

**Aus der Klinik für Rinder
der Tierärztlichen Hochschule Hannover**

**Farbdoppler-Sonographie und Echotexturanalyse zur
Diagnostik am Ovar und Uterus des Rindes**

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der *Venia legendi*
an der Tierärztlichen Hochschule**

**vorgelegt von
Dr. med. vet. Kathrin Herzog
Hannover 2012**

Tag der nicht öffentlichen wissenschaftlichen Aussprache: 14.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Seite

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Vorwort

Liste der Publikationen, die Bestandteil der Habilitationsschrift sind

1. Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

1.1	Etablierte Methoden zur Diagnostik am Ovar und Uterus	7
1.2	Neue Methoden zur Diagnostik	11
1.3	Computer-gestützte Auswertung des Blutflusses	19
1.4	Echotexturanalyse	20
1.5	Prinzipien und Technik	21
1.6	Anwendungsgebiete der Echotexturanalyse in der Gynäkologie	24
1.7	Konzeption und Fragestellung	25

2. Ergebnisse

2.1.	Der luteale Blutfluss während des Zyklus bei Rindern	26
2.2.	Echotexturanalyse des Corpus luteum im Zyklus bei Rindern	28
2.3	Aussagen zur lutealen Funktion anhand Computer-gestützter Analyse von B-Mode-Bildern des Corpus luteum im Zyklus bei Rindern	30
2.4	Untersuchungen zur Follikeldurchblutung nach Einleitung der Luteolyse bei Rindern	32
2.5	Einfluss von <i>E. coli</i> Lipopolysacchariden auf das Corpus luteum bei Rindern im Diöstrus	34
2.6	Der luteale Blutfluss während der Frühgravidität bei Rindern	36
2.7	Untersuchungen zum uterinen Blutfluss in der zweiten Trächtigkeitshälfte bei Rindern mit Hilfe der Farbdoppler-Sonographie	38

3. Übergreifende Diskussion

3.1	Methodik der Zyklusansprache bei Rindern	39
3.2	Methodik der Trächtigkeitsdiagnostik bei Rindern	46
3.3	Ausblick	52

4.	Zusammenfassung	55
5.	Summary	58
6.	Literaturverzeichnis	60
7.	Darstellung des eigenen Anteils an den wissenschaftlichen Arbeiten	73
8.	Anhang	80

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A.	Arterie
AUC	Area-under-the-curve
B-Bild	Brightness-Bild
BFV	Blutflussvolumen
BFV _{ges}	Gesamtblutflussvolumen
CAUS	Computer-Aided Ultrasound Diagnosis
CL	Corpus luteum
cm	Zentimeter
et al.	et alii
FBF	Follicular Blood Flow
h	Stunde
kg	Kilogramm
LH	Luteinisierungs Hormon
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
Max.	Maximum
min	Minute
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mod.	modifiziert
n	Anzahl
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p. insem.	post inseminationem
p. ovul.	post ovulationem
p. p.	post partum
PAG	Trächtigkeitsassoziierte Glycoproteine
PI	Pulsatility Index
PRF	pulse repetition frequency
PW	pulsed - wave
r	Korrelationskoeffizient
RI	Resistance Index
ROI	Region Of Interest
ROC	Receiver Operating Characteristic
S	maximale systolische Frequenzverschiebung
s	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAMF	mittlere maximale Frequenzverschiebung
TAMV	mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
μl	Mikroliter

Vorwort

Die Milcherzeugung in Deutschland wird in Zukunft in immer größeren Herden durch spezialisierte Betriebe erfolgen. Eine ökonomisch tragfähige, nachhaltige Milchviehwirtschaft setzt nicht nur metabolisch belastbare Kühe mit hohem genetischen Leistungspotential voraus, sondern basiert auch entscheidend auf der Fertilität der Herde. Aktuell sind mehr als 20% der Abgänge aus Milchviehherden auf Infertilität der Tiere zurückzuführen (Wittrock et al., 2011). Damit bilden Fruchtbarkeitsstörungen eine wichtige Ursache für die gegenwärtig unbefriedigende Lebensleistung bzw. Nutzungsdauer von Milchkühen.

Die Fertilität einer Herde wird von einer Vielzahl von Faktoren determiniert. Eine Vielzahl komplexer Interaktionen zwischen Milchleistung, Metabolismus und Fruchtbarkeit wurde inzwischen nachgewiesen; so sinkt z. B. die Brunstdauer drastisch mit zunehmender Laktationsleistung (Lopez et al., 2004; Wiltbank et al., 2006). Andererseits gibt es zahlreiche Beispiele für die Vereinbarkeit von Hochleistung und Fertilität – entscheidende Voraussetzung dafür ist ein optimiertes Fruchtbarkeitsmanagement.

Von zentraler Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die zuverlässige Erfassung des Zyklusgeschehens sowie eine belastbare Trächtigkeitsdiagnostik möglichst bereits innerhalb von drei Wochen nach der Besamung. Entsprechende Optionen sind in der gegenwärtigen Praxis nicht verfügbar. Nach wie vor ist die manuelle transrektale Untersuchung des inneren Genitale das diagnostische Standardverfahren in der tierärztlichen Routine. Allerdings sind auch bei versierten Untersuchern Sensitivität und Spezifität der Diagnosen bei der Zyklusansprache unbefriedigend; eine belastbare Trächtigkeitsdiagnostik ist i. d. R. erst ab dem 35. Tag nach der Besamung möglich (Götze, 1940; van der Weijden, 1999; Romano et al., 2007). Die heute bereits routinemäßig eingesetzte B-Mode Sonographie zur Untersuchung von Ovarien und Uterus bietet demgegenüber zwar Vorteile, kann jedoch ebenfalls die gestiegenen Ansprüche an die diagnostische Verlässlichkeit nicht erfüllen.

Demgegenüber ergeben sich durch die Weiterentwicklung bildgebender Verfahren wie der Farbdoppler-Sonographie und der Echotexturanalyse Perspektiven, um im-

manente Limitierungen etablierter diagnostischer Verfahren zu überwinden. Die vorliegende Habilitationsschrift umfasst eine zusammenfassende Darstellung von Studien zur Charakterisierung des Potentials der Farbdoppler-Sonographie und der Computer-gestützten Echotexturanalyse als Verfahren zur Diagnostik des Zyklusgeschehens sowie der Frühgravidität bei Rindern.

Liste der Publikationen, die Bestandteil der Habilitationsschrift sind

Bei der Auflistung der Originalarbeiten wurde nicht die chronologische Reihenfolge ihres Erscheinens berücksichtigt, sondern eine für die gemeinsame Diskussion der Ergebnisse sinnvolle Reihenfolge.

- [1] **Herzog, K.**, Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H. (2010):
Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size.
Theriogenology 73, 691-7.
- [2] **Herzog, K.**, Kiossis, E., Bollwein, H. (2008):
Examination of cyclic changes in bovine luteal echotexture using computer-assisted statistical pattern recognition techniques.
Animal Reproduction Science 106, 289-297.
- [3] Thijssen, J.M., **Herzog, K.**, Weijers, G., Brockhan-Luedemann M., Starke, A., Bollwein, H., de Korte, C. L. (2011)
Plasma progesterone concentration predicted by quantitative ultrasound during luteal phase in the estrous cycle in cows: a feasibility study.
Animal Reproduction Science 127, 7-15
- [4] Jordan, A., **Herzog, K.**, Ulbrich, S.E., Beindorff, N., Honnens, Ä., Krüger, L., Miyamoto, A., Bollwein, H. (2009):
Genital blood flow and endometrial gene expression during the preovulatory period after PGF_{2α}-induced luteolysis in different luteal phases in cows.
Journal of Reproduction and Development 55, 309-15.

- [5] **Herzog, K.**, Strueve, K., Kastelic J.P., Piechotta, M., Ulbrich, S. E., Pfarrer, C., Miyamoto, A., Shirasuna, K., Bollwein, H.:
E. coli lipopolysaccharide transiently suppresses luteal function in diestrus cows.
Submitted for publication in Reproduction.
- [6] **Herzog, K.**, Voss, C., Kastelic, J.P., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H. (2011):
Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows.
Theriogenology 75, 549-54.
- [7] **Herzog, K.**, Körte, J., Flachowsky, G., Bollwein, H. (2011):
Variability of uterine blood flow during the second half of pregnancy in cows.
Theriogenology 75, 1688-94.

1. Einleitung

1.1 Etablierte Methoden zur Diagnostik am Ovar und Uterus

1.1.1 Transrektale Palpation

Die transrektale manuelle Untersuchung des weiblichen Genitale ist im Rahmen der Zyklus- und Trächtigkeitsdiagnostik sowie der Puerperalkontrolle des Rindes das noch immer in der tierärztlichen Routine am häufigsten angewandte Verfahren. Die transrektale Palpation ist ohne großen materiellen Aufwand durchführbar und in der Regel sowohl für die untersuchende Person als auch für das untersuchte Tier risikolos (Day et al., 1995; Aslan, 2002; Yaniz et al., 2002). Andererseits wird das Risiko der Entwicklung einer Atresia ani beim Fetus durch die rektale Untersuchung diskutiert. Es gibt Hinweise, dass die Palpation des fetalen Amnions zwischen dem 36. und 42. Tag *post inseminationem* (*p. insem.*) eine Störung der fetalen Durchblutung im Intestinalbereich induziert und die Organogenese beeinflusst (Johnson, 1986; Constable et al., 1989; Brenner and Orgad, 2003; Azizi et al., 2010).

1.1.1.1 Zyklusdiagnostik

Die Intention der Zyklusansprache besteht darin, von der Norm abweichende Befunde am inneren Genitale auszuschließen und den Zyklustag einzugrenzen. Die rektale Palpation ist jedoch auch bei erfahrenen Untersuchern mit einer relativ hohen Fehlerquote behaftet. Insbesondere wird ein Corpus luteum (CL) während der Anbildungs- und Rückbildungsphase häufig nicht erkannt oder fälschlich als Follikel angesprochen. Bedenkt man, dass diese Phasen ca. 40% des Zyklus ausmachen, so werden die Grenzen der diagnostischen Sicherheit dieser Methode sichtbar. Ein positiver prädiktiver Wert von nur 64% während der lutealen Regressionsphase unterstreicht die Insuffizienz dieser Methode in diesem Zeitraum. Große Follikel und die Präsenz von mehr als einem CL, die dicht nebeneinander liegen, führen zu Fehldiagnosen (Guay and Bedoya, 1981). Grundsätzlich ist die Präsenz eines CL leichter zu diagnostizieren als seine Abwesenheit (Hanzen et al., 2000a).

Lediglich im Diöstrus zwischen dem 8. und 16. Zyklustag („Blütegelbkörper“) sind Sensitivität, Spezifität und positiver prädiktiver Wert der transrektalen Palpation mit 85%, 95,7% und 89,5% durchaus zufriedenstellend (Ribadu et al., 1994). Die enge positive Korrelation ($r = 0.85$) zwischen der Größe des CL und der Progesteronkonzentration im Plasma (Pieterse et al., 1990; Ribadu et al., 1994) erklärt die Notwendigkeit einer korrekten CL-Diagnostik.

Nach wie vor ist deshalb die laboranalytische Bestimmung des Progesterongehaltes im Plasma Goldstandard zur Prüfung der Gelbkörperaktivität und konsekutiv zur Bestimmung des Zyklusstandes (Kastelic et al., 1990; Kelton et al., 1991; Ribadu et al., 1994; Tom et al., 1998; Battocchio et al., 1999). Bei Vorliegen eines aktiven CL ist die Progesteronkonzentration im Plasma höher als 1,0 ng/ml (Battocchio et al., 1999; Veronesi et al., 2002; Bicalho et al., 2008). Zentrale Nachteile dieser Methode sind der erhebliche Arbeitsaufwand der Probengewinnung, die hohen Kosten der Analytik und vor allem die Verzögerung zwischen Probenentnahme und Vorliegen des Ergebnisses.

Das Auffinden der Ovulationsgrube mittels rektaler Palpation erfordert Erfahrung und setzt die Kenntnis der Lokalisation des ovulierten Follikels voraus. Die Charakterisierung der Funktionskörper ist besonders anspruchsvoll, wenn das Ovar mehr als vier Follikel mit einem Durchmesser von mehr als 10 mm aufweist (Guay and Bedoya, 1981). Ein Follikel wird dann häufig mit einem CL verwechselt. Große flüssigkeitsgefüllte Blasen auf dem Ovar gelten als Hinweis auf das Vorliegen von Ovarialzysten. Allerdings erlaubt die rektale Untersuchung keine Unterscheidung zwischen Theka- und Luteinzysten (Guay and Bedoya, 1981; Sprecher et al., 1989).

1.1.1.2 Trächtigkeitsdiagnostik

Die Trächtigkeitsdiagnose mittels rektaler Palpation erfolgt über Größe, Symmetrie und Füllungszustand des Uterus sowie über das Auffinden eines CL graviditatis. In den ersten 28 Tagen nach der Besamung kann in der Regel rektal kein Unterschied zwischen dem trächtigen und dem nicht trächtigen Uterushorn ausgemacht werden. Erst ab dem 35. Tag nach der Besamung kann je nach Erfahrung des Untersuchers

eine Trächtigkeit transrektal festgestellt werden (van der Weijden, 1999). Die „Doppelwandigkeit“ der Gebärmutter, hervorgerufen durch die Uteruswand und das anliegende Allantochorion, gilt als erster beweisender Befund für eine Trächtigkeit („positiver Eihautgriff“). Jedoch sind auch bei geübten Untersuchern die Sensitivität und Spezifität der rektalen Palpation gering (Sensitivität 67%; Lopes and Rocha, 2006). Fehldiagnosen werden durch pathologische Flüssigkeitsansammlungen im Uteruslumen oder durch embryonale Mortalität hervorgerufen. Insbesondere die Diagnose „nicht trächtig“ ist oftmals nicht sicher zu stellen. Eine Schädigung der Fruchthüllen (Day et al., 1995) oder des Fetus durch die manuelle Trächtigkeitsuntersuchung mit konsekutiver Entwicklung einer Atresia ani wird diskutiert (Romano et al., 2007).

1.1.2 Sonographie

Die Sonographie wurde zu Beginn der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts in der Veterinärmedizin etabliert und diente zunächst der Darstellung der Reproduktionsorgane, insbesondere der physiologischen Prozesse wie z. B. Follikelreifung und Darstellung des Konzeptus (Odde et al., 1980; Roberson et al., 1989; Hussein et al., 1992; Acosta and Miyamoto, 2004).

1.1.2.1 Zyklusdiagnostik

Durch den Einsatz der Sonographie konnte die diagnostische Sicherheit wesentlich gegenüber der transrektalen Palpation verbessert werden (Roberson et al., 1989; Kastelic et al., 1990; Hussein et al., 1992; Acosta and Miyamoto, 2004). Mit Hilfe der B-Mode Sonographie kann die Größe der Funktionskörper ausgemessen und die Diagnostik objektiviert werden (Odde et al., 1980; Roberson et al., 1989). Vor allem die korrekte Identifikation eines CL ermöglicht eine relativ zuverlässige Einschätzung des Zyklusstadiums. Leider bleibt das Risiko einer Fehldiagnose auch bei erfahrenen Untersuchern hoch. Ein ovarieller Funktionskörper wie das CL wird in bis zu 40% der Untersuchungen übersehen oder bei bis zu 44% der Untersuchungen als Follikel angesprochen (El-Wishy, 1995; Hanzen et al., 2000a; b).

Zudem kann ein CL in der Anbildungsphase (1.-5. Zyklustag) allein aufgrund der Größe nicht von einem CL in der Rückbildungsphase (16.-21. Zyklustag) unterschieden werden (Odde et al., 1980; Roberson et al., 1989; Lamming and Darwash, 1998; Sangsritavong et al., 2002; Sartori et al., 2004). Während der Regressionsphase nimmt die Größe des CL langsamer ab als die Progesteronkonzentration im Plasma. Das CL weist in dieser Phase eine noch beachtliche Größe auf, ist aber funktionell nicht mehr aktiv und die Progesteronkonzentrationen bereits unter den Schwellenwert von < 1.0 ng/ml abgesunken (Odde et al., 1980; Roberson et al., 1989; Shelton et al., 1990).

Durch die B-Mode Sonographie ergaben sich im Hinblick auf die Dynamik des Follikelwachstums völlig neue Erkenntnisse. So wurde erstmals festgestellt, dass Kühe zwei bis vier Follikelwellen pro Zyklus aufweisen (Quirk et al., 1986; Savio et al., 1988; Lucy et al., 1992). Ferner konnte mittels Sonographie erstmalig zwischen den beiden unterschiedlichen Typen der Ovarialzysten unterschieden werden, da manuell die Beschaffenheit einer Zystenwand und damit der Luteinisierungsgrad schwierig zu erfassen sind. Zysten mit einer dicken Wandstruktur (> 3 mm) werden seitdem als Follikel-Lutein-Zysten und Zysten mit einer dünnen Wand (< 3 mm) als Follikel-Theka-Zysten definiert (Farin and Estill, 1993). Allerdings liefert die B-Mode Sonographie keine Befunde, die über das Maß der morphologischen Veränderungen hinausgehen. Physiologische Veränderungen sind mit dieser Methode nicht zu erfassen. Aussagen über die Qualität eines dominanten Follikels oder den Funktionszustand eines CL können mit der B-Mode Sonographie nicht hinreichend beurteilt werden.

1.1.2.2 Trächtigkeitsdiagnostik

Die Trächtigkeitsdiagnose kann mittels Sonographie ab dem 24.-26. Tag nach der Besamung weitgehend korrekt gestellt werden. Als eindeutiger Beweis für eine Trächtigkeit gilt die sonographische Darstellung des embryonalen Herzschlages. Sensitivität und Spezifität sind für diesen Zeitraum mit 95-99% bzw. 75-97% zunächst zufriedenstellend (Taverne et al., 1985; Pieterse et al., 1990). Allerdings sind die Sensitivität und auch der Zeitpunkt der sicheren Diagnosestellung entscheidend

abhängig von der Erfahrung des Anwenders und der Qualität des verwendeten Geräts (Taverne et al., 1985; Curran et al., 1986a; b; Kastelic et al., 1989; Szenci et al., 1995; Szenci et al., 1998a; Szenci et al., 1998b; Romano et al., 2006).

1.1.2.3 Pathologische Befunde

Die Diagnose von Puerperalstörungen beruht gegenwärtig vornehmlich auf der manuellen transrektalen Untersuchung des Uterus (Arbeiter, 1973; Grunert, 1993). Auf Grund der Subjektivität der Befunde bei der transrektalen Palpation im Hinblick auf Puerperalstörungen wurde diese Methode in der Vergangenheit kritisch beurteilt (Okano and Tomizuka, 1987; Sheldon et al., 2006). Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Diagnosen zu objektivieren (Pierson and Ginther, 1984; 1987; 1988; Bekana et al., 1994; Sheldon et al., 2006; Lenz et al., 2007). Die Ergebnisse zeigen, dass pathologische Prozesse wie Retentio secundinarum, Metritis und Pyometra mit Hilfe der Sonographie exakter befundet und diagnostiziert werden können (Ginther and Pierson, 1984; Pierson and Ginther, 1988; Bekana et al., 1994; Chebel et al., 2006; Sheldon et al., 2006).

1.2 Neue Methoden zur Diagnostik

1.2.1 Farbdoppler-Sonographie

Die Farbdoppler-Sonographie ermöglicht eine visuelle Darstellung und konsekutive Quantifizierung des Blutflusses in einzelnen Blutgefäßen oder der Durchblutung spezifischer Gewebe. Ihr Einsatz dient derzeit noch vorwiegend der Evaluierung wissenschaftlicher Fragestellungen und ist in der täglichen tierärztlichen Routinediagnostik am Rind bislang nicht etabliert.

1.2.1.1 Prinzipien und Technik

Ultraschallwellen werden an Grenzflächen von Geweben mit unterschiedlicher akustischer Impedanz m. o. w. reflektiert. Treffen die Ultraschallwellen auf ruhende

Grenzflächen, so entspricht die Frequenz der reflektierten Echos derjenigen der ausgesendeten Schallwellen. Stoßen die Schallwellen dagegen auf sich bewegende Strukturen, wie z. B. Erythrozyten, so resultiert eine Frequenzverschiebung der reflektierten Schallwellen gegenüber den emittierten Wellen („Dopplerverschiebung“; „Doppler-Shift“). Bewegen sich die Erythrozyten auf die Sonde zu, so ist die Frequenz der reflektierten Schallwellen höher als die der emittierten Schallwellen und damit positiv. Entfernen sich die Erythrozyten hingegen von der Sonde, ist die Frequenz der reflektierten Schallwellen im Vergleich zu den ausgesendeten Ultraschallwellen erniedrigt und der Doppler-Shift damit negativ. Zur besseren Visualisierung werden die Doppler-Shifts bei der Farbdoppler-Sonographie farblich kodiert dargestellt. Blutflüsse, die auf die Sonde zufließen, erscheinen rot (positive Frequenzverschiebungen) und Bewegungen, die von der Sonde weggehen, blau (negative Frequenzverschiebungen). Die Helligkeit der Farbpixel korreliert wiederum mit der Höhe der Frequenzverschiebung.

Der Doppler-Shift ist von der Sendefrequenz des Schallkopfes, dem Winkel zwischen Schallstrahl und Blutflussrichtung, der Geschwindigkeit des Ultraschalls im Körpergewebe (ca. 1540 m/s) abhängig und errechnet sich nach folgender Formel:

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

f_d	=	Frequenzverschiebung = Dopplershift [Hz]
f_0	=	Sendefrequenz des Schallkopfes [Hz]
f_e	=	Empfangsfrequenz [Hz]
v	=	Blutflussgeschwindigkeit [m/s]
α	=	Winkel zwischen Ultraschallwellen und Richtung des Blutflusses
c	=	Ausbreitungsgeschwindigkeit des Ultraschalls im Weichteilgewebe [1540 m/s]

Durch Umstellung dieser Gleichung lässt sich quantitativ die Blutflussgeschwindigkeit (TAMV = Time Averaged Maximum Frequency Velocity) berechnen:

$$v = \frac{f_d \cdot c}{2 \cdot f_0 \cdot \cos\alpha}$$

Zunächst werden die maximale systolische Frequenzverschiebung (S), die minimale diastolische Frequenzverschiebung (Min) und die mittlere maximale Frequenzverschiebung (TAMF = Time Averaged Maximum Frequency Shift) bestimmt. Dabei ist die TAMF definiert als Integral unter der Hüllkurve, die über die Dopplerwelle eines Herzzyklus gelegt wird (Abb. 1). Aus diesen Frequenzverschiebungen können dann mit Hilfe oben genannter Formel die entsprechenden Geschwindigkeiten berechnet werden. Es sollten nur solche Dopplerwellen ausgewertet werden, bei denen der Winkel zwischen Blutfluss und Schallwellen unter 60° liegt. Kleine Ungenauigkeiten verursachen bei einem Winkel über 60° einen relativ großen Fehler in der Berechnung des Kosinus und damit der Gesamtgeschwindigkeit. Unterscheiden sich der vom Untersucher eingestellte Winkel und der tatsächliche Winkel um 5° bei einem realen Winkel von kleiner 10°, so führt dieses zu einer Fehlerquote von bis zu 2% bei der Berechnung der Blutflussgeschwindigkeit. Bei einem realen Winkel von 60° beträgt diese Fehlerquote bereits 12% (Dickey, 1997).

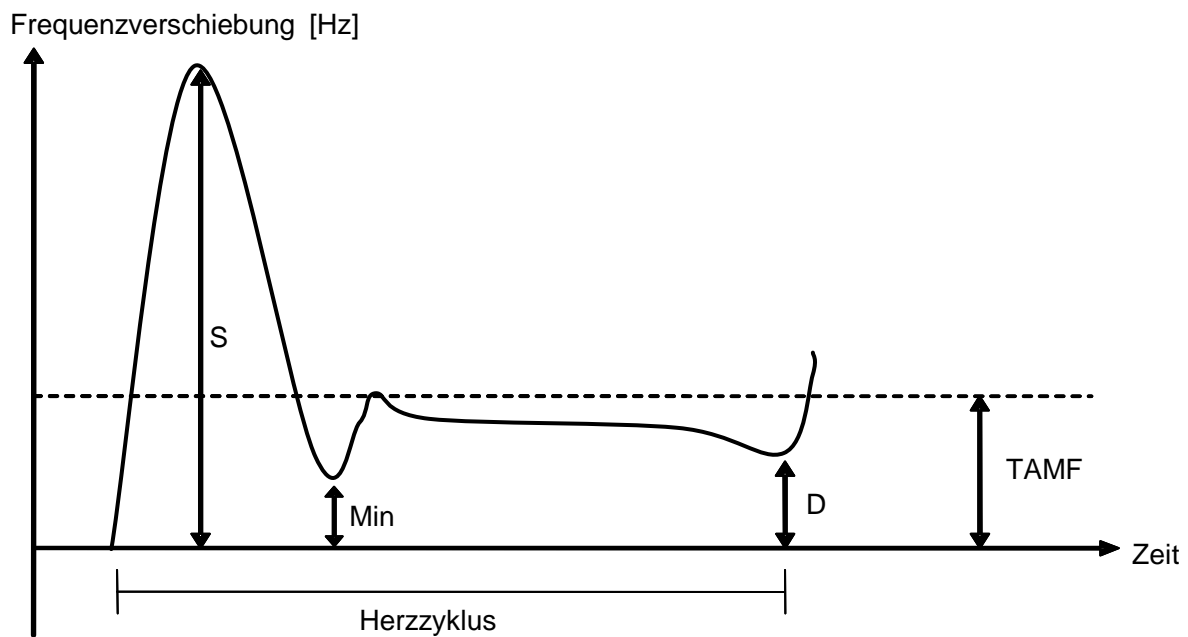


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Dopplerwelle in einer Arterie mit der maximalen systolischen (S), minimalen diastolischen (Min), enddiastolischen (D) und maximalen mittleren (TAMF) Frequenzverschiebung während eines Herzzyklus (mod. nach Bollwein et al., 2000).

Zusätzlich kann die Frequenzverschiebung in einem Koordinatensystem in Abhängigkeit von der Zeit als Spektralkurve dargestellt werden (Abb. 2). Oberhalb der Nulllinie wird der Blutstrom dargestellt, der zur Sonde hin fließt. Von der Sonde wegströmendes Blut wird unterhalb der Nulllinie angezeigt (Dudwiesus, 1993).

Erythrozyten bewegen sich mit dem Blutfluss innerhalb eines Gefäßes im Zentralstrahl eines Gefäßes wesentlich schneller als in randständigen Bereichen. Entsprechend ergibt sich ein ganzes Spektrum unterschiedlicher Dopplerfrequenzen („Spektraldoppler“) (Dickey, 1997; Maulik, 1997).

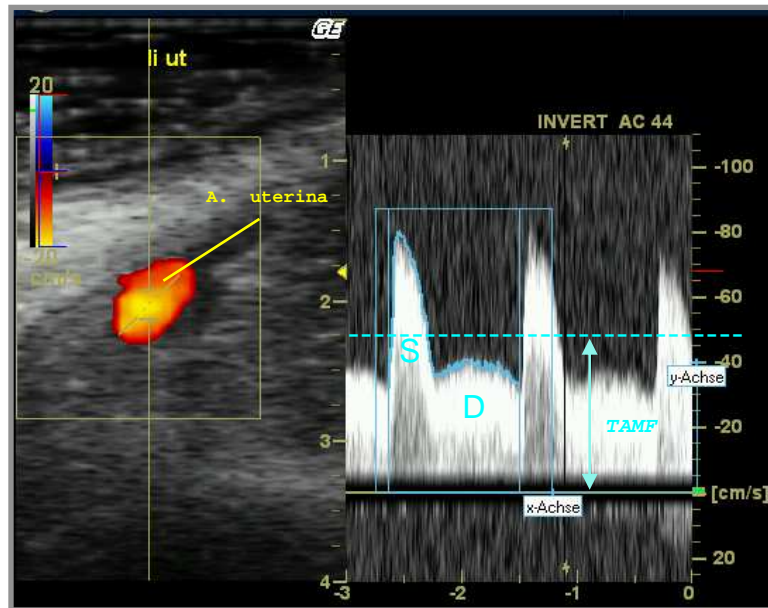


Abb. 2: Spektraldoppler: Darstellung von Dopplerwellen der A. uterina im Pulse-Wave-Mode während mehrerer Herzzyklen bei einer Kuh (mod. nach Bollwein et al., 2000).

Neben der Blutflussgeschwindigkeit kann der Blutfluss quantitativ über das Blutflussvolumen und semiquantitativ über den Blutflusswiderstand, die sog. Doppler-Indices ermittelt werden. Das Blutflussvolumen (BFV) errechnet sich aus der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) und dem Gefäßdurchmesser und entspricht der Perfusion des betreffenden Gefäßes oder Parenchyms (Volumen pro Zeiteinheit). Die Doppler-Indices sind winkelunabhängig und stellen ein Maß für den in der Peripherie des untersuchten Gefäßes herrschenden Blutflusswiderstand dar. Je höher der Wert des Index ist, desto größer ist der Blutflusswiderstand in dem Organ, das von dem untersuchten Blutgefäß versorgt wird.

Als sensitiveres Verfahren zur Darstellung der Durchblutung gilt der so genannte Angio-Mode, der sich insbesondere zur Erfassung der Gewebepfusion eignet (Abb. 3). Dabei wird die Blutflussintensität, d. h. die Zahl der pro Zeiteinheit durch ein Gefäß strömenden zellulären Blutbestandteile detektiert. Es handelt sich somit nicht um eine Messung der Fließgeschwindigkeit. Die Erythrozyten werden als farbige Bildpunkte im B-Mode Bild dargestellt (Dudwiesus, 1995). Dies Verfahren ist der herkömmlichen Farbdoppler-Technik bei der Darstellung sehr geringer Blutflüsse überlegen (Bude et al., 1994).

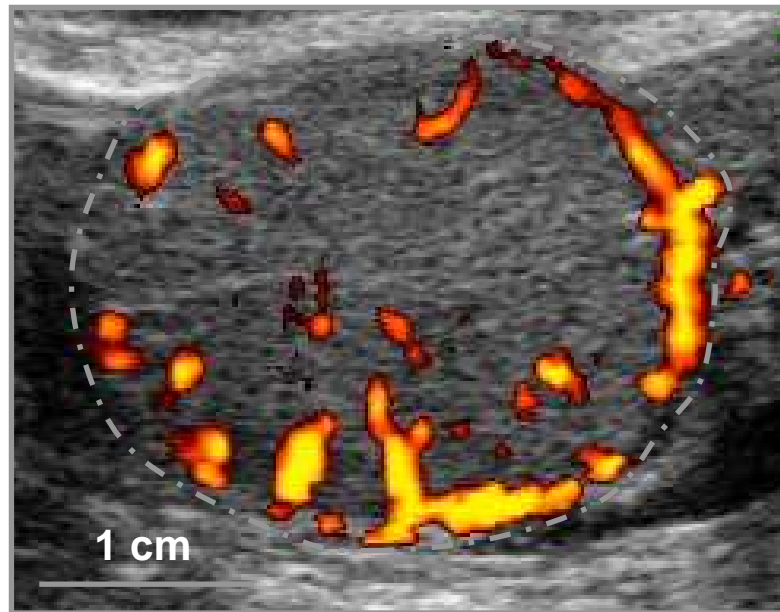


Abb. 3: Angio-Mode: Darstellung der Durchblutung (gelb-orange Bereiche) des Corpus luteum einer Kuh im Diöstrus.

1.2.1.2 Untersuchungen zum genitalen Blutfluss in der Veterinärmedizin

1.2.1.2.1 Uteriner Blutfluss

Bollwein et al. (1998; 2000) entwickelten ein Verfahren, mit dem beim Rind nicht-invasiv mittels transrektaler Doppler-Sonographie die Durchblutung der A. uterina ermittelt wurde. Dabei wurde eine erhebliche Variabilität der uterinen Durchblutung während des Zyklus deutlich: Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) in der A. uterina war im Proöstrus und Östrus mit ca. 30 cm/sec am höchsten, halbierte sich während des Diöstrus und blieb in dieser Zeit auf einem konstanten Niveau. Die Zyklus-abhängigen Schwankungen der uterinen Blutflussgeschwindigkeit korrelierten dabei eng mit der Östrogenkonzentration im Plasma ($r = 0,51$). Honnens et al. (2008) wiesen mit dieser Methode einen Anstieg der uterinen Blutflussgeschwindigkeit bei trächtigen Kühen zwischen den Tagen 13 und 18 nach der Besamung um 27% nach. Konnten Bollwein et al. (1998) einen Zusammenhang zwischen dem Blutfluss und der Östrogenkonzentration im Plasma feststellen, so war dieser bei Honnens et al. (2008) nicht nachweisbar. Offensichtlich sind bei der Regulation der uterinen Durchblutung neben den Steroidhormonen noch weitere Faktoren beteiligt. So werden

PGE₂ (Kimura et al., 1995), Nitritoxid (Jovanovic et al., 1994; Saha et al., 1998), Zytokine (Matsumoto et al., 1992) und weitere endokrine, lokale Blutflussregulatoren (Krzymowski und Stefanczyk-Krzymowska, 2004) in diesem Zusammenhang diskutiert. Ferner wurde der Anstieg der uterinen Durchblutung als lokales Phänomen angesehen, das mit der Lokalisation des Embryos und der Produktion vasoaktiver Substanzen durch den Embryo und/oder das Endometrium bei verschiedenen Spezies in Zusammenhang gebracht wurde (Ford et al., 1979a; Ford et al., 1979b; Reynolds et al., 1984; Silva et al., 2005).

Panarace et al. (2006) untersuchten die uterine Durchblutung vom zweiten bis zum neunten Trächtigkeitsmonat bei Fleischrindern. Sie beobachteten einen vierfachen Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit in der A. uterina auf der trächtigen Seite über die gesamte Trächtigkeit von 46 auf 197 cm/sec. Das Blutflussvolumen stieg in diesem Gefäß in den letzten zwei Dritteln der Trächtigkeit exponentiell. Die Autoren stellten eine positive Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht der Kälber und der uterinen Durchblutung fest.

Untersuchungen während des Puerperiums zeigten charakteristische Veränderungen des Blutflussvolumens und des Blutflusswiderstandes. Das Blutflussvolumen reduzierte sich innerhalb der ersten sieben Tage *post partum* (*p.p.*) von 4,3 l/min auf 1,4 l/min (Krueger et al., 2009) und bis zum 28. Tag *p.p.* weiter auf 0,2 l/min. Danach konnte keine weitere Abnahme beobachtet werden. Die Veränderungen des Blutflussvolumens spiegelten die Vorgänge der uterinen Involution wieder, die am Tag 28 bei allen untersuchten Tieren abgeschlossen war (Kontrolle durch rektale und sonographische Untersuchung).

1.2.1.2.2 Ovarieller Blutfluss

Die transrektale Farbdoppler-Sonographie wurde in den letzten Jahren ferner zur Untersuchung der ovariellen Durchblutung genutzt. Hier standen die folliculäre sowie die luteale Durchblutung im Fokus (Acosta et al., 2002; Acosta et al., 2003; Acosta et al., 2005; Miyamoto et al., 2005; Miyamoto et al., 2006).

Acosta et al. (2003) erfassten erstmalig quantitativ die lokale Durchblutung der Theca externa der Follikel bei Kühen. Ihre Untersuchungen stellten den ersten Hinweis dar, dass der Blutfluss in der Wand des dominant werdenden Follikels zum Zeitpunkt der Follikeldeviation stieg und in den atresierenden Follikeln konsekutiv abnahm (Acosta et al., 2003). Weiterhin ergaben sich Unterschiede zwischen dem Blutfluss im präovulatorischen Follikel bei einer Spontanovulation und einer durch GnRH-Injektion induzierten Ovulation. Die Durchblutung stieg innerhalb von 6 Stunden nach dem endogenen LH-Peak, während der Blutfluss bei der durch GnRH-Injektion induzierten Ovulation bereits 0,5 Stunden *post injectionem* und damit synchron mit dem Beginn des LH-Peaks anstieg. Die komplexen strukturellen und funktionellen Änderungen in einem reifen Follikel - induziert durch den LH-Peak – scheinen eng mit Veränderungen in der präovulatorischen Follikelwand assoziiert zu sein (Miyamoto et al., 2006).

Auch eine Verkürzung der präovulatorischen Follikelphase in einem OvSynch Protokoll durch eine zweite GnRH Injektion 40 h nach der PGF_{2α}-Applikation hat Auswirkungen auf den ovariellen Blutfluss (Bollwein et al., 2010). Die Ovulationsfollikel waren kleiner, weniger durchblutet und die sich daraus entwickelnden CL kleiner als bei einer GnRH Injektion erst 60 h nach der PGF_{2α}-Applikation. Folglich könnten die erhöhten Trächtigkeitsraten bei OvSynch-Programmen, bei denen die präovulatorische Follikelentwicklung durch eine spätere Injektion von GnRH verlängert wird, auf eine positive Beeinflussung der folliculären und lutealen Entwicklung zurückzuführen sein. Untersuchungen von Siddiqui et al. (2009) bestätigen diese Hypothese. Sie untersuchten die Durchblutung des präovulatorischen Follikels bei Färsen vor der künstlichen Besamung. Dabei war ein positiver Zusammenhang zwischen der folliculären Durchblutung und der Graviditätsrate nachweisbar. Es wird ein "cross-talk" zwischen den Endothelzellen und folliculären Steroidhormonen vermutet, der die lokalen Veränderungen im Ovulationsfollikel beeinflusst (Acosta et al., 2003; Acosta und Miyamoto, 2004).

Die Farbdoppler-Sonographie wurde vereinzelt auch zur Untersuchung der Durchblutung des Corpus luteum angewandt. Da das CL während des Zyklus für eine kurze Zeit das Organ im Körper ist, welches pro Gewichtseinheit am stärksten durchblutet ist (Wiltbank et al., 1988), eignet es sich besonders für Doppler-sonographische Untersuchungen. Während der Luteolyse erfolgt ein initialer Anstieg der lutealen

Durchblutung gefolgt von einem stetigen Abfall (Acosta et al., 2002). Diese Ergebnisse ließen auf eine erhebliche Zunahme der lutealen Durchblutung noch vor Abnahme der Progesteronkonzentration im Plasma schließen. Der Blutflussanstieg wurde als möglicher Trigger für die luteolytische Kaskade diskutiert, der erst die funktionelle, dann die strukturelle Luteolyse einleitet (Miyamoto et al., 2005). So ging der Blutflussanstieg mit einer erhöhten Konzentration von Stickstoffmonoxid im Plasma einher, das möglicherweise die initiale Vasodilatation auslöste (Acosta et al., 2002). Versuche, die Luteolyse eines Anbildungsgelbkörpers experimentell zu induzieren, zeigten, dass sowohl der initiale Blutflussanstieg als auch die Luteolyse unter diesen Bedingungen ausblieben (Acosta und Miyamoto, 2004). Nach experimenteller Induktion der Luteolyse eines Blütegelbkörpers stieg hingegen die Durchblutung bereits 30 min nach einer PGF_{2α}-Applikation für zwei Stunden an, und es erfolgte die Luteolyse. Die initiale Vasodilatation im CL führte zur parakrinen Freisetzung von Endothelin 1 (ET-1) und Angiotensin II (Ang II) (Ohtani et al., 1998; Levy et al., 2000). Diese vasoaktiven Substanzen induzierten schließlich eine Vasokonstriktion und konsekutiv eine verminderte luteale Durchblutung. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass ein initialer Blutflussanstieg als Trigger zur Freisetzung von vasoaktiven Substanzen aus den lutealen Endothelzellen und damit zur Einleitung der Luteolyse notwendig sei.

1.3 Computer-gestützte Auswertung des Blutflusses

Zur off-line Auswertung des Blutflusses wird meist das Programm PixelFlux[®] verwendet. Dieses Programm wurde zur Computer-gestützten Analyse der Organ- und Gewebsperfusion beim Menschen mit Hilfe von Doppler-Ultraschallvideos entwickelt (Scholbach et al., 2004a; Scholbach et al., 2004b). Mit PixelFlux[®] werden anhand von Videodateien durch den Benutzer festgelegte Regions of Interest (ROI) analysiert. PixelFlux[®] wird sowohl in der Nephrologie sowie in der Gynäkologie eingesetzt (Abb. 4).

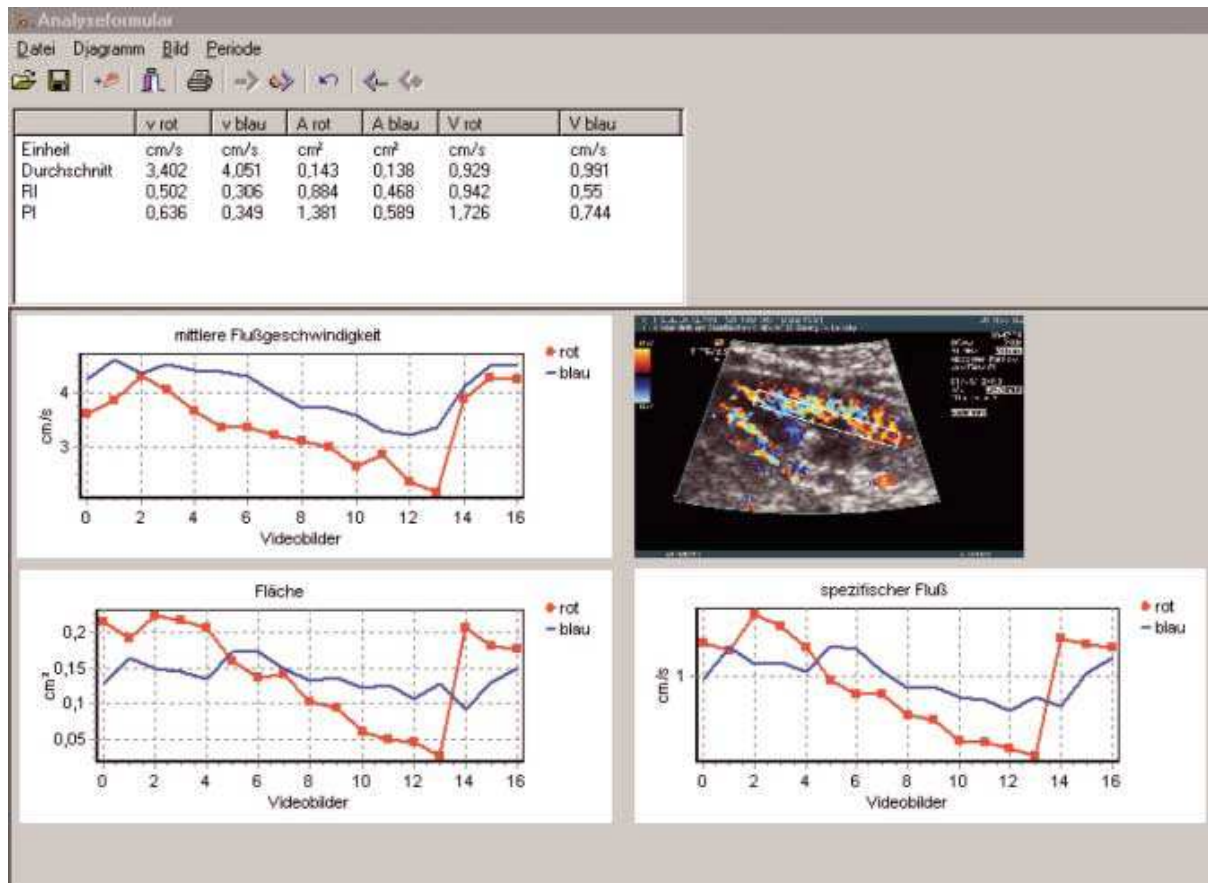


Abb. 4: Exemplarische Darstellung des Blutflusses in der Niere. In dem Farbdoppler-Bild wird manuell eine Region of Interest festgelegt. Die drei Diagramme demonstrieren die relevanten Perfusionsparameter während eines Herzzyklus: (1) oben links: Änderungen der mittleren Flussgeschwindigkeit; (2) unten links: Änderungen der durchbluteten Fläche; (3) unten rechts: spezifischer Fluss, der sich aus der durchbluteten Fläche und der mittleren Flussgeschwindigkeit errechnet.

1.4 Echotexturanalyse

Die Echotexturanalyse hat sich in den letzten beiden Jahrzehnten als eine spezifische quantitative Form der Auswertung sonographischer B-Mode Bilder zur Analyse der Gewebestruktur innerer Organe entwickelt. Sie wurde insbesondere in der Humanmedizin vor allem in der Leber- und Tumordiagnostik eingesetzt (Garra et al., 1987a; Garra et al., 1987b; Valckx et al., 2000). In der Veterinärmedizin fand die Echotexturanalyse bislang in der Leberdiagnostik der Milchkuh Anwendung (Acorda,

1994; Bobe et al., 2004; Bobe et al., 2008; Thijssen et al., 2008; Starke et al., 2010); wenige Studien wurden in dem Bereich der Gynäkologie durchgeführt (Singh et al., 1997; Tom et al., 1998; Schmauder, 2003).

1.5 Prinzip und Technik

Ein B-Mode-Ultraschallbild besteht aus Pixeln und verfügt über bis zu 256 verschiedene Grautöne (Delorme und Zuna, 1995). Das menschliche Auge vermag nur 20, im Extremfall 60, dieser 256 Graustufen zu differenzieren (Zink, 1996). Zwangsläufig führt die visuelle Auswertung von Ultraschallbildern durch den menschlichen Betrachter somit zu einem Informationsverlust (Delorme und Zuna, 1995). Um den Informationsgewinn basierend auf sonographischen Untersuchungen zu erhöhen, wird bei der Computer-gestützten Grauwertanalyse der Grauwert jedes einzelnen Pixels exakt über eine Zahl kodiert. Die Auswertung der Daten erfolgt durch quantitative statistische Verfahren, so dass eine Objektivierung der Ergebnisse gewährleistet ist (Ginther, 1995).

Die Echotexturanalyse von B-Mode-Bildern basiert zum einen auf der quantitativen Beschreibung der Helligkeit und zum anderen auf der Analyse der räumlichen Anordnung der Pixel in der untersuchten Bildregion. Zur Analyse der Helligkeit eines B-Mode-Bildes wird für die zu analysierende Region („Region of interest“, ROI) ein eindimensionales Grauwert-Histogramm angefertigt (Abb. 5). Dieses schlüsselt die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Grauwerte auf, ohne deren räumliche Beziehung zueinander zu berücksichtigen. Zwei Bilder, die in ihrer Textur völlig unterschiedlich sind, können demnach identische Grauwertverteilungen bzw. Histogramme haben. Beschrieben wird lediglich die Gesamthelligkeit des sonographischen Bildes. Dieses Verfahren wird *Grauwertanalyse erster Ordnung* genannt (Abb. 5). Auch der mittlere Grauwert zählt zu dieser Kategorie, da er die mittlere Helligkeit der ROI definiert (Raeth et al., 1985; Haberkorn, 1991; Delorme and Zuna, 1995; Bleck et al., 2000).

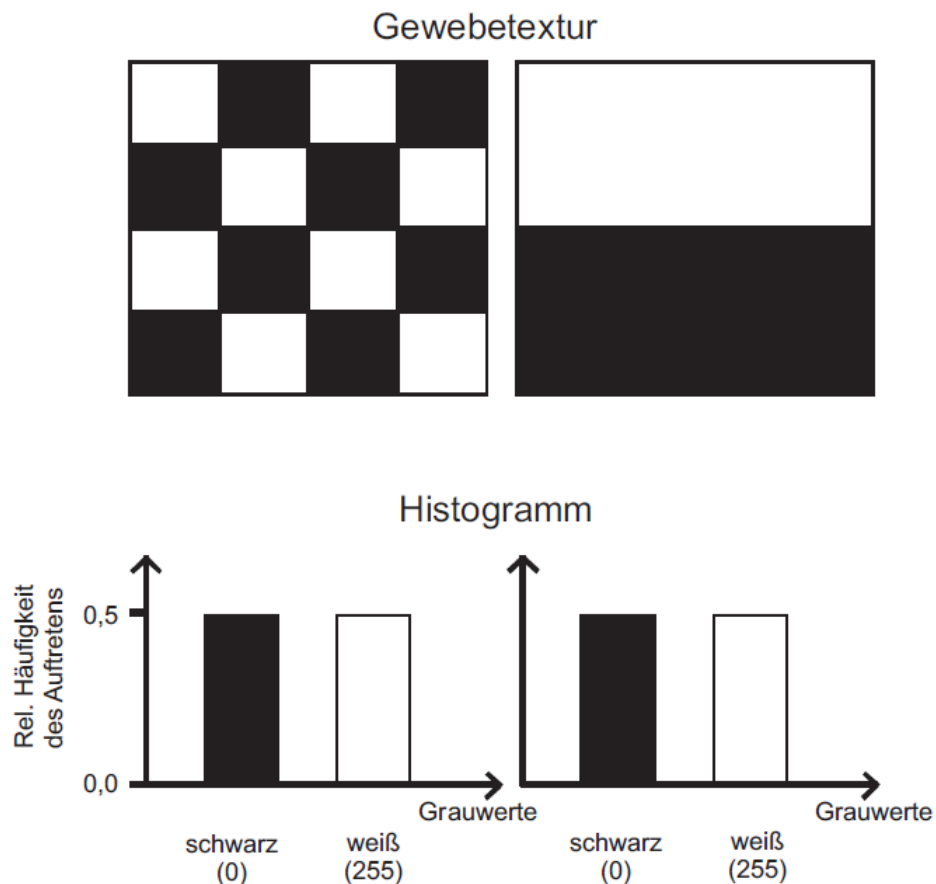


Abb. 5: Darstellung der eindimensionalen Histogramme (z.B. mittlerer Grauwert) zweier unterschiedlicher Schwarz-Weiß-Bilder (modifiziert nach Hermes et al., 1997). Der mittlere Grauwert unterscheidet sich in beiden Bildern nicht.

Der räumliche Bezug der einzelnen Pixel wird über die *Grauwertanalyse zweiter Ordnung* („co-occurrence matrix“) erfasst (Delorme and Zuna, 1995). Für die Berechnung der Parameter der zweiten Ordnung muss eine so genannte Grauwertabhängigkeitsmatrix der ROI erstellt werden. Dabei handelt es sich um ein zweidimensionales Histogramm (Scatterplot), in dem die Häufigkeit bestimmter Kombinationen von Grauwerten berechnet wird. Durch die schrittweise Erfassung und Registrierung von Pixelpaaren in der ROI ergibt sich in der Matrix eine Häufigkeitsverteilung der Grauwertkombinationen (Delorme und Zuna, 1995; Valckx und Thijssen, 1997). Im Anschluss wird die Matrix statistisch ausgewertet und somit werden die Parameter der zweiten Ordnung, wie beispielsweise Homogenität und Heterogenität, ermittelt (Raeth et al., 1985; Haberkorn, 1991; Zuna, 1991; Huber und Luscher, 1994; Delorme und Zuna, 1995; Huber et al., 2000). Anhand dieser Parameter wird die Gleich-

förmigkeit der vorkommenden Pixelpaare beurteilt (Gertsch, 1997). Sie werden bestimmt durch die Anzahl der unterschiedlichen Grauwertkombinationen und deren Häufigkeit. Die Homogenität ist groß, wenn es wenige verschiedene Grauwertkombinationen in der Matrix gibt und diese sich häufig wiederholen (Abb. 6).

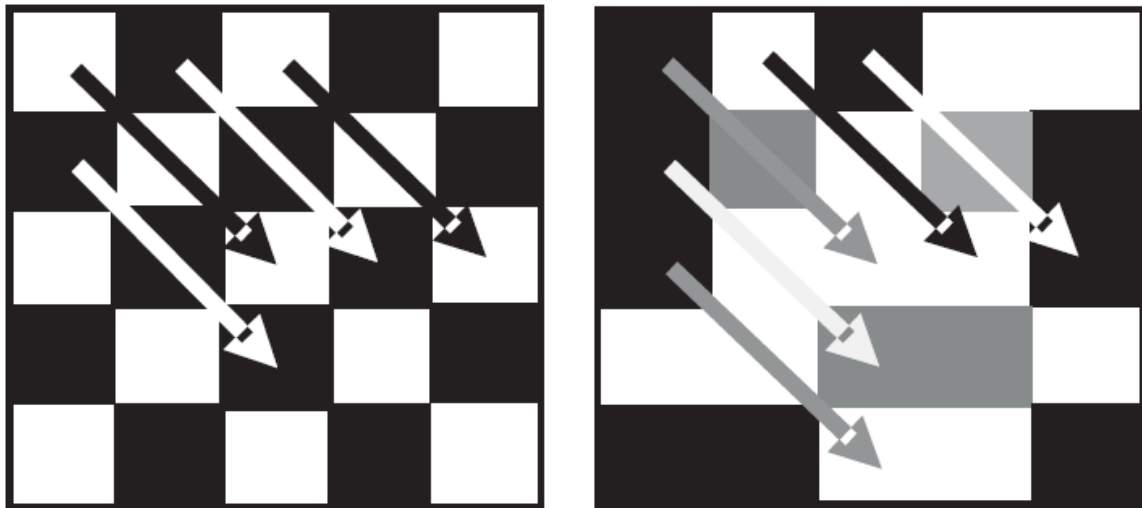


Abb. 6: Schematische Darstellung eines homogenen (links) bzw. heterogenen Bildes (rechts). Das homogene Bild enthält weniger unterschiedliche Graustufen (Pfeile) als das heterogene Bild (modifiziert nach Meyer-Scheel, 2005).

Alle bislang verfügbaren Auswertungsprogramme wurden jedoch für die Computertomographie entwickelt und an die Auswertung sonographischer Bilder adaptiert. Bislang existieren noch keine speziell an die Sonographie adaptierten Programme, die vor allem eine geräteunabhängige Bildauswertung ermöglichen. Das ist mit einem zentralen Nachteil verbunden: Sonographie-spezifische Artefakte („Speckles“, Randschatten, Schallschatten, Kometenschweife) fließen in die Bildauswertung mit ein. Artefakte entstehen durch die Überlagerung mehrerer Ultraschallwellen und haben keinen Bezug zu dem anatomischen Korrelat (Bleck, 1998). Sie erscheinen im B-Mode-Bild als dunkle oder helle Flecken (Delorme und Zuna, 1995). In der Humanmedizin wird deshalb in der Tumordiagnostik die Computer-gestützte *Grauwertanalyse erster und zweiter Ordnung* mit der Auswertung von „Speckle“-Informationen kombiniert, um die Belastbarkeit von Aussagen basierend auf der Computer-gestützten Echotexturanalyse zu erhöhen (Thijssen, 2000; Chang et al., 2003).

1.6 Anwendungsgebiete der Echotexturanalyse in der Gynäkologie

Mittels Echotexturanalyse wurden bereits Strukturveränderungen des Endometriums beim zyklischen Rind untersucht (Schmauder, 2003). Dabei war eine positive Korrelation zwischen der Progesteronkonzentration im Plasma und dem mittleren Grauwert des Endometriums nachweisbar ($r = 0,48$). Die Homogenität der Grauwerte war dagegen negativ mit der Progesteronkonzentration korreliert, d. h. im Diöstrus waren mehr verschiedene Grauwerte nachweisbar. Dabei fiel die subjektive Beurteilung der Homogenität umgekehrt zu der digital ermittelten aus.

Zusätzlich wurden mittels Echotexturanalyse akute inflammatorische Prozesse am Endometrium des Rindes untersucht. Hierzu wurde den Tieren Policresulen (Lota-gen[®]) intrauterin verabreicht. Innerhalb von 72 Stunden *post infusionem* erhöhte sich die Variabilität der Grauwerte; dies erscheint plausibel aufgrund der durch die Infusion induzierten Ödematisierung des Endometriums (Schmauder, 2003).

Die Echotexturanalyse wurde schließlich als *Grauwertanalyse erster Ordnung* genutzt, um Informationen über den morphologischen und funktionellen Status des CL zu erhalten. Charakteristische zyklische Veränderungen zwischen dem mittleren Grauwert und den histomorphologischen Charakteristika eines Gelbkörpers waren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisbar (Singh et al., 1997; Tom et al., 1998). Der mittlere Grauwert korrelierte *in vitro* negativ mit der Dichte der Luteinzellen und positiv mit der Dichte des Bindegewebes. Obwohl die Pixelwerte der Ultraschallbilder sowohl mit der lutealen Progesteronkonzentration ($r = -0.72$) als auch der Plasmakonzentration des Progesterons ($r = -0.71$) korrelierten, war eine Differenzierung der unterschiedlichen Stadien eines CL und damit der Zyklusstadien anhand des Grauwertes nicht möglich (Singh et al., 1997). In den beschriebenen Studien blieb die diagnostische Aussagekraft dieser Untersuchungsmethode bislang begrenzt.

1.7 Konzeption und Fragestellung

Mittels Farbdoppler-Sonographie und Echotexturanalyse wurden Untersuchungen am Genitale des Rindes während des Zyklus und der Trächtigkeit durchgeführt. Anhand von Verlaufsuntersuchungen wurde geprüft, ob mit Hilfe dieser Untersuchungsverfahren zusätzliche funktionelle Erkenntnisse über die Physiologie des Zyklusgeschehens als auch der Gravidität gewonnen werden können, die über die morphologischen Veränderungen von Uterus und Ovar hinausgehen. Diese nicht-invasiven Untersuchungsverfahren sind schonend für das Tier und zudem ggf. auch bei vielen Tieren in kurzer Zeit durchführbar. Es wurden folgende Problemstellungen bearbeitet:

- Bestimmung des prädiktiven Werts des lutealen Blutflusses zur Charakterisierung der Funktion des CL;
- Charakterisierung der Veränderungen des CL während des Zyklus anhand der Echotexturanalyse;
- Etablierung eines neuen, spezifischen Programms zur Analyse der lutealen Echotextur des Rindes;
- Induzierung der Luteolyse an unterschiedlichen Zeitpunkten der Lutealphase und Effekte auf den Ovulationsfollikel;
- Charakterisierung lutealer Veränderungen nach experimenteller Entzündung durch Lipopolysaccharide bei Kühen im Diöstrus;
- Etablierung einer Methode zur Trächtigkeitsdiagnostik anhand der lutealen Durchblutung bereits in der dritten Woche der Gravidität;
- Charakterisierung des uterinen Blutflusses in der zweiten Hälfte der Gravidität bei Milchkühen mit Hilfe der Farbdoppler-Sonographie und Ableitung von Determinanten des Blutflusses.

Zukünftige Herausforderungen ergeben sich zusätzlich bei der Diagnostik pathologischer Zustände und der Überprüfung von Erfolgen therapeutischer Interventionen.

2. Ergebnisse

2.1 Der luteale Blutfluss während des Zyklus bei Rindern

Herzog, K., M. Brockhan-Lüdemann, M. Kaske, N. Beindorff, V. Paul, H. Niemann, H. Bollwein (2009). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 73, 691-7.

Ziel dieser Studie war es, (a) die luteale Durchblutung mittels Farbdoppler-Sonographie während eines physiologischen Zyklus zu quantifizieren und (b) die luteale Durchblutung mit der Plasmakonzentration des Progesterons sowie der Größe des CL (bestimmt durch B-Mode-Sonographie) zu korrelieren. Dazu wurde der Zyklus von zehn Deutschen Holstein Kühen zunächst synchronisiert. Während des folgenden Zyklus (Tag 1 entspricht dem sonographisch nachgewiesenen Tag der Ovulation) wurden die Kühe an den Tagen 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, -5, -4, -3, -2, -1 transrektal sonographisch untersucht; an jedem Untersuchungstag wurde zudem eine venöse Blutprobe zur Bestimmung der Plasmakonzentration des Progesterons entnommen und mittels Enzymimmunoassay (Immulite[®]) analysiert. Die Bestimmung der Größe des CL erfolgte mittels B-Mode-Sonographie aus dem maximalen Querschnitt des CL. Die luteale Durchblutung wurde mittels Farbdoppler-Sonographie anhand der maximal durchbluteten Fläche des CL bestimmt. Die Größe des CL verdoppelte sich während der Anbildungsphase zwischen Tag 4 und 7, blieb während der Blütephase (Tag 8 bis 16) auf konstant hohem Niveau und nahm danach während der Regressionsphase (Tag -5 bis -1) langsam ab. Die luteale Durchblutung verdoppelte sich während der Anbildungsphase, verdoppelte sich wiederum während der Blütephase und nahm während der Regressionsphase rapide ab. Die Progesteronkonzentration verhielt sich über den Zyklus ähnlich wie die luteale Durchblutung. Diese ermöglichte einen validen Nachweis einer hohen Progesteronkonzentration im Plasma ($> 1,0$ ng/ml; „aktives CL“); dazu musste die luteale Durchblutung nur 35% ihrer Maximalwerte erreichen. Die Größe des CL erwies sich als weniger sensitiv; die Größe musste 60% des Maximalwerts überschreiten, um zuverlässig auf eine Plasmakonzentration des Progesterons von > 1 ng/ml hinzuweisen. Die luteale Durchblutung erwies sich damit insbesondere während der Regressionsphase als probater

Parameter zur Beurteilung der CL-Funktion und besser geeignet als die luteale Größe. Die Nutzung dieses Parameters erscheint heute auch für die Routinepraxis möglich, da tragbare, batteriebetriebene Ultraschallgeräte mit Farbdopplerfunktion bereits ökonomisch vertretbar sind. Die Erfassung der lutealen Durchblutung eröffnet somit neue Optionen für zootecnische Maßnahmen im Rahmen des Fertilitätsmanagements beim Rind.

2.2 Echotexturanalyse des Corpus luteum im Zyklus bei Rindern

Herzog, K., E. Kiossis, H. Bollwein (2008). Examination of cyclic changes in bovine luteal echotexture using computer-assisted statistical pattern recognition techniques. *Animal Reproduction Science* 106, 289-297.

Die B-Mode-Sonographie repräsentiert ein etabliertes, diagnostisches Verfahren zur Zyklusbestimmung beim Rind. Ziel dieser Studie war es zu prüfen, ob die Computergestützte Analyse von B-Mode-Ultraschallbildern des Corpus luteum (CL) im Rahmen einer Echotexturanalyse zusätzliche Informationen über das Zyklusgeschehen der Milchkuh vermittelt. Dazu wurden vier Kühe (Deutsches Fleckvieh) in zwei aufeinander folgenden Zyklen beginnend am Tag 1 (Ovulation = Tag 0) jeden zweiten Tag bis Tag 13 im Diöstrus und täglich von Tag -5 bis zur folgenden Ovulation transrektal sonographisch untersucht. Während jeder Untersuchung wurden jeweils drei B-Mode-Bilder des CL gespeichert; diese wurden digitalisiert und später off-line mit einem Computergestützten Analyseprogramm (Pepe[®], Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) ausgewertet. Dabei wurden die Querschnittsfläche des CL (A), Mean grey level (MGL) („Echotexturparameter 1. Ordnung“) sowie Correlation (CORR), Run percentage (RPERC) und Long-run emphasis (LREM) („Echotexturparameter 2. Ordnung“) ausgewertet; zusätzlich wurden bei jeder Untersuchung Blutproben zur Bestimmung der Plasmakonzentration des Progesterons (P₄) mittels Enzymimmunoassay gewonnen. Alle erfassten Parameter der Echotextur zeigten charakteristische Veränderungen im Verlauf des Zyklus. Eine Varianzkomponentenschätzung wurde durchgeführt, um den Effekt des Zyklustages zu ermitteln; dieser lag für A, MGL, CORR, RPERC und LREM bei 56,6%, 64,6%, 77,6%, 89,9% bzw. 86,0%. Der Effekt des Individuums auf die untersuchten Parameter A, MGL, CORR, RPERC und LREM war mit Werten von 20,6%, 24,5%, 7,2%, 0,0% und 14,0% gering. Die Ergebnisse zeigten, dass die Veränderungen der lutealen Echotextur primär durch das Zyklusstadium und kaum durch die interindividuelle Streuung beeinflusst wurden. Auch der Einfluss der zwei unterschiedlichen Zyklen auf die untersuchten Echotexturparameter fiel mit 22,8%, 10,9%, 15,2%, 10,1% und 0,0% relativ gering aus; die zyklischen Veränderungen der Parameter A und P₄ waren ähnlich. Im Gegensatz zu P₄, dessen Konzentration bereits zwischen den Tagen -5 und -3 deut-

lich abnahm, blieb A bis Tag -3 auf konstant hohem Niveau. Der MGL war an den Tagen 7, 9 und 13 des Zyklus deutlich höher ($p < 0,05$) verglichen mit den Tagen 3 und -3. Der Parameter CORR wies in den ersten Tagen nach der Ovulation konstant hohe Werte auf ($p > 0,05$) und nahm zwischen den Tagen 5 und 13 kontinuierlich ab ($p < 0,05$). Danach blieben die Werte bis zur nächsten Ovulation, mit Ausnahme von Tag -3 ($p < 0,05$) auf niedrigem Niveau ($p < 0,05$). Der Parameter RPERC stieg zwischen den Tagen 1 und 9 an ($p < 0,0001$), blieb zwischen Tag 9 und 15 auf hohem Niveau ($p > 0,05$) und nahm anschließend bis Tag -1 bis auf das Basalniveau ab ($p < 0,05$). Der Parameter LREM stieg steil auf Maximalwerte zwischen den Tagen 1 und 5 ($p < 0,0001$) an. Von Tag 7 bis -3 blieb dieser Parameter auf einem konstant hohen Level nahe des Maximums ($p > 0,05$); an Tag -1 war er bis auf den Basalwert abgesunken. Die Ergebnisse zeigen, dass die Computer-gestützte Analyse von B-Mode-Ultraschallbildern zusätzliche Informationen über die Morphologie des CL liefert und eine bessere Differenzierung zwischen den einzelnen Zyklusstadien ermöglichte. Allerdings erwies sich die Unterscheidung eines CL während der An- und Rückbildungsphase, die eine erhebliche Relevanz für tierärztliche Interventionen hat, mit dem hier eingesetzten kommerziell verfügbaren Bildanalyseprogramm schwierig, bzw. nicht möglich.

2.3 Aussagen zur lutealen Funktion anhand Computer-gestützter Analyse von B-Mode-Bildern des Corpus luteum im Zyklus bei Rindern

Thijssen, J.M., K. Herzog, G. Weijers, M. Brockhan-Luedemann, A. Starke, H. Niemann, H. Bollwein, C. L. de Korte (2011). Quantitative ultrasound image analysis offers the possibility to predict plasma progesterone concentrations in the estrous cycle in cows: a feasibility study. *Animal Reproduction Science* 127, 7-15.

In den vergangenen Jahren wurden mehrfach Versuche unternommen, den Funktionszustand eines Corpus luteum (CL) anhand seiner sonographischen Echotextur zu charakterisieren. In diesen Studien waren die Ergebnisse der Echotexturanalyse wesentlich von der Art und Einstellung des verwendeten Ultraschallgeräts bzw. der zur Analyse benutzten Computerprogramme abhängig. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob die quantitative Analyse von Ultraschallbildern des CL nach Kalibrierung der Ultraschallgeräte eine valide Abschätzung der peripheren Plasmaprogesteronkonzentration (P_4) ermöglicht. Zehn Deutsche Holstein Kühe wurden täglich an den Tagen 4 bis 8, 10 bis 16 und -5 bis -1 (Tag 1 = Ovulation) des Zyklus sonographisch (B-Mode) untersucht. Zusätzlich wurde den Tieren bei jeder Untersuchung eine venöse Blutprobe zur Bestimmung der Plasmakonzentration des Progesterons entnommen. Die Ultraschallbilder wurden mit dem durch die Autoren entwickelten Analyseprogramm CAUS ausgewertet. Zusätzlich zur Größe des CL (Total Area, TotA; Tissue Area interactive, TisAi; Tissue Area Automatic, TisAa) wurden anhand des Grauwert-Histogramms und der Speckle-Größe bestimmt: Mean, Standard Deviation (SD), Signal-to-Noise Ratio (SNR = Mean/SD) der Echolevel und Residual Attenuation (ResAtt) sowie Axial und Lateral speckle size (Ax and Lat). Die interindividuelle Variabilität der P_4 -Konzentration, gemittelt über alle Untersuchungstage, wurde durch den Variationskoeffizient (VK) abgeschätzt. Der VK der P_4 -Plasmakonzentration war mit 0,65 hoch. Deshalb wurde exemplarisch während des Diöstrus die relative P_4 -Konzentration am Tag 16 mit 100% als Referenzwert genutzt ($P4_rel_D16$). Für diesen Zyklustag wurden zwischen der relativen P_4 -Konzentration und den Ultraschallparametern die höchsten Korrelationen errechnet. Die Korrelationen zwischen $P4_rel_D16$ und TotA, TisAa (CL Größe nach automatischer Größenbestimmung) sowie ResAtt waren mit $r = 0,68$, $0,74$ und $-0,42$ am höchsten. Eine multiple Regressionsanalyse unter Einbeziehung aller sonographischen Parameter

ergab $P4_rel_D16_{pred} = -0,315 + 0,225TisAa - 0,023ResAtt$ ($r^2 = 0,59$; $p < 0,001$). Anhand dieser Formel wurde die Plasmakonzentration des Progesterons $P4_rel_D16$ mit Hilfe der sonographischen Parameter für jeden Untersuchungstag berechnet. Die Korrelation zwischen der errechneten und gemessenen Progesteronkonzentration $P4_rel_D16$ war hoch ($r = 0,77$). Die Klassifizierung eines mit CAUS analysierten sonographischen Bildes in Abhängigkeit zum prognostizierten P_4 -Wert mittels ROC-Kurve erwies sich für den Diöstrus (Tag 10 bis 16) mit $ROC > 0,80$ als zufriedenstellend. Die Flächenberechnung ergab für die Echotexturparameter $TisAa$ and $ResAtt$ Werte von 0.88. Zusammenfassend erwies sich damit die quantitative Analyse von kalibrierten Ultraschallbildern mit CAUS als geeignet, die zyklischen Veränderungen der P_4 -Konzentration mit hinreichender Sicherheit abzuschätzen und damit das Zyklusstadium vorherzusagen. Eine Integration derartiger Computer-gestützter Auswertungsprogramme in Ultraschallgeräte erscheint heute durchaus umsetzbar. Die damit erzielbare zuverlässigere Interpretation sonographischer Befunde eröffnet dem Tierarzt zusätzliche Optionen im Reproduktionsmanagement von Milchviehherden.

2.4 Untersuchung zur Follikeldurchblutung nach Einleitung der Luteolyse bei Rindern

Jordan, A., K. Herzog, S.E. Ulbrich, N. Beindorff, Ä. Honnens, L. Krüger, A. Miyamoto, H. Bollwein (2009). Genital blood flow and endometrial gene expression during the preovulatory period after PGF_{2α}-induced luteolysis in different luteal phases in cows. *Journal of Reproduction and Development* 55, 309-15.

Ziel dieser Studie war es zu prüfen, ob sich die folliculäre und uterine Durchblutung sowie die endometriale Genexpression bei Kühen nach Induktion der Luteolyse während der ersten oder zweiten Follikelwelle eines Zyklus unterscheiden. Zusätzlich wurden die Tiere in einem unbeeinflussten Zyklus untersucht (Kontrollzyklus). Neun klinisch gesunde, nicht laktierende Deutsche Holstein Kühe wurden über drei Brunstzyklen untersucht. Der Tag der Ovulation wurde als Tag 1 festgelegt; an diesem Tag war der Ovulationsfollikel erstmals nicht mittels B-Mode-Sonographie auf dem Ovar nachweisbar. Jedes Tier wurde über einen Zyklus verfolgt, in dem kein hormonelles Eingreifen erfolgte (spontane Ovulation; Kontrolle), zusätzlich wurde in zwei Zyklen entweder am Tag 7 (erste Follikelwelle) oder am Tag 11 (zweite Follikelwelle) ein Prostaglandin-Analogon (PGF_{2α}) zur Luteolyse verabreicht. Die experimentelle Abfolge wurde randomisiert. Während des Kontrollzyklus wurden die Tiere beginnend mit Tag 18 *post ovulationem* (*p. ovul.*) täglich transrektal farbdopplersonographisch bis zur folgenden Ovulation untersucht. Nach experimenteller PGF_{2α}-Applikation erfolgten die farbdopplersonographischen Untersuchungen täglich bis zur folgenden Ovulation. Nach jeder sonographischen Untersuchung wurde den Tieren eine Blutprobe aus der Vena coccygealis zur Bestimmung der Östrogen- und Progesteronkonzentration im Plasma entnommen. Der folliculäre Blutfluss (FBF) wurde anhand der maximalen Anzahl der Farbpixel auf den digitalisierten Ultraschallbildern der Follikel ermittelt. Der uterine Blutfluss wurde durch die uterine Time-averaged maximum velocity (UTAMV) und den Pulsatility index (PI) in beiden Aa. uterinae quantifiziert. Im Rahmen der standardisierten Auswertung wurden lediglich die Ergebnisse der Blutflussmessung an den beiden Vortagen der folgenden Ovulation (d. h. Tag -1 und 0) berücksichtigt. Am Tag der Ovulation wurden Biopsien vom Endometrium des Corpus uteri entnommen, um die Genexpression der Östro-

gen-, Progesteron-, Oxytozin-, Vasoendothelin-growth-factor-Rezeptoren sowie der eNOS (endothelial nitric oxide synthase) - und iNOS (inducible NOS) -Rezeptoren mittels qRT-PCR zu untersuchen. Das Intervall zwischen PGF_{2α}-Injektion und Ovulation war bei Kühen, die am Tag 7 während der ersten Follikelwelle behandelt wurden, ca. 1,7 Tage kürzer als bei Kühen, die am Tag 11 während der zweiten Follikelwelle PGF_{2α} erhielten ($p < 0,05$). Bei den am Tag 7 behandelten Kühen war der FBF an Tag -1 und 0 höher als bei den am Tag 11 behandelten Kühen ($p < 0,05$). Die UTAMV war an Tag -1 ebenfalls größer bei Kühen, die am Tag 7 behandelt wurden als bei Kühen, die PGF_{2α} am Tag 11 erhielten ($p < 0,05$); es bestanden jedoch keine Unterschiede in FBF und UTAMV zwischen Kühen, die PGF_{2α} am Tag 11 erhielten und Kühen im unbeeinflussten Zyklus ($p > 0,05$). Die Genexpressionen und die Plasmakonzentrationen von Östrogen und Progesteron unterschieden sich zwischen den Zyklen nicht ($p > 0,05$). Die Ergebnisse zeigten, dass die Induktion der Luteolyse zu einem früheren Zeitpunkt des Zyklus (erste Follikelwelle) sowohl mit einer besseren Durchblutung des Ovulationsfollikels als auch der A. uterina einhergeht. Aus ökonomischer Sicht erwies sich die frühere Induktion der Luteolyse als sinnvoll, da diese Tiere im Schnitt 1,7 Tage früher ovulierten.

2.5 Einfluss von *E. coli* Lipopolysacchariden auf das Corpus luteum bei Rindern im Diöstrus

Herzog, K., K. Strueve, J.P. Kastelic, M. Piechotta, S. Ulbrich, C. Pfarrer, T. Shimizu, A. Miyamoto, K. Shirasuna, H. Bollwein. *E. coli* lipopolysaccharide transiently suppresses luteal function in diestrus cows. Submitted for publication in *Reproduction*.

Es war das Ziel dieser Studie, die Effekte von intravenös verabreichtem *E. coli* Endotoxin (LPS) auf die Größe des Gelbkörpers (LS), die luteale Durchblutung (LBF), die Plasmakonzentrationen von Progesteron (P_4), 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2 α} (PGFM) und Prostaglandin E₂ (PGE) sowie die Genexpression des lutealen Gewebes bei Milchkühen näher zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst der Zyklus von sieben nicht-laktierenden, primiparen (N=5) bzw. pluriparen (N=2) Deutsche Holstein Kühen (Alter: 5,1 \pm 0,8 Jahre [Mittelwert \pm SEM], die vor > 4 Monaten gekalbt hatten, synchronisiert (OvSynch) und der Tag der Ovulation als Tag 0 definiert. Im folgenden Zyklus wurde den Kühen an Tag 9 *post ovulationem* (*p. ovul.*) intravenös 10 ml Kochsalzlösung (0,9%) verabreicht (Kontrollzyklus). Im sich anschließenden Zyklus wurden am Tag 9 *p. ovul.* 10 ml Kochsalzlösung (0,9%) mit 0,5 μ g/kg LPS (*Escherichia coli*, O55:B5) intravenös verabreicht. Das Corpus luteum (CL) wurde eine Stunde vor und 3, 6, 9 sowie 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Injektion der Kochsalz- bzw. LPS-Lösung transrektal Farbdoppler-sonographisch (10,0-MHz Linearscanner) untersucht. Blutproben zur Bestimmung der Plasmakonzentration von P_4 , PGFM sowie PGE wurden eine und 0,5 Stunden vor der Injektion sowie 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 48, 72 Stunden nach der Injektion aus der V. jugularis externa entnommen. Ferner wurden 12 Stunden nach der Kochsalz- bzw. LPS-Injektion sowie an Tag 9 *p. ovul.* des folgenden Zyklus unter transvaginaler sonographischer Kontrolle Biopsien aus dem CL genommen. Die Art der Injektionslösung (Kochsalzlösung vs. LPS) hatte keinen Einfluss auf die Zykluslänge ($p = 0,138$). Nach Injektion von LPS nahm die LS innerhalb von 24 Stunden deutlich ab (von 5,2 auf 3,8 cm²: $p < 0,05$) und blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraums kleiner als nach der Injektion von Kochsalzlösung. Die LS veränderte sich nach der Kochsalz-Injektion bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nicht. Der LBF verringerte sich innerhalb von drei Stunden nach Injektion der LPS-Lösung um 34% ($p < 0,05$) und blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraums niedriger als nach Injektion der Kochsalzlösung ($p < 0,05$). Die

Plasma P_4 -Konzentration war während der ersten drei Stunden nach der LPS-Injektion zunächst höher als nach Kochsalz-Injektion ($p < 0,05$); neun Stunden *post injectionem* war P_4 nach LPS-Injektion bis zum Ende des Untersuchungszeitraums niedriger als nach Verabreichung von Kochsalzlösung ($p < 0,05$). Die PGFM-Konzentration im Plasma stieg nach LPS-Injektion innerhalb von 30 min um das 12-fache (9.2 vs. 0.8 ng/ml; $p < 0,05$) und blieb über weitere 6 Stunden erhöht im Vergleich zu den Tieren nach Kochsalz-Injektion ($p < 0,05$). Die PGE Konzentration verdoppelte sich innerhalb der ersten Stunde nach LPS-Injektion ($p < 0,05$) und nahm während der folgenden drei Stunden wieder auf Basalwerte ab. Die mRNA-Gehalte für das an der Progesteron-Produktion beteiligte Steroidogenic Acute Regulatory Protein waren 12 Stunden nach LPS-Injektion niedriger und für das Enzym Caspase3 als Apoptose-Marker höher im Vergleich zu den Tieren nach Injektion von Kochsalzlösung und im Vergleich zu Tag 9 des folgenden Zyklus ($p < 0,05$). In dem Zyklus, der auf den LPS beeinflussten Zyklus folgte, ergaben sich durch die LPS- bzw. Kochsalzlösung keine Einflüsse auf LS, Plasmakonzentration des P_4 und die Genexpression ($p > 0,05$). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass erhöhte LPS-Konzentrationen im Diöstrus zu einer transienten Beeinflussung des CL führten, aber keine Auswirkung auf das CL des folgenden Zyklus hatten. Das LPS-Modell wird derzeit bei frühträchtigen Kühen zwischen dem 33. und 38. Trächtigkeitstag mit dem Ziel angewandt, die Verbindung zwischen der temporären morphologischen und funktionellen CL-Depression und der embryonalen Mortalität zu prüfen. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass trotz der Beeinträchtigung des CL kein Fruchttod ausgelöst wird. Offensichtlich ist diesem Stadium das CL nicht entscheidend für das Absterben des Embryos.

2.6 Der luteale Blutfluss während der Frühgravidität bei Rindern

Herzog, K., C. Voss, J. P. Kastelic, N. Beindorff, V. Paul, H. Niemann, H. Bollwein (2011). Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology* 75, 549-54.

Ziel dieser Studie war es, (a) die Durchblutung des Gelbkörpers (CL) bei zyklischen und trächtigen Kühen zu messen und (b) zu prüfen, ob die Erfassung der Durchblutung des CL eine praktikable Methode zum Nachweis einer Frühträchtigkeit darstellt. Insgesamt 54 laktierende Deutsche Holstein Kühe (Alter: $5,2 \pm 0,2$ Jahre [Mittelwert \pm SEM]; $2,4 \pm 0,2$ Laktationen) wurden ab der sechsten Woche *post partum* in die Studie einbezogen. Dreimal täglich wurden Brunstkontrollen durchgeführt. Der Tag, an dem der Duldungsreflex beobachtet wurde und die Tiere besamt wurden, wurde als Tag 0 festgelegt. Insgesamt wurden 40 Tiere besamt. Die übrigen 14 Tiere wurden nicht besamt und als Kontrolltiere genutzt. An den Tagen 3, 6, 9, 11, 13, 15, 18 und 21 des folgenden Zyklus wurde das CL transrektal mittels Farbdoppler-Sonographie (10,0 MHz Linearscanner) untersucht. Die besamten Tiere wurden am Tag 25 *post inseminationem* [*p. insemin.*] untersucht und als trächtig (Herzschlag des Embryos nachweisbar; N=18), nicht-trächtig (Interöstrus-Intervall 15-21 Tage; N=18) oder als Tiere mit embryonaler Mortalität (Interöstrus-Intervall > 25 Tage; N=4) klassifiziert. Am Tag 3 *p. insemin.* betrug die durchblutete Fläche des CL für alle Tiere im Mittel $1,10 \pm 0,08$ cm²; diese Fläche stieg linear bis Tag 13 *p. insemin.* auf $2,00 \pm 0,08$ cm². Der Anstieg war unabhängig vom Erfolg der Besamung bei allen Tieren nachweisbar. Danach war die luteale Durchblutung tendenziell höher bei trächtigen Kühen. Sie blieb bei Kühen mit embryonaler Mortalität auf einem vergleichbar hohen Niveau. Bei nicht-trächtigen Tieren nahm die luteale Durchblutung tendenziell zwischen den Tagen 15 und 18 *p. insemin.* ab. Die luteale Durchblutung erhöhte sich weiter bei den trächtigen Tieren (Tag 15 *p. insemin.*: $2,50 \pm 0,16$; Tag 18 *p. insemin.*: $2,40 \pm 0,19$ cm²), während sie bei den besamten, nicht-trächtigen Kühen abnahm (Tag 15: $2,01 \pm 0,16$; Tag 18: $1,45 \pm 0,19$ cm²; $p < 0,05$). Die Werte entsprachen dabei weitgehend denen der nicht besamten, zyklischen Tiere (Tag 15: $2,00 \pm 0,18$; Tag 18: $0,95 \pm 0,21$ cm²; $p < 0,05$, n=14). Bei Kühen mit frühembryonaler Mortalität lag die luteale Durchblutung am Tagen 15 *p. insemin.* tendenziell niedriger als bei trächtigen Kühen (Tag 15: $2,00 \pm 0,34$; Tag 18: $2,05 \pm 0,39$ cm²). Obwohl die luteale Durchblutung bei trächtigen Kü-

hen an den Tagen 15 und 18 *p. insemin.* höher war als bei nicht-trächtigen Kühen, erwies sich die Farbdoppler-Sonographie insbesondere aufgrund einer hohen interindividuellen Varianz als ungeeignete Methode zur Diagnostik einer Frühträchtigkeit.

2.7 Untersuchungen zum uterinen Blutfluss in der zweiten Trächtigkeitshälfte bei Rindern mit Hilfe der Farbdoppler-Sonographie

Herzog, K., J. Körte, G. Flachowsky, H. Bollwein (2011). Variability of uterine blood flow in lactating cows during the second half of gestation. *Theriogenology* 75, 1688-94.

Es war das Ziel dieser Studie, (a) die uterine Durchblutung mit Hilfe des uterinen Blutflussvolumens (BFV) bei Kühen (Deutsche Holstein) während der zweiten Trächtigkeitshälfte zu quantifizieren, (b) die individuellen Änderungen der uterinen Durchblutung zu bestimmen und (c) mögliche Zusammenhänge zwischen uterinem Blutfluss (uBFV) und dem Gewicht des Muttertieres sowie dem Geburtsgewicht der Kälber zu prüfen. Das Gewicht des Muttertieres wurde in der 21. Trächtigkeitswoche und einen Tag *post partum* erfasst und aus beiden Werten der Mittelwert gebildet. Der Blutfluss der beiden Aa. uterinae wurde mittels Farbdoppler sonographisch bei 44 Kühen in der 21., 25., 29., 33., 37. und 39. Trächtigkeitswoche untersucht. Während des Untersuchungszeitraums stieg das uBFV linear von 3.053 ± 1.143 ml/min (Mittelwert \pm SD) auf 16.912 ± 5.793 ml/min und damit im Mittel um 5,5% pro Trächtigkeitswoche. Die interindividuelle Varianz war in den ausgewerteten Trächtigkeitswochen durch Variationskoeffizienten von 0,34 bis 0,37 charakterisiert. Eine moderate Korrelation zwischen uBFV und dem Geburtsgewicht der Kälber war bereits in den Wochen 21 bis 37 nachweisbar ($r = 0.30-0.49$; $p < 0,05$); in der 39. Trächtigkeitswoche war die Korrelation enger ($r = 0.60$; $p < 0,001$). Das uBFV war beginnend mit der 21. Woche bei schweren Kühen (> 575 kg Lebendmasse [LM]; $N = 24$) etwa 30% höher als bei leichten Kühen (< 575 kg LM; $N = 20$) (3.394 ± 1.119 ml/min vs. 2.658 ± 1.064 ml/min in der 21. Woche; $p < 0,01$). In der 21. Woche unterschied sich das uBFV nicht zwischen Kühen, die später ein schweres Kalb (> 42 kg Geburtsgewicht [GG]; $N = 19$) bzw. ein leichtes Kalb (< 42 kg GG; $N = 22$) gebären (3.351 ± 1.130 vs. 2.796 ± 1.115 ml/min; $p > 0,05$). Allerdings wiesen Kühe mit Kälbern mit hohem GG ab der 21. Woche bis zum Partus eine um 43% höhere Steigung ($p < 0,0001$) im uBFV pro Woche auf als Kühe, deren Kälber ein niedriges GG hatten. Das uBFV erwies sich als signifikant abhängig vom GG des Kalbes, während die LM des Muttertieres keinen entscheidenden Einflussfaktor darstellte.

3. Übergreifende Diskussion

3.1 Methodik der Zyklusansprache bei Rindern

Beide in dieser Arbeit dargestellten Verfahren der bildgebenden Diagnostik sind geeignet, die herkömmlichen Untersuchungsverfahren der Zyklusdiagnostik bzgl. der Belastbarkeit der Diagnosen wesentlich zu erweitern (Studie 1, 2, 3). Die korrekte Einschätzung des Zyklusstandes basierend auf der manuellen transrektalen Palpation des Uterus und der Ovarien hängt wesentlich von der Erfahrung des Untersuchers ab. Die Werte für Sensitivität und Spezifität zeigen, dass diese Methode mit einer hohen Fehlerquote verbunden ist.

Die Farbdoppler-Sonographie ist demgegenüber eine objektive und einfach durchzuführende Technik. Bereits die Etablierung der B-Mode Sonographie zeigte Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts, dass Funktionskörper auf den Ovarien dargestellt und differenziert werden konnten. Der Stellenwert der Sonographie in der Gynäkologie des Rindes wurde schon vor 17 Jahren mit folgendem Statement zutreffend eingeordnet: „Die real-time B-Mode Sonographie stellt im Bereich der Gynäkologie den bedeutendsten technologischen Fortschritt seit Einführung der Hormonanalytik dar. Sie ist ein nicht-invasives Untersuchungsmedium, das verlässliche Informationen über die Reproduktionsorgane liefert.“ (Ginther, 1995). Entscheidend ist dabei aber nicht nur die korrekte Position des Schallkopfes, um aussagekräftige Bilder zu generieren, sondern ebenso viel Bedeutung ist der korrekten Bildinterpretation beizumessen. Die mittels B-Mode Sonographie erfasste Größe des CL wurde zunächst in wissenschaftlichem Kontext, inzwischen aber auch in der tierärztlichen Routinepraxis genutzt, um Aussagen über die Progesteronproduktion und damit den funktionellen Status eines CL zu machen (Bicalho et al., 2008). Die unbefriedigende Spezifität zwischen 38 und 51% ist dabei Ausdruck des zentralen Nachteils dieses Parameters: eine zuverlässige Erkennung eines Regressionsgelbkörpers ist anhand der Größe des CL nicht möglich (Abb. 7). In der Regressionsphase ist das CL noch relativ groß, sezerniert jedoch so wenig Progesteron, dass die Plasmakonzentration des Progesterons bereits unter dem Schwellenwert von 1 ng/ml liegt. Daraus ergibt sich die Limitierung der Bedeutung der Größe des CL für die Zyklusdiagnostik.

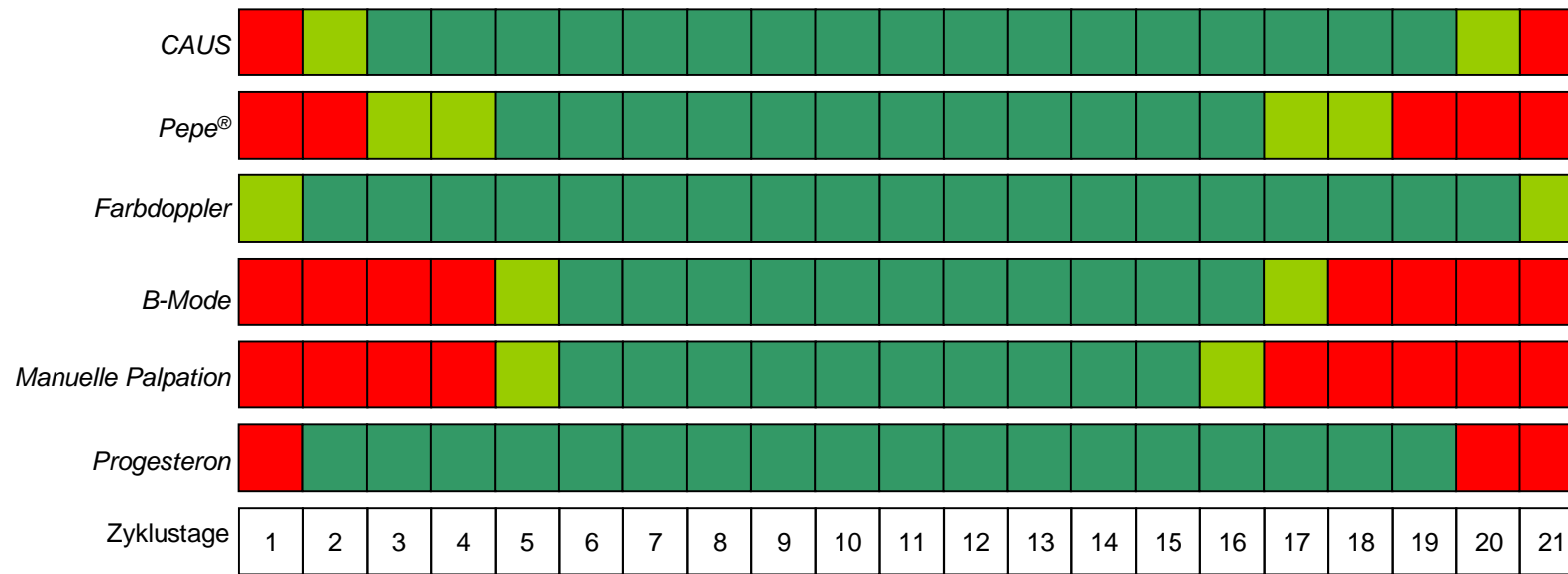


Abb. 7: Darstellung verschiedener Methoden zur Ansprache des Corpus luteum im Rahmen der Zyklusdiagnostik beim Rind (Tag 1 = Tag der Ovulation). Zyklustage, die mit hoher diagnostischer Sicherheit anhand der dargestellten Methoden bestimmt werden können, sind *dunkelgrün* gekennzeichnet. Tage, mit geringer diagnostischer Sicherheit sind *hellgrün* und Tage, an denen keine valide Diagnose möglich ist, sind *orange* dargestellt.

CAUS (Computer-Aided Ultrasound Diagnosis) – durch die eigene Arbeitsgruppe entwickeltes Analyseprogramm zur Computer-gestützten Auswertung von B-Mode-Ultraschallbildern des Corpus luteum;
 Pepe® – kommerziell erhältliches Analyseprogramm zur Computer-gestützten Auswertung von B-Mode-Ultraschallbildern des Corpus luteum;
 Farbdoppler – Farbdoppler-Sonographie zur Erfassung der Durchblutung des Corpus luteum;
 B-Mode – Brightness-Mode-Sonographie zur Darstellung des Corpus luteum;
 Manuelle Palpation – Erfassung des Corpus luteum während der transrektalen, manuellen Untersuchung;
 Progesteron – Progesteronbestimmung in Blut oder Milch gilt als Goldstandard zum Nachweis der sekretorischen Funktion des Corpus luteum.

Um diese diagnostische Lücke zu umgehen, blieb bislang nur die Bestimmung der Progesteronkonzentration im Plasma oder der Milch (Abb. 7). Sie gilt nach wie vor als Goldstandard zur Verifizierung der lutealen Funktion (Short, 1967; Hafs und Armstrong, 1968; Kelton et al., 1991). Trotz allem ist anhand einer einmaligen Progesteronbestimmung ohne zusätzliche Untersuchung des Tieres keine exakte Bestimmung des Zyklustages möglich. Die zeitliche Verzögerung zwischen Blutentnahme und der Verfügbarkeit des Ergebnisses sowie der mit dem Einsenden der Blut- oder Milchprobe verbundene logistische und finanzielle Aufwand haben dazu geführt, dass sich diese Hormonanalytik in der Routinepraxis nicht durchgesetzt hat. Seit wenigen Jahren sind portable Geräte erhältlich, mit denen der Nachweis von Progesteron in der Milch innerhalb von ca. 20 min gelingen soll und durch den Landwirt selbst durchgeführt wird. Jedoch charakterisieren eine nicht zufriedenstellende Reproduzierbarkeit, fehlende Kontroll-, und Thermoregulationsfunktionen die Schwachstellen dieser Methodik. Demgegenüber erwies sich die Farbdoppler-Sonographie als geeignet, über den Blutfluss im CL belastbare Aussagen über die Hormonkonzentration während des Zyklus zu machen (Herzog et al., 2010). Dabei verhielten sich die Veränderungen des LBF analog zu denen der Plasmaprogesteronkonzentration über den Zyklus und es konnte erstmals demonstriert werden, dass die über Farbdoppler-Sonographie ermittelte luteale Durchblutung prädestiniert ist, die luteale Funktion im Hinblick auf die Hormonproduktion zu erfassen. Die luteale Durchblutung veränderte sich im Zyklusverlauf wesentlich stärker als die Größe des CL. Die Werte für die luteale Durchblutung vervierfachten sich von der Anbildungsphase (Tag 4) bis zur Mitte des Diöstrus (Tag 14), während die luteale Größe in diesem Intervall lediglich um das 2,5-fache zunahm. Entsprechend war eine Plasmakonzentration des Progesterons von mehr als 1 ng/ml bereits zu erwarten, wenn die luteale Durchblutung 30% der Maximalwerte erreichte – während das CL mindestens 60% der maximalen Größe erreichen musste, um es korrekt als aktiv ansprechen zu können. Dieses Ergebnis überrascht insofern nicht, als der Anteil Hormon-produzierender Zellen an dem gesamten CL vergleichsweise niedrig ist. Andererseits ist es naheliegend, die Durchblutung als funktionell entscheidend für die Hormonproduktion anzusehen. Die zuverlässige Erkennung von Regressionsgelbkörpern mittels Erfassung der lutealen Durchblutung basiert auf dem rapiden Rückgang der Durchblutung während der lutealen Rückbildungsphase, während die Gesamtgröße des Gelbkörpers während dieses mehrtägigen Intervalls nur sehr allmählich abnimmt (Herzog et al., 2010).

Es lässt sich schlussfolgern, dass die mittels Farbdoppler-Sonographie bestimmte luteale Durchblutung geeignet ist, den Funktionszustand eines CL und damit das Zyklusstadium einer Kuh methodisch einfach und diagnostisch sicher zu erfassen. Die bereits intensive Durchblutung eines Anbildungsgelbkörpers und die reduzierte Durchblutung bei noch erheblicher Größe eines Regressionsgelbkörpers, erlauben sogar eine exaktere Erfassung des Zyklustages als mit Hilfe der Progesteronbestimmung möglich ist. Somit ist diese Methode nicht nur der B-Mode-Sonographie, sondern auch dem Goldstandard in der Zyklusdiagnostik überlegen.

Neben der Charakterisierung physiologischer Änderungen der Durchblutung des Gelbkörpers wurde die Farbdoppler-Sonographie eingesetzt, um die Durchblutung des Ovulationsfollikels nach Induktion der Luteolyse zu untersuchen (Jordan et al., 2009). Die Methode erwies sich als geeignet, Unterschiede in der Durchblutung von Follikeln darzustellen. Wurde die Luteolyse zu einem früheren Zeitpunkt im Zyklus eingeleitet und kamen Follikel der ersten Follikelwelle zur Ovulation, so waren diese stärker durchblutet als Follikel, die dem Einfluss der Luteolyse zu einem späteren Zeitpunkt ausgesetzt waren und bereits Follikel der zweiten Follikelwelle waren. Der höhere Blutfluss in der Wand der dominanten Follikel der ersten Follikelwelle konnte dem hormonalen Milieu der Follikel zugeordnet werden. Follikel der ersten Follikelwelle weisen höhere Östrogenkonzentrationen im Vergleich zu Follikeln der zweiten Welle auf (Wolfenson et al., 1999). Die vasodilatative Wirkung des Östrogens und die damit verbundene Steigerung der Durchblutung wurden bereits vor Jahrzehnten beschrieben (Killam et al., 1973; Ford, 1982; Naden und Rosenfeld, 1985). Trotzdem scheint Östrogen nur einer von zahlreichen Faktoren zu sein, die die folliculäre Durchblutung determinieren. Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass LH den folliculären Blutfluss steigert, indem der Gefäßwiderstand im Ovar abnimmt (Varga et al., 1985). Ferner gibt es Hinweise auf einen „cross-talk“ zwischen vaskulären Komponenten der Endothelzellen und Hormon-produzierenden Zellen der Follikel (Acosta et al., 1998; Acosta et al., 1999), der Einfluss auf lokale Veränderungen des Blutflusses der Ovulationsfollikel hat (Acosta et al., 2003).

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die Induktion der Luteolyse während der frühen Zyklusphase einen positiven Effekt auf die Follikeldurchblutung hat. Daraus lässt sich die für die Praxis besonders relevante Frage ableiten, ob die mittels Farb-

doppler-Sonographie problemlos erfassbare Durchblutung der Follikelwand ggf. prognostische Bedeutung für die Einschätzung des Erfolgs einer konsekutiven Besamung hat (Siddiqui et al. 2009). Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden inzwischen entsprechende experimentelle Studien konzipiert, die gegenwärtig in der eigenen Arbeitsgruppe geprüft werden.

Bereits abgeschlossen wurden Untersuchungen zur Beurteilung der lutealen Durchblutung nach experimentell induzierter Entzündung bei zyklischen Tieren im Diöstrus (Studie 5). Nach einer Infusion von Lipopolysacchariden (LPS) reduzierte sich der Blutfluss innerhalb von drei Stunden um 34% und erreichte während der folgenden 72 Stunden nicht mehr das Ausgangsniveau. Der Abfall der lutealen Durchblutung ist Ausdruck der luteolytischer Veränderungen. Auch nach Induktion der Luteolyse durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ reduzierte sich der luteale Blutfluss in wenigen Stunden, wobei zunächst ein initialer Anstieg innerhalb von 30 Minuten nach der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation beobachtet wurde (Acosta und Miyamoto, 2004). Ob ein entsprechender initialer Anstieg der lutealen Durchblutung auch nach der LPS Injektion auftrat, ist unklar; der mögliche initiale Anstieg konnte hier nicht nachgewiesen werden, da das Verhalten der Tiere in der eigenen Studie zu diesem Zeitpunkt von einem gestörten Allgemeinbefinden als Ausdruck der Septikämie und Hypoxie geprägt war; eine sonographische Untersuchung war deshalb nicht möglich.

Analog zu den Untersuchungen zur lutealen Durchblutung während des Zyklus (Herzog et al., 2010) fiel auch in dieser Studie ein enger Zusammenhang zwischen der lutealen Durchblutung und der Plasmakonzentration des Progesterons auf. Die Abnahme der Progesteronkonzentration im Plasma über mehrere Tage nach lokaler, intrauteriner Applikation von LPS (Williams et al., 2008) unterstreicht die Hypothese, dass Lipopolysaccharide auch die Ovarfunktion beeinträchtigen. Trotz der systemischen Effekte des LPS in der eigenen Studie kam es bei keinem der untersuchten Tiere zu einer vorzeitigen Luteolyse; bei zwei Tieren war der Zyklus verlängert auf 28 bis 38 Tage. Die LPS Injektion wirkte sich auch auf die Morphologie des CL aus: die luteale Größe verringerte sich innerhalb von 24 h nach der LPS Administration um 30% und blieb bis zum Ende der Untersuchungen auf diesem Niveau. Das Phänomen, dass Entzündungen einen Einfluss auf die luteale Größe besitzen, beobachteten auch (Williams et al., 2007). Hier wiesen Kühe, die an einer Metritis erkrankt wa-

ren und eine höhere Anzahl an pathogenen Keimen intrauterin aufwiesen, im ersten Zyklus *post partum* kleinere CL im Vergleich zu Kühen auf, bei denen eine geringere Anzahl an pathogenen Keimen intrauterin festgestellt wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Entzündungen, lokal oder systemisch, einen Einfluss auf die Funktion des Ovars besitzen und die Fertilität beeinflussen können.

Es lässt sich zusammenfassen, dass anhand der B-Mode- und der Farbdoppler-Sonographie eine temporäre Depression der lutealen Morphologie und Funktion infolge einer experimentellen Entzündung nachgewiesen und quantifiziert werden konnte. Für das Reproduktionsmanagement ergibt sich die Frage, welche zeitliche Latenz zwischen Entzündungsgeschehen und Effekten auf Funktionskörper am Ovar bedeutungsvoll ist; dies gilt es in weiterführenden Studien zu prüfen.

Das zweite nicht-invasive Untersuchungsverfahren, die Computer-gestützte Analyse von B-Mode Ultraschallbildern, erwies sich wie die Farbdoppler-Sonographie als potentiell geeignete Methode für die spezifische Zyklusdiagnostik (Abb. 7; Herzog et al., 2008; Thijssen et al., 2011). Mit dem etablierten Analyseprogramm (Pepe[®]) konnten zwar zunächst charakteristische Veränderungen der lutealen Mikrotexur über den Zyklus nachgewiesen werden, aber eine valide Differenzierung aller Zyklusstadien und eine Korrelation zur Plasmaprogesteronkonzentration blieben aus. Damit war die Aussagekraft der Echotexurparameter der ersten Ordnung (Mean grey level; vgl. S. 21) begrenzt (Herzog et al., 2008). Auch Tom et al. (1998) konnten keinen Zusammenhang zwischen Mean grey level und der Progesteronsekretion des CL nachweisen. Eine auf der Histologie von exenterierten Ovarien basierende Studie von Singh et al. (1997) belegte, dass Veränderungen des Mean grey level nicht nur auf Änderungen der Dichte der Lutealzellen, sondern auch auf Änderungen des Bindegewebes sowie auf Änderungen des angiogenetischen Gewebes zurückzuführen sind. Mit den Echotexurparametern der zweiten Ordnung (CORR, LREM, RPERC; vgl. S. 22) gelang zwar eine Differenzierung zwischen einem CL im Diöstrus und der Anbildungs- sowie Rückbildungsphase, aber die Unterscheidung zwischen einem Anbildungs- und Rückbildungsgelbkörper blieb auch mit dieser Methode problematisch (Herzog et al., 2008).

Es wurde deshalb ein auf die Verhältnisse am CL zugeschnittenes Analyseprogramm entwickelt. Ziel war es, die Progesteronkonzentration im Plasma mit Hilfe der B-Mode-Bilder valide prognostizieren zu können (Abb. 7; Thijssen et al., 2011). In Kooperation mit einer Arbeitsgruppe aus den Niederlanden wurde dazu das Analyseprogramm CAUS (Computer-Aided Ultrasound Diagnosis) entwickelt. Die Grundlagen ergaben sich aus einem Auswertungsprotokoll zur Evaluierung des Leberfettgehaltes von Milchkühen mittels B-Mode-Sonographie (Thijssen et al., 2008; Weijers et al., 2010). Bei der Charakterisierung des CL ergab sich aus der geringen Größe des Organs eine besondere Herausforderung. Zunächst wurde das Ultraschallgerät inklusive des Schallkopfes mit Hilfe eines Phantoms kalibriert („Pre-processing“). Anschließend wurden die Ultraschallbilder durch Bildkorrekturschritte mit Hilfe des CAUS-Programms ausgewertet („Post-processing“; Abb. 8). Diese beiden Schritte demonstrieren den Vorteil des CAUS Programms, da durch seine Anwendung die Bildwerte geräteunabhängig werden. Ein Schwerpunkt bei der Entwicklung dieses Programms bestand in der automatischen Erkennung von Artefakten wie den intralutealen Hohlräumen sowie Blutgefäßen, um ein Maximum an Objektivität bei der Auswertung zu gewährleisten (Weijers et al., 2010).

Die Berechnung der Plasmakonzentration des Progesterons über den Zyklusverlauf mit Hilfe des Programms wurde durch die erhebliche interindividuelle Varianz der Progesteronkonzentration erschwert. Es wurde deshalb stets der relative Progesteronwert während der stabilen Lutealphase im Diöstrus (Tag 16 *p. ovul.*) ermittelt und als Bezugswert (d. h. 100%) genutzt. Die Progesteronkonzentrationen anderer Zyklostage wurden dann als Relativwerte berechnet. Eine ROC-Analyse wurde durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen dem mit CAUS ausgewerteten Ultraschallbild während des Diöstrus und der Plasmakonzentration des Progesterons zu prüfen. Bei zwei spezifischen, im Rahmen der CAUS-Analyse berechneten Parametern (TisAa und ResAtt; vgl. S. 30) war die engste Korrelation zu der Plasmakonzentration des Progesterons gegeben, d. h. in 90% der geprüften Fälle wurde das Ultraschallbild im Diöstrus korrekt berechnet. Ergebnisse außerhalb dieser stabilen CL Phase erforderten jedoch eine zweite Untersuchung, um den ersten Wert dazu in Relation zu setzen und abschließend beurteilen zu können, ob sich das CL in der Anbildungs- oder Regressionsphase befand. Auf Grundlage dieser eigenen Ergebnisse (Herzog et al., 2008; Thijssen et al., 2011) ist der Weg über das „Pre-Processing“ und die Ka-

librierungsschritte vor der Bildauswertung unerlässlich, um B-Mode-Bilder einer so kleinen Struktur wie der des CL korrekt Computer-gestützt auszuwerten.

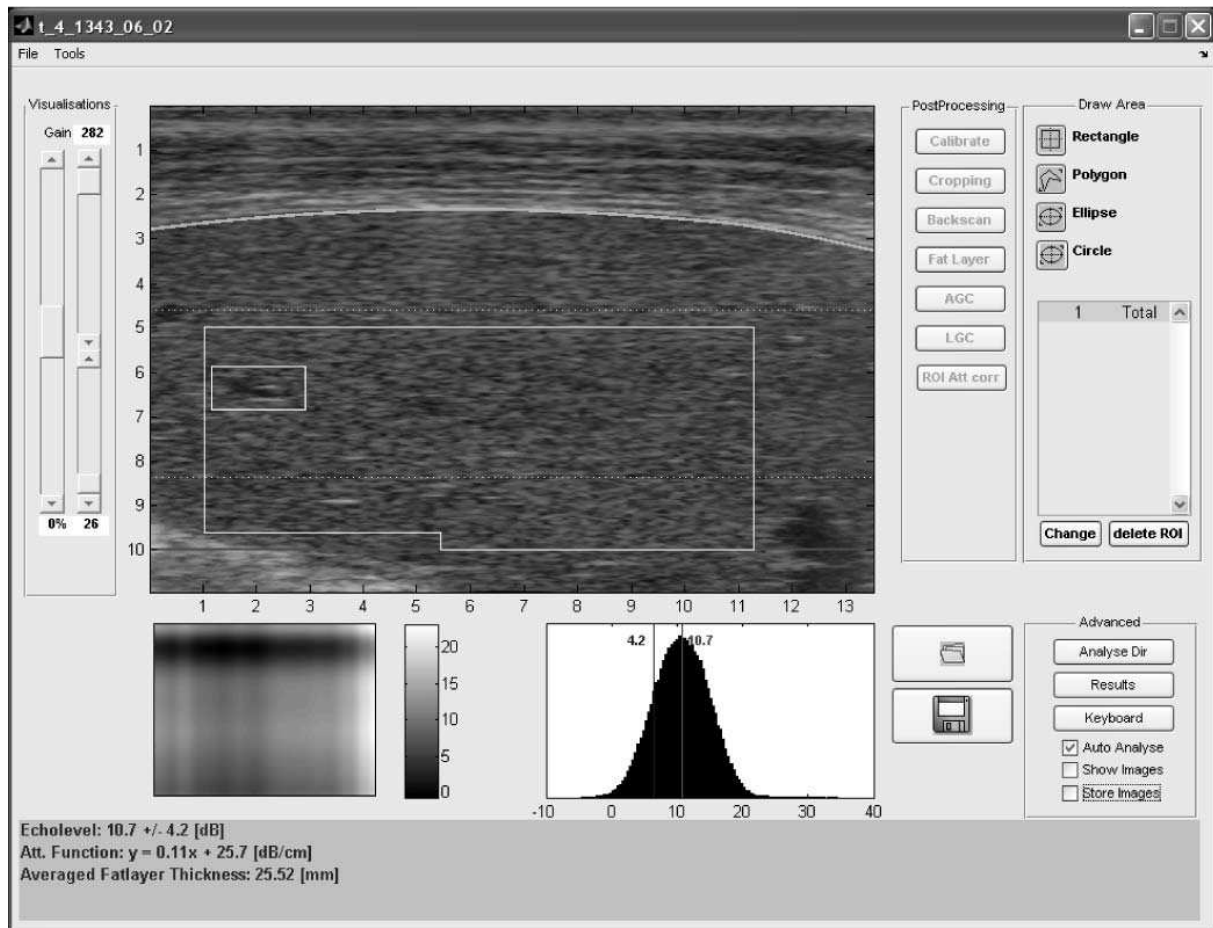


Abb. 8: Darstellung der Benutzeroberfläche des CAUS-Programms: Bild nach Bildkorrektur („backscan conversion“), bei dem aus dem Konvexbild zunächst ein rechteckiges Bild erzeugt wird, in dem dann die zu analysierende Region of interest (ROI) festgelegt wird. Größere Blutgefäße werden in der spezifischen ROI automatisch erkannt und bleiben bei der Auswertung unberücksichtigt. Unten links: Darstellung einer allgemeinen Korrekturmaske. Unten rechts: Darstellung eines Grauwert-Histogramms der einzelnen Pixel (dB) in der ROI. Angezeigt werden Mittelwert und Standardabweichung.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich das CAUS-Programm als praxisingerechtere Methode verglichen mit kommerziellen Analyseprogrammen erwies, um nicht-invasiv die Progesteronproduktion eines CL und damit den Zyklusstand einer Kuh abschätzen zu können. Eine gesicherte Diagnose ergab sich allerdings

auch mit dem CAUS-Programm häufig erst nach zweimaliger Untersuchung des CL während eines Zyklus. Zukunftsweisend ist neben einer Verbesserung des Analyseprogramms die Integration von CAUS in handelsübliche Ultraschallgeräte zur routinemäßigen Anwendung in der täglichen tierärztlichen Diagnostik. Andererseits aber werden durch die Computer-gestützte Bildauswertung primär die morphologischen Veränderungen charakterisiert, die nicht so eng mit der Progesteronsekretion des CL korrelieren wie der dynamischere LBF, der mittels Farbdoppler-Sonographie erfassbar ist und offenbar die sensiblere Methode repräsentiert.

3.2 Methodik der Trächtigkeitsdiagnostik bei Rindern

Die Trächtigkeitsdiagnostik, die üblicherweise beim Rind mittels transrektaler manueller Palpation ab Tag 35 *post inseminationem* (*p. insem.*) durchgeführt wird, ist primär von der Erfahrung des Untersuchers abhängig (Abb. 9). Auch die Parität des Muttertieres ist von Bedeutung: so ist bei Färsen die Uteruswand weniger fibrotisch als bei pluriparen Kühen; dies erleichtert die gesamte Palpation und im Besonderen die Durchführung des Eihautgriffs. Häufig wird zudem in der Routinepraxis auf die Kontrolle der Ovarien und das Aufsuchen eines CL verzichtet und damit ein Hinweis auf Vorliegen einer Trächtigkeit bei Nachweis eines Corpus luteum graviditatis übersehen.

Um die Belastbarkeit der transrektalen manuellen Diagnostik zu verbessern, wird zunehmend ergänzend eine Blutprobe zur Bestimmung trächtigkeitsassoziierter Glycoproteine (PAG) entnommen. Im Endokrinologischen Labor der Klinik für Rinder werden seit Etablierung der PAG-Diagnostik mittels ELISA vor zwei Jahren etwa 1.000 Proben pro Jahr untersucht. Der früheste Zeitpunkt für eine aussagekräftige PAG-Bestimmung ist bei Erstkalbinnen Tag 28 *p. insem.* (Abb. 9). Die Methode ist jedoch bei pluriparen Kühen erst 60 bis 90 Tage *post partum* einsetzbar, da in den ersten beiden Monaten der Trächtigkeit durch die vorangegangene Gravidität noch ein erhöhter Gehalt an PAG im Serum nachzuweisen ist. Leider hat der Nachweis von PAG im Labor den Nachteil, dass die Ergebnisse erst mit einer Latenz von mehreren Tagen verfügbar sind. Dies trifft ebenso zu auf die Progesteronbestimmung im Plasma, die aktuell immer noch häufig als Zusatzdiagnostik herangezogen wird. An-

dererseits würde die Verbesserung der Technik zur semiquantitativen Bestimmung des Milchprogesterongehalts durch den Landwirt einen entscheidenden Vorteil in dieser Hinsicht bedeuten. Von zentraler Bedeutung ist die Erkennung von nicht-trächtigen Tieren mit einer Progesteronkonzentration von < 1 ng/ml; es können dann unmittelbar zootechnische Maßnahmen zur Brunsteinleitung eingeleitet werden. Problematisch ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass bei 10-25% der Kühe der Zyklus (> 24 Tage) und somit auch die Gelbkörperphase verlängert sind. Bei diesen Tieren kann es zu falsch-positiven Trächtigkeitsdiagnosen durch die Progesteronbestimmung kommen. Die gleiche Gefahr geht von den Tieren aus, die zum falschen Zeitpunkt des Zyklus besamt wurden. Ferner ist auch bei Tieren mit frühembryonaler Mortalität der Progesteronwert häufig noch hoch und Tiere, die auf Grund des Fruchttods bereits nicht mehr trächtig sind, können durch die Progesteronbestimmung fehlerhaft als trächtig gewertet werden.

Die B-Mode Sonographie erlaubt je nach Qualität und Erfahrung des Untersuchers eine Trächtigkeitsdiagnose ab Tag 25 *p. insemin.* (Abb. 9). Als beweisend gilt hier die Darstellung des embryonalen Herzschlages. Entscheidend ist bei einer Untersuchung von Kühen in einem so frühen Trächtigkeitsstadium in erster Linie das Erkennen einer Nicht-Trächtigkeit, da dann unmittelbar die nächste Brunst (mittels Prostaglandin-Applikation, PRID-Spirale, OvSynch-Programm, u.a.) induziert und somit die Verzögerungszeit minimiert werden kann. Der Nachweis einer Trächtigkeit bereits in der vierten Trächtigkeitswoche hat den zentralen Nachteil, dass aufgrund der frühembryonalen Mortalität mehr als 12% der frühträchtigen Tiere während der folgenden Wochen (Tag 25 bis 60) die Frucht verlieren und größtenteils unbemerkt umbullen (Van Cleeff et al., 1991; Humblot, 2001). Die Diagnose „trächtig“ am 25. Tag *p. insemin.* ist somit stets mit einem erheblichen Unsicherheitsfaktor verbunden und sollte möglichst um den 60. Tag *p. insemin.* bestätigt werden (Romano et al., 2011).

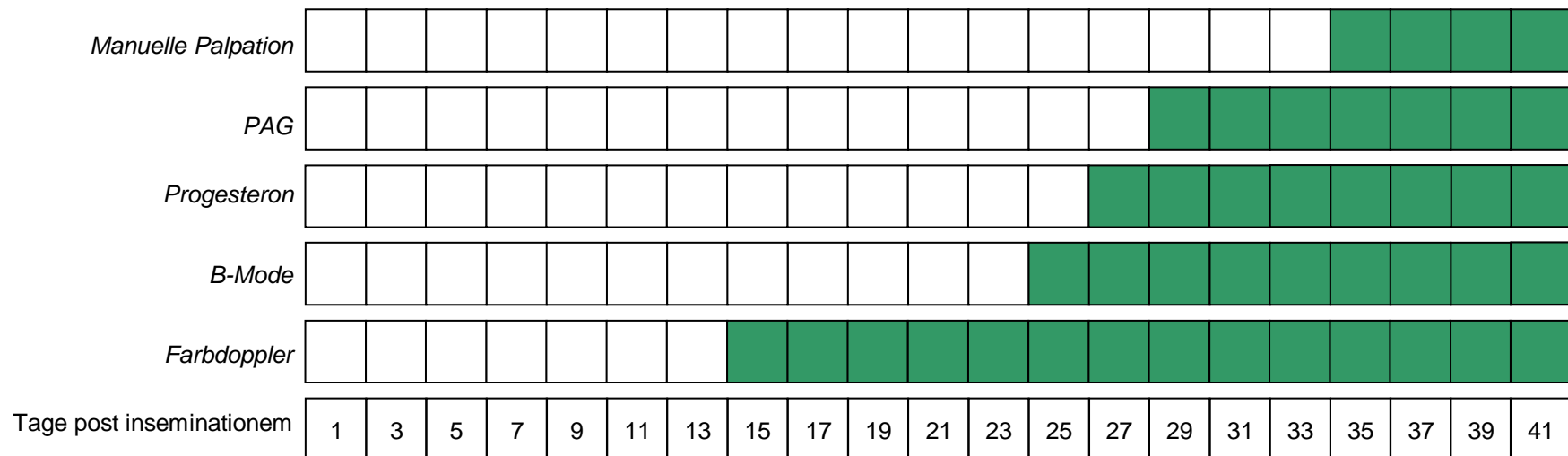


Abb. 9: Darstellung verschiedener Methoden zur Erfassung erster trchtigkeitsbedingter Veränderungen *post inseminationem* beim Rind. Tage, an denen erstmals Veränderungen nachweisbar sind, sind *grün* gekennzeichnet.

Manuelle Palpation – manueller Nachweis der Doppelwandigkeit der Uteruswand

PAG – Pregnancy Associated Glycoprotein; Nachweis von Glykoproteinen im Blut, die in den Trophoblasten-Riesenzellen der Plazenta gebildet werden;

Progesteron – Bestimmung der Progesteronkonzentration in Blut oder Milch zum Nachweis eines Trchtigkeitsgelbkrpers;

B-Mode – Brightness-Mode-Sonographie zur Darstellung des Konzeptus und des Corpus luteum;

Farbdoppler – Farbdoppler-Sonographie zur Erfassung der lutealen Durchblutung.

Die mittels Farbdoppler-Sonographie erfasste luteale Durchblutung als diagnostischer Parameter zur Feststellung einer Frühträchtigkeit hat den Nachteil einer erheblichen interindividuellen Variabilität; eine eindeutige Differenzierung zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Tieren ist dadurch zu Beginn der dritten Trächtigswoche unmöglich (Herzog et al., 2011b). Zwar ist die luteale Durchblutung bei trächtigen Kühen bereits ab dem 15. Trächtigkeitstag höher als bei besamten, nicht-trächtigen und nicht-besamten, zyklischen Kühen; die erheblichen Unterschiede in der Durchblutung zwischen verschiedenen Tieren haben aber eine mangelhafte Trennschärfe zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Kühen zur Folge, da ein für alle Tiere zutreffender Cut-off nicht anzugeben ist. Zu diesem Resultat kamen auch (Utt et al., 2009), die bei Fleischrindern einen 1,5-fachen Anstieg der lutealen Durchblutung im Rahmen eines Embryotransferprogramms zwischen den Tagen 7 und 15 nach der Brunst beobachteten. Die Autoren postulierten in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, dass die luteale Durchblutung aufgrund der höheren Dynamik im Zyklusverlauf und der drastischen Reduktion bei einer Luteolyse besser geeignet ist, nicht-trächtige Tiere zu identifizieren. Utt et al. (2009) fanden Unterschiede in der lutealen Durchblutung zwischen trächtigen Kühen und Kühen mit embryonaler Mortalität ab Tag 19 *p. insemin.* und damit zu einem vergleichbaren Zeitpunkt wie in der eigenen Studie (Herzog et al., 2011b). Zwischen Tag 15 und 17 *p. insemin.* erfolgt beim Rind die Anheftung der Blastozyste am Endometrium; anschließend dringen im Rahmen der Implantation Trophoblastzellen zwischen die Epithelzellen des Endometriums ein (Roberts et al., 1990; Mann et al., 1999; Wolf et al., 2003; Roberts et al., 2008). Ein vitaler Konzeptus produziert dabei Interferon τ ($\text{IFN}\tau$), das die uterine Prostaglandinsynthese hemmt (Thatcher et al., 1995; Thatcher et al., 2001). Der Höhepunkt der $\text{IFN}\tau$ -Produktion wird bereits vor der Implantation des Embryos um Tag 14 *p. insemin.* erreicht, um die luteale Regression zu verhindern und die Trächtigkeit aufrechtzuerhalten (Thatcher et al., 2001; Roberts et al., 2008). Die gegenüber nicht-trächtigen Tieren erhöhte luteale Durchblutung könnte mit dem Signal des Embryos im Rahmen der embryo-maternalen Kommunikation in Zusammenhang stehen (Ginther und Del Campo, 1973; Kawakami et al., 1995). Studien, die diesen Zusammenhang untersuchen, stehen bislang noch aus. Der Umstand, dass $\text{IFN}\tau$ fast ausschließlich nur intrauterin nachweisbar ist, macht derartige Untersuchungen zu einem höchst anspruchsvollen Unterfangen, das in Zukunft durch die eigene Arbeitsgruppe erarbeitet werden soll.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die luteale Durchblutung aufgrund hoher interindividueller Schwankungen keine geeignete Methode darstellt, eine Frühträchtigkeit beim Rind hinreichend sicher zu diagnostizieren. Andererseits aber steigt die luteale Durchblutung ab Tag 15 *p. insemin.* bei trächtigen Tieren stärker als bei nicht-trächtigen Kühen; die Methode ermöglicht damit eine nähere Charakterisierung physiologischer Mechanismen im Rahmen der embryo-maternalen Kommunikation.

Auch im Verlauf der späten Trächtigkeit konnte mit der Farbdoppler-Sonographie ein Einblick in die Physiologie der Trächtigkeit beim Rind gewonnen werden. Im Gegensatz zur Untersuchung der folliculären und lutealen Durchblutung ist die Messung des Blutflusses in der Arteria uterina anspruchsvoller (Bollwein et al., 1998; Bollwein et al., 2000). Nach entsprechender Einarbeitung war die eindeutige Identifikation der A. uterina sicher gewährleistet: zunächst wurde die Aorta aufgesucht und bis zum Abgang der A. iliaca interna nach caudal verfolgt. Die A. iliaca interna entlässt die nur stumpfartig ausgebildete A. umbilicalis und die A. uterina. Die A. uterina ist das wichtigste zuführende Blutgefäß zum Uterus und weist bei nicht trächtigen Rindern, die noch nicht gekalbt haben, einen Durchmesser von 2,8 bis 5,0 mm auf. Im Verlauf der Trächtigkeit steigt der Durchmesser auf ca. 1,5 cm an. Die Untersuchungsdauer pro Tier betrug für beide Aa. uterinae im Mittel 20-30 min. Obwohl Araujo und Ginther (2009) keinen Einfluss einer Sedation eines Rindes mit 14 mg Xylazin pro Tier (0,02 mg/kg KGW i.m.) auf die Durchblutung der Reproduktionsorgane beim Rind nachwiesen, war das Ziel der eigenen Studien, die Perfusionsmessungen ohne Epiduralanästhesie oder Sedation durchzuführen. Tatsächlich war diese Zeitspanne dem Tier problemlos zuzumuten und ermöglichte die Untersuchung, ohne physiologische Parameter durch Medikamente ggf. zu beeinflussen. So war ein Anstieg der uterinen Durchblutung um das 5,5-fache in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit nachweisbar (Herzog et al., 2011a). Hierbei fiel die hohe interindividuelle Varianz der uterinen Durchblutung auf. Während der letzten Untersuchung in der 39. Trächtigkeitswoche unterschieden sich die minimal und maximal gemessenen Werte um den Faktor 4,3. Auch andere Studien (Ferrell und Ford, 1980; Nishida et al., 2001; Bollwein et al., 2002; Nishida et al., 2006; Panarace et al., 2006) berichteten über vergleichbar hohe interindividuelle Schwankungen; diese sind somit eindeutig nicht methodisch bedingt. Offensichtlich beeinflusst diese hohe Variabilität jedoch die Entwicklung eines gesunden Kalbes nicht, denn alle untersuchten Tiere gebaren vitale, gesunde Kälber.

Auf der anderen Seite wird durch diese hohe Variabilität die Schwierigkeit deutlich, dieses Verfahren als standardisiertes Untersuchungsverfahren anzusehen, um zum Beispiel das Geburtsgewicht und/oder die Körpergröße des Kalbes bereits mehrere Wochen *ante partum* prognostizieren zu können. Allenfalls ließ ein besonders hoher Blutfluss auf eine Zwillingsträchtigkeit schließen. In der letzten Trächtigkeitswoche wurde – wenig überraschend - die höchste Korrelation zwischen uterinem Blutflussvolumen und Geburtsgewicht des Kalbes beobachtet.

Die intrauterine Gewichtsentwicklung der Feten ist durch paternale wie maternale genetische Einflüsse determiniert (Gregory et al., 1990; Ferrell, 1991a; b; Holland und Odde, 1992). Tatsächlich zeigte sich eine deutlichere Korrelation zwischen späterem Geburtsgewicht des Kalbes und uterinem Blutflussvolumen, während das Gewicht des Muttertieres keinen statistisch absicherbaren Einfluss hatte. Hier wird postuliert, dass durch den Fötus produzierte anti-angiogenetische Faktoren eine Rolle in der Entwicklung der plazentären Zirkulation spielen (Reynolds und Redmer, 1988; Millaway et al., 1989).

Für die Praxis bedeutet das Ergebnis dieser Studie, dass die Farbdoppler-Sonographie geeignet ist, den Anstieg der uterinen Durchblutung in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit beim Rind valide zu erfassen. Es lässt sich schlussfolgern, dass das Blutflussvolumen starke interindividuelle Unterschiede aufwies und primär durch das spätere Geburtsgewicht des Kalbes bestimmt war, während das Gewicht des Muttertieres ohne signifikanten Einfluss blieb. Ferner hatten die hohen interindividuellen Variationen keinen Einfluss auf die Vitalität des neugeborenen Kalbes.

3.3 Ausblick

In der intensiven Milchviehhaltung sind heute die korrekte Diagnose des Zyklusstandes, die zuverlässige Erkennung der Brunst mit minimalem Aufwand und die eindeutige Erfassung des Besamungserfolgs schon während der Frühträchtigkeit von zentraler Bedeutung. Die in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Studien zeigen, dass die Farbdoppler-Sonographie das gegenwärtig dafür verfügbare methodische Repertoire entscheidend erweitert. Dies betrifft insbesondere die nun vorhandene Option einer zuverlässigen Differenzierung zwischen Anbildungs- und Regressionsgelbkörper, die gegenwärtig nur mit erheblichem Aufwand möglich ist. Der technologische Fortschritt und die rapide Kostendegression werden zukünftig den Einsatz der Farbdoppler-Sonographie in der routinemäßigen Rinderpraxis ermöglichen.

Zusätzlich realisieren die Farbdoppler-Sonographie und die Echotexturanalyse die Untersuchung von Fragestellungen, die für die Zukunft der Reproduktionsmedizin besonders bedeutsam erscheinen:

1. Experimentell induzierte, systemische Entzündungsreize beeinflussen die Morphologie und sekretorische Kapazität ovarieller Funktionskörper (Studie 5). Diese Ergebnisse haben für künftige Studien weitreichende Implikationen:
 - *Wie lange ist ein negativer Effekt eines Entzündungsgeschehens im Organismus auf die ovarielle Funktion nachweisbar?* Entsprechende Untersuchungen zu Effekten einer lokalen Entzündung (Metritis) auf die Gelbkörperfunktion wurden bereits über die ersten vier Zyklen *p.p.* initiiert; die Ergebnisse demonstrieren, dass es keinen Langzeit-Effekt einer Metritis auf das CL gibt (Herzog et al., unpublished). Im ersten Zyklus *p.p.* wurde eine Beeinträchtigung der lutealen Funktion und Morphologie beobachtet, aber bereits ab dem zweiten Zyklus war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.
 - *Korreliert das Ausmaß des Entzündungsgeschehens mit der Beeinträchtigung ovarieller Funktionskörper und unterscheiden sich die Effekte in Abhängigkeit vom primären Sitz der Entzündung?* Zur Beantwortung dieser Fragestellung wird zum einen der Einfluss einer Toxinämie infolge einer Metritis auf das Corpus luteum untersucht. Zum anderen soll mit Hilfe des LPS-Entzündungsmodells geprüft werden, ob eine Mastitis oder eine Metritis ver-

gleichbare Effekte auf die Funktion und Morphologie eines Corpus luteum besitzen. Der fertilitätsmindernde Effekt von klinischen Erkrankungen in der *postpartalen* Phase ist bekannt; noch nicht geklärt ist die Frage, inwiefern graduelle Unterschiede in der Beeinträchtigung des Corpus luteum durch die verschiedenen Erkrankungen bestehen.

2. Die erweiterten Möglichkeiten einer bildgebenden Diagnostik ermöglichen darüber hinaus völlig neue Ansätze für die Charakterisierung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge bei der Implantierung von Trophoblasten im Rahmen der Frühträchtigkeit. Der Anstieg der lutealen Durchblutung bei frühträchtigen Rindern zum Zeitpunkt der embryonalen-maternalen Kommunikation demonstriert die Sensibilität dieser Methodik. Interferon τ wird von den Trophoblastenzellen des Embryos produziert (Thatcher et al., 1995) und wurde erst vor kurzem in nur sehr geringer Konzentration im Blut nachgewiesen (Oliveira et al., 2008; Bott et al., 2010). Das Potential der Farbdoppler-Sonographie soll in weiteren Studien ausgeschöpft werden, um im Zusammenhang mit diesem Indikatorprotein die Mechanismen aufzuklären, die bei der Etablierung einer Trächtigkeit eine Rolle spielen.
3. Auch der Hintergrund der gegenwärtig hohen embryonalen Mortalität kann intensiver untersucht werden. Zudem ermöglicht die Farbdoppler-sonographische Untersuchung trächtiger Kühe Hinweise auf eine Zwillingsträchtigkeit, Risikoträchtigkeit, Missbildungen des Kalbes sowie eines Large Offspring-Syndroms im Rahmen eines Embryotransferprogramms.
4. Mit der Beantwortung von Fragestellungen zum Einsatz der Echotexturanalyse auf dem Gebiet der Geburtshilfe soll die Minimierung der Totgeburtenrate initiiert werden. Im Rahmen des Geburtsmanagements wird die Erweichung der Zervix B-Mode-sonographisch und anschließend Computer-gestützt charakterisiert, um den Geburtseintritt objektiver eingrenzen zu können.

Abschließend wäre zudem die Integration von Auswertungsprogrammen sowohl zur Farbdoppler-Sonographie als auch zur Computer-gestützten Analyse der B-Mode-Bilder direkt in verfügbare Ultraschallsysteme zukunftsweisend. Die Interpretation der

erhobenen Befunde wären damit während der Untersuchung wesentlich leichter und der Einfluss der Subjektivität des Untersuchers nennenswert reduziert.

Zusammenfassend werden die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten bildgebenden Verfahren für die experimentelle Reproduktionsmedizin beim Rind – und konsekutiv die Routinepraxis – erhebliche Bedeutung erlangen.

4. Zusammenfassung

Die Diagnostik in der Reproduktionsmedizin des Rindes hat sich in den vergangenen 20 Jahren stark weiterentwickelt. Der Einsatz der B-Mode Sonographie ist mittlerweile in Großtierpraxen ein diagnostisches Standarduntersuchungsverfahren. Bis vor wenigen Jahren limitierten sowohl der Preis als auch Größe und Gewicht den routinemäßigen Einsatz in der Rindermedizin. Inzwischen existiert eine breite Auswahl an portablen, Batterie-betriebenen Geräten, die eine kontrastreiche Darstellung im B-Mode ermöglichen und teilweise bereits mit Zusatzfunktionen wie der Farbdopplerfunktion ausgestattet sind.

Durch die B-Mode-Sonographie hat sich die Diagnostik des Zyklusstadiums, der Frühträchtigkeit oder das Erkennen von pathologischen Zuständen am inneren Genitale der Kuh zwar erweitert, aber sie stößt teilweise technisch bedingt an Grenzen. Die Intention zur Durchführung dieser Arbeit bestand darin, fortschrittliche, auf der Sonographie basierende Diagnostikmethoden wie der Farbdoppler-Sonographie oder der Computer-gestützten Analyse von B-Mode Ultraschallbildern im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit beim Rind zu untersuchen.

Mit Hilfe der Farbdoppler-Sonographie gelang es, eine enge Korrelation zwischen der lutealen Durchblutung und der Plasmakonzentration des Progesterons nachzuweisen. Die relativen Veränderungen der Durchblutung entsprachen weitestgehend denen der Progesteronkonzentration. Insbesondere während der Regressionsphase erwies sich die Farbdoppler-Sonographie als geeignet, ein CL als nicht mehr funktionell aktiv zu erkennen. Ein Schwellenwert zur sicheren Kennzeichnung eines noch funktionell aktiven CL wurde ermittelt. Dabei musste die Durchblutung nur 30% ihrer Maximalwerte erreichen; die Größe des CL musste hingegen 60% der Maximalwerte erreichen, um Fehler bei der Einschätzung der Progesteronsekretion auszuschließen. Die Farbdoppler-Sonographie stellte sich somit als das sensiblere Verfahren heraus, um die sekretorische Kapazität eines Cl korrekt zu identifizieren. Für die Anwendung in der Praxis ergibt sich hieraus, dass die Farbdoppler-Sonographie immer zur Untersuchung herangezogen werden sollte, um den Funktionszustand eines Cl zu bestimmen und eigene Referenzwerte zu ermitteln.

Die Farbdoppler-Sonographie wurde ferner als Methode geprüft, um Veränderungen der ovariellen Durchblutung sowohl nach Induktion der Luteolyse als auch nach Simulation einer systemischen Entzündung zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass die Induktion der Luteolyse zu einem früheren Zeitpunkt im Diöstrus zu der Ovulation größerer und besser durchbluteter Follikel führte. Ob sich die Brunstinduktion zu einem früheren Zeitpunkt und die besser durchbluteten Follikel auf die Trächtigkeitsrate auswirken, wird in Folgestudien ermittelt. Mit Hilfe eines Entzündungsmodells konnte demonstriert werden, dass sich die luteale Durchblutung innerhalb von drei Stunden nach der Verabreichung von Lipopolysacchariden um 34% reduzierte. Wiederum verliefen die Änderungen der Durchblutung und der Progesteronkonzentration analog. Sie traten eher auf und waren stärker ausgeprägt als die durch B-Mode-Sonographie untersuchten morphologischen Veränderungen. Die systemische Verabreichung von LPS führte bei den Versuchstieren zu Symptomen der Septikämie und zu einer temporären Depression des CL in Funktion und Morphologie, hatte aber keinen Einfluss auf das CL des folgenden Zyklus.

Mit Hilfe der Computer-gestützten Auswertung von B-Mode Ultraschallbildern wurden morphologische Veränderungen des CL über den Zyklus untersucht. Durch den Einsatz dieser Methode sollte die Frage beantwortet werden, ob sowohl das Zyklusstadium eingegrenzt als auch Aussagen über die Progesteronsekretion getroffen werden können. Mit dem handelsüblichen Bildanalyseverfahren Pepe[®] gelang die Differenzierung zwischen der Anbildung eines CL und seiner Blütephase. Eine für eine Therapieeinleitung entscheidende Differenzierung der An- und Rückbildungsphase gelang mit dieser Methode nicht. Mit der Etablierung eines eigens auf das CL angepassten Analyseverfahrens (CAUS) wurden die standardisierten Gerätegrundeinstellungen zunächst kalibriert. Im nächsten Schritt wurden während der Bildauswertung Artefakte sowie Blutgefäße durch das CAUS-Programm selbständig erkannt und von der Berechnung ausgeschlossen. Durch die Untersuchung von 10 Tieren an jeweils 14 Zyklostagen bestätigte sich die Überlegenheit von CAUS im Rahmen der digitalen Analyse von B-Mode-Bildern des CL zur Diagnose des Zyklusstandes und während des Diöstrus zur Vorhersage der Plasmakonzentration des Progesterons.

Die Untersuchung von CL in der dritten Woche der Trächtigkeit mittels Farbdoppler-Sonographie zeigte eine stärkere Durchblutung der CL verglichen mit nicht-trächtigen

Tieren. Dieser Befund lässt sich als Ausdruck der embryo-maternalen Erkennung interpretieren. Aufgrund einer hohen interindividuellen Varianz der lutealen Durchblutung in dieser Frühphase der Trächtigkeit ist die Farbdoppler-Sonographie jedoch gegenwärtig nicht zur zuverlässigen Trächtigkeitsdiagnostik geeignet.

Auch während der Spätträchtigkeit erwies sich die Farbdoppler-Sonographie als wertvolle Methode zur Erweiterung der diagnostischen Optionen. Durch die regelmäßige Untersuchung der Durchblutung der Arteria uterina von 40 Tieren in der zweiten Hälfte der Gravidität wurde eine Zunahme der uterinen Durchblutung um das 5,5-fache diagnostiziert. Hierbei zeigte sich, dass bei Kühen gleicher Lebendmasse der uterine Blutfluss bei jenen Tieren höher war, die später schwerere Kälber gebären. Ob eine höhere uterine Durchblutung zur Entwicklung von Kälbern mit höherem Geburtsgewicht führte oder ob schwerere Kälber eine intensivere Blutversorgung bedingen, konnte durch diese Studie nicht hinreichend geklärt werden.

Beide in dieser Habilitationsschrift dargestellten bildgebenden Verfahren bzw. das neu etablierte Computer-gestützte Analyseverfahren haben das Spektrum diagnostischer Methoden zur Erfassung von physiologischen wie pathophysiologischen Veränderungen am Uterus und am Ovar des Rindes wesentlich erweitert.

5. Summary

Diagnostic procedures in bovine reproductive medicine have substantially improved in the last 20 years. In particular, B-Mode sonography is now used routinely in clinical veterinary practice. Although the application of sonography in bovine medicine was previously limited by the price, size, and weight of ultrasound scanners, there are now modestly priced, portable, battery-powered scanners that are appropriate for use in the field. The availability of B-mode sonography for assessing the uterus and ovaries of cattle was an extremely important advance for clinicians and researchers. It was noteworthy that this technology enabled high-resolution, non-invasive examinations to be done as often as desired. Furthermore, the introduction of colour Doppler sonography and computer-assisted image analysis of B-mode images created new, unprecedented opportunities for the use of sonography in reproductive imaging.

Since the corpus luteum (CL) is a highly vascular and metabolically active organ, it was not surprising that luteal blood flow (assessed with colour Doppler sonography) was highly correlated with plasma progesterone concentrations. It had been previously reported that, during luteal regression, plasma progesterone concentrations decreased prior to a reduction in luteal size, as determined by conventional B-mode sonography. However, with colour Doppler sonography, lower plasma progesterone concentrations were accompanied by reductions in luteal blood flow. Clearly colour Doppler sonography was superior to conventional B-mode sonography for assessing the secretory capacity of a CL.

In addition to monitoring physiologic changes during the estrous cycle, colour Doppler sonography was valuable for characterizing changes in ovarian perfusion following induction of luteolysis or a simulated systemic inflammation. Induction of luteolysis during the first follicular wave resulted in ovulation of a large follicle with high follicular blood flow. Further studies of the relationship between follicle perfusion and fertility are planned. In a model of systemic inflammation involving intravenous administration of *E. coli* lipopolysaccharides, at 12 hours after treatment, luteal blood flow and plasma progesterone concentrations had decreased by approximately 42 and 60%, respectively, despite CL size decreased only by 15%. Although this model

resulted in transient clinical symptoms of septicemia and toxemia, it was noteworthy that the CL of the following estrous cycle was not affected.

Computer-assisted image analysis was used to improve the use of ultrasonography for assessment of the CL and plasma progesterone concentrations, and ultimately for accurately predicting the stage of the estrous cycle. Although Pepe[®] (commercial image analysis software) was able to distinguish between a CL in the growing versus static phases, it could not reliably distinguish between the growing and regressing phases. Therefore, another software package (CAUS) was specifically adapted for analysing ultrasonographic images of the CL. In a series of steps, standardized settings were calibrated, and then artefacts and blood vessels were automatically recognized and excluded, and the software was validated by examination of 10 animals on 14 days during the estrous cycle. Ultimately, it was possible to accurately predict stage of cycle and plasma progesterone concentrations.

Colour Doppler sonography was used to detect increased blood flow to the CL in pregnant versus nonpregnant cattle during the third week after breeding; perhaps this difference was related to embryo-maternal communication. However, due to substantial variations among cows, luteal blood flow was not a reliable tool for early pregnancy diagnosis.

Using colour Doppler sonography to examine 40 pregnant cows, it was shown that uterine perfusion increased by 5.5 fold during the second half of pregnancy. Furthermore, in cows of similar body weight, those with greater uterine blood flow had calves with a greater birth weight, although the cause and effect of blood flow and birth weight could not be determined.

In summary, this research yielded new methods of generating and analysing ultrasonographic images which increased the use of ultrasound technology for assessing physiological and patho-physiological changes in the bovine uterus and ovary.

6. Literaturverzeichnis

Acorda, J.A., H. Yamada, S. M. Ghamsari, 1994. Evaluation of fatty infiltration of the liver in dairy-cattle through digital analysis of hepatic ultrasonograms. *Vet Radiol Ultrasound* 35, 120-123.

Acosta, T.J., Berisha, B., Ozawa, T., Sato, K., Schams, D., Miyamoto, A., 1999. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol Reprod* 61, 1419-1425.

Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Matsui, M., Miyamoto, A., 2005. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *The Journal of reproduction and development* 51, 273-280.

Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125, 759-767.

Acosta, T.J., Miyamoto, A., 2004. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal reproduction science* 82-83, 127-140.

Acosta, T.J., Miyamoto, A., Ozawa, T., Wijayagunawardane, M.P., Sato, K., 1998. Local release of steroid hormones, prostaglandin E₂, and endothelin-1 from bovine mature follicles In vitro: effects of luteinizing hormone, endothelin-1, and cytokines. *Biol Reprod* 59, 437-443.

Acosta, T.J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2002. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ (alpha) injection in the cow. *Biol Reprod* 66, 651-658.

Araujo, R.R., Ginther, O.J., 2009. Vascular perfusion of reproductive organs in pony mares and heifers during sedation with detomidine or xylazine. *Am J Vet Res* 70, 141-148.

Arbeiter, K., 1973. Sterilitätsprophylaxe - eine Möglichkeit zur Bekämpfung der Herdensterilität beim Rind. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 80, 565-568.

Aslan, S., Findik, M., Erünal-Maral, N., Kalender, H., Celebi, M., Saban, E., 2002. Comparison of various examination methods used in ovarian diagnostics in cattle. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 107, 227-230.

Azizi, S., Mohammadi, R., Mohammadpour, I., 2010. Surgical repair and management of congenital intestinal atresia in 68 calves. *Vet Surg* 39, 115-120.

Battocchio, M., Gabai, G., Mollo, A., Veronesi, M.C., Soldano, F., Bono, G., Cairoli, F., 1999. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 51, 1059-1069.

- Bekana, M., Ekman, T., Kindahl, H., 1994. Ultrasonography of the bovine postpartum uterus with retained fetal membranes. *Zentralbl Veterinarmed A* 41, 653-662.
- Bicalho, R.C., Galvao, K.N., Guard, C.L., Santos, J.E., 2008. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology* 70, 199-207.
- Bleck, J.S., 1998. Parametrischer Ultraschall in der Inneren Medizin am Beispiel der Leber., Medizinische Hochschule Hannover Hannover.
- Bleck, J.S., Gebel, M., Manns, M.P., 2000. Quantitative Sonographie - Bedeutung und Perspektive. *Internist (Berl)* 41, 10-16.
- Bobé, G., Amin, V.R., Hippen, A.R., She, P., Young, J.W., Beitz, D.C., 2008. Non-invasive detection of fatty liver in dairy cows by digital analyses of hepatic ultrasonograms. *The Journal of dairy research* 75, 84-89.
- Bobé, G., Young, J.W., Beitz, D.C., 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of dairy science* 87, 3105-3124.
- Bollwein, H., Baumgartner, U., Stolla, R., 2002. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. *Theriogenology* 57, 2053-2061.
- Bollwein, H., Maierl, J., Mayer, R., Stolla, R., 1998. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterina in cyclic mares. *Theriogenology* 49, 1483-1488.
- Bollwein, H., Meyer, H.H., Maierl, J., Weber, F., Baumgartner, U., Stolla, R., 2000. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow. *Theriogenology* 53, 1541-1552.
- Bollwein, H., Prost, D., Ulbrich, S.E., Niemann, H., Honnens, A., 2010. Effects of a shortened preovulatory follicular phase on genital blood flow and endometrial hormone receptor concentrations in Holstein-Friesian cows. *Theriogenology* 73, 242-249.
- Bott, R.C., Ashley, R.L., Henkes, L.E., Antoniazzi, A.Q., Bruemmer, J.E., Niswender, G.D., Bazer, F.W., Spencer, T.E., Smirnova, N.P., Anthony, R.V., Hansen, T.R., 2010. Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biol Reprod* 82, 725-735.
- Brenner, J., Orgad, U., 2003. Epidemiological investigations of an outbreak of intestinal atresia in two Israeli dairy herds. *J Vet Med Sci* 65, 141-143.
- Bude, R.O., Rubin, J.M., Adler, R.S., 1994. Power versus conventional color Doppler sonography: comparison in the depiction of normal intrarenal vasculature. *Radiology* 192, 777-780.
- Chang, R.F., Wu, W.J., Moon, W.K., Chen, D.R., 2003. Improvement in breast tumor discrimination by support vector machines and speckle-emphasis texture analysis. *Ultrasound Med Biol* 29, 679-686.

- Chebel, R.C., Santos, J.E., Cerri, R.L., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G., 2006. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *Journal of dairy science* 89, 4205-4219.
- Constable, P.D., Rings, D.M., Hull, B.L., Hoffsis, G.F., Robertson, J.T., 1989. Atresia coli in calves: 26 cases (1977-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195, 118-123.
- Curran, S., Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1986a. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189, 1289-1294.
- Curran, S., Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1986b. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189, 1295-1302.
- Day, J.D., Weaver, L.D., Franti, C.E., 1995. Twin pregnancy diagnosis in Holstein cows: discriminatory powers and accuracy of diagnosis by transrectal palpation and outcome of twin pregnancies. *Can Vet J* 36, 93-97.
- Delorme, S., Zuna, I., 1995. Quantitative Auswerteverfahren in der B-Bild- und Farbdopplersonographie. *Ultraschall Klin Prax* 10, 50-61.
- Dickey, R.P., 1997. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 3, 467-503.
- Dudwiesus, H., 1995. Physikalische Grundlagen., In: Sohn, C. (Ed.), *Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe*, Thieme, Stuttgart, New York, pp. 1-68.
- Dudwiesus, H., Krieg, R., Schmidt, K.J., 1993. Physikalische Grundlagen und Technik., In: Sohn, C., Stolz, W., Bastert, G. (Ed.), *Dopplersonographie in der Gynäkologie und Geburtshilfe.*, Thieme, Stuttgart, New York, pp. 1-10.
- El-Wishy, A.B., Ghoneim, I. M., 1995. Ovarian function in Buffalo cows with special reference to the accuracy of rectal palpation. *Reproduction Domestic Animal* 30, 39-41.
- Farin, P.W., Estill, C.T., 1993. Infertility due to abnormalities of the ovaries in cattle. *The Veterinary clinics of North America* 9, 291-308.
- Ferrell, C.L., 1991a. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *Journal of animal science* 69, 1945-1953.
- Ferrell, C.L., 1991b. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: II. Blood flow and nutrient flux. *Journal of animal science* 69, 1954-1965.
- Ferrell, C.L., Ford, S.P., 1980. Blood flow steroid secretion and nutrient uptake of the gravid bovine uterus. *Journal of animal science* 50, 1113-1121.

Ford, S.P., 1982. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cows. *J Anim Sci* 55 Suppl 2, 32-42.

Ford, S.P., Chenault, J.R., Echterkamp, S.E., 1979a. Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. *J Reprod Fertil* 56, 53-62.

Ford, S.P., Christenson, R.K., Chenault, J.R., 1979b. Patterns of blood flow to the uterus and ovaries of ewes during the period of luteal regression. *Journal of animal science* 49, 1510-1516.

Garra, B.S., Insana, F. M., Shawker, T.H. and M. A. Russell,, Normal, Q.e.o.a.a.e., state versus diffuse liver disease, *R.*, vol. 162, no. 1,, pp. 61-67, J., 1987a. Quantitative estimation of attenuation and echogenicity: Normal state versus diffuse liver disease *Radiology* 162, 61-67.

Garra, B.S., Shawker, T.H., Doppman, J.L., Sindelar, W.F., 1987b. Comparison of angiography and ultrasound in the evaluation of the portal venous system in pancreatic carcinoma. *J Clin Ultrasound* 15, 83-93.

Gertsch, U., 1997. Bildanalytische Untersuchungen zur Bestimmung der Ödematisierung des Uterus bei der Stute. Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Bern.

Ginther, O.J., 1995. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals, Book 1. Equiservices Publishing, Wisconsin, USA.

Ginther, O.J., Del Campo, C.H., 1973. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: areas of close apposition between the ovarian artery and vessels which contain uterine venous blood in sheep. *Am J Vet Res* 34, 1387-1393.

Ginther, O.J., Pierson, R.A., 1984. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology* 21, 505-516.

Götze, R., 1940. Die Feststellung der Schwangerschaft beim Rinde. *Deutsch Tierärztl Wochschr* 48, 183-185.

Gregory, K.E., Echterkamp, S.E., Dickerson, G.E., Cundiff, L.V., Koch, R.M., Van Vleck, L.D., 1990. Twinning in cattle: III. Effects of twinning on dystocia, reproductive traits, calf survival, calf growth and cow productivity. *Journal of animal science* 68, 3133-3144.

Grunert, E.u.A., K., 1993. Das normale Puerperium., In: Grunert, E., Götze, R. (Ed.), *Tiergeburtshilfe*, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, pp. 105-108.

Guay, P., Bedoya, M., 1981. A study of the equivalence between rectal palpation, laparoscopy, laparotomy and ovarian dissection for evaluation of the ovarian response of PMSG-superovulated cows. *Can Vet J* 22, 353-355.

- Haberkorn, U., Layer, G., Zuna, I., Gebraemlack, T., van Kaick, G., , 1991. Der Einfluss unterschiedlicher Fettvorlaufstrecken auf das Ultraschall-B-Bild. *Ultraschall Klein. Prax* 6, 21-25.
- Hafs, H., Armstrong, D., 1968. Corpus luteum growth and progesterone synthesis during the bovine estrous cycle. *Journal of animal science* 27, 134-141.
- Hanzen, C., Pieterse, M., Scenczi, O., Drost, M., 2000a. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Veterinary Journal* 159, 161-170.
- Hanzen, C., Pieterse, M., Scenczi, O., Drost, M., 2000b. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Vet J* 159, 161-170.
- Hermes, R., Hildebrandt, T.B., Göritz, F., Lengwinat, T., Jewgenow, K., Hofmann, R.R., 1997. Sonographie der Trächtigkeit beim Europäischen Reh (*Capreolus capreolus*) - Diapause,
- Embryonal- und Fetalentwicklung, Embryonale Resorptionen. *Verh Ber Erkrgr Zootiere* 38, 169-173.
- Herzog, K., Brockhan-Ludemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H., 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 73, 691-697.
- Herzog, K., Kiossis, E., Bollwein, H., 2008. Examination of cyclic changes in bovine luteal echotexture using computer-assisted statistical pattern recognition techniques. *Animal reproduction science* 106, 289-297.
- Herzog, K., Koerte, J., Flachowsky, G., Bollwein, H., 2011a. Variability of uterine blood flow in lactating cows during the second half of gestation. *Theriogenology* 75, 1688-1694.
- Herzog, K., Voss, C., Kastelic, J.P., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H., 2011b. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology* 75, 549-554.
- Holland, M.D., Odde, K.G., 1992. Factors affecting calf birth weight: a review. *Theriogenology* 38, 769-798.
- Honnens, A., Voss, C., Herzog, K., Niemann, H., Rath, D., Bollwein, H., 2008. Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. *Theriogenology* 70, 1048-1056.
- Huber, S., Medl, M., Vesely, M., Czembirek, H., Zuna, I., Delorme, S., 2000. Ultrasonographic tissue characterization in monitoring tumor response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer (work in progress). *J Ultrasound Med* 19, 677-686.

Huber, T., Luscher, T.F., 1994. [Physiologic and pathophysiologic functions of nitric oxide in circulation]. *Med. Klin. (Munich)* 89 Suppl 2, 2-5.

Humblot, P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56, 1417-1433.

Hussein, F.M., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E., Younis, M.Y., 1992. Comparison of ovarian palpation, milk progesterone and plasma progesterone in the cow. *Theriogenology* 38, 431-439.

Johnson, R., 1986. Intestinal atresia and stenosis: a review comparing its etiopathogenesis. *Vet Res Commun* 10, 95-104.

Jordan, A., Herzog, K., Ulbrich, S.E., Beindorff, N., Honnens, A., Kruger, L., Miyamoto, A., Bollwein, H., 2009. Genital blood flow and endometrial gene expression during the preovulatory period after Prostaglandin F(2alpha)-induced luteolysis in different luteal phases in cows. *The Journal of reproduction and development* 55, 309-315.

Jovanovic, A., Grbovic, L., Tulic, I., 1994. Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by acetylcholine in human uterine artery. *Human reproduction (Oxford, England)* 9, 387-393.

Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1990. Relationship between ultrasonic assesment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33, 1269-1278.

Kastelic, J.P., Curran, S., Ginther, O.J., 1989. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology* 31, 813-820.

Kawakami, S., Shida, T., Mutoh, M., Kohmoto, H., Onhchi, T., 1995. Relation between luteal regression and so-called counter current mechanisms in the cow: Verification from PGF2alpha concentrations in arterial, uterine venous and jugular venous blood following PGF2alpha loading. *Journal of Reproduction and Development* 49, 219-224.

Kelton, D.F., Leslie, K.E., Etherington, W.G., Bonnett, B.N., Walton, J.S., 1991. Accuracy of rectal palpation and of a rapid milk progesterone enzyme-immunoassay for determining the presence of a functional corpus luteum in subestrus dairy cows. *Can Vet J* 32, 286-291.

Killam, A.P., Rosenfeld, C.R., Battaglia, F.C., Makowski, E.L., Meschia, G., 1973. Effect of estrogens on the uterine blood flow of oophorectomized ewes. *Am J Obstet Gynecol* 115, 1045-1052.

Kimura, T., Okamura, T., Yoshida, Y., Toda, N., 1995. Relaxant responses to prostaglandin F2 alpha and E2 of isolated human uterine arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology* 26, 333-338.

- Krueger, L., Koerte, J., Tsousis, G., Herzog, K., Flachowsky, G., Bollwein, H., 2009. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Animal reproduction science* 114, 23-31.
- Krzymowski, T., Stefanczyk-Krzymowska, S., 2004. The oestrous cycle and early pregnancy--a new concept of local endocrine regulation. *Vet J* 168, 285-296.
- Lamming, G.E., Darwash, A.O., 1998. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Animal reproduction science* 52, 175-190.
- Lenz, M., Drillich, M., Heuwieser, W., 2007. [Evaluation of the diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle using ultrasound]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120, 237-244.
- Levy, N., Kobayashi, S., Roth, Z., Wolfenson, D., Miyamoto, A., Meidan, R., 2000. Administration of prostaglandin f(2 alpha) during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod* 63, 377-382.
- Lopes, G., Rocha, A., 2006. Teaching bovine rectal palpation with live cows in the slaughterhouse: is it worthwhile? *Reprod Domest Anim* 41, 510-513.
- Lopez, H., Satter, L.D., Wiltbank, M.C., 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal reproduction science* 81, 209-223.
- Lucy, M.C., Savio, J.D., Badinga, L., De La Sota, R.L., Thatcher, W.W., 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of animal science* 70, 3615-3626.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S., Wathes, D.C., 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of reproduction and fertility* 54, 317-328.
- Matsumoto, T., Kanamaru, K., Sugiyama, Y., Murata, Y., 1992. Endothelium-derived relaxation of the pregnant and nonpregnant canine uterine artery. *J Reprod Med* 37, 529-533.
- Maulik, D., 1997. Spectral Doppler: Basic Principles and Instrumentation, In: Maulik, D. (Ed.), *Doppler Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.*, Springer, New York, pp. 21-42.
- Meyer-Scheel, T., 2005. Spezielle gynäkosonographische Befunde an Ovarien, Uterus und Cervix uteri und deren Beziehung zum Ovulationstermin bei der Warmblutstute., *Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.*
- Millaway, D.S., Redmer, D.A., Kirsch, J.D., Anthony, R.V., Reynolds, L.P., 1989. Angiogenic activity of maternal and fetal placental tissues of ewes throughout gestation. *J Reprod Fertil* 86, 689-696.

- Miyamoto, A., Shirasuna, K., Hayashi, K.G., Kamada, D., Awashima, C., Kaneko, E., Acosta, T.J., Matsui, M., 2006. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *The Journal of reproduction and development* 52, 153-160.
- Miyamoto, A., Shirasuna, K., Wijayagunawardane, M.P., Watanabe, S., Hayashi, M., Yamamoto, D., Matsui, M., Acosta, T.J., 2005. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domestic animal endocrinology* 29, 329-339.
- Naden, R.P., Rosenfeld, C.R., 1985. Role of alpha-receptors in estrogen-induced vasodilation in nonpregnant sheep. *Am J Physiol* 248, H339-344.
- Nishida, T., Ando, S., Islam, M.R., Nagao, Y., Ishida, M., 2001. Establishment of a simple method for measurement of chronic blood flow in uterine artery of pregnant cows. *Journal of dairy science* 84, 1621-1626.
- Nishida, T., Hosoda, K., Matsuyama, H., Ishida, M., 2006. Collateral uterine blood flow in Holstein cows during the third trimester of pregnancy. *The Journal of reproduction and development* 52, 663-668.
- Odde, K.G., Ward, H.S., Kiracofe, G.H., McKee, R.M., Kittok, R.J., 1980. Short estrous cycles and associated serum progesterone levels in beef cows. *Theriogenology* 14, 105-112.
- Ohtani, M., Kobayashi, S., Miyamoto, A., Hayashi, K., Fukui, Y., 1998. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandin F₂α-induced luteolysis in the cow. *Biol Reprod* 58, 103-108.
- Okano, A., Tomizuka, T., 1987. Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology* 27, 369-376.
- Oliveira, J.F., Henkes, L.E., Ashley, R.L., Purcell, S.H., Smirnova, N.P., Veeramachaneni, D.N., Anthony, R.V., Hansen, T.R., 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology* 149, 1252-1259.
- Panarace, M., Garnil, C., Marfil, M., Jauregui, G., Lagioia, J., Luther, E., Medina, M., 2006. Transrectal Doppler sonography for evaluation of uterine blood flow throughout pregnancy in 13 cows. *Theriogenology* 66, 2113-2119.
- Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21, 495-504.
- Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 190, 995-1001.

Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1988. Ultrasonic Imaging of the Ovaries and Uterus in Cattle. *Theriogenology* 29, 21-37.

Pieterse, M.C., Taverne, M.A., Kruij, T.A., Willemse, A.H., 1990. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Veterinary Record* 126, 552-554.

Quirk, S.M., Hickey, G.J., Fortune, J.E., 1986. Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrous cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF-2 alpha-induced luteolysis. *J Reprod Fertil* 77, 211-219.

Raeth, U., Schlaps, D., Limberg, B., Zuna, I., Lorenz, A., van Kaick, G., Lorenz, W.J., Kommerell, B., 1985. Diagnostic accuracy of computerized B-scan texture analysis and conventional ultrasonography in diffuse parenchymal and malignant liver disease. *J Clin Ultrasound* 13, 87-99.

Reynolds, L.P., Magness, R.R., Ford, S.P., 1984. Uterine blood flow during early pregnancy in ewes: interaction between the conceptus and the ovary bearing the corpus luteum. *Journal of animal science* 58, 423-429.

Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 1988. Secretion of angiogenic activity by placental tissues of cows at several stages of gestation. *J Reprod Fertil* 83, 497-502.

Ribadu, A.Y., Ward, W.R., Dobson, H., 1994. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Veterinary Record* 135, 452-457.

Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Stumpf, T.T., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1989. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod* 41, 997-1003.

Roberts, R.M., Chen, Y., Ezashi, T., Walker, A.M., 2008. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 19, 170-177.

Roberts, R.M., Farin, C.E., Cross, J.C., 1990. Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. *Oxf Rev Reprod Biol* 12, 147-180.

Romano, J.E., Thompson, J.A., Forrest, D.W., Westhusin, M.E., Tomaszewski, M.A., Kraemer, D.C., 2006. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology* 66, 1034-1041.

Romano, J.E., Thompson, J.A., Kraemer, D.C., Westhusin, M.E., Forrest, D.W., Tomaszewski, M.A., 2007. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology* 67, 486-493.

Romano, J.E., Thompson, J.A., Kraemer, D.C., Westhusin, M.E., Tomaszewski, M.A., Forrest, D.W., 2011. Effects of early pregnancy diagnosis by palpation per rectum on pregnancy loss in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 239, 668-673.

Saha, P.R., Alsip, N.L., Henzel, M.K., Asher, E.F., 1998. Role of nitric oxide and cyclooxygenase products in controlling vascular tone in uterine microvessels of rats. *J Reprod Fertil* 112, 211-216.

Sangsritavong, S., Combs, D.K., Sartori, R., Armentano, L.E., Wiltbank, M.C., 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *Journal of dairy science* 85, 2831-2842.

Sartori, R., Haughian, J.M., Shaver, R.D., Rosa, G.J., Wiltbank, M.C., 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of dairy science* 87, 905-920.

Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., Roche, J.F., 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 83, 663-671.

Schmauder, S., 2003. Zyklus- und entzündungsbedingte Veränderungen der endometrialen Echostruktur beim Rind unter Berücksichtigung der Stickstoffmonoxid-Synthase-Expression., Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilian-Universität, München.

Scholbach, T., Dimos, I., Scholbach, J., 2004a. A new method of color Doppler perfusion measurement via dynamic sonographic signal quantification in renal parenchyma. *Nephron Physiol* 96, p99-104.

Scholbach, T., Herrero, I., Scholbach, J., 2004b. Dynamic color Doppler sonography of intestinal wall in patients with Crohn disease compared with healthy subjects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39, 524-528.

Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.

Shelton, K., Gayerie De Abreu, M.F., Hunter, M.G., Parkinson, T.J., Lamming, G.E., 1990. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J Reprod Fertil* 90, 1-10.

Short, R.V., 1967. The synthesis and secretion of steroids by the corpus luteum. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 56, 258-272.

Siddiqui, M.A., Almamun, M., Ginther, O.J., 2009. Blood flow in the wall of the pre-ovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Animal reproduction science* 113, 287-292.

Silva, L.A., Gastal, E.L., Beg, M.A., Ginther, O.J., 2005. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. *Biol Reprod* 72, 755-761.

Singh, J., Pierson, R.A., Adams, G.P., 1997. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J Reprod Fertil* 109, 35-44.

- Sprecher, D.J., Nebel, R.L., Whitman, S.S., 1989. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. *Theriogenology* 31, 1165-1172.
- Starke, A., Haudum, A., Weijers, G., Herzog, K., Wohlsein, P., Beyerbach, M., de Korte, C.L., Thijssen, J.M., Rehage, J., 2010. Noninvasive detection of hepatic lipodosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. *Journal of dairy science* 93, 2952-2965.
- Szenci, O., Beckers, J.F., Humblot, P., Sulon, J., Sasser, G., Taverne, M.A., Varga, J., Baltussen, R., Schekk, G., 1998a. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology* 50, 77-88.
- Szenci, O., Gyulai, G., Nagy, P., Kovacs, L., Varga, J., Taverne, M.A., 1995. Effect of uterus position relative to the pelvic inlet on the accuracy of early bovine pregnancy diagnosis by means of ultrasonography. *Vet Q* 17, 37-39.
- Szenci, O., Taverne, M.A., Beckers, J.F., Sulon, J., Varga, J., Borzsonyi, L., Hanzen, C., Schekk, G., 1998b. Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine pregnancy-associated glycoprotein 1. *The Veterinary record* 142, 304-306.
- Taverne, M.A., Szenci, O., Szetag, J., Piros, A., 1985. Pregnancy diagnosis in cows with linear-array real-time ultrasound scanning: a preliminary note. *Vet Q* 7, 264-270.
- Thatcher, W.W., Meyer, M.D., Danet-Desnoyers, G., 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of reproduction and fertility* 49, 15-28.
- Thatcher, W.W., Moreira, F., Santos, J.E., Mattos, R.C., Lopes, F.L., Pancarci, S.M., Risco, C.A., 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55, 75-89.
- Thijssen, J.M., 2000. Spectroscopy and image texture analysis. *Ultrasound Med Biol* 26 Suppl 1, S41-44.
- Thijssen, J.M., Herzog, K., Weijers, G., Brockhan-Luedemann, M., Starke, A., Niemann, H., Bollwein, H., de Korte, C.L., 2011. Ultrasound image analysis offers the opportunity to predict plasma progesterone concentrations in the estrous cycle in cows: a feasibility study. *Animal reproduction science* 127, 7-15.
- Thijssen, J.M., Starke, A., Weijers, G., Haudum, A., Herzog, K., Wohlsein, P., Rehage, J., De Korte, C.L., 2008. Computer-aided B-mode ultrasound diagnosis of hepatic steatosis: a feasibility study. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 55, 1343-1354.
- Tom, J.W., Pierson, R.A., Adams, G.P., 1998. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology* 49, 1345-1352.

- Utt, M.D., Johnson, G.L., 3rd, Beal, W.E., 2009. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology* 71, 707-715.
- Valckx, F.M., Thijssen, J.M., van Geemen, A.J., Rotteveel, J.J., Mullaart, R., 2000. Calibrated parametric medical ultrasound imaging. *Ultrason Imaging* 22, 57-72.
- Valckx, F.M., Thijssen, J.M., 1997. Characterization of echographic image texture by cooccurrence matrix parameters. *Ultrasound Med Biol* 23, 559-571.
- Van Cleeff, J., Drost, M., Thatcher, W.W., 1991. Effects of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous responses of dairy heifers. *Theriogenology* 36, 795-807.
- van der Weijden, G.C.u.T., M., 1999. Trächtigkeitsuntersuchung, In: Grunert, E., de Kruif, A. (Ed.), *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind.*, Paul Parey Verlag, Berlin, pp. 78-92.
- Varga, B., Horvath, E., Folly, G., Stark, E., 1985. Study of the luteinizing hormone-induced increase of ovarian blood flow during the estrous cycle in the rat. *Biol Reprod* 32, 480-488.
- Veronesi, M.C., Gabai, G., Battocchio, M., Mollo, A., Soldano, F., Bono, G., Cairoli, F., 2002. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. *Theriogenology* 58, 61-68.
- Weijers, G., Starke, A., Haudum, A., Thijssen, J.M., Rehage, J., De Korte, C.L., 2010. Interactive vs. automatic ultrasound image segmentation methods for staging hepatic lipidosis. *Ultrason Imaging* 32, 143-153.
- Williams, E.J., Fischer, D.P., Noakes, D.E., England, G.C., Rycroft, A., Dobson, H., Sheldon, I.M., 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68, 549-559.
- Williams, E.J., Sibley, K., Miller, A.N., Lane, E.A., Fishwick, J., Nash, D.M., Herath, S., England, G.C., Dobson, H., Sheldon, I.M., 2008. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *Am J Reprod Immunol* 60, 462-473.
- Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S., Gumen, A., 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17-29.
- Wiltbank, M.C., Dysko, R.C., Gallagher, K.P., Keyes, P.L., 1988. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit Corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 84, 513-520.
- Wittrock, J.M., Proudfoot, K.L., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A., 2011. Short communication: Metritis affects milk production and cull rate of Holstein multiparous and primiparous dairy cows differently. *Journal of dairy science* 94, 2408-2412.

Wolf, E., Arnold, G.J., Bauersachs, S., Beier, H.M., Blum, H., Einspanier, R., Frohlich, T., Herrler, A., Hiendleder, S., Kolle, S., Prella, K., Reichenbach, H.D., Stojkovic, M., Wenigerkind, H., Sinowatz, F., 2003. Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod Domest Anim* 38, 276-289.

Wolfenson, D., Sonogo, H., Shaham-Albalancy, A., Shpirer, Y., Meidan, R., 1999. Comparison of the steroidogenic capacity of bovine follicular and luteal cells, and corpora lutea originating from dominant follicles of the first or second follicular wave. *Journal of Reproduction and Fertility* 117, 241-247.

Yaniz, J., Santolaria, P., Lopez-Gatius, F., 2002. Surface alterations in the bovine pelvic peritoneum following rectal examination of reproductive organs: a scanning electron microscopy study. *Anat Histol Embryol* 31, 372-374.

Zink, C., 1996. *Ultraschall Lexikon*, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin-Wien.

Zuna, I., 1991. Aktueller Stand der sonographischen Gewebeklassifizierung., In: Günther, R.W., Gockel, P. (Eds.), *Jahrbuch der Radiologie.*, Verlag Biermann, Zül-pich, pp. 135-144.

7. Darstellung des eigenen Anteils an den wissenschaftlichen Arbeiten

Der Anteil der beteiligten Autorinnen und Autoren an den Publikationen 1 - 7 wird nach folgenden Kriterien aufgeführt:

1. Idee, Versuchsplanung
2. Versuchsdurchführung
3. Auswertung der Ergebnisse
4. Erstellen des Manuskriptes

Publikation 1:

Herzog, K., M. Brockhan-Lüdemann, M. Kaske, N. Beindorff, V. Paul, H. Niemann, H. Bollwein (2009):

Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size.

Theriogenology 73, 691-7.

Folgende Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, D30173 Hannover, Germany

Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich Loeffler Institute (FLI), Hoeltystrasse 10, Mariensee, D - 31535 Neustadt, Germany

Physiology Weihenstephan, Technische Universitaet Muenchen, Weihenstephaner Berg 3, D - 85354 Freising, Germany

1. Idee, Versuchsplanung: Herzog, Bollwein
2. Versuchsdurchführung: Brockhan-Lüdemann, Herzog, Beindorff, Paul
3. Auswertung der Ergebnisse: Herzog, Kaske
4. Erstellen des Manuskriptes: Herzog, Kaske, Niemann, Bollwein
5. Korrespondierender Autor: Herzog

Publikation 2:

Herzog, K., E. Kiossis, H. Bollwein (2008):

Examination of cyclic changes in bovine luteal echotexture using computer-assisted statistical pattern recognition techniques.

Animal Reproduction Science 106, 289-297.

Folgende Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, D30173 Hannover, Germany

Clinic for Obstetrics and AI, School of Veterinary Medicine, Aristotelian University Thessaloniki, Greece

1. Idee, Versuchsplanung: Bollwein, Kiossis
2. Versuchsdurchführung: Kiossis, Bollwein
3. Auswertung der Ergebnisse: Kiossis, Bollwein, Herzog
4. Erstellen des Manuskriptes: Herzog, Bollwein
5. Korrespondierender Autor: Herzog

Publikation 3:

Thijssen, J.M., K. Herzog, G. Weijers, M. Brockhan-Luedemann, A. Starke, H. Niemann, H. Bollwein, C. L. de Korte (2011):

Plasma progesterone concentration predicted by quantitative ultrasound during luteal phase in the estrous cycle in cows: a feasibility study.

Animal Reproduction Science 127,7-15.

Folgende Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

Clinical Physics Laboratory, Radboud University Medical Centre, P.O. Box 9101, 6500HB Nijmegen, the Netherlands

Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-30173, Hannover,

Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich Loeffler Institut (FLI), Hoeltystrasse 10, Mariensee, D - 31535 Neustadt, Germany

1. Idee, Versuchsplanung: Herzog, Bollwein
2. Versuchsdurchführung: Brockhan-Lüdemann, Herzog, Weijers
3. Auswertung der Ergebnisse: Thijssen, Herzog, Weijers, de Korte
4. Erstellen des Manuskriptes: Thijssen, Herzog, Starke, Bollwein, Niemann
5. Korrespondierender Autor: Thijssen

Publikation 4:

Jordan, A. K. Herzog, S. E. Ulbrich, N. Beindorff, Ä. Honnens, L. Krüger, A. Miyamoto, H. Bollwein (2009):

Blood flow and endometrial gene expression during the preovulatory period after Prostaglandin F_{2α}-induced luteolysis in different luteal phases in cows.

Journal of Reproduction and Development 55, 309-315.

Folgende Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hannover

Physiology-Weihenstephan, Technical University of Munich

Graduate School of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

1. Idee, Versuchsplanung: Herzog, Bollwein
2. Versuchsdurchführung: Jordan, Herzog, Ulbrich, Beindorff, Krüger, Honnens
3. Auswertung der Ergebnisse: Herzog, Bollwein
4. Erstellen des Manuskriptes: Herzog, Jordan, Bollwein, Miyamoto
5. Korrespondierender Autor: Herzog

Publikation 5:

Herzog, K., K. Strueve, J.P. Kastelic, M. Piechotta, S.E. Ulbrich, C. Pfarrer, T. Shimizu, A. Miyamoto, K. Shirasuna, H. Bollwein:

E. coli lipopolysaccharide transiently suppresses luteal function in diestrus cows.

Submitted for publication in *Reproduction*.

Folgende Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-30173, Hannover,

Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre, Lethbridge, AB, Canada

Physiology-Weihenstephan, Technical University of Munich, Freising, Germany

Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

Graduate School of Animal and Food hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan

1. Idee, Versuchsplanung: Herzog, Bollwein
2. Versuchsdurchführung: Strueve, Herzog, Piechotta, Pfarrer, Shirasuna
3. Auswertung der Ergebnisse: Herzog, Strueve, Kastelic
4. Erstellen des Manuskriptes: Herzog, Kastelic, Piechotta, Pfarrer, Shirasuna
5. Korrespondierender Autor: Herzog

Publikation 6:

Herzog, K., C. Voss, J.P. Kastelic, N. Beindorff, V. Paul, H. Niemann, H. Bollwein (2011):

Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows.

Theriogenology 75, 549-54.

Folgende Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, D30173 Hannover, Germany

Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich Loeffler Institut (FLI), Hoeltystrasse 10, Mariensee, D - 31535 Neustadt, Germany

Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre, Lethbridge, AB, Canada

Physiology Weihenstephan, Technische Universitaet Muenchen, Weihenstephaner Berg 3, D - 85354 Freising, Germany

1. Idee, Versuchsplanung: Herzog, Bollwein
2. Versuchsdurchführung: Voss, Herzog, Beindorff, Paul
3. Auswertung der Ergebnisse: Herzog, Kastelic, Bollwein
4. Erstellen des Manuskriptes: Herzog, Kastelic, Bollwein
5. Korrespondierender Autor: Herzog

Publikation 7:

Herzog, K., J. Körte, G. Flachowsky, H. Bollwein (2011):
Uterine blood flow during the second half of pregnancy in cows.
Theriogenology 75, 1688-94.

Folgende Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine, Bischofsholer Damm 15, 30173
Hanover

Institute of Animal Nutrition, Friedrich-Loeffler-Institute (FLI), Federal Research Institute for Animal Health, Bundesallee 50, Braunschweig, Germany

1. Idee, Versuchsplanung: Bollwein, Herzog, Flachowsky
2. Versuchsdurchführung: Körte, Herzog
3. Auswertung der Ergebnisse: Körte, Bollwein, Herzog
4. Erstellen des Manuskriptes: Herzog, Bollwein, Körte
5. Korrespondierender Autor: Herzog

8. Anhang

Im Kontext mit dieser Habilitationsschrift sind folgende Publikationen weiterhin relevant:

1. Herzog, K., Bollwein, H. (2007): Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction – a review. *Reproduction in Domestic Animals* 42 (Suppl 2), 51-58.
2. Tsousis, G., Herzog, K., Bitter, J., Krüger, L., Bollwein, H. (2008): Sonographische Beurteilung des Uterus bei Holstein-Friesian Kühen ohne und mit Puerperalstörungen in den ersten 14 Tagen post partum. *Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 121, 78-85.
3. Honnens, Ä., Voss, C., Herzog, K., Niemann, H., Rath, D., Bollwein, H. (2008): Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. *Theriogenology* 70, 1048-1056.
4. Krüger, L., Körte, J., Tsousis, G., Herzog, K., Flachowsky, G., Bollwein, H. (2009): Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Animal Reproduction Science* 114, 23-31.
5. Honnens, Ä., Niemann, H., Herzog, K., Haderler, K.G., Bollwein, H. (2009): Relationships between ovarian blood flow and response to eCG-treatment of dairy cows *Animal Reproduction Science* 115, 1-10.
6. Beindorff, N., Nagai, K., Shirasuna, K., Herzog, K., Hoeffmann, K., Sasaki, M., Bollwein, H., Miyamoto, A. (2010): Vascular Changes in the Corpus Luteum during early pregnancy in the cow. *Journal of Reproduction and Development* 56, 263-70.
7. Lüttgenau J, Ulbrich SE, Beindorff N, Honnens A, Herzog K, Bollwein H. (2011): Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 125, 20-9.

