

Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
der Justus-Liebig Universität Gießen
und dem
Institut für Anatomie und Histologie
der veterinärmedizinischen Universität Wien

EINFLUSS VON PROGESTERON, HYALURONSÄURE UND
WACHSTUMSHORMON AUF DEN ZILIÄREN TRANSPORT UND DIE
SEKRETION IM BOVINEN EILEITER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. agr.

beim Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und
Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Beatrice Borkenhagen

Gießen, im März 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Hoy
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
Fachgebiet Tierhaltung und Haltungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Bismarckstr. 16
35390 Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. S. Kölle
Institut für Anatomie und Histologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	X
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Funktionelle Anatomie des Eileiters	2
2.2 Ziliärer Transport im Eileiter	5
2.3 Sekretion im Eileiter	8
2.4 Einfluss von Wachstumshormon (GH), Progesteron (P) und Hyaluronsäure (HA) im Eileiter	11
3 Eigene Untersuchungen – Material	26
3.1 Untersuchte Tiere	26
3.2 Lösungen, Medien, Puffer	26
3.3 Pharmaka	29
4 Eigene Untersuchungen – Methode	30
4.1 Probengewinnung	30
4.2 Zyklusbestimmung	30
4.3 Präparation	33
4.4 Fixierung und Anfertigung von Paraffinschnitten	33
4.5 Morphologische Charakterisierung des Eileiters	34
4.6 Histochemische Untersuchung des Eileiters	35
4.6.1 Perjodsäure Schiffs Reaktion (PAS)	35
4.6.2 Alcianblau Färbung	37
4.7 Immunhistologische Untersuchungen des Eileiters und Uterus	38
4.8 Mikroskopische Auswertung	39
4.9 Digitale Videomikroskopie	39
4.9.1 Probenaufbereitung	39
4.9.2 Messstand	39
4.9.3 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)	41

4.9.4 Messung der Zilienschlagfrequenz (ZSF)	45
4.9.5 Digitale Auswertung	48
4.10 Statistische Auswertung	52
5 Ergebnisse	53
5.1 Morphologische Veränderungen während der frühen Trächtigkeit im bovinen Eileiter und Uterus	53
5.2 Sekretion im bovinen Eileiter	58
5.2.1 Physiologische Veränderungen der Sekretion in Abhängigkeit vom Zyklusstand	58
5.2.2 Physiologische Veränderungen der Sekretion während der frühen Trächtigkeit	61
5.2.3 Einfluss von Progesteron (P)	64
5.2.4 Einfluss von Hyaluronsäure (HA)	67
5.2.5 Einfluss des Wachstumshormons (GH)	70
5.3 Rolle des Progesteronrezeptors (PR) in der frühen Trächtigkeit im bovinen Eileiter und Uterus	73
5.4 Partikeltransportgeschwindigkeit im bovinen Eileiter	78
5.4.1 Basale Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)	78
5.4.2 Einfluss von Progesteron (P)	79
5.4.3 Einfluss von Hyaluronsäure (HA)	79
5.4.4 Einfluss des Wachstumshormons (GH)	80
5.5 Zilienschlagfrequenz (ZSF) im bovinen Eileiter	81
5.5.1 Basale Zilienschlagfrequenz (ZSF)	81
5.5.2 Einfluss von Progesteron (P)	82
5.5.3 Einfluss von Hyaluronsäure (HA)	83
5.5.4 Einfluss des Wachstumshormons (GH)	84
6 Diskussion	85
7 Zusammenfassung	100
8 Summary	102
9 Quellenverzeichnis	104
10 Erklärung	140
11 Danksagung	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
AOI	Area of interest
ATP	Adenosintri-phosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOECs	Bovine oviductal epithel cells
°C	Grad Celsius
Ca ₂₊	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CL	Corpus luteum
cm	Zentimeter
COC	Cumulus oocyte complex
d	Distanz
Da	Dalton
DÖ	Diöstrus
EZM	Extrazelluläre Matrix
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm
GH	Growth Hormone
GH-R	Growth Hormone Rezeptor
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes-Protein
GPcR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HE	Hämatoxylin Eosin
H ₂ O	Wasser
HVL	Hypophysenvorderlappen
Hz	Hertz

IGF I+II	Insulin growth factor I+II
IHC	indirekte Immunhistochemie
IU	International Unit
IVF	In vitro Fertilisation
k	Kilo
K ⁺	Kalium
KO	Knock-out
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MÖ	Metöstrus
mPR	Membranständiger Progesteronrezeptor
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
Ö	Östrus
OSGP	Oviduct specific glycoprotein
OT	Objektträger
OVGP	Oviductal glycoprotein
P	Progesteron
PAS	Periodic Acid Schiff- Reaktion
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
p.f.	Post Fertilisation
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PÖ	Proöstrus
p.m.	post mortem

PR	Progesteronrezeptor
PTG	Partikeltransportgeschwindigkeit
PTS	particle transport speed
RHAMM	Rezeptor of hyaluronan mediated motility
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard error of the mean
t	Zeit
Tab	Tabelle
ü. N.	Über Nacht
v	Geschwindigkeit
ZSF	Zilienschlagfrequenz

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zilie (Lindemann et al., 2007)	6
Abbildung 2: Freipräparierter Uterus mit Eileiter und Ovarien	31
Abbildung 3: Digitales videomikroskopisches Analysesystem	40
Abbildung 4: Einfluss von Ethanol auf die PTG relativ zum Basalwert	43
Abbildung 5: Zeitlicher Versuchsablauf der PTG-Messungen	44
Abbildung 6: Einfluss der Zeit auf die ZSF in der Ampulla	46
Abbildung 7: Zelluläre Funktionalität in der Ampulla	46
Abbildung 8: Zeitlicher Versuchsablauf der ZSF-Messungen	48
Abbildung 9: Videomikroskopische Darstellung des Eileitersegments sowie Auswertungsschritte mittels der Software „Image-Pro Plus“	49
Abbildung 10: Mittels der Software Image-Pro Plus gemessene Hauptparameter zur Berechnung der PTG	49
Abbildung 11: Aufnahmesequenz der Ampulla unter 40-facher Vergrößerung mit eingekreisten zilientragenden Zellen (AOI = Area of interest) zur Bestimmung der ZSF	50
Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der Bildverarbeitung zur Analyse der ZSF mittels der „AutoSignal“-Software	51
Abbildung 13: Zellhöhe der zilientragenden Zellen in der Ampulla	53
Abbildung 14: Morphologische Charakterisierung der Ampulla mittels HE- Färbung im Vergleich unbefruchteter (MÖ) und trächtiger Rinder	54
Abbildung 15: Zellhöhe der zilientragenden Zellen im Isthmus	55
Abbildung 16: Morphologische Charakterisierung des Isthmus mittels HE-Färbung im Vergleich unbefruchteter (MÖ) und trächtiger Rinder	56
Abbildung 17: Zellhöhe des luminalen Uterusepithels und der uterinen Drüsen im Vergleich trächtiger (3,5-4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder	57
Abbildung 18: Morphologische Charakterisierung des Uterus mittels HE-Färbung im Vergleich trächtiger (3,5-4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder	58

Abbildung 19: Höhe der zilientragenden Zellen im Verlauf des Zyklus in der Ampulla	59
Abbildung 20: Nachweis von Glykoproteinen, Glykogen und sauren Mukopolysacchariden im Ampullaepithel zyklischer Rinder	60
Abbildung 21: Ampulla: Nachweis von Glykoproteinen und Glykogen im Vergleich zyklischer (MÖ) und trächtiger (3,5-4,5 Tage) Rinder	61
Abbildung 22: Isthmus: Nachweis von Glykoproteinen im Vergleich zyklischer (MÖ) und trächtiger (3,5-4,5 d) Rinder	62
Abbildung 23: Uterus: Nachweis von Glykoproteinen im Vergleich zyklischer (MÖ) und trächtiger (3,5-4,5 Tage) Rinder	63
Abbildung 24: Anteil Alcianblau-positiver sekretorischer Zellen vor und nach P Inkubation	64
Abbildung 25: Nachweis saurer Mukopolysaccharide in der Ampulla vor und nach einer P-Behandlung	65
Abbildung 26: Nachweis von Glykoproteinen in der Ampulla vor und nach einer P-Behandlung	66
Abbildung 27: Anteil Alcianblau-positiver sekretorischer Zellen in der Ampulla vor und nach einer HA Behandlung	67
Abbildung 28: Nachweis saurer Mucopolysaccharide in der Ampulla vor und nach einer HA-Behandlung	68
Abbildung 29: Nachweis von Glykoproteinen in der Ampulla vor und nach einer HA-Behandlung	69
Abbildung 30: Nachweis saurer Mukopolysaccharide in der Ampulla vor und nach GH-Behandlung	71
Abbildung 31: Nachweis von Glykoproteinen in der Ampulla vor und nach GH – Behandlung	72
Abbildung 32: Ampulla: Nachweis der PR Expression trächtiger und zyklischer (MÖ) Rinder mittels Immunhistochemie	73
Abbildung 33: Relative Anzahl PR-positiver Zellkerne in der ipsi- und kontralateralen Ampulla trächtiger Rinder (3,5-4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder	74

Abbildung 34: Isthmus: Nachweis der Progesteronrezeptorexpression im Vergleich trächtiger (3,5-4,5 Tage) und zyklischer (MÖ) Rinder mittels Immunhistochemie	75
Abbildung 35: Uterus: Nachweis der Progesteronrezeptorexpression trächtiger und zyklischer (MÖ) Rinder mittels Immunhistochemie	76
Abbildung 36: Relative Anzahl PR-positiver Zellkerne im der ipsi- und kontralateralen luminalen Uterusepithel trächtiger (3,5-4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder	77
Abbildung 37: Durchschnittliche basale Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in Ampulla und Isthmus	78
Abbildung 38: Einfluss von Progesteron auf die PTG in Ampulla und Isthmus	79
Abbildung 39: Einfluss von Hyaluronsäure auf die PTG	80
Abbildung 40: Einfluss vom Wachstumshormon auf die PTG	80
Abbildung 41: Einfluss von Progesteron auf die ZSF	82
Abbildung 42: Einfluss von HA ohne und mit enzymatischem Verdau der endogenen HA auf die ZSF	83
Abbildung 43: ZSF vor und nach GH-Zgabe	84

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Reagenzien mit zugehöriger Quelle und Mengenangabe zur Herstellung von HEPES-Ringer	27
Tabelle 2 : Reagenzien mit der zugehörigen Quelle und Mengenangabe zur Herstellung von PBS	28
Tabelle 3: Auflistung der eingesetzten Pharmaka mit Quellenangabe.	29
Tabelle 4: Makroskopische Merkmale an Ovar, Uterus und Zervix zur Zyklusbestimmung	32
Tabelle 5: Hämatoxylin-Eosin Färbeprotokoll	34
Tabelle 6: Perjodsäure-Schiffs Färbeprotokoll	36
Tabelle 7: Alcianblau Färbeprotokoll	37
Tabelle 8: Verwendete Pharmaka mit jeweiliger Quelle und der eingesetzten Konzentrationen zu Messung der PTG	44
Tabelle 9: Verwendete Pharmaka mit jeweiliger Quelle und der eingesetzten Konzentrationen zur Messung der ZSF	47

1 Einleitung

Für eine erfolgreiche Etablierung der Trächtigkeit sind sowohl ein zeitgerechter Transport als auch eine nutritive Versorgung der Gameten und des frühen Embryos essentiell. Grundlage hierfür bildet die erste embryo-maternale Kommunikation (EMK), bei der ein Signalaustausch für die maternale Erkennung des Embryos sorgt. Die involvierten Faktoren und Signaltransduktionswege sind jedoch bislang ungeklärt. Bekannt ist, dass Progesteron (P) im Ovidukt zu einem Verlust der sekretorischen Aktivität sowie zu einem Abfall der Zilienschlagfrequenz (ZSF) unter in vitro Bedingungen führt. Die stimulierende Wirkung von Hyaluronsäure (HA) auf die ZSF in der Trachea deutet darauf hin, dass HA – ein wichtiger Bestandteil der Eileiterflüssigkeit und der Kumulusmatrix – ähnliche Effekte im Eileiter erzielen könnte. Die Expression des Wachstumshormonrezeptors (GH-R) in den zilientragenden Zellen der Ampulla um den Zeitpunkt der Ovulation deutet auf eine Beteiligung des Wachstumshormons (GH) am Gametentransport hin. Daher war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von P, HA und GH sowohl auf die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) und die Zilienschlagfrequenz (ZSF) als auch auf die Synthese und Sekretion von Glykoproteinen und sauren Mukopolysacchariden an ex vivo Organkulturen des Eileiters mit Hilfe eines digitalen Videomikroskops und histochemischer Analysen zu untersuchen. Unter Verwendung immunhistologischer Untersuchungen wurde zudem der Einfluss des frühen Embryos (3,5-4,5 Tage) auf die P-Rezeptor Expression im bovinen Ovidukt und Uterus charakterisiert. Die Ergebnisse der HA-, P- und GH-vermittelten Effekte sollen zu einem besseren Verständnis der Mechanismen, die an der Gametenmaturation und Embryoentwicklung sowie dem ziliären Transport im Eileiter beteiligt sind, beitragen und so ermöglichen, die Techniken der assistierten Reproduktion weiter zu optimieren.

2 Literatur

2.1 Funktionelle Anatomie des Eileiters

Der Eileiter bildet als paariges, schlauchförmiges Organ eine Verbindung zwischen Ovarien und Uterus. Kranial öffnet sich der Eileiter trichterartig in Form des Ostium abdominale in die Bauchhöhle. Kaudal verjüngt sich das Ovidukt zunehmend und mündet schließlich in das jeweilige Uterushorn. Die Aufgaben des Eileiters umfassen sowohl den Transport der Gameten bzw. des frühen Embryos als auch die Optimierung ihrer Entwicklung. Hierbei handelt es sich um die Enddifferenzierung der Eizelle (Beendigung der zweiten meiotischen Teilung bei der Befruchtung), die Endreifung der Spermien (Kapazitation) sowie die Befruchtung und die Entwicklung von der Zygote bis zur Morula. Somit obliegt dem Eileiter eine zentrale Bedeutung im Rahmen einer erfolgreichen Etablierung der Trächtigkeit (Liebich, 1998).

Makroskopisch lässt sich der Eileiter in vier funktionelle Abschnitte unterteilen. Von Ovar in Richtung Uterus wird eine Gliederung in Infundibulum, Ampulla, Isthmus und utero-tubaren Übergang vorgenommen. Das Infundibulum beginnt unmittelbar am Ovar, mit dem es allerdings keine kontinuierliche Verbindung eingeht. Fimbrien, die an der abdominalen Öffnung bestehen, sind zum Teil mit dem Ovar verwachsen (Fimbriae ovaricae) und bilden die Aufhängung des Eileitertrichters. Dies gewährleistet über den sogenannten Oozyten Pickup den Transport der ovulierten Eizelle in das Ovidukt. Die überwiegend zilienträgenden Zellen induzieren einen Flüssigkeitsstrom kaudaler Richtung. In Folge einer Ovulation wird die Eizelle mit dem sie umgebenden Kumulus zunächst von dem Eileitertrichter aufgefangen. Hier lagert sich der expandierte COC (Cumulus-Oocyte-Complex) an die Spitzen der Zilien an. Die adhäsive Interaktion zwischen dem COC und den Zilien, gekoppelt mit dem Schlag der Zilien, veranlasst ein Gleiten der Eizelle über die Oberfläche des Infundibulums, so dass sie zur Öffnung der Ampulla gezogen wird. Um diese Engstelle passieren zu können, muss der COC seinen Durchmesser verringern, indem er kompakter wird. Zunächst passiert nur ein Teil der Kumuluszellen und der extrazellulären Matrix die Öffnung. Der durch den Zilienschlag erzeugte Strom zieht an dem bereits passierten Teil des COCs, sodass die Oocyte einer sich windenden Aktivität unterworfen wird. Auf diese Weise nimmt der COC eine sphärische und ausreichend kompakte Form an, um den Eingang zur Ampulla zu bewältigen. In

Folge dieser Belastung wird die Eizelle meist exzentrisch im Kumulus lokalisiert (Corselli und Talbot, 1998). Die Ampulla stellt den folgenden Abschnitt des Eileiters dar und beginnt kaudal des Ostiums. Ein relativ weites Lumen bedient in diesem Abschnitt die Anforderungen, die für eine erfolgreiche Fertilisation erforderlich sind. Nach der Befruchtung wandert der frühe Embryo durch den sehr viel schmaleren Isthmus zum utero-tubaren Übergang. In diesem Bereich befindet sich das Spermienreservoir, in dem die Spermatozoen an das Epithel binden. Sobald die Ovulation erfolgt, lösen sich die Spermien durch ihre hyperaktive Geißelbewegung wieder vom Epithel und schwimmen gegen den Flüssigkeitsstrom zielstrebig Richtung Eizelle in die Ampulla. Die funktionellen Ansprüche des Reproduktionsgeschehens werden vor allem durch den speziellen Aufbau der Eileiterwand ermöglicht. Grundsätzlich besitzen die Eileiterabschnitte die gleiche Wandauskleidung. Lediglich die Ausprägung variiert, um den Aufgaben der verschiedenen Segmente gerecht zu werden. An die innen gelegene Tunica mucosa schließt sich die Tunica muscularis an. Darüber befindet sich die Tela subserosa, in der vor allem größere Gefäße geführt werden. Durch eine subperitoneale Muskulatur ermöglicht die Tela subserosa dem Eileiter Lageveränderungen, die z.B. bei der Ovulation eine Rolle spielen. Die äußerste Schicht bildet das einschichtige Plattenepithel der Tunica serosa. Die Tunica muscularis ist für die kontraktile Beweglichkeit des Eileiters verantwortlich. Strukturell wird sie durch eine mittlere, gefäßreiche Schicht geteilt. Der sich an der Tunica mucosa anschließende Teil der Muskelschicht besteht überwiegend aus ringförmig verlaufenden Bündeln der glatten Muskulatur. Schräg und längs verlaufende Fasern der glatten Muskulatur bilden den distalen Bereich. Die Ausprägung der Tunica muscularis steigt in kaudaler Richtung an. So ist im Infundibulum und der Ampulla die Muskulatur nur schwach ausgebildet, während sie im Isthmus deutlich zunimmt und im utero-tubarem Übergang schließlich ihr Maximum erreicht (Liebich, 1998).

Die Tunica mucosa setzt sich aus der Lamina propria mucosa und der Lamina epithelialis mucosa zusammen und verfügt über eine charakteristische Faltenstruktur. Die Lamina propria bildet die bindegewebige Basis der Falten. In ihr verlaufen zahlreiche Gefäße, die die Zellen bis in die Spitzen der Falten versorgen. Über die Lamina epithelialis wird der Kontakt zum Inneren des Eileiters hergestellt. Die Auffaltung des Epithels dient der Oberflächenvergrößerung, welche von kranial nach kaudal kontinuierlich abnimmt. Dementsprechend weist das Infundilulum mit Primär-,

Sekundär- und Tertiärfalten eine komplexe Faltenarchitektur auf, die weit in das Lumen des Hohlorgans hineinreicht. Dieser Aufbau ist für den Transfer der Eizelle durch das Ostium zur Ampulla von besonderer Bedeutung. Durch die Oberflächenvergrößerung des Epithels entsteht im Infundibulum eine adhäsive Interaktion zwischen dem COC und den Zilien, wodurch eine Aufnahme in die Ampulla realisiert wird. Dort angekommen bilden die Primär- und Sekundärfalten eine vergrößerte stoffwechselaktive Oberfläche der Schleimhaut, die die Voraussetzung für ein optimales Milieu zur Erhaltung der Keimzellen schafft. Die Oozyte lagert sich in die Schleimhautnischen ein und kann auf diese Weise bis zu 24 Stunden von dem Eileitersekret ernährt werden, während sie auf die Spermien zur Befruchtung wartet. Im Isthmus sind nur noch Primärfalten anwesend, deren Länge stark reduziert ist. Auf diese Weise wird eine Einlagerung des frühen Embryos verhindert und der Transport in den Uterus unterstützt. Krypten werden zusätzlich im uterotubaren Übergang gefunden. Sie dienen vermutlich als Spermienreservoir (Yaniz et al., 2000; Yaniz et al., 2006).

Das einschichtige, meist hochprismatische Epithel des Eileiters verfügt über zwei Hauptzelltypen, deren Vorkommen vor allem zyklusabhängig variiert. Die zilientragenden Zellen, auch Flimmerzellen genannt, weisen oberflächlich Kinozilien und Mikrovilli auf und sind für den Transport von Bedeutung. Während die sekretorischen Zellen, auch Drüsenzellen genannt, nur Mikrovilli besitzen. Ekkrin sezernieren diese Zellen einen schwach sauren und nährstoffreichen Schleim und sind damit für die Versorgung der Keimzellen von enormer Relevanz. Zusätzlich können vereinzelt sogenannte Stiftchenzellen und Basalzellen ausfindig gemacht werden. Erstere sind Drüsenzellen, deren Sekret bereits abgegeben wurde. Sie zeichnen sich durch ihren pyknotischen Kern aus. Bei den kleinen runden Basalzellen handelt es sich um Immunzellen, die als T-Lymphozyten zu identifizieren sind (Comer et al, 1998; Abughrien et al., 2000).

Zyklusabhängige Umbauvorgänge des Epithels schaffen optimale Stoffwechselbedingungen für das Reproduktionsgeschehen. Präovulatorisch zeichnet sich das Epithel durch eine glatte Oberfläche aus. Zudem werden die Zellzwischenräume durch Flüssigkeitsansammlungen geweitet. Vorwölbungen und ein kompaktes Eileiterepithel prägen hingegen die luteale Phase (Björkmann, 1959). Dementsprechend verhält sich auch die Epithelhöhe. In der Follikelphase enthalten die Zellen den höchsten Gehalt an acidophilen Granula, der mit der Zellhöhe positiv

korreliert. Da die acidophilen Granula in der lutealen Phase reduziert auftreten, ist in dieser Zeit auch die Epithelhöhe am geringsten ausgebildet (Lombard, 1950).

Die das Epithel auskleidenden Zellen weisen ebenfalls zyklische Schwankungen auf, wobei dies vor allem im Infundibulum und der Ampulla zu beobachten ist. In der Ampulla ist der Anteil der ziliotragenden Zellen im Östrus mit 61 % am höchsten, während sich dieser an Tag 7 des Zyklus um ca. 15 % verringert (Abughrien und Dore, 2000). Die sekretorischen Zellen schnüren im Diöstrus und Proöstrus sekret- und teilweise auch kernhaltige Vesikel ab (Lombard, 1950), wodurch Stiftchenzellen vermehrt zu beobachten sind. Dieser Sachverhalt unterstützt den Oozytentransport unmittelbar nach der Ovulation. Auch Yaniz konnte 2000 nachweisen, dass die Zilienanzahl und deren Funktionalität im Infundibulum mit dem Erfolg des Oozytentransports korrelieren. In der frühen Lutealphase steht die Versorgung der Gameten mit Nährstoffen im Vordergrund, wodurch sich das Verhältnis zu Gunsten der sekretorischen Zellen verschiebt.

2.2 Ziliärer Transport im Eileiter

Kinozilien sind permanente Oberflächenorganellen, die als polar orientierte Zellfortsätze in den Kinetosomen (Basalkörper) im apikalen Zytoplasma verankert sind. Zellausstülpungen dieser Art kommen bevorzugt auf dem Epithel der Atemwege und des Eileiters vor und dienen mit bis zu 10 μm Länge und 0,25 μm Durchmesser (Satir et al., 1992) dem Transport von flüssigen und festen Stoffen. Das Grundgerüst der Kinozilie bildet der zentrale Achsenfaden, das so genannte Axonema, welches aus einem Mikrotubulipaar mittig der Zilie aufgebaut ist. Umgeben wird das Zentraltubuli von neun peripheren Doppelmikrotubuli, die jeweils aus einem A- und einem B-Tubulus bestehen. Der Aufbau des tubulären Zytoskelett wird als $9 \times 2 + 2$ – Muster beschrieben. Die Verbindung des zentralen Tubulipaars mit den zirkulären Dubletten wird über Radiärspeichen gesichert. Die Mikrotubuli werden an der Zelloberfläche aus der Wand des Kinetosom entwickelt. Der strukturelle Aufbau des Kinetosoms besteht aus neun Mikrotubuli Triplets und ähnelt somit dem Gerüst des Zentriols. Distal formt sich aus dem Kinetosom die Zilie mit ihren neun Mikrotubuli Dubletten und dem zentralen Mikrotubulipaar. Die Mikrotubuli bestehen aus dem globulären Polypeptid Tubulin, welches sich aus zwei Polypeptiduntereinheiten, dem

α -Tubulin und dem β -Tubulin zusammensetzt. Durch ihre kettenförmige Verbindung bilden sie Protofilamente, die auch als Dimere bezeichnet werden. Während ein Querschnitt durch die zentralen Mikrotubuli 13 zirkulär angeordnete Protofilamente offenbart, unterscheiden sich die peripheren A-Tubuli (13) und B-Tubuli (10 – 11) in der Anzahl ihrer Protofilamente. Eine Verbindung der Dubletten untereinander wird über Nexin-Bindestellen gewährleistet. Des Weiteren setzen an den A-Tubuli paarige kontraktile Dyneinarme an. Durch die Eingehung einer Bindung des am A-Tubulus befestigten Dyneinarmes mit dem benachbarten B-Tubulus wird ein aktives Gleiten der Dubletten hervorgerufen (Satir et al., 1980). Dies beschreibt einen ATP-abhängigen Prozess und wird unter Aktivierung des in den Dyneinarmen enthaltenen ATP spaltenden Enzyms ATP-ase initiiert. Während die Hydrolyse von ATP die Bindung des Dyneinarms an den benachbarten Tubulus bewirkt, führt die Dephosphorylierung von ATP zur Lösung der Bindung. Dabei arbeiten die äußeren Dyneinarme mit den inneren zusammen, indem die äußeren für die Schlagfrequenz und die inneren die Schlagform regulieren (Satir und Christensen, 2008).

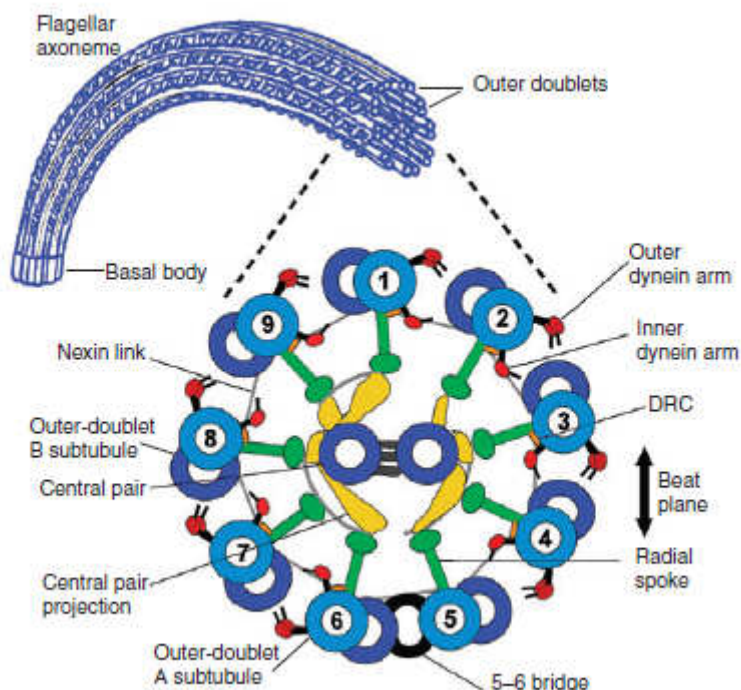


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zilie (Lindemann et al., 2007)

Im Eileiter trägt der Zilienschlag neben der Kontraktilität der glatten Muskulatur und der Strömung der Flüssigkeit zur Oozyten- und Embryobeförderung bei (Jansen 1984). Obwohl die relative Bedeutung jeder dieser Transportmechanismen unklar ist, besteht Anlass zu der Annahme, dass dem Zilienschlag eine besondere Relevanz beim tubalen Transport zukommt. So zeigten Halbert et al. 1976 und 1989, dass die Inhibition der muskulären Aktivität zu keiner Änderung der totalen Transitzeit durch die Ampulla führt. Daraus schlossen sie, dass der Zilienschlag allein zu einem normalen Eizellentransport fähig ist. Bestätigt wird diese These durch Untersuchungen an Frauen mit dem „Kartagener Syndrom“ und der Endometriose. Die krankheitsbedingte Beeinträchtigung des Zilienschlags ist mit einer reduzierten Fertilität assoziiert (McComb et al., 1986; Lyons et al., 2002a). Andererseits gibt es auch Fälle, bei denen eine erfolgreiche Schwangerschaft von Frauen mit dem Kartagener Syndrom gezeigt werden kann (McComb et al., 1986). Zudem wurde die Bedeutung des kontrahierenden Myosalpinx für den Eileitertransport bestärkt. Untersuchungen zeigten, dass die Kontraktionen des Eileiters allein einen erfolgreichen Embryotransport gewährleisten (Croxatto et al., 2002). Perez Martinez et al. (2000) wiesen durch eine Stimulierung der Muskulatur einen beschleunigten Oozytentransport nach. Im Bezug auf den Gameten- und Embryotransport beschreiben Noreikat (2009, persönliche Mitteilung) eine untergeordnete Rolle der ziliären Aktivität gegenüber der glatten Muskulatur. Da sowohl die Eileitermuskulatur, als auch der Zilienschlag an der Generierung des Flüssigkeitsstroms im Ovidukt beteiligt sind, findet der Embryotransport vermutlich nicht direkt über den Zilienschlag, sondern hauptsächlich indirekt über den kontinuierlichen Strom der Eileiterflüssigkeit statt (Kölle et al., 2010). Während die Beförderungsgeschwindigkeit (Partikeltransportgeschwindigkeit, PTG) im murinen Ovidukt keinen signifikanten zyklischen Veränderungen unterworfen ist (Noreikat 2009, persönliche Mitteilung), treten bei der Zilienaktivität zyklusassoziierte Unterschiede auf. Critoph et al. zeigten 1977 einen signifikanten Anstieg der ZSF nach der Ovulation, der eine funktionelle Bedeutung für den Oozyten Pickup und -Transport haben könnte (Lyons et al., 2006). Lyons et al. beschrieben 2002b in der Sekretionsphase eine signifikant höhere ZSF als in der Proliferationsphase. Einen Zusammenhang zwischen der ZSF und der Anwesenheit von Follikelflüssigkeit konnte ebenfalls gezeigt werden (Lyons et al., 2006). Eine Kultivierung von Eileiterproben in Follikelflüssigkeit führte nach 24 h zu einer signifikant höheren ZSF als in Medium kultivierte Eileiter. Eine

Differenzierung zwischen peritonealer Flüssigkeit der sekretorischen und der proliferativen Phase ergab eine signifikant höhere ZSF bei Eileiterstücken, die in der Flüssigkeit der sekretorischen Phase inkubiert wurden (Lyons et al., 2006). Zudem üben Signale und Substanzen, die bei der Kopulation freigesetzt und von der Zygote abgegeben werden, Einfluss auf den Transport aus (Croxatto 2000; Spilman et al., 1978). Ortiz et al. konnten 1986 und 1989 an Eileitern von Hamstern und Ratten einen lokalen Einfluss der Eizelle sowie des Embryos auf die Transportrate nachweisen. Kölle et al. wiesen 2009 nach der Fertilisation im bovinen Ovidukt einen signifikanten Abfall der PTG nach. Bezüglich der anatomischen Lokalisation im Ovidukt (Fimbria, Ampulla, Isthmus) wurde in der ZSF kein Einfluss nachgewiesen (Lyons et al., 2002b). Der Transport von Partikeln erfolgt im Isthmus jedoch schneller als in der Ampulla (Kölle et al., 2009). Dieser Unterschied in der PTG, bei gleichbleibender ZSF, basiert vor allem auf der morphologischen Beschaffenheit der beiden Eileitersegmente. Während in der Ampulla eine starke Auffaltung der Lamina propia den Transport in die Tiefen zwischen die Falten leitet, wo sich der COC zur ersten Kommunikation mit dem maternalen Epithel anlagert, bedingt die Faltenstruktur des Isthmus einen raschen Transport apikal der Primärfalten zum uterotubarem Übergang (Kölle et al., 2009).

2.3 Sekretion im Eileiter

Der Eileiter repräsentiert ein multifunktionales Organ im weiblichen Reproduktionstrakt. Neben der Beförderung der Gameten und des frühen Embryos schafft er durch die Anwesenheit der Eileiterflüssigkeit ein ideales Milieu zur Gametenmaturation, Fertilisation und Embryonalentwicklung. Die Oviduktflüssigkeit setzt sich aus der Follikelflüssigkeit, dem Sekret des Eileiterepithels und selektiver Transsudate des Serums zusammen (Leese et al., 1988). Während die Follikelflüssigkeit durch die Ovulation aus der Follikelhöhle in das Ovidukt geleitet wird, findet die Synthese des epithelialen Sekrets in den sekretorischen Zellen statt. Zyklusassoziierte Veränderungen in der sekretorischen Aktivität verursachen im Östrus die höchste Produktion (Roberts et al., 1975) und schaffen optimale Voraussetzung zur Ernährung und Beförderung der Gameten. Die Entwicklung der Epithelzellen wird im Verlauf des Zyklus nach funktionellen Ansprüchen moduliert.

Daher ist der Anteil sekretorischer Zellen in der späten Luteal- und der frühen Proliferationsphase höher als in der frühen Luteal- und späten Proliferationsphase (Odor et al., 1995). Auf diese Weise sorgt der Eileiter, vorbereitend auf die Ovulation, für die Produktion des nährreichen Sekrets und sichert im Anschluss den Transport durch den Eileiter. In der proliferativen Phase bewirkt der zunehmende Einfluss von Östrogen in den Epithelzellen Hypertrophie, Hyperplasie und die Differenzierung der Zellen. Die Differenzierung der sekretorischen Zellen ist durch ein gut entwickeltes rohes endoplasmatisches Retikulum mit dilatierter Zisterne, vielen Ribosomen, einem vergrößerten Golgi Apparat und sekretorischen Vesikel in unterschiedlicher Größe und Dichte charakterisiert (Nayak et al., 1977; Verhage et al., 1973; Bareither et al., 1981; Abe et al., 1999). In der lutealen Phase verursacht Progesteron eine Atrophie und Dedifferenzierung der sekretorischen Zellen. Zudem werden apoptotische Prozesse im Epithel initiiert (Bareither et al., 1981). Die sekretorischen Vesikel entleeren sich während der frühen Lutealphase via Exozytose (Bareither et al., 1981; Boice et al. 1990; Odor et al., 1995; Abe et al., 1999), apokrin (Verhage et al., 1973; Nayak et al., 1976) oder durch beide Prozesse (Odor et al., 1995; Murray et al., 1995, 1996) in das Eileiterlumen. In Folge dessen verschwinden die sekretorischen Vesikel in der mittleren Lutealphase und zytoplasmatische Protrusionen, die zum Teil auch Zellkerne und andere zytoplasmatische Organellen in das Lumen schleusen, dominieren diese Zyklusphase (Nayak et al., 1977; Abe et al., 1999). Kommt es zu einer Trächtigkeit führen in den ersten Tagen Änderungen in den proteinsynthetisierenden Organellen der sekretorischen Zellen zu einer Modifikation des sekretorischen Status (Murray et al., 1996). Bereits 3 Tage nach der Befruchtung ist die Anzahl sekretorischer Zellen reduziert und es befinden sich apikale Protrusionen in luminalen Bereich der Zelle (Murray, 1996). Die Regulierung dieser ultrastrukturellen Prozesse wird durch die ovariellen Steroidhormone Östrogen und Progesteron bestimmt. In vitro Untersuchungen zeigten, dass eine Östrogenbehandlung die Bildung sekretorischer Granula im apikalen Zytoplasma veranlasst und eine darauf folgende Behandlung mit Progesteron durch eine verstärkte Exozytose zu einem Versiegen der Vesikel führt (Bareither et al., 1981; Verhage et al., 1990). Allerdings ist die Bedeutung von Progesteron an diesem Prozess ungewiss. In Untersuchungen, bei denen ovariectomierte Schafe über einen längeren Zeitraum mit Östradiol behandelt wurden, zeigte sich ebenfalls eine exozytotische Sekretabgabe aus den sekretorischen Zellen. Damit ist zu vermuten,

dass im Zyklus weder der Progesteroneinfluss noch die sinkende Östrogeneinwirkung für den ultrastrukturellen Umbau der sekretorischen Zellen verantwortlich ist. Es scheint so, als wäre die Sekretabgabe nicht durch einen spezifischen Auslöser initiiert, sondern vielmehr eine logische Konsequenz von zuvor stattfindender Synthese sekretorischer Granula (Willemse et al., 1975). Bezüglich der anatomischen Zellposition zeigten Verhage et al. (1990) einen klaren zephalokaudalen Steroid-responsiven Gradienten. Während in der Ampulla eine ausgeprägte Reaktion auf die Steroidzugabe ausgelöst wird, verfügt der Isthmus kaum über sekretorische Granula (Abe et al., 1999; Verhage et al., 1990). Die Bestandteile der Sekretionsprodukte scheinen an der Modulierung der physiologischen Funktionen des Eileiters beteiligt zu sein. Hinsichtlich der Ionenkonzentrationen verfügt die Oviduktflüssigkeit im Vergleich zur Plasmakonzentration über einen hohen Gehalt an K^+ und HCO_3^- Ionen. Auch die Konzentration von Nährstoffen unterscheidet sich von der im Plasma und ist abhängig vom endokrinen Status. Beispielhaft sinkt der Gehalt an Glukose nach der Ovulation stark ab (Nichol et al., 1992, 1998). Die Zusammensetzung von Aminosäuren ist tierartspezifisch unterschiedlich. Beim Menschen kommen Arginin, Alanin und Glutamat in den höchsten Konzentrationen vor (Tay et al., 1997). Beim Hasen sind es Glyzin, Glutamat und Alanin (Miller und Schultz, 1987). Die Beimengung der Aminosäuren läuft hauptsächlich über die Transsudation aus den Gefäßen in das Lumen des Ovidukts (Leese und Gray, 1985). Die Sekretionabgabe aus den sekretorischen Epithelzellen stellt eine weitere große Quelle von intraluminalen Proteinen dar (Kapur und Johnson, 1985; Verhage et al., 1988). Eines der bedeutendsten Proteine bildet das Ovidukt-spezifische Glykoprotein (OSGP), welches in allen untersuchten Spezies synthetisiert wird und im Rind über ein Molekulargewicht von 97 kDa verfügt (Boice et al., 1990). Angelehnt an die Zelldifferenzierung und Aktivierung der Sekretion ist die höchste Synthese des OSGP in der proliferativen Periode als Antwort auf den Östrogeneinfluss zu verzeichnen (Abe et al., 1998). In einer in vitro Studie wurde durch eine Inkubation mit Östrogen keine Änderung in der Expression des OSGP nachgewiesen. Eine Ko- Kultivierung des Eileiterepithels mit LH führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg der OSGP Transkripte, so dass Sun et al. (1997) annahmen, dass vielmehr LH als Östrogen als Stimulus für die Synthese des Glykoproteins fungiert. Ein Rückgang in der mRNA Expression durch eine Progesteronbehandlung wird in der Literatur zum Großteil

belegt, jedoch auch kontrovers dargestellt (Sun et al., 1997; Donnelly et al., 1991; Jaffe et al., 1996; Ulbrich et al., 2006; Umezu et al., 2003). Als Bestandteil der Eileiterflüssigkeit übernimmt das Glykoprotein eine wichtige Aufgabe. Bei der Kultivierung von BOECs (bovine oviductal epithel cells) fungiert die Anwesenheit des OSGP-1 als Marker für die embryotrophe Eignung eines Eileiter-Zellkultur-System (Schoen et al., 2008), welche bekannterweise durch die sekretorischen Zellen des Epitheliums gesichert wird (Boice et al., 1990). Die Relevanz von Glykoproteinen für den reproduktiven Prozess wird durch die Bindungsfähigkeit des Proteins an die Zona Pellucida der Oozyte und des Embryos bestärkt (Verhage et al., 1997; Schmidt et al., 1997; Staros und Killian, 1998). Martus et al. (1998) vermuteten eine durch diese Bindung assoziierte Verbesserung der Fertilisation, indem sowohl die Bindung an die Zona Pellucida als auch die Kapazitation und schließlich die Penetration der Spermien gefördert wird (Abe et al., 1995; Verhage et al., 1997). Hunter publizieren 1994, dass die OSGP induzierte gesteigerte Viskosität der Oviduktflüssigkeit dazu beiträgt, dass die Gameten und der Embryo sofort von dem nutritiven Sekret umgeben werden und eine Versorgung mit Nährstoffen und Ionen gewährleisten wird, die zum Teil auch an der Aktivierung der Zilien und der glatten Muskulatur beteiligt sind. Die hohe Viskosität dient ebenfalls als Puffer für den Embryo zum Schutz vor osmotischen Veränderungen und Fluktationen in den Bestandteilen der luminalen Flüssigkeit. Die Dominanz des Glykoproteins in den sekretorischen Zellen des Isthmus deutet auf eine regional spezifische Bedeutung der OSGP Produktion hin (Abe et al., 1995). DeMott et al. (1995) vermuteten eine OSGP-vermittelte Anlagerung der Spermien an das Epithel im Isthmus.

2.4 Einfluss von Progesteron, Hyaluronsäure und Wachstumshormon im Eileiter

Progesteron

Das Steroidhormon Progesteron, auch als Luteal- und Gelbkörperhormon bekannt, gehört zu den Geschlechtshormonen der Gestagene. Die Bildungsstätte des Hormons stellen im weiblichen Organismus in erster Linie die Eierstöcke dar. Während des Sexualzyklus kommt es im Ovar in periodischen Abständen zur An- und Rückbildung des Corpus luteums (CL), welcher auch als Gelbkörper bezeichnet wird und durch seine temporäre inkretorische Drüsenaktivität eine Bildungsstätte des

gleichnamigen Hormons darstellt. Neben dem Ovar wird Progesteron in großen Mengen in der Plazenta synthetisiert und nimmt somit eine essentielle Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit ein (Spencer et al., 2002). Im Zyklusverlauf reifen die ovariellen Follikel unter Einfluss der hypophysär gesteuerten Gonadotropine „Follikel Stimulierendes Hormon“ (FSH) und „Luteinisierendes Hormon“ (LH). Ist ein dominanter Graff'scher Follikel herangewachsen, wird die Ovulation durch einen Peak der LH-Freisetzung ausgelöst. Aus der kollabierten Follikelwand baut sich postovulatorisch der CL auf. Die Follikelwand fällt zusammen und bildet zunächst einen Hohlraum, in dem sich ein Blutkoagulum, welches später resorbiert wird, befindet. In diesem, als Metöstrus bezeichneten Zyklusstand (Tag 1 bis 4), wird der Gelbkörper als Corpus haemorrhagicum bezeichnet. Die ausströmende Follikelflüssigkeit enthält im bovinen Eileiter einen Progesterongehalt von 250 ng/ml (Prevost et al., 1989). Der Anstieg der im Serum vorliegenden Progesteronkonzentration ist beim Rind innerhalb der ersten 3 Tage jedoch nicht signifikant (Stabenfeldt et al., 1969). Durch die Einlagerung von Lipoiden mit Lipochromen (Luteinisierung) in den Zellen der Theca interna und den Granulosazellen wird die Anbildung des CL initiiert. Somit wandeln sich die Granulosazellen zu Granulosaluteinzellen und die Zellen der Theca interna zu Thecaluteinzellen um. Letztere sind bei Rind und Schaf allerdings nicht vorhanden. Mit dem Aufbau des Gelbkörpers steigt die Progesteronkonzentration im bovinen Serum ab dem vierten Tag signifikant an (Stabenfeldt et al., 1969). Durch die Analyse der Serumkonzentration können ebenfalls Schlüsse auf die Progesteronkonzentration im Ovar gezogen werden. Cavazos et al. postulieren 1969 eine signifikant positive Korrelation der peripheren Plasmaprogesteronkonzentration und der Konzentration im CL im Verlauf des Zyklus. Eine maximale Plasmaprogesteronkonzentration von 6,6 ng/ml bzw. 6,8 ng/ml wird gegen Ende des Blütestadiums (Tag 14) erreicht (Stabenfeldt et al., 1969; Donaldson et al., 1970). Das Ausbleiben einer Befruchtung bewirkt im bovinen Uterus die Synthese des Oxytozinrezeptors, welcher in Wechselwirkung mit Oxytozin die Sekretion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ vermittelt. Die Ausschüttung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ führt an Tag 16 des Zyklus zur Luteolyse des CL, wodurch die Sekretion von Progesteron abnimmt und mit der vollendeten Regression des CL schließlich versiegt. Hat jedoch eine Befruchtung stattgefunden, unterdrückt der Embryo, vermutlich durch die Sekretion von Interferon tau (Mann et al., 1999), die Entwicklung des Oxytozinrezeptors im Endometrium.

Somit wird eine Oxytozin-induzierte Freisetzung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und die darauf folgende Luteolyse inhibiert. Zur weiteren Versorgung des Embryos bleibt der Gelbkörper als Corpus graviditatis bestehen. Erst mit der Plazentation kommt es zur Bildung der Plazenta, die ab diesem Zeitpunkt die Progesteronproduktion übernimmt. Die Bedeutung von Progesteron für eine erfolgreiche Trächtigkeit wurde bereits in vielen Studien analysiert. In Untersuchungen konnte durch eine erhöhte Progesteronkonzentration im Blutkreislauf in der Post-Konzeptionsperiode eine Verbesserung in der Konzeptuselongation, einen assoziierten Anstieg der Interferon tau Produktion sowie höhere Trächtigkeitsraten bei Rind und Schaf belegt werden (Lamming & Royal 1999; Mann & Lamming 2001; Inskoop 2004; Stronge et al. 2005; McNeill et al. 2006). Für eine Erhaltung der Trächtigkeit ist neben der ausreichenden Progesteronproduktion vor allem das Timing des postovulatorischen Progesteronanstiegs von Wichtigkeit (Starbuck et al., 2006; Wathes et al., 2003). Carter et al. zeigten 2008, dass eine Erhöhung der Progesteronkonzentration an Tag 5 und 6 post Konzeption zu einer signifikant stärkeren Elongation des Embryos führte, während eine heraufgesetzte Progesteronkonzentration an Tag 7 und 8 die Konzeptusgröße nicht mehr signifikant beeinflusste. Eine Progesteronabhängige Konzeptuselongation findet demnach vor Tag 7 statt. Bleibt in den ersten Tagen der Trächtigkeit ein ausreichender postovulatorische Progesteronanstieg aus, werden an Tag 16 kleinere Embryonen, die weniger Interferon tau sezernieren, nachgewiesen (Mann et al., 2001). Neben der maternalen Regulierung der Progesteronproduktion gibt es Hinweise darauf, dass der Embryo die Fähigkeit besitzt, luteotrophe Substanzen zu bilden und auf diese Weise die Progesteronsekretion stimuliert. Pereira et al. (2006) postulieren eine Stimulation der Progesteronproduktion in bovinen Granulosa- und Lutealzellen bei 2 bis 3 Tage alten in vitro kultivierten Embryonen. Eine Kokultivierung von bovinen Embryonen mit Granulosazellen bewirkte einen Anstieg der Progesteronkonzentration in den Granulosazellen. Der Embryo induzierte Einfluss auf die Progesteronsekretion zeigte sich in Assoziation mit der Embryofurchung (Tag 4 bis 5) und der Transition von der expandierten zu der eingesteten Blastozyste (Tag 11 bis 14). Durch eine Progesteron-Behandlung konnten jedoch auch negative Effekte auf die embryonale Entwicklung nachgewiesen werden. Eine Kokultivierung von Embryonen mit bovinen Eileiterepithelzellen (BOECs) und einer Progesteron Supplementation resultierte in einer herabgesetzten Entwicklungsrate an 8 Tage alten Embryonen (Pereira et al., 2008). Dieser negative

Effekt wurde nicht bei der Kokultivierung mit Progesteron produzierenden Granulosazellen nachgewiesen. Die negativen Auswirkungen von P scheinen auf den Wechselwirkungen mit den BOECs zu basieren. Verhage et al. zeigten 1990, dass eine Progesteron Behandlung am Eileiterepithel zur Atrophie, Dezilisation, Apoptose und dem Verlust der sekretorischen Aktivität führt. Bereits 1984 wiesen Sawyer et al. eine Regression des Epithels im Eileiter nach einer Progesteron-Behandlung in präpubertalen Beageln nach. Dies stimmt damit überein, dass die Epithelhöhe auch in der Progesteron dominierenden lutealen Zyklusphase am niedrigsten ist. Mit der Reduktion der Epithelhöhe geht auch der Gehalt sekretorischer Granulae in den sekretorischen Zellen zurück (Lombard et al., 1950). Die Synthese der in den Vesikel enthaltenden Glykoproteinen nimmt ebenfalls in der Lutealphase ab. Ulbrich et al. wiesen 2006 einen signifikanten Abfall in der Transkriptmenge des Glykoprotein-1 (OVGP-1) in Folge einer Progesteronstimulation in vitro von 18 h nach. Bereits 1996 untersuchten Jaffe et al. den Einfluss von P auf die Expression der OVGP mRNA im Eileiter. Sowohl in der Lutealphase als auch durch eine P-Behandlung der Versuchstiere sank die mRNA Expression des OGP's auf eine nicht mehr detektierbare Menge. Untersuchungen von Sun et al. konnten 1997 keinen direkten Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Progesteron und der Elimination der mRNA OVGP-1 nachweisen.

Vermittelt wird die progesteroninduzierte Wirkung durch die Bindung an den Progesteronrezeptor (PR), der zur Superfamilie der Nukleärrezeptoren gehört. Dieser verfügt über die zwei Isoformen A (94 kDa) und B (116 kDa) (Schrader et al., 1981). Im Ovidukt treten beide Subtypen des Rezeptors auf. Während der PR-A vorwiegend in der Ampulla in der frühen Lutealphase exprimiert wird, ist der PR-B hauptsächlich im Isthmus lokalisiert und keinen zyklischen Schwankungen unterworfen (Ulbrich et al., 2003). Conneely et al. untersuchten 2002 an knock-out Mäusen die Relevanz der beiden Isoformen für die Fertilität. Sie zeigten, dass das Fehlen des PR-B zu keiner Beeinflussung der Hormonantwort an Ovar und Uterus führt, während die Abwesenheit von PR-A die Fertilität vermindert. Reguliert wird die PR Expression hormonell über die Gestagene Östrogen und Progesteron. Eine stimulierende Wirkung übt Östrogen auf die Ausprägung des PRs in der folliculären Phase aus. In der Lutealphase hemmt Progesteron hingegen die Induktion seines eigenen Rezeptors (Conneely et al., 2000; Peterson, 2000). Im bovinen weiblichen Geschlechtstrakt ist die PR-Expression demnach zyklischen Schwankungen

unterworfen. In der Ampulla ist in den Epithelzellen die stärkste Expression im Östrus unter Östrogeneinfluss zu verzeichnen. Im Metöstrus nimmt die Anzahl PR-positiver Zellkerne ab, bis im Diöstrus und Proöstrus nur noch vereinzelt schwache Reaktionen vorhanden sind. Im Isthmus wird die PR-Expression weniger intensiv von der Anwesenheit der Gestagene beeinflusst. Lediglich die stark positiven Reaktionen gehen im Diöstrus und Proöstrus zurück (Lücke, 2005, persönliche Mitteilung). Im bovinen Uterus zeigten Martin et al., 2008 an den Tagen 0, 5 und 9 des Zyklus eine intensivere PR Immunreaktion im Stroma und glandulären Epithel als an den Tagen 13 und 19. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Robinson et al. (2001) überein. Sie analysierten die PR-Expression im Endometrium auf mRNA- und Proteinebene. Nach der Ovulation steigt das Progesteronrezeptor Protein sowohl im luminalen- und glandulären Epithel als auch im Stroma langsam an. Während die PR-Expression im Stroma bereits nach dem zweiten Zyklustag wieder zu sinken beginnt, steigt die Ausprägung des PRs im glandulären Epithel bis zum 6. Zyklustag und die des luminalen Epithels bis zum 12. Zyklustag weiter an. Im Drüsenepithel sind ab dem 12. Tag nur noch vereinzelt positive Zellkerne zu verzeichnen. Die Expression im luminalen Epithel versiegt hingegen erst an Tag 18. Durch die Expression von Hormonrezeptoren in der Mukosa des Eileiters verfügen die Zellen über die Fähigkeit, Signale zur Kontrolle des Gameten- und Embryotransportes zu empfangen. Die Beförderung durch den Eileiter wird durch das Zusammenspiel des Zilienschlags, der Muskelkontraktion und des luminalen Flüssigkeitsstroms ermöglicht. Untersuchungen zeigten bereits eine Beteiligung von Progesteron an diesem Prozess. Neben einer relaxierenden Wirkung auf die Muskulatur im Eileiter (Wanggren et al., 2008), wurde in verschiedenen Studien ebenfalls der Einfluss auf die Zilienaktivität nachgewiesen (Nishimura et al., 2010; Mahmood et al., 1998; Paltieli et al., 2000; Wessel et al., 2003; Bylander et al., 2010). Im humanen Eileiter untersuchten Mahmood et al. (1998) den Einfluss von Progesteron auf die ZSF unter in vitro Bedingungen. Nach einer 24-stündigen Inkubation des Eileitergewebes mit Progesteron in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$, sank die ZSF signifikant ab. Dies bestätigen Paltieli et al., die 2000 in einer in vitro Studie durch eine Progesteron-Behandlung über 24 Stunden ebenfalls einen signifikanten Abfall der ZSF nachwiesen. Auch unter ex vivo Bedingungen konnte der inhibitorische Effekt von Progesteron (100 nmol/l) auf die ZSF im Mäuseeileiter nachgewiesen werden (Bylander et al., 2010). Beim Schwein wurde in der progesterondominierenden

Zyklusphase ein Abfall der Zilienschlagfrequenz (ZSF) analysiert. Auch eine Progesteronbehandlung führte zu einem Sinken der ZSF im porcinen Eileiter. Eine Vorbehandlung mittels des Progesteronrezeptorblockers Mifepristone verhindert die progesteron-induzierte Reduktion der ZSF. Demnach wird im porcinen Ovidukt die ZSF von Signalen, die über den PR vermittelt werden, reguliert. Zu konträren Ergebnissen bezüglich der Signalübertragung kamen Wessel et al. (2004) im bovinen Eileiter. Eine Vorbehandlung mit Mifepristone führte im Gegensatz zu den Untersuchungen am porcinen Eileiter zu einem progesteron-induzierten Abfall in der ZSF. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Signalvermittlung über den nukleären PR, was die Beteiligung eines anderen Rezeptors nahe legt. Des Weiteren zeigten Wessel et al. (2004) durch eine Supplementierung von P ($20 \mu\text{mol/l}$) bereits nach 15 Minuten einen inhibitorischen Effekt auf die ZSF. Nach 90 Minuten reduzierte sich die ZSF um insgesamt 11 %. Die rasche Reaktion auf die P Zufuhr schließt eine genomische Signalübertragung aus, da einer Änderung der Genexpression und der damit verbundenen Aktivierung der RNA- und Proteinsynthese ein Transkriptionsprozess vorausgeht, der gewöhnlich mehr als 30 bis 60 min. benötigt. Demnach basieren die schnellen Effekte auf nicht-genomischen Wirkungsmechanismen. Charakteristisch für nicht-genomisch vermittelte Reaktionen ist die Insensitivität zu Steroidantagonisten, was darauf hinweist, dass eine neue Klasse des Steroidrezeptors für die schnelle Wirkung des Hormons verantwortlich sein könnte. Dabei wird eine Beteiligung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren, vermutet. Mögliche Mediatoren könnten die in der Membran lokalisierten Progesteron-Rezeptoren ($\text{mPR}\alpha, \beta, \gamma$) darstellen. Nutu et al. wiesen 2009 die Präsenz des $\text{mPR}\beta$ und $\text{mPR}\gamma$ im murinen und humanen Eileiter nach. Während der $\text{mPR}\gamma$ an der Basis der Zilien lokalisiert ist, wird der $\text{mPR}\beta$ entlang der Zilie exprimiert. Durch eine Steroidbehandlung konnte eine hormonelle Regulation des mPRs gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass der mPR als nicht genomisch agierender Mediator an der Steuerung der Zilienmotilität beteiligt sein könnte.

Hyaluronsäure

Das Glykosaminoglykan, Hyaluronsäure (HA), ist ein lineares unsulfatiertes Polysaccharid, welches aus sich wiederholenden Disaccariden aufgebaut ist (2.000-2.500 Untereinheiten). Die Disaccharideinheiten bestehen aus zwei Glukosederivaten, D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-glucosaminen. Dabei wird die Glucuronsäure glykosidisch $\beta(1\rightarrow3)$ an das N-Acetyl-D-glucosamin geknüpft und dieses wiederum glykosidisch $\beta(1\rightarrow4)$ mit der nächsten Glukuronsäure in der polymeren Kette verbunden. Im Organismus bildet HA in fast allen Geweben einen grundlegenden Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM), wo sie durch Adhäsion (Underhill und Dorfmann, 1978), Proliferation (West und Kumar, 1989) und Migration (Peck und Isacke, 1996) einen stimulierenden Effekt auf Zellaktivitäten ausübt. Die Synthese der HA wird durch integrale Membranproteine, den HA-Synthasen (HAS), gewährleistet. Diese Enzyme können in drei unterschiedlichen Isoformen (HAS1, 2, 3) vorliegen und bauen die Hyaluronsäure aus einzelnen Monosaccharidbausteinen auf. Das entstehende Polymer wird durch das Längenwachstum der Kette und über ABC-Transporter durch die Membran aus der Zelle geschleust (Weigel et al., 1997). Als Makromolekül verfügt HA über ein Molekulargewicht von 200 kDa bis 2.000 kDa (Itano et al., 1999). Als Bestandteil der von Kumuluszellen gebildeten EZM des Kumulus Oozyten Komplexes (COC) übernimmt HA im weiblichen Reproduktionstrakt eine wichtige Rolle bei der Oozytenmaturation und Kumulusexpandierung (Ball et al., 1982; Schoenfelder et al., 2003). Während der Follikelreifung bilden die Granulosazellen ein mehrschichtiges Epithel, welches die Eizelle umgibt. Am Ende des Follikelwachstums differenzieren sich die Granulosazellen in Kumuluszellen und murale Granulosazellen. Beide dieser Subpopulationen sind zur Synthese von HA fähig. Physiologisch wird die Synthese und Organisation von HA in der EZM der Kumuluszellen durch den präovulatorischen LH-Anstieg initiiert (Ball et al., 1982). Somit kommt es zur Expandierung des COC, wodurch eine Loslösung von der Follikelwand gewährleistet wird (Chen et al., 1993). Auch eine Injektion von human chorionic Gonadotropin (hcG) ins Serum führt zu einem Anstieg der HA-Synthese im COC (Salustri et al., 1992). Schoenfelder et al. zeigten 2003, dass die Zufuhr von Gonadotropinen (LH, FSH) in bovinen COC einen schnellen und 120-fachen Anstieg der HAS2 mRNA-Expression bewirkt, während die HAS3 mRNA nur um das 2-fache hochreguliert wurde. HAS1 mRNA wurde kaum detektiert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Enzym HAS2 für die

schnelle Synthese von HA im bovinen COC verantwortlich ist (Schoenfelder et al., 2003). Die Vermittlung HA-induzierter Effekte wird durch Rezeptoren geleistet. Identifiziert wurde der transmembrane Rezeptor CD44 und der „Rezeptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility“ (RHAMM) (Schoenfelder et al., 2003; Yokoo et al., 2002; Otha et al., 1999). Das Glykoprotein CD44 ist für Zell-zu-Zell Interaktionen und für die Kommunikation zwischen der Zelle und der EZM verantwortlich (Naor et al., 1997). Des Weiteren zeigten verschiedene Studien einen Einfluss auf die Inhibition von Apoptosis (Kaneko et al., 2000), die Endozytose von HA (Tammi et al., 2001), die Augmentation der Motilität und Metastasen von Tumorzellen (Thomas et al., 1992) und die Stimulation von Lymphozyten (Lesley et al., 1997). Der andere bekannte Rezeptor RHAMM besitzt zwei potenzielle HA-Bindungsstellen (Yang et al., 1993) und wird sowohl in der Zelle als auch an der Zelloberfläche exprimiert (Toole, 1997). Neben der Vermittlung von Zellaktivitäten ist RHAMM in die Wundheilung, die Migration von Zellen der glatten Muskulatur (Savani et al., 1995) und die Modulation des Zilienschlages in der Trachea (Lieb et al., 2000) involviert. Im COC kommt es während der *in vitro* Maturation zu einem starken Anstieg der mRNA CD44 Expression. Eine Steigerung der CD44-Expression konnte ebenfalls durch eine Gonadotropinbehandlung gezeigt werden (Schoenfelder et al., 2004). Aufgrund der unveränderten Ausprägung der RHAMM mRNA während der *in vitro* Maturation von COCs schließen Schoenfelder et al. (2003), auf eine spezifische Beteiligung des CD44 Rezeptors an der Eizellenreifung. Durch die Anreicherung von HA im Kumulus, welche bei der Maus zwischen 5 und 10 µg/ml liegt (Camaioni et al., 1996), gelangt die HA auch in die Follikelflüssigkeit. Daher befindet sich HA als natürlicher Bestandteil in Eileiter- und Uterussekreten. Beim Rind wurde in der Eileiterflüssigkeit der größte Gehalt an HA am Tag der Ovulation nachgewiesen (2,9 +/- 0,64 µg pro Tag), während der geringste Gehalt vier Tage vor der Ovulation gemessen wurde (Bergqvist et al., 2005). In boviner gepoolter Follikelflüssigkeit handelt es sich um eine Konzentration von 37,19 µg/ml (Stojkovic et al., 2002). Kano et al. analysierten 1998 in porciner Follikel-, Ovidukt-, und Uterusflüssigkeit eine Konzentration von 0,4 bis 18,3 µg HA pro ml. Beim Menschen wurde eine Konzentration von 66,9 ng/ml in der Follikelflüssigkeit unfertilisierter Eizellen nachgewiesen, während Follikelflüssigkeit, die eine befruchtete Eizelle enthielt, signifikant weniger HA beinhaltete (50 ng/ml) (Saito et al., 2000). Des Weiteren wurde ein positiver Zusammenhang zwischen dem HA-Gehalt in der Follikelflüssigkeit und der

Implantationsrate nachgewiesen (Babayán et al., 2008). Während bei Frauen, deren Embryonen sich nach einem Embryotransfer implantiert haben, eine Konzentration von 220 ng/ml gemessen wurde, verfügten Frauen, in denen sich der Embryo nicht implantierte, nur über einen HA-Gehalt von 158 ng/ml in der Follikel­flüssigkeit. Stojkovic et al. zeigten 2002, dass geschlüpfte Blastozysten signifikant höhere HA Mengen sezernieren als Embryonen in früheren Entwicklungsstadien. In vitro Studien präsentieren ebenfalls die Bedeutung von HA für eine erfolgreiche Trächtigkeit. So beschrieben Stojkovic et al. (2002) eine signifikant bessere Entwicklung boviner Blastozysten, wenn diese mit dem Zusatz von HA kultiviert wurden. Auch bei der Kultivierung von porcinen parthenogenetischen Embryonen verbesserte die Zufuhr von exogener HA die Entwicklungsrate signifikant (Toyokawa et al., 2005). Borg et al. wiesen 2008 durch die Addition von HA zum Kultivierungsmedium ebenfalls eine signifikant erhöhte Entwicklungsrate bei parthenogenetischen Rattenembryonen nach. Es ist anzunehmen, dass die Expression des RHAMMs, welche ab dem embryonalen 2-Zellstadium detektiert wurde, für die positiven Auswirkungen in Folge der HA Supplementierung verantwortlich ist (Stojkovic et al., 2003; Choudhary et al., 2007). Während die HA sowohl bei der Oozytenmaturation als auch bei der embryonalen Entwicklung eine fördernde Rolle einnimmt, konnte bisher kein Einfluss auf die Befruchtungsrate bei in vitro fertilisierten Eizellen nachgewiesen werden (Borg et al., 2008). Ueno et al. zeigten 2009 bei denudierten murinen Eizellen, dass die Zugabe eines HA-Synthase Blockers (4-Methylumbelliferone) zu einer unveränderten Fertilisationsrate führt. Des Weiteren wiesen Ueno et al. (2009) nach, dass auch die Oozyte selbst HA synthetisiert und damit zur Ausweitung des Perivitellin-Raumes beiträgt. Auf diese Weise tritt während der IVF bei unbehandelten denudierten Oozyten signifikant weniger Polyspermie auf als in HA-Synthase geblockten denudierten Eizellen. Eine mögliche Erklärung könnte in der Verbesserung der Induktion der Akrosomreaktion durch die Interaktion zwischen den Spermien und der HA des Kumulus bzw. des Perivitellin-Raumes liegen (Sabeur et al., 1998). Huszar et al. zeigten 1990, dass Spermien an HA in Lösung binden, wodurch ein starker Anstieg des Geißelschlages und der Schwimmggeschwindigkeit ausgelöst wurde. Aufgrund der dominanten preovulatorischen Anwesenheit von HA in der intraluminalen Flüssigkeit sowie im Epithel des Spermienreservoir (Bergqvist et al., 2005; Tienthai et al., 2003) und der Expression spezifischer HA Rezeptoren (PH-20 und RHAMM) in maturierten Spermatozoen (Sabeur et al., 1998; Kornovski et al.,

1994) kann ein Zusammenhang mit der Loslösung der Spermien aus ihrem Reservoir durch die HA-induzierte Hyperaktivität vermutet werden. Ein weiterer Hinweis für die Relevanz von HA im kaudalen Abschnitt des Ovidukts stellt die starke Expression des Zelloberflächenrezeptors CD44 dar (Ulbrich et al., 2004). Mit einem Molekulargewicht von 200 kDa (Bergqvist et al., 2005) bildet der CD44 den größten der drei bekannten HA-Rezeptoren (CD44, RHAMM, PH-20). Während sich der CD44 in allen Segmenten des bovinen Eileiters auf der ad-luminalen Oberfläche und der Supra-nuklear Region der sekretorischen Epithelzellen nachweisen lässt (Tienthai et al., 2003; Bergqvist et al., 2005), zeigt ausschließlich das Epithel des Uterus-Isthmus-Übergangs eine Rezeptorpräsenz innerhalb des gesamten Zytoplasmas (Bergqvist et al., 2005). Im Gegensatz zur Ampulla ist die mRNA-Expression des CD44 im Isthmus um das 10-fache erhöht. Zyklusabhängige Veränderungen wurden ebenfalls detektiert. Dabei ergab sich im Isthmus ein signifikant höheres Level der CD44 mRNA im Östrus (19. und 20. Tag) als in der späten Lutealphase (13.-18. Tag) (Ulbrich et al., 2004). Während eine zyklusorientierte Vermittlung der HA-induzierten Wirkung im Isthmus über den CD44 Rezeptor geregelt wird, übernimmt in der Ampulla der RHAMM diese Aufgabe. Dabei ist die mRNA-Expression des RHAMMs im Östrus signifikant höher als in der frühen und mittleren Lutealphase (Ulbrich et al., 2004). Daher scheint die Dominanz der beiden HA-Rezeptoren in der prä- und periovulatorischen Phase eine wichtige Voraussetzung für HA-vermittelte Effekte bei der Gametenmaturation sowie der Spermien-Eizellen-Interaktion (Schoenfelder et al., 2003; Tienthai et al., 2003) darzustellen. Neben den fördernden Effekten auf die Reifungsprozesse liegt die Vermutung nahe, dass HA durch eine Beeinflussung des Zilienschlages im Eileiter auch am Gametentransport beteiligt sein könnte. Anlass zu der Annahme besteht vor allem durch die Kenntnis, dass eine HA-Behandlung von Spermien *in vitro* zu einer Steigerung der Motilität und Schlagfrequenz des Spermischwanzes führt (Huszar et al., 1990). Kornovski et al. (1994) nahmen an, dass die Präsenz des HA Rezeptors RHAMM auf der Oberfläche der Spermatozoe eine wichtige Rolle für die Vermittlung der Spermienmotilität darstellt. Aufgrund der äquivalenten mikrotubulären Struktur des Spermischwanzes und der Zilie vermuteten Wissenschaftler bereits Parallelen im Bezug auf HA induzierte Effekte bei Zilien trachealer Epithelzellen (Lieb et al., 2000; Forteza et al., 2001; Manzanares et al., 2007). Forteza et al. wiesen 2001 in einer *in vitro* Studie an ovinen trachealen Epithelzellen eine gesteigerte

Zilienschlagfrequenz (ZSF) durch die Bindung von HA an den RHAMM nach. Zunächst maßen sie die ZSF (in Hz) vor und nach der Zugabe von 50 µg/ml HA. Der daraufhin verzeichnete Anstieg der ZSF wurde in einem zweiten Versuch durch eine Vorbehandlung des Epithels mit einem anti-RHAMM Antikörper blockiert. Daraus geht hervor, dass der HA induzierte Anstieg der ZSF durch die Anwesenheit des RHAMMs vermittelt wird. Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Manzanares et al. (2007). Untersuchungen zur Analyse des Einflusses von HA auf die ZSF im Eileiter bestehen bislang nicht. Da die Expression des RHAMMs in der Ampulla zu dem Zeitpunkt der Ovulation am höchsten ist (Ulbrich et al., 2004), kann eine HA induzierte Beteiligung am Oozyten Pick up vermuten werden. Ein wichtiger Faktor für die biologische Aktivität der HA ist das Molekulargewicht. Während ein Molekulargewicht < 300 kDa eine stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation ausübt (Horton et al., 1999), inhibiert ein Molekulargewicht > 1000 kDa die Zellproliferation (Delpech et al., 1997). Die Untersuchungen am Epithel der Trachea zeigten ebenfalls eine differenzierte Wirkung bezüglich des Molekulargewichtes. HA unter 300 kDa erzielte einen Anstieg der ZSF (Forteza et al., 2001; Leib et al., 2000). Keinen Einfluss auf die ZSF wurde durch HA mit einem großen Molekulargewicht (> 1000 kDa) erlangt (Morimoto et al., 1991). Auch die Erhöhung der Spermienmotilität wurde durch ein niedrigeres Molekulargewicht stimuliert (Ranganathan et al., 1995). In den Kumuluszellen der Eizelle stimuliert der prä-ovulatorische Anstieg des Luteinisierenden Hormons (LH) die Synthese von HA (Saito et al., 2000; Tienthai et al., 2000). Dieser Prozess ist notwendig, damit sich der expandierte Kumulus-Oozyten-Komplex (COC) von der Follikelwand lösen kann. Zudem synthetisiert und sezerniert die Oozyte selbst HA. Somit kommt es zu einer Ausweitung des Perivitalraumes, wodurch das Auftreten von Polyspermie reduziert wird (Ueno et al., 2009).

Das Wachstumshormon

Das Wachstumshormon, auch unter den Synonymen Somatotropin oder Growth Hormon bekannt, ist ein einkettiges Proteohormon, dessen Primärstruktur aus 191 Aminosäuren aufgebaut ist. Für die Interaktionen zwischen GH und GHR ist die dreidimensionale Struktur aus vier α -Helices mit zwei intramolekularen Disulfidbindungen verantwortlich (Abdel-Maguid et al., 1987). Allerdings existieren artspezifische Varianten des Hormons, wobei die Aminosäuresequenz des bovinen GH zu 66 % mit der des humanen GH übereinstimmt (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST). So besitzt das humane GH ein Molekulargewicht von 22.000 Da (Li und Dixon, 1971), während bei bovinem GH in verschiedenen Studien (Li et al., 1945 und 1948) Werte zwischen 20.000 und 50.000 Da ermittelt wurden. Im Organismus wird das Somatotropin in den azidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) gebildet und dessen Ausschüttung direkt über Neuropeptide des Hypothalamus reguliert (Plotsky und Vale, 1985). Dabei wirkt das Somatoliberin (GHRH: Growth-Hormone-Releasing-Hormone) stimulierend auf die Synthese und Sekretion von GH, während das Somatostatin (GHIH: Growth-Hormone-Inhibiting-Hormone) die Ausschüttung hemmt. GHRH aktiviert dabei an den somatotropen Zellen das cAMP-System, welches hingegen durch inhibitorische G-Proteine des Somatostatin unterdrückt werden kann. Zudem ist GH selbst, wie auch IGF-1 (Insulin-like-growth-factor-1), durch eine stimulierende Wirkung auf GHIH in der Lage, die GH Ausschüttung zu reduzieren. Die Wirkung von GH lässt sich in schnell wirksame metabolische Effekte und in eine langsam und lang wirkende Stimulierung des Wachstums einteilen. Metabolische GH-induzierte Effekte werden durch die Wechselwirkung mit den Zielzellen vermittelt. Basierend auf einer erhöhten Lipolyseaktivität dienen die freigesetzten Fettsäuren als Energieträger zur Proteinsynthese. Ein reduzierter Glukosetransport über die Zellmembran veranlasst eine insulinantagonistische Wirkung und aktiviert die Glukoneogenese (Dart et al., 1998). Eine länger andauernde wachstumsfördernde Wirkung wird in der Leber durch eine GH abhängige Synthese von den Wachstumsfaktoren 1 und 2 (Insulin-like-growth-factor, IGF 1 und 2) initiiert. Diese insulinähnlichen Moleküle binden im Blut an IGF-BPs und weisen mit 20 Stunden eine längere Halbwertszeit als GH auf. Die Sekretion des endokrinen Wachstumshormons erfolgt pulsatil über den Tag verteilt, wobei in der Nacht die Maximalwerte erreicht werden. Auf die GH-Synthese kann sowohl eine direkte Ausschüttung folgen oder zunächst eine Speicherung in

sekretorischer Granula der somatotrophen Zellen. Die Sekretionsmenge ist von der Anzahl und Größe der somatotrophen Zellen abhängig. Diese und die sekretorische Granula nehmen während der Embryogenese und postnatal zu (Sun et al., 1984). In der Pubertät werden die höchsten Tagesmengen erzielt, die nach Abschluss des Wachstums relativ schnell abfallen. Mit dem Alter nimmt außerdem die Frequenz und Amplitude der pulsatilen GH-Freisetzung ab (Sun et al. 1984, Finkelstein et al., 1972; Console et al., 1993). Die Ausschüttung des Hormons erfolgt durch Exozytose (Farmer et al., 1989; Zor, 1983), die einen Calcium-abhängigen Prozess darstellt. Durch die Anwesenheit von Calcium-Ionophoren, Calciumkanal-Agonisten, Stoffen mit hoher extrazellulärer Calciumkonzentration sowie weiteren Calcium-mobilisierenden Stoffen (z.B. cAMP-Analoga, Prostaglandine) wird ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration bewirkt und eine Exozytose von GH eingeleitet (Cuttler et al., 1992; Holl et al., 1988; Lussier, 1991). Das freigesetzte GH gelangt im Folgenden über den Blutkreislauf zu den Zielzellen. Die biologische Halbwertszeit des somatotropen Hormons beträgt in freier Form etwa 20 bis 60 Minuten. Durch die Bindung an ein Transportprotein wird eine rasche Metabolisierung des GH verhindert (Baumann und Mercado, 1993). Bei den Transportproteinen handelt es sich um spezifische Wachstumshormon-Bindungsproteine (GHBP), die eine Beförderung zu den Zielzellen gewährleisten. Beim Menschen wurden bereits zwei GHBP identifiziert, welche sich durch eine unterschiedliche Affinität zu GH differenzieren. Das zirkulierende high affinity GHBP ist ein Glykoprotein und entspricht mit einem Molekulargewicht von 60.000 bis 65.000 Da der extrazellulären Domäne des GH-Rs (Goffin und Kelly, 1997). Bei dem low affinity GHBP handelt es sich vermutlich um ein α 2-Makroglobulin. Im Blut liegen etwa 40 % bis 45 % des GHs in gebundener Form an dem high affinity GHBP vor. Von besonderer Bedeutung für die Hormonwirkung ist das Verhältnis von GH und GHBP, da das GH nur in freier Form eine Wirkung an seinem Rezeptor erzielen kann. Der GH-R ist ein einkettiges Protein, welches der Klasse 1 Zytokinrezeptoren angehört (Kopchick und Andry, 2000). Die Bindungsstellen des Rezeptors werden durch eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine zytoplasmatische Domäne beschrieben (Kelly und Goffin, 1997). Die extrazelluläre Domäne lässt sich wiederum in zwei Subdomänen differenzieren, die durch eine Gelenkregion verbunden werden (Frank, 2002). GH selbst verfügt über zwei Rezeptorbindungsstellen, wodurch eine Bindung an zwei Rezeptoren gleichzeitig ermöglicht wird. Auf diese Weise kommt es zu einer

Dimerisierung, die für eine Signalübertragung notwendig ist (Cunningham et al., 1991; Fuh et al., 1992). Zu hohe GH-Konzentrationen führen zu einer Bindung an die verfügbaren Rezeptoren, wodurch es vermehrt zu unproduktiven monomeren Interaktionen kommt (Frank, 2002). Somit ist das Verhältnis von GHR und GH für die Hormonwirkung ebenfalls entscheidend. Der GHR wird in vielen Geweben des Organismus exprimiert, wo er die Zellproliferation und-differenzierung stimuliert. Eine Hormonwirkung am GH-Rezeptor wird hauptsächlich durch endogenes GH aus dem HVL erzielt. Zusätzlich findet eine lokale GH-Synthese in extrahypophysären Bildungsstätten statt, die vermutlich über para- bzw. autokrine Mechanismen reguliert wird. Zu den bekannten GH-produzierenden Geweben gehören die Milchdrüse, die Plazenta und das Ovar. Auf diese Weise wirkt das Wachstumshormon entweder direkt oder über lokales IGF-1 und nimmt eine funktionelle Rolle in der weiblichen Reproduktion ein (Hull und Harvey 2001). Im humanen Ovar publizierten Schwärzler et al. (1997) einen intraovariellen auto- bzw. parakrinen Wirkmechanismus des Wachstumshormons. Durch die Bindung an den GH-R in den ovariellen Teka-, Granulosa- sowie Lutealzellen ist GH an der Regulierung und Modulierung der Gonadotropinwirkung beteiligt und begünstigt damit sowohl die Steroidogenese als auch die Follikel- und Gametogenese. Die Anwesenheit des GHRs im bovinen Ovidukt (Kirby et al., 1996) deutet auf einen GH- induzierten Wirkungsmechanismus im Eileiter hin. Vor der Fertilisation zeigen immunhistologische Untersuchungen eine GHR-Expression im Zytoplasma der zilientragenden Zellen. Dies bestätigen auch Steffl et al. (2009), die im Östrus und Metöstrus die stärkste GHR-Expression im Zytoplasma der zilientragenden Zellen nachweisen. Während die GHR-Synthese in der bovinen Ampulla nach einer Befruchtung (3,5 Tage) stoppt (Kölle, 2009, persönliche Mitteilung), ändert sich die GHR-Expression in der porcinen Ampulla nicht durch eine frühe Trächtigkeit (2-3 Tage) (Steffl et al., 2009). Die Synthese von GH konnte weder immunhistologisch noch auf mRNA-Ebene im porcinen Eileiter gezeigt werden (Steffl et al., 2009). Im bovinen gereiften Kumulus Oozyten Komplex wird der GHR sowohl in den Kumuluszellen als auch in der Oocyte exprimiert (Kölle, 2009, persönliche Mitteilung). Nach der Befruchtung ist das GHR-Protein erstmals in 3 Tage alten bovinen Embryonen im Zytoplasma der Blastomere nachzuweisen (Kölle et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt erreicht der frühe Embryo den Uterus. Während im Endometrium vor der Fertilisation keine Expression des GHRs gezeigt werden kann, findet 3,5 Tage nach der Fertilisation eine starke GHR-Synthese im

luminalen und glandulären Epithel statt (Kölle, 2009, persönliche Mitteilung). Während die embryonale GHR-Expression an Tag 5 im Zytoplasma und in den Kernen der Morula lokalisiert ist, exprimieren Blastozysten an Tag 8 den GHR in der inneren Zellmasse (Kölle et al., 2001). Von einer funktionellen Wirkungsweise des Rezeptors ist allerdings erst ab Tag 6 der Embryogenese auszugehen. Die embryonale Synthese der GH mRNA wurde erst ab Tag 8 in vitro kultivierter Embryonen nachgewiesen. Auf Proteinebene konnte embryonales GH jedoch nicht detektiert werden, was darauf hinweist, dass die Transkription des GH-Gens zu einem späteren embryonalen Entwicklungsstadium beginnt, als die des GHR-Gens. Die Aktivierung des GHRs durch eine maternale hypophysäre GH-Synthese oder einer GH-Sekretion im Ovidukt und Endometrium wird diskutiert. Jedoch liegen bisher noch keine Studien zur GH-Synthese im Endometrium während der ersten Tage der Trächtigkeit vor. Bekannt ist allerdings die fördernde Wirkung von exogenem GH auf die präimplantatorische Embryonalentwicklung von in vitro produzierten Embryonen, die sowohl durch eine Modulierung des Kohlenhydrat- Fett- und Energiemetabolismus als auch durch eine Beeinflussung des Transportprozesses im frühen in vitro fertilisierten Embryo hervorgerufen wird (Kölle et al., 2004). Außerdem zeigen Analysen von Kölle et al. (2001), dass eine GH-Behandlung an 6 bis 8 Tage alten in vitro kultivierten Embryonen zu einer Eliminierung von Glykogen aus der inneren Zellmasse und zu einem Anstieg der Lipidexozytose in der Blastozyste führt.

3 Eigene Untersuchungen – Material

3.1 Untersuchte Tiere

Eileiter und Uteri wurden unmittelbar nach der Schlachtung von Kühen der Rasse Fleckvieh, Schwarzbunte und Rotbunte im Alter zwischen 2 und 8 Jahren in den Schlachthöfen Gießen und Granditz (Österreich) gewonnen. Es wurden ausschließlich gesunde Tiere in die Untersuchungen einbezogen.

Für die Untersuchungen an den Eileitern und Uteri tragender Rinder wurden in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie des Fachbereiches Veterinärmedizin Giessen Kühe definiert besamt. Nach 2,5 bis 4,5 Tagen p.f. wurden die Rinder im Institut für Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen getötet und Eileiter und Uteri entnommen.

3.2 Lösungen, Medien, Puffer

Alcianblau 8GX, pH 2,5

Zunächst wurde eine 1%ige Alcianblau-Lösung hergestellt. Dazu wurde 1 g Alcianblau 8GX (Hopkin and Williams, Chroma, Münster, Deutschland) abgewogen und in 100 ml erwärmter 3 % iger Essigsäure gelöst. Im Anschluss wurde der pH-Wert mit Hilfe eines pH-Meters (Schott AG, Stafford, UK) gemessen und mittels 25 %iger HCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt. Abschließend wurde die Lösung mehrfach filtriert (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

Bouin-Lösung

Die Lösung setzt sich aus 15 Teilen gesättigter wässriger Pikrinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 5 Teilen 37%igem Formalin (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe) und einem Teil Essigsäure (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe) zusammen.

HCl-Lösung (0,1 N)

Um eine 0,1 N HCl-Lösung herzustellen wurden 2,92 ml einer 25 %igen HCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 200 ml Aqua dest. gelöst.

HEPES-Ringer Puffer

Zur Herstellung von einem Liter HEPES-Ringer Puffer wurden folgende Reagenzien in 1 L Aqua dest. gelöst.

Tab. 1: Reagenzien mit zugehöriger Quelle und Mengenangabe zur Herstellung von HEPES-Ringer

Reagenzien	Quelle	Menge
KCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	0,418 g
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	7,97 g
1 M MgCl Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	1 ml
1 M CaCl-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	2,2 ml
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	1,98 g
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	2,38 g

Im Anschluss wurde der pH-Wert an einem pH-Meter ermittelt und auf 7,4 eingestellt. Abschließend wurde die Lösung durch einen Porenfilter (Nalge Nunc International, New York, USA) membranfiltriert.

Hyaluronidase (0,05 %)

Zum Ansetzen der Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden 0,025 g Hyaluronidase abgewogen und erst unmittelbar vor Gebrauch in 5 ml Phosphatpuffer (pH 6,7) gelöst.

Kernechtrot (0,1 %)

Um eine 0,1 %ige Kernechtrot-Lösung zu erhalten, wurden 0,2 g Kernechtrot (Chroma Münster, Deutschland) für 5-10 min. in 200 ml 5 %iger Aluminiumsulfatlösung (Schmid GmbH & Co., Stuttgart-Untertürkheim, Deutschland)

gekocht. Nachdem die resultierende Lösung abgekühlt war, wurde sie einer Filtration (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) unterzogen.

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)

Ein 5 l PBS-Puffer beinhaltet folgende Bestandteile.

- 1) 28,75 ml einer 0,2 M Lösung A
- 2) 96,2 ml einer 0,2 M Lösung B
- 3) 22,4 g NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Zur Herstellung der Lösungen A und B wurden die in der Tabelle aufgeführten Reagenzien jeweils mit 1 l Aqua dest. in Lösung gebracht.

Tab.2 : Reagenzien mit der zugehörigen Quelle und Mengenangabe zur Herstellung von PBS

Lösungen	Reagenz	Quelle	Menge
Lösung A	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	31,2 g
Lösung B	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland	35,6 g

Nach der Mischung der drei Hauptbestandteile wurde der Puffer auf 5 l aufgefüllt und am pH-Meter auf 7,4 eingestellt.

0,2 M Phosphatpuffer (pH 6,7)

Es wurden 115 ml der Stammlösung A (PBS-Puffer) und 385 ml der Stammlösung B (PBS-Puffer) gemischt und mit Aqua dest. auf 500 ml ergänzt. Mittels des pH-Meters wurde der pH-Wert auf 6,7 eingestellt.

Sylgardgel 18

Zur Erstellung des Sylgardgel 184 (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) wurden 9 Teile der Sylgard 184 Base und 1 Teil des Sylgard 184 Härters abgewogen und bei Raumtemperatur für 2 Stunden miteinander vermengt.

Für eine weitere Stunde wurde das Gemisch in einen Exsikkator mit Unterdruckpumpe gestellt. Entstandene Luftblasen wurden auf diese Weise aus dem Gel entfernt. Nun konnten 1,2 ml der zähen Flüssigkeit mittig auf einem Delta T-Dish 0,17 mm, klar (Bioprotechs Inc., Butler, USA) aufgegossen und gleichmäßig über den Boden verteilt werden. Um eine Aushärtung des Gels zu erreichen, verblieb es über Nacht bei 60 °C im Wärmeschrank (Mettler GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland).

3.3 Pharmaka

Die verwendeten Pharmaka sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 3: Auflistung der eingesetzten Pharmaka mit Quellenangabe

Pharmaka	Quelle
Hyaluronsäure (von bovine vitreous humor)	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, NJ
Progesteron	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wachstumshormon (von bovine pituitary)	Sioux Biochemical Industry, IA

4 Eigene Untersuchungen – Methoden

4.1 Probengewinnung

Die Uteri wurden samt Eileiter und Ovarien unmittelbar nach der Schlachtung durch einen Schnitt kaudal der Zervix und der Durchtrennung vom Ligamentum latum uteri und Ligamentum teres uteri entnommen. Für den Transport wurden die Proben auf Eis gelagert.

4.2 Zyklusbestimmung

Die Bestimmung des Zyklusstandes setzte sich durch eine Beurteilung der Ovarien, der Eileiter, der Uteri und der Zervix zusammen. Dabei wurden folgende Punkte dokumentiert.

Ovar:

- Größe und Symmetrie
- Follikel
- Corpus Luteum
 - o Anbildung
 - o Blüte
 - o Rückbildung

Eileiter:

- Durchmesser und Symmetrie
- Vaskularisation (- bis +++)

Uterus:

- Größe und Symmetrie
- Schleimhaut
 - o Schleim (- bis +++)
 - o Farbe
 - o Ablagerungen
- Anwesenheit von Karunkeln

Zervix:

- Öffnungsgrad (- bis +++)
- Schleim (- bis +++)

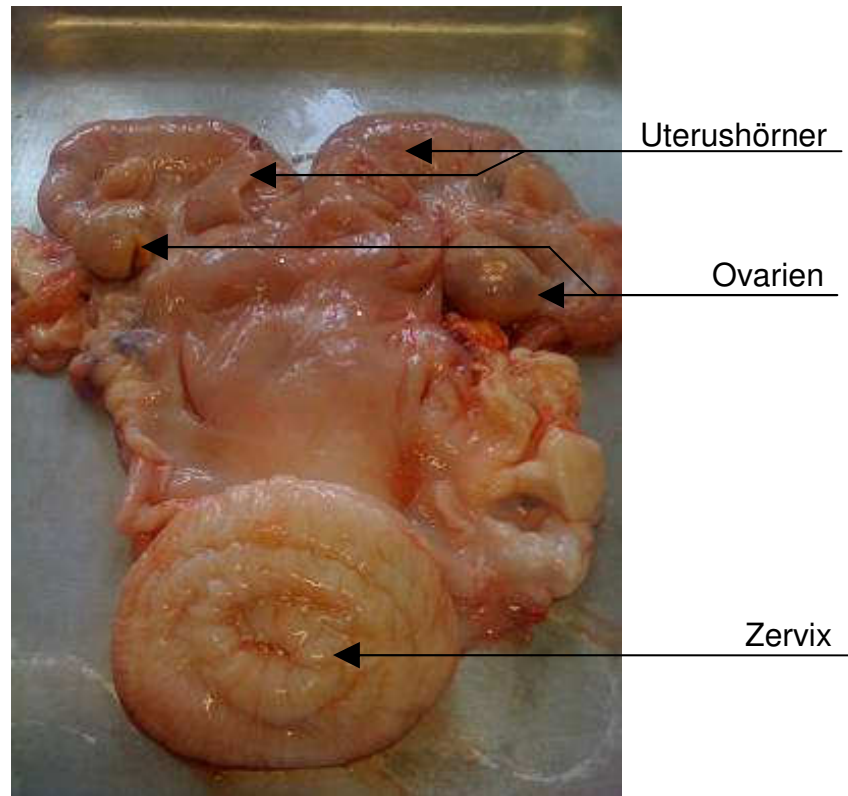






Abb. 2: Freipräparierter Uterus mit Eileiter und Ovarien

Zur Kontrolle diente eine mikroskopische Charakterisierung des Epithels. Eine Differenzierung zwischen sekretorischer oder proliferatorischer Phase des Epithels wurde bei den eingebetteten Proben anhand histologischer Färbungen und bei den unfixierten Proben direkt unter dem Videomikroskop vorgenommen. Eine Kombination dieser Befunde stellte die Basis zu einer sicheren Zyklusdiagnostik dar.

In der folgenden Tabelle wird verdeutlicht wie die Zyklusstände makroskopisch differenziert wurden.

Tab. 4: Makroskopische Merkmale an Ovar, Uterus und Zervix zur Zyklusbestimmung

Zyklusstand	Ovar	Eileiter	Uterus	Zervix
Proöstrus	<ul style="list-style-type: none"> - viele kleine Follikel < 1,2 cm - C.L. albicans 	<ul style="list-style-type: none"> - ø normal - normale Vaskularisation 	<ul style="list-style-type: none"> - kein Schleim 	<ul style="list-style-type: none"> - geschlossen - kein Schleim
Östrus	<ul style="list-style-type: none"> - dominante Follikel (Graaf) - 2 - 2,5 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - ø erweitert - stark vaskularisiert 	<ul style="list-style-type: none"> - viel Schleim 	<ul style="list-style-type: none"> - weit geöffnet - viel zähflüssiger Schleim 
Metöstrus	<ul style="list-style-type: none"> - kleine Follikel - C.L. haemorrhagicum 	<ul style="list-style-type: none"> - ø erweitert - deutlich vaskularisiert 	<ul style="list-style-type: none"> - wenig Schleim - blutige Beimengungen 	<ul style="list-style-type: none"> - leicht geöffnet - wenig Schleim
Diöstrus	<ul style="list-style-type: none"> - kleine Follikel - C.L. - Anbildung (wenig erhaben, rötliche Färbung) - Blüte (Sektorkorkenförmig, gelb, nimmt Großteil des Ovars ein) - Rückbildung (verliert gelbe Farbe) 	<ul style="list-style-type: none"> - ø normal - normale Vaskularisation 	<ul style="list-style-type: none"> - kein Schleim 	<ul style="list-style-type: none"> - geschlossen - kein Schleim

4.3 Präparation

Um den Eileiter vom Uterus zu selektieren, wurde eine mittelgroße gebogene Schere verwendet und das Ovidukt samt Ovar und utero-tubaren Übergang durch die Trennung vom Mesosalpinx herausgeschnitten. Der separierte Eileiter wurde auf einem Schneidebrett aus Kork ausgestreckt und mit 20 G Kanülen (Braun, Melsungen, Deutschland) am Ovar und utero-tubaren Übergang fixiert. Eine anschließende Benetzung des zu präparierenden Eileiters mit HEPES bewahrte das Probenmaterial vor der Austrocknung. Mittels einer mittelgroßen anatomischen Pinzette (JST Instruments, Leeds, UK) und eines Klingemessers (C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland) erfolgte die Beseitigung des umliegenden Mesosalpinx, so dass das Ovidukt gestreckt werden konnte. Darauf folgte eine Separierung der Ampulla in ca. 1 cm große Stücke. Diese wurden zur weiteren Verwendung in 35 mm x 10 mm Plastikschälchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit HEPES aufbewahrt.

4.4 Fixierung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die ca. 1 cm langen Eileiterstücke je nach Experiment entweder direkt oder gleich nach der Inkubation mit Hormonen und Pharmaka für 24 h in Bouin-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Proben in 70 %igem Ethanol gespült (3 Tage, 2 x täglich), um die Fixans aus dem Gewebe zu entfernen. Im Einbettautomat (Leica, Wetzlar, Deutschland) erfolgte eine Entwässerung der Proben, bevor diese in Förmchen mit flüssigem Paraffin platziert wurden. Eine in die Aufgießstation (Leica, Wetzlar, Deutschland) integrierte Kühlplatte diente der schnellen Erhärtung der Paraffinblöcke, so dass diese aus der Form gelöst werden konnten. Zur Erstellung der Schnitte wurden die Paraffinblöcke erneut auf einer Kühlplatte verdichtet. Anschließend wurde der Block in das Rotationsmikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) eingespannt und 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden darauf hin in einem warmen (60 °C) Wasserbad (Memmert, GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) gestreckt und auf beschichteten Objektträger platziert.

4.5 Morphologische Charakterisierung des Eileiters

Für einen morphologischen Vergleich von Eileiter und Uteri trächtiger (3,5 -4,5 Tage) (n = 4) und zyklischer Rinder (Metöstrus) (n = 4) diente eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE). Die HE-Färbung stellt eine Übersichtsfärbung dar, wobei sich die Kerne (lila) farblich vom Zytoplasma (rosa) absetzen. Folgende Parameter wurden berücksichtigt.

- 1) Differenzierung der sekretorischen, zilientragenden und Basalzellen
- 2) Epithelhöhe

Die Durchführung der HE-Färbung wurde nach dem in der Tabelle 5 dargestellten Ablauf umgesetzt.

Tab. 5: Hämatoxylin – Eosin Färbeprotokoll

Arbeitsschritt	Material	Dauer	Quelle
1. Entparaffinieren und Rehydrieren	Xylol	3 x 10 min.	Merck, Darmstadt, D
	100 % Ethanol	2 x 5 min.	
	96 % Ethanol	5 min.	
	80 % Ethanol	5 min.	
	70 % Ethanol	5 min.	
Aqua dest.	5 min.		
2. Färbung	Hämatoxylin	20 sec.	Anatomical Pathology International Runcorn, Cheshire, GB
3. Bläuen	Leitungswasser (fließend)	10 min.	
4. Gegenfärbung	Eosin	5 min.	Merck, Darmstadt, D
5. Spülen	Aqua dest.	5 min.	
6. Dehydrieren	70 % Ethanol	5 min.	
	80 % Ethanol	5 min.	
	96 % Ethanol	5 min.	
	100 % Ethanol	2 x 5 min.	
	Xylol	3 x 10 min.	
7. Eindeckeln	Vitro Clud		R.Langenbrinck, Teningen, D Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
	Deckgläser		

4.6 Histochemische Untersuchung des Eileiters

Es wurden Eileiter und Uteri von unbefruchteten (Metöstrus) (n = 4) mit trächtigen Rindern (3,5 – 4,5 Tage) (n = 4) verglichen sowie Veränderungen während des Zyklus (Östrus: n = 8, Metöstrus: n = 12, Diöstrus Blüte: n = 11, Proöstrus: n = 8) gegenübergestellt. Zudem wurde der Einfluss von Progesteron (Östrus: n = 7, Metöstrus: n = 6, Diöstrus Blüte: n = 5, Proöstrus: n = 5), Hyaluronsäure (Östrus: n = 3, Metöstrus: n = 6, Diöstrus Blüte: n = 4, Proöstrus: n = 4) und des Wachstumshormons (Östrus: n = 4, Metöstrus: n = 3, Diöstrus Blüte: n = 4, Proöstrus: n = 4) an Eileitern zyklischer Rinder untersucht.

4.6.1 Perjodsäure Schiff Reaktion (PAS)

Die PAS Färbung weist neutrale Glykosaminoglykane und Glykogene nach. Eine zusätzliche α -Amylase-Behandlung bewirkt einen enzymatischen Verdau von Glykogenen, wodurch selektiv auf die Menge ihrer Anwesenheit geschlossen werden konnte. Die PAS-Färbung wurde nach dem Ablauf der folgenden Tabelle 6 durchgeführt.

Tab. 6: Perjodsäure – Schiffs Färbeprotokoll

Arbeitsschritt	Material	Dauer		Quelle
		PAS o. Amylase	PAS m. Amylase	
1. Entparaffinieren und Rehydrieren	Xylol	3 x 10 min.	3 x 10 min.	Merck, Darmstadt, D
	100 % Ethanol	2 x 5 min.	2 x 5 min.	
	96 % Ethanol	5 min.	5 min.	
	80 % Ethanol	5 min.	5 min.	
	70 % Ethanol	5 min.	5 min.	
Aqua dest.	5 min.	5 min.		
2. Amylaseverdau	0,5 % α -Amylase		10 min.	Merck, Darmstadt, D
3. Waschen	Aqua dest.		Kurz	
4. Hydrolyse	0,1 % Perjodsäurelösung	10 min.	10 min.	Merck, Darmstadt, D
5. Wässern	Leitungswasser (fließend)	10 min.	10 min.	
6. Waschen	Aqua dest.	Kurz	Kurz	
7. Färbung	Schiffs Reagenz	20 min.	20 min.	Merck, Darmstadt, D
8. Wässern	Warmes (37 °C) Leitungswasser (fließend)	5 min.	5 min.	
9. Waschen	Aqua dest.	2 x 2min.	2 x 2min.	
10. Gegenfärbung	Hämalaun	1 min.	1 min.	
11. Bläuen	Leitungswasser (fließend)	10 min.	10 min.	
12. Dehydrieren	70 % Ethanol	5 min.	5 min.	
	80 % Ethanol	5 min.	5 min.	
	96 % Ethanol	5 min.	5 min.	
	100 % Ethanol	2 x 5 min.	2 x 5 min.	
	Xylol	3 x 10 min.	3 x 10 min.	
13. Eindeckeln	Vitro Clud			R.Langenbrinck, Teningen, D Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
	Deckgläser			

4.6.2 Alcianblau-Färbung

Die Anwendung der Alcianblau-Färbung diente dem Nachweis von sauren Glykosaminoglykanen, wobei diese durch eine blaue Anfärbung visualisiert wurden. Da mit einem pH-Wert von 2,5 gearbeitet wurde, sind sowohl Sulfat- als auch Karboxylgruppen erkannt worden. Die Färbung wurde entsprechend des folgenden Protokolls ausgeführt (Tab. 7).

Tab. 7: Alcianblau-Färbeprotokoll

Arbeitsschritt	Materiale	Dauer	Quelle
1. Entparaffinieren Rehydrieren	Xylol 100 % Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest	3 x 10 min. 2 x 5 min. 5 min. 5 min. 5 min. 5 min.	Merck, Darmstadt, D
2. Erythrolyse	3 % Essigsäure	3 min.	Carl Roth GmbH Und Co.KG, Karlsruhe, D
3. Färbung	Alcianblau	30 min.	Hopkin and Williams, Chadwell Heath Essex, GB
4. Erythrolyse	3 % Essigsäure	kurz	
5. Waschen	Aqua dest.	kurz	
6. Gegenfärbung	0,1 % Kernechtrot	5 min.	Merck, Darmstadt, D
7. Waschen	Aqua dest.	kurz	
8. Dehydrieren	70 % Ethanol 80 % Ethanol 96 % Ethanol 100 % Ethanol Xylol	5 min. 5 min. 5 min. 2 x 5 min. 3 x 10 min.	
9. Eindeckeln	Vitro Clud Deckgläser		R.Langenbrinck, Teningen, D Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D

4.7 Immunhistologische Untersuchungen des Eileiters und Uterus

Ein Vergleich der Progesteronrezeptor (PR)-Expression im Eileiter und Uterus unbefruchteter (Metöstrus) (n = 4) und trächtiger (3,5-4,5 Tage) (n = 4) Rinder wurde mit Hilfe des Antikörpers (AK) PR SP2 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA) untersucht. Der im Kaninchen produzierte monoklonale AK erkennt die Isoformen A (116 kDa) und B (81 kDa) und richtet sich gegen ein Epitop, welches mit der Aminosäure (aa) Sequenz 412 – 526 des humanen PRs korrespondiert. Ein Proteinabgleich des Paratops des AKs mit dem bovinen PR mittels BLAST ergibt eine Übereinstimmung von 76 %. Die spezifische Region des bovinen Antigens befindet sich bei der Aminosäure (aa) Sequenz 3 – 70 (BLAST). Um die Rolle des PRs zu charakterisieren, wurden Eileiter und Uteri tragender (3,5-4,5 Tage) und nicht tragender Rinder (Zyklusstand Metöstrus) untersucht. Ein Vergleich der ipsi- und kontralateralen Seite sollte Aufschluss über einen möglichen direkten Effekt des Embryos geben. Die immunhistologische Untersuchung wurde wie folgt durchgeführt: Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zur Entfernung der endogenen Peroxidase zunächst für 15 min. 3 %igem H₂O₂-Konzentrat (Verdünnung 1 : 50) (Merk, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Leitungswasser wurden die Objektträger in der Mikrowelle (700 Watt) in Tris-EDTA-Puffer (Target Retrieval pH 9: Dako, Glostrup, Dänemark) erhitzt. Um eine gleichmäßige Wärmeverteilung zu gewährleisten, wurden die Küvetten in ein Wasserbad gestellt. Nach dreimaligem Erwärmen der Schnitte für je 5 min. wurden die Küvetten aus der Mikrowelle genommen und für 20 min. stehen gelassen. Die abgekühlten OT wurden mittels Coverplates (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA) in den Immunfärbearomat Shandon Sequenza (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA) verbracht und 1 x 5 min. mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die OT jeweils mit 100 µl Normalserum (Ziege) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu blocken. Schließlich wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper SP2 (Verdünnung 1 : 40 in PBS) inkubiert (ü. N., 4 °C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Schnitte mit dem sekundären AK (Verdünnung 1 : 100, 30 min. RT) (anti-rabbit EnVision™: Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Nach einem weiteren Spülvorgang wurden die Schnitte in einer Färbelösung (DAB Tablette (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in TRIS-HCl Puffer (pH 7,4) und 3 % iger H₂O₂) für 10 min. entwickelt. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100

%, je 5 min.) wurden die Schnitte mit Xylol behandelt (2 x 10 min.) und mit Vitro Clud eingedeckelt.

4.8 Mikroskopische Auswertung

Die histologischen Präparate wurden mit Hilfe eines DM 1000 LED Lichtmikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Mittels einer integrierten Kamera wurden Bilder in den Vergrößerungen x 10, x 20, x 40 und unter einem Ölimmersionobjektiv (Leica, Wetzlar, Deutschland) x 100 erstellt.

Mit Hilfe des Programms ImageJ wurde sowohl die Zellhöhe in den unterschiedlichen Zyklusstadien als auch die Häufigkeit von PR-positiven Zellkernen und Alcianblau bzw. PAS-positiven Zellen ermittelt. Dazu wurden bei jedem Tier an je 4 Stellen der Ampulla die Epithelhöhe von 50 zilienträgenden Zellen gemessen bzw. 200 Zellen zur Bestimmung der PR-positiven Zellkerne und der Alcianblau- und PAS-positiven Zellen ausgezählt.

4.9 Digitale Videomikroskopie

4.9.1 Probenaufbereitung

Untersucht wurden Eileiter von Rindern im Östrus. Nach der Präparation der Eileiter wurde ein 1 cm langes Stück der Ampulla in einem mit Gel (Sylgardgel 184, Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) beschichteten Delta T-Dish (Biotechs inc., Butler, PA) positioniert und longitudinal geöffnet und ausgebreitet. Minuntien No 15 (Ento Sphinx s.r.o., Pardubice, Tchechen) dienten der Fixierung des ausgestreckten Eileiters. Im Anschluss wurde das Delta T-Dish mit 1,5 ml warmen (RT) HEPES-Puffer beschickt.

4.9.2 Messstand

Sowohl die Messungen im Rahmen der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) als auch der Zilienschlagfrequenz (ZSF) wurden an einem Olympus BX61WI Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Das Mikroskop verfügt neben drei Wasserimmersionsobjektiven (UMPlanFL N 10x/0,30 w, UMPlan FL N 20x/0,50 w, LUMPlanFL N 40x/0,80 w) auch über ein angeschlossenes Thermostat (Biotechs inc. Butler, PA) . Für die Messungen wurde ein Soll-Wert von

37,2 °C eingestellt. Mittels zwei Halteklammern (Bioptechs Inc., Butler, PA) wurde das Delta T-Dish auf dem Mikroskoptisch eingespannt und stand so mit dem heizenden Thermostatfühler an zwei Stellen in Kontakt. Des Weiteren war am Mikroskop eine Lichtquelle (Olympus, Hamburg, Deutschland) sowie eine monochrome Kamera (Sumix Corporation, Oceanside, CA) angeschlossen. Die Kamera war über dem Okular angebracht und erfasste Bilder vom optischen System in bestimmten Frequenzen und übertrug diese an den angeschlossenen Computer. Mittels der installierten Imaginganalysesoftware „StreamPix“ (Norpix Inc., Montral, Kanada) wurde die Messung auf dem Monitor visualisiert und die Aufnahme gestartet. Zur Auswertung der Filmsequenzen diente sowohl für die PTG als auch für die ZSF das Programm „Image-Pro Plus“ (MediaCybernetics Inc., Silver Spring, USA). Zusätzlich sorgte die Software AutoSignal 1.7 (SYSTAT Software GmbH, Erkrath, Deutschland) für die Bestimmung der ZSF.

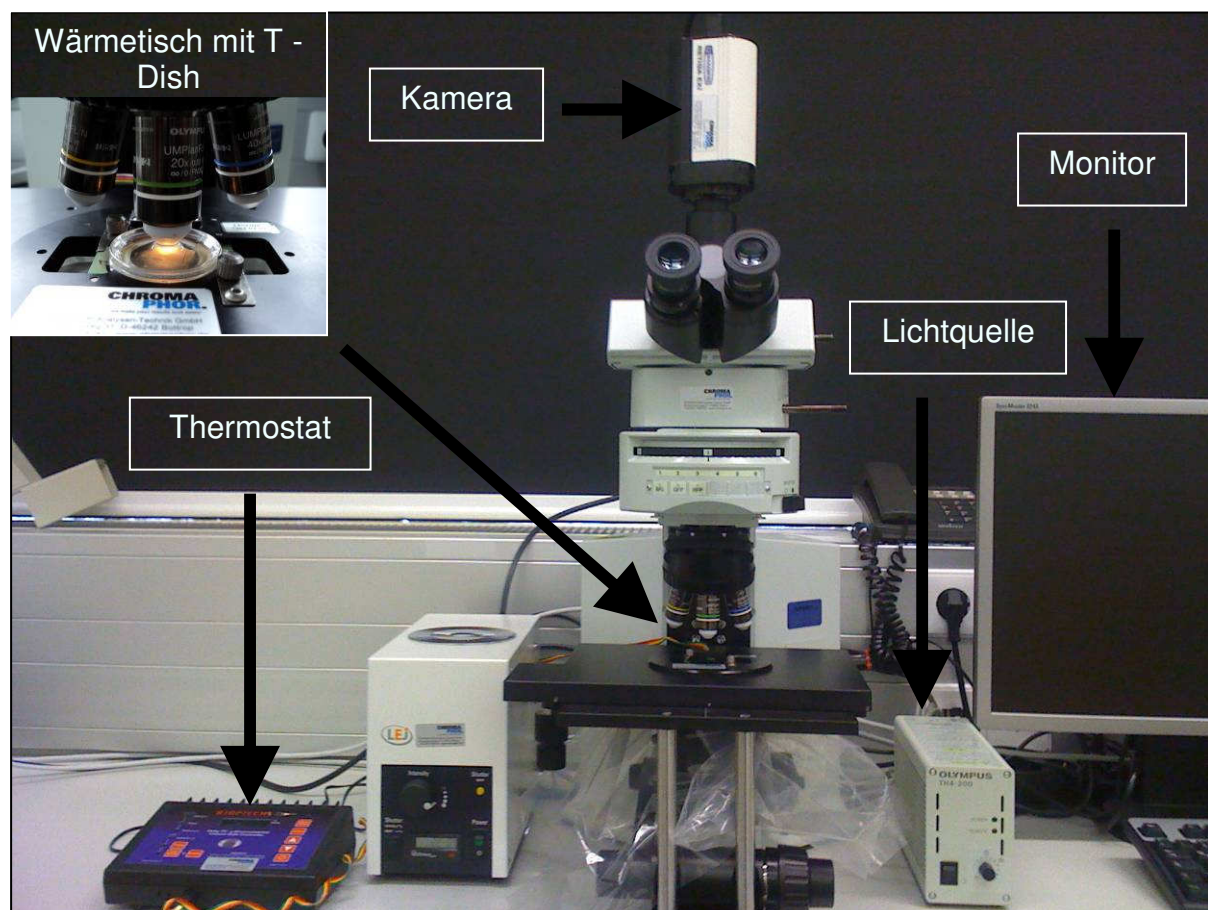


Abb. 3: Digitales videomikroskopisches Analysesystem

4.9.3 Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)

Die Messung der PTG fungiert als Model zur Erfassung der Fließgeschwindigkeit im Eileiter. Der Transport durch das Ovidukt erfolgt durch ein Zusammenspiel der Peristaltik der glatten Muskulatur, des Zilienschlags sowie des luminalen Flüssigkeitsstroms. Basierend auf diesen Einflussgrößen wurde unter Einsatz diverser Pharmaka die kumulative Reaktionsfähigkeit analysiert.

Untersuchte Rinder

Für die Messungen der PTG im Eileiter wurden Ampullastücke von 5 Rindern im Östrus herangezogen. Voruntersuchungen wiesen darauf hin, dass bis zu 8 h p.m. mit einem funktionalen Eileiterepithel zu rechnen ist. Daher fanden die Messungen zwischen 4 und 8 h p.m. statt.

Messvorbereitungen

Vor Messbeginn wurden zunächst die Lichtquelle und das Thermostat des Mikroskops angeschaltet. Um den Thermofühler als auch das Objektiv (UMPlan FL N 20x/0,50 w) vorzuwärmen, wurde ein mit Aqua dest. befülltes Delta T-Dish auf dem Mikroskoptisch eingespannt und so justiert, dass die Linse eingetaucht war. Als nächstes wurde der Computer gestartet und die Imagingsoftware „StreamPix“ (Norix Inc., Montral, Kanada) geöffnet.

Folgende Konfigurationen waren zur korrekten Messung notwendig:

- 1) Bildgröße x: 640, y: 512
- 2) Aufnahmefrequenz: 20Hz
- 3) Bilder pro Sekunde: 49
- 4) Aufnahmen insgesamt: 200 (1 Aufnahme pro 84 ms)

Parallel wurde der Eileiter präpariert, in einem beschichteten Delta T-Dish longitudinal geöffnet, festgepinnt und mit 1,5 ml warmen HEPES-Puffer inkubiert. Im Folgenden wurde das Organsegment enthaltende T-Dish in die Messkammer eingespannt und das Objektiv (UMPlan FL N 20x/0,50 w) eingetaucht. Um bei Messbeginn eine konstante und standardisierte Temperatur im Dish zu erreichen, folgte eine 10 minütige Äquilibration. Während dessen wurde nach einer geeigneten

Messposition gesucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Fokus stets in der gleichen Ebene erfolgte. 3 min. vor der ersten Messung wurden 3 μl (9×10^6) der ca. 2,8 μm großen Polystyrolkugeln (Dynabeads, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) in den Puffer pipettiert. Durch wiederholtes Pipettieren erfolgte eine gleichmäßige Vermengung mit dem Puffer.

Validierung des Versuchablaufes

Zur Erfassung der Partikeltransportgeschwindigkeit im bovinen Eileiter wurden vorab einige Messdurchläufe vorgenommen, um ein optimales Versuchsdesign zu entwickeln. Es zeigte sich, dass die zugefügten Partikel (Dynabeads) im Laufe der Messung absinken und somit weniger im Messfokus erfasst werden können. Ein regelmäßiges Durchmischen der Partikel war aus diesem Grund notwendig. Das Mischen wurde mit einer Pipette (70 μl Volumen) durchgeführt. Um die Geschwindigkeit der zugefügten Dynabeads möglichst unbeeinflusst vom Mischvorgang zu lassen, wurde zunächst versucht, das Eileitersegment geschlossen im Dish zu befestigen und mittels der Durchleuchtung die Partikel zu erfassen. Allerdings stellte sich heraus, dass die Wand des Eileiters zu dick war, um die Dynabeads im Lumen erkennen zu können. Um die Beeinflussung des Mischens bei geöffnetem Eileiter minimieren zu können, wurde zwischen dem Mischvorgang und der nächsten Messung stets 3 Minuten abgewartet, damit die Bewegung des Mediums die Partikelgeschwindigkeit während der Messung nicht beeinflusst.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Progesteronpulvers war eine Suspension in HEPES nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Lösung in Ethanol angesetzt. Die Inkubation erfolgte schließlich mit 3 %igem Ethanolgehalt und einer Progesteronkonzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$. Die ersten Messungen zeigten jedoch, dass ein derartiger Ethanolgehalt im Messgefäß ein verändertes Fließverhalten der Dynabeads verursacht. Die Partikel bewegten sich nicht mehr gradlinig, sondern schwebten (floating) mit stark reduzierter Geschwindigkeit (Abb. 4). Zudem war eine Erfassung der Dynabeads über eine längere Strecke kaum möglich. Um den alleinigen Effekt des Ethanol zu erfassen, wurde eine Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Ethanol durchgeführt. Bei der Applikation von 0,06 % Ethanol konnte kein derartiger Einfluss auf die Partikel gezeigt werden. Für die folgenden Messungen wurde P daher in Ethanol gelöst und in einer Endkonzentration von 0,06 % Ethanol verwendet.

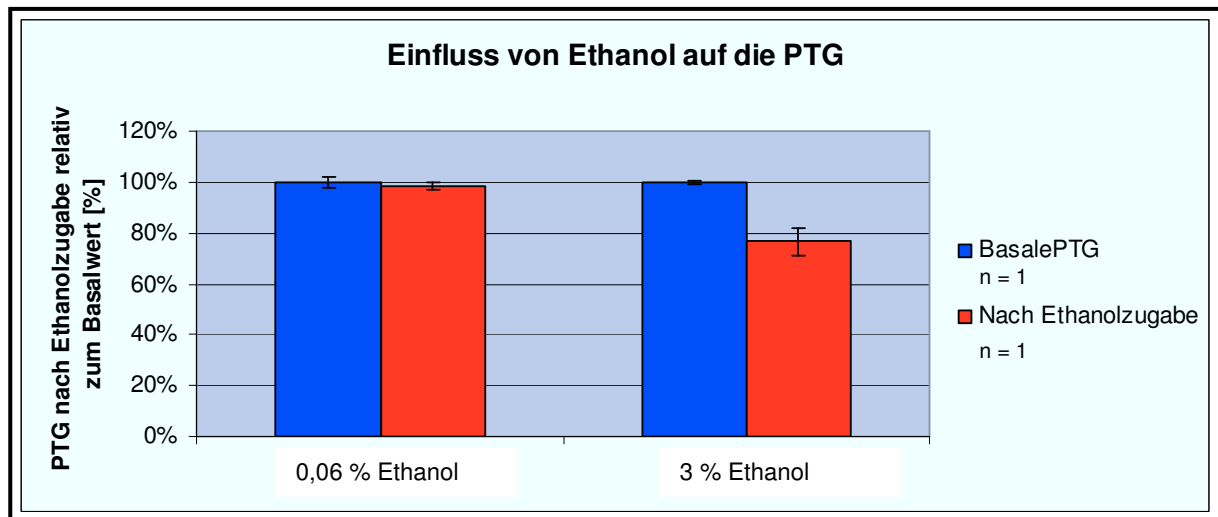


Abb. 4: Einfluss von Ethanol auf die PTG relativ zum Basalwert

Ein Ethanolgehalt von 3 % beeinflusst das Fließverhalten der Partikel, so dass es zu einem deutlichen Abfall der PTG kommt. Eine Ethanolkonzentration von 0,06% im Messgefäß zeigt keine Beeinträchtigung der Dynabeads.

Messungen

Im Rahmen der PTG Messungen wurden folgende Punkte behandelt.

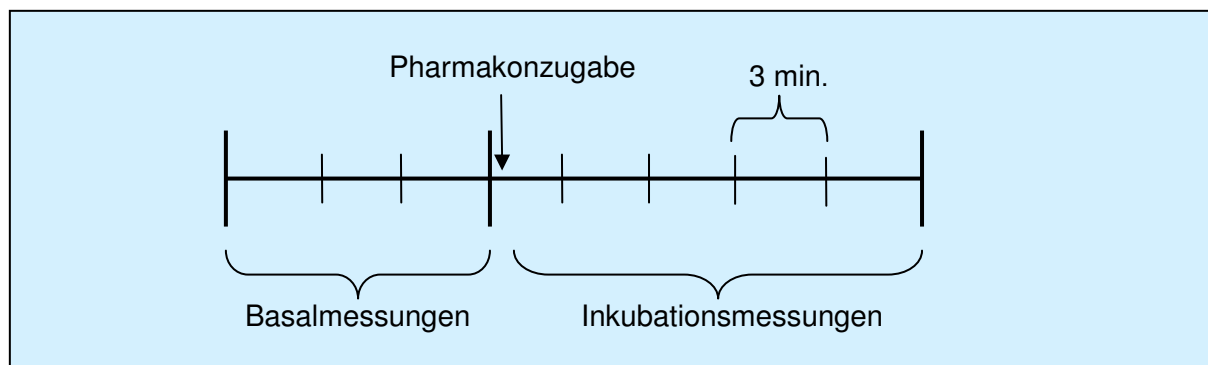
- 1) Basale PTG in der Ampulla und im Isthmus
- 2) Einfluss von HA auf die PTG in der Ampulla
 - ohne Verdau der endogenen HA
- 3) Einfluss von HA auf die PTG in der Ampulla
 - einstündiger enzymatischer Verdau der endogenen HA in 0,05 %iger Hyaluronidase bei 38 °C im Wärmeschrank
- 4) Einfluss von GH auf die PTG in der Ampulla
- 5) Einfluss von P auf die PTG in Ampulla und Isthmus.

Die Messungen folgten alle dem gleichen zeitlichen Ablauf. Dabei erfolgte nach jeder Messung ein erneutes Mischen der Dynabeads, um immer genügend Partikel in der Filmsequenz zu gewährleisten. Die Messungen starteten mit 4 Basalaufnahmen im Abstand von 3 min. und dienten als Kontrollwert der PTG. Anschließend wurden die zu untersuchenden Pharmaka in folgenden Konzentrationen hinzu pipettiert (Tab. 8).

Tab. 8: Verwendete Pharmaka mit jeweiliger Quelle und eingesetzter Konzentrationen zur Messung der PTG

Phamaka	Konzentration	Quelle
Hyaluronsäure	- 50 µg/ml - 150 µg/ml	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, NJ
Progesteron	- 30 µmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wachstumshormon	- 100 ng/ml - 300 ng/ml	Sioux Biochemical Industry, IA

Die Inkubation erstreckte sich über 15 min., wobei alle 3 min. eine Messung stattfand.

**Abb. 5:** Zeitlicher Versuchsablauf der PTG-Messungen.

4.9.4 Messung der Zilienschlagfrequenz (ZSF)

Im Gegensatz zu der PTG wurde der Fokus bei der ZSF-Messung einzig auf die ziliäre Bewegung gelegt. Auf diese Weise konnte die Wirkung verschiedener Pharmaka auf das Reaktionsvermögen des zilientragenden Epithels separiert untersucht werden.

Untersuchte Rinder

In die Messungen gingen ausschließlich Eileiter gesunder Rinder ein. Zuvor durchgeführte Experimente hatten ergeben, dass die physiologische Funktionalität des Eileiters bis zu 8 h nach dem Tod konstant bleibt. Die Messungen fanden daher zwischen 4 und 8 h p.m. statt.

Messvorbereitungen

Die Vorbereitungen entsprechen den für die Messung der PTG (siehe 4.9.3). Für die Aufnahme der ZSF wurde jedoch das 40er Objektiv statt dem 20iger verwendet. Zur Erstellung von Filmsequenzen wurde ebenfalls die Imaginganalysesoftware „StreamPix“ gestartet. Die Einstellungen unterschieden sich hingegen bei den beiden Messmethoden. Für die ZSF wurden folgende Konfigurationen vorgenommen:

- 1) Bildgröße: x: 640, y: 480
- 2) Aufnahmefrequenz: 48Hz
- 3) Bilder pro Sekunde: 105
- 4) 1000 Bilder insgesamt.

Außerdem entfällt bei der Messung der ZSF die Zugabe von Dynabeads.

Validierung des Versuchablaufs

Zur Untersuchung der ziliären Bewegung im Eileiter wurden ebenfalls vorab Probemessungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Messungen an Rindereileitern im Metöstrus nicht auswertbar waren, da die Kontraktionen die fokuzierten Zellen ständig aus dem Aufnahmebereich bewegten. Demnach wurden für die Untersuchungen der Zilienschlagfrequenz ausschließlich Eileiterproben von Rindern im Östrus herangezogen. Außerdem stellte sich heraus, dass innerhalb eines Versuchs der Fokus unbedingt auf der gleichen Stelle bleiben muss, da die

Vergleichbarkeit von unterschiedlichen Stellen nicht gewährleistet ist. Ebenso sollte bei der Auswertung darauf geachtet werden, die gleichen Zellen einzubeziehen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich die Zilienschlagfrequenz innerhalb von 24 h p.m. ändert und wie lange die zelluläre Funktionalität des Eileiterepithels gegeben ist. Die erste Messung erfolgte an Tag 1 (4 h p.m.) und die zweite an Tag 2 (24 h p.m.). Für die Überprüfung der Funktionalität der Eileiterepithelzellen wurde Progesteron als Stimulanz verwendet. Während der Zilienschlag 24 h p.m. die gleiche Frequenz wie 4 h p.m. besitzt (Abb. 6), ist die zelluläre Funktionalität des Eileiterepithels nach 24 h nicht mehr gegeben (Abb. 7).

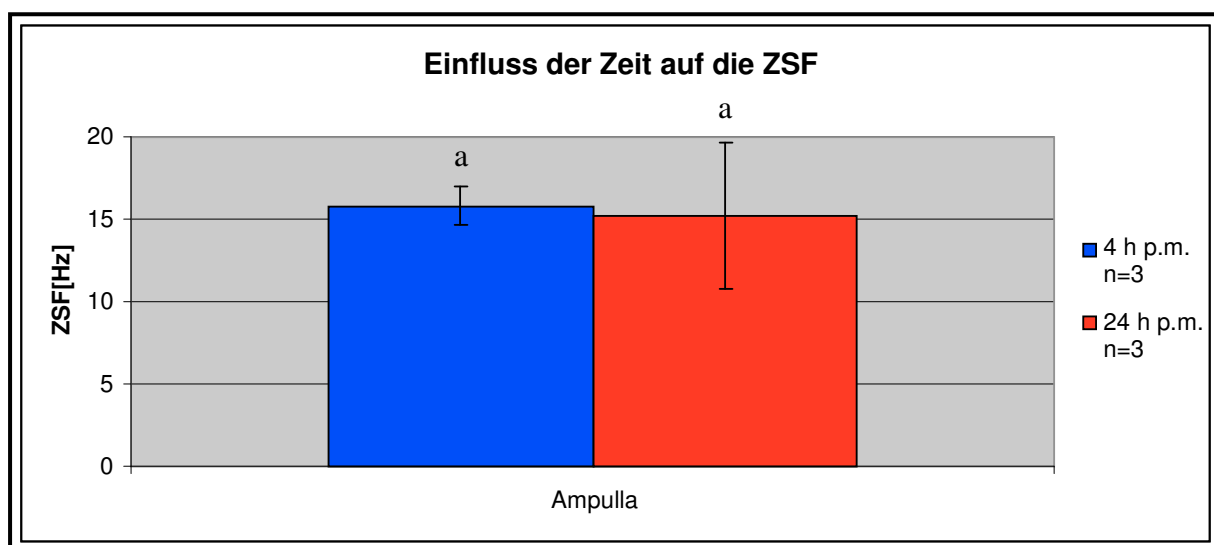


Abb. 6: Einfluss der Zeit auf die ZSF in der Ampulla

Die Frequenz des Zilienschlags gleicht 24 h p.m. der, die 4 h p.m. nachzuweisen ist (t-Test für verbundene Stichproben, $p > 0,05$).

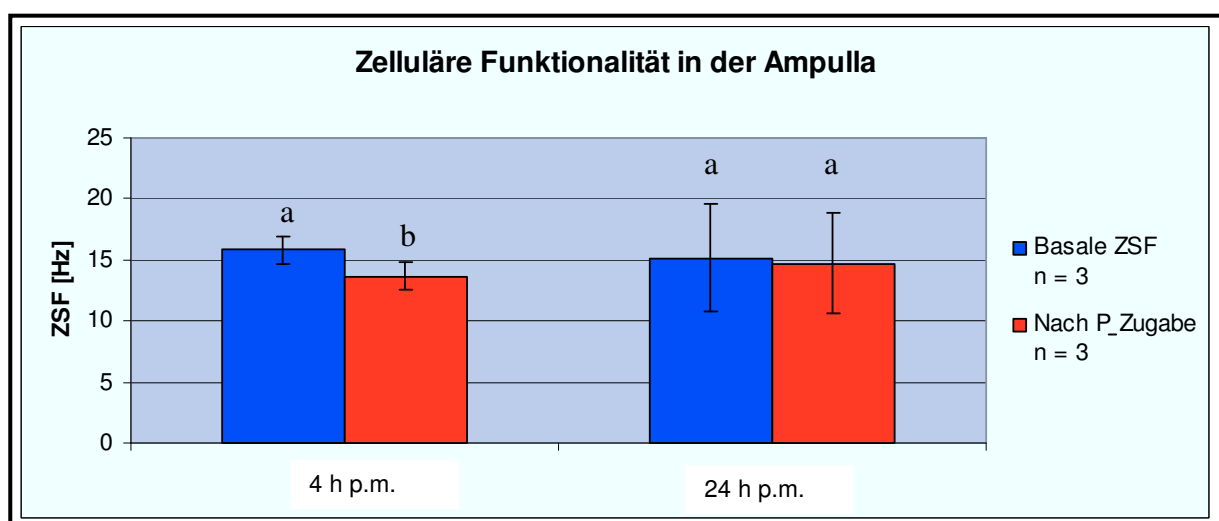


Abb. 7: Zelluläre Funktionalität in der Ampulla

Während durch den signifikanten Abfall der ZSF nach einer P-Inkubation die zelluläre Funktionalität bestätigt wird, ist nach 24 h keine Reaktion mehr auf die P-Zugabe nachzuweisen (t-Test für verbundene Stichproben, $p \leq 0,05$).

Messung

Die Messung der ZSF umfasst folgende Parameter:

- 1) Basale ZSF in der Ampulla
- 2) Einfluss von P auf die ZSF in der Ampulla
- 3) Einfluss von HA auf die ZSF in der Ampulla
 - ohne Vorverdau der endogenen HA
- 4) Einfluss von HA auf die ZSF in der Ampulla
 - einstündiger enzymatischer Verdau der endogenen HA in 0,05 %iger Hyaluronidase bei 38 °C im Wärmeschrank
- 5) Einfluss von GH auf die ZSF in der Ampulla

Alle Messungen folgen dem gleichen zeitlichen Ablauf. Nach der Äquilibration des Organbades und der Fokussierung einer geeigneten Stelle auf dem Epithel startete die Messung. Um zunächst die basale ZSF als Kontrollwert zu erfassen, erfolgten 4 Messungen im Abstand von je 3 Minuten (Abb. 8). Im Anschluss wurde die jeweiligen Pharmaka in der entsprechenden Konzentration (Tab. 9) hinzu pipettiert und gründlich mit dem Puffer vermischt.

Tab. 9: Verwendete Pharmaka mit jeweiliger Quelle und der eingesetzten Konzentrationen zur Messung der ZSF

Pharmaka	Konzentration	Quelle
Hyaluronsäure	50 µg/ml	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
Progesteron	10 µmol/l 30 µmol/l	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wachstumshormon	100 ng/ml	Sioux Biochemical Industry, IA

Es wurde in einem 3-Minutenintervall gemessen. Die Inkubationszeit verlief insgesamt über 15 Minuten.

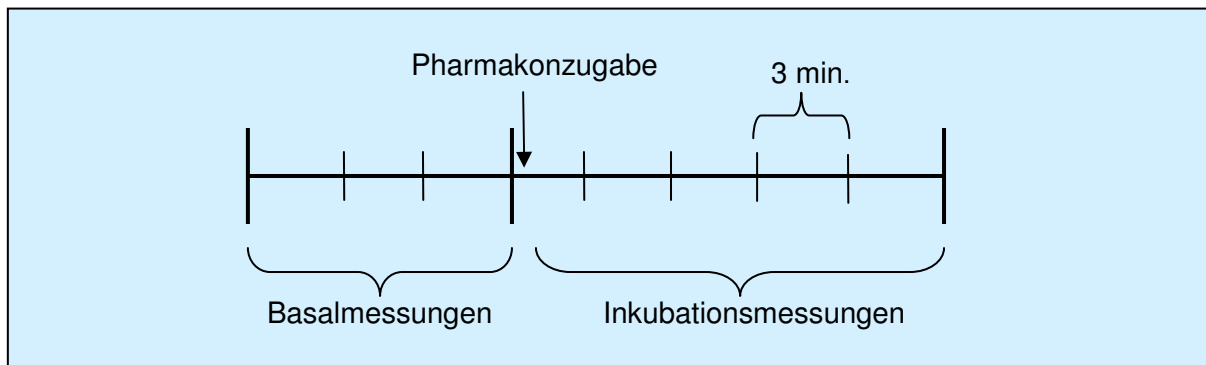


Abb. 8: Zeitlicher Versuchsablauf der ZSF-Messungen.

4.9.5 Digitale Auswertung

Auswertung der Partikeltransportgeschwindigkeit

Die Auswertung der PTG erfolgte mit Hilfe der Software „Image-Pro Plus“ (MediaCybernetics, Inc., Silver Spring, USA). Zunächst wurde die auszuwertende Filmsequenz in diesem Programm geöffnet. Anschließend wurden eine Graustufenkonfiguration von 12 auf 8 bit vorgenommen sowie eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Mittels einer automatischen Prozedur erfasst das Programm markierte Partikel basierend auf einer entstehenden Graustufenänderung, die aus der Partikelbewegung resultiert. Auf diese Weise konnte das Programm den Weg der Partikel nachvollziehen und die Geschwindigkeit durch die zeitliche Komponente berechnen.

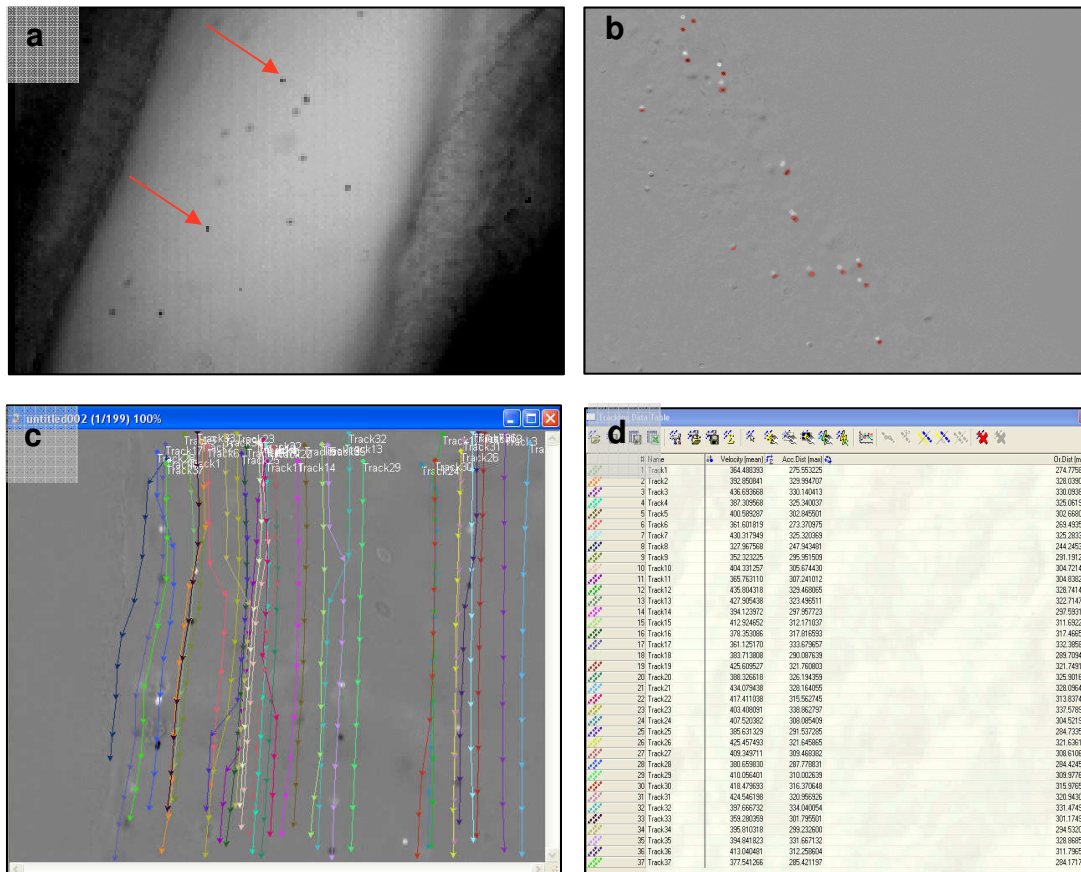
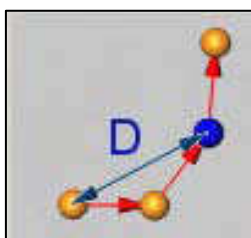


Abb.9: Videomikroskopische Darstellung des Eileitersegments sowie Auswertungsschritte mittels der Software „Image-Pro Plus“

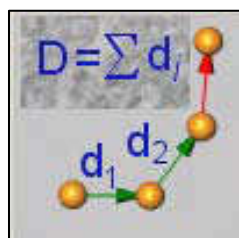
- a) Darstellung der Ampulla unter 20-facher Vergrößerung mit Dynabeads \longrightarrow .
- b) Markierte Dynabeads nach Graustufenveränderung und Hintergrundkorrektur eines aufgenommenen Films.
- c) Darstellung der Position der Partikel zum Zeitpunkt jedes aufgenommenen Images sowie ihr gesamt zurückgelegter Weg (track) innerhalb eines aufgenommenen Films.
- d) Auflistung der erfassten Partikel mit den ermittelten Werten bezüglich drei Parameter.

Zur Berechnung der PTG werden die in der folgenden Darstellung illustrierten Parameter mit Hilfe der Software „Image-Pro Plus“ ermittelt (Abb. 10).

Originale Distanz



Akkumulierte Distanz



Geschwindigkeit.

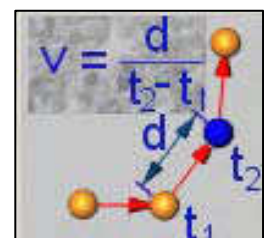


Abb.10: Mittels der Software Image-Pro Plus gemessene Hauptparameter zur Berechnung der PTG

Basierend auf diesen Parametern werden die folgenden Zielgrößen mittels Excel berechnet:

- Durchschnittsgeschwindigkeit aller gemessenen Partikel
- Median
- Durchschnittsgeschwindigkeit der Partikel, die nicht mehr als 15 % vom idealen Weg (direkter Weg zwischen Start- und Endpunkt) abweichen (Partikel $Q < 1,15$).

Auswertung der Zilienschlagfrequenz

Zur Auswertung der ZSF wurde die Filmsequenz zunächst mit dem Programm „Image-Pro Plus“ (MediaCybernetics, Inc., Silver Spring, USA) geöffnet. Mit Hilfe eines Softwarewerkzeuges wurden in jeder Aufnahme mind. 6 zilientragende Zellen einzeln umkreist. Die ausgewählten Zellen bildeten die sogenannten „Areas of interest“, die im Folgenden als Grundlage zur Auswertung dienten. Die Graustufenänderung, die durch die Bewegung der Zilien resultierte, wurde von dem Programm für jede eingekreiste Zelle ermittelt (Abb. 11).

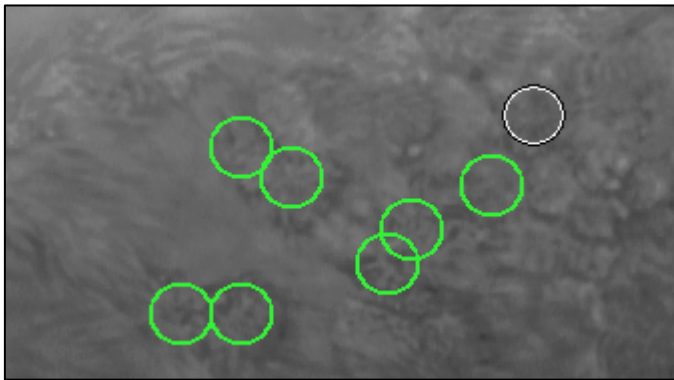


Abb. 11: Aufnahmesequenz der Ampulla unter 40-facher Vergrößerung mit eingekreisten zilientragenden Zellen (AOI = Area of interest) zur Bestimmung der ZSF

Zur Umwandlung dieser Werte in die durchschnittliche Frequenz in Hz wurden die Daten im Programm „AutoSignal“ (SYSTAT Software GmbH, Erkrath, Deutschland) importiert. Mit Hilfe einer Fast Fourier Transformation konnte die durchschnittliche ZSF aller AOI`s aus einer Aufnahme berechnet werden (Abb. 12).

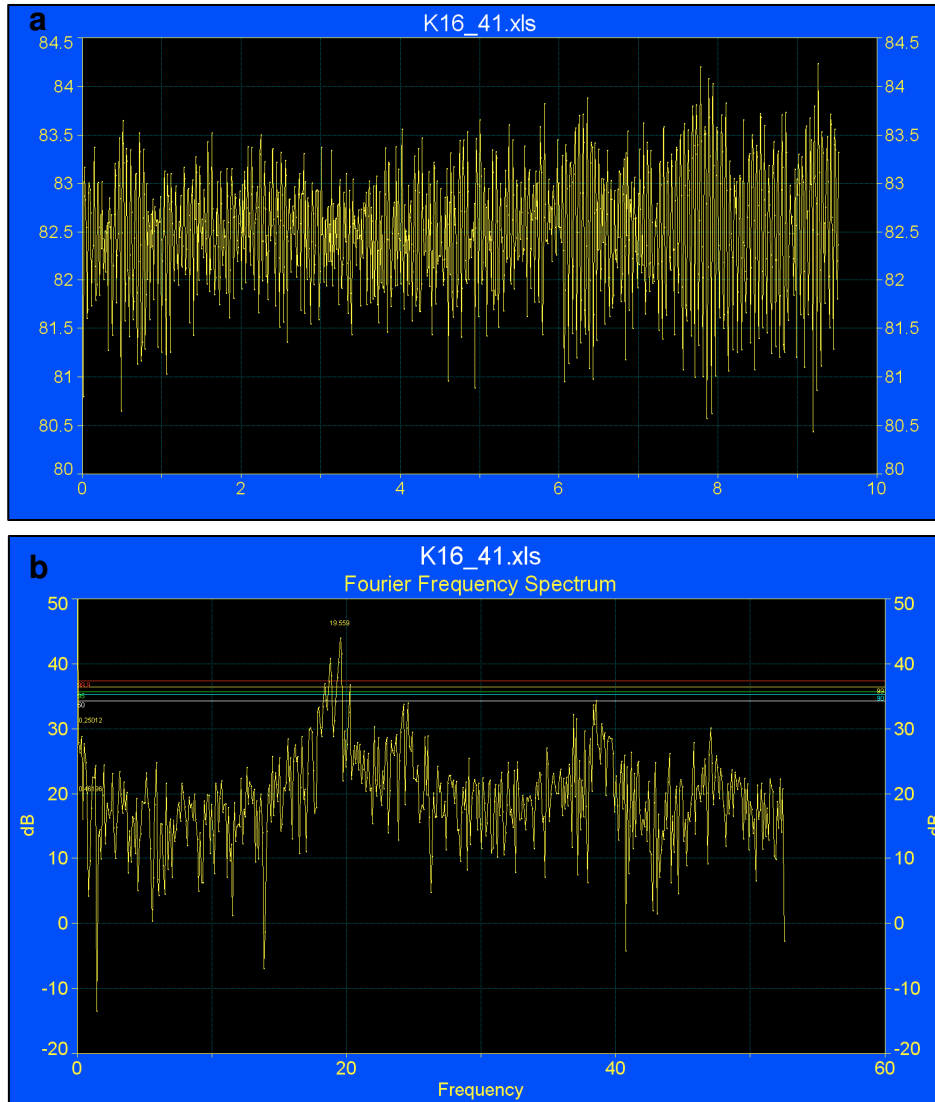


Abb. 12: Beispielhafte Darstellung der Bildverarbeitung zur Analyse der ZSF mittels der „AutoSignal“-Software.

- a) Darstellung der Graustufenveränderung eines Films (1000 Bilder) innerhalb der Areas of interest.
- b) Fourier Frequency Spectrum nach Fast Fourier Transformation des Mittelwertes der Graustufenänderung zur Berechnung der durchschnittlichen ZSF.

4.10 Statistische Auswertung

Zuerst wurden die Daten in Excel übertragen und Mittelwerte wie auch Standardfehler berechnet. Mit Hilfe der Software SPSS 17.0 (SPSS Inc. Headquarters Chicago Illinois, USA) erfolgte eine statistische Datenanalyse.

Unter Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Im Anschluss diente der parametrische t-Test sowohl für eine Stichprobe als auch für verbundene und unabhängige Stichproben zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden. Für multiple Vergleiche wurde eine ANOVA durchgeführt, die im Falle signifikanter Interaktionen mittels des Post-Hoc Tests (Bonferoni) ergänzt wurde. Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant und bei $p \leq 0,01$ als hoch signifikant interpretiert.

5 Ergebnisse

5.1 Morphologische Veränderungen während der frühen Trächtigkeit in Eileiter und Uterus

Zur Analyse trächtigkeitsbedingter Veränderungen der Morphologie im Eileiter und Uterus wurden 4 unbefruchtete (Metöstrus, MÖ) mit 4 trächtigen (3,5 – 4,5 Tage) Rindern verglichen. Eine vergleichende Betrachtung der ipsi- und kontralateralen Eileiter und Uteri zeigt lokale embryoinduzierte Veränderungen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert in μm und mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben.

In der **Ampulla** wird die Höhe der zilientragenden Zellen durch eine frühe Trächtigkeit signifikant reduziert (Abb. 13). Während die Zellhöhe im MÖ $32,4 \pm 1,13 \mu\text{m}$ beträgt, erreicht sie bei trächtigen Rindern nur $28,6 \pm 0,67 \mu\text{m}$.

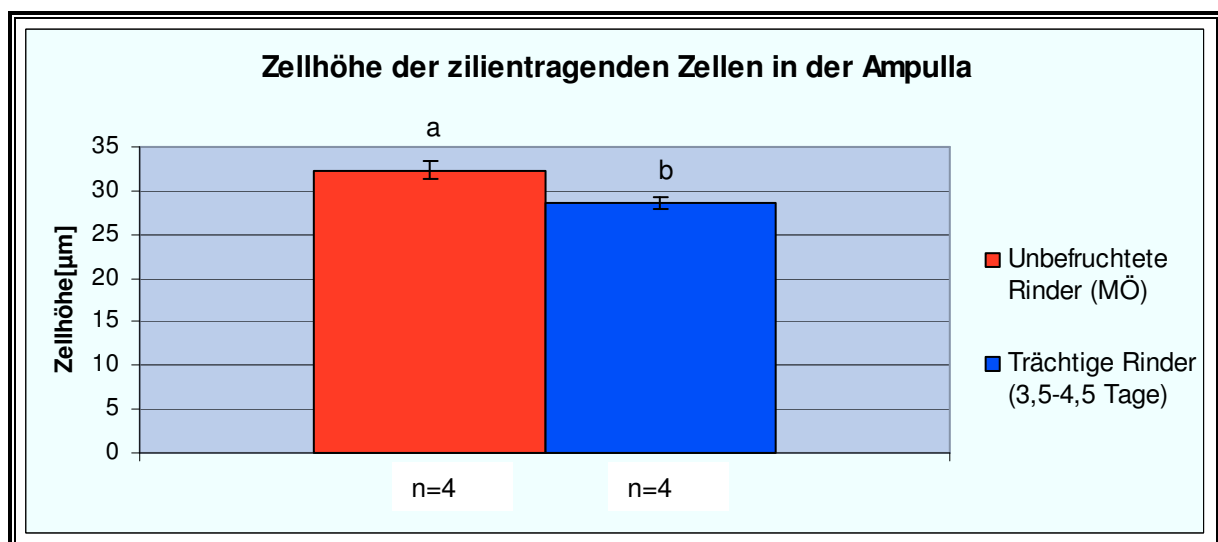


Abb.13: Zellhöhe der zilientragenden Zellen in der Ampulla (MW und SEM)

Die Zellhöhe der zilientragenden Zellen ist in der Ampulla trächtiger Rinder signifikant geringer als bei unbefruchteter Rindern (Metöstrus) (t-Test für unabhängige Stichproben, $p \leq 0,05$).

Während die Zelloberfläche im Metöstrus durch leichte Vorwölbungen der sekretorischen Zellen gekennzeichnet ist, bilden die sekretorischen Zellen in der Ampulla trächtiger Rinder starke Protrusionen, die in das Lumen hineinragen (Abb. 14 c, d). Das Verhältnis der zilientragenden und sekretorischen Zellen ist in der Ampulla im Metöstrus ausgeglichen. In der frühen Trächtigkeit bedingt eine starke Sekretabgabe der sekretorischen Zellen eine Dominanz der zilientragenden Zellen.

Während sich die Kerne der zilientragenden Zellen bei beiden Versuchsgruppen im apikalen Drittel befinden, unterscheidet sich die Lokalisation der Zellkerne in den sekretorischen Zellen. Im Metöstrus liegen diese basal bis mittig im Zytoplasma (Abb. 14 a, b). Durch eine frühe Trächtigkeit wandern die Kerne deutlich an die Zelloberfläche und werden über Vesikel ins Lumen abgegeben (Abb. 14 c, d). Sekretorische Zellen, die Sekret abgegeben haben, sog. Stiftchenzellen, sind sowohl im Epithel trächtiger als auch unbefruchteter Rinder im MÖ vertreten. Unabhängig von einer Trächtigkeit befinden sich Immnzellen in der Lamina epithelialis.

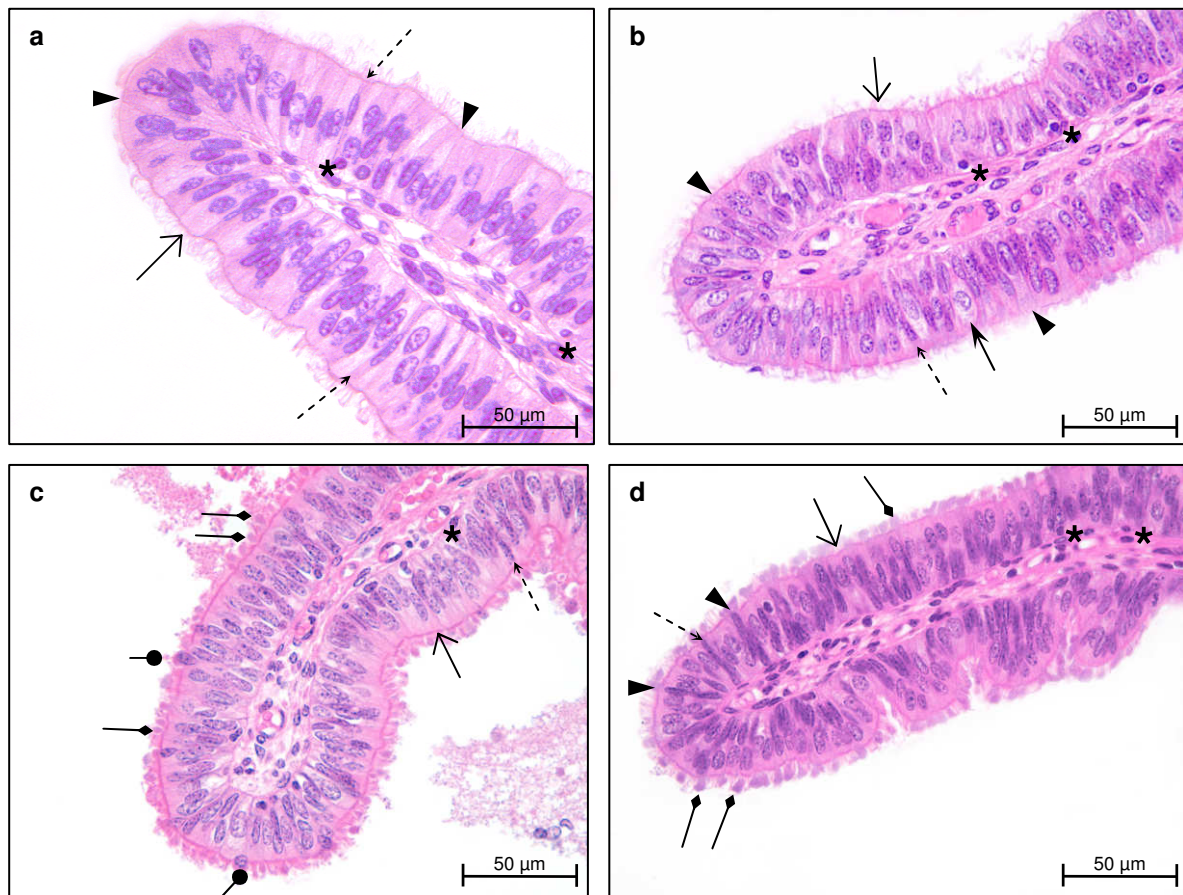


Abb.14: Morphologische Charakterisierung der Ampulla mittels HE-Färbung im Vergleich unbefruchteter (MÖ) und trächtiger Rinder.

Während die Epitheloberfläche im Metöstrus ipsi- (a) und kontralateral (b) durch einen dichten Zellsaum geprägt ist, wölben sich in der Ampulla trächtiger Rinder ipsi- (c) und kontralateral (d) sehr viele Protrusionen (—◆) ins Lumen. Vereinzelt enthalten werden auch kernhaltige Vesikel (—●) aus den sekretorischen Zellen geschleust (c).

Zilientragende Zellen → , sekretorische Zellen ► , Stiftchenzellen --> , Basalzellen * , aufgelöstes Zytoplasma →

Im **Isthmus** gleicht die Höhe zilentragender Zellen im Metöstrus ($30,13 \pm 1,73 \mu\text{m}$) der von trächtigen Rindern ($29,25 \pm 1,5 \mu\text{m}$) (Abb. 15).

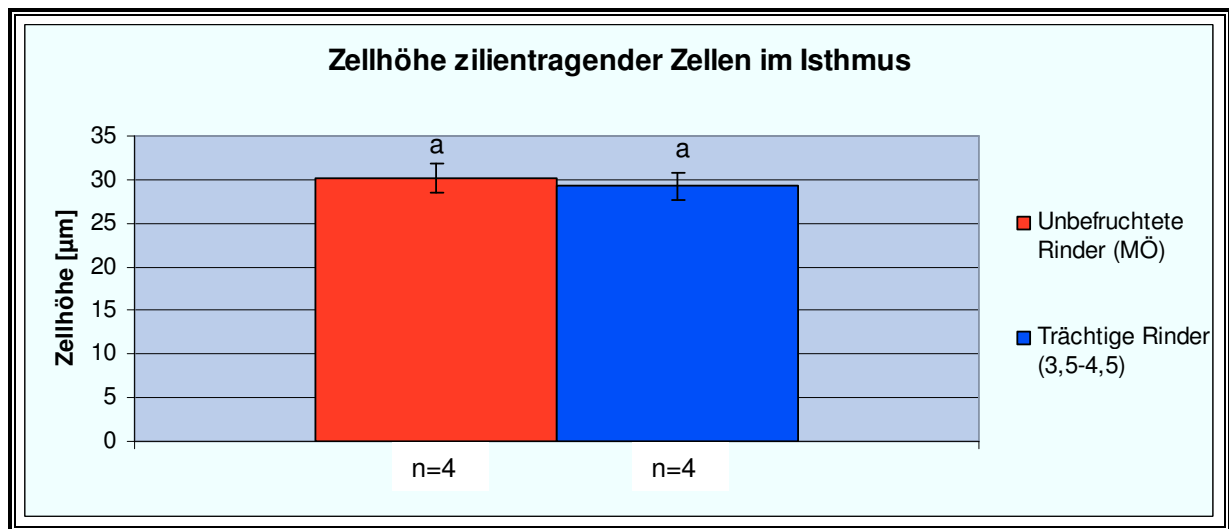


Abb.15: Zellhöhe der zilentragenden Zellen im Isthmus (MW und SEM)

Die Höhe der zilentragenden Zellen entspricht im Isthmus trächtiger Rinder (3,5 – 4,5 Tage) der unbefruchteter Rinder im Metöstrus (t-Test für unabhängige Stichproben, $p > 0,05$).

Im Isthmus gleichen sich morphologische Charakteristika in der Lamina epithelialis trächtiger und unbefruchteter Rinder (MÖ). Dabei überwiegt die Anzahl zilientragender gegenüber der sekretorischer Zellen (Abb. 16). Die Zellkerne beider Zellarten liegen basal bis mittig in der Zelle.

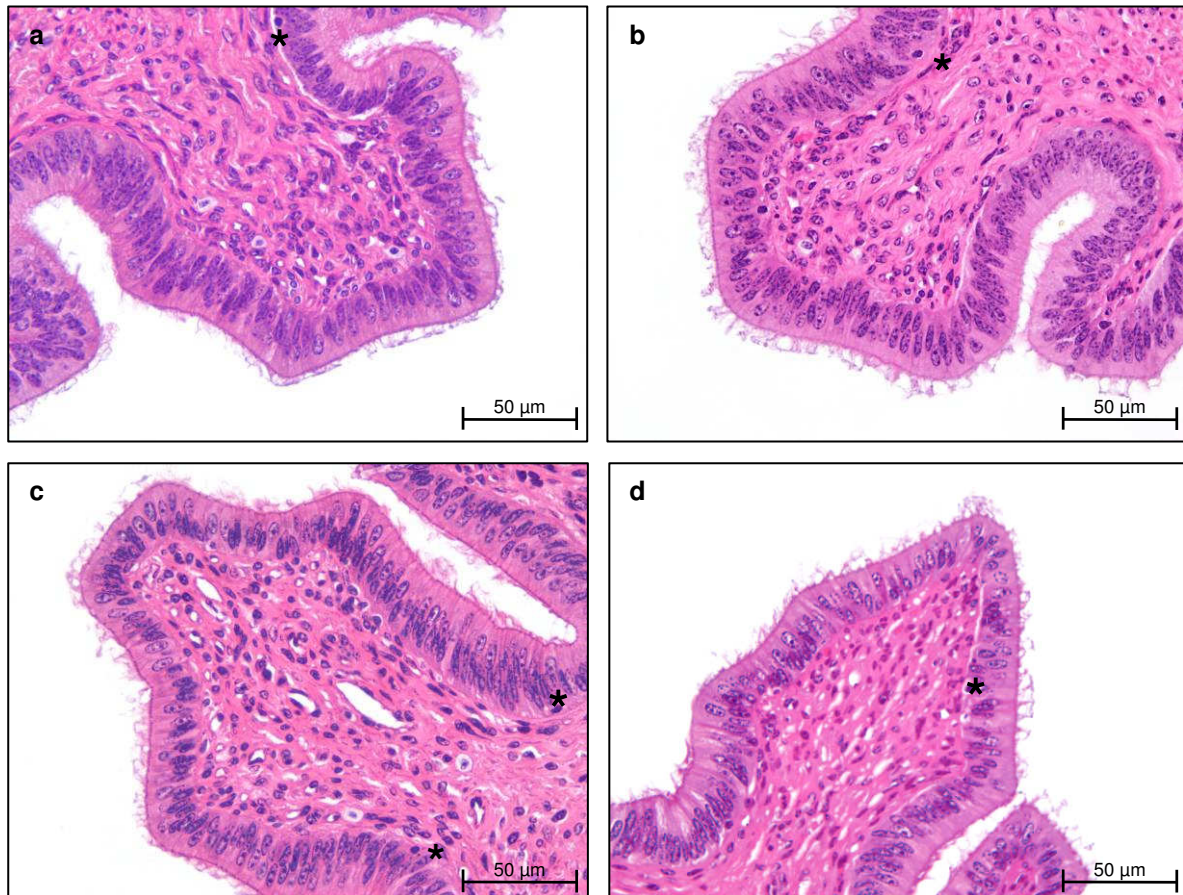


Abb.16: Morphologische Charakterisierung des Isthmus mittels HE-Färbung im Vergleich unbefruchteter (MÖ) und trächtiger Rinder.

Sowohl bei trächtigen (3,5 – 4,5 Tage) (c, d) als auch bei unbefruchteten Rindern (MÖ) (a, b) besteht das Epithel im Isthmus überwiegend aus zilientragenden Zellen. Der ipsi – und kontralaterale Isthmus gleichen sich ebenfalls.

Basalzellen *

Im **Uterus** ist sowohl die Höhe des luminalen Epithels (MÖ: $12,4 \mu\text{m} \pm 0,44$, trächtig: $13,5 \pm 0,72 \mu\text{m}$) als auch des Drüsenepithels (MÖ: $11,21 \pm 1,15 \mu\text{m}$, trächtig: $11,7 \pm 0,95 \mu\text{m}$) bei unbefruchteten und trächtigen Rindern gleich (Abb. 17).

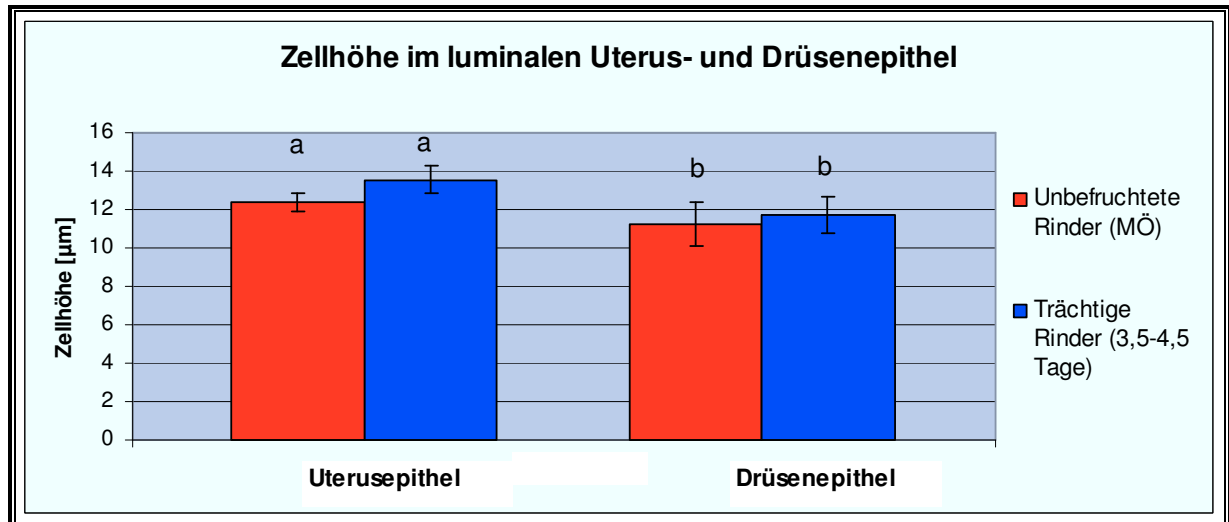


Abb.17: Zellhöhe des luminalen Uterusepithels und der uterinen Drüsen im Vergleich trächtiger (3,5 – 4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder (MW und SEM)

Weder die Zellhöhe des Uterusepithels noch die des Drüsenepithels lassen sich signifikant voneinander unterscheiden (t-Test für unabhängige Stichproben, $p > 0,05$).

Die morphologische Charakteristik im Uterus entspricht im Metöstrus der trächtiger Rinder. Die Zellen des Uterusepithels sind hochprismatisch, wobei der Zellkern basal bis mittig in der Zelle lokalisiert ist (Abb. 18). In den Zellen der Uterusdrüsen liegen die Kerne deutlich basal (Abb. 18). Basalzellen treten im Uterusepithel wenig auf.

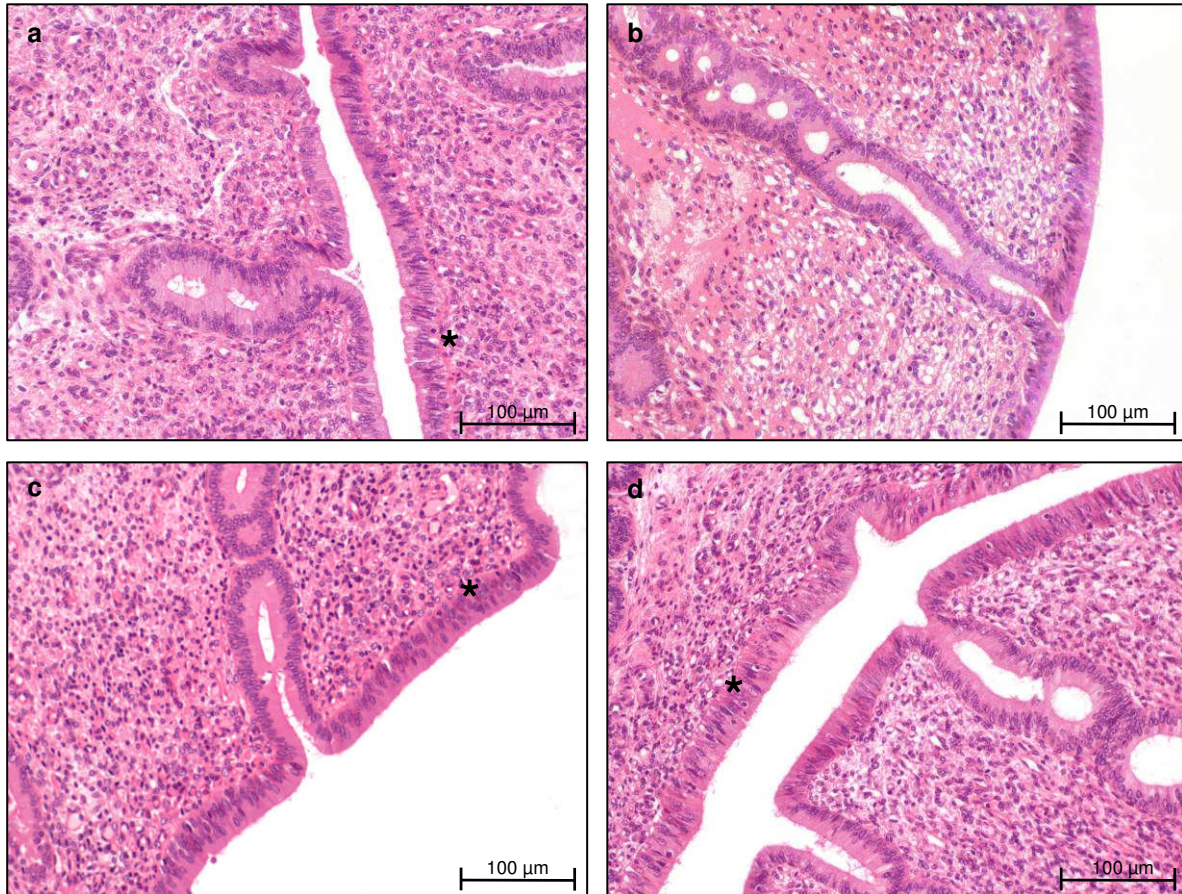


Abb.18: Morphologische Charakterisierung des Uterus mittels HE-Färbung im Vergleich trächtiger (3,5 – 4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder.

Morphologisch unterscheidet sich das Endometrium trächtiger Rinder (3,5 - 4,5 Tage) (c, d) nicht von Rindern im MÖ (a, b). Des Weiteren gleicht das Endometrium des embryotragenden Uterushorns (c) dem kontralateralen (d). Basalzellen *

5.2 Sekretion im bovinen Eileiter

5.2.1 Physiologische Veränderungen der Sekretion in Abhängigkeit vom Zyklusstand

Das Sekret der Ampulla enthält im Rindereileiter sowohl Glykoproteine als auch saure Mukopolysaccharide. Glykogen ist hingegen in keinem Zyklusstadium nachzuweisen (Abb. 20 b, e, h, k). Die Menge und Lokalisation des Sekrets variiert im Verlauf des Zyklus. Die Ergebnisse werden als Mittelwert in μm und mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben.

Im **Östrus** ($n = 4$) findet eine starke Synthese von Glykoproteinen und sauren Mukopolysacchariden in den sekretorischen Zellen der Ampulla statt. Der Gehalt an Glykoproteinen und sauren Mukopolysacchariden ist präovulatorisch am größten und

füllt das Zytoplasma der sekretorischen Zellen (Abb. 20 a, c), so dass sich im Östrus eine hochprismatische Zellform darstellt und die Höhe der zilientragenden Zellen mit $39,1 \pm 0,45 \mu\text{m}$ (Abb. 19) maximal ist. Im **Metöstrus** ($n = 6$) synthetisieren und sezernieren die sekretorischen Zellen sowohl Glykoproteine als auch saure Mukopolysaccharide. Aus den sekretorischen Zellen wölben sich einzelne Vesikel über die Zelloberfläche und geben Sekret in das Eileiterlumen ab. Somit befindet sich das Sekret mittig und vereinzelt nur noch apikal im Zytoplasma (Abb. 20 d, f). Die zilientragenden Zellen weisen mit einer Zellhöhe von $31,1 \pm 1 \mu\text{m}$ (Abb. 19) im Metöstrus eine hochprismatische Zellform auf. In der Blütephase des **Diöstrus** ($n = 5$) sind nur im apikalen Bereich der sekretorischen Zellen wenige Sekretreste vorhanden (Abb. 20 g, i). Vereinzelt, distal gelegene Falten weisen in den sekretorischen Zellen eine deutliche Synthese von Glykoproteinen und sauren Mukopolysacchariden auf. Die Zellkerne der sekretorischen Zellen wandern in Richtung Lumen. Auf diesem Weg wird das verbliebene Sekret aus der Zelle geschleust. Die zilientragenden Zellen beschreiben während des Blütestadiums des Gelbkörpers eine isoprismatische Zellform und erreichen eine Zellhöhe von $23,9 \pm 0,63 \mu\text{m}$ (Abb. 19). Im **Proöstrus** ($n = 4$) kommt es zu einer starken Abschnürung von Kernen der sekretorischen Zellen. Das Epithel der zilientragenden Zellen ist isoprismatisch und erreicht eine Höhe von $23,3 \pm 0,99 \mu\text{m}$ (Abb. 19). In dieser Phase befinden sich nur noch vereinzelt Glykoproteine und saure Mukopolysaccharide an der Epitheloberfläche (Abb. 20 j, l). Im späten Proöstrus beginnt vereinzelt die Synthese von Glykoproteinen sowie sauren Mukopolysacchariden in den sekretorischen Zellen.

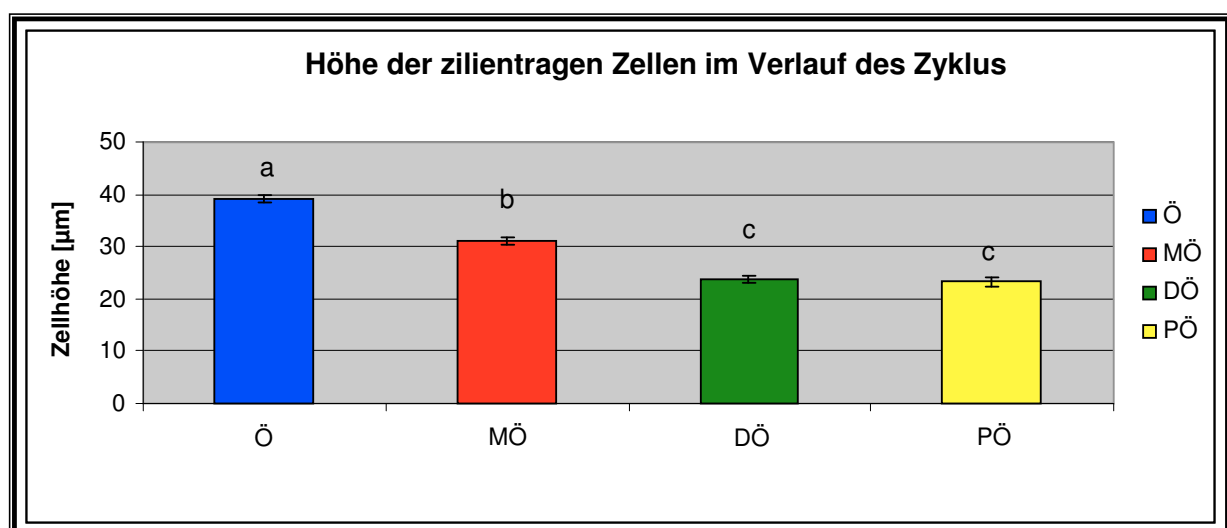


Abb. 19: Höhe der zilientragenden Zellen im Verlauf des Zyklus in der Ampulla (MW und SEM)

Die Zelhöhe der zilientragenden Zellen variiert während des Zyklus hoch signifikant (Einfaktorielle ANOVA, $p \leq 0,01$). Im Östrus ist die Epithelhöhe der zilientragenden Zellen mit $39,1 \pm 0,45 \mu\text{m}$ am höchsten und nimmt im Metöstrus mit $31,1 \pm 1 \mu\text{m}$ hoch signifikant ($p \leq 0,01$) ab. Im Diöstrus (Blüte) ($23,9 \pm 0,63 \mu\text{m}$) und Proöstrus ($23,3 \pm 0,99 \mu\text{m}$) kommt es zu einem weiteren hoch signifikanten ($p \leq 0,01$) Abfall in der Zelhöhe der zilientragenden Zellen. Die Unterschiede zwischen den Zyklusständen wurden mit einem Bonferoni Post-Hoc-Test geprüft.

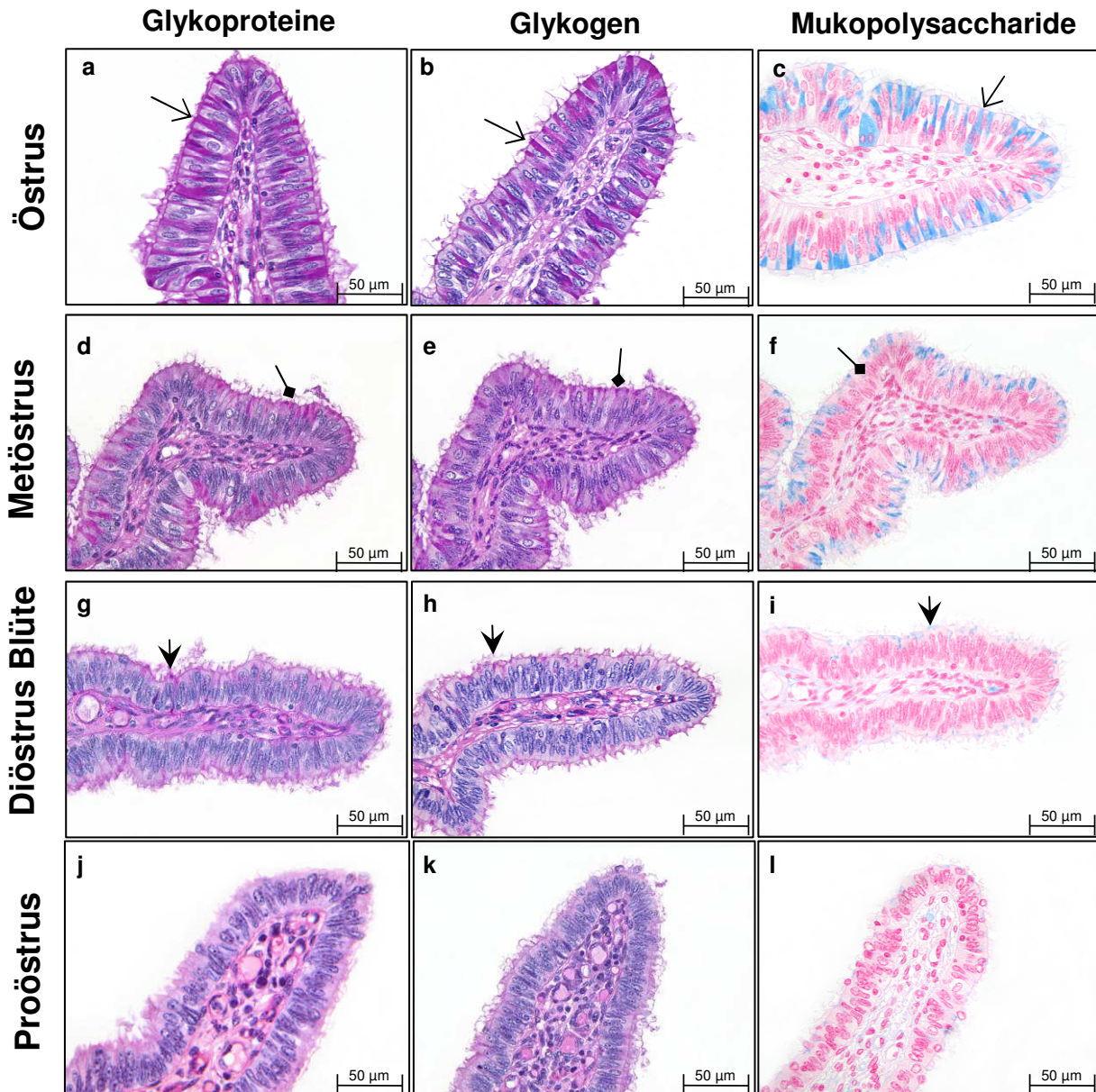


Abb.20: Nachweis von Glykoproteinen, Glykogen und sauren Mukopolysacchariden im Ampullaepithel zyklischer Rinder.

Ein unverändertes PAS Signal nach Amylaseverdau zeigt, dass in allen vier Zyklusständen (b, e, h, k) kein Glykogen im Epithel der sekretorischen Zellen gespeichert wird. Im Östrus sind sowohl Glykoproteine (a) als auch saure Mukopolysaccharide (c) im gesamten Zytoplasma (\rightarrow) der sekretorischen Zellen lokalisiert. Während sich im Metöstrus die Glykoproteine (d) und sauren Mukopolysaccharide (f) mittig bis apikal (\rightarrow) in den sekretorischen Zellen befinden, sind im Diöstrus (Blüte) (g, i) nur noch Reste am Zellsaum (\rightarrow) nachzuweisen. Im Proöstrus sind nur noch vereinzelt PAS (j)– und Alcianblau (l) Signale an der Zelloberfläche vorhanden.

5.1.2 Physiologische Veränderungen der Sekretion während der frühen Trächtigkeit

Mittels der PAS-Färbung wurde die Synthese und Sekretion von Glykoproteinen und Glykogen im Eileiter und Uteri trächtiger (3,5 bis 4,5 Tage) und zyklischer Rinder (Metöstrus) (jeweils $n = 4$) gegenübergestellt. Eine vergleichende Betrachtung der ipsi- und kontralateralen Eileiter und Uteri zeigt lokale embryoinduzierte Veränderungen.

Im Metöstrus sowie bei trächtigen Rindern werden in den sekretorischen Zellen der **Ampulla** Glykoproteine synthetisiert (Abb. 21 a, b). Während im Metöstrus eine starke intrazytoplasmatische Synthese von Glykoproteinen gleichermaßen ipsi- wie auch kontralateral in den sekretorischen Zellen auftritt, ist bei trächtigen Rindern die Glykoproteinsynthese in den sekretorischen Zellen ipsilateral deutlich geringer als kontralateral. Auf der Seite des Embryos werden die Glykoproteine aus den sekretorischen Zellen über Vesikel in das Eileiterlumen abgegeben (Abb. 21 c). Glykogen wird weder bei zyklischen noch bei trächtigen Rindern nachgewiesen.

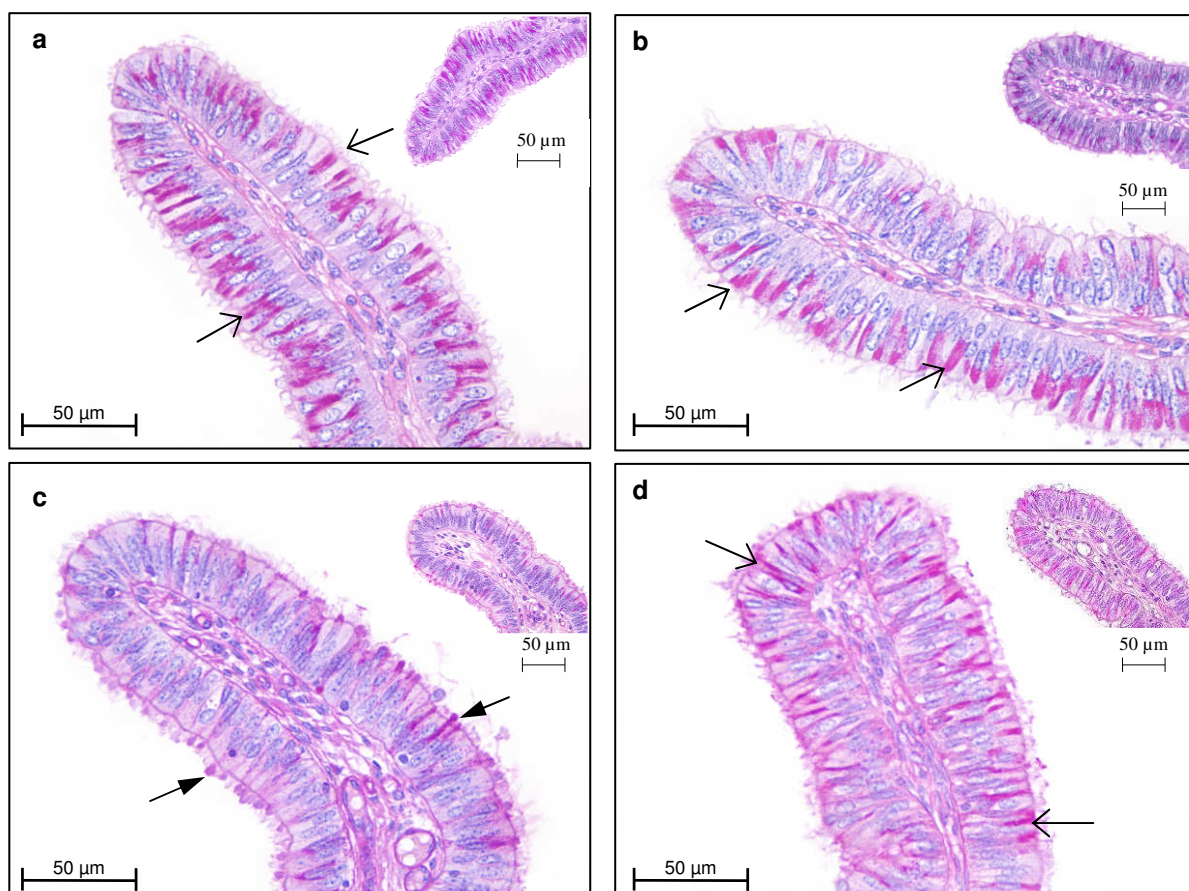


Abb.21: Ampulla: Nachweis von Glykoproteinen und Glykogen im Vergleich zyklischer (MÖ) und trächtiger (3,5 – 4,5 Tage) Rinder.

Die Synthese von Glykoproteinen findet in den sekretorischen Zellen statt. Im MÖ ist sowohl ipsi- als auch kontralateral eine starke Glykoproteinsynthese (\rightarrow) vorhanden (a, b). Während in der kontralateralen Ampulla trächtiger Rinder (d) ebenfalls eine deutliche Glykoproteinsynthese (\rightarrow) zu verzeichnen ist, werden die Glykoproteine ipsilateral (c) durch Exozytose (\rightarrow) aus den sekretorischen Zellen geschleust. Glykogen wird in der Ampulla trächtiger Rinder weder ipsi- noch kontralateral nachgewiesen (Inlay in c und d).

Im **Isthmus** besteht weder zwischen trächtigen (3,5-4,5 Tage) und zyklischen (MÖ) Rindern noch ipsi- und kontralateralem Eileiter ein Unterschied in der Synthese von Glykoproteinen. Eine deutliche PAS-Reaktion zeigt sich am Zellsaum (Abb. 22) und vereinzelt im Zytoplasma sekretorischer Zellen.

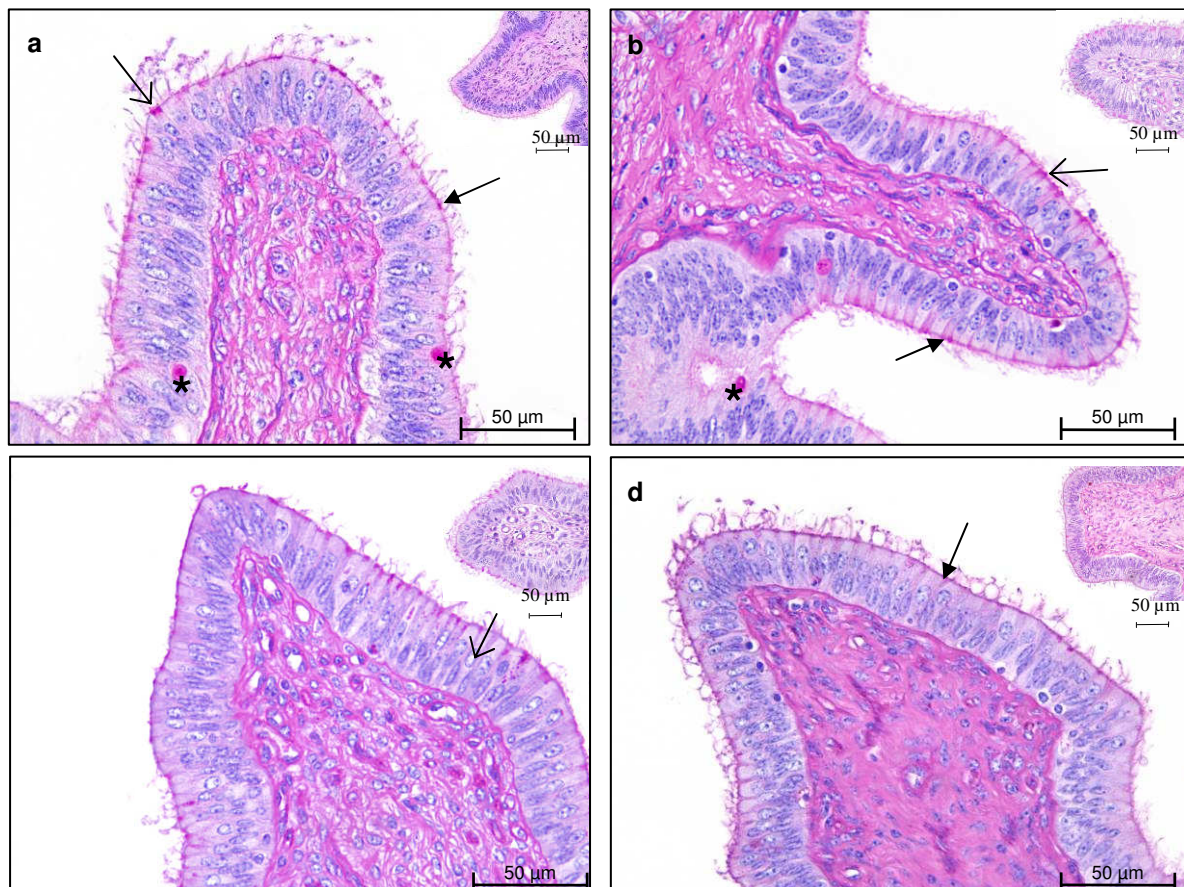


Abb.22: Isthmus: Nachweis von Glykoproteinen im Vergleich zyklischer (MÖ) und trächtiger (3,5-4,5 Tage) Rinder.

Sowohl im MÖ (a, b) als auch bei trächtigen Rindern (c, d) ist am apikalen Zellsaum (\rightarrow) ipsi- (a, c) als auch kontralateral (b, d) eine deutliche Präsenz von Glykoproteinen zu verzeichnen. Vereinzelt tritt apikal der sekretorischen Zelle eine intrazytoplasmatische Synthese (\rightarrow) von Glykoproteinen auf. Glykogen wird im Isthmus trächtiger und unbefruchteter Rinder weder ipsi- noch kontralateral nachgewiesen (Inlay in a, b, c, d). Mastzellen *

Im **Uterus** unterscheidet sich die Glykoproteinsynthese zwischen zyklischen (MÖ) und trächtigen Rindern nicht. Auch ipsi- und kontralateral treten keine Unterschiede in der Glykoproteinsynthese auf. Im luminalen Uterusepithel zeigt sich neben einer apikal lokalisierten Synthese von Glykoproteinen vereinzelt auch im Zytoplasma eine starke PAS-Reaktion (Abb. 23). In den uterinen Drüsen sind nur wenig PAS-positive Zellen nachzuweisen.

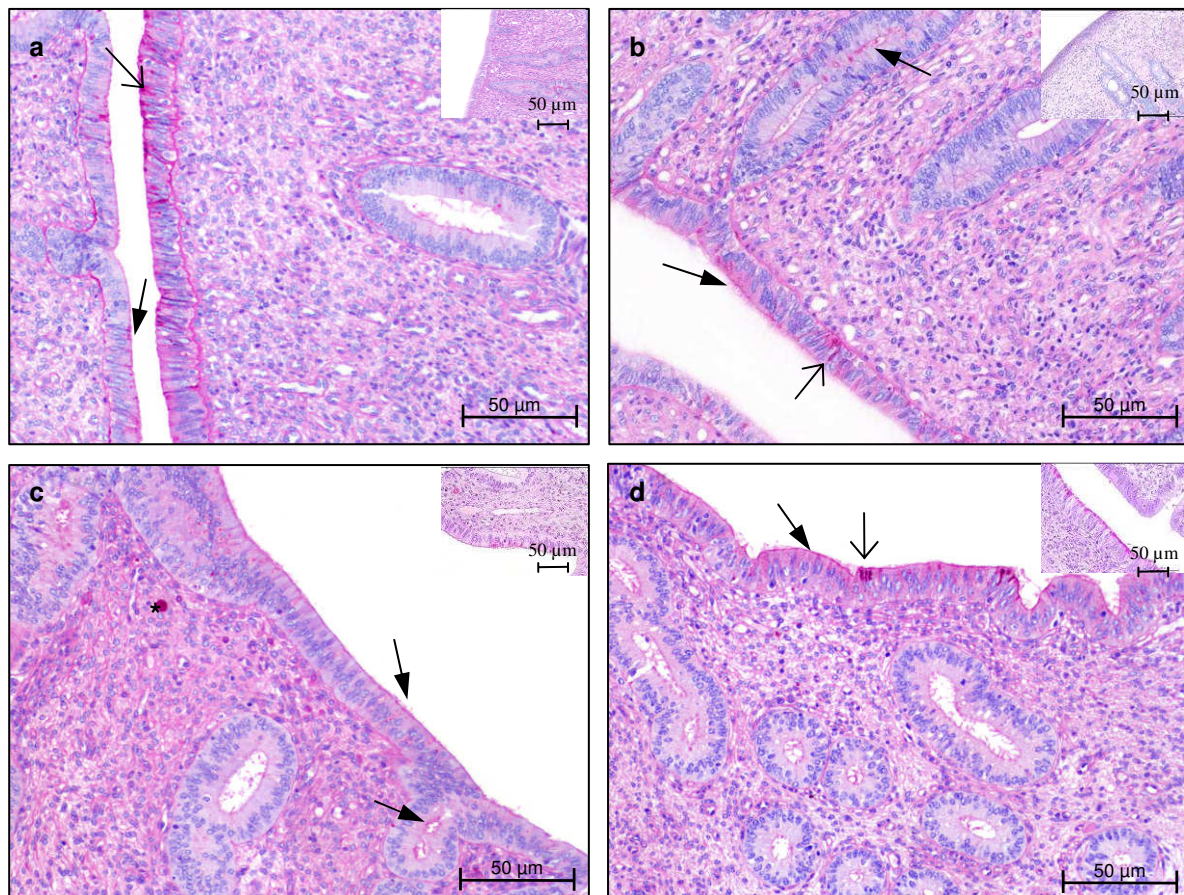


Abb.23: Uterus: Nachweis von Glykoproteinen im Vergleich zyklischer (MÖ) und trächtiger (3,5 – 4,5 Tage) Rinder.

Das luminal Epithel des Endometriums weist sowohl im ipsi- (a, c) als auch im kontralateralen (b, d) Uterushorn zyklischer (a, b) und trächtiger (c, d) Rinder eine deutliche apikale PAS-Reaktionen auf (→). Zusätzlich tritt in vereinzelt Zellen eine starke intrazytoplasmatische Synthese von Glykoproteinen auf (→). In den uterinen Drüsen trächtiger wie auch zyklischer Rinder (MÖ) deutet ein schwaches PAS Signal auf eine geringe sekretorische Aktivität hin.

Mastzellen *

5.2.3 Einfluss von Progesteron (P)

Um den Einfluss von P auf die Synthese von Glykoproteinen, Glykogen und sauren Mukopolysacchariden zu untersuchen wurden Ampullae von Rindern im Östrus (n = 7), Metöstrus (n = 6), Diöstrus Blüte (n = 5) und Proöstrus (n = 5) mit P inkubiert. Im Östrus führt eine P-Inkubation zu einer Elimination von sauren Mukopolysacchariden aus dem Zytoplasma sekretorischer Zellen (Abb. 24, 25 a, b). Die Synthese von Glykoproteinen bleibt im Östrus durch eine P Behandlung unverändert (Abb. 26). Im Metöstrus, Diöstrus und Proöstrus gleichen die Alcianblau-Reaktionen (Abb. 25 c, d, e, f, g, h) und PAS-Reaktionen (Abb. 26) der P-inkubierten Ampullasegmente denen der Kontrollstücke. In allen Zyklusstadien weist ein unverändertes PAS-Signal nach enzymatischem Verdau von Glykogen darauf hin, dass weder in der Kontrolle noch in den P-behandelten Eileitern Glykogen synthetisiert wird.

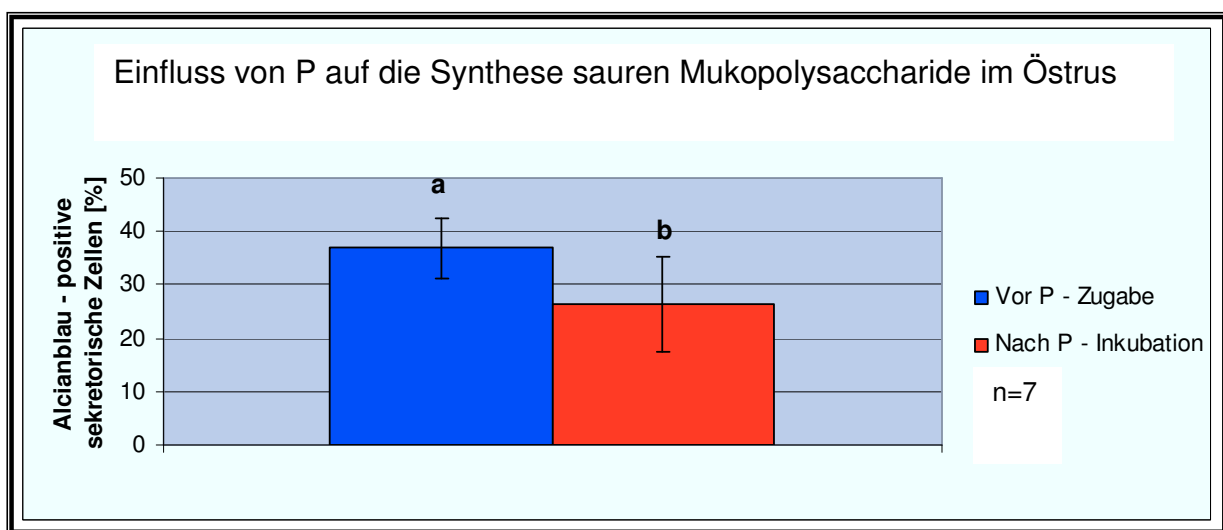


Abb. 24: Anteil Alcianblau – positiver sekretorischer Zellen vor und nach P Inkubation (MW und SEM) Im Östrus sinkt die Synthese von sauren Mukopolysacchariden durch eine P Inkubation signifikant ab (t-Test für verbundene Stichproben, $p \leq 0,05$).

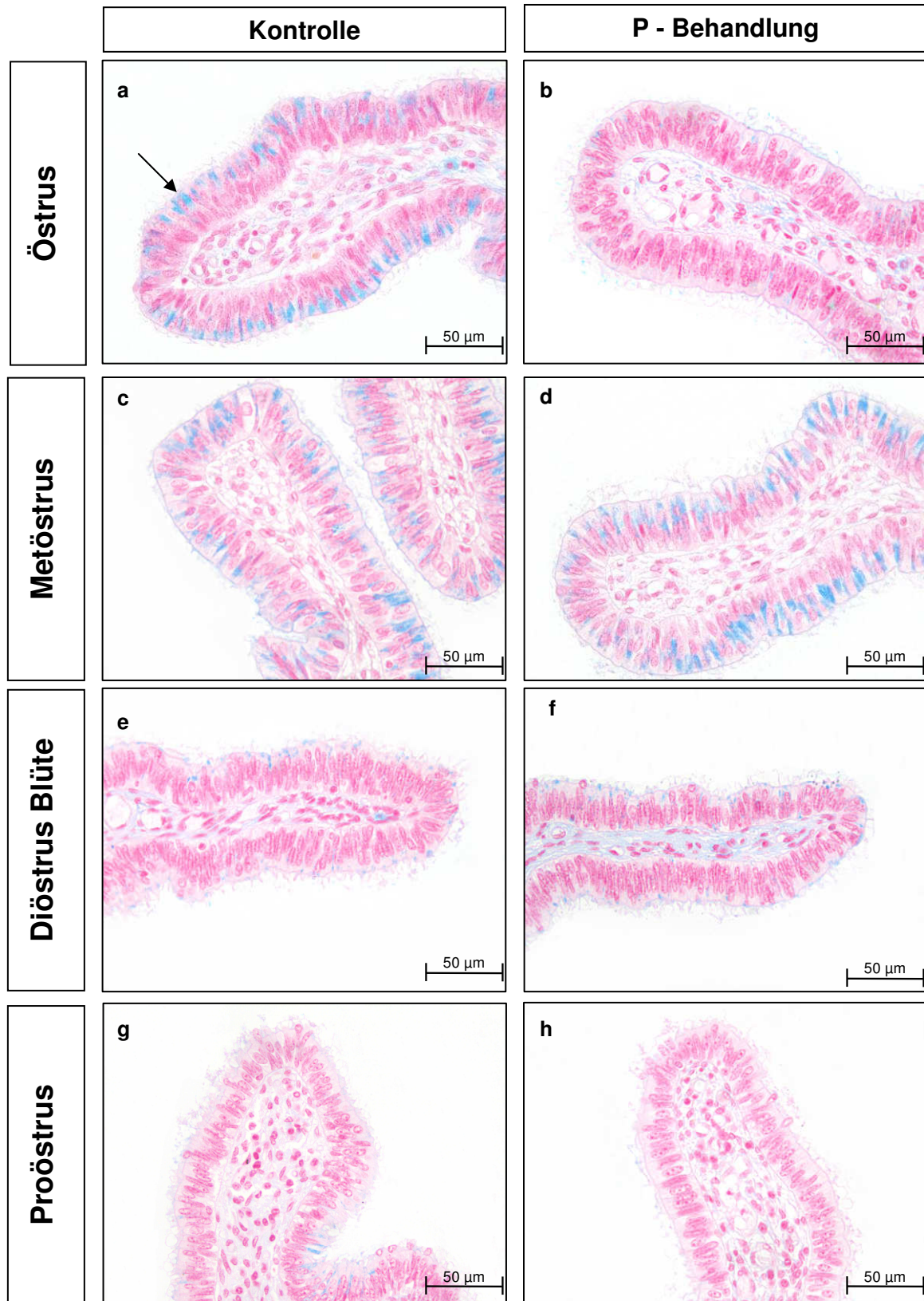


Abb. 25: Nachweis saurer Mukopolysaccharide in der Ampulla vor und nach einer P-Behandlung

Im Östrus findet in den unbehandelten Ampullae (a) eine starke Synthese saurer Mukopolysaccharide (→) im Zytoplasma sekretorischer Zellen statt, die durch eine Behandlung mit P (10 µmol/l) (b) deutlich gesenkt wird. In den anderen Zyklusständen gleicht die Synthese von sauren Mukopolysacchariden der unbehandelten Eileiter (c, e, g) der der P – inkubierten Eileiter (d, f, h).

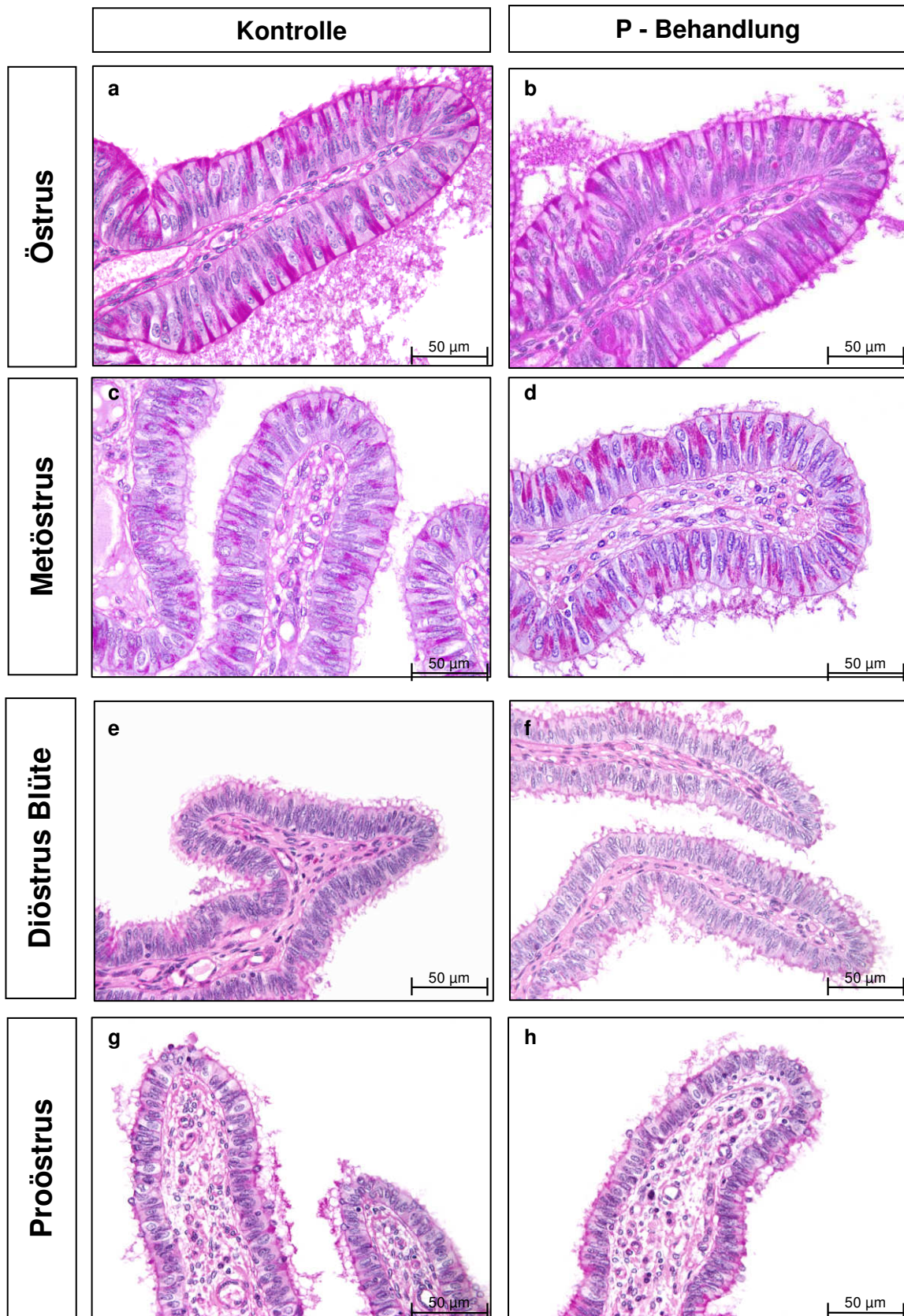


Abb. 26: Nachweis von Glykoproteinen in der Ampulla vor und nach einer P-Behandlung.

In allen Zyklusstadien gleicht die Synthese von Glykoproteinen in unbehandelten Eileitern (a, c, e, g) der in P-inkubierten Eileitern (b, d, f, h).

5.2.4 Einfluss von Hyaluronsäure (HA)

Der Effekt von HA auf die Synthese und Sekretion von sauren Mukopolysacchariden und Glykoproteinen wurde an Ampullae zyklischer Rinder (Östrus n = 3, Metöstrus n = 6, Diöstrus Blüte n = 4, Proöstrus n = 4) untersucht.

Im Metöstrus führt eine HA Inkubation zu einer signifikanten Steigerung der Synthese von sauren Mucopolysacchariden in den sekretorischen Zellen (Abb. 27, 28 c, d). Im Proöstrus, Östrus und Diöstrus in der Blütephase gleichen die Alcianblau-Signale der HA-inkubierten Eileiter denen der unbehandelten Ampullae (Abb. 28 a, b, e, f, g, h). Die Synthese und Sekretion von Glykoproteinen entspricht nach einer HA-Behandlung in allen Zyklusstadien der Glykoproteinsynthese in den Kontrollsegmenten (Abb. 29).

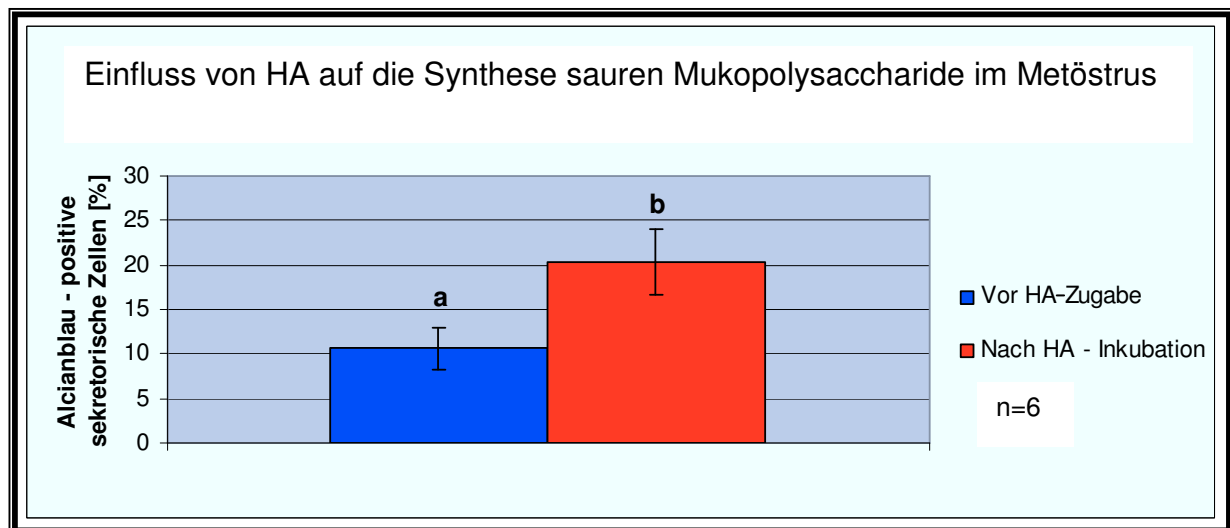


Abb. 27: Anteil Alcianblau-positiver sekretorischer Zellen in der Ampulla vor und nach einer HA Behandlung (MW und SEM)

Im Metöstrus zeigt sich ein signifikanter Anstieg in der Synthese von sauren Mucopolysacchariden in den sekretorischen Zellen nach der HA Inkubation (t-Test für verbundene Stichproben, $p \leq 0,05$).

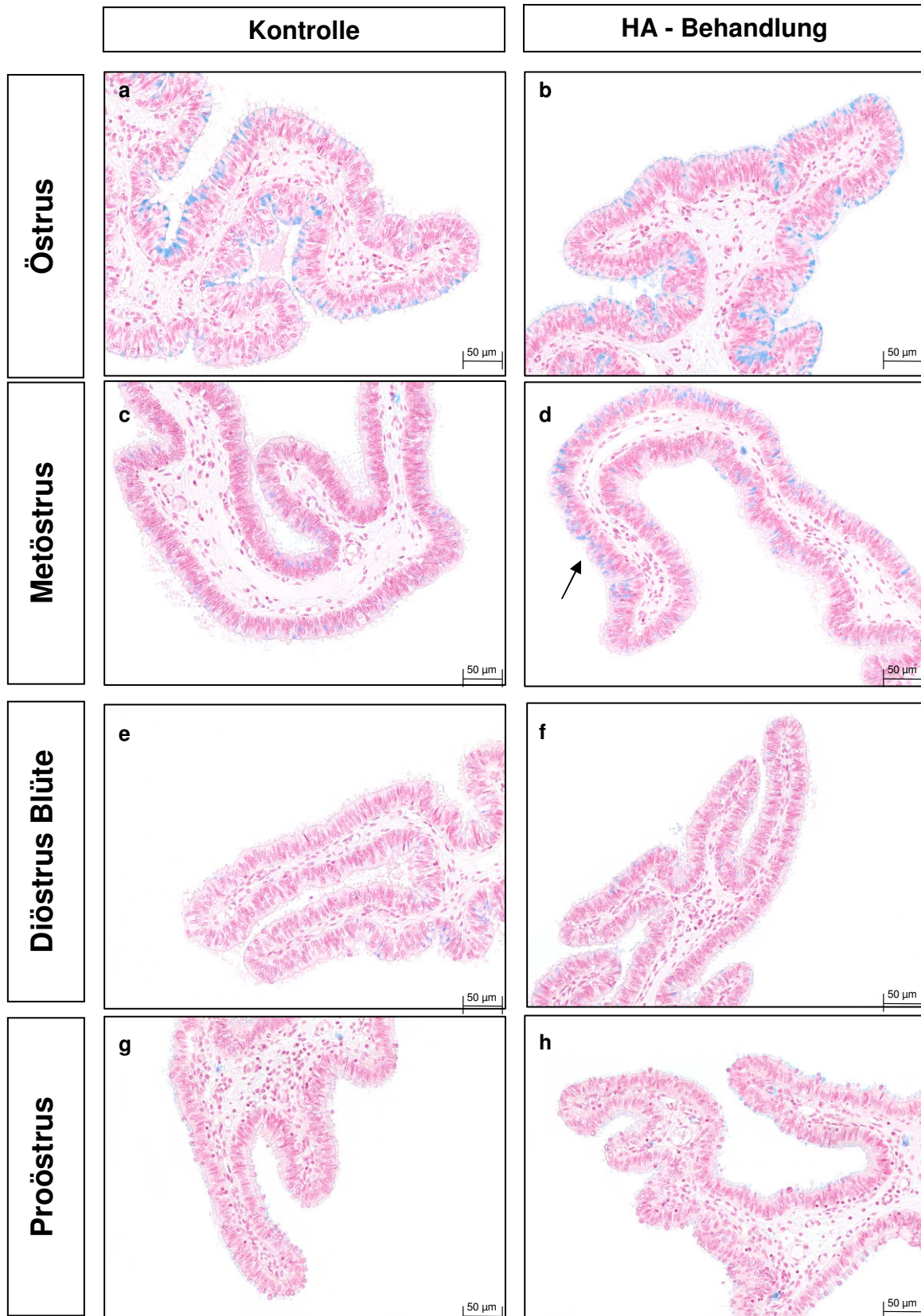


Abb.28: Nachweis saurer Mukopolysaccharide in der Ampulla vor und nach einer HA-Behandlung
 Im Metöstrus zeigt sich eine signifikant gesteigerte Synthese von sauren Mukopolysacchariden in den sekretorischen Zellen im Vergleich zu unbehandelten Ampullae. Im Proöstrus, Östrus und Diöstrus (Blüte) gleicht das Alcianblau-Signal in den Kontrollampullae dem nach der HA-Inkubation

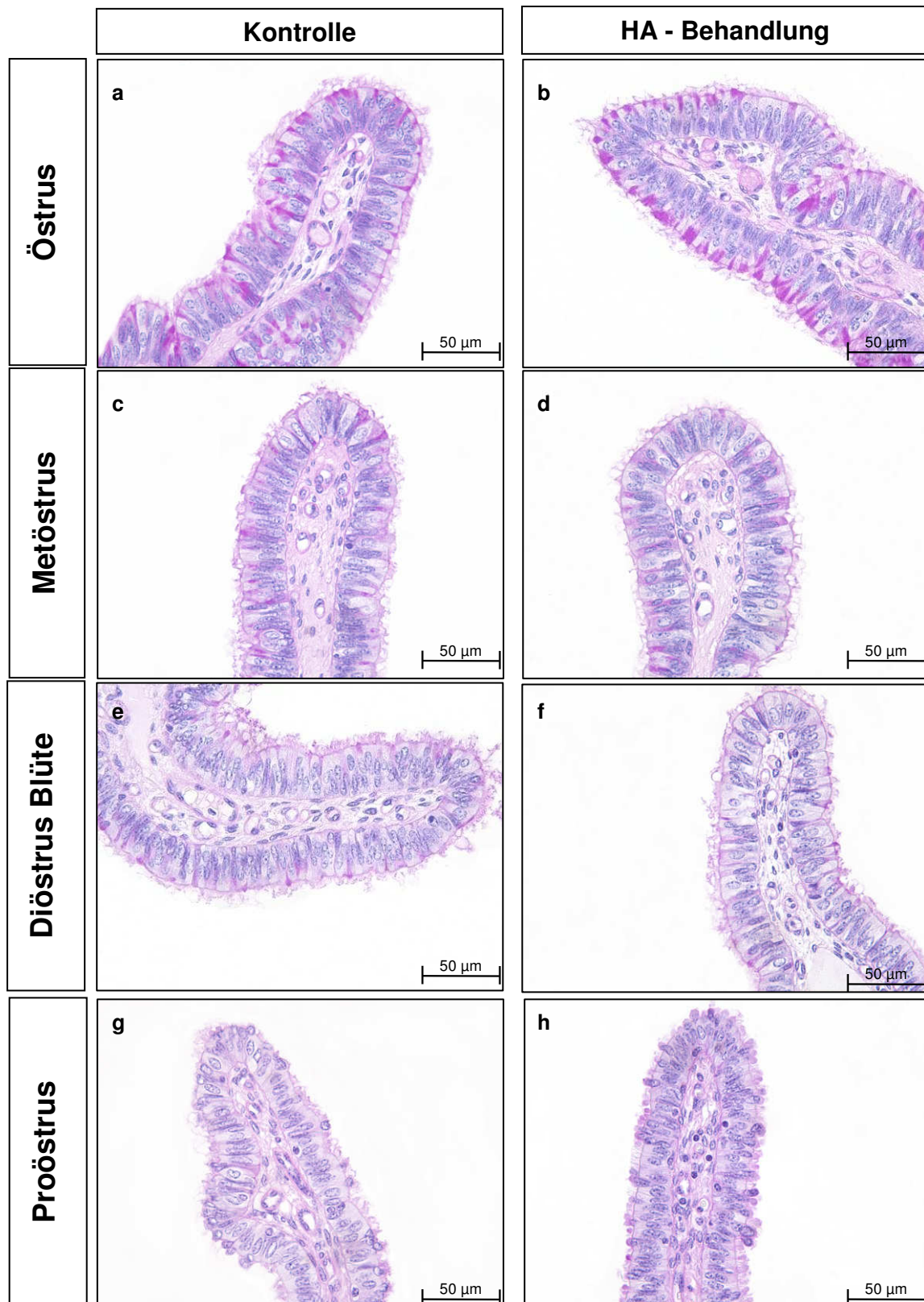


Abb. 29: Nachweis von Glykoproteinen in der Ampulla vor und nach einer HA-Behandlung. In allen Zyklusstadien gleicht die PAS-Reaktion in den Kontrollampullae der in den HA behandelten Ampullae.

5.2.5 Einfluss des Wachstumshormons (GH)

Die Wirkung von GH auf die Synthese und Sekretion von sauren Mucopolysacchariden, Glykoproteinen und Glykogen wurde in der Ampulla von Rindern im Östrus (n = 4), Metöstrus (n = 3), Diöstrus in Blüte (n = 4) und Proöstrus (n = 4) untersucht. Eine GH-Inkubation (100 ng/ml) zeigt im Vergleich mit den unbehandelten Ampullae sowohl in der Alcianblau- als auch in der PAS-Färbung ein unverändertes Farbsignal (Abb. 30, 31). Dies bestätigt sich in allen Zyklusstadien. Auf eine Synthese von Glykogen kann weder in den unbehandelten noch in den GH-behandelten Ampullae geschlossen werden.

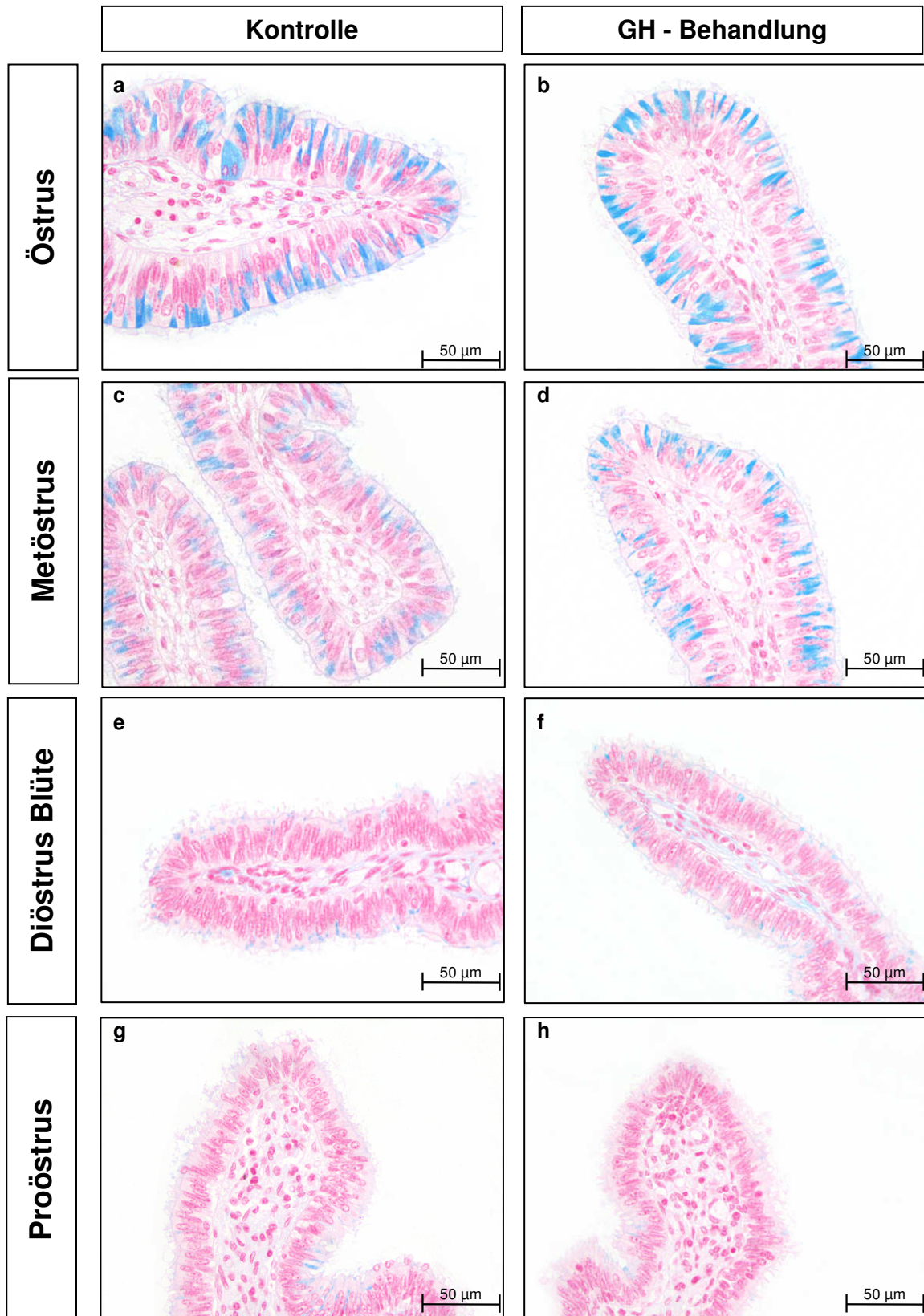


Abb. 30: Nachweis saurer Mukopolysaccharide in der Ampulla vor und nach GH-Behandlung.

Die Synthese von sauren Mukopolysacchariden in den sekretorischen Zellen gleicht in GH-inkubierten Ampullae der in unbehandelten Ampullae.

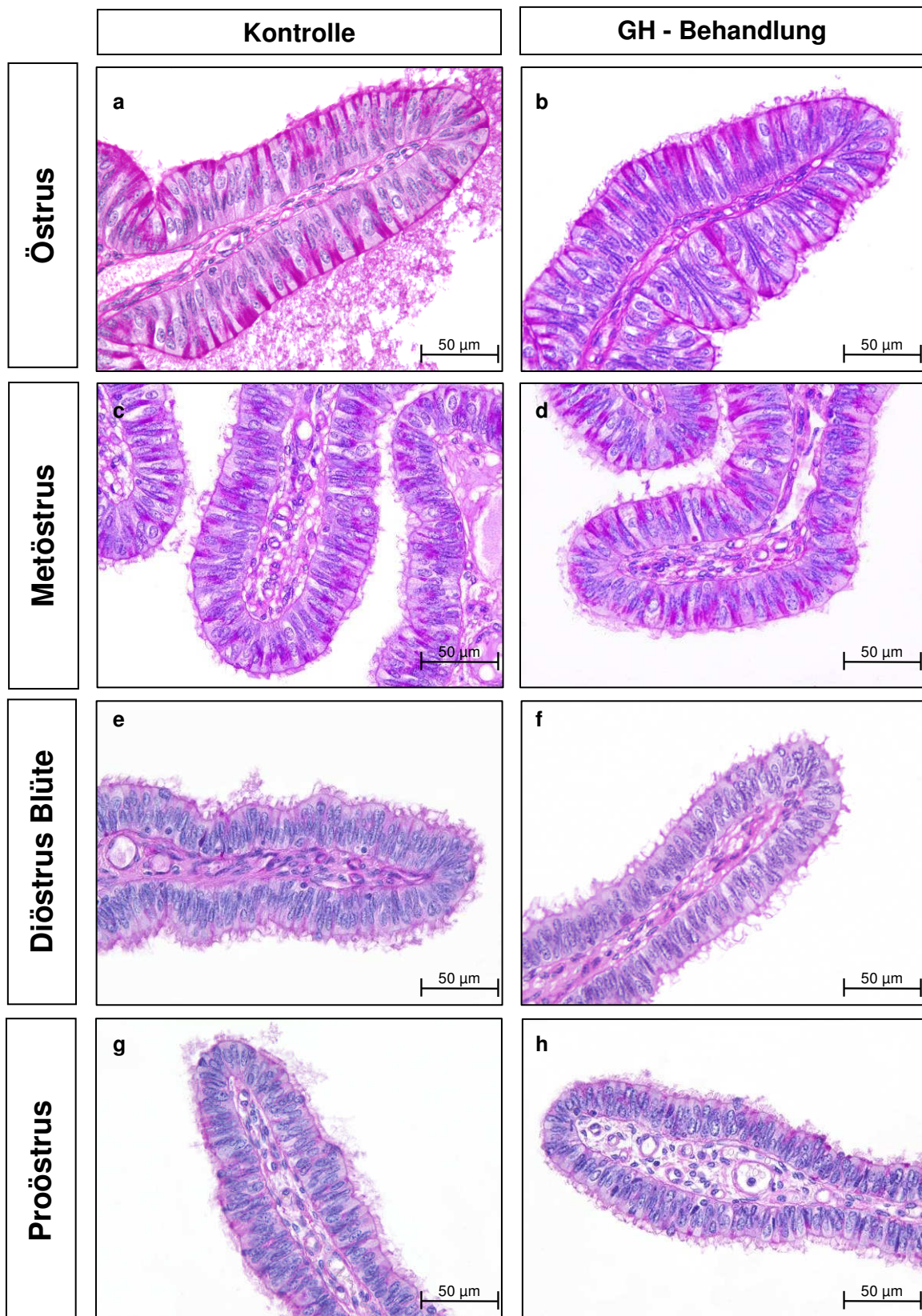


Abb. 31: Nachweis von Glykoproteinen in der Ampulla vor und nach GH-Behandlung

Die Synthese von Glykoproteinen in den sekretorischen Zellen gleicht in GH-inkubierten Ampullae der in unbehandelten Ampullae.

5.3 Rolle des Progesteronrezeptors (PR) in der frühen Trächtigkeit im bovinen Eileiter und Uterus

Um die Bedeutung des PRs in der frühen Trächtigkeit zu untersuchen, wurden Eileiter und Uteri von 4 zyklischen (MÖ) Rindern mit denen von 4 trächtigen (3,5-4,5 Tage) Rindern verglichen. Lokale Effekte wurden durch ein Vergleich des ipsi- und kontralateralen Eileiters sowie Uteris analysiert.

Der PR ist in der **Ampulla** zyklischer (MÖ) Rinder sowohl in den Nuklei der zilientragenden als auch der sekretorischer Zellen lokalisiert (Abb. 33 a, b). In der Ampulla trächtiger Rinder ist der PR deutlich schwächer ausgeprägt und lediglich in den Zellkernen sekretorischen Zellen exprimiert (Abb. 33 c, d). Zudem ist die Anzahl PR-positiver Zellkerne in der ipsilateralen Ampulla trächtiger Rinder signifikant ($p \leq 0,05$) geringer als kontralateral und als in beiden Ampullaseiten zyklischer (MÖ) Rinder (Abb. 32).

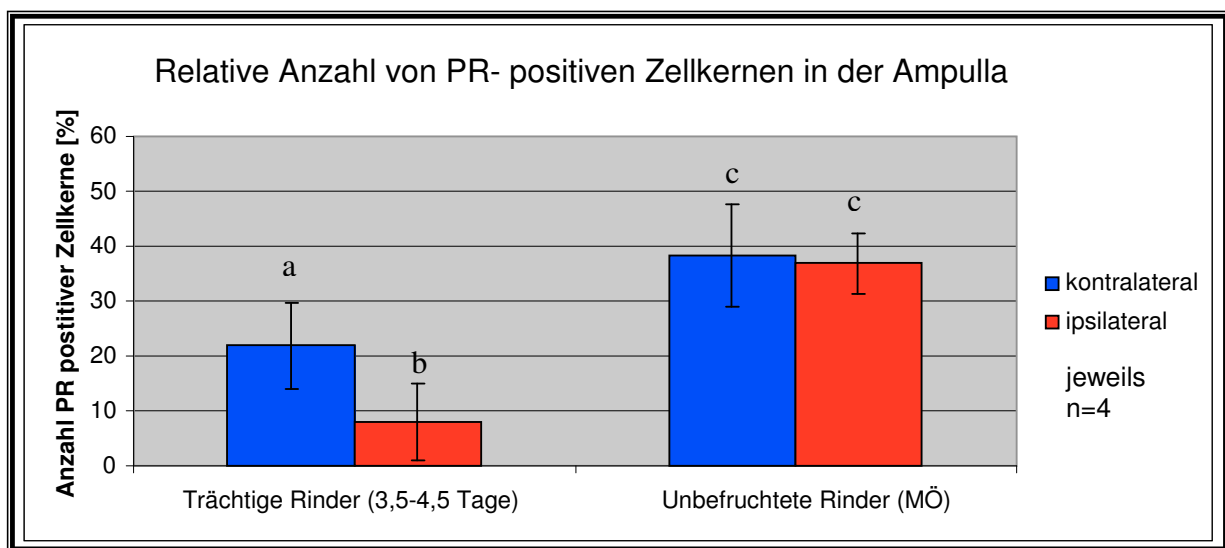


Abb. 32: Relative Anzahl PR-positiver Zellkerne in der ipsi- und kontralateralen Ampulla trächtiger Rinder (3,5-4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder (MW und SEM)

Die PR-Expression in den Zellkernen der zilientragenden und sekretorischen Zellen ist in der Ampulla trächtiger Rinder signifikant geringer als bei unbefruchteten Rindern (t-Test bei unabhängigen Stichproben, $p \leq 0,05$). Die Anwesenheit des Embryos bewirkt ipsilateral zudem eine signifikant reduzierte Anzahl PR-positiver Zellkerne im Vergleich zur kontralateralen Ampulla trächtiger Rinder (t-Test für verbundene Stichproben, $p \leq 0,05$). Bei unbefruchteten Rindern (MÖ) gleicht sich die PR - Expression ipsil- und kontralateral (t-Test bei verbundenen Stichproben, $p > 0,05$).

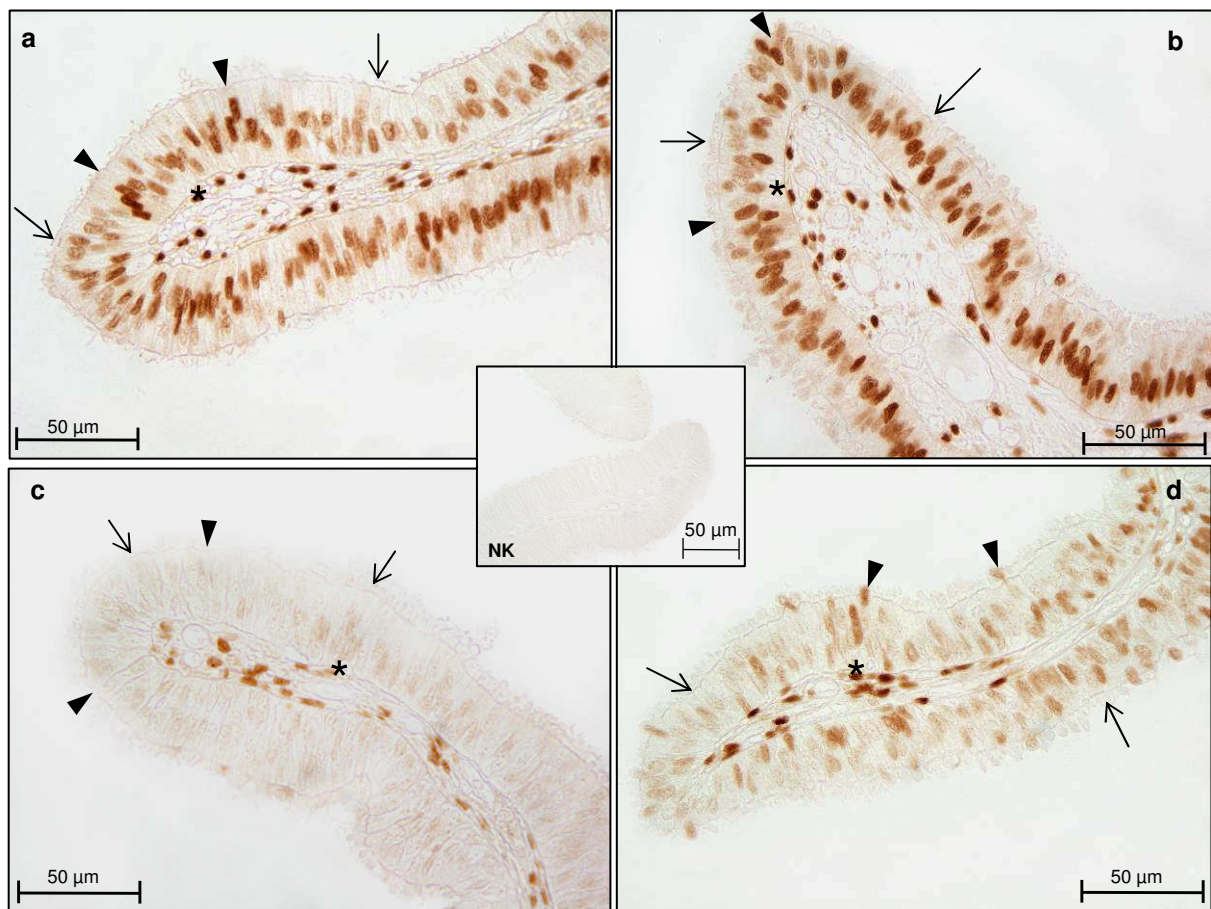


Abb. 33: Ampulla: Nachweis der PR-Expression trächtiger und zyklischer (MÖ) Rinder mittels Immunhistochemie.

Die PR-Expression ist im MÖ (ipsilateral: a, kontralateral: b) in den Nukleii beider Zelltypen (sekretorische ► , zilientragende → Zellen) stark ausgeprägt. In der kontralateralen (d) Ampulla trächtiger Rinder zeigt sich in den sekretorischen Zellen eine deutliche PR-Expression. Ipsilateral (c) ist das PR-Signal sowohl in den zilientragenden als auch in den sekretorischen Zellen schwach bis negativ. Basalzellen * , Negativkontrolle (NK)

Im **Isthmus** zeigt sich eine starke Expression in den Kernen der Lamina epithelialis mucosae. Trächtige und zyklische (Metösrus) Rinder weisen sowohl ipsi- als auch kontralateral eine starke PR-Expression in den zilientragenden und sekretorischen Zellen des Isthmusepithels auf (Abb. 34).

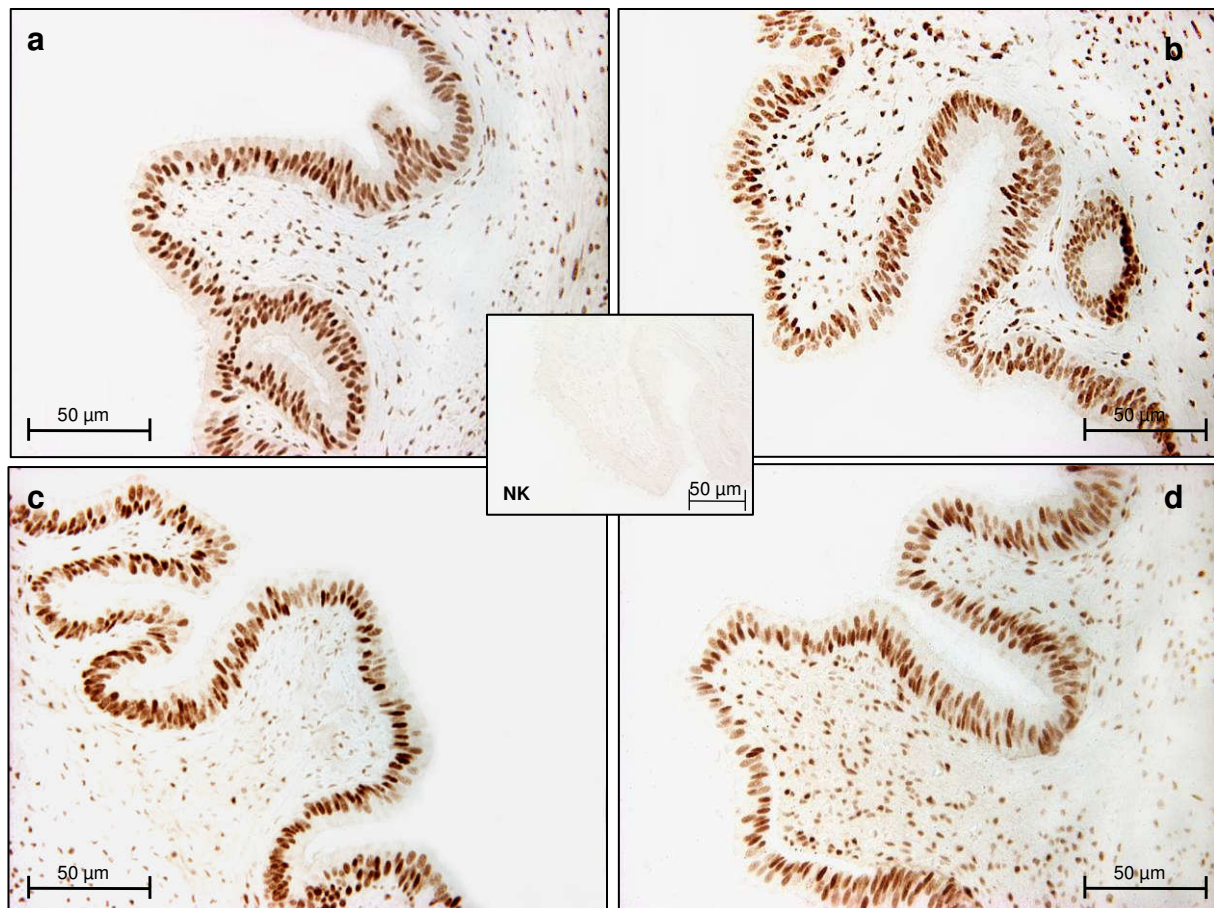


Abb. 34: Isthmus: Nachweis der Progesteronrezeptorexpression im Vergleich trächtiger (3,5-4,5 Tage) und zyklischer (MÖ) Rinder mittels Immunhistochemie.

Im Isthmus wird der PR in den zilientragenden und sekretorischen Zellen gleichermaßen bei zyklischen (MÖ) (ipsilateral: a, kontralateral: b) und trächtigen Rindern (ipsilateral: c, kontralateral: d) exprimiert. Negativkontrolle (NK)

Während sich im luminalen **Uterusepithel** trächtiger Rinder ipsi- wie kontralateral eine starke PR-Expression in den Zellkernen zeigt, wird im Uterusepithel zyklischer Rinder (Metöstrus) in weniger Zellkernen der PR exprimiert (Abb. 35, 36). Die Zellkerne der uterinen Drüsen weisen sowohl bei trächtigen als auch bei zyklischen Rindern eine starke PR-Präsenz auf (Abb. 36).

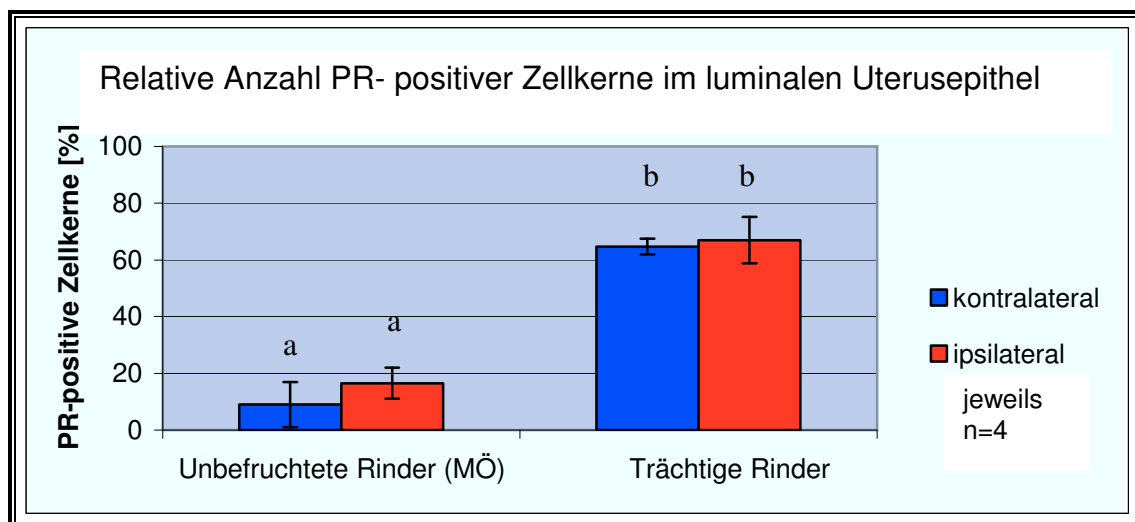


Abb. 35: Relative Anzahl PR-positiver Zellkerne im ipsi- und kontralateralen luminalen Uterusepithel trächtiger (3,5-4,5 Tage) und unbefruchteter (MÖ) Rinder (MW und SEM)

In den Zellkernen des luminalen Uterusepithels ist die PR-Expression in trächtigen Rindern signifikant höher als in unbefruchteten Rindern (MÖ) (t-Test für unabhängige Stichproben, $p \leq 0,05$). Die ipsi- und kontralaterale PR-Expression gleicht sich sowohl bei unbefruchteten als auch bei trächtigen Rindern (t-Test für verbundene Stichproben, $p > 0,05$).

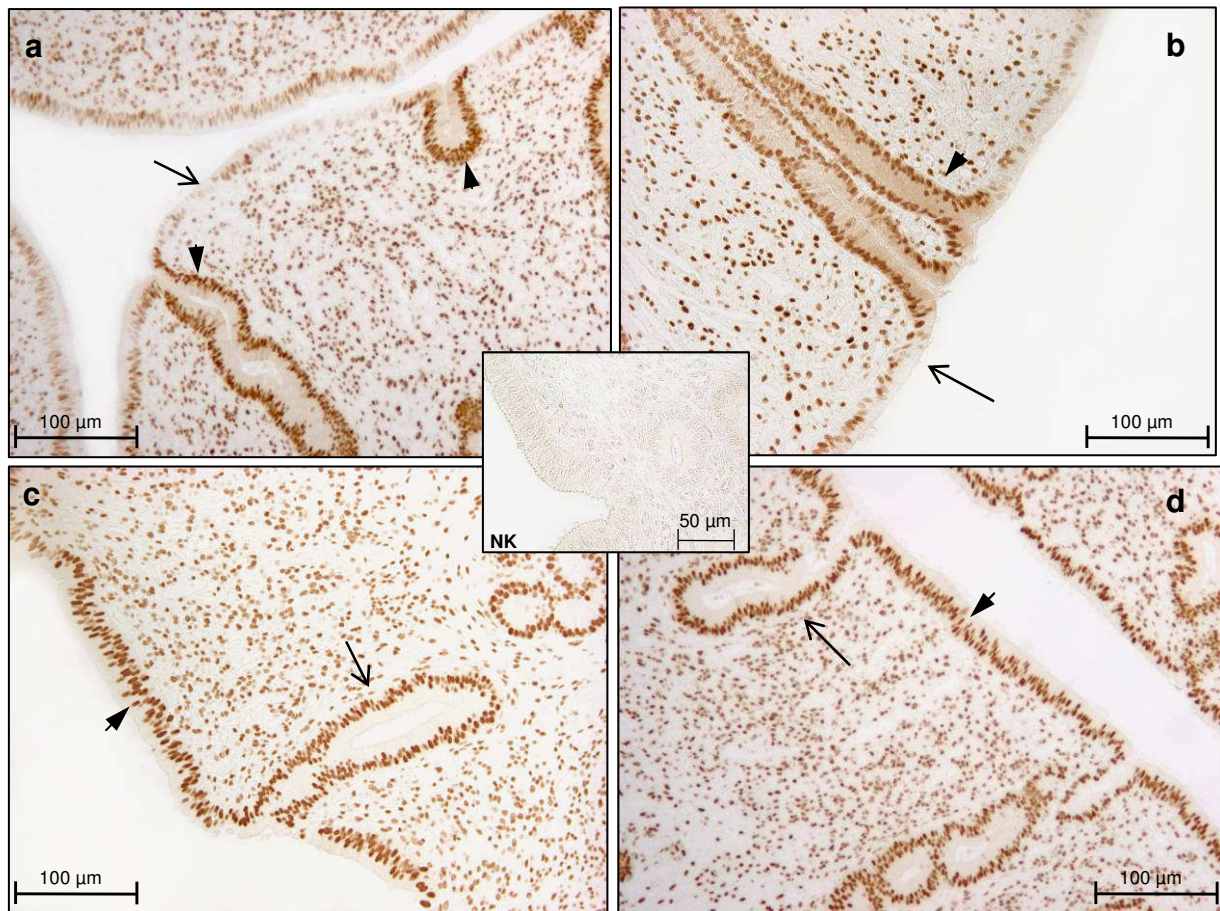


Abb. 36: Uterus: Nachweis der Progesteronrezeptorexpression trächtiger und zyklischer (MÖ) Rinder mittels Immunhistochemie.

Die Kerne des Drüsenepithels (→) weisen im MÖ (ipsilateral: a, kontralateral: b) und in trächtigen Rindern (ipsilateral: c, kontralateral: d) eine starke PR-Ausprägung auf. Das Uterusepithel (▶) zeigt in trächtigen Rindern (c, d) ebenfalls eine starke Anfärbung der Zellkerne. Im MÖ (a, b) sind hingegen weniger PR-positive Nuklei im Uterusepithel nachzuweisen. Negativkontrolle (NK)

5.4 Partikeltransportgeschwindigkeit im bovinen Eileiter

Untersucht wurden ipsilaterale Ampullae von Rindern im Östrus. Die Partikeltransportgeschwindigkeiten werden als Mittelwert in $\mu\text{m/s}$ und mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben.

5.4.1 Basale Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG)

In der **Ampulla** beträgt die PTG im Mittel $234,7 \pm 18,9 \mu\text{m/s}$. Mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $296,4 \pm 25,7 \mu\text{m/s}$ im **Isthmus** ist der Unterschied der beiden Eileiterabschnitte nicht signifikant (Abb. 37).

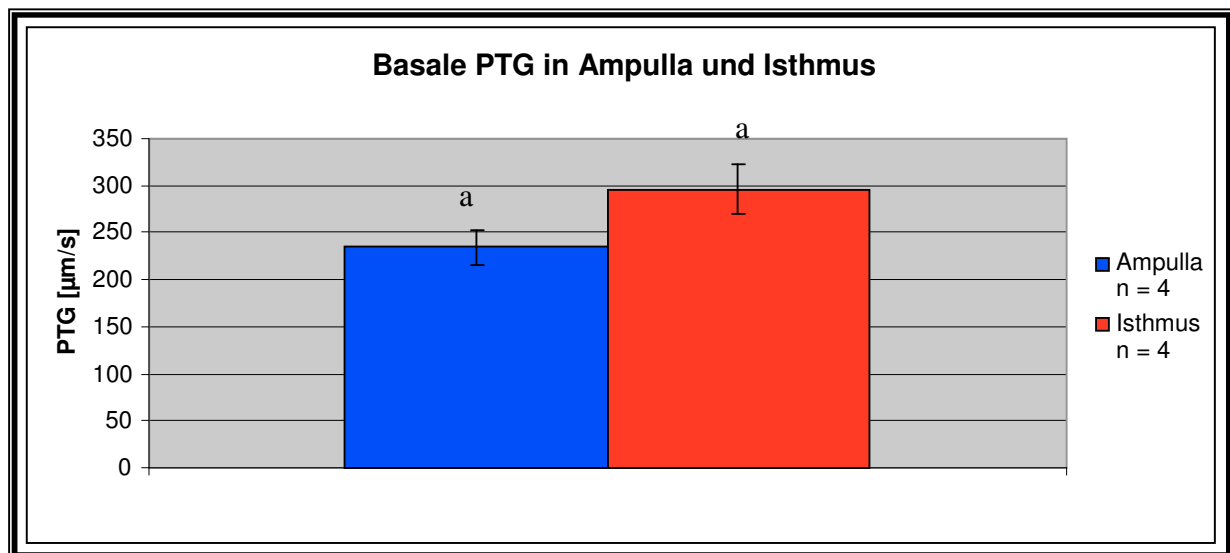


Abb. 37: Durchschnittliche basale Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) in Ampulla und Isthmus. Es werden keine signifikanten Unterschiede zwischen der PTG in der Ampulla und im Isthmus festgestellt (t-Test für unabhängige Stichproben, $p > 0,05$).

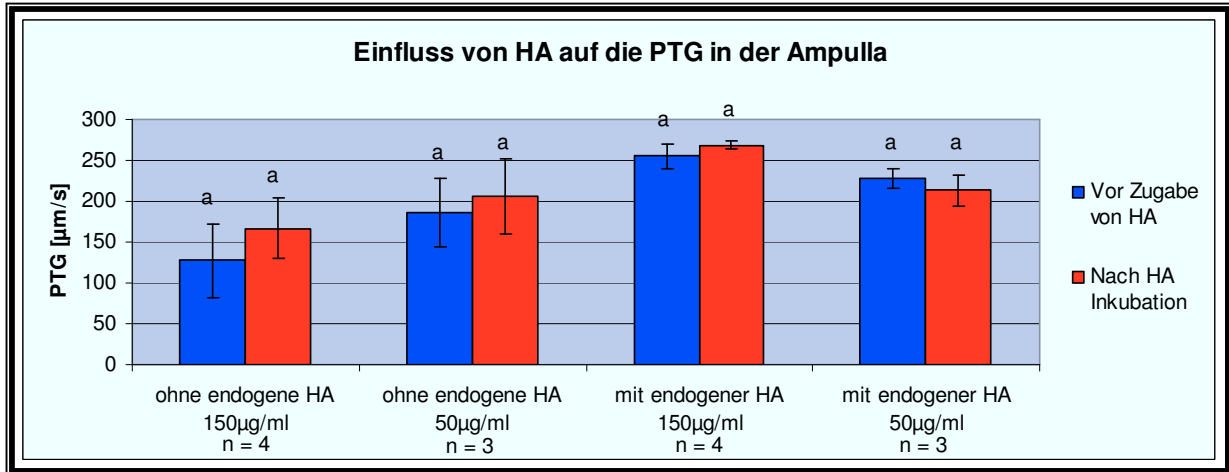


Abb. 39: Einfluss von Hyaluronsäure auf die PTG (MW und SEM)

Eine Zugabe von HA verändert die PTG nicht (t-Test für verbundene Stichproben, $p > 0,05$).

5.4.4 Einfluss von Growth Hormone (GH)

Eine Inkubation mit GH (100 ng/ml, 300 ng/ml) führt nicht zu einer Veränderung der PTG (Abb. 40).

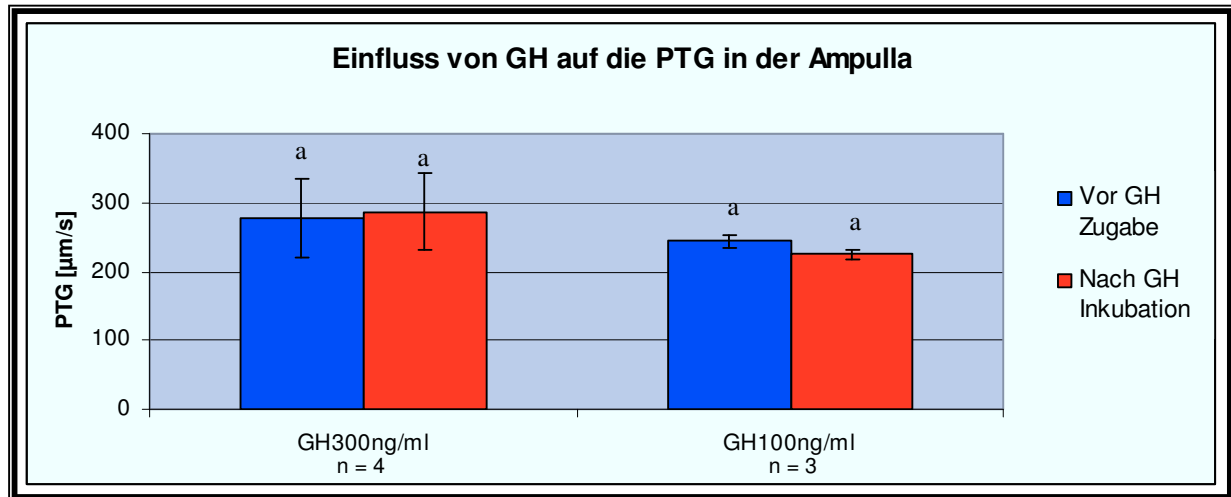


Abb. 40: Einfluss vom Wachstumshormon auf die PTG (MW und SEM)

Die Zufuhr von GH (100 ng/ml, 300 ng/ml) beeinflusst die basale PTG nicht (t-Test für verbundene Stichproben, $p > 0,05$).

5.5 Zilienschlagfrequenz (ZSF) im bovinen Eileiter

Für die Untersuchungen bezüglich der ZSF wurden ipsilaterale Ampullasegmente von Rindern im Östrus herangezogen. Die Zilienschlagfrequenzen werden als Mittelwerte der Basalmessungen und der nach Hormon- bzw. HA- Zugabe (Mittelwert nach 15 min. Inkubation) in Hz mit dem dazugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben. Bei signifikanten Unterschieden werden zusätzlich die Mittelwerte der einzelnen Messzeitpunkte nach der Zugabe (3, 6, 9, 12, 15 Minuten) relativ zu dem Mittelwert der Basalwerte in % illustriert.

5.5.1 Basale Zilienschlagfrequenz (ZSF)

Die durchschnittliche ZSF liegt in der Ampulla bei einer Frequenz von $17,8 \text{ Hz} \pm 0,66$ ($n = 10$).

5.5.2 Einfluss von Progesteron (P)

Eine Zugabe von Progesteron in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ erzielt bei einer 15 minütigen Inkubation einen signifikanten Abfall der ZSF um 21,64 % (Abb. 41a). Die Inkubation mit einer P-Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ bewirkte einen signifikanten ($p \leq 0,05$) Abfall der ZSF um 10,77 % (Abb. 41a). Eine Betrachtung der einzelnen Messzeitpunkte zeigt, dass P (10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$) bereits nach drei bzw. neun Minuten einen signifikanten ($p \leq 0,05$) Abfall der ZSF auslöst (Abb. 41b).

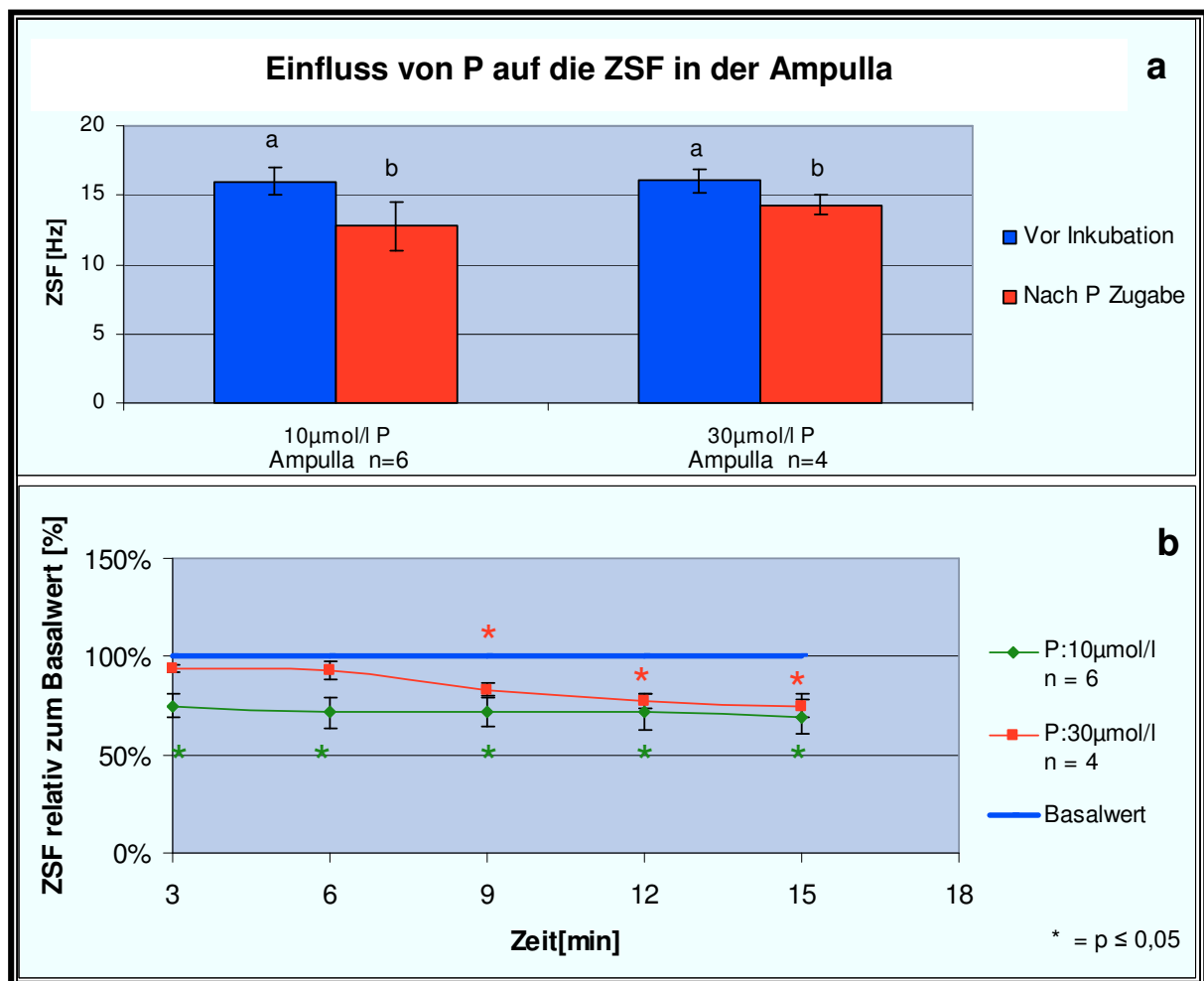


Abb. 41: Einfluss von Progesteron auf die ZSF (MW und SEM)

Die Zugabe von P (10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$) reduziert die ZSF signifikant (a) (t-Test für verbundene Stichproben, $p \leq 0,05$). Ein signifikanter Abfall der ZSF tritt bereits nach 3 min. (10 $\mu\text{mol/l}$) bzw. 9 min. (30 $\mu\text{mol/l}$) ein (b) (t-Test für eine Stichprobe, $p \leq 0,05$). Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Basalwert.

5.5.3 Einfluss von Hyaluronsäure

Die Wirkung von HA wurde durch drei Versuchsmodelle untersucht.

1. Vorbehandlung: keine
Inkubationskonzentration: - 50 µg/ml HA
2. Vorbehandlung: Verdau von endogener HA
Inkubationskonzentration: - 50 µg/ml HA
3. Vorbehandlung: Verdau von endogener HA
Keine HA-Zugabe

Bei der Anwesenheit endogener HA erzielt die Zugabe exogener HA keine Veränderung der basalen ZSF. Ein vorangegangener enzymatischer Verdau der endogenen HA führt durch eine 15-minütige Inkubation mit HA zu einem signifikanten ($p \leq 0,05$) Anstieg der basalen ZSF (Abb. 42a). Dabei zeigen die einzelnen Messungen nach der HA Zugabe ab der neunten Minute eine signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhte ZSF (Abb. 42b).

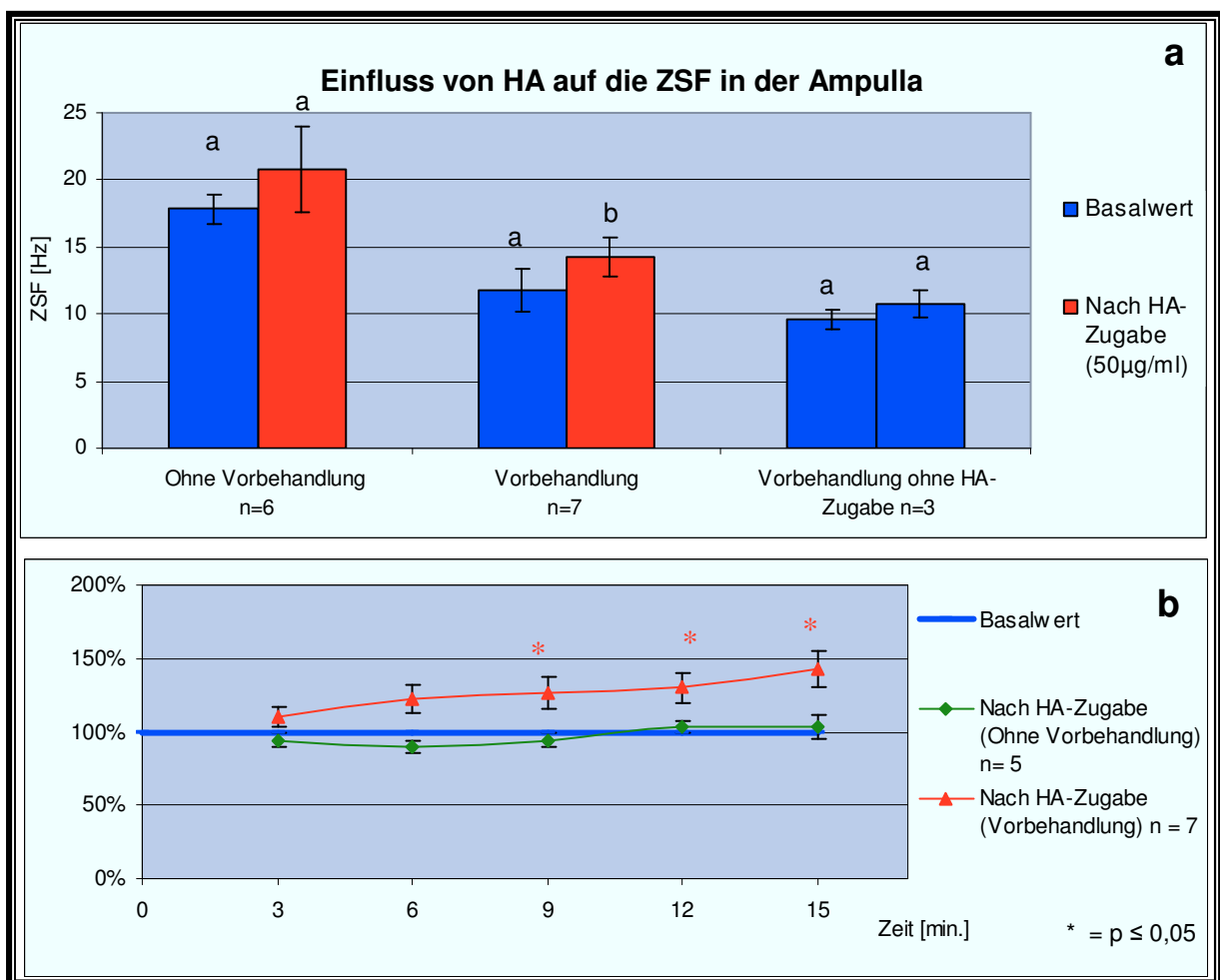


Abb. 42: Einfluss von HA ohne und mit enzymatischen Verdau der endogenen HA auf die ZSF (MW und SEM)

Durch einen vorhergegangenen Verdau der endogenen HA steigt die ZSF nach einer 15-minütigen Inkubation mit exogener HA signifikant an (a) (t-Test für verbundene Stichproben, $p \leq 0,05$). Eine signifikante Erhöhung der ZSF stellt sich neun Minuten nach der HA Zugabe ein (b) (t-Test für eine Stichprobe, $p \leq 0,05$).

5.5.4 Einfluss von GH

Die Zugabe von GH (100 ng/ml) beeinflusst die basale ZSF nicht (Abb. 43).

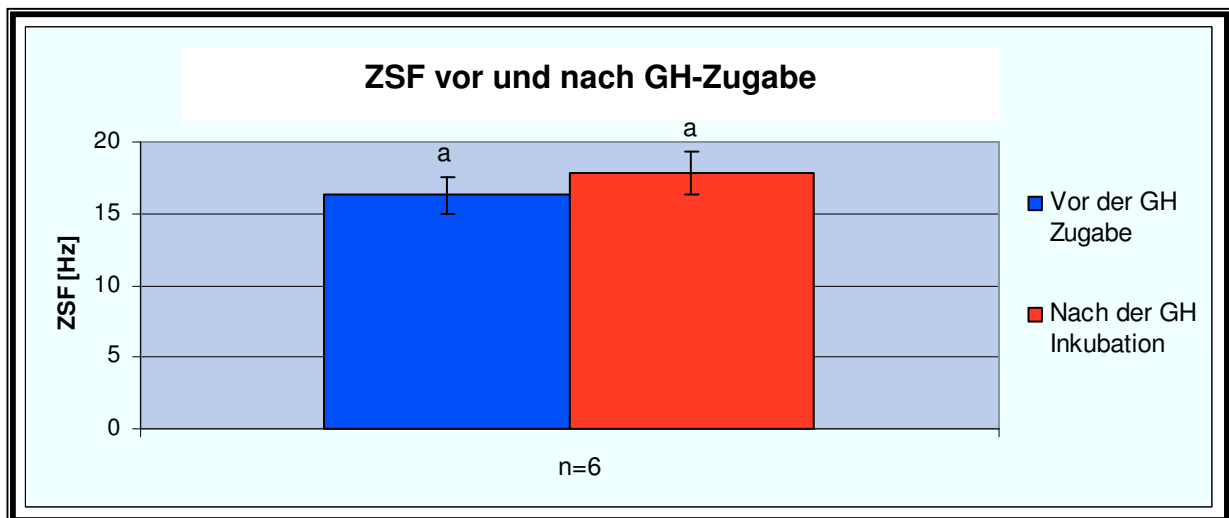


Abb. 43: ZSF vor und nach GH-Zugabe (MW und SEM)

Die Zugabe von GH bewirkt keine Änderung der basalen ZSF (t-Test für verbundene Stichproben, $p > 0,05$).

6 Diskussion

Im Eileiter ist der Transport der Gameten und des frühen Embryos essentiell für eine erfolgreiche Fertilisation bzw. Gravidität. Dabei sorgt ein Zusammenspiel der ziliären Aktivität, der Kontraktilität glatter Muskulatur und des Flüssigkeitsstroms im Ovidukt für einen zielgerichteten und zeitgerechten Transport (Jansen 1984; Halbert et al., 1976). In unserer Studie untersuchten wir den möglichen Einfluss von Progesteron, Hyaluronsäure sowie des Wachstumshormons auf die Zilienschlagfrequenz (ZSF) und die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG). Letztere dient als Modell zur Simulation des Flüssigkeitsstroms im Eileiter. Für die Messungen der PTG und ZSF wurden Eileitersegmente innerhalb von 4 bis 8 h nach der Schlachtung verwendet. Ein Vergleich mit Eileitern, die 24 h nach der Schlachtung gemessen wurden, zeigte keinen Unterschied in der ZSF. Die Reaktionsfähigkeit auf die Hormonzugabe war jedoch nicht mehr gegeben. Nach unseren Ergebnissen ist bis zu 8 h allerdings mit einem funktionalen Eileiterepithel zu rechnen. Um den Einfluss der Pharmaka zu untersuchen, wurden Kontrollmessungen vor der Supplementierung der entsprechenden Substanzen durchgeführt. Bei den Messungen fungierte somit jedes Tier und jede zilientragende Zelle (bei der ZSF) bzw. Eileiterfalte (bei der PTG) als eigene Kontrolle, um individuelle Effekte zu minimieren (Bylander et al., 2010). Dies stellte sich als besonders wichtig für die Vergleichbarkeit der Messungen heraus, da die ZSF in der Ampulla variiert und die PTG durch die Struktur der Falten beeinflusst wird. Zudem wurde die ZSF ausschließlich an Segmenten der Ampulla gemessen, da eine Fokussierung definierter zilientragender Zellen im Isthmus durch die starken Kontraktionen nicht möglich war.

In unseren Untersuchungen wurde eine basale ZSF von durchschnittlich $17,8 \pm 0,6$ Hz gemessen, während Wessel et al. (2003) im bovinen Eileiter eine Frequenz von durchschnittlich 23,1 Hz analysierten. Dieser Unterschied ergibt sich vermutlich durch Differenzen in den Zyklusständen (Critoph et al. 1977; Lyons et al., 2002b; Lyons et al., 2006). Während unsere Messungen an Eileitern von Rindern im Östrus, wenn die ZSF gering ist (Lyons et al., 2002; Lyons et al., 2006; Nishimura et al., 2010), stattfanden, bezogen Wessel et al. (2003) auch Rinder in anderen Zyklusständen in ihre Messungen ein. Zudem könnten Klimateffekte oder auch die Verwendung unterschiedlicher Auswertungssoftware einen Einfluss haben.

Die basale PTG beträgt in der bovinen Ampulla durchschnittlich $234,7 \pm 18,9 \mu\text{m}$ und im Isthmus $296,4 \pm 25,7 \mu\text{m}$ mit einer kaudalen Fließrichtung (Gaddum-Rosse und Blandau, 1976). Eine geringere PTG ermittelten Kölle et al. (2009) im Metöstrus mit durchschnittlich $133 \mu\text{m/s}$. Der Grund für die deutliche Differenz zu unseren Werten liegt vermutlich ebenfalls im Unterschied des Zyklusstandes, da die PTG durch die Viskosität der Follikelflüssigkeit reduziert wird (Molsner, 2011, persönliche Mitteilung). Zudem zeigte Molsner (2011, persönliche Mitteilung), dass die Jahreszeit einen Einfluss auf die PTG im bovinen Eileiter ausübt. Dabei liegt die höchste PTG im Winter vor. Da unsere Messungen in den Wintermonaten durchgeführt wurden, erklären sich die höheren Werte.

Nach der Erfassung der Basalwerte wurden die Pharmaka hinzugefügt. Hyaluronsäure bildet einen natürlichen Bestandteil der Follikelflüssigkeit, der Eileiterflüssigkeit, des Kumulus und des Perivitalraums der Oozyte (Lee und Ax, 1984; Ax und Ryan, 1979; Suchanek et al., 1994; Ueno et al., 2009; Saito et al., 2000; Tienthai et al., 2000; Thienthai et al., 2003). Dabei liegt am Tag der Ovulation die höchste Konzentration in der Oviduktflüssigkeit vor (Bergqvist et al., 2005). Zudem wiesen Ulbrich et al. (2004) im Östrus die höchste Expression des Rezeptors für Hyaluronsäure vermittelte Motilität (RHAMM) nach. Während eine HA-induzierte Stimulation der Spermienaktivität (Huszar et al., 1990) sowie der ZSF in der Trachea (Lieb et al., 2000; Forteza et al., 2001; Manzanares et al., 2007) bereits bekannt ist, wurde der Einfluss von HA auf die ziliäre Aktivität im Eileiter in unserer Studie erstmals untersucht. Die verwendete HA-Konzentration wurde in Anlehnung an den physiologischen Gehalt in der Follikelflüssigkeit ausgewählt (Stojkovic et al., 2002) und stammte vom bovinen Glaskörper. Studien ergaben, dass ein niedrigeres Molekulargewicht, bei einer Vielfalt von Zellsignalen, zu deutlicheren biologischen Effekten führt, verglichen mit einem hohen Molekulargewicht der HA (Slevin et al., 1998; Asari et al., 1998). So wiesen Morimoto et al. (1991) mit einem Molekulargewicht über 1.000 kDa keinen Einfluss auf die ZSF von nasalen Zellen nach. Mit einem Molekulargewicht zwischen 340 kDa und 500 kDa verfügt die HA aus dem Glaskörper über ein relativ geringes Molekulargewicht (Laurent 1955). Nach einer 15-minütigen Inkubation unbehandelter Stücke der Ampulla mit HA ($50 \mu\text{g/ml}$) ergab sich keine Veränderung der ZSF. Da die verwendeten Segmente der Ampulla von Rindern im Östrus stammten und daher mit einem hohen endogenen HA-Gehalt

gerechnet werden musste, wurde in einem zweiten Versuch die endogene HA enzymatisch entfernt (0,05 % Hyaluronidase), bevor die Messungen begannen. Die anschließende Zufuhr exogener HA (50 µg/ml) bewirkte nach 15 Minuten einen signifikanten Anstieg der ZSF. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der physiologische Anstieg der HA während der periovulatorischen Phase an der postovulatorischen Erhöhung der ZSF beteiligt ist. Da HA einen Bestandteil der bovinen Follikelflüssigkeit darstellt, ist es naheliegend, dass HA an dem Anstieg der ZSF durch die Anwesenheit von Follikelflüssigkeit (Lyons et al., 2006; Nishimura et al., 2010) maßgeblich involviert ist. Somit könnte HA eine wichtige Rolle für den Oozyten-Pickup spielen sowie nach der Ovulation den Fluss der viskösen Follikelflüssigkeit im Eileiter aufrechterhalten. Zudem könnte der schnelle Zilienschlag nach der Ovulation zu einer natürlichen Selektion von vitalen Eizellen dienen. Die Signalübertragung der im Eileiter parakrin wirkenden HA ist bisher unbekannt. In der Trachea wurde gezeigt, dass der HA induzierte Anstieg der ZSF durch den RHAMM vermittelt wird (Forteza et al., 2001). Aufgrund der dominanten Präsenz des RHAMMs in der Ampulla während des Östrus (Ulbrich et al., 2004) liegt es nahe, dass eine Bindung der HA an den RHAMM auch im Eileiter den Anstieg der ZSF initiiert (Ulbrich et al., 2004). Da der RHAMM in BOECs exprimiert wird (Ulbrich et al., 2004, Mitteilung), könnte eine direkte Interaktion mit der HA in der Oviduktflüssigkeit bzw. des Kumulus-Oozyten-Komplexes eine lokale Regulierung des Zilienschlags ermöglichen. Zudem spricht die schnelle Reaktion der ZSF auf die HA – Zugabe für eine nicht genomische Signalvermittlung. Untersuchungen an kultivierten ovinen Epithelzellen der Trachea zeigten hingegen erst nach einer 7-tägigen Kultivierung der Trachealzellen eine Reaktion auf die Zufuhr exogener HA (Lieb et al., 2000). Die Autoren vermuteten, dass die Behandlung der trachealen Mukosa mit Protease zu einem Verdau des RHAMM geführt hat und somit in den ersten Tagen der Kultivierung keine HA-Bindung erfolgen konnte. Da unsere Untersuchungen an ex vivo Organkulturen durchgeführt wurden, bei denen keine Proteasebehandlung stattfand, könnte die rasche Erhöhung der ZSF durch eine Bindung der HA an den RHAMM vermittelt worden sein. Allerdings konnte in Studien an der Trachea nicht eindeutig geklärt werden, wie der RHAMM die ZSF steigert, ohne über eine transmembrane Signalkomponente zu verfügen (Assmann et al., 1999; Forteza et al., 2001).

Die Messungen der PTG ergaben weder durch die direkte Zufuhr noch nach einem vorangegangenen Verdau der endogenen HA eine Veränderung der basalen PTG. Auch eine Erhöhung der HA-Konzentration erzielte keinen Effekt, obwohl zu erwarten gewesen wäre, dass der Anstieg des Zilienschlags auch zu einer erhöhten Fließgeschwindigkeit im Eileiter führt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass HA im Medium eine Erhöhung der Viskosität (Stojkovic et al., 2002) bewirkt, die die Fließgeschwindigkeit zunächst reduziert (Huang et al., 1997), gepaart mit einer höheren ZSF allerdings zu einer gleichbleibenden PTG führt. Anzumerken ist, dass sowohl die ZSF als auch die PTG durch eine Behandlung der Ampulla mit Hyaluronidase (0,05 %, 1 h bei 37 °C) deutlich gesenkt wurde. Diese Beobachtungen machten Forteza et al. (2001) nach der Behandlung von in vitro kultivierten trachealen Epithelzellen mit Hyaluronidase (5 IU/ml, 2 h bei RT) nicht. Da die ZSF wie auch die PTG nach der Äquilibrierungszeit konstante Werte erreichte, ist zu vermuten, dass die Entfernung der endogenen HA im Östrus zu einem Absinken der ZSF und PTG führt.

Die dominante Anwesenheit der HA im Eileiter während der peri-ovulatorischen Phase führt zu der Vermutung, dass HA eine wichtige Rolle bei der Gametogenese und der Befruchtung der Eizelle spielt (Varner et al., 1991). Inwieweit HA die Synthese und Sekretion im Epithel des Ovidukts beeinflusst, ist bisher unbekannt. Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine HA-Behandlung der Ampulla bei Rindern im Metöstrus zu einer signifikant gesteigerten Synthese von sauren Mukopolysacchariden in den sekretorischen Zellen führt. Korrelierend mit der erhöhten Präsenz von HA um den Zeitpunkt der Ovulation (Tienthai et al., 2000; Anderson und Killian, 1994) scheint HA in die Bildung sekretorischer Produkte zur Vorbereitung eines optimalen Milieus beim Eintreffen der Gameten in der Ampulla involviert zu sein. Dabei begünstigt die Anwesenheit von Mukopolysacchariden die Akrosomreaktion (Handrow et al., 1982) und damit auch die Befruchtungskompetenz der Spermien. HA gekoppelte Eigenschaften, wie lokale Zellproliferation und Migration (Laurent und Fraser, 1992), untermauern diese These. Als grundlegender Zelloberflächenrezeptor repräsentiert der CD44 einen Vermittler HA-induzierter Zellsignale (Salamonsen et al., 2001; Aruffo et al., 1990). Die Präsenz des CD44 Rezeptors an der ad-luminalen Oberfläche sowie der supranuklearen Region der Epithelzellen deutet ebenfalls auf einen Wirkungsmechanismus der luminalen HA im Eileiterepithel hin (Bergqvist et al., 2005). Der HA-induzierte Effekt zeigt sich

allerdings nur im Metöstrus. Die zyklusunabhängige Expression des CD44 Rezeptors in der Ampulla (Bergqvist et al., 2005) schließt eine fehlende Signalvermittlungskompetenz als Ursache aus. Ein möglicher Ansatz wäre, dass ein bestimmtes Verhältnis der Steroidhormone als Grundlage für die Wirkung der HA-assoziierten Stimulation der intrazytoplasmatischen Synthese saurer Mukopolysaccharide fungiert.

Es ist bekannt, dass P am Transport im Eileiter beteiligt ist, jedoch fanden bisherige Untersuchungen ausschließlich an kultivierten Eileitern statt (Wessel et al., 2004; Bylander et al., 2010; Mahmood et al., 1998; Paltieli et al., 2000). In unserer Studie wurde der Einfluss von P auf den ziliären Transport erstmals unter nahen in vivo Bedingungen untersucht. Für die Messungen der ZSF und der PTG entsprach die Progesteronkonzentration der in präovulatorischen Follikeln (Prévost et al., 1989), da diese existent ist, wenn sich die Gameten in der Ampulla befinden. Angesetzt wurde die Progesteronlösung in Ethanol und mit dem Puffer, in dem auch die Messungen stattfanden, verdünnt. Während der Inkubation lag Ethanol in einer Endkonzentration von 0,06 % vor. Voruntersuchungen hatten ergeben, dass ein derartiger Ethanolgehalt weder einen Einfluss auf die ZSF noch auf die PTG ausübt. Ein Ethanolgehalt von 3 % zeigte hingegen ein verändertes Fließverhalten der Dynabeads. In anderen Studien wurde Progesteron ebenfalls in Ethanol gelöst, wobei eine Ethanolkonzentration zwischen 0,1 % und 1 % die ZSF nicht beeinflusst (Wessel et al., 2003; Bylander et al., 2010; Mahmood et al., 1998). Um bei den Messungen ausschließlich die Wirkung exogenen Progesterons ermitteln zu können, wurden Eileiter von Rindern im Östrus herangezogen. Dadurch befand sich das Epithel in dem Zustand, in dem es auch während des Gameten- bzw. frühen Embryotransports vorliegt, nur ohne den Einfluss der freigesetzten Follikelflüssigkeit und des progesteronproduzierenden Corpus haemorrhagicums.

Die Zugabe von P (10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$) bewirkte nach 15 Minuten einen signifikanten Abfall der ZSF. Im Vergleich zu der Studie von Wessel et al. (2003), die den Einfluss von P (P: 20 $\mu\text{mol/l}$) an 2 bis 4 Tage kultivierten bovinen Eileitern über eine Inkubationsdauer von 15 Minuten untersuchten, zeigten die Ergebnisse unserer Untersuchungen an ex vivo Eileitern (4 bis 8 h) ein vielfach stärkeres Absinken (21,6 %) der ZSF als bei Wessel et al. (2003) (3,7 %). Dies führt zu der Annahme, dass die Reaktionsfähigkeit der Signalübertragungen in 4 – 8 h ex vivo Eileitern die in vivo

Bedingungen besser widerspiegelt, als es in 2 bis 4 Tage kultivierten bovinen Eileitern der Fall ist. Eine direkte Vergleichbarkeit mit anderen Studien ist aufgrund der unterschiedlichen Inkubationsdauer und der speziesabhängigen Differenzen begrenzt. In murinen 24 h kultivierten Eileitern wurde nach einer 30 minütigen P-Inkubation (20 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$) ein Absinken der ZSF um 10 % bzw. 15 % erreicht (Bylander et al., 2010). Bei Studien am humanen Eileiter führte eine Inkubation über 24 h bei einer P-Konzentration von 10 $\mu\text{mol/ml}$ zu einem Abfall um 40 % (Mahmood et al., 1998), während 2 ng/ml eine Paralyse von 50-70 % der Zilien verursachte (Paltieli et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurde in unserer Studie bereits 3 Minuten nach der P-Zugabe (10 $\mu\text{mol/l}$) eine signifikante Reduktion der ZSF nachgewiesen. Dies untermauert die Schlussfolgerung von Wessel et al. (2003), die den P-induzierten Abfall der ZSF aufgrund des schnellen inhibitorischen Effekts auf nicht genomische Mechanismen zurückführen. Diese hormonell ausgelösten Reaktionen sind zu schnell, um genomisch reguliert zu werden. Für gewöhnlich benötigen diese Prozesse mehr als 30 bis 60 Minuten (Cato et al., 2002). Die raschen steroid-induzierten Veränderungen basieren somit vielmehr auf einer Modulation zytoplasmatischer oder zellmembrangebundener regulatorischer Proteine (Simoncini und Genazzani, 2003). Im humanen und murinen Eileiter wurde der Membran Progesteron Rezeptor gamma (mPR γ) in der apikalen Membran der ziliärentragenden Zellen angrenzend an das Eileiterlumen nachgewiesen. Er scheint dort über nicht genomische Prozesse an der Regulation der ziliären Aktivität beteiligt zu sein (Nutu et al., 2007). Die inhibierende Wirkung von P auf die ZSF führt auch im Zyklus zu einer reduzierten Zilienaktivität in der Lutealphase, in der die P-Konzentration maximal ist (Lyons et al., 2002; Nishimura et al., 2010). Die physiologische Begründung liegt vermutlich darin, dass in dieser Zeit kein Embryotransport erforderlich ist, im Gegensatz zur frühen Lutealphase, in der die P-Konzentration noch gering ist, da ein Abfall der ZSF in dieser Zyklusphase den Abtransport des Embryos aufgrund der Präsenz visköser Follikelflüssigkeit gefährden würde.

Bezüglich der PTG bewirkt die Zugabe von P (10 $\mu\text{mol/l}$) jedoch weder in der Ampulla noch im Isthmus eine Veränderung. Da P zu einem signifikanten Absinken der ZSF, aber nicht der PTG führt, ist die ZSF vermutlich nicht essentiell an der Modulation der luminalen Fließgeschwindigkeit beteiligt. Dies untermauern auch Ergebnisse von Croxatto et al. (2002). Sie zeigten, dass die Muskelkontraktionen allein einen erfolgreichen Embryotransport gewährleisten. Auch Noreikat (2009,

persönliche Mitteilung) vermutete eine untergeordnete Rolle der ziliären Aktivität gegenüber den Kontraktionen der glatten Muskulatur im Bezug auf den Gameten- bzw. Embryotransport. Im Gegensatz dazu wird durch die Hemmung der Muskelkontraktibilität dennoch ein unveränderter Transport im Eileiter ermöglicht (Halbert et al. 1976 und 1989). Zudem ist es bekannt, dass krankheitsbedingte Beeinträchtigungen des Zilienschlags, wie das „Kartagener Syndrom“ und die Endometriose, mit einer geringeren Fertilität assoziiert sind (McComb et al., 1986; Lyons et al., 2002a). Daher vermuten wir, dass der Zilienschlag grundlegend zu einer Strömung im Lumen des Eileiters beiträgt (Abe und Hoshi, 1997; Hagiwara et al., 1997), die Modulierung der Fließgeschwindigkeit jedoch nur wenig beeinflusst. Somit ist die ZSF vor allem für die Feinregulierung des Transportes, der durch den Kontakt des Embryos mit dem maternalen Eileiterepithel stattfindet, verantwortlich. Die PTG scheint vielmehr durch die Viskosität der Oviduktflüssigkeit beeinflusst zu werden.

Ein Teil der Sekrete im Eileiter werden von sekretorischen Epithelzellen synthetisiert und in das Lumen abgegeben. Die sekretorische Aktivität im Epithel der Ampulla variiert während des Zyklus. Dabei führt die wechselnde Dominanz der Steroidhormone Östrogen und Progesteron zu einer Modifizierung der Synthese und Sekretion sekretorischer Produkte (Verhage et al., 1988, Boice et al., 1990, Murray et al., 1992, 1993). Während Östrogen eine stimulierende Wirkung auf die Synthese von Glykoproteinen im Eileiter ausübt (Buhi et al., 1991, Bhatt et al., 2004, Briton – Jones et al., 2004, Jaffe et al., 1996), führt Progesteron zu einem Verlust der sekretorischen Aktivität (Murray et al., 1995, Verhage et al., 1990, Bareither et al., 1981). In unseren Untersuchungen führte eine Progesteronbehandlung der Ampulla ausschließlich im Östrus zu einer signifikanten Reduktion saurer Mucopolysaccharide im Zytoplasma der sekretorischen Zellen. Murray et al. zeigten 1995, dass die sekretorischen Produkte durch einen exozytotischen Prozess aus den sekretorischen Zellen geschleust werden. Der Auslöser dieses exozytotischen Prozesses ist bisher unklar. Die steigende Progesteronpräsenz in der lutealen Phase scheint nicht essentiell an der Abgabe des Sekrets beteiligt zu sein (Willemse et al., 1974). Eine Behandlung von weiblichen ovariokomierten Schafen mit Progesteron nach einer vorherigen Östrogenbehandlung führt zwar zur Abgabe kernhaltiger Vesikel, jedoch löst eine chronische Behandlung mit Östrogen allein ebenfalls die Abgabe der Sekretprodukte aus (Willemse et al., 1975, Bareither et al., 1981). Daher schlossen

Willemse et al. (1975), dass weder der Progesteroneinfluss noch ein Effekt durch die absinkende Östrogeneinwirkung an dem morphologischen Umbau der sekretorischen Zellen essentiell beteiligt ist. Vielmehr vermuteten sie, dass die Exozytose aus den sekretorischen Zellen eine logische Konsequenz auf eine vorangegangene Synthese darstellt. Bei einer kombinierten Administration von Östradiol und Progesteron in präöstradiol behandelten Eileitern wurden nach 2 Tagen keine sekretorischen Granulae mehr nachgewiesen (Bareither et al., 1980). Demnach scheint P in einem östradiolreichen Umfeld durch einen antiöstrogenen Effekt ein rasches Versiegen der sekretorischen Granulae zu verursachen (Bareither et al., 1980). Diesbezüglich ist es naheliegend, dass exogen zugeführtes Progesteron aufgrund seines antiöstrogenen Effekts im Östrus einen raschen Abfall in der Synthese von sauren Mukopolysacchariden initiiert. In den anderen Zyklusstadien (Metöstrus, Diöstrus Blüte, Proöstrus) scheinen die geringe Präsenz von Östradiol und die bereits vorhandene endogene Progesteronkonzentration den Einfluss von exogen zugefügtem Progesteron zu schmälern. Im Gegensatz zu in vitro Studien, bei denen durch eine Progesteronstimulation ein signifikanter Abfall in der Transkriptmenge des oviduktalen Glykoprotein-1 (OVGP-1) nachgewiesen wurde (Ulbrich et al., 2006, Jaffe et al., 1996), zeigten unsere Ergebnisse keinen Einfluss auf die Synthese und Sekretion von Glykoproteinen durch P. Demzufolge ist davon auszugehen, dass eine 20-minütige Inkubationsdauer nicht ausreicht, um eine P-induzierte Änderung der Genexpression auch auf Proteinebene nachzuweisen.

Die Synthese und Sekretion von Glykoproteinen wurde zudem in den ersten Tagen der Trächtigkeit analysiert. Zur Untersuchung erster embryoinduzierter Veränderungen und den zugrunde liegenden Signaltransduktionswegen wurden daher Eileiter und Uteri von 3,5 bis 4,5 Tage trächtigen Rindern verwendet. Während ein Vergleich der Eileiter und Uteri trächtiger Rinder mit Eileitern und Uteri von unbefruchteten Rindern im Metöstrus systemische Effekte einer Trächtigkeit aufzeigen sollte, diente die Gegenüberstellung des ipsi- und kontralateralen Eileiters und Uterus dazu, lokale Effekte durch die Anwesenheit des Embryos zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass sich die Synthese von Glykoproteinen und deren Lokalisation in der Ampulla trächtiger (3,5-4,5 Tage) von unbefruchteten (Metöstrus) Rindern unterscheiden. Während im Metöstrus eine deutliche intrazytoplasmatische Synthese von Glykoproteinen in den sekretorischen Zellen der Ampulla stattfindet, befinden

sich die Glykoproteine bei trächtigen Rindern in der ipsilateralen Ampulla in Vesikeln, die in das Eileiterlumen abgegeben werden. Damit einhergehend stellt sich die Morphologie der Epithelzellen im Eileiter dar. Durch eine frühe Trächtigkeit (3,5 – 4,5 Tage) kommt es in den sekretorischen Zellen der ipsilateralen Ampulla zu einer starken Abschnürung von Vesikeln, die vereinzelt auch Zellkerne enthalten, während sich die sekretorischen Zellen in der unbefruchteten (Metöstrus) Ampulla nur leicht über das Niveau der zillientragenden Zellen wölben. Eine Formation der sekretorischen Zellen an Tag 3 der Trächtigkeit wurde auch unter dem Transmissionselektronenmikroskop nachgewiesen (Kölle et al., 2009). Entsprechend unseren Beobachtungen in der HE-Färbung zeigten Kölle et al. (2009) in der Ampulla, die der Embryo vor 1,5 Tagen passierte, eine hohe Aktivität der sekretorischen Zellen. Diese Zellen weisen eine runde Form auf und ragen weit über die Oberfläche der Zellmembran ins Lumen. Auch Murray et al. beschrieben 1995 ab dem dritten bis vierten Trächtigkeitstag eine Sekretabgabe über Vesikel in der Ampulla trächtiger Zibben. Bei zyklischen Rindern zeigte sich die Abschnürung von kernhaltigen Vesikeln erst im Diöstrus (Blüte) und Proöstrus. Dies ergaben auch Studien von Lücke (2005, persönliche Mitteilung) und Hollis et al. (1984). Somit werden die sekretorischen Produkte durch die Anwesenheit des Embryos früh freigesetzt, um die embryonale Versorgung zu gewährleisten (Abe und Hoshi, 1999; Leese et al., 2001). Die Bedeutung der Epithelzellen im Eileiter für die embryonale Entwicklung beschrieben auch Thibodeaux et al. (1992). Sie wiesen auf eine erhöhte Entwicklungsrate bei Embryonen hin, die mit bovinen Ovidukt-Epithelzellen (BOECs) kokultiviert wurden. Neben der sekretorischen Aktivität beeinflusst die Anwesenheit eines Embryos zudem die Zellhöhe der zillientragenden Zellen in der Ampulla. Bei trächtigen Rindern ist die Zellhöhe im Vergleich zu unbefruchteten Rindern signifikant reduziert. Auch ein Vergleich der Zellhöhe von zillientragenden Zellen im Östrus und Metöstrus zeigt postovulatorisch einen signifikanten Abfall. Untermauert wird dies durch einen signifikanten Progesteronanstieg ab dem 4. Tag nach der Ovulation (Stabenfeldt et al., 1969) und der Progesteron-induzierten Atrophie der Epithelzellen im Eileiter (Verhage et al., 1990). Auch Abe et al. wiesen 1999 in der Lutealphase einen signifikanten Abfall in der Zellhöhe zillientragender Zellen auf. Die signifikant reduzierte Zellhöhe in der Ampulla trächtiger Rinder (3,5-4,5 Tage) im Vergleich zum Metöstrus könnte auf eine erhöhte Progesteronpräsenz im Ovidukt während der frühen Trächtigkeit zurückzuführen sein. Auch beim Schaf stellten Murray et al.

(1995) ab dem 4. Trächtigkeitstag eine signifikante Abnahme in der ovinen Epithelhöhe fest. Sie vermuteten, dass der Abstieg des Embryos in den Uterus und der damit einhergehende systemische Anstieg von P sowie die Abnahme des Östrogenlevels einen Initiator für die degenerativen Prozesse während der frühen Trächtigkeit darstellen. Bei zyklischen Rindern fällt die Höhe der zilientragenden Zellen bis zum Diöstrus (Blüte) und Proöstrus weiter signifikant ab, was sich darauf zurückführen lässt, dass erst gegen Ende des Gelbkörper-Blüte-Stadiums eine maximale Progesteronkonzentration im Plasma erreicht wird (Stabenfeldt et al., 1969).

Bei einer Konzeption dient der Isthmus durch seine morphologische Beschaffenheit dem raschen Transport des Embryos in den Uterus. Das geringe Volumen mit Primärfalten gewährleistet einen Transfer des Embryos, ohne dass sich dieser in den Falten festsetzt. Der embryonale Transport erfolgt im Isthmus vor allem durch die Kontraktion der glatten Muskulatur innerhalb der stark ausgeprägten Tunica muskularis (Grieve et al., 1984). Der geringe Anteil sekretorischer Zellen und sekretorischer Produkte, wie Glykoproteine, weist darauf hin, dass sich der Embryo nicht lange im Isthmus aufhält und somit ein geringer Gehalt an Glykoproteinen ausreicht, um die Versorgung sicherzustellen. Demzufolge trägt der hohe Anteil an zilientragenden Zellen (Kölle et al., 2009) zu einem raschen Transport in den Uterus bei, indem der aktive postovulatorische Zilienschlag (Critoph and Dennis, 1977b) den Embryo daran hindert, sich im Isthmus festzusetzen.

Im Uterus weisen die luminalen Epithelzellen sowohl bei trächtigen (3,5-4,5 Tage), als auch bei unbefruchteten Rindern (Metöstrus) eine hochprismatische Zellform auf. Die Synthese von Glykoproteinen findet dabei sowohl bei trächtigen als auch bei unbefruchteten (Metöstrus) Rindern im Zytoplasma einzelner Zellen des luminalen Uterusepithels statt. Auch Uhrín et al. beschrieben 1983 in den luminalen Epithelzellen und den uterinen Drüsenzellen im Metöstrus eine maximale Zellhöhe, die mit einer starken Synthese von Glykoproteinen einhergeht. Somit wird ein optimales Milieu zur Versorgung des eintreffenden Embryos im Uterus vorbereitet. Durch welche Signale der Embryo und das maternale Gewebe kommunizieren, ist jedoch kaum bekannt. Nach einer Befruchtung bildet P das wichtigste Hormon zur Erhaltung der Trächtigkeit. Eine erhöhte maternale Progesteronproduktion ist daher in der Postkonzeptionperiode essentiell (Green et al., 2005; Mann et al., 2001; Inskeep 2004, Stronge et al. 2005, McNeill et al. 2006).

Die Vermittlung der P-induzierten Effekte findet durch die Bindung an den Progesteronrezeptor (PR) statt. Die Expression des Progesteronrezeptors im Eileiter und Uterus wurde im Verlauf des Sexualzyklus bereits ausführlich untersucht (Ulbrich et al., 2003; Okada et al., 2003; Martin et al., 2008; Robinson et al., 2001; Okumu et al., 2010; Boos et al., 1996; Kimmins et al., 2001). Während der ersten Trächtigkeitstage sind Veränderungen in der PR-Expression bisher nur beim Hasen und der Ratte analysiert worden. In der Ampulla unbefruchteter Rinder (Metöstrus) findet sowohl in den Zellkernen der zilientragenden als auch der sekretorischen Zellen eine starke PR-Expression statt. Damit übereinstimmend verzeichneten Ulbrich et al. (2003) in der frühen Lutealphase (Tag 1 bis 5) die stärkste PR-Expression in der Ampulla. Im Weiteren zeigte ein Vergleich der ipsi- und kontralateralen Ampulla unbefruchteter Rinder (Metöstrus) keine Unterschiede in der Lokalisation und Intensität der PR-positiven Signale. Eine Gegenüberstellung ipsi- und kontralateraler boviner Epithelzellen an Tag 3,5 des Zyklus ergab ebenfalls keinen Unterschied in der detektierten Menge von PR-Transkripten (Rottmayer et al., 2006). Dies deutet auf eine systemische Freisetzung von Progesteron über den Blutkreislauf hin. Die Übereinstimmung der ipsi- und kontralateralen PR-Expression lässt darauf schließen, dass die im Metöstrus vorhandene Follikelflüssigkeit (ipsilateral) keinen deutlichen Effekt auf die PR-Proteinexpression in vivo ausübt. Dagegen führte eine Inkubation der Ampulla von Rindern im Östrus mit Follikelflüssigkeit zu einer erhöhten PR mRNA Expression (Krähling, 2010, persönliche Mitteilung). Im Vergleich zur Ampulla unbefruchteter Rinder (Metöstrus) zeigte sich in der Ampulla trächtiger Rinder (3,5-4,5 Tage) ein Abfall der PR-Expression. Dabei sinkt die PR-Expression in den zilientragenden Zellen sowohl ipsi- als auch kontralateral. Zudem ist die Anzahl PR-positiver Zellkerne im Epithel der embryotragenden Ampulla (ipsilateralen) signifikant geringer, als in der kontralateralen Ampulla trächtiger Rinder wie auch in der Ampulla unbefruchteter Rinder (ipsi- und kontralateral). Da Progesteron die Expression seines eigenen Rezeptors inhibiert (McDowell et al., 1999; Kreitmann et al., 1979), ist der Abfall der PR-Immunoreaktivität, 1,5-2,5 Tage nachdem der Embryo die Ampulla verlassen hat, auf eine erhöhte Progesteronpräsenz in der ipsilateralen Ampulla zurückzuführen. Ulbrich et al., zeigten 2003 an in vitro kultivierten bovinen Epithelzellen, dass eine Progesteroninkubation bereits nach 6 h zu einer Unterdrückung der PR-Transkription führt. Syvälä et al. (1998) zeigten im Eileiter des Huhns, dass P zwar zu einem

Verlust des PR-Proteins führt, die PR mRNA-Expression jedoch kaum beeinflusst. Untersuchungen von Pereira et al. (2006) und Vaques et al. (1997) deuteten darauf hin, dass der frühe Embryo die Fähigkeit besitzt, luteotrophe Substanzen zu bilden und damit die Progesteronsekretion zu stimulieren. So bewirkt eine Kokultivierung von bovinen Embryonen mit Granulosazellen einen Anstieg der Progesteronkonzentration in den Granulosazellen. Allerdings zeigen Untersuchungen, dass in den ersten Tagen der Trächtigkeit keine Erhöhung der peripheren Plasmaprogesteronkonzentration stattfindet (Donaldson et al., 1970; Thorburn und Schneider, 1972; Lukaszewska und Hansel, 1980). Dies bestätigten auch Chagas e Silva et al. (2005), die durch die Anwesenheit eines Embryos (5-7 Tage) keinen im Plasma detektierbaren luteotrophen Einfluss nachwiesen. Im Hinblick auf die Beurteilung des Probenmaterials dokumentierten wir ipsilateral eine stärkere Ödematisierung der Eileiterwand als kontralateral. Zudem verlief die ipsilaterale Arteria tubae uterinae stark gewunden, während die kontralaterale gestreckt vorlag. Auch Kölle et al. (2009) beschrieben eine Veränderung der Vaskularisation in Verbindung mit der Anwesenheit eines Embryos im Ovidukt. Somit könnte auch der Blutfluss zum Ovidukt verändert sein und trotz äquivalenter Plasmaprogesteronkonzentration eine höhere P-Menge in die ipsilaterale Ampulla gelangen, um dort eine inhibitorische Wirkung auf die PR-Expression auszuüben. Die involvierten Mechanismen sind jedoch bisher weitgehend ungeklärt (Zhang et al., 2007). Eine Erklärung für den Degradation des PR-Proteins stellt eine Ubiquitin-vermittelte Ligandenbindung dar, die bereits im Ovidukt des Huhns nachgewiesen wurde (Syväälä et al., 1998). In der Anwesenheit von P bewirkt das Proteasom Ubiquitin eine sogenannte Ubiquitynylierung, wobei eine rasche Proteolyse des PRs ausgelöst wird (Zhang et al., 2007).

Im Isthmus wurde sowohl bei trächtigen als auch bei unbefruchteten Rindern auf beiden Eileiterseiten eine starke PR-Expression in den Zellkernen der zilientragenden und sekretorischen Zellen nachgewiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Okada et al. (2003). Sie zeigten, dass die PR-Expression im Isthmus von Ratten in der Präimplantationsphase vergleichbar mit der von zyklischen Ratten ist. Im Metöstrus detektieren auch Ulbrich et al. (2003) im bovinen Isthmus eine starke PR-Expression. Des Weiteren beschrieben sie eine Differenzierung der PR Isoformen A und B. In der Ampulla dominiert der PR-A, welcher durch Veränderungen in der Steroidogenese reguliert wird. Im Isthmus wird der PR-B

unabhängig von peripheren Steroidhormonen während des gesamten Zyklus exprimiert (Ulbrich et al., 2003). Der in unseren Untersuchungen verwendete PR Antikörper PR SP2 (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA) erkennt beide Isoformen A (116 kDa) und B (81 kDa), sodass eine differenzierte Betrachtung nicht möglich war. Wir vermuten, dass die starke Präsenz des PRs im ipsilateralen Isthmus im Gegensatz zur ipsilateralen Ampulla trächtiger Rinder auf die fehlende inhibitorische Wirkung des P auf den PR-B zurückzuführen ist.

Im Uterus trächtiger (3,5-4,5 Tage) wie unbefruchteter (Metöstrus) Rinder findet in den Zellkernen des grandulären Epithels eine starke PR-Expression statt. Während des Zyklus erreicht der PR in der frühen Lutealphase eine maximale Expression (Martin et al., 2008 und Robinson et al., 2001). Im luminalen Uterusepithel wurden bei unbefruchteten Rindern (Metöstrus) signifikant weniger PR-positive Zellkerne als bei trächtigen Rindern (3,5-4,5 Tage) nachgewiesen. Ergebnisse von anderen Studien variierten bezüglich der PR-Expression im luminalen Uterusepithel. Okumu et al. zeigten 2010 eine starke Ausprägung des PRs an Tag 5 und 7. Auch Boos et al. wiesen 1996 in den Zellkernen des bovinen luminalen Uterusepithels die stärkste PR-Expression an Tag 8 des Zyklus nach. Andere Studien analysierten im luminalen Uterusepithel eine schwache bis nicht detektierbare PR-Expression, die nur bei einzelnen Rindern an Tag 3 und 6 (Kimmins et al., 2001) bzw. an Tag 6 (Robinson et al., 2001) stark ausgeprägt war. Unterschiede in der PR-Expression durch eine frühe Trächtigkeit wurden bereits im porcinen Uterus analysiert (Sukjumlong et al., 2005; Sukjumlong et al., 2009). Dabei zeigte sich sowohl bei besamten (70 h post Ovulation) als auch unbesamten (70,5 – 71 h post Ovulation) Sauen eine starke PR Expression im luminalen und grandulären Uterusepithel. In den besamten Sauen hob sich weder die uterine PR mRNA-, noch die PR-Proteinkonzentration von der unbesamter Sauen ab. Untersuchungen beim Kaninchen wiesen hingegen einen ähnlichen Effekt wie in unseren Ergebnissen auf. Dabei ist im luminalen Epithel 3 Tage trächtiger Tiere ebenfalls eine höhere Anzahl PR-positiver Zellkerne sowie eine intensivere Immunfärbung als bei nicht tragenden Kaninchen vorhanden (Anzaldúa et al., 2007). Der Stimulus für die gesteigerte PR-Expression im luminalen Uterusepithel ist jedoch unbekannt. In ovariectomierten Rindern wird der PR im luminalen Uterusepithel exprimiert. Eine Behandlung der ovariectomierten Rinder mit Östrogen verändert die Expression nicht. Eine Progesteronbehandlung allein oder in Kombination mit Östrogen führt zur Hemmung der PR-Expression im luminalen

Uterusepithel (Kimmins et al., 2001). Auch Forde et al. zeigten 2011, dass in Rindern mit niedriger Progesteronkonzentration im Vergleich zu Rindern mit physiologischer Progesteronkonzentration am Zyklustag 7 eine stärkere PR-Expression im luminalen Uterusepithel nachzuweisen ist. Dies führt zu der Annahme, dass die Expression des PRs im luminalen Uterusepithel unter dominanter Anwesenheit von P inhibiert wird. Da sich die Plasmaprogesteronkonzentration in den ersten 9 Tagen der frühen Trächtigkeit und im Zyklus gleichen (Henricks et al., 1970; Henricks et al., 1971; Green et al., 2005), lässt sich der Unterschied in der PR-Expression nicht durch den Einfluss des peripheren Progesteronspiegels ableiten. Es liegt nahe, dass die höhere Anzahl PR-positiver Zellkerne im luminalen Uterusepithel bei 3,5-4,5 Tage trächtigen Rindern mit dem in diesem Zeitrahmen stattfindenden embryonalen Eintritt in den Uterus zusammenhängt. Dabei bildet das luminale Uterusepithel eine direkte Kontaktfläche für den frühen Embryo. Die hohe Ansprechbarkeit des PRs ist demnach mit der Ankunft des Embryos assoziiert und nimmt vermutlich eine wichtige Rolle bei der frühen embryo-maternalen Kommunikation ein. Dennoch scheint es sich hierbei nicht um lokale Signale zu handeln, da die PR-Expression sowohl im ipsi- als auch im kontralateralen Uterushorn stark ausgeprägt ist.

Die Expression des GHR im Zytoplasma der zilientragenden Zellen des Eileiterepithels (Krähling, 2010, persönliche Mitteilung) deuten auf einen Wirkungsmechanismus des GHs im Ovidukt hin. Die hohe Ansprechbarkeit des Rezeptors weist auf eine mögliche Funktion im Gameten- und Embryotransport hin. Um eine Beteiligung am ziliären Transport zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie erstmals der Einfluss von GH auf die ZSF und die PTG in der Ampulla analysiert. Die Zufuhr von GH erzielte jedoch weder in der ZSF noch bei der PTG einen Effekt auf die basalen Werte. Da die Messungen an Segmenten der Ampulla von Rindern im Östrus stammten, konnte eine Rezeptorpräsenz vorausgesetzt werden. Die ausgebliebenen Effekte weisen daraufhin, dass exogenes GH keine Reaktion der ziliären Aktivität am Rezeptor bewirkt. Zudem vermuteten Steffl et al. (2009), aufgrund der Abwesenheit von GH im porcinen Eileiter, dass eine auto- bzw. parakrine Wirkung von GH auf seinen Rezeptor auszuschließen ist. Die hypophysäre Freisetzung des Wachstumshormons (GH) wirkt sowohl auf die Ausschüttung der Gonadotropine wie auch auf die ovarielle Steroidogenese. Damit ist GH indirekt auch an der Synthese und Sekretion in den Epithelzellen des Eileiters beteiligt. Es ist

bekannt, dass GH die sekretorischen Funktionen durch cAMP-abhängige intrazelluläre Mechanismen im Ovidukt beeinflussen kann (Makarevich und Sirotkin, 1997). Gegenstand unserer Untersuchungen war es daher, den Einfluss von GH auf die Synthese und Sekretion im bovinen Eileiter zu analysieren. Durch eine GH-Behandlung der Ampullae von Rindern im Östrus, Metöstrus, Diöstrus Blüte und Proöstrus wurde jedoch weder eine Veränderung in der Synthese und Sekretion von Glykoproteinen noch von sauren Mukopolysacchariden nachgewiesen.

Abschließend ist festzuhalten, dass das videomikroskopische System eine wertvolle Methode darstellt, um die Mechanismen des ziliären Transports im Eileiter weiter aufzuklären. Dies ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche therapeutische Modulation des Transports von Eizellen und Embryonen im Eileiter.

7 Zusammenfassung

Die frühe embryo-maternale Kommunikation findet bereits im Eileiter statt und bildet eine essentielle Voraussetzung für eine erfolgreiche Trächtigkeit. Zur Analyse der beteiligten Signaltransduktionswege wurden bisher überwiegend Untersuchungen unter in vitro Bedingungen durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es daher, unter nahen in vivo Bedingungen den Einfluss von Progesteron (P), Hyaluronsäure (HA) und Wachstumshormon (GH) auf den ziliären Transport und die Sekretion im Eileiter am Modell des Rindes zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden ex vivo Organkulturen des Eileiters mit einem neu etablierten digitalen Videomikroskop untersucht. Dabei wurden mit Hilfe der Software StreamPix und Image-Pro Plus die Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) und die Zilienschlagfrequenz (ZSF) analysiert. Zur Ermittlung der ZSF wurde zusätzlich eine Fast Fourier Transformation durchgeführt. Zudem erfolgten histochemische und immunhistochemische Analysen. Während des Östrus beträgt die basale PTG in der Ampulla $234,7 \pm 18,9 \mu\text{m/s}$ ($n = 4$) und die ZSF $17,8 \pm 0,6 \text{ Hz}$ ($n = 10$). HA bewirkt in der Ampulla nach 15 min. einen signifikanten Anstieg der ZSF um 25,9 % ($n = 7$) und könnte damit als natürlicher Bestandteil der Eileiterflüssigkeit und des COCs eine wichtige Rolle beim Oozyten-Pickup spielen sowie an dem physiologischen Anstieg der ZSF nach der Ovulation beteiligt sein, um den Flüssigkeitsstrom der viskösen Follikelflüssigkeit aufrecht zu erhalten. Zudem löst exogen zugefügte HA im Metöstrus einen signifikanten Anstieg ($n = 6$) der Synthese von sauren Mukopolysacchariden in den sekretorischen Zellen der Ampulla aus und trägt damit zu einer erfolgreichen Gametogenese sowie Fertilisation bei. Progesteron senkt die ZSF in der Ampulla signifikant um 21,6 % ($n = 6$). Eine Begründung dafür könnte die untergeordnete Rolle der ziliären Aktivität im P dominierenden Diöstrus darstellen, da in diesem Zyklusabschnitt kein Transport der Eizelle bzw. des Embryos stattfindet. Dies spiegelt sich auch in der signifikant reduzierten Synthese von sauren Mukopolysacchariden wider ($n = 7$), da auch eine nutritive Versorgung im Diöstrus nicht erforderlich ist. In der frühen Trächtigkeit ist die Bereitstellung von Nährstoffen hingegen von großer Bedeutung, wodurch sich die starke Sekretion von Glykoproteinen über ausgeschleuste Vesikel in der Ampulla begründet. Die Expression des PRs ist 1,5 Tage, nachdem der Embryo die Ampulla verlassen hat, ipsilateral signifikant geringer (64,1 %) als kontralateral ($n = 4$), was

auf einen lokalen Wirkungsmechanismus des Embryos hinweist. Im Uterus wird der PR bei der Ankunft des Embryos ipsi- als auch kontralateral stark exprimiert.

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ziliäre Aktivität im bovinen Eileiter sowohl endokrin (P) als auch parakrin (HA) über lokale Signale reguliert wird. Durch die gewonnenen Erkenntnisse wird zu einem besseren Verständnis der kausalen Zusammenhänge bei Sub- und Infertilitäten bezüglich eines gestörten Gameten- bzw. Embryotransportes beigetragen.

8 Summary

The early embryo-maternal communication occurs to be in the oviduct and provides an essential prerequisite for successful pregnancy. In most instances, studies which analyze the involved signaling pathways are based on in vitro conditions. Therefore the aim of our study was to investigate the influence of progesterone (P), hyaluronan (HA) and growth hormone (GH) on ciliary transport and secretion in the bovine oviduct under near in vivo conditions. For this object we analyzed ex vivo organ cultures of the oviduct with a new established digital videomicroscope. Particletransport speed (PTS) and ciliary beating frequency (CBF) were evaluated by means of the software StreamPix and Image – Pro Plus. To determine CBF a Fast Fourier Transformation was done additionally. Moreover histochemic and immunohistochemic analyzes were performed.

In the bovine estrus ampulla, basal PTS averages $234.7 \pm 18.9 \mu\text{m/s}$ ($n = 4$) and basal CBF $17.8 \pm 0.6 \text{ Hz}$ ($n = 10$). HA causes a significant increase (25.9 %) of the CBF in the ampulla after an incubation of 15 minutes ($n = 7$). As natural component of oviductal fluid and the cumulus oocyte complex, HA could play an important role in the oocyte pickup as well as be involved in the physiological increase of ciliary beating after ovulation to ensure a continuous current of the viscous follicle fluid. Furthermore exogene HA increases the synthesis of acid mucopolysaccharides significantly ($n = 6$) in the secretory cells of the ampulla from cows in metestrus to provide successful gametogenesis and fertilization. Progesterone significantly decreases (21.6 %) CBF in the ampulla ($n = 6$). A potential reason could be the subordinate role of ciliary activity in the P dominant diestrus, when oocyte- and embryo transport does not occur. This is also reflected in significant reduced synthesis of acid mucopolysaccharides ($n = 7$) since nutritive maintenance is not necessary in diestrus. However, in the early pregnancy the supply of nutrients is very important, wherefore a strong secretion by vesicles of glycoproteins arises in the oviduct. 1.5 days after the embryo leaves the ampulla PR expression is significantly less (64.1 %) expressed in ipsilateral ampulla than in contralateral ampulla ($n = 4$), which indicates a local mechanism of the embryo. When the embryo enters the uterus PR is expressed very strong both ipsi- and contralateral.

With the aid of this study it could be shown that ciliary activity is regulated endocrine (P) and paracrine (HA) by local signals in the bovine oviduct. The gained findings

contribute to a better understanding of causal relationship in sub- and infertilities
respective defective gamete and embryo transport.

9 Quellenverzeichnis

- ABDEL-MEGUID SS, SHIEH H S. SMITH WW. DAYRINGER HE. VIOLAND BN. BENTLE LA. (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 6434-37.
- ABE H, HOSHI H. (1997). Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. Cytotechnology 23:171-183.
- ABE H, ONODERA M. SUGAWARA S. SATOH T. HOSHI H. (1999) Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. J. Anat. 195:515-521.
- ABE H, ONODERA M. SUGAWARA S. SATOH T. HOSHI H. (1999). Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. J Anat. 195 (Pt 4):515-21.
- ABE H, SATOH T. HOSHI H. (1998). Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. J Reprod Fertil. 112(1):157-63.
- ABE H, SENDAI Y. SATOH T. HOSHI H. (1995). Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. Mol Reprod Dev. 42(2):226-32.
- ABE H. (1995). Immunocytochemical evidence that a specialised region of the rat oviduct secretes an oviductal glycoprotein. J Anat 188:333-339.
- ABUGHRIEM BM, DORE MA, McGEADY TA, FITZPATRICK E. (2000). Intraepithelial leucocytes in the bovine uterine tube. Cells Tissues Organs. 166(1):20-30.
- ALHO AM, UNDERHILL CB. (1989). The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. The Journal of Cell Biology, 108:1557-1565.

ANDERSON SH, KILLIAN GJ. (1994). Effect of Macromolecules from Oviductal Conditioned Medium on Bovine Sperm Motion and Capacitation. *Biol Reprod.* 51:795-799.

ANZALDÚA SR, CAMACHO-ARROYO I. REYNA-NEYRA A. PÉREZ-MARTÍNEZ M. CERBÓN M. (2007). Regional differences in expression of progesterone receptor in oviduct and uterus of rabbit during early pregnancy. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 147(3):685-90.

ANZALDÚA SR. CAMACHO-ARROYO I. REYNA-NEYRA A. PÉREZ-MARTÍNEZ M. CERBÓN M. (2006). Regional differences in expression of progesterone receptor in oviduct and uterus of rabbit during early pregnancy. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147:685-690.

ARUFFO A, STAMENKOVIC I. MELNICK M. UNDERHILL CB. SEED B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 61(7):1303-13.

ASARI A, MIYAUCHI S. MATSUZAKA S. ITO T. KOMINAMI E. UCHIYAMA Y. (1998). Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Arch Histol Cytol.* 61(2):125-35.

ASSMANN V, JENKINSON D. MARSHALL JF. HART IR. (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J Cell Sci.* 112 (22):3943-54.

AX RL, RYAN RJ. (1979). The porcine ovarian follicle. IV. Mucopolysaccharides at different stages of development. *Biol Reprod.* 20(5):1123-32.

BABAYAN A, NEUER A. DIETERLE S. BONGIOVANNI AM. WITKIN SS. (2008). Hyaluronan in follicular fluid and embryo implantation following in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 25:473-476.

BACHELOT A, MONGET P. IMBERT-BOLLORÉ P. COSHIGANO K. KOPCHICK JJ. KELLY PA. BINART N. (2002). Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology* 143(10):4104-4112.

BAKHTIARI M, SOBHANI A. AKBARI M. PASBAKHSH P. ABBASI M. HEDAYATPOOR. AMIDI F. SARGOLZAEI. (2007). The effect of hyaluronic acid on motility, vitality and fertilization capability of mouse sperms after cryopreservation. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 5(2):45-50.

BALL GD, BELLIN ME. AX RL. FIRST NL. (1982). Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol Cell Endocrinol.* 28(1):113-122.

BAREITHER ML, VERHAGE HG. (1980). Effect of estrogen and progesterone on secretory granule formation and release in the endometrium of the ovariectomized cat. *Biol Reprod.* 22(3):635-43.

BAREITHER ML, VERHAGE HG. (1981). Control of the secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. *Am J Anat.* 162(2):107-18.

BAUERSACHS S, BLUM H. MALLOK S. WENIGERKIND H. RIEF S. PRELLE K. WOLF E. (2002). Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function.in the postovulation period: A transcriptomics approach. *Biol Reprod* 68:1170–1177.

BAUMANN G, MERCADO M. (1993).Growth hormone-binding proteins in plasma. *Nutrition.* 9(6):546-53.

BEBINGTON C, DOHERTY FJ. NDUKWE G. FLEMING SD. (2000). The progesterone receptor and ubiquitin are differentially regulated within the endometrial glands of the natural and stimulated cycle. *Molecular Human Reproduction* 6(3):264-268.

- BELTMAN ME, ROCHE JF. LONERGAN P. FORDE N. CROWE MA. (2009).
Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase
in cattle. *Theriogenology* 72:986-992.
- BERGQUIST AS, YOKOO M. BAGE R. SATO E. RODRIGUEZ-MARTINEZ H.
(2005). Detection of the hyaluronan receptor CD44 in the bovine oviductal
epithelium. *J. Reprod. Dev.* 51(4):445-45.
- BERGQVIST AS, YOKOO M. HELDIN P. FRENDIN P. SATO E. RODRÍGUEZ-
MARTÍNEZ H. (2005). Hyaluronan and its binding proteins in the epithelium
and intraluminal fluid of the bovine oviduct. *Zygote* 13(3):207-18.
- BHATT P, KADAM K. SAXENA A. NATRAJ U. (2004). Fertilization, embryonic
development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal
glycoprotein. *Indian J Exp Biol.* 42(11):1043-55.
- BJORKMAN N und FREDRICSSOI B. (1961). The bovine oviduct epithelium and its
secretory process as studied with the electron microscope and histochemical
tests. *Zeitschrift für Zellforschung* 55:500-513.
- BOICE ML, GEISERT RD. BLAIR RM. VERHAGE HG. (1990). Identification and
characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol
Reprod.* 43(3):457-65.
- BOOS A, MEYER W. SCHWARZ R. GRUNERT E. (1996). Immunohistochemical
assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in
biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous
cycle. *Animal Reproduction Science*, 44(1):11-21.
- BORG N, HOLLAND M. (2008). The effect of glycosaminoglycans on rat gametes in
vitro and the associated signal pathway. *Reproduction.* 135(3):311-9.

- BRITON-JONES C, LOK IH. CHEUNG CK. CHIU TT. CHEUNG LP. HAINES C. (2004). Estradiol regulation of oviductin/oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid expression in human oviduct mucosal cells in vitro. *Fertil Steril.* 81 Suppl 1:749-56.
- BRÜSSOW KP, TORNER H. RÁTKY J. MANABE N. TUCHSCHERER A. (2006). Experimental evidence for the influence of cumulus-oocyte-complexes on sperm release from the porcine oviductal sperm reservoir. *J Reprod Dev.* 52(2):249-257.
- BUHI WC, BAZER FW. ALVAREZ IM. MIRANDO MA. (1991). In vitro synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 beta-estradiol-treated ovariectomized ewes. *Endocrinology* 128(6):3086-95.
- BUHI WC. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123, 355–362. Review.
- BUHI WC, ALVAREZ IM. KOUBA AJ. (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* 166:165-179.
- BYLANDER A, NUTU M. WELLANDER R. GOKSÖR M. BILLIG H. JOAKIM LARSSON DG. (2010). Rapid effect of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8(48)
- CAMAIONI A, SALUSTRI A. YANAGISHITA M. HASCALL VC. (1996). Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Arch Biochem Biophys.* 325(2):190-8.
- CARTER F, FORDE N. DUFFY P. WADE M. FAIR T. CROWE MA. EVANS AC. KENNY DA. ROCHE JF. LONERGAN P. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev.* 20(3):368-75.

- CATO AC, NESTL A. MINK S. (2002). Rapid actions of steroid receptors in cellular signalling pathways. *Sci STKE* 2002(138):re9. Review.
- CAVAZOS LF, ANDERSON LL. BELT WD. HENRICKS DM. KRAELING RR. MELAMPY RM. (1969). Fine structure and progesterone levels in the corpus luteum of the pig during the estrous cycle. *Biol Reprod.* 1(1):83-106.
- CHAGAS E SILVA J, LOPES DA COSTA L. (2005). Lutetrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology*, 64(1):49-60.
- CHEN L, RUSSELL PT. LARSEN WJ. (1993). Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol Reprod Dev.* 34(1):87-93.
- CHILVERS MA, O`CALLAGHAN C. (2000). Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax.* 55(4):314-7.
- CHOUDHARY M, ZHANG X. STOJKOVIC P. HYSLOP L. ANYFANTIS G. HERBERT M. MURDOCH AP. STOJKOVIC M. LAKO M. (2007). Putative role of hyaluronan and its related genes, HAS2 and RHAMM, in human early präimplantation embryogenesis and embryonic stem cell characterization. *Stem Cells.* 25(12):3045-57.
- CLEMENTE M, LA FUENTE J. FAIR T. NAIB AAI. GUTIERREZ-ADAN A. ROCHE JF. RIZOS D. LONERGAN P. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138:507–517.
- COMER MT, LEESE HJ, SOUTHGATE J. (1998). Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of fallopian tube epithelium. *Human Reproduction* 13 (11), 3114-3120.

- CONNELLY OM, JERICEVIC BM. (2002). Progesterone regulation of reproductive function through functionally distinct progesterone receptor isoforms. *Rev Endocr Metab Disord.* 3(3):201-9. Review.
- CONNELLY OM, LYDON JP. (2000). Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids.* 65(10-11):571-7. Review.
- CONNELLY OM, LYDON JP. DeMAYO F. O'MALLY BW. (2000). Reproductive functions of the progesterone receptor. *J Soc Gynecol Investig.* 7(1 Suppl):S25-32. Review.
- CONSOLE GM, GOMEZ DUMM CL. GOYA RG. (1993). Impact of aging on the morphology and function of the somatotroph cell population in rats. *Mech Ageing Dev.* 70(1-2):45-51.
- CORSELLI J. AND TALBOT P. (1987). In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. *Dev Biol.* 122(1):227-42.
- CRITOPH FN, DENNIS KJ. (1977). Ciliary activity in the human oviduct. *Obstet Gynecol Surv.* 32(7):602-3.
- CRITOPH FN, DENNIS KJ. (1977). Ciliary activity in the human oviduct. *Obstet Gynecol Surv.* 32(7):602-3.
- CROXATTO HB. (2002). Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod Biomed Online.* 4(2):160-9.
- CUNNINGHAM BC, ULTSCH M. DE VOS AM. MULKERRIN MG. CLAUSER KR. WELLS JA. (1991). Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science.* 254(5033):821-5.
- CURRAN AJ, PEACEY SR. SHALET SM. (1998). Is maternal growth hormone essential for a normal pregnancy? *Journal of Endocrinology* 139:54-58.

- CUTTLE L, GLAUM SR. COLLINS BA. MILLER RJ. (1992). Calcium signalling in single growth- hormone- releasing factor- responsive pituitary cells. *Endocrinology (Baltimore)* 130(2):945-953.
- DALL'AGLIO C, CECCARELLI P. GARGIULO AM. PEDINI V. MONACI M. (1999). Immunohistochemical localization of endometrial oestrogen and progesterone receptors in the cow. *Anat Histol Embryol.* 28(5-6):375-7.
- DARRYL L, RUSSELL D. SALUSTRI AD. (2006). Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Seminars in Reproductive Medicine* 24(4):217-227.
- DART AJ, STRONG M. ROSE RJ. HODGSON DR. (1998). Effects of two large doses of equine recombinant growth hormone on clinical, haematological and serum biochemical variables in adult horses. *Aust. Vet. J.* Vol.76(5), 339-342.
- DEMOTT RP, LEFEBVRE R. SUAREZ SS. (1995). Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod.* 52(6):1395-403.
- DISKIN MG, KENNY DA. DUNNE LD. SREENAN JM. (2002). Systemic progesterone pre- and post- AI and embryo survival in heifers. *Irish Agricultural Research forum proceedings* p27
- DOBROWOLSKI W, STUPNICKA E. DOMANSKI E. (1968). Progesterone levels in ovarian venous blood during the oestrus cycle of the cow. *J Reprod Fert.* 15:409-414.
- DONALDSON LE, BASSETT JM. THORBURN GD. (1970). Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation, and the effects of under-nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J Endocrinol.* 48(4):599-614.

- DONNELLY KM, FAZLEABAS AT. VERHAGE HG, MAVROGIANIS PA. JAFFE RC. (1991). Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Mol Endocrinol.* 5(3):356-64.
- EDELSTAM GAB, LUNDKVIST OE. WELLS AF. LAURENT TC. (1991). Localization of hyaluronan in regions of the human female reproductive tract. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 39(8):1131-1135.
- ELLINGTON JE. (1991). The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet.* 81(3):313-28.
- FARMER PK, TYLER JM. STACHURA ME. (1989). Monensin influences basal and human growth hormone-releasing hormone 44-induced release of stored and new rat growth hormone and prolactin. *Mol Cell Endocrinol.* 62(2):253-62.
- FINKELSTEIN JW, ROFFWARG HP. BOYAR RM. KREAM J. HELLMAN L. (1972). Age-related change in the twenty-four-hour spontaneous secretion of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 35(5):665-70.
- FLEISCH MC, CHOU YC. CARDIFF RD. ASAITHAMBI A. SHYAMALA G. (2009). Overexpression of progesterone receptor A isoform in mice leads to endometrial hyperproliferation, hyperplasia and atypia. *Molecular Human Reproduction*, 15(4):241–249.
- FORD SP, CHENAULT JR. ECHTERNKAMP SE. (1979). Uterine blood flow of cows during the oestrus cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. *J Reprod Fert.* 56:53-62.
- FORDE N, BELTMAN ME. DUFFY GB. DUFFY P. MEHTA JP. O'GAORA P. ROCHE JF. LONERGAN P. CROWE MA. (2011). Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol Reprod.* 84(2):266-78.

- FORTEZA R, LIEB T. AOKI T. SAVANI RC. CONNER GE. SALATHE M. (2001).
Hyaluronan serves a novel role in airway mucosal host defense. *The FASEB Journal* 15:2179-2186.
- FRANK SJ. (2002). Minireview: Receptor dimerization in GH and erythropoietin action - it takes two to tango, but how? *Endocrinology*. 143(1):2-10.
- FUH G, CUNNINGHAM BC. FUKUNAGA R. NAGATA S. GOEDEL DV. WELLS JA. (1992). Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*. 256(5064):1677-80.
- GADDUM-ROSSE P, BLANDAU RJ. (1976). Comparative observations on ciliary currents in mammalian oviducts. *Biol Reprod*. 14(5):605-9.
- GANDOLFI F, BREVINI TAL. RICHARDSON L. BROWN CR. MOOR RM. (1989). Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Dev* 106:303-312.
- GAWRONSKA B, PAUKKU T. HUHTANIEMI I. WASOWICZ G. A. J. ZIECIK GAJ. (1999). Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptors in pig Fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct. *J Reprod Fert*. 115:193-301.
- GOFFIN V, KELLY PA. (1997). The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2(1):7-17.
- GOTT AL, GRAY SM, JAMES AF, LEESE HJ. (1988). The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biol Reprod*. 39(4):758-63.
- GOTT AL, GRAY SM. JAMES AF. LEESE HJ. (1988). The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Bio Reprod* 39:758-763.
- GREEN MP, HUNTER MG. MANN GE. (2005). Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 88(3-4):179-89.

- GRIEVE KL, KENDLE KE. (1984). Method for maintaining embryo transport in mouse oviducts in vitro. *J Reprod Fertil.* 71(1):303-7.
- HAGIWARA H, AOKI T. OHWADA N. FUJIMOTO T. (1997). Development of striated rootlets during ciliogenesis in the human oviduct epithelium. *Cell Tissue Res.* 290(1):39-42.
- HALBERT SA, BECKER DR & SZAL SE. (1989). Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. *Biol Reprod* 40, 1131-1136.
- HALBERT SA, TAM PY, BLANDAU RJ. (1976) Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science* 191(4231):1052-3.
- HANDROW RR, LENZ RW. AX RL. (1982). Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Comm.* 107:1326.
- HARPER K, PROCTOR M. HUGHES E. (2003). Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD000099. Review.
- HARTT LS, CARLING SJ. JOYCE MM. JOHNSON GA. VANDERWALL DK. OTT TL. (2005). Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*, 130:241–250.
- HENRICKS DM, DICKEY JF. NISWENDER GD. (1970). Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. *Biol Reprod.* 2(3):346-51.
- HENRICKS DM, GUTHRIE HD. HANDLIN DL. (1972). Plasma estrogen, progesterone and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in pigs. *Biol Reprod.* 6:210-218.

HENRICKS DM, HILL JR. DICKEY JF. LAMOND DR. (1973). Plasma hormone levels in beef cows with induced multiple ovulations. *J Reprod Fert.* 35:225-233.

HENRICKS DM, LAMOND DR. HILL JR. DICKEY JF. (1971). Plasma progesterone concentration before mating and in early pregnancy in the beef heifer. *J Anim Sci.* 33:450-454.

HOFMANN M, FIEBER C. ASSMANN V. GÖTTLICHER M. SLEEMAN J. PLUG R. (1998). Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *Journal of Cell Science* 111:1673-1684.

HOLL RW, THORNER MO. LEONG DA. (1988). Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology (Baltimore)* 122(6):2927-2932.

HOLLIS DE, FRITH PA. VAUGHAN JD. CHAPMAN RE. NANCARROW CD. (1984). Ultrastructural changes in the oviductal epithelium of Merino ewes during the estrous cycle. *Am J Anat.* 171(4):441-56.

HORTON MR, OLMAN MA. NOBLE PW. (1999). Hyaluronan fragments induce plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit urokinase activity in mouse alveolar macrophages: a potential mechanism for impaired fibrinolytic activity in acute lung injury. *Chest.* 116(1 Suppl):17S.

HUANG S, DRIESSEN N. KNOLL M. TALBOT P. (1997). In vitro analysis of oocyte cumulus complex pickup rate in the hamster *Mesocricetus auratus*. *Mol Reprod Dev.* 47(3):312-22.

HULL KL, HARVEY S. (2001). Growth hormone:role in female reproduction. *Journal of Endocrinology* 168:1-23. Review.

HUNTER RH. (1994). Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev.* 39(2):176-81. Review.

- HUSZAR G, WILLETTS M. CORRALES M. (1990). Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril.* 54(6):1127-34.
- INSKEEP EK. (2004). Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci.* 82 E-Suppl:E24-39. Review.
- ITANO N, SAWAI T. YOSHIDA M. LENAS P. YAMADA Y. IMAGAWA M. SHINOMURA T. HAMAGUCHI M. YOSHIDA Y. OHNUKI Y. MIYAUCHI S. SPICER AP. McDONALD JA. KIMATA K. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry* 275(35): 25085–25092
- JAFFE RC, ARIAS EB. O'DAY-BOWMAN MB. DONNELLY KM. MAVROGIANIS PA. VERHAGE HG. (1996). Regional distribution and hormonal control of estrogen-dependent oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod.* 55(2):421-6.
- JANSEN RP. (1984). Endocrine response in the fallopian tube. *Endocr Rev* 5:525-551.
- JOUDREY EM, LECHNIAK D. PETRIK J. KING WA. (2003). Expression of growth hormone and its transcription factor, Pit-1, in early bovine development. *Mol Reprod Dev.* 64(3):275-83.
- KANEKO T, SAITO H. TOYA M. SAITO T. NAKAHARA K. HIROI M. (2000). Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. *J Assist Reprod Genet.* 17(3):162-7.
- KANO K, MIYANO T. KATO S. (1998). Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and -fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. *Biol Reprod.* 58(5):1226-32.

- KAPUR RP, JOHNSON LV. (1985). An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev Biol.* 112(1):89-93.
- KARTERIS E, ZERVOU S. PANG Y. DONGJ. HILLHOUSE EW. RANDEVA HS. THOMAS P. (2006). Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol.* 20(7):1519-34.
- KHANUM SA, HUSSAIN M. KAUSAR R. (2008). Progesterone and estradiol profiles during estrous cycle and gestation in dwarf goats (*capra hircus*). *Pakistan Vet. J.* 28(1): 1-4.
- KIMMINS S, MACLAREN LA. (2001). Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta.* 22(8-9):742-8.
- KIRBY JK, THATCHER WW. COLLIER RJ. SIMMEN FA. LUCY MC. (1996). Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary and oviduct. *Biology of Reproduction* 55:996-1002.
- KÖLLE S, DUBIELZIG S, REESE S, WEHREND A, KÖNIG P, KUMMER W. (2009). Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol Reprod.* 81(2):267-74. Epub 2009 Mar 18.
- KÖLLE S, REESE S, KUMMER W. (2010). New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. *Theriogenology.* 73(6):786-95.
- KÖLLE S, STOJKOVIC M. BOIE G. WOLF E. SINOWATZ F. (2002). Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 61:180-186.

- KÖLLE S, STOJKOVIC M. PRELLE K. WATERS M. WOLF E. SINOWATZ F. (2001). Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biol Reprod* 64:1826-1834.
- KÖLLE S, STOJKOVIC M. REESE S. REICHENBACH HD. WOLF E. SINOWATZ F. (2004). Effects of growth hormone on the ultrastructure of bovine präimplantation embryos. *Cell Tissue Res.* 317(1):101-8.
- KOPCHICK JJ, ANDRY JM. (2000). Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol. Genet. Metab.* 71:293-314.
- KORNOVSKI BS, McCOSHEN J. KRENTSER J. TURLEY E. (1994). The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril.* 61(5):935-40.
- KREITMANN B, BUGAT R. BAYARD F. (1979). Estrogen and progestin regulation of the progesterone receptor concentration in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 49(6):926-9.
- LAM X, GIESEKE C. KNOLL M. TALBOT P. (2000). Assay and Importance of Adhesive Interaction Between Hamster (*Mesocricetus auratus*) Oocyte-Cumulus Complexes and the Oviductal Epithelium. *Biol Reprod.* 62:579-588.
- LAURENT TC, FRASER JR. (1992). Hyaluronan. *FASEB J.* 6(7):2397-404. Review.
- LAURENT TC. (1955). Studies on hyaluronic acid in the vitreous body. *J Biol Chem.* 216(1):263-71.
- LAUSCHOVÁ I. (1999). Influence of estrogen and progesterone on ultrastructural indices of oviductal epithelium in sexually immature mice. *ACTA VET. BRNO,* 68: 13–21.
- LEE CN, AX RL. (2006). Concentration and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci* 67:2006-2009

- LEESE HJ, TAY JI. REISCHL J. DOWNING SJ. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reprod* 121:319-346. Review.
- LEESE HJ. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil.* 82(2):843-56.
- LEFCOURT AM, BITMAN J. WOOD DL. AKERS RM. (1995). Circadian and ultradian rhythms of peripheral growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 12(3):247-56.
- LESLEY J, HYMAN R. ENGLISH N. CATTERALL JB. TURNER GA. (1997). CD44 in inflammation and metastasis. *Glycoconj J.* 14(5):611-22. Review.
- LI CH, DIXON JS. (1971). Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision. *Arch. Biochem. Biophys.* 146(1): 233-6.
- LI CH, EVANS HM. SIMPSON ME. (1945). Isolation and properties of the anterior pituitary growth hormone. *J. Biol. Chem.* 159:353-366.
- LI CH, SIMPSON ME, EVANS HM. (1948). The gigantism produced in normal rats by injection of the pituitary growth hormone; main chemical components of the body. *Growth.* 12(1):39-42.
- LIBERSKY EA, BOATMAN DE. (1995). Progesterone concentrations in serum, follicular fluid, and oviductal fluid of the golden hamster during the periovulatory period. *Biol Reprod.* 53:477-482.
- LIEB T, FORTEZA R. SALATHE M. (2000). Hyaluronic acid in cultured ovine tracheal cells and its effect on ciliary beat frequency in vitro. *J. of Aerosol Medicine* 13(3):231-237.
- LINDEMANN CB, LESICH KA. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *Journal of Cell Science* 123, 519-528.

- LINDEMANN CB, MITCHELL DR. (2007). Evidence for axonemal distortion during the flagellar beat of *Chlamydomonas*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 64(8):580-9.
- LOBIE PE, BREIPOHL W. ARAGÓN JG. WATESTR M. (1990). Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive system. *Endocrinology* 126(4):2214-2221.
- LOMBARD L. (1950). The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the estrous cycle. *J. Morphology* 86, 1-15.
- LÜCKE S. (2005). Zyklusabhängige Veränderungen am Eileiter des Rindes und Charakterisierung boviner Eileiterepithelzellen in Suspensionskultur. Dissertation, München.
- LUKASZEWSKA J, HANSEL W. (1980). Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil*. 59(2):485-93.
- LUSSIER BT, FRENCH MB. MOOR BC. KRAICER J. (1991). Free intracellular Ca²⁺ concentration and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca²⁺ influx raises. *Endocrinology* 128(1):570-582.
- LYDON JP, SIVARAMAN L. CONNEELY OM. (2000). A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 5(3):325-38. Review.
- LYONS RA, DJAHANBAKHCH O, MAHMOOD T, SARIDOGAN E, SATTAR S, SHEAFF MT, NAFTALIN AA, CHENOY R. (2002a). Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod*. 17(3):584-8.

- LYONS RA, DJAHANBAKHCH O, MAHMOOD T, SARIDOGAN E, SATTAR S, SHEAFF MT, NAFTALIN AA, CHENOY R. (2002a). Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod.* 17(3):584-8.
- LYONS RA, DJAHANBAKHCH O, SARIDOGAN E, NAFTALIN AA, MAHMOOD T, WEEKES A, CHENOY R. (2002b). Peritoneal fluid, endometriosis, and ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Lancet.* 360(9341):1221-2.
- LYONS RA, DJAHANBAKHCH O. MAHMOOD T. SARIDOGAN E. SATTAR S. SHEAFF MT. NAFTALIN AA. CHENOY R. (2002). Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Human Reproduction* 17(3):584-588.
- LYONS RA, SARDOGAN E. DJAHANBAKHCH O.(2006). The effect of ovarien follicular fluid and peritoneal fluid on fallopian tube ciliary beat frequency. *Human Reproduction* 21(1):52-56.
- LYONS RA, SARIDOGAN E, DJAHANBAKHCH O. (2006). The effect of ovarian follicular fluid and peritoneal fluid on Fallopian tube ciliary beat frequency. *Hum Reprod.* 21(1):52-6.
- LYONS RA, SARIDOGAN E. DJAHANBAKHCH O. (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reproduction Update,* 12(4):363–372.
- MAHMOOD T, SARDOGAN E. SMUTNA S. HABIB AM, DJAHANBAKHCH O. (1998). The effect of ovarien steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Human Reproduction* 13(11):2991-2994.
- MAKAREVICH AV, SIROTKIN AV. (1997). The involvement of the GH/IGF-I axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. *Animal Reproduction Science* 48:197-207.

MAKAREVICH AV, SIROTKIN AV. (1997). The involvement of the GH/IGF-I axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. *Anim Reprod Sci.* 48(2-4):197-207.

MANGAL RK, WIEHLE RD. POINDEXTER AN. WEGEL NL. (1997). Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 63(4-6):195-202.

MANN GE, FRAY MD. LAMMING GE. (2005). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *Vet J.* 171, (3):500-503.

MANN GE, GREEN MP. SINCLAIR KD. DEMMERS KJ. FRAY MD. GUTIERREZ CG. (2003). Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 79:71-9.

MANN GE, LAMMING GE. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction.* 121(1):175-80.

MANN GE, LAMMING GE. ROBINSON RS. WATHES DC. (1999). The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl.* 54:317-28. Review.

MANN GE, MERSON P. FRAY MD. LAMMING GE. (2001). Conception rate following progesterone supplementation after second insemination in dairy cows. *Vet J.* 162(2):161-2.

MANN GE. (2001). Pregnancy rates during experimentation in dairy cows. *Vet J.* 161(3):301-5.

MANZANARES D, MONZON ME. SAVANI RC. SALATHE M. (2007). Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37(2):160-8.

- MARTIN I, TORRES NETO R. OBA E. Jr BURATINI J. BINELLI M. LAUFER-AMORIM. FERREIRA JCP. (2008). Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrus cycle in nelore (*bos taurus indicus*) cow. *Reprod Dom Anim* 43:415-421.
- MARTUS NS, VERHAGE HG. MAVROGIANIS PA. THIBODEAUX JK. (1998). Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil.* 113(2):323-9.
- MATHEW D, SELLNER EM. GREEN JC. OKAMURA CS. ANDERSON LL. LUCY MC. GEISERT RD. (2011). Uterine progesterone receptor expression, conceptus development and ovarian function in pigs treated with RU 486 during Early pregnancy. *Biol Reprod.* 84(1):130-9.
- McCOMB P, LANGLEY L, VILLALON M, VERDUGO P. (1986). The oviductal cilia and Kartagener's syndrome. *Fertil Steril.* 46(3):412-6.
- McDANIEL JW, SCALZI H. BLACK DL. (1968). Influence of ovarian hormones on histology and histochemistry of the bovine oviduct. *J Dairy Sci.* 51(5):754-61.
- MCDOWELL KJ, ADAMS MH. ADAM CY. SIMPSON KS. (1999). Changes in equine endometrial oestrogen receptor alpha and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J Reprod Fertil.* 117(1):135-42.
- McNEILL RE, SREENAN JM. DISKIN MG. CAIRNS MT. FITZPATRICK R. SMITH TJ. MORRIS DG. (2006). Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reprod Fertil Dev.* 18(5):573-83.
- MILVAE RA, HANSEL W. (1983). Prostacyclin, prostaglandin F₂ a and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 29:1063-1068.

- MŁYNARCZUK J, SAŚIADEK J. KOTWICA J. (2005). Non-genomic action of progesterone in cultured bovine luteal and endometrial epithelial cells. *Bull Vet Inst Pulawy* 49:193-198.
- MORIMOTO K, YAMAGUCHI H. IWAKURA Y. MORISAKA K. OHASHI Y. NAKAI Y. (1991). Effects of viscous hyaluronate-sodium solutions on the nasal absorption of vasopressin and an analogue. *Pharm Res.* 8(4):471-4.
- MOTE PA, ARNETT-MANSFIELD L. GAVA N. DE FAZIO A. MULAC-JERICEVIC B. CONNEELY OM. CLARKE CL. (2006). Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. *Endocrinology* 147(12):5503–5512.
- MOTE PA, BALLEINE RL. McGOWAN EM. CLARKE CL. (1999). Colocalization of Progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:2963-2971.
- MULAC-JERICEVIC B, MULLINAX RA. DeMAYO FJ. LYDON JP. CONNEELY OM. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science.* 289(5485):1751-4.
- MURRAY MK, (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol Reprod.* 53(3):653-63.
- MURRAY MK, (1996). Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. *J Reprod Fertil.* 106(2):173-83.
- MURRAY MK. (1992). Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct. *Biol Reprod.* 47(5):889-902.

- MURRAY MK. (1993). An estrogen-dependent glycoprotein is synthesized and released from the oviduct in a temporal- and region-specific manner during early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod.* 48(3):446-53.
- MURRAY MK. (1997). Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. *The Anatomical Record*, 247:368–378.
- NAJAK RK, ALBERT EN. KASSIRA WN. (1976). Fine structural changes of the porcine uterine tube epithelium during early and late pregnancy. *Am J Vet Res.* 37(12):1421-33.
- NAOR D, SIONOV RV. ISH-SHALOM D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res.* 71:241-319.
- NAYAK RK, ELLINGTON EF. (1977). Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. *Am J Vet Res.* 38(2):157-68.
- NICHOL R, HUNTER RH. GARDNER DK. LEESE HJ. COOKE GM. (1992). Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil.* 96(2):699-707.
- NICHOL R, HUNTER RH. GARDNER DK. PARTRIDGE R. LEESE HJ. COOKE GM. (1998). Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomised pigs. *Res Vet Sci.* 65(3):263-4.
- NISHIMURA A, SAKUMA K. SHIMAMOTO C. SHIGENORI I. NAKANO T. DAIKOKU E. OHMACHI M. USHIROYAMA T. UEKI M. KUWABARA H. MORI H. NAKAHARI T. (2010). Ciliary beat frequency controlled by oestradiol and progesterone during ovarian cycle in guinea-pig fallopian tube. *Experimental Physiology* 95(7):819-828.

NOREIKAT K, KUMMER W, KÖLLE S. (2009). Impact of early pregnancy and the non- neuronal cholinergic system on oviductal transport in the mouse.

Dissertation

NUTU M, WEIJDEGARD B. THOMAS P. BERGH C. THURIN-KJELLBERG A. BILLIG H. PANG Y. LARSSON DGJ. (2007). Membrane progesterone receptor gamma: tissue distribution and expression in ciliated cells in the fallopian tube. *Molecular Reproduction and Development* 74:843-850.

NUTU M, WEIJDEGARD B. THOMAS P. THURIN-KJELLBERG A. BILLIG H. LARSSON DGJ. (2009). Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors β and γ in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7:89

ODOR DL, AUGUSTINE JR. (1995). Morphological study of changes in the baboon oviductal epithelium during the menstrual cycle. *Microsc Res Tech.* 32(1):13-28.

OKADA A, OTHA Y. INOUE S. HIROI H. MURAMATSU M. IGUCHI T. (2003). Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats. *Journal of Molecular Endocrinology* 30:301-315.

OKUMU LA, FORDE N. FAHEY AG. FITZPATRICK E. RCHE JF. CROWE MA. LONERGAN P. (2010). The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction.* 140(1):143-53.

ORITZ ME, BEDREGAL P, CARVAJAL MI, CROXATTO HB. (1986). Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biol Reprod.* 34(4):777-81.

- ORITZ ME, LLADOS C, CROXATTO HB. (1989). Embryos of different ages transferred to the rat oviduct enter the uterus at different times. *Biol Reprod.* 41(3):381-4.
- PALTIELI Y, EIBSCHITZ I. ZISKIND G. OHEL G. SILBERMANN M. WEICHSELBAUM A. (2000). High progesterone levels and ciliary dysfunction - a possible cause of ectopic pregnancy. *J Assist Reprod Genet.* 17(2):103-6.
- PANTALEON M, WHITESIDE EJ. HARVEY MB. BARNARD RT. WATERS MJ. KAYE PL. (1997). Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by präimplantation mouse embryos: A role for GH in early embryogenesis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5125–5130.
- PECK D, ISACKE CM. (1996). CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. *Curr Biol.* 6(7):884-90.
- PEREIRA RM, BAPTISTA MC. VAQUES MI. HORTA AE. PORTUGAL PV. BESSA RJ. SILVA JC. PEREIRA MS. MARQUES CC. (2006). Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim Reprod Sci.* 98(3-4):293-301.
- PEREIRA RM, MARQUES CC. BAPTISTA MC. VASQUES MI. HORTA AE. (2008). Embryos and culture cells: a model for studying the effect of progesterone. *Anim Reprod Sci.* 111(1):31-40.
- PEREZ MARTINEZ S, VIGGIANO M, FRANCHI AM, HERRERO MB, ORTIZ ME, GIMENO MF, VILLALÓN M. (2000). Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct. *J Reprod Fertil.* 118(1):111-7.
- PETERSON CM. (2000). Estrogen and progesterone receptors: an overview from the year 2000. *J Soc Gynecol Investig.* 7(1 Suppl):S3-7. Review.

- PHARAZYN A, FOXCROFT GR. AHERNE FX. (1991). Temporal relationship between plasma progesterone concentrations in the utero-ovarian and jugular veins during early pregnancy in the pig. *Anim Reprod Sci.* 26(3):323-332.
- PIEBER D, ALLPORT VC. HILLS F. JOHNSON M. BENNETT PR. (2001). Interaction between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Molecular Human Reproduction*, 7(9):875-879.
- PLOTSKY PM. & VALE W. (1985). Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science.* 230(4724):461-3.
- PREVOST J, BÉLANGER A. BERNARD C. LAMBERT RD. (1989). Androgen metabolites in bovine follicular fluid. *Theriogenology.* 31(3):675-81.
- PRÉVOST J, BÉLANGER A. BERNARD C. LAMBERT RD. (1989). Androgen metabolites in bovine follicular fluid. *Theriogenology* 31(3):675-681.
- RANGANATHAN S, BHARADWAJ A. DATTA K. (1995). Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein. *Cell Mol Biol Res.* 41(5):467-76.
- RANGANATHAN S. BHARADWAJ A. DATTA K. (1995). Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein. *Cell Mol Biol Res.* 41(5):467-76.
- ROBERTS GP, PARKER JM, SYMONDS HW. (1975). Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil.* 45(2):301-13.
- ROBINSON RS, MANN GE. LAMMING GE. WATHES DC. (1999). The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *J Endocrinol.* 160(1):21-33.

- ROBINSON RS, MANN GE. LAMMING GE. WATHES DC. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*. 122(6):965-79.
- ROSE MK, PARVIZI N. (2011). Up-regulation of lymphocytic growth hormone secretion during the luteal phase of cycle and early pregnancy. *Regul Pept*. 167(1):1-4.
- ROTTMAYER R, ULBRICH SE. KÖLLE S. PRELLE K. NEUMUELLER C. SINOWATZ F. MEYER HH. WOLF E. HIENDLEDER S. (2006). A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*. 132(4):637-48.
- RÜSSE I, LIEBICH HG. (1979). Maturation of secretory granules in the endosalpinx one to four days post coitum in sheep. *Cell Tissue Res*. 201:145-158.
- SABEUR K, CHERR GN. YUDIN AI. OVERSTREET JW. (1998). Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote*. 6(2):103-11.
- SAITO H, KANEKO T. TAKAHASHI T. KAWACHIYA S. SAITO T. HIROI M. (2000). Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertility and Sterility* 74(6):1148-
- SALAMONSEN LA, SHUSTER S. STERN R. (2001). Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle. Implications for implantation and menstruation. *Cell Tissue Res*. 306(2):335-40.
- SALATHE M. (2007). Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu. Rev. Physiol*. 69:401-22.

- SALUSTRI A, YANAGISHITA M. UNDERHILL CB. LAURENT TC. HASCALL VC. (1992). Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol.* 151(2):541-51.
- SATIR P. (1980). Structural basis of ciliary movement. *Environ Health Perspect* 35, 77-82.
- SATIR P. (1992). Mechanisms of ciliary movement: contributions from electron microscopy. *Scanning Microsc.* 6 (2): 573-9.
- SATOH T, ABE H. SENDAI Y. IWATA H. HOSHI H. (1995). Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1266(2):117-23.
- SAVANI RC, WANG C. YANG B. ZHANG S. KINSELLA MG. WIGHT TN. STERN R. NANCE DM. TURLEY EA. (1995). Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J Clin Invest.* 95(3):1158-68.
- SAWYER HR, OLSON PN. GORELL TA. (1984). Effects of progesterone on the oviductal epithelium in estrogen-primed prepubertal beagles: light and electron microscopic observations. *Am J Anat.* 169(1):75-87.
- SBRACIA M, GRASSO J. SAYME N. STRONK J. HUSTAR G. (1997). Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Human Reproduction*, 12(9):1949-1954.
- SCHAMS D, KOHLENBERG S. AMSELGRUBER W. BERISHA B. PFAFFL MW. SINOWATZ F. (2003). Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *Journal of Endocrinology* 177:305–317.
- SCHOEN J, BONDZIO A. TOPP K. EINSPANIER R. (2008). Establishment and characterization of an adherent pure epithelial cell line derived from the bovine oviduct. *Theriogenology* 69:536-545.

SCHOENEFELDER M, EINSPANIER R. (2003). Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biology of Reproduction* 69:269-277.

SCHRADER WT, BIRNBAUMER ME. HUGHES MR. WEIGEL NL. GRODY WW. O'MALLEY BW. (1981). Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. *Recent Prog Horm Res.* 37:583-633. Review.

SCHULER G, WIRTH C. KLISCH K. PFARRER C. LEISER R. HOFFMANN B. (1999). Immunolocalization of Progesterone Receptors in Bovine Placentomes Throughout Mid and Late Gestation and at Parturition. *Biol Reprod.* 61:797-801.

SCHWÄRZLER P, UNTERGASSER G. HERMANN M. DIRNHOFER S. ADENDSTEIN B. MADERSBACHER S. BERGER P. (1997). Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(10):3337-41.

SCHMIDT A, MAVROGIANIS PA. O'DAY-BOWMAN MB. VERHAGE HG. (1997). Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Mol Reprod Dev.* 46(2):201-7.

SIMONCINI T, GENAZZANI AR. (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology* 148:281-292.

SLEVIN M, KRUPINSKI J. KUMAR S. GAFFNEY J. (1998). Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab. Invest.* 78: 987-1003.

SPENCER TE, BAZER FW. (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 53:1527-1543.

SPENCER TE, BAZER FW. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci.* 7:d1879-98. Review.

SPENCER TE, JOHNSON GA. BURGHARDT RC. BAZER FW. (2004). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod.* 71:2–10.

SPILMAN CH, SHAIKH AA, HARPER MJ. (1978). Oviductal motility amplitude and ovarian steroid secretion during egg transport in the rabbit. *Biol Reprod.* 18(3):409-17.

STABENFELDT GH, EWING LL. McDONALD LE. (1969). Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 19(3):433-42.

STARBUCK GR, GUTIERREZ CG. PETERS AR. MANN GE. (2006). Timing of follicular phase events and the postovulatory progesterone next term rise following synchronisation of oestrus in cows. *Vet J.* 172(1):103-108.

STAROS AL, KILLIAN GJ. (1998). In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. *J Reprod Fertil.* 112(1):131-7.

STEFFL M, SCHWEIGER M. MAYER J. AMSELGRUBER WM. (2009). Expression and localization of growth hormone receptor in the oviduct of cyclic and pregnant pigs and mid-implantation conceptuses. *Histochem Cell Biol* 131:773-779.

STEIN BA und O`NEILL C. (1994). Morphometric evidence of changes in the vasculature of the uterine tube of mice induced by the 2-cell embryo on the second day of pregnancy. *J. Anat.* 185:397-403.

STEVENS R, BHARGAVA J. POWELL RJ. (1998). Endothelial cells inhibit smooth muscle cell secretion of hyaluronan. *J Vasc Surg.* 28(2):319-25.

- STOJKOVIC M, KÖLLE S. PEINL S. STOJKOVIC P. ZAKHARTCHENKO V. THOMPSON JG. WENIGERKIND H. REICHENBACH H-D. SINOWATZ F. WOLF E. (2002). Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 124:141-153.
- STOJKOVIC M, KREBS O. KÖLLE S. PRELLE K. ASSMANN V. ZAKHARTCHENKO V. SINOWATZ F. WOLF E. (2003). Development regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early bovine embryos. *Bio Reprod* 68:60-66.
- STRONGE AJ, SREENAN JM. DISKIN MG. MEE JF. KENNY DA. MORRIS DG. (2005). Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64(5):1212-24. Epub 2005 Apr 7.
- SUCHANEK E. SIMUNIC V. JURETIC D. GRIZELJ V. (1994). Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril*. 62(2):347-52.
- SUKJUMLONG S, DALIN AM. SAHLIN L. PERSSON E. (2005). Immunohistochemical studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrous cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. *Reproduction*. 129(3):349-59.
- SUKJUMLONG S, PERSSON E. DALIN AM. JANSON V. SAHLIN L. (2009). Messenger RNA levels of estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in the cyclic and inseminated/early pregnant sow uterus. *Anim Reprod Sci*. 112(3-4):215-28.
- SUN T, LEI ZM. RAO CV. (1997). A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*. 131(1):97-108.

- SUN YK, XI YP. FENOGLIO CM. PUSHPARAJ N. O'TOOLE KM. KLEDIZIK GS, NETTE EG. KING DW. (1984). The effect of age on the number of pituitary cells immunoreactive to growth hormone and prolactin. *Hum Pathol.* 15(2):169-80.
- SYVÄLÄ H, VIENONEN A. ZHUANG YH. KIVINEVA M. YLIKOMI T. TUOHIMAA P. (1998). Evidence for enhanced ubiquitin-mediated proteolysis of the chicken progesterone receptor by progesterone. *Life Sci.* 63(17):1505-12.
- TALBOT P, GEISKE C. KNOLL M. (1999). Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Molecular Biology of the Cell* 10:5-8.
- TAMMI R, RILLA K. PIENIMAKI JP. MACCALLUM DK. HOGG M. LUUKKONEN M. HASCALL VC. TAMMI M. (2001). Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem.* 276(37):35111-22.
- TAY JI, RUTHERFORD AJ. KILLICK SR. MAGUINESS SD. PARTRIDGE RJ. LEESE HJ. (1997). Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Hum Reprod.* 12(11):2451-6.
- TEILMANN SC, CLEMENT CA. THORUP J. BYSKOV AG. CHRISTENSEN ST. (2006). Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *Journal of Endocrinology* 191:525-535.
- THIBODEAUX JK, MENEZO Y. ROUSSEL JD. HANSEL W. GOODEAUX LL. THOMPSON DL JR. GODKE RA. (1992). Coculture of in vitro fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycle. *J Dairy Sci.* 75(6):1448-55.
- THOMAS L, BYERS HR. VINK J. STAMENKOVIC I. (1992). CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *Cell Biol.* 118(4):971-7.
- THORBURN GD, SCHNEIDER W. (1972). The progesterone concentration in the plasma of the goat during the oestrous cycle and pregnancy. *J Endocrinol.* 52(1):23-36.

- TIENTHAI P, KJELLÉN L. PERTOFT H. SUZUKI K. RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2000). Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod Fertil Dev.* 12(3-4):173-82.
- TIENTHAI P, SUZUKI K. PERTOFT H. KJELLÉN L. RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2000). Production of Glycosaminoglycans by the Porcine Oviduct in Relation to Sperm Storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 35(3-4):167–170.
- TIENTHAI P, YOKOO M. KIMURA N. HELDIN P. SATO E. RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2003). Immunohistochemical localization and expression of the hyaluronan receptor CD44 in the epithelium of the pig oviduct during oestrus. *Reproduction* 125:119-132.
- TOOLE BP. (1997). Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med.* 242(1):35-40.
- TOYOKAWA K, HARAYAMA H. MIYAKE M. (2005). Exogenous hyaluronic acid enhances porcine parthenogenetic embryo development in vitro possibly mediated by CD44. *Theriogenology* 64:378-392.
- TROCHON V, MABILAT-PRAGNON C. BERTRAND P. LEGRAND Y. SORIA C. DELPECH B. LU H. (1997). Hyaluronectin blocks the stimulatory effect of hyaluronan-derived fragments on endothelial cells during angiogenesis in vitro. *FEBS Lett.* 418(1-2):6-10.
- UENO S, NIIMURA S. (2008). Size of Perivitelline Space and Incidence of Polyspermy in Mouse Oocytes Matured In Vivo and In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research* 25(1):44-49.
- UENO S, YOSHIDA N. NIIMUR S. (2009). Amount of hyaluronan produced by mouse oocytes and role of hyaluronan in enlargement of the perivitelline space. *J Reprod Dev.* 55(5):496-501.

- UHRÍN V. (1983). [Microscopic structure of the uterine mucosa in cows during the estrus cycle]. *Vet Med (Praha)*. 28(12):727-36.
- ULBRICH SE, KETTLER A. EINSPANIER R. (2003). Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 84:279-289.
- ULBRICH SE, KETTLER A. EINSPANIER R. (2003). Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 84(2-3):279-89.
- ULBRICH SE, SCHOENFELDER M. THOENE S. EINSPANIER R. (2004). Hyaluronan in the bovine oviduct-modulation of synthases and receptors during the estrus cycle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 214:9-18.
- UMEZU T, HANAZONO M. AIZAWA S. TOMOOKA Y. (2003). Characterization of newly established clonal oviductal cell lines and differential hormonal regulation of gene expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2003 Mar-Apr;39(3-4):146-56.
- UNDERHILL C, DORFMAN A. (1978). The role of hyaluronic acid in intercellular adhesion of cultured mouse cells. *Exp Cell Res*. 117(1):155-64.
- VAQUES MI, MARQUES CC. PEREIRA RM. BAPTISTA MC. HORTA AEM. (1997). Luteotrophic effect of bovine embryos and different sera supplementation on granulosa cell monolayers in vitro. *Estoril*, 2:155-164.
- VARNER DD, FORREST DW. FUENTES F. TAYLOR TS. HOOPER RN. BRINSKO SP. BLANCHARD TL. (1991). Measurements of glycosaminoglycans in follicular, oviductal and uterine fluids of mares. *J Reprod Fertil Suppl*. 44:297-306.

- VERHAGE HG, ABEL JH JR. TIETZ WJ JR. BARRAU MD. (1973). Development and maintenance of the oviductal epithelium during the estrous cycle in the bitch. *Biol Reprod.* 9(5):460-74.
- VERHAGE HG, ABEL JH. TIETZ WJ. BARRAU MD. (1973). Estrogen-induced differentiation of the oviductal epithelium in prepubertal dogs. *Bio Reprod* 9:475-488.
- VERHAGE HG, BARREITHER ML. JAFFE RC. AKBAR M. (1979). Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat.* 156(4):505-21.
- VERHAGE HG, FAZLEABAS AT. DONNELLY K. (1988). The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology.* 122(4):1639-45.
- VERHAGE HG, FAZLEABAS AT. MAVROGIANIS PA. O'DAY-BOWMAN MB. SCMIDT A. ARIAS EB. JAFFE RC. (1997). Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in fertility control. *J Reprod Fertil Suppl.* 51:217-26.
- VERHAGE HG, MAVROGIANIS PA. BOICE ML. LI W. FAZLEABAS AT. (1990). Oviductal epithelium of the baboon: hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins. *Am J Anat.* 187(1):81-90.
- VESANEN M, ISOMAA V. ALANKO M. VIHKO R. (1988). Cytosol estrogen and progesterone receptors in bovine endometrium after uterine involution postpartum and in the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 17(1):9-20.
- WALTER I. (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *Anat Rec.* 243(3):347-56.
- WANG CK, ROBINSON RS. FLINT APF. MANN GE. (2007). Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction,* 134:365–371.

- WANGGREN K, STAVREUS-EVERS A. OLSSON C. ANDERSSON E. GREMZELL-DANIELSSON K. (2008). Regulation of muscular contractions in the human Fallopian. *Human Reproduction* 23(10):2359–2368.
- WATERS MJ, HOANG HN. FAIRLIE DP. PELEKANOS RA. BROWN RJ. (2006). New insights into growth hormone action. *Journal of Molecular Endocrinology* 36:1-7. Review.
- WATHES DC, MANN GE. PAYNE JH. RILEY PR. STEVEBSON KR. LAMMING GE. (1996). Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. *Journal of Endocrinology*, 151:375-393.
- WATHES DC, TAYLOR VJ. CHENG Z. MANN GE. (2003). Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reprod Suppl.* 61:219-37. Review.
- WEIGEL PH, HASCALL VC. TAMMI M. (1997). Hyaluronan synthases. *J Biol Chem.* 272(22):13997-4000. Review.
- WESSEL TH, SCHUCHTER U. WALT H. (2003). Ciliary motility in bovine oviducts for sensing rapid non-genomic reaction upon exposure to progesterone. *Horm Metab Res.* 36:136-141.
- WEST DC, KUMAR S. (1989). The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res.* 183(1):179-96.
- WETTEMANN RP, HAFS HD. EDGERTON LA. SWANSON VL. (1972). Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrus cycle. *J Anim Sci.* 34:1020-1024.

- WIJAYAGUNAWARDANE MPB, CERBITO WA. MIYAMOTO A. ACOSTA TJ.
TAKAGI M. MIYAZAWA K. SATO K. (1996). Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. 46(7):1149-1158.
- WILLEMSE AH, VAN VORSTENBOSCH CJ. (1974). The secretory activity of the epithelium of the ampulla tubae in cyclic ewes: an electron microscopical study. Tijdschr Diergeneeskd. 100(2):95-105.
- WILLEMSE AH, VAN VORSTENBOSCH CJ. (1975). The influence of oestradiol benzoate and progesterone on the secretory activity of the epithelium of the ampulla tubae in ovariectomized ewes: an electron microscopical study. Tijdschr Diergeneeskd. 100(14):763-74.
- WILLEMSE AH. (1974). The secretory activity of the epithelium of the ampulla tubae in cyclic ewes: a light microscopical study. Tijdschr Diergeneeskd. 100(2):84-94.
- WORDINGER RJ, DICKEY JF. JILL JR. (1971). Histological and Histochemical Changes in Bovine Endometrium Following Treatment with a Progestin. Theriogenology, 46(7):1149-1158.
- YANG B, ZHANG L. TURLEY EA. (1993). Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. J Biol Chem. 268(12):8617-23.
- YANIZ JL, LOPEZ-GATIUS F & HUNTER RH. (2006). Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. Anat Histol Embryol 35, 28-34.
- YANIZ JL, LOPEZ-GATIUS F, SANTOLARIA P & MULLINS KJ. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. Anat Rec 260, 268-278.

YING C, YANG Y-C. HONG WF. CHENG WTK. HSU WL. (2000). Progesterone receptor gene expression in präimplantation pig embryos. *European Journal of Endocrinology* 143 697-703.

YOKOO M, MIYAHAYASHI Y. NAGANUMA T. KIMURA N. SASADA H. SATO E. (2002). Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 67(4):1165-71.

YOKOO M, TIENHA P. KIMURA N. NIWA K. SATO E. RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2002). Localisation of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during in vivo and in vitro maturation. *Zygote.* 10(4):317-26.

ZHANG PJ, ZHAO J. LI HY. MAN JH. HE K. ZHOU T. PAN X. LI AL. GONG WL. JIN BF. XIA Q. YU M. SHEN BF. ZHANG XM. CUE domain containing 2 regulates degradation of progesterone receptor by ubiquitin-proteasome. *EMBO J.* 26(7):1831-42.

ZOR U. (1983). Role of cytoskeletal organization in the regulation of adenylate cyclase-cyclic adenosine monophosphate by hormones. *Endocr. Rev.* 4(1):1-21.

10 Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in dieser Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die mir bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützend zur Seite gestanden haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Hoy, der mir als Doktorvater ermöglichte, diese wissenschaftliche Arbeit zu erstellen.

Besonders danke ich Frau Prof. Dr. Kölle, die mir mit fachlicher Kompetenz zur Seite stand. Durch ihr großes Vertrauen eröffnete sie mir kreative Freiräume und gab mir so einen Einblick in die Faszination wissenschaftlichen Arbeitens.

Ich danke meiner langjährigen Kommilitonin und besten Freundin Jill Molsner, mit der ich mich stets über wissenschaftliche Erkenntnisse austauschen konnte und auf deren Unterstützung ich in allen Lebenslagen bauen konnte.

Ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich in meinem Tun stets positiv bestärkten.