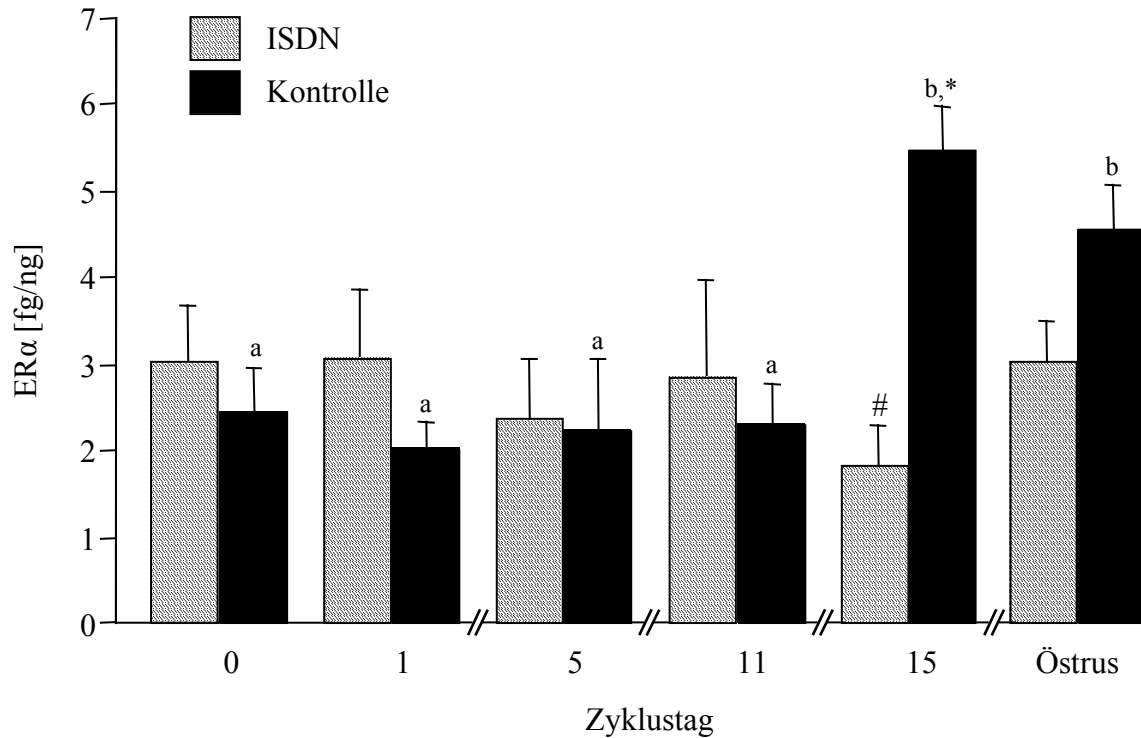


Abb. 4.24: mRNA-Expression von ER α . Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen.

a, b: Werte des gleichen Zyklus mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$); #, *: Werte des gleichen Untersuchungstags aus unterschiedlichen Zyklen unterscheiden sich ($p < 0,05$)

Das mRNA-Expressionsmuster des ER β während des ISDN-Zyklus stimmte weitgehend mit dem im Kontrollzyklus beobachteten Verlauf überein, lediglich der im Kontrollzyklus beobachtete starke Anstieg im Östrus blieb aus (Abb. 4.25).

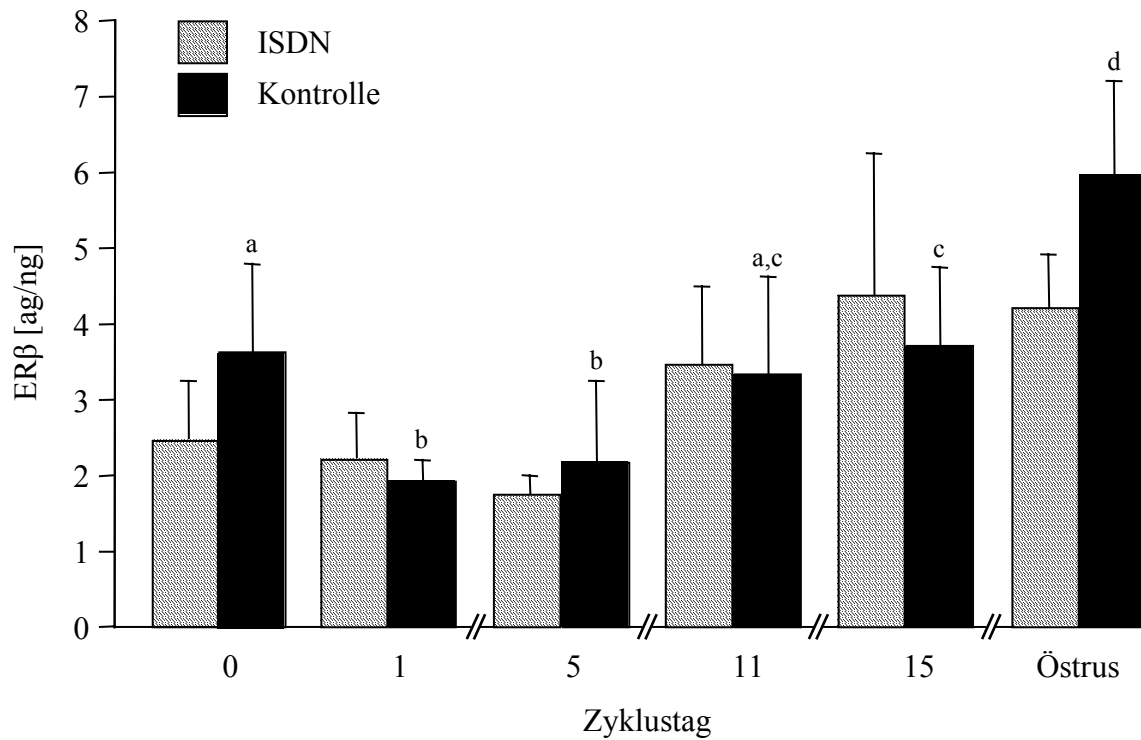


Abb. 4.25: mRNA-Expression von ER β . Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Kontroll- und ISDN-Zyklen.

a, b: Werte des gleichen Zyklus mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$)

4.4 Frühgravidität

4.4.1 Klinisch-Gynäkologische Befunde

In der Frühgravidität war bei 4 Stuten (A, B, C, E) jeweils ein, bei einer Stute (D) zwei Corpora lutea ausgebildet. In allen Fällen handelte es sich um Einzelgraviditäten. Am Tag 11 betrug der mittlere Durchmesser der Fruchtanlage $4,2 \pm 0,5$ mm. Diese war am Tag 15 auf $19,8 \pm 2,5$ mm angewachsen.

4.4.2 Farbdopplersonographische Befunde

4.4.2.1 Blutfluss in den Aa. uterinae

Die uterine Perfusion folgte in der Frühgravidität weitgehend demselben Muster wie im Zyklus, wobei an den Tagen 0 und 15 deutlich höhere Blutflussgeschwindigkeiten gemessen wurden als im Zyklus (Abb. 4.26).

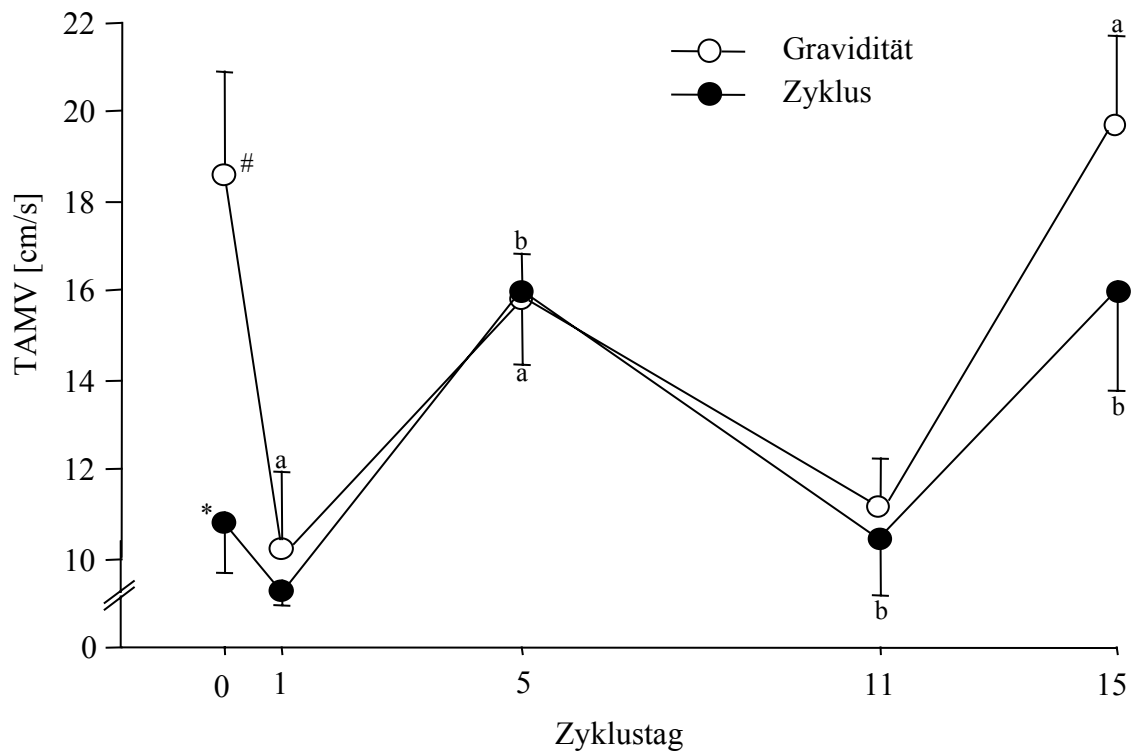


Abb. 4.26: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den Aa. uterinae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Frühgravidität und des Zyklus.

a, b: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$);

#, *: Werte des gleichen Untersuchungstags aus unterschiedlichen Zyklen unterscheiden sich ($p < 0,05$)

4.4.2.2 Blutfluss in den dominanten Aa. ovaricae

Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit in den dominanten Aa. ovaricae (Abb. 4.27) lag während des gesamten Untersuchungszeitraumes in der Gravidität höher als im Zyklus ($p < 0,0001$).

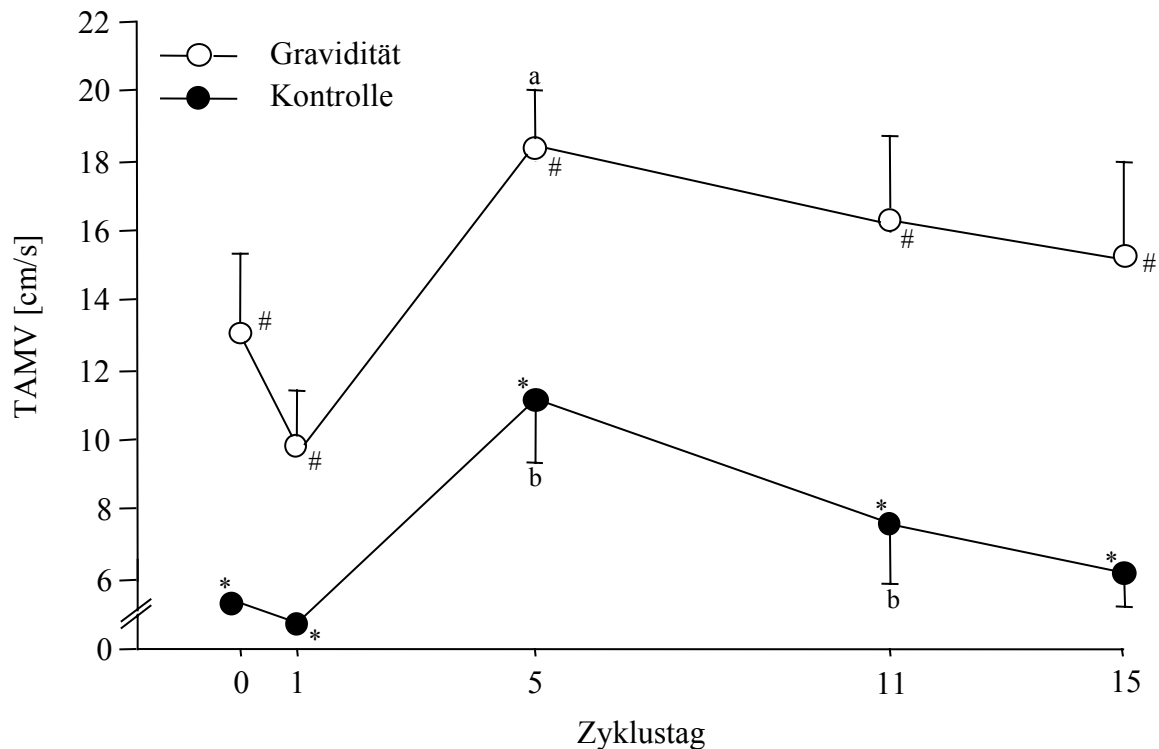


Abb. 4.27: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den dominanten Aa. ovaricae. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 Stuten während der Frühgravidität und des Zyklus.

a, b: signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Untersuchungstag ($p < 0,05$)

#, *: Werte des gleichen Untersuchungstags aus unterschiedlichen Zyklen unterscheiden sich ($p < 0,05$)

4.4.3 Vergleich der untersuchten Parameter am Tag 15 der Frühgravidität und des Kontrollzyklus

Da sowohl in der vorliegenden als auch in vorangegangenen Studien bereits ab Tag 15 der Gravidität eine im Vergleich zum Zyklus gesteigerte uterine und ovarielle Durchblutung nachgewiesen wurde, sollen im folgenden die Veränderung der Steroidhormone, NO-Synthasen und Östrogenrezeptoren am Trächtigkeitstag 15 betrachtet werden.

Die Blutflussgeschwindigkeit in den Aa. uterinae lag mit $19,7 \pm 2,1$ cm/s deutlich über den im Kontrollzyklus gemessenen Werten ($16,0 \pm 2,2$). Die ovarielle Perfusion war in der Gravidität mit einer TAMV von $15,3 \pm 2,7$ cm/s sogar signifikant ($p < 0,05$) höher als im Zyklus ($6,2 \pm 1,0$).

Die Progesteronwerte blieben bei allen Stuten in der Gravidität auch am Tag 15 noch auf hohem Niveau. Die Östrogenkonzentrationen bewegten sich in der Gravidität etwa im selben Bereich wie im Diöstrus. Eine deutliche Veränderung des Nitratspiegels während der Trächtigkeit war ebenfalls nicht nachweisbar (Tab. 4.4).

Die eNOS-mRNA im Endometrium der frühgraviden Stuten war im Durchschnitt geringgradig schwächer exprimiert als im Zyklus (Tab. 4.4).

Dagegen war in der Frühgravidität eine deutlich höhere iNOS-mRNA-Expression als im Kontrollzyklus zu beobachten (Tab. 4.4).

Analog zu den Verhältnissen im frühen Diöstrus war die mRNA-Expression beider Östrogenrezeptoren am Tag 15 der Gravidität sehr gering (Tab. 4.4).

Bei den Östrogen- und Nitratspiegel sowie der mRNA-Expression der eNOS waren keine graviditätsbedingten Veränderungen festzustellen (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Ergebnisse der Untersuchungen am Tag 15 der Frühgravidität (G) und des Zyklus (Z) bei 5 Stuten (A, B, C, D und E); Mittelwert und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$):

		Stute:					Mittelwert
		A	B	C	D	E	($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)
TAMV A.ut. (cm/s)	G	18,1	14,1	24,3	24,6	17,1	19,7 ± 2,1
	Z	11,6	22,7	19,6	11,5	14,6	16,0 ± 2,2
TAMV A.ov. (cm/s)	G	17,3	10,5	15,7	23,9	8,8	15,3 ± 2,7 ^a
	Z	4,5	9,9	6,1	4,9	5,4	6,2 ± 1,0 ^b
Progesteron (pmol/ml)	G	23,3	43,2	49,3	52,2	22,4	38,1 ± 6,4
	Z	70,7	4,3	20,6	0,6	1,4	19,5 ± 13,3
Östrogen (pmol/ml)	G	5,4	2,9	1,9	2,2	1,4	2,8 ± 0,7
	Z	1,2	2,6	2,0	2,6	1,3	1,9 ± 0,3
Nitrat (µmol/ml)	G	66	19	25	268	123	100 ± 46
	Z	49	183	6	114	300	130 ± 52
eNOS-mRNA (ag/ng)	G	3,2	2,4	2,0	1,6	2,0	2,2 ± 0,3
	Z	3,0	4,7	2,5	1,5	2,3	2,8 ± 0,5
iNOS-mRNA (ag/ng)	G	5,3	5,8	6,0	4,0	11,0	6,4 ± 1,2
	Z	1,6	7,8	0,3	4,3	1,8	3,2 ± 1,3
ERα (fg/ng)	G	1,5	2,3	0,2	0,5	1,7	1,2 ± 0,4 ^a
	Z	4,7	4,4	2,1	7,3	5,5	5,5 ± 0,5 ^b
ERβ (ag/ng)	G	3,0	2,9	0,1	2,8	2,6	2,3 ± 0,6 ^a
	Z	4,0	4,0	0,7	7,1	3,0	3,7 ± 1,0 ^b

a, b: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$)

5 DISKUSSION

In den vergangenen 5 Jahren wurde bereits in mehreren Studien die transrektale Farbdopplersonographie zur Untersuchung der Durchblutung des inneren Genitales der Stute eingesetzt (STOLLA und BOLLWEIN 1997, BOLLWEIN et al. 1998, MAYER 1999, BÜHLMAYER 1999, KOLBERG 2000). Dabei ergab sich, dass sowohl die uterine als auch die ovarielle Durchblutung einem zyklusabhängigen, biphasischen Blutflussmuster folgt (MAYER 1999, KOLBERG 2000), wie es in ähnlicher Form auch schon für die Frau beschrieben wurde (DICKEY 1997). Viele Autoren führen diese zyklischen Schwankungen vor allem auf den Einfluss der Sexualsteroiden zurück (FORD 1989, GOSWAMY und STREPTOE 1988, KURJAK et al. 1991, TINKANEN et al. 1994). Als weiterer durchblutungsregulierender Faktor wird das NOS-System diskutiert, welches im gesamten Organismus zu finden ist und dessen Aufgaben unter anderem in der Gefäßrelaxation und der Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes, beispielsweise durch Hemmung der Thrombozytenaggregation, bestehen. Die endotheliale (eNOS) sowie die neuronale (nNOS) NO-Synthase wurden bereits in der Gebärmutter von zyklischen Tieren und Frauen identifiziert (TELFER et al. 1995, BANSAL et al. 1997, KHORRAM et al. 1999). Im graviden Uterus fand man zusätzlich noch die induzierbare (iNOS) Form (BANSAL et al. 1997, ALI et al. 1997). Systematische Untersuchungen über die möglichen Zusammenhänge zwischen der uterinen Expression der verschiedenen Formen der NO-Synthasen und der genitalen Durchblutung stehen jedoch noch aus.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb überprüft werden, welche Faktoren für die charakteristischen Blutflussänderungen in den Aa. uterinae und Aa. ovaricae verantwortlich sind, um damit möglicherweise Ansatzpunkte für den therapeutischen Einsatz von durchblutungsfördernden Substanzen zu erhalten. Insbesondere wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen der NO-Synthasen im Endometrium bzw. den Nitratspiegeln im Plasma und der genitalen Durchblutung bestehen und inwieweit Beziehungen zu den Sexualsteroidhormonen Östrogen und Progesteron herzustellen sind.

Da zum Zeitpunkt der Versuche noch keine Studien zur NOS-Expression im Endometrium der Stute existierten, war es notwendig, zunächst Untersuchungen über die Verhältnisse während eines physiologischen, medikamentell unbeeinflussten Rosseyklus durchzuführen. Neben der Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in den Aa. uterinae bzw. den Aa. ovaricae,

wurden die Gesamtöstrogen-, Progesteron- und Nitratkonzentrationen im peripheren Blut gemessen. In den, während der verschiedenen Zyklusphasen entnommenen Endometriumbiopsaten, wurde die mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren α und β , sowie der induzierbaren (iNOS) und der endothelialen (eNOS) NO-Synthasen bestimmt und auf eventuelle Abhängigkeiten vom Rossezyklus hin untersucht.

Da während dieses „Kontrollzyklus“ die Untersuchungen an vorher festgelegten Zyklustagen, also ungeachtet der individuellen Unterschiede in der Dauer des Diöstrus oder der Rosse erfolgten, wurde zur Standardisierung der Versuchsbedingungen in einem zweiten Zyklus sowohl die Luteolyse (mit $\text{PGF}_{2\alpha}$) als auch die Ovulation (mit hCG) hormonell ausgelöst. Auf diese Weise wurde bei allen Stuten eine vergleichbare Dauer der Phasen der Östrogen- und Progesteroneinwirkung erreicht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde dann getestet, ob es möglich ist, den uterinen und ovariellen Blutfluss durch die exogene Zufuhr des NO-Donors ISDN zu steigern und ob sich die Plasmaspiegel der untersuchten Steroidhormone bzw. endometriale mRNA-Expression der endothelialen und induzierbaren NO-Synthasen unter dem Einfluss eines NO-Donors verändern.

Schließlich wurden noch analoge Untersuchungen während einer Frühgravidität durchgeführt.

Kontrollzyklus

Während des Kontrollzyklus ergab sich das charakteristische biphasische Durchblutungsmuster des Uterus, wie es bereits in den Arbeiten von MAYER (1999) und KOLBERG (2000) dargestellt wurde (Abb. 4.1). Die Durchblutung der dominanten Aa. ovaricae wies ebenfalls das bereits bei MAYER (1999) und KOLBERG (2000) beschriebene Muster auf (Abb. 4.2).

In der vorliegenden Studie war, entgegen den Ergebnissen der oben genannten Autoren, kein Zusammenhang zwischen den Östrogenkonzentrationen und der uterinen Perfusion nachweisbar, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass MAYER und KOLBERG

den Blutflusswiderstand (PI bzw. RI) als Parameter für die Durchblutung verwendeten und nicht wie in der vorliegenden Arbeit die Blutflussgeschwindigkeit (TAMV). Zwischen den Progesteronspiegeln im Plasma und der uterinen Perfusion (Abb. 4.3) waren ebenfalls keine Abhängigkeiten nachweisbar. Erwartungsgemäß wurde zwischen der Progesteronkonzentration im Blutplasma und der TAMV der dominanten *A. ovarica* (Abb. 4.4) eine positive Korrelation gefunden.

Da die Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, welche letztendlich die Hormonwirkung bedingen, sehr komplexen Regulationsvorgängen unterliegen, ist eine Beurteilung des tatsächlichen Einflusses der Sexualsteroiden auf die uterine und ovarielle Perfusion allein anhand der Plasmaspiegel kaum möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde daher, neben den Gesamtöstrogenkonzentrationen im peripheren Blut auch die endometriale mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren α und β (ER α und ER β) untersucht. Beide Rezeptortypen ließen ein zyklusphasenabhängiges Expressionsmuster erkennen, wobei die höchsten Werte am Tag 15 und im Östrus erreicht wurden (Abb. 4.9). Beim Vergleich der Östrogenrezeptorexpression im Endometrium mit dem Blutfluss in den Aa. uterina war lediglich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen ER α und TAMV erkennbar. Ob zwischen diesen beiden Parametern eine eindeutige Abhängigkeit besteht, müßte an einer größeren Stutenzahl untersucht werden.

Die Messung des NO-Abbauproduktes Nitrat im peripheren Blut erwies sich für die hier aufgeworfene Fragestellung als ungeeignet, da bei den Stuten im Zyklusverlauf kein einheitliches Konzentrationsmuster beobachtet werden konnte (Abb. 4.5). Demzufolge war auch kein Zusammenhang mit der Durchblutung nachvollziehbar. Vermutlich tragen das an uterusfernen Syntheseorten (ROSSELLI et al. 1998, MONCADA et al. 1991) gebildete NO, sowie über die Nahrung aufgenommene Stickstoffverbindungen (KIRCHGESSNER 1975) ebenfalls zu Veränderungen des Nitratspiegels bei.

Dagegen zeigte sich bei dem mRNA-Nachweis der NO-Synthasen in den Endometriumbiopsaten, dass die endotheliale NOS sehr deutlichen zyklusabhängigen Schwankungen im Expressionsmuster, mit hohen Konzentrationen am Tag 5 und in der Rosse und geringeren Gehalten an den Tagen 0, 1, 11 und 15 (Abb. 4.6), unterliegt. Dieses biphasische Verlaufsmuster ähnelte auffällig demjenigen des uterinen Blutflusses (Abb. 4.7). Tatsächlich bestand ein positiver Zusammenhang zwischen den beiden Parametern ($r = 0,54$; $p < 0,05$).

Signifikante Zusammenhänge mit der eNOS-mRNA-Expression (Abb. 4.7) ergaben sich auch für die TAMV in den Aa. ovaricae ($r = 0,43$; $p < 0,05$). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der endothelialen NOS eine zentrale Bedeutung in der Regulation der genitalen Durchblutung während des Zyklus der Stute zukommt. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass ein Vergleich der ovariellen Durchblutung mit den uterinen mRNA-Konzentrationen der Östrogenrezeptoren und der NO-Synthasen nur unter Vorbehalt angestellt werden kann, da die Ovarien selbst nicht auf das Vorkommen bzw. die zyklusabhängigen Veränderungen dieser Parameter untersucht werden konnten.

Die mRNA-Expression der induzierbaren NOS zeigte zwar weniger ausgeprägte Schwankungen, jedoch war tendenziell ein ähnlicher zyklischer Verlauf zu beobachten wie bei der eNOS. So wurden auch hier vor allem am Tag 5 und im Östrus die jeweiligen Höchstwerte erreicht (Abb. 4.6). Signifikante Korrelationen mit dem Rosseyklus und der uterinen oder ovariellen Durchblutung waren allerdings nicht nachweisbar.

In mehreren Untersuchungen wurde bereits nachgewiesen, dass sowohl Progesteron als auch Östrogen eine gefäßrelaxierende Wirkung besitzt und diese Wirkung zu einem großen Teil NO-vermittelt ist (CHAN et al. 2001, MOLINARI et al. 2001, RUPNOW et al. 2001). In der eigenen Studie ergaben sich im Kontrollzyklus Hinweise auf eine Beteiligung der Steroidhormone an der Steuerung der NOS-Expression. So waren die hier untersuchten NO-Synthasen an den Tagen am stärksten exprimiert, an denen auch die höchsten Steroidhormonkonzentrationen gemessen wurden, also am Tag 5 des Diöstrus, bei maximalen Progesteronwerten, und in der Rosse, bei maximalen Östrogenkonzentrationen (Abb. 4.8).

PGF 2α -induzierter Zyklus

Um die im Kontrollzyklus beobachteten Zusammenhänge unter möglichst standardisierten Bedingungen genauer nachzuprüfen, wurde in einem weiteren Versuch mit dem PGF 2α -Analogon Tiaprost die Luteolyse induziert. Anschließend wurden der uterine und ovarielle Blutfluss, sowie die mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren und der NO-Synthasen in Abhängigkeit vom Eintritt des durch die Luteolyse ausgelösten, plötzlichen Progesteronabfalls dokumentiert.

Der uterine Blutfluss fiel 12 Stunden nach Induktion der Luteolyse deutlich ab (Abb. 4.10). Die Blutflussgeschwindigkeit der dominanten Aa. ovaricae blieb dagegen bis 12 Stunden post applicationem auf hohem Niveau und fiel erst nach 24 Stunden signifikant ab (Abb. 4.11).

Die Progesteronkonzentration war 3 Stunden nach der $\text{PGF2}\alpha$ -Injektion bereits signifikant abgefallen. Nach 24 Stunden waren basale Werte um 2,6 pmol/ml erreicht (Abb. 4.12). Sowohl die uterine als auch die ovarielle Perfusion nahmen also erst deutlich nach Abfall des Progesteronspiegels ab. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch BOLLWEIN und STOLLA (1996), welche die Corpus luteum-Durchblutung und die Progesteronkonzentration nach Prostaglandin-Applikation bei der Stute untersuchten. Offensichtlich sind damit nach artifiziell induzierter Luteolyse andere Verhältnisse vorzufinden als im medikamentell unbeeinflussten Zyklus, in dem der uterine und ovarielle Blutfluss bereits am Tag 11, also deutlich vor dem Progesteronspiegel, abgefallen war. Anders als im Kontrollzyklus, konnte in diesem Versuch zwischen der Progesteronkonzentration im Plasma und der TAMV der A. uterina ein enger Zusammenhang nachgewiesen werden. Diese scheinbare Diskrepanz ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im $\text{PGF2}\alpha$ -induzierten Zyklus der Ablauf der Luteolyse bei den untersuchten Stuten zeitlich besser koordiniert war, so dass die Korrelationen zu der Intensität der Uterusdurchblutung, im Gegensatz zu der Situation im Kontrollzyklus, belegt werden konnte. Der Zusammenhang zwischen den Plasma-progesterongehalten und der Durchblutung der A. ovarica, der im Kontrollzyklus festgestellt wurde, bestätigte sich auch im $\text{PGF2}\alpha$ -induzierten Zyklus. Die beobachteten Korrelationen lassen somit darauf schließen, dass Progesteron einen Einfluss auf die Steuerung der uterinen und ovariellen Perfusion hat.

Zwischen der Gesamtöstrogenkonzentration im Blutplasma und der uterinen bzw. ovariellen Durchblutung war, nach Induktion der Luteolyse, ebenso wie im Kontrollzyklus, keinerlei Zusammenhang erkennbar.

Die mRNA-Expression des $\text{ER}\beta$ korrelierte negativ mit dem ovariellen Blutfluss (TAMV). Auch die TAMV der Aa. uterina ließ tendenziell einen negativen Zusammenhang mit $\text{ER}\beta$ erkennen. Diese negative Korrelation zwischen $\text{ER}\beta$ und der genitalen Perfusion war, wenn auch weniger deutlich ausgeprägt, schon im Kontrollzyklus festgestellt worden. Zwischen dem $\text{ER}\alpha$ und der genitalen Perfusion waren keine Abhängigkeiten nachweisbar.

Die mRNA-Expression von eNOS und iNOS zeigte bis 36 Stunden nach der PGF2 α -Applikation einen sehr ähnlichen Verlauf: die höchsten Konzentrationen wurden zum Zeitpunkt 0 (Tag 5 des Diöstrus) und zum Zeitpunkt 36 Stunden gemessen, 12 Stunden nach PGF2 α lagen sie dagegen im niedrigen Bereich. In der Rosse lagen die Konzentrationen an eNOS-mRNA im niedrigen Bereich, während die mRNA-Expression der iNOS sich eher auf mittlerem bis hohem Niveau bewegte. Damit war prinzipiell ein ähnlicher Verlauf wie im Kontrollzyklus nachvollziehbar (Abb. 4.13). Dass die beiden NO-Synthasen während der Rosse am Ovar unterschiedlich exprimiert werden und unterschiedliche Aufgaben im Ovulationsgeschehen erfüllen, wurde bereits nachgewiesen (FALETTI et al. 1999, VAN VOORHIS et al. 1995, ZACKRISSON et al. 1996). Es wäre also denkbar, dass die beiden Enzyme in diesem Zeitraum im Uterus ebenfalls unterschiedlich reguliert werden.

Bedenkt man die antibakterielle Wirkung von NO und dass die iNOS bislang vor allem in Verbindung mit Entzündungsreaktionen identifiziert wurde, so könnte eine mögliche Funktion dieses Enzyms im Uterus, in der Rosse und um den Zeitpunkt der Ovulation, der Schutz vor belegungsbedingten Infektionen sein. Dafür spricht auch die gesteigerte Phagozytosefähigkeit des Endometriums in diesem Zeitraum.

Obwohl zwischen der uterinen Perfusion und der mRNA-Expression der eNOS keine Korrelation nachgewiesen werden konnte, fiel dennoch auf, dass beide Parameter, wie bereits im Kontrollzyklus beobachtet, ein ähnliches Verlaufsmuster zeigten (Abb. 4.14). Damit wurde die bereits im Kontrollzyklus angestellte These bestätigt, dass die endometriale eNOS eine wichtige Rolle in der uterinen Perfusion spielt. Dass die eNOS-mRNA zum Zeitpunkt 36 Stunden bereits in sehr hohen Konzentrationen vorlag, während die TAMV dieses hohe Niveau erst 36 Stunden später erreichte, kann damit erklärt werden, dass für die Translation und damit die Synthese des Enzyms ein Zeitraum von mehreren Stunden eingeräumt werden muss. Die Expression der eNOS-mRNA korrelierte im Luteolyse-Versuch, ebenso wie der uterine und ovarielle Blutfluss, positiv mit der Progesteronkonzentration im Plasma (Tab. 4.2). Diese Ergebnisse, zusammen mit den erläuterten Gemeinsamkeiten der Verlaufsmuster der uterinen Perfusion und der eNOS-mRNA legen die Vermutung nahe, dass die endogenen Gestagene an der Steuerung der Durchblutung im Genitale der Stute maßgeblich beteiligt sind und dass dieser Einfluss NO-vermittelt ist. Da die Ovarien selbst aber in dieser Studie nicht auf die NO-Synthasen hin untersucht worden sind, können bezüglich einer Steuerung der ovariellen Perfusion durch das NOS-System nur Vermutungen angestellt werden.

ZACKRISSON et al. (1996) fanden am Corpus luteum eine sehr hohe eNOS-Expression, was sie mit der großen Dichte an Blutgefäßen in Verbindung brachten. So wäre es denkbar, dass durch die Progesteronwirkung die eNOS- und iNOS-Expression im Uterus und am Ovar gesteigert wird. Ein stimulierender Effekt von Progesteron auf die NO-Synthese bei der Ratte und beim Schaf wurde bereits beschrieben (AL-HIJJJI et al. 2001, RUPNOW et al. 2001). In der Folge eines abrupten Progesteronabfalls könnte es also, wie im PGF 2α -Versuch beobachtet, etwas zeitlich versetzt zu einer Abnahme der NO-Synthasen kommen, was wiederum zu einer Senkung der Durchblutung führt. Andererseits wird, wie bei MOTTA et al. (1999) beschrieben, die NO-Synthese durch PGF 2α stimuliert und ist an der Corpus luteum-Involution beteiligt. Durch die Applikation des Prostaglandins wird also möglicherweise die NO-Synthese am Ovar trotz abfallender Gestagenspiegel zunächst weiter angeregt, weshalb die ovarielle Durchblutung erst nach vollständiger Luteolyse absinkt.

Da sich die NO-Synthese über einen negativen Feedback-Mechanismus (ASSREY et al. 1993, ROGERS und IGNARRO 1992, BUGA et al. 1993) auch selbst reguliert, kommt es im unbeeinflussten Zyklus im mittleren bis späten Diöstrus vermutlich zu einem Abfall der NOS-Expression. Für diese These sprechen auch die Untersuchungen von MAYER (1999), nach denen die Perfusion des Corpus luteum bereits am Tag 9, also etwa 4 Tage vor dem Abfall der Progesteronspiegel, wieder abnahm.

In mehreren Studien wurde allerdings bereits nachgewiesen, dass auch Östrogen das NOS-System stimuliert (VAN BUREN et al. 1992, ROSENFELD et al. 1996, CHAN et al. 2001). In dieser Versuchsreihe erreichte bei hohen Östrogenspiegeln und hoher mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren vor allem die iNOS-, im Kontrollzyklus auch die eNOS-mRNA, ein weiteres Maximum (Abb. 4.6 und 4.13). Dass die Anstiege der beiden NO-Synthasen im Endometrium während der Rosse aber tatsächlich östrogenvermittelt sind, kann nach den Ergebnissen dieser Studie nur vermutet werden, da keine signifikanten Abhängigkeiten ermittelt werden konnten.

ISDN-Zyklen

Während der Applikation des NO-Donors ISDN war die mRNA der beiden untersuchten NO-Synthasen signifikant geringer exprimiert als im Kontrollzyklus (Abb. 4.22 und 4.23). Diese

Minderexpression läßt sich damit begründen, dass durch das exogen zugeführte NO vermutlich die endogene NO-Synthese gehemmt und damit auch die Menge an NO-Synthasen im Uterus reduziert wurde. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch VAZIRI und WANG (1999) bei der Applikation von ISDN an Ratten. Wie bereits beschrieben, reguliert sich die NO-Synthese über einen negativen Feedback-Mechanismus selbst, wodurch ein Überschuss an NO im Organismus verhindert wird (ROGERS und IGNARRO 1992, ASSREY et al. 1993, BUGA et al. 1993). Insofern ist es auch erklärlich, dass der von STEFFEN (2000) beschriebene durchblutungssteigernde Effekt nach Verabreichung des NO-Donors ISDN in der vorliegenden Untersuchung nicht zu beobachten war. Worauf diese divergierenden Ergebnisse zurückzuführen sind, ist unklar. Möglicherweise spielte die Entnahme der Uterusbiopiate in der vorliegenden Studie eine Rolle.

Das im Kontroll- und PGF-Zyklus beobachtete, zyklusabhängige Expressionsmuster der NO-Synthasen-mRNA, war im ISDN-Zyklus nicht gegeben. Dies deutet darauf hin, dass durch den Überschuss an exogen appliziertem NO eine gezielte Steuerung der NOS-Expression im Endometrium entfällt. Dass aber dennoch das gleiche zyklische Blutflussmuster gefunden wurde wie im Kontrollzyklus, legt die Vermutung nahe, dass die Durchblutung im Genitale der Stute nicht allein durch die endogene NO-Synthese der im Uterus lokalisierten NOS gesteuert wird, sondern auch noch andere Faktoren beteiligt sein müssen. Denkbar wäre eine zyklusabhängige Regulation der löslichen Guanylatzyklase (cGMP), also des Enzyms, welches mittels NO-Bindung letztlich zur Vasodilatation führt (RAGGLE 1999). Tatsächlich ergaben bereits mehrere Studien, dass die uterine cGMP-Expression durch die Sexualsteroiden reguliert wird (CHEN et al. 2001, KRUMENACKER et al. 2001).

Die ISDN-Applikation führte im ISDN-Zyklus I in Kombination mit der Biopsieprobenentnahme am Tag 5 zu einer vorzeitigen Luteolyse. Außerdem waren die Progesteronkonzentrationen im Diöstrus niedriger als im Kontrollzyklus (Abb. 4.21). Diese Vorgänge sind dadurch erklärbar, dass durch Biopsieprobenentnahmen Entzündungsreize gesetzt werden, welche eine vermehrte Prostaglandinausschüttung induzieren. Das außerdem im Überschuss vorhandene NO stimuliert seinerseits die PGF 2α -synthetisierende Cyclooxygenase (ESTEVEZ et al. 1995, MOTTA et al. 2001), so dass es zu einer vorzeitigen Luteolyse kommt.

Fühgravidität

In der frühen Gravidität fanden sich etwas andere Verhältnisse als während des Zyklus. Bei hohen Plasmaprogesteronspiegeln war die Konzentration der eNOS-mRNA im Endometrium bei allen Tieren relativ gering. Betrachtet man Tabelle 4.4 genauer, so stellt man fest, dass bei denjenigen Stuten, bei denen der uterine und ovarielle Blutfluss im Vergleich zum Kontrollzyklus erhöht war (Stute A, C, D, E), auch große Mengen an iNOS-mRNA im Endometriumsbiopat nachgewiesen werden konnten. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren, die während der Gravidität sowohl bei der Frau (YOSHIKI et al. 2000) als auch bei der Ratte (BANSAL et al. 1997) eine starke Expression der iNOS fanden. Es besteht also möglicherweise auch in der Trächtigkeit eine Abhängigkeit zwischen der Durchblutung und der NOS, jedoch scheint hier die iNOS und nicht, wie im Zyklus die eNOS, die entscheidende Rolle zu spielen.

Interessanterweise lag bei Stute B, die am Tag 15 der Gravidität keinen höheren Blutfluss als im Kontrollzyklus aufwies, auch die Konzentration der iNOS-mRNA auf einem niedrigen Niveau (Tab. 4.4). Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Durchblutungssteigerung in dieser Trächtigkeitsphase auf eine gesteigerte iNOS-Expression zurückzuführen ist.

Bereits in mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass der Embryo in der frühen Trächtigkeit Östrogen produziert (ZAVY et al. 1984, HEAP et al. 1982). Die uterine Expression der Östrogenrezeptoren war in dieser Studie, bedingt durch die suppressive Wirkung des Progesterons zwar relativ gering, dennoch aber ausreichend, um auf eventuelle Signale des Konzeptus reagieren zu können. Es wäre also durchaus vorstellbar, dass die Östrogensynthese durch den Konzeptus in der frühen Gravidität für die Steigerung der iNOS-mRNA im Endometrium verantwortlich ist. Der hohe maternale Progesteronspiegel könnte dabei noch einen zusätzlichen Stimulus darstellen. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen einer Untersuchung von SAXENA et al. (2000) am Mäuseuterus. In deren Studie wurde mit immunhistologischen Methoden peri implantationem eine starke östrogen-induzierte iNOS-Expression nachgewiesen, die sich durch zusätzliche Progesteronapplikation noch steigern ließ.

In der vorliegenden Studie wurde bei Stute B in einer vorangegangenen Trächtigkeit eine Wachstumsretardierung des Konzeptus festgestellt, d. h. die Fruchtanlage war erst 18 Tage nach der Ovulation mit einem Durchmesser von 7,5 mm, was normalerweise der Größe am Tag 12 entspricht, ultrasonographisch darstellbar. Möglicherweise bestand auch während der in dieser Studie untersuchten Trächtigkeit, trotz normaler Konzeptusgröße an den Tagen 11 und 15, ein Defizit im fetomaternalen Blutaustausch, weshalb eine vom Fetus, möglicherweise durch Östrogen, induzierte Erhöhung des Blutflusses und der iNOS ausblieb.

5.1 Schlussfolgerungen

Die Übereinstimmung in den zyklusabhängigen Mustern des Blutflusses der A. uterina und der endometrialen eNOS-mRNA-Expression im Kontroll- und PGF 2α -induzierten Zyklus läßt den Schluss zu, dass das im Uterus lokalisierte NOS-System eine wichtige Rolle in der Regulation der uterinen Perfusion spielt. Während des Zyklus scheint die endotheliale NO-Synthase das für den Blutfluss entscheidende Enzym zu sein.

Im Kontrollzyklus wurde beobachtet, dass die NOS-Expression wie die uterine Durchblutung an den Tagen am höchsten waren, an denen auch die höchsten Konzentrationen von Progesteron (Tag 5 des Diöstrus) bzw. Östrogen (Rosse) gemessen wurden. Nach artifizieller Induktion der Luteolyse war außerdem ein Absinken der eNOS und iNOS-Konzentrationen, wie auch eine Abnahme der Durchblutung in den untersuchten Gefäßen in Abhängigkeit vom abfallenden Progesteronspiegel nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass vermutlich beide Hormone einen gewissen Einfluss auf die Expression der NO-Synthasen im Endometrium haben, und somit indirekt an der Regulation der Perfusion im Genitale der Stute beteiligt sind.

In der Frühgravidität ist dagegen die induzierbare Form der NO-Synthasen im Uterus vorherrschend. Es ist anzunehmen, dass die iNOS hier ebenfalls eine Blutflussteigerung hervorruft, was möglicherweise durch ein Signal des Embryos induziert wird.

Durch die Applikation des NO-Donors ISDN konnte die uterine und ovarielle Perfusion nicht gesteigert werden. Dass während der ISDN-Applikation die uterinen NO-Synthasen kein zyklisches Muster mehr zeigten, das Blutflussmuster jedoch im Vergleich zum Kontrollzyklus

unverändert blieb, deutet darauf hin, dass der dem NO-System nachgeschalteten löslichen Guanylatzyklase eine ebenso entscheidende Rolle bei der Durchblutungsregulation zukommt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des uterinen NOS-System und der Sexualsteroid Östrogen und Progesteron auf die uterine und ovarielle Durchblutung bei der Stute zu untersuchen.

Fünf Traberstuten wurden jeweils über insgesamt 4 Zyklen und während einer Frühgravidität untersucht. Die Untersuchungen beinhalteten farbdoppler- und ultrasonographische Aufzeichnungen, sowie die Gewinnung von Blutproben und Endometriumsbiopaten. Dabei verlief der erste Zyklus medikamentell unbeeinflusst mit Untersuchungen an den Tagen 0 (= Ovulation), 1, 5, 11, 15 und täglich während der Rosse, jedoch wurde in der Rosse nur an einem Tag ein Uterusbiopat entnommen. Im zweiten Zyklus wurde am Tag 5 des Diöstrus mit dem PGF 2α -Analogon Tiaprost (Iliren[®], 450 mg i.m.) die Luteolyse induziert und später in der Rosse, bei einer Follikelgröße von 35 mm, mit hCG (Choriolutin[®], 2500 IE i.v.) die Ovulation ausgelöst. Die Untersuchungen wurden in diesem Zyklus unmittelbar vor PGF 2α , 30 min, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 Stunden danach und schließlich alle 24 Stunden bis zur Ovulation vorgenommen. Die Biopsieproben wurden jeweils vor Induktion der Luteolyse, 12 und 36 Stunden danach, unmittelbar vor der hCG-Injektion und nach Eintritt der Ovulation entnommen. Während weiterer zwei Zyklen wurde der NO-Donor ISDN (ISDN 40[®], 30 mg, 2 mal täglich) oral verabreicht. Im ersten Zyklus (ISDN I) erfolgten die Untersuchungen an den Zyklustagen 0, 1 und 5, im zweiten Zyklus (ISDN II) an den Tagen 11, 15 und in der Rosse. Während der Frühgravidität wurden die farbdopplersonographischen Aufzeichnungen und die Blutproben-entnahmen an den Trächtigkeitstagen 0, 1, 5, 11 und 15 durchgeführt, eine Biopsieprobe wurde nur am Tag 15 gewonnen.

Die Durchblutung in der A. uterina und der dominanten A. ovarica wurde anhand der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) semiquantitativ beurteilt. Die Östrogen- und Progesteronkonzentration im peripheren Blut wurden mittels EIA bestimmt, die Nitratspiegel wurden nach einem Verfahren auf Basis der GRIESS-Reaktion ermittelt. Die mRNA-Expression der endothelialen und der induzierbaren NO-Synthasen (eNOS und iNOS), sowie der Östrogenrezeptoren α und β (ER α und ER β) wurde mit Hilfe der RT-PCR-Analyse quantifiziert.

Die mRNA-Expression der eNOS wies im Kontroll- wie im PGF2 α -induzierten Zyklus ein zyklisches Muster auf ($p < 0,05$ bzw $p < 0,0001$), diejenige der iNOS nur im PGF2 α -Versuch ($p < 0,05$). Die Expressionsmaxima der beiden NO-Synthasen traten vor allem am Tag 5 des Diöstrus und in der Rosse auf, also an den Tagen an denen entweder die höchsten Progesteron- oder die höchsten Östrogenkonzentrationen gemessen wurden. Im PGF2 α -induzierten Zyklus wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen eNOS und Progesteron nachgewiesen ($p < 0,05$).

Im Kontrollzyklus korrelierte die Expression der eNOS-mRNA signifikant mit dem uterinen Blutfluss ($p < 0,05$). Diese beiden Parameter zeigten auch im PGF2 α -induzierten Zyklus einen gleichartigen Verlauf.

Zwischen den Östrogenrezeptoren im Endometrium bzw. den Östrogenkonzentrationen im Plasma und dem NOS-System oder der genitalen Perfusion konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

Die Nitratkonzentrationen im Plasma folgten keinem zyklischen Muster und erwiesen sich somit für die hier aufgeworfene Fragestellung als ungeeignet.

Die Applikation des NO-Donors ISDN führte zu einer, im Vergleich zum Kontrollzyklus verminderten Expression der uterinen NOS-mRNA ($p < 0,0001$). Eine Steigerung der uterinen oder ovariellen Durchblutung durch ISDN war nicht nachweisbar ($p > 0,05$). In Folge der Biopsieprobenentnahme am Tag 5 kam es bei gleichzeitiger ISDN-Applikation bei allen Stuten zur Luteolyse.

Am Tag 15 der Gravidität wurde neben einer gesteigerten uterinen und ovariellen Perfusion auch eine deutlich erhöhte iNOS-mRNA-Expression beobachtet.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das uterine NOS-System sowohl während des Zyklus als auch während der Frühgravidität der Stute eine wichtige Rolle in der Regulation der genitalen Perfusion spielt. Progesteron wie auch Östrogen scheinen die endometriale Expression von eNOS und iNOS zu stimulieren, wodurch sie die Durchblutung indirekt beeinflussen.

7 SUMMARY

“Investigations on the regulation of uterine and ovarian blood flow and the expression of nitric oxide-synthases and estrogen receptors during estrous cycle and early pregnancy in mares.”

The aim of the present study was to estimate the influence of uterine NOS-system and the sexual steroids estrogen and progesterone on the blood supply of the uterus and the ovaries.

Five trotter mares were examined in total during four estrous cycles and one early pregnancy. The investigations contained color Doppler- and ultrasound recordings as soon as the extraction of blood samples and endometrial biopsies. The first cycle was medically uninfluenced and investigations were carried out on Days 0 (= ovulation), 1, 5, 11, 15 and daily during estrous, whereas in estrous only one endometrial biopsy was taken. In the second cycle luteal regression was induced on Day 5 of diestrus with the PGF₂α-analogue Tiaprost (Iliren[®], 450 mg i.m.) and in estrus ovulation was induced with hCG (Choriolutin[®], 2500 IE i.v.), when the size of one follicle reached 35 mm. Investigations were carried out in this cycle immediately before giving PGF₂α and 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 hours after that and then once a day up to ovulation. Endometrial biopsies were taken in each case before induction of luteolysis, 12 and 36 hours after that, before injection of hCG and immediately after ovulation. During the further two cycles the mares were treated orally with the NO donor ISDN (ISDN 40[®], 30 mg, twice a day). Investigations were carried out on Days 0, 1 and 5 of the first cycle (ISDN I), as well as on Days 11, 15 and during estrus of the second cycle (ISDN II). During early pregnancy color Doppler recordings and blood samples were taken on Days 0, 1, 5, 11 and 15 of pregnancy, while endometrial biopsies were only gained on day 15.

The analysis of uterine blood flow was based on the time-averaged maximum velocity (TAMV). Estrogens and progesterone were measured by an enzyme immunoassay. Nitrate concentrations were evaluated using Griess reacting. Total RNA was isolated from endometrial biopsies. Transcripts encoding the estrogen receptors α and β and the endothelial as well as the inducible nitric oxide-synthase (eNOS and iNOS) were quantified by RT-PCR-analysis.

The expression of eNOS-mRNA in control, as well as in the PGF2 α -induced cycle, followed a consistent wavelike pattern ($p < 0.05$ and $p < 0.0001$). Both, eNOS and iNOS, showed their maximum of expression especially on Day 5 of diestrous and during estrous, when the highest levels of either progesterone or estrogen were measured. In the PGF2 α -induced cycle, a significant connection between eNOS and progesterone was proved ($p < 0.05$).

There was a positive correlation between the expression of the eNOS-mRNA and the uterine blood flow ($p < 0.05$) in the control cycle. In the PGF2 α -induced cycle these two parameters also showed a similar cyclic pattern.

The levels of estrogen-receptors in the endometrium or concentrations of estrogen in plasma were not related to the endometrial NO-synthases or to TAMV values.

Plasma concentrations of nitrate were independent from the stage of estrous cycle and consequently were proved as unsuitable for the question raised here (in this case).

The application of the NO donor ISDN led to a marked decrease of the uterine NOS-expression when compared with control cycle ($p < 0.0001$). An increase of uterine or ovarian perfusion during the application of ISDN was not provable ($p > 0.05$). In result of the biopsies on day 5 and of simultaneous ISDN application luteolysis was induced next to all mares.

On day 15 of pregnancy, an increase in uterine and ovarian perfusion as well as an enhancement in iNOS-mRNA expression was observed.

In conclusion, the results of this study indicate that the endometrial NO-synthases play an important role in the regulation of uterine blood supply during estrous cycle and pregnancy of the mare. Progesterone as well as estrogen seem to stimulate the endometrial expression of eNOS and iNOS, by which these hormones may indirectly influence uterine and ovarian blood flow.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- AL-HIJJ J., I. LARSSON und S. BATRA (2001):
Effect of ovarian steroids on nitric oxide synthase in the rat uterus, cervix and vagina.
Life Sci. ; **69** (10), 1133-1142
- ALI M., I. BUHIMSCHI, K. CHWALISZ und 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**, 995-1003
- ALLEN W.E. (1988):
Endocrine control of the estrous cycle and puberty.
In: ALLEN, W. E. (Ed.): Fertility and obstetrics in the horse; 6-8
Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne
- ANTEBY E.Y., A. HURWITZ, O. KORACH, A. REVEL, A. SIMON, Z. FINCI-YEHESCEL, M. MAYER und N. LAUFER (1996):
Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow.
Hum. Reprod. ; **11**, 1947-1951
- ASSREUY J., F.Q. CUNHA, F.Y. LIEW und S. MONCADA (1993):
Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide.
Br. J. Pharmacol. ; **108**, 833-837
- BANI D., M.C. BACCARI, S. NISTRI, F. CALAMAI, M. BIGAZZI und T.B. SACCHI (1999):
Relaxin up-regulates the nitric oxide biosynthetic pathway in the mouse uterus: involvement in the inhibition of myometrial contractility.
Endocrinology ; **140**, 4434-4441
- BANSAL R.K., P.C. GOLDSMITH, Y. HE, C.J. ZALOUDEK, J.L. ECKER und R.K. RIEMER (1997):
A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor in delivery.
J. Clin. Invest. ; **99**, 2502-2508
- BAUMGARTNER U. (1998):
Farbdopplersonographische Untersuchung der A. uterina und des Corpus luteum beim Rind.
Vet. med. Diss., München
- BLACHIER F., H. M'RABET-TOUIL und B. DARAY-VRILLON (1991):
Stimulation by D-glucose of the direct conversion of arginine to citrulline in enterocytes isolated from pig jejunum.
Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **168**, 1034-1040

BLUM J. (2000):

Div. of Nutritional Pathology
Inst. of Animal Breeding; University of Berne
Pers. Mitteilung

BOLLWEIN H. und R. STOLLA (1996):

The effect of PGF 2α on luteal vascularisation in mares studied by color Doppler sonography.
13th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia

BOLLWEIN H., J. MEIERL, R. MAYER und R. STOLLA (1998):

Transrectal color Doppler sonography of the A. uterina in cyclic mares.
Theriogenology ; **49**, 1483-1488

BOLLWEIN H., S. STEFFEN und R. STOLLA (2001):

The influence of drugs on uterine and ovarian blood flow in cyclic mares.
3. Internationale Konferenz für equine Reproduktionsmedizin, Leipzig 2001

BOLLWEIN H., F. WEBER, B. KOLBERG und R. STOLLA (2002):

Uterine and ovarian blood flow during the estrus cycle in mares.
Theriogenology ; in press

BONELLO N., K. McKIE, M. JASPER, L. ANDREW, N. ROSS, E. BRAYBON, M.
BRÄNSTRÖM und R.J. NORMAN (1996):

Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1beta-enhanced ovulation rate, steroid
hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat.
Biol. Reprod. ; **54**, 436-445

BRADLEY K.K., I.L. BUXTON, J.E. BARBER, T. McGAW und M.E. BRADLEY (1998):

Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism.
Am. J. Physiol. ; **275**, C 1668-1673

BRECKWOLDT M., J. NEULEN und H.P. ZAHRADNIK (1990):

Stoffwechsel und biologische Wirkung der Östrogene.
In: WOLF, A. S. und H. P. G. SCHNEIDER (Hrsg.): Östrogene in der Diagnostik und
Therapie; 13-17
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

BUGA G.M., J.M. GRISCAVAGE, N.E. ROGERS und L.J. IGNARRO (1993):

Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide.
Circ. Res. ; **73**, 808-812

BUHIMSCHI I., C. YALLAMPALLI, Y.L. DONG und 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**, 1577-1584

BUSSE R. und A. MULSCH (1990):

Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle.
FEBS Letters ; **275**, 87-90

- BÜHLMAYER M. (1999):
Farbdopplersonographische Untersuchung der A. uterina und A. ovarica der Stute im Verlauf spontaner und hormonell induzierter Ovulationen.
Vet. med. Diss., München
- CHAN H.Y., X. YAO, S.Y. TSANG, F.L.CHAN, C.W. LAU und Y. HUANG (2001):
Different role of endothelium/nitric oxide in 17beta-estradiol- and progesterone-induced relaxation in rat arteries.
Life Sci. ; **69** (14), 1609-1617
- CHOMCZYNSKI P. und N. SACCHI (1987):
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction.
Anal. Biochem. ; **162**, 156-159
- CLARK J.H., A.J. HSUEH und E.J. PECK Jr. (1977):
Regulation of estrogen receptor replenishment by progesterone.
Ann. N.Y. Acad. Sci. ; **286**, 161-179
- COGSWELL A.M., P.J. JOHNSON und H.R. ADAMS (1995):
Evidence for endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide in the equine digital arteries.
Am. J. Vet. Res. ; **56**, 1637-1641
- COOK J.P. und P.S. TSAO (1993):
Cryoprotective effects of nitric oxide.
Circulation ; **88**, 2451-2454
- COULSON P.B. und E.J. PAVLIK (1977):
Effects of estrogen and progesterone on cytoplasmic estrogen receptor rates of protein synthesis in rat uterus.
J. Steroid. Biochem. ; **8**, 205-207
- DAELS P.F., D.C. AMMON, G.H. STABENFELDT, I.K.M. LIU, J.P. HUGHES und B.L. LASLEY (1991):
Urinary and plasma oestrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares.
Theriogenology ; **35**, 1001-1017
- DAELS P.F. und J.P. HUGHES (1993):
The normal estrous cycle.
In: McKINNON, A.O. and VOSS, J.L.: Equine Reproduction; 121-132
Lea and Febiger, Philadelphia, London
- DAVIES M.G., G.J. FULTON und P.O. HAGEN (1995):
Clinical biology of nitric oxide.
Br. J. Surg. ; **82**, 1598-1610
- DENK H. (1989):
Immunhistochemische Färbemethoden.
In: BÖCK, P. (Hrsg): ROMEIS: Mikroskopische Technik, 17. Auflage; 251-262
Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

- DICKEY R.P. (1997):
Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy.
Hum. Reprod. Update ; **3**, 467-503
- DIXIT V.D. und N. PARVIZI (2001):
Nitric oxide and the control of reproduction.
Anim. Reprod. Sci. ; **65**, 1-16
- DUDWIESUS H., R. KRIEG und K.J. SCHMIDT (1993):
Physikalisch-technische Grundlagen der Dopplersonographie.
In: SOHN, C., W. STOLZ und G. BASTIRT (Hrsg.):
Dopplerultrasonographie in der Gynäkologie und Geburtshilfe; 1-11
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- ELLIOT J., C.E. BRYANT und J. SOYDAN (1994):
The role of nitric oxide in the response of equine digital veins to vasodilator and vasoconstrictor agents.
Equine Vet. J. ; **26**, 378-384
- ESTEVAZ A., A.B. MOTTA und M. FERNANDEZ DE GIMENO (1999):
Role of nitric oxide in the synthesis of prostaglandin F₂ alpha and progesterone during luteolysis in the rat.
Medicina (B. Aires) ; **59**, 463-465
- EVANS R.W. und W.W. LEAVITT (1980):
Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: dependence on RNA and protein synthesis.
Biochemistry ; **77**, 856-860
- FALETTI A., S. PEREZ-MARTINEZ, C. PEROTTI und M.A. de GIMENO (1999):
Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production.
Nitric Oxide ; **3**, 340-347
- FANG L., B.J. NOWICKI, Y.L. DONG und C. YALLAMPALLI (1999):
Localized increase in nitric oxide production and the expression of nitric oxide isoforms in rat uterus with experimental intrauterine infection.
Am. J. Obstet. Gynecol. ; **181**, 601-609
- FLEMING I., G.A. GRAY, C. SCHOTT und J.-C. STOCLET (1991):
Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells.
Eur. J. Pharm. ; **200**, 375-376
- FLOOD P.F. (1993):
Fertilization, early development and establishment of the placenta.
In: McKINNON, A. O. and J. L. Voss (Eds.): Equine reproduction; 473-485
Lea and Febinger, Philadelphia, London

FORD, S.P. (1989):

Factors controlling uterine blood flow during estrous and early pregnancy.

In: C.R. ROSENFELD (Ed.): Reproductive and perinatal medicine (X):

The uterine circulation.

Perinatology Press, Ithaca, New York, 113-134

GABLER C., B. LAUER, A. EINSPANIER, D. SCHAMS und 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**, 213-221

GILES W., S. O'CALLAGHAN, A. BOURBA und A. WALTER (1992):

Reduction in human fetal umbilical-placental vascular resistance by glyceryl trinitrate.

Lancet ; **340**, 856

GINTHER O.J., M.C. GARCIA, E.L. SQUIRES und W.P. STEFFENHAGEN (1972):

Anatomy of vasculature of uterus and ovaries in the mare.

Am. J. Vet. Res. ; **33**, 1561-1568

GINTHER O.J. (1979):

Characteristics of the ovulatory season.

In: GINTHER, O. J. (Ed.): Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects;

133-168

Equiservice, Cross Plains, Wisconsin

GINTHER O.J. (1983a):

Fixation and orientation of the early equine conceptus.

Theriogenology ; **19**, 613-623

GINTHER O.J. (1983b):

Mobility of the early equine conceptus.

Theriogenology ; **19**, 603-611

GINTHER O.J. und R.A. PIERSON (1984):

Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus.

Theriogenology ; **21**, 505-516

GINTHER O.J. (1992a):

Characteristics of the ovulatory season.

In: GINTHER, O. J. (Ed.): Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects, 2nd edition; 173-232

Equiservice, Cross Plains, Wisconsin

GINTHER O.J. (1992b):

Endocrinology of the ovulatory season.

In: GINTHER, O. J. (Ed.): Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects, 2nd. edition; 233-290

Equiservice, Cross Plains, Wisconsin

GOSLING R.G. und D.H. KING (1975):

Ultrasonic angiology.

In: A.W. MARCUS and L. ADAMSON (Eds.): Arteries and Veins; 61-98

Churchill Livingstone, Edinburgh

GOSWAMY R.K. und P.C. STEPTOE (1988):

Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles.

Hum. Reprod. ; **3**, 721-726

GREENHOF G.R. und R.F. KENNEY (1975):

Evaluation of reproductive status of nonpregnant mares.

J. Am. Vet. Med. Assoc. ; **15**, 449-458

GRIFFITH O. und D. STUEHR (1995):

Nitric Oxide Synthases: Properties and Catalytic Mechanism.

Annu. Rev. Physiol. ; **57**, 707-736

GRYGLEWSKI R.J., R.M.J. PALMER und S. MONCADA (1986):

Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor.

Nature ; **320**, 454-456

HEAP R.B., M. HAMON und W.R. ALLEN (1982):

Studies on estrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus.

J. Reprod. Fertil. Suppl. ; **32**, 343-352

HESLA J.S., S. PREUTTHIPAN, M.P. MAGUIRE, T.S.K. CHANG, E.E. WALLACH und A.M. DHARMARAJAN (1997):

Nitric oxide modulates human chorionic gonadotropin-induced ovulation in the rabbit.

Fertil. Steril. ; **67**, 548-552

HEYMANN M.A., B. BOOTSTAYLOR, C. ROMAN, E.S. NATUZZI, J.T. PARER, M.R. HARRISON und R.K. RIEMER (1994):

Glyceryl trinitrate stops labour in sheep.

In: MONCADA, S., M. FEELISCH, R. BUSSE und E. A. HIGGS (Hrsg.): Biology of Nitric Oxide, vol. 3; 201-203

Portland Press, London

HIBBS JR. J.B., R.R. TAINTOR, Z. VAVRIN und E.M. RACHLIN (1988):

Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.

Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **157**, 87-94

HINKLEY K.A., S. FEARN, B.R. WOWARD und I.W. HENDERSON (1996):

Nitric oxide donors as treatment for grass induced acute laminitis in ponies.

Equine Vet. J. ; **28**, 17-28

HINZ B., K. BRUNE und A. PAHL (2000):

Nitric oxide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA-expression in RAW 264,7 macrophages.

Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **271**, 353-357

- HOPPEN H.O. (1995):
Endocrine diagnostic techniques in equine reproduction.
Reprod. Dom. Anim. ; **30**, 149-152
- HUGHES J.P., G.H. STABENFELDT und J.W. EVANS (1972):
Clinical and endocrine aspects of estrous cycle of the mare.
Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Practice ; **18**, 119-151
- HUGHES J.P., G.H. STABENFELDT und P.C. KENNEDY (1980):
The estrous cycle and selected functional and pathological ovarian abnormalities in the mare.
Vet. Clin. North Am. ; **2**, 225-239
- JABLONKA-SHARIFF A. und L.M. OLSON (1997):
Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary.
Endocrinology ; **138**, 460-468
- JABLONKA-SHARIFF A., R. BASURAY und L.M. OLSON (1999):
Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats.
J. Soc. Gynecol. Investig. ; **6**, 95-101
- JAROSZEWSKI J.J. und W. HANSEL (2000):
Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. ; **224**, 50-55
- JENNINGS E.R.W., T.E. MCGILLIVRAY und M.R. HARRISON (1993):
Nitric oxide ablates preterm labor in the rhesus monkey.
J. Maternal Fetal Med. ; **2**, 170-175
- JULOU-SCHAEFFER G., G.A. GRAY, I. FLEMING, C. SCHOTT, J.R. PARRATT und J.C. STOCLET (1990):
Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway.
Am. J. Physiol. ; **259**, H 1038-1043
- KARLSON P. (1974):
Nucleinsäuren und Proteinbiosynthese.
In: KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 9. Auflage; 103-134
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- KÄHN W. und W. LEIDL (1987):
Echographische Befunde an Ovarien von Stuten.
Tierärztl. Umschau ; **42**, 257-266
- KEANEY J.F., D.J. SIMON und J.S. STAMLER (1993):
NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor like properties.
J. Clin. Invest. ; **91**, 1582-1589

KELLY R.A., J.-L. BALLIGAND und T.N. SMITH (1996):
Nitric oxide and cardiac function.
Circ. Res. ; **79**, 363-380

KHORRAM O., M. GARTHWAITE und R.R. MAGNESS (1999):
Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women.
J. Clin. Endocrinol. Metab. ; **84**, 2226-2232

KIRCHGESSNER M. (1975):
Die Nährstoffe und ihr Stoffwechsel.
In: Kirchgessner, M.: Tierernährung; 41-101
DLG-Verlag, Frankfurt (Main)

KLINGA K. (1987):
Hormone. Steroidhormone.
In: RUNNEBAUM, B. und T. RABE (Hrsg.):
Gynäkologische Endokrinologie; 10-18
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

KNUDSEN O. und W. VELLE (1961):
Ovarian oestrogen levels in the nonpregnant mare: relationship to histological appearance of the uterus and to clinical state.
J. Reprod. Fertil. ; **2**, 130-137

KOLBERG B. (2000):
Einfluß von Östrogenen und Gestagenen auf die uterine und ovarielle Durchblutung der Stute.
Vet. med. Diss., München

KÖNIG H.E. und R. RIES (1987):
Korrosionsanatomische Untersuchungen am Blutgefäßsystem des Eierstocks der Stute.
Tierärztl. Prax. ; **15**, 181-184

KRAUPP O., G. RABERGER und W. SCHÜTZ (1992):
Pharmakodynamische Beeinflussung von Rhythmik, Kontraktion und Durchblutung des Herzens.
Pharmakologie der Koronartherapeutika.
In: FORTH, W., D. HENTSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage; 394-402
Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

KRUMENACKER J.S., S.M. HYDER und F. MURAD (2001):
Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; **98** (2), 717-722

KUENZLI K.A., M.E. BRADLEY und I.L. BUXTON (1996):
Cyclic GMP-independent effects of nitric oxide on guinea-pig uterine contractility.
Br. J. Pharmacol. ; **119**, 737-743

KURJAK A., S. KUPESIK, H. SCHULMAN und I. ZALUD (1991):
Transvaginal color flow Doppler in assessment of ovarian and uterine blood flow in infertile women.
Fertil. Steril. ; **56**, 870-873

LIEBICH H.G. (1993):
Mikroskopische Anatomie: Weibliche Geschlechtsorgane.
In: LIEBICH, H. G. (Hrsg.): Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere, 2. Auflage; 255-273
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York

LÖFFLER G. (1997):
Replikation und Genetik.
In: LÖFFLER, G. und PETRIDES, P.E.: Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage; 205-238
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

MATSUMI H., T. YANO, T. KOJI, T. OGURA, O. TSUTSUMI, Y. TAKETANI und H. ESUMI (1998):
Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in the follicular development.
Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **243**, 67-72

MATTIOLI M., G. GALEATI und E. SEREN (1983):
Characteristics of receptors for prostaglandin F-2alpha in bovine and equine corpora lutea.
Prostaglandins Leukot. Med. ; **11**, 259-268

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

McCALL T.B., N.K. BOUGHTON-SMITH, R.M.J. PALMER, B.J.R. WHITTLE und S. MONCADA (1989):
Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion.
Biochem. J. ; **261**, 293-296

McDOWELL K.J., M.H. ADAMS, C.Y. ADAM und K.S. SIMPSON (1999):
Changes in equine oestrogen receptor alpha and progesteron receptor mRNAs during the oestrus cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids.
J. Reprod. Fertil. ; **117**, 135-142

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

MEYER H.H.D, M. ROHLEDER, W.J. STREICH, R. GÖLTENBOTH und A. OCHS (1997):
Sexualsteroidprofile und Ovaraktivitäten des Pandaweibchen YAN YAN im Berliner Zoo.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. ; **110** , 143-147

- MILLER M.J., J.H. THOMPSON, X. LIU, S. ELOBY-CHILDRESS, H. SADOWSKA-KROWICKA, X.J. ZHANG und D.A. CLARK (1996):
Failure of L-NAME to cause inhibition of nitric oxide synthesis: role of inducible nitric oxide synthase.
Inflamm. Res. ; **45**, 272-276
- MITSUBE K., M. MIKUNI, M. MATOUSEK und M. BRANNSTROM (1999):
Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on luteinizing hormone-induced ovulation in the ex-vivo perfused rat ovary.
Hum. Reprod. ; **14**, 2537-2543
- MOLINARI C., A. BATTAGLIA, E. GROSSINI, D.A. MARY, N. SURICO und G. VACCA (2001):
Effect of progesterone on peripheral blood flow in prepubertal female anesthetized pigs.
J. Vasc. Res. ; **38** (6), 569-577
- MOLLACE V., D. SALVEMINI, E. ANGGARD und J. VANE (1990):
Cultured astrocytoma cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **172**, 564-569
- MONCADA S., R.M.J. PALMER und E.A. HIGGS (1991):
Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.
Pharmacol. Rev. ; **43**, 109-142
- MORRIS S.M. (1992):
Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis.
Annu. Rev. Nutr. ; **12**, 81-101
- MORRIS S.M. und T.R. BILLIAR (1994):
New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis.
Am. J. Physiol. ; **266**, E 829-E 839
- MORRIS N.H., B.M. EATON und G. DEKKER (1996):
Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia.
Br. J. Obstet. Gynaecol. ; **103**, 4-15
- MOTTA A.B., A. ESTEVEZ und M.F. de GIMEN (1999):
The involvement of nitric oxide in corpus luteum regression in the rat: feedback mechanism between prostaglandin f (2alpha) and nitric oxide.
Mol. Hum. Reprod. ; **5**, 1011-1016
- MOTTA A.B., A. ESTEVEZ, T. TOGNETTI, M.A. GIMENO und A.M. FRANCHI (2001a):
Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum.
Mol. Hum. Reprod. ; **7**, 43-47
- MOTTA A.B., A. ESTEVEZ, A. FRANCHI, S. PEREZ-MARTINEZ, M. FARINA, M.L. RIBEIRO, A. LASSERRE und M.F. GIMENO (2001b):
Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF2alpha during luteal regression in rats.
Reproduction ; **121**, 631-637

MURAD F. (1994):

Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclicGMP signal transduction system.

Adv. Pharmacol. ; **26**, 19-33

MUTSCHLER E. (1991):

Herz-Kreislauf-System. Pharmaka bei ischämischen Herzerkrankungen.

In: MUTSCHLER, E. :Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage; 414-425

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

NAKATSUKA M., K. TADA, Y. KIMURA, K. ASAGARI, Y. KAMADA, M. TAKATA, T. NAKATA, N. INOUE und T. KUDO (1999):

Clinical experience of long-term transdermal treatment with nitric oxide donor for women with preeclampsia.

Gynecol. Obstet. Invest. ; **47**, 13-19

NUSSLER A.K. und T.R. BILLIAR (1993):

Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase.

J.Leukocyte Biol. ; **54**, 171-178

OCHOA J.B., A.O. UDEKWU, T.R. BILLIAR, R.D. CURRAN, F.B. CERRA und R.L. SIMMONS (1991):

Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis.

Ann. Surg. ; **214**, 621-6

PALMER E. und M. TERQUI (1977):

The measurement of total plasma estrogens during the follicular phase of the mares estrous cycle.

Theriogenology ; **7**, 331-338

PALMER R.M.J., A.G. FERRIGE und S. MONCADA (1987):

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxation factor.

Nature ; **327**, 524-526

PALMER R., D. ASHTON und S. MONCADA (1988):

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.

Nature ; **333**, 664-666

PIERSON R.A. und O.J. GINTHER (1985):

Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare.

Theriogenology ; **24**, 359-368

PINEDA M.H. (1989):

Female reproductive system.

In: L. E. McDONALD (Ed.): Veterinary Endocrinology and Reproduction; 303-354

Lea and Febiger, Philadelphia

PINTO C.R.F., D.L. PACCAMONTI, B.E. EILTS, C.R. SHORT und R.A. GODKE (2000):
Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) delays ovulation in hCG-stimulated mares.
Proceedings of the equine symposium and annual conference, San Antonio, Texas, USA

POURCELOT L. (1974):

Applications cliniques de l'examen Doppler transcutane.

In: P. PERONNEAU (Hrsg.): Velocimetric ultrasonore Doppler; 213-240
Inserm 34, Paris

RADOMSKI M.W., R.M.J. PALMER und S. MONCADA (1990):

An L-arginine-nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; **87**, 5193-5197

RAGGLE C.A. (1999):

Nitroglycerine treatment of equine laminitis.

Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. ; **21**, 170-174

RAMSAY B., A. DE BELDER, S. CAMPBELL, S. MONCADA und J.F. MARTINS (1994):

A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy
and in woman at high risk of preeclampsia.

Eur. J. Clin. Invest. ; **24**, 76-78

REES D.D., S. CELLEK, R.M.J. PALMER und S. MONCADA (1990):

Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the
associated effect on vascular tone. An insight into endotoxin shock.

Biochem. Res. Commun. ; **173**, 541-547

RIEMER R.K., C. BUSCHER und R.K. BANSAL (1997):

Increased expression of nitric oxide synthase in the myometrium of pregnant rat uterus.

Am. J. Physiol. ; **272**, E 1008-E 1015

ROCKETT K.A., M.M. AWBURN, E.J. ROCKETT, W.B. COWDEN und I.A. CLARK
(1994):

Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression.

Parasite immunol. ; **16**, 243-249

ROGERS N.E. und L.J. IGNARRO (1992):

Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide
formed from L-arginine.

Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **189**, 242-249

ROSENFELD C.R., B.E. COX, T. ROY und R.R. MAGNESS (1996):

Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine circulation.

J. Clin. Invest. ; **98**, 2158-2166

ROSSELLI M., B. IMTHURN und E. MACAS (1994):

Circulating nitrite/nitrate increase with follicular development: indirect evidence for estradiol
mediated release.

Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **202**, 1543-1552

- ROSSELLI M., P.J. KELLER und R.K. DUBEY (1998):
Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction.
Hum. Reprod. ; **4**, 3-24
- RUPNOW H.L., T.M. PHERNETTON, C.E. SHAW, M.L. MODRICK, I.M. BIRD und
R.R. MAGNESS (2001):
Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. Estrogen and
progesterone effects on eNOS.
Am. J. Physiol. Circ. Physiol. ; **280** (4), H 1699-H 1705
- SAXENA D., S.B. PUROHIT, G.P. KUMER und M. LALORAYA (2000):
Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at
implantation.
Nitric Oxide ; **4** (4), 384-391
- SCHMIDT H.H.W., T.D. WARNER, M. NAKANE, U. FÖRSTERMANN und F. MURAD
(1992):
Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7.
Molecular Pharmacol. ; **41**, 615-624
- SCHNORR B. (1989):
Primitiventwicklung.
In: SCHNORR, B.: Embryologie der Haustiere, 2. Auflage; 36-40
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- SCHULZ R., E. NAVA und S. MONCADA (1992):
Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺ independent nitric oxide synthase in
the myocardium.
Br. J. Pharmacol. ; **105**, 575-580
- SHARP D.C., M.-J. THATCHER, M.E. SALUTE und A.-R. FUCHS (1997):
Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F-
2alpha release during oestrus cycle and early pregnancy in pony mares.
J. Reprod. Fertil. ; **109**, 137-144
- SHUKOVSKI L. und A. TSAFIRI (1994):
The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat.
Endocrinology ; **135**, 2287-2290
- SNYDER S.H. (1995):
Nitric oxide. No endothelial NO.
Nature ; **377**, 196-197
- SPONER G. (1996):
Pharmakologie des Herz-/Kreislaufsystems.
In: FREY, H.-H. und W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
für die Veterinärmedizin; 213-235
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

STABENFELDT G.H., H. KINDAHL, J.P. HUGHES, D.P. NEELY, I. LIU und D. PASCOE (1981):

Control of luteolysis in the mare.
Acta Vet. Scand., Suppl. ; **77**, 159-170

STADApHarm (2001):

Fachinformation zu ISDN STADA 40mg Tabletten.

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

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

Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; **89**, 444-448

STARBUCK G.R., T.A.E. STOUT, G.E. LAMMING, W.R. ALLEN und A.P.F. FLINT (1998):

Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrus cycle and early pregnancy.

J. Reprod. Fertil. ; **113**, 173-179

STEFFEN S.B. (2000):

Medikamentelle Beeinflussung der uterinen und ovariellen Durchblutung im Zyklus und in der Frühgravidität der Stute.

Vet. med. Diss., München

STOLLA R. and H. BOLLWEIN (1997):

Color Doppler sonography of the uterine artery in subfertile mares.

Pferdeheilkunde 13, 547

STOLLA R., A.-R. GÜNZEL und H. BADER (1980):

Control of ovarian activity by milk progesterone determination in mares.

9th International Congress on Animal Reproduction and A. I.,

Madrid/Spain, Vol.IV, 206-209

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

Fetal blood flow velocity waveforms in normal pregnancy.

Br. J. Obstet. Gynaecol. ; **87**, 780-785

TEKAY A., H. MARTKAINEN und P. JOUPPILA (1996):

Comparison of uterine blood flow characteristics between spontaneous and stimulated cycles before embryo transfer.

Hum. Reprod. ; **11**, 364-368

TELFER J.F., F. LYALL, J.E. NORMAN und I.T. CAMERON (1995):

Identification of nitric oxide synthase in human uterus.

Hum. Reprod. ; **10**, 19-23

TERQUI M. und E. PALMER (1979):

Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare.

J. Reprod. Fertil., Suppl. ; **27**, 441-446

- TETZKE T.A., S. ISMAIL, G. MIKUCKIS und J.W. EVANS (1987):
Patterns of oxytocin secretion during the estrous cycle of the mare.
J. Reprod. Fertil., Suppl. ; **35**, 245-252
- THALER I., A. AMIT, P. JAKOBI und J. ITSKOVITZ-ELDOR (1996):
The effect of isosorbiddinitrate on uterine artery and umbilical artery flow velocity waveforms at mid-pregnancy.
Obstet. Gynecol. ; **88**, 838-843
- THALER I., A. AMIT, D. KAMIL und J. ITSKOVITZ-ELDOR (1999):
The effect of isosorbiddinitrate on placental blood flow and maternal blood pressure in woman with pregnancy-induced hypertension.
Am. J. Hypertension ; **12**, 341-347
- TINKANEN H., E. KUJANSUU und P. LAIPPALA (1995):
The association between hormone levels and vascular resistance in uterine and ovarian arteries in spontaneous menstrual cycles – a Doppler ultrasound study.
Acta Obstet. Gynecol. Scand.; **74**, 297-301
- TOMANELLI R.N., P.L. SERTICH und E.D. WATSON (1991):
Soluble oestrogen and progesterone receptors in the endometrium of the mare.
J. Reprod. Fert., Suppl. ; **44**, 267-273
- TOWNSON D.H., R.A. PIERSON und O.J. GINTHER (1989):
Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares.
Theriogenology ; **32**, 197-204
- VAN BUREN G.A., D. YANG und K.E. CLARK (1992):
Estrogen-induced uterine vasodilation is antagonized by L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis.
Am. J. Obstet. Gynecol. ; **167**, 828-833
- VAN VOORHIS B.J., K. MOORE, P.J. STRIJBOS, S. NELSON, S.A. BAYLIS, D. GRZYBICKI und C.P. WEINER (1995):
Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropine stimulation in vivo.
J. Clin. Invest. ; **96**, 2719-26
- VAZIRI N.D. und X.Q. WANG (1999):
cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide.
Hypertension ; **34**, 1237-41
- VERNON M.W., S. STRAUSS, M. SIMONELLI, M.T. ZAVY und D.C. SHARP (1979):
Specific PGF₂α binding by the corpus luteum of the pregnant and nonpregnant mare.
J. Reprod. Fertil. Suppl. ; **27**, 421-429

- WEBER J.A., G.L. WOODS und J.J. AGUILAR (1996):
Location of equine oviductal embryos on day 5 post ovulation and oviductal transport time of day 5 embryos autotransferred to the contralateral oviduct.
Theriogenology ; **46**, 1477-1483
- WEBER F., H. BOLLWEIN und R. STOLLA (2000):
Progesterone and luteal blood flow during estrous cycle and pregnancy in mares.
Reprod. Dom. Anim. ; **35**, 45
- WHEELER M.A., S.D. SMITH, G. GARCIA-GARDENA, C. NATHAN, R.M. WEISS und W.C. SESSA (1997):
Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils.
J. Clin. Invest. ; **99**, 110-6
- WILKENS H. und W. MÜNSTER (1984):
Arterien, Arteriae. Venen, Venae.
In: HABERMEHL, K.-H., B. VOLLMERHAUS und H. WILKENS (Hrsg.): NICKEL, R., A. SCHUMMER und E. SEIFERLE: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III: Kreislaufsystem, Haut- und Hautorgane*, 2. Auflage, 76-276.
Parey Verlag, Berlin-Hamburg
- WILL K. (1988):
Ultraschalluntersuchungen zur Ovulationsdiagnose für die künstliche Besamung der Stute.
Vet. Med. Diss., München
- YALLAMPALLI C., H. IZUMI, M. BYAM-SMITH und R.E. GARFIELD (1993):
An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol. ; **170**, 175-185
- YAMAUCHI J., T. MIYAZAKI, S. IWASAKI, I. KISHI, M. KUROSHIMA, C. TEI und Y. YOSHIMURA (1997):
Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit.
Endocrinology ; **138**, 3630-3637
- YOSHIKI N., T. KUBOTA und T. ASO (2000):
Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and early pregnant endometrium.
Mol. Hum. Reprod. ; **6**, 283-7
- ZACKRISSON U., M. MIKUNI, A. WALLIN, D. DELBRO, L. HEDIN und M. BRÄNSTRÖM (1996):
Cell-specific localization of nitric oxide synthases in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation.
Hum. Reprod. ; **11**, 2667-2673
- ZAVY M.T., M.W. VERNON, D.C. SHARP und F.W. BAZER (1984):
Endocrine aspects of early pregnancy in pony mares: a comparison of uterine luminal and peripheral plasma levels of steroids during estrous cycle and early pregnancy.
Endocrinology ; **115** (1), 214-219

ZHANG R.-S., P.H. GUTH, O.U. SCREMIN, R. SINGH, S. PERVIN und G. CHAUDHURI (1997):

Regulation of endometrial blood flow in ovariectomized rats: assessment of the role of nitric oxide.

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. ; **273**, H 2009-2017

9 ANHANG

Tab. 9.1: Gesamtöstrogen- und Progesteronkonzentrationen in pmol/ml an den verschiedenen Untersuchungstagen im Kontrollzyklus (Mittelwerte von 5 Stuten):

	Zyklustag								
	0	1	5	11	15	-4	-3	-2	-1
Gesamtöstrogen	2,9	3,0	2,0	1,8	1,9	3,8	3,2	3,8	3,4
Progesteron	2,4	5,9	48,4	40,5	20,5	1,6	2,2	2,7	2,3

Tab. 9.2: Konzentrationen der eNOS-mRNA (ag/ng) von 5 Stuten (A - E) an den verschiedenen Untersuchungstagen während des Kontrollzyklus; Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$):

Stute	Zyklustag					
	0	1	5	11	15	Östrus
A	2,6	1,6	4,2	2,7	3,0	8,3
B	2,0	1,9	11,4	3,2	4,7	12,5
C	0,9	1,4	3,7	1,5	2,5	3,4
D	0,9	0,7	3,1	4,6	1,5	1,3
E	9,4	2,4	6,8	3,3	2,3	4,8
Mw	3,2 ± 1,6	1,6 ± 0,3	5,8 ± 1,5	3,1 ± 0,5	2,8 ± 0,5	6,1 ± 2,0

Tab. 9.3: Konzentrationen der iNOS-mRNA (ag/ng) von 5 Stuten (A – E) an den verschiedenen Untersuchungstagen während des Kontrollzyklus; Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$):

Stute	Zyklustag					
	0	1	5	11	15	Östrus
A	2,6	1,4	1,4	0,9	1,6	9,2
B	0,9	2,1	7,1	2,0	7,8	8,6
C	3,5	1,1	1,9	1,7	0,3	6,0
D	1,7	4,0	1,9	2,5	4,3	2,2
E	7,8	2,9	4,6	1,8	1,8	2,0
Mw	3,3 ± 1,2	2,3 ± 0,5	3,4 ± 1,0	1,8 ± 0,3	3,2 ± 1,3	5,6 ± 1,5

Tab. 9.4: Konzentrationen des ER α -mRNA (fg/ng) von 5 Stuten (A – E) an den verschiedenen Untersuchungstagen während des Kontrollzyklus; Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$):

Stute	Zyklustag					
	0	1	5	11	15	Östrus
A	2,24	2,48	1,25	0,65	4,67	5,13
B	2,02	1,83	1,32	1,94	4,43	3,18
C	1,69	0,79	0,97	3,16	2,06	5,99
D	1,99	2,37	1,89	2,90	7,34	3,91
E	4,36	2,58	5,63	2,92	5,49	4,66
Mw	2,5 \pm 0,5	2,0 \pm 0,3	2,2 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5	5,5 \pm 0,5	4,6 \pm 0,5

Tab. 9.5: Konzentrationen des ER β -mRNA (ag/ng) von 5 Stuten (A – E) an den verschiedenen Untersuchungstagen während des Kontrollzyklus; Östrus = Tag 2 oder 3 der Rosse; Mittelwerte (Mw) und Standardfehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$):

Stute	Zyklustag					
	0	1	5	11	15	Östrus
A	2,85	1,89	1,19	0,93	3,96	9,88
B	2,18	1,97	1,32	3,72	4,01	3,12
C	2,51	0,82	0,67	1,54	0,67	4,02
D	2,23	2,27	1,28	8,29	7,05	5,06
E	8,03	2,55	6,42	2,11	2,95	7,75
Mw	3,6 \pm 1,2	1,9 \pm 0,3	2,2 \pm 1,1	3,3 \pm 1,3	3,7 \pm 1,0	6,0 \pm 1,3

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 einer Anstellung als technische Assistentin während der Anfertigung der Dissertation und seine Bereitschaft, mich noch vor Fertigstellung dieser Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin zu übernehmen, bedanken.

Ein großer Dank geht natürlich auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft für das Vertrauen und die finanzielle Unterstützung dieses Projekts.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Bollwein für sein Engagement und seinen unermüdlichen persönlichen Einsatz, durch den er einen wesentlichen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich auch bei Herrn Dr. F. Weber und Frau H. Mayrhofer für die gute Anleitung und tatkräftige Mithilfe bei der Durchführung der hormonanalytischen Untersuchungen.

Vielen Dank an das Institut für Physiologie der TU München-Weihenstephan, insbesondere an Herrn Dr. R. Einspanier und Herrn H. Welter für die gute Zusammenarbeit und die mRNA-Analyse der Biopsieproben im Rahmen dieses Projekts.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr. K. Osterkorn und Herrn Dr. M. Wiseman für die Beratung zur statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Für die gute Zusammenarbeit, die Aufmunterungen und die schöne Zeit während der Anfertigung meiner Dissertation bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Tierpflegern vom OWF, ganz besonders aber bei Jenny für Korrektur und Mithilfe beim „Summary“ und bei Heidi für ihre Freundschaft und die seelische Unterstützung in „harten Zeiten“.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen lieben Kollegen Peter und Vangelis ganz herzlich für ihr Verständnis und die bereitwillige Überlassung des Computers in den letzten Monaten bedanken.

Meinen Eltern danke ich natürlich ganz besonders für ihren liebevollen Zuspruch, ihre Geduld, ihr Verständnis und natürlich die finanzielle Unterstützung in den ganzen Jahren.

Name: Simone Kathrin Rohr
Geburtsdatum: 13.07.1972
Geburtsort: Göppingen
Eltern: Kurt Rohr, Verkaufsleiter
Ilse Rohr, geb. Schwarz, Angestellte
Schwester: Stefanie Rohr, Repro-Herstellerin

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1979 - 1983 Grundschule Bezgenriet
1983 - 1992 Mörike-Gymnasium Göppingen
21. Mai 1992 Abitur
1992 - 1993 Ausbildung zur Reiseverkehrskauffrau
1993 - 1999 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
 Universität München
9. Sept. 1999 Staatsexamen
ab Nov. 1999 Anfertigung der Dissertation an der Gynäkologischen
 und Ambulatorischen Tierklinik der LMU München
10. Feb. 2000 Approbation
Nov. 2000 - Okt. 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der LMU-München im
 Rahmen des DFG-Projektes
Nov. 2001 - Feb. 2002 Teilzeitbeschäftigung als TA an der Gynäkologischen und
 Ambulatorischen TK, LMU München
seit Mai 2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Gynäkologischen und
 Ambulatorischen Tierklinik der LMU-München