

ELK Maija Asmundela

KOHTU NAUDAN KIIMAKIERRON SÄÄTELYSSÄ

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto

Kotieläinten lisääntyminen

2010



Tiedekunta - Fakultet - Faculty		Osasto - Avdelning - Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author			
ELK Majja Asmundela			
Työn nimi - Arbetets titel - Title			
Kohtu naudan kiimakierron säätelyssä			
Oppiaine - Läroämne - Subject			
Kotieläinten lisääntyminen			
Työn laji - Arbetets art - Level		Aika - Datum - Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma		toukokuu 2010	44
Tiivistelmä - Referat - Abstract			
<p>Kohdun endometriumiin syntetisoituu keltarauhasvaiheen loppupuolella oksitosiinireseptoreita, joihin sitoutuva oksitosiini aiheuttaa prostaglandiini $F_{2\alpha}$:n ($PGF_{2\alpha}$) erittymisen ja luteolyysin. Kohdun vaste oksitosiinille riippuu oksitosiinireseptorien määrästä, ei niinkään plasman oksitosiinipitoisuudesta. Kiimakierron aikaiset progesteroni- ja estradiolipitoisuuden vaihtelut vaikuttavat oksitosiinireseptorien ilmentymiseen. Oksitosiinireseptorien ja siten luteolyysin ajankohdan säätely ei kuitenkaan ole kaikilta osin selvillä.</p> <p>Naudalla esiintyy poikkeuksellisen lyhyitä kiimakiertoja fysiologisesti puberteetin aikana ja ensimmäisen poikimista seuraavan ovulaation jälkeen. Lyhyiden kiertojen pituus on tavallisimmin 7–10 päivää. Vastaavia, niin sanottuja indusoituja lyhyitä kiimakiertoja, on todettu esiintyvän tiettyjen hormonihoitojen jälkeen myös normaalisti syklöivillä lehmillä. Kokeellisen työn tarkoituksena oli selvittää tällaisten hormonihoitojen vaikutuksia endometriumin steroidireseptoreihin ja sitä kautta näiden reseptoreiden roolia ennenaikaiseen luteolyysiin liittyvissä tapahtumissa.</p> <p>Tutkimus suoritettiin Viikin opetus- ja tutkimustilan lypsylehmillä (11 kpl), joista kolme kävi kokeet läpi kahdesti. Lehmille annettiin kiimakierron päivänä 8 dekskloprostenoli- (PG) ja 24 tuntia myöhemmin gonadorelinipistokset (GnRH). Kaikki lehmät ovuloivat 24–36 tunnin kuluttua GnRH:sta. Munasarjat tutkittiin päivittäin ultraäänellä, ja verinäytteitä plasman progesteroni- ja estradioli-17β-määrittelyksiin otettiin päivittäin indusoitua ovulaatiota seuraavaan ovulaatioon asti. Lehmiltä otettiin kohtubiopsiat kaksi ja viisi päivää indusoidun ovulaation jälkeen. Tuloksissa on mukana 13 kiimakiertoa. Kokeessa havaittiin selvästi kahdenlaisia kiimakiertoja: lyhyitä ja normaalipituisia. Lyhyiden kiertojen (8/13) pituus oli $8,7\pm 0,6$ ja normaalipituisien kiertojen (5/13) $20,0\pm 1,5$. Progesteroni- ja estrogeenireseptorien tai COX-2-entsyymien määrissä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa lyhyiden ja normaalipituisien kiertojen tai eri päivinä otettujen biopsioiden välillä, mikä johtuu todennäköisesti pienestä aineistokoosta ja käytetyn värjäysmenetelmän epätarkkuudesta.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords			
nauta, luteolyysi, endometriumin oksitosiinireseptorit, endometriumin steroidireseptorit, lyhyet kiimakerrot			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited			
Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s)			
Työn johtaja: prof. Terttu Katila Työn ohjaajat: ELT Juhani Taponen, ELL Mari Rantala			

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	4
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	5
2.1 Kohdun ja munasarjojen anatomiaa.....	5
2.2 Lehmän lisääntymisfysiologiaa	7
2.3 Luteolyysi	9
2.3.1 Prostaglandiinien synteesi.....	9
2.3.2 Luteolyysin mekanismi	9
2.3.3 Luteolyysin hormonaalinen säätely	11
2.4 Endometriumin oksitosiinireseptorit.....	13
2.4.1 Oksitosiinireseptorien ilmentyminen kiimakierron eri vaiheissa	14
2.4.2 Oksitosiinireseptorien sijainti.....	16
2.4.3 Steroidihormonien vaikutus oksitosiinireseptoreihin.....	16
2.5 Endometriumin steroidireseptorit	17
2.5.1 Estrogeenireseptorit	18
2.5.2 Progesteronireseptorit	20
2.6 Lyhyet kiimakierrot.....	20
3 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	24
3.1 Eläimet.....	24
3.2 Koejärjestely	25
3.3 Verinäytteet	25
3.4 Munasarjatutkimukset	26
3.5 Kohtubiopsiat.....	26
3.6 Immunohistokemialliset tutkimukset.....	27
3.7 Tilastollinen analyysi	28
4 TULOKSET	29
4.1 Kiimakierron pituus ja munasarjalöydökset	29
4.2 Hormonitutkimukset	29
4.2.1 Plasman progesteronipitoisuus.....	29
4.2.2 Plasman estradioli-17 β -pitoisuus	30
4.3 Immunohistokemialliset tutkimukset.....	32
4.3.1 Progesteronireseptorit	32
4.3.2 Estrogeenireseptori- α	33
4.3.3 COX-2-entsyymi.....	34
5 POHDINTA	35
6 KIRJALLISUUS	36

1 JOHDANTO

Nauta on polyestrinen lisääntyjä, eli kiimakierrot jatkuvat ympäri vuoden, ellei eläin tiinehdy. Kiimakierron pituus on lehmillä 21 ± 3 vrk ja hiehoilla 20 ± 3 vrk. Noin 80 prosenttia kierrosta on luteaalivaihetta, jolloin hormonaalista ympäristöä hallitsee keltarauhasen erittämä progesteroni (P_4). Noin 20 prosenttia kierrosta on follikulaarivaihetta, jolloin vallitseva hormoni on follikkelien erittämä estradioli (E_2). Luteaalivaihe päättyy luteolyysiin, keltarauhasen rakenteelliseen ja toiminnalliseen surkastumiseen, jonka aiheuttaa kohdun endometriumien erittämä prostaglandiini $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Endometriumiin syntetisoituu luteaalivaiheen loppupuolella oksitosiinireseptoreita, joihin sitoutuva oksitosiini aiheuttaa $PGF_{2\alpha}$:n erittymisen ja luteolyysin. Luteolyysin ajoitus ratkaisee kiimakierron pituuden (Senger 2003).

Oksitosiinireseptorien ekspresion säätely vaikuttaa oleellisesti luteolyysin käynnistymiseen. Kohdun vaste oksitosiinille riippuu oksitosiinireseptorien määrästä, ei niinkään plasman oksitosiinipitoisuudesta. Kohtuun sitoutuneen oksitosiinin määrä on pienimmillään luteaalivaiheen puolivälissä, jolloin taas plasman oksitosiinipitoisuus on suurimmillaan. Kiimakierron aikaiset progesteroni- ja estradiolipitoisuuden vaihtelut vaikuttavat oksitosiinireseptorien ilmentymiseen. Progesteroni inhiboi oksitosiinireseptorien ekspressiota, mutta riittävän pitkä yhtäjaksoinen altistus kumoaa vaikutuksen. Estradioli puolestaan lisää oksitosiinireseptorien ekspressiota (Robinson ym. 2001).

Koska sekä oksitosiinin, progesteronin että estradiolin vaikutus välittyy kohdekudoksessa olevien spesifisten reseptorien kautta, luteolyysin säätelymekanismien ymmärtäminen vaatii perehtymistä reseptoridynamiikkaan. Oksitosiini-, progesteroni- ja estrogeenireseptorien määrät vaihtelevat naudan endometriumissa kiimakierron ja tiineyden vaiheen mukaan ja eri solutyypin välillä (Robinson ym. 2001). Progesteroni vähentää ja estradioli lisää endometriumien steroidireseptorien ekspressiota. Sekä progesteroni että estrogeenireseptoreiden määrä on siis suurimmillaan kiiman aikoihin ja vähenee luteaalivaiheessa (Boos ym. 1996). Estradioli on progesteronia tärkeämpi säätelytekijä (Kimmins ja MacLaren 2001). Kuitenkin endometriumien oksitosiinireseptorien lisääntyminen luteaalivaiheen loppupuolella tapahtuu jo ennen progesteroni- ja estrogeenireseptorien määrän lisääntymistä (Robinson ym. 2001). Oksitosiinireseptorien säätely ei siis ole kaikilta osin selvillä, ja lisätutkimuksia tarvitaan.

Naudalla esiintyy poikkeuksellisen lyhyitä, 7–12 vuorokauden mittaisia, kiimakiertoja ensimmäisen poikimista seuraavan ovulaation jälkeen ja puberteetin aikana (Garverick ja Smith 1986). Vastaavia, niin sanottuja indusoituja lyhyitä kiimakiertoja, on todettu esiintyvän myös normaalisti sykloivilla eläimillä tiettyjen hormonihoidojen yhteydessä. Kun lypsylehmille annettiin kahdeksan päivää luonnollisen kiiman jälkeen pistos $\text{PGF}_{2\alpha}$:aa ja 24 tunnin kuluttua gonadotropiinin vapauttajahormonia (GnRH), kolmasosalla lehmistä ilmeni lyhyt kiimakierto (Taponen ym. 2002). Lyhyt kiimakierto on seurausta $\text{PGF}_{2\alpha}$:n ennenaikaisesta vapautumisesta kohdun endometriumista (Garverick ym. 1992). Lyhyen kiimakierron aikana endometriumi on enemmän oksitosiini- ja vähemmän progesteronireseptoreita kuin normaalipituisten kiimakierron aikana (Zollers ym. 1993).

Kokeellisen työn tarkoituksena on tutkia biopsioiden avulla endometriumin oksitosiini- ja steroidihormonireseptorien määriä 24 tunnin välein annettavien PG- ja GnRH-hoidojen jälkeen ja selvittää näiden reseptoreiden roolia ennenaikaiseen luteolyysiin liittyvissä tapahtumissa. Mann ja Lamming (1994) ovat esitelleet transkervikaalisen näytteenottomenetelmän naudan endometrium-näytteiden keräämiseen eläviltä eläimiltä. Näytteenotto ei häiritse kiimakierron pituutta, eli näytteenotto sinänsä ei aiheuta $\text{PGF}_{2\alpha}$:n erittymistä. Reseptorien konsentraatiot ovat samankaltaisia kohdun eri osissa.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Kohdun ja munasarjojen anatomiaa

Lehmän kohdussa (*uterus*) on kohdunkaula, lyhyt runko-osa ja kaksi kohdunsarvea. Noin 35–45 cm pitkät sarvet käpertyvät itsensä alle ja kaventuvat kärkeä kohti ennen yhtymistään munanjohtimeen (*tuba uterina*). Kohtu roikkuu kaudaalisen vatsaontelon kattoon ja lantio-ontelon seinämiin kiinnittyvien kohdun leveiden kannatinsiteiden (*ligamentum latum uteri*) varassa (Dyce ym. 2002).

Munasarjat (*ovarium, ovaria*) sijaitsevat kohdunsarvien käpertymisestä johtuen tyypilli-

sesti kohdun bifurkaation tasolla. Munasarjat ovat muodoltaan ovaalimaiset ja lateraalisuunnassa litistyneet. Niiden koko vaihtelee yksilöittäin sekä iän että fysiologisen tilan mukaan, mutta on keskimäärin 4 x 2 x 1,5 cm. Follikkelit ja keltarauhaset muuttavat munasarjojen muotoa ja kokoa ja ovat tunnettavissa rektaalipalpaatiolla. Munasarjaa kannattelee dorsaalisuunnassa munasarjan lieve (*mesovarium*), joka on osa kohdun leveää kannatinsidettä. Lyhyt munasarjan kannatinside (*ligamentum ovarii proprium*) kiinnittää munasarjan kohdunsarven kärkeen. Munasarjan ympärillä on munasarjan säkki (*bursa ovarica*), joka muodostuu kohdun leveästä kannatinsiteestä ja jää mediaalipuolelta avoimeksi (Dyce ym. 2002).

Munasarjoja peittää *tunica albuginea*. Munasarjan kuorikerros, *cortex*, on munasarjan toiminnallisesti aktiivinen osa. Ydin, *medulla*, pitää sisällään veri- ja imusuonet sekä hermot (Dyce ym. 2002).

Histologisesti kohtu koostuu kolmesta kerroksesta. Sisimpänä on kohdun limakalvo (*endometrium*). Sen alapuolella on lihaskerros (*myometrium*), josta erotetaan sisempi rengasmaisen lihaskerros ja ulompi pitkittäinen lihaskerros. Uloimpana on herakalvo (*perimetrium*), joka on osa vatsakalvoa (Senger 2002).

Endometrium muodostaa sekä pitkittäisiä että poikittaisia poimuja. Tiineellä eläimellä endometrium muodostaa lisäksi noin 70–120 pyöreää tai ovaalinmuotoista, kohollaan olevaa kohtukäpystä (*carunculae*). Ne muodostavat sikiönpuoleisen sikiökalvoista erilaistuneen osan (*cotyledon*) kanssa toiminnallisen istukan. Sukukypsällä naudalla, joka ei ole tiine, karunkkelialueet erottuvat ympäröivästä endometriumista hieman kohollaan olevina alueina. Karunkkelialueilla on erittäin runsas verisuonitus, mutta ei lainkaan rauhasia. Sen sijaan muualla endometriummassa on runsaasti rauhasia, joiden morfologia ja eritystoiminta ovat hormoneista riippuvaisia (Dyce ym. 2002).

Endometrium voidaan jaotella histologisesti pinta- ja rauhasepiteeliin sekä stroomaan. Strooma koostuu epiteelin alla olevasta löyhästä sidekudoksesta ja myometriumiä vasten olevasta tiiviistä sidekudoksesta. Endometriumin rauhaset tunkeutuvat syväälle stroomaan, lähes myometriumin rajalle. Stroomassa on sidekudossolujen lisäksi runsaasti immuunijärjestelmän soluja, kuten makrofageja, lymfosyyttejä ja syöttösoluja (Dellmann ja Carithers 1996).

2.2 Lehmän lisääntymisfysiologiaa

Naaraan lisääntymistoimintoja säätelevät pääasiassa hormonit, joita erittyy hypotalamuksesta, aivolisäkkeen etulohkosta, munasarjoista ja kohdun endometriumista. Hypotalamuksen hermosolut erittävät kymmenestä aminohaposta koostuvaa neuropeptidiä, gonadotropiinin vapauttajahormonia (GnRH). Aivolisäkkeen etulohkosta vapautuu GnRH:n vaikutuksesta follikkelia stimuloivaa hormonia (FSH) ja luteinisoivaa hormonia (LH). Munasarjan toiminnalliset rakenteet erittävät estradiolia, progesteronia, inhibiiniä, aktiviinia, oksitosiinia, relaksiinia ja hieman testosteronia. Hypotalamus–aivolisäke–munasarja-akselilla toimii monimutkainen palautejärjestelmä, jonka avulla hormonipitoisuuksia säädellään (Senger 2002).

Nauta saavuttaa sukukypsyyden keskimäärin 11 kuukauden iässä, tosin ympäristö- ja perintötekijät aiheuttavat suurta yksilöllistä vaihtelua. Puberteetti-än myötä alkavien kiimakiertojen tarkoituksena on tarjota naaraalle toistuva mahdollisuus tiinehtymiseen. Lehmällä kiimakierrat jatkuvat ympäri vuoden, ja niiden pituus on 21 ± 3 vrk, hiehoilla 20 ± 3 vrk. Kierrossa erotetaan neljä vaihetta: esikiima (proestrus), varsinainen kiima (estrus), jälkikiima (metestrus) ja kiimojen välinen aika (diestrus). Varsinainen kiima kestää keskimäärin 15 tuntia (vaihteluväli 6–24 tuntia). Muiden kiimakierron vaiheiden kestossa on huomattavaa vaihtelua, osittain johtuen määritelmien epätasaisuudesta. Munasarjatoiminnan perusteella kiimakierto voidaan jakaa myös lyhyeen follikulaarivaiheeseen ja pitkään luteaalivaiheeseen. Follikulaarivaiheen osuus kiimakierron kestosta on noin 20 prosenttia ja luteaalivaiheen vastaavasti 80 prosenttia (Senger 2002).

Follikulaarivaihe alkaa keltarauhasen surkastumisesta ja päättyy ovulaatioon. Siihen sisältyvät siis esikiima, varsinainen kiima ja jälkikiiman alkuosa. Luteolyysin myötä progesteronin negatiivinen palautevaikutus hypotalamukseen lakkaa, joten GnRH:n ja siten myös LH:n erityis lisääntyy. Follikkelikasvu kiihtyy ja estradiolipitoisuus suurenee. Tämä taas johtaa näkyviin kiiman oireisiin ja seksuaaliseen halukkuuteen. Follikulaarivaiheen loppupuolella suuri estradiolipitoisuus ja samanaikainen pieni progesteronipitoisuus saavat aikaan LH-hormonin massiivisen vapautumisen, niin sanotun LH-piikin, jonka seurauksena dominoiva follikkeli puhkeaa ja munasolu vapautuu. Samalla käynnistyy uusi follikkeliaalto. LH-piikki ajoittuu varsinaisen kiiman ensimmäisiin 12 tuntiin. Ovulaatio tapahtuu jälkikiiman ensimmäisten tuntien aikana, 24–32 tunnin kuluttua

varsinaisen kiiman alusta. Kiimakierron aikana ehtii yleensä kehittyä kaksi tai kolme follikkeliaaltoa (Senger 2002).

Luteaalivaihe alkaa ovulaatiosta ja päättyy keltarauhasen surkastumiseen. Puhjenneen follikkelin paikalle kehittyy keltarauhanen. Myös luteaalivaiheen aikana tapahtuu follikkelikasvua, mutta suuri progesteronipitoisuus estää follikkeleiden loppukypsytymisen ja ovulaation. Mikäli lehmä ei ole tiinehtynyt tai tiineyden tunnistaminen on epäonnistunut, keltarauhasvaiheen loppupuolella (noin päivänä 16–17) käynnistyy luteolyysi ja lehmä palaa kiimaan. Luteolyysi tarkoittaa keltarauhasen rakenteellista ja toiminnallista regressiota, jonka seurauksena keltarauhasen solut hajoavat ja progesteronin tuotanto loppuu. Useimmilla nisäkkäillä, märehitijät mukaan lukien, luteolyysi on riippuvainen kohdusta. Luteolyysin aiheuttaa kohdun endometriumin erittämä $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Senger 2002).

Keltarauhasen erittämistä hormoneista tärkein on progesteroni, joka lukeutuu steroidihormoneihin. Progesteroni valmistaa kohtua tiineyteen ja on välttämätön tiineyden ylläpidossa. Sen tehtävänä on muun muassa lisätä endometriumin rauhasen eritystä, lamata myometriumin toimintaa ja estää emän immuunivastetta sikiön antigeeneihin (Senger 2002). Keltarauhanen koostuu kahdenlaisista steroideja valmistavista soluista, jotka ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan erilaisia. Pieniksi luteaalisoluiksi kutsutaan niitä, joiden halkaisija on 12–22 μm . Isojen luteaalisolujen halkaisija on yli 22 μm . Pienet solut erittävät spontaanisti vain pieniä määriä progesteronia *in vitro*, mutta niissä on LH-reseptoreita, ja altistaminen LH:lle johtaa lisääntyneeseen progesteronituotantoon. Isojen solujen perusprogesteronieritys on suurempi, mutta ne eivät vastaa LH-stimulaatioon (Fitz ym. 1982).

Tiineyden tunnistamisen kannalta välttämätön on myös interferoni τ -niminen proteiini (IFN- τ), jota alkion trofoblastisolut tuottavat. Sitä täytyy erittyä riittävä määrä tiineyspäivinä 14–17, jotta tiineys jatkuisi. IFN- τ vähentää endometriumin oksitosiinireseptorien ekspressiota, jolloin oksitosiinin välittämä $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautuminen ja luteolyysi estyvät. IFN- τ myös muuttaa endometriumin prostaglandiinisynteesiä luteotrooppisen PGE_2 :n suuntaan. Lisäksi IFN- τ muun muassa lisää endometriumin rauhasen eritystä ja siten alkion ravinnonsaantia (Niswender ym. 2000).

2.3 Luteolyysi

2.3.1 Prostaglandiinien synteesi

Prostaglandiinit ovat hormoninkaltaisia yhdisteitä, jotka osallistuvat tärkeinä säätelytekijöinä moniin elimistön reaktioihin. Ne muodostuvat suoraketjuisista, 20-hiilisistä monitydyttymättömistä rasvahapoista, tyypillisesti arakidonihaposta, jota fosfolipaasi A₂ -entsyymit irrottavat solukalvolta (synteessin nopeutta rajoittava tekijä). Syklo-oksigenaasientsyymit (COX) muuttavat arakidonihappoa PGH₂:ksi. COX-1 on jatkuvasti syntetisoitava entsyymi, COX-2 taas indusoituu esimerkiksi hormonien, kasvutekijöiden ja sytokiinien vaikutuksesta. Terminaalinen syntaasi muuttaa PGH₂:n edelleen muiksi prostanoideiksi (Milvae ym. 1996).

2.3.2 Luteolyysin mekanismi

Monilla nisäkkäillä luteolyysi palauttaa tiinehtymättömän eläimen uudelleen kiimaan ja siten tehostaa lisääntymistä. Polyestrillä, spontaanisti ovuloivilla eläimillä, luteolyysin ajoitus määrää kiimakierron pituuden. Jotta alkuun päässyt tiineys voisi jatkua, luteolyysin täytyy estyä (Senger 2003).

Loeb (1923) huomasi, että kohdun poistaminen marsulta johtaa epänormaaliin persistoivaan keltarauhaseen ja syklien loppumiseen. Samankaltaisia havaintoja tehtiin tämän jälkeen muillakin eläinlajeilla, kuten lampaalla, naudalla, sialla, hevosella, hamsterilla, kanilla ja rotalla (Anderson ym. 1969). Lampaalla ja naudalla keltarauhasen puoleisen kohdunsarven poistaminen estää luteolyysin, mutta vastakkaisen kohdunsarven poistaminen ei. Näillä eläinlajeilla kohdun vaikutus luteolyysiin ei välity systeemisesti, vaan paikallisesti (Knickerbocker ym. 1988).

Hixon ja Hansel (1974) tutkivat naudan kohtuun ruiskutetun PGF_{2α}:n leviämistä verenkierrossa. Verinäytteitä kerättiin kaulavaltimosta, -laskimosta ja munasarjavaltimosta. Kaulavaltimossa ja -laskimossa pitoisuus oli korkeimmillaan viiden minuutin kuluttua annostelusta. Munasarjavaltimossa pitoisuus nousi huomattavasti suuremmaksi ja saavutti maksimin 40 minuutin kuluttua annostelusta. Useissa tutkimuksissa on kuitenkin

saatu näyttöä, että $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vaikutus välittyy naudalla osittain myös systeemisen verenkierron kautta. Liharotuisilla lehmillä todettiin luteolyysi ja normaalit kiimakierrot puollittaisen kohdunpoiston jälkeen, vaikka keltarauhanen olikin poistetun osan puoleisessa munasarjassa (Ward ym. 1976). Kun toinen munasarja poistettiin ja toinen siirrettiin keinotekoisesti kaulavaltimon ja -laskimon verenkiertoon, kiimakierrot olivat normaalin mittaisia (Barcikowski ym. 1976). Naudalla vain 65 prosenttia [^3H]- $\text{PGF}_{2\alpha}$:sta metaboloituu keuhkojen läpi kulkiessaan (Davis ym. 1985), lampaalla sen sijaan yli 99 prosenttia (Davis ym. 1980). Lammasta käytetään tutkimuksissa usein märehitjoiden mallieläimenä, mutta lajikohtaiset erot on syytä pitää mielessä.

Naudalla luteolyysi käynnistyy, kun aivolisäkkeestä peräisin oleva oksitosiini sitoutuu endometriumin oksitosiinireseptoreihin. Pieni määrä $\text{PGF}_{2\alpha}$:aa vapautuu endometriumiasta ja saavuttaa samanpuoleisen munasarjan paikallisen vena–arteria-yhteyden välityksellä. Keltarauhasen isoista luteaalisoluista alkaa erittyä oksitosiinia, joka lisää $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautumista endometriumiasta (McCracken ym. 1999). Naudalla luteolyysin aiheuttavat noin viisi $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pulsssia, jotka kestävät kukin noin neljä tuntia. Pulssit tulevat noin 8 tunnin välein. Päivä, jolloin ensimmäinen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pulssi havaitaan, on sama, jolloin progesteronipitoisuus alkaa laskea. $\text{PGF}_{2\alpha}$:n luteolyyttinen vaikutus on siis nopea (Mann ja Lamming 2006).

$\text{PGF}_{2\alpha}$ käynnistää monimutkaisen tapahtumaketjun, joka johtaa keltarauhasen rakenteelliseen ja toiminnalliseen regressioon. Aihetta on tutkittu paljon, mutta kaikkia yksityiskohtia ei vielä tunneta. $\text{PGF}_{2\alpha}$ vähentää veren virtausta keltarauhaseen ja heikentää siten ravintoaineiden, steroidihormonisynteesissä tarvittavien substraattien ja luteotrooppisten aineiden saantia. Keltarauhasen verisuonten endoteelisoluissa on reseptoreita $\text{PGF}_{2\alpha}$:lle, ja molekyylin sitoutuminen reseptoriinsa johtaa solujen degeneraatioon. Keltarauhasen ensimmäisiä morfologia muutoksia ovatkin hiussuonten endoteelisolujen, perisyyttien ja pienten luteaalisolujen vähentyminen. Suurin osa keltarauhasen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -reseptoreista on isoissa luteaalisoluissa, mutta näiden solujen morfologiset muutokset nähdään vasta tunteja sen jälkeen, kun veren progesteronipitoisuus on jo alkanut pienentyä. $\text{PGF}_{2\alpha}$ estää kolesterolin kuljetusta luteaalisoluihin ja edelleen mitokondrioon, jossa progesteronisynteesin entsymaattiset reaktiot tapahtuvat. Myös immuunijärjestelmällä on tärkeä rooli luteolyysin etenemisessä. Suuria määriä valkosoluja, muun muassa makrofageja, kertyy keltarauhaseen ennen veren progesteronipitoisuuden pientymistä. Ne

fagosytoivat hajoavia soluja ja tuottavat sytokiineja. Nämä sytokiinit, joista tärkeimpiä ovat interleukiini-1, tuumorinekroositekijä- α ja interferoni- γ , vähentävät steroidisynteesiä ja houkuttelevat edelleen lisää valkosoluja paikalle (Niswender ym. 2000).

2.3.3 Luteolyysin hormonaalinen säätely

Plasman progesteroni ja estradioli säätelevät oksitosiinin vapautumista neurohypofyysistä, oksitosiinireseptoreiden syntetisoitumista endometriumiin ja siten PGF_{2 α} :n vapautumista (McCracken ym. 1999). Eksogeeninen oksitosiini ei käynnistä PGF_{2 α} :n vapautumista ennen kuin kiimakierron lopulla, luonnollisen luteolyysin aikaan. Herkkyys oksitosiinille hiippuu seuraavan luteaalivaiheen alkupuolella. Kiimakierron aikana kohdussa tapahtuu useita muutoksia, jotka vaikuttavat kohdun vasteeseen oksitosiinille. Endometriumin kyky syntetisoida prostaglandiinia riippuu muun muassa endometriumiin kertyneen arakidonihapon määrästä ja mobilisoinnista solukalvoilta sekä COX-entsyymien toiminnasta. Kaikkein oleellisimpia ovat oksitosiinireseptorien ekspressiossa tapahtuvat muutokset (Goff 2004).

Mann ja Lamming (2006) tutkivat sykloivilla lehmillä endometriumin oksitosiinireseptoreiden lisääntymistä ja PGF_{2 α} :n vapautumista suhteessa luteolyysin ajankohtaan. Luteolyysin alku määriteltiin hetkeksi, jolloin progesteronin pitoisuus plasmassa alkaa laskea yhtäjaksoisesti, ja päättyminen hetkeksi, jolloin plasman progesteronipitoisuus on alittanut 1 ng/ml. Kohdun endometriumin oksitosiinireseptorien määrä oli aluksi testin herkkyuden alapuolella (< 15 fmol/mg proteiinia). Se lisääntyi kaikilla lehmillä ennen PGF_{2 α} -pulssien alkamista. Reseptorien määrä lisääntyi edelleen ja saavutti huippupitoisuuden luteolyysin päättymisen jälkeen. Tällöin oksitosiinireseptoreita oli noin viisinkertaisesti luteolyysin alkuun nähden.

Steroidihormonien vaikutuksesta PGF_{2 α} :n erittymiseen on tehty lukuisia tutkimuksia (Woody ym. 1967; Villa-Godoy ym. 1985; Thatcher ym. 1986; Lafrance ja Goff 1988; Mann 2001; Mann ym. 2001; Kombé ym. 2003), mutta tulosten yhteenveto ei ole helppoa. Tutkimuksissa on käytetty mallina sekä ovariektomoituja että intakteja eläimiä, ja käytettyjen hormoneiden määrät, antoreitit ja hoitojen kestot vaihtelevat. Pääsääntö kuitenkin on, että estradioli lisää PGF_{2 α} :n synteesiä ja aiempi altistuminen progesteronille

tehostaa estradiolin vaikutusta. Lyhytaikainen altistuminen progesteronille vähentää oksitosiinireseptoreiden geeniekspressiota ja siten ehkäisee PGF_{2α}:n eritystä, mutta pitkä altistuminen muuttaa tilanteen päinvastaiseksi. Estradiolin tiedetään lisäävän fosfolipasi A₂ -entsyymin aktiivisuutta. Progesteroni edistää PGF_{2α}:n synteesissä välttämättömän arakidonihapon kerääntymistä endometriumiin ja parantaa siten entsyymin toimintamahdollisuuksia. Lisäksi progesteroni stimuloi suoraan COX-entsyymin aktiivisuutta (McCracken ym. 1999).

Estradiolin merkityksestä luteolyysin käynnistymisessä kertoo havainto, että follikkelien tuhoaminen hieholta johtaa pidentyneeseen keltarauhasvaiheeseen (Villa-Godoy ym. 1985). Vastaavasti estradiolin antaminen lehmälle kiimakierron päivänä 13 saa aikaan luteolyysin (Thatcher ym. 1986). Estradioli vaikuttaa luteolyysin käynnistymiseen, mutta mekanismi ei ole täysin selvillä. Estrogeenit eivät lisää COX-1- tai COX-2-entsyymien ekspressiota naudan endometriumissa *in vitro* (Kombé ym. 2003). Lampaan endometriumissa COX-1-entsyymiä syntetisoidaan tasaisesti koko kiimakierron ajan. COX-2-entsyymiä syntetisoidaan runsaasti kiimakierron päivinä 12–15, minkä jälkeen se vähenee nopeasti alle määrittämissä rajan. Steroidikäsittely ei vaikuta COX-1-entsyymin määrään mitenkään. Progesteronikäsittely lisää COX-2-entsyymin määrää, mutta estradiolilla ei ole vaikutusta (Charpigny ym. 1997). Naudan endometriumissa COX-1-entsyymiä ei syntetisoida lainkaan. COX-2-entsyymiä syntetisoidaan vähän kiimakierron päivinä 1–12 ja runsaasti päivinä 13–21 (Arosh ym. 2002). Steroidihormonien vaikutuksesta naudan endometriumin COX-entsyymien synteesiin *in vivo* ei ole julkaistu tutkimustuloksia.

Jos lehmä altistetaan progesteronille kiimakierron alussa ennen luontaista plasman progesteronin nousua, seurauksena on ennenaikainen luteolyysi ja kiimakierron lyheneminen keskimäärin neljällä vuorokaudella. Tutkimuksessa lehmille annettiin kymmenen progesteronipistosta vuorokauden välein, ensimmäinen kiimapäivänä (Woody ym. 1967). Ovariektomoiduilla hiehoilla PGF_{2α} vapautuu vasteena oksitosiinille jo seitsemän vuorokauden progesteronikäsittelyn jälkeen, mutta voimakkain vaste havaitaan 14 vuorokauden progesteronikäsittelyn jälkeen (Lafrance ja Goff 1988). Progesteroni säätelee omien reseptorensa määrää siten, että pitkäkestoinen altistuminen progesteronille vähentää reseptorien määrää. Progesteronilla on tärkeä tehtävä endometriumin valmistuksessa PGF_{2α}:n synteesiä ja eritystä varten, mutta myös progesteronireseptorien oikeaan

aikaan tapahtuva vähentyminen on tärkeä osa luteolyysin ajoitusta (McCracken ym. 1999).

Steroidihormonien vaikutusta $\text{PGF}_{2\alpha}$:n eritykseen on tutkittu myös naudan endometriumin valmistetuilla soluviljelmillä. Kombé ym. (2003) pyrkivät selvittämään, miten endometriumin epiteelisolujen altistaminen progesteronille vaikuttaa niiden vasteeseen estrogeenille ja oksitosiinille. Progesteronikäsittely lisäsi $\text{PGF}_{2\alpha}$:n eritystä oksitosiinin välityksellä, mutta ei suoraan. Estrogeeni lisäsi $\text{PGF}_{2\alpha}$:n eritystä, mikäli soluja oli ensin altistettu progesteronille 17 tai 21 päivän ajan. Jos progesteronialtistus kesti vain kymmenen päivää, estrogeenilla ei ollut vaikutusta $\text{PGF}_{2\alpha}$:n erittymiseen. Myöskään estrogeeni ei lisännyt $\text{PGF}_{2\alpha}$:n erittymisestä suoraan, vaan ainoastaan oksitosiinin välityksellä. Progesteroni ja estrogeeni vaikuttavat eristettyihin epiteelisoluihin samaan tapaan kuin *in vivo*. Endometriumin muut solut eivät siis ole välttämättömiä oksitosiinireseptoreiden lisääntymisen ja siten $\text{PGF}_{2\alpha}$:n erittymisen ja luteolyysin kannalta. Muut solutyypit voivat toki moduloida solujen vastetta steroideille.

Kombé ym. (2003) pyrkivät myös selvittämään, johtuuko estrogeenin vaikutus oksitosiinireseptoreiden määrän lisääntymisestä. Estrogeeni lisäsi oksitosiinireseptoreiden määrää, joka oli suurimmillaan 24 tunnin estrogeenialtistuksen jälkeen. Kun inkubaatiota jatkettiin toiset 24 tuntia, oksitosiinireseptoreiden määrä väheni yhtä pieneksi kuin kontrollinäytteessä. Tulos vahvistaa aiempaa havaintoa, että estradioli lisää oksitosiinireseptoreiden määrää vain lyhytaikaisesti (Leung ja Wathes 2000).

2.4 Endometriumin oksitosiinireseptorit

Oksitosiini on yhdeksästä aminohaposta koostuva peptidihormoni, jota erittyy aivo-lisäkkeen takalohkosta ja keltarauhasesta. Oksitosiinin vaikutus välittyy kohdesolujen solukalvolla sijaitsevien oksitosiinireseptorien kautta. Hormoni–reseptori-kompleksi käynnistää toisiolähekkaskadin, mikä johtaa proteiinisynteesin muutoksiin solun sisällä (Senger 2003).

2.4.1 Oksitosiinireseptorien ilmentyminen kiimakierron eri vaiheissa

Lampailla tehdyissä kokeissa huomattiin, että kohdun mekaaninen stimulointi johtaa $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautumiseen kiimakierron alussa ja lopussa (McCracken 1980). Kohdun mekaaninen stimulointi saa aikaan veren oksitosiinipitoisuuden lisääntymisen, joten $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautumisen pääteltiin tapahtuvan oksitosiinin välityksellä. Jo aikaisemmin oli huomattu, että oksitosiinin antaminen naudalle kiimakierron alkuvaiheessa johtaa luteolyysiin. Vaikutus estyy, jos kohtu poistetaan (Armstrong ja Hansel 1959). Suuret oksitosiiniannokset kiimakierron päivinä 2 ja 3 (päivä 0 = estrus) johtavat kohonneisiin 15-keto-13,14-dihydro- $\text{PGF}_{2\alpha}$:n eli $\text{PGF}_{2\alpha}$:n päämetaboliitin pitoisuuksiin. Oksitosiinilla aikaansaatu luteolyysi välittyy siis $\text{PGF}_{2\alpha}$:n kautta (Oyedipe ym. 1984).

Kohdun oksitosiinireseptorien määrä kiimakierron eri vaiheissa vaikuttaa oleellisesti niihin fysiologisiin vaihteluihin, joita nähdään kohdun vasteessa oksitosiinille. Plasman oksitosiinipitoisuus on suurimmillaan keltarauhasvaiheen puolivälissä (Schams ym. 1985). Tällöin kuitenkin kohtuun sitoutuneen oksitosiinin määrä on pienimmillään (Jenner ym. 1991; Soloff ja Field 1989). Kohdun vaste oksitosiinille riippuu siis oksitosiinireseptorien määrästä, ei niinkään plasman oksitosiinipitoisuudesta.

Soloff ja Fields (1989) tutkivat endometriumin ja myometriumin oksitosiinireseptoripitoisuutta kiimakierron eri vaiheissa. Näytteet otettiin teurastetuilta liharotuisilta lehmiltä keltarauhasen puoleisesta kohdunsarvesta. Tutkimuksessa todettiin, että myometriumin kalvoproteiineihin sitoutuneen oksitosiinin määrä on suurimmillaan kiiman aikoihin ja pienimmillään keltarauhasvaiheen aikana. Päivänä 21 myometriumin kalvoproteiineihin sitoutuneen oksitosiinin määrä on lähes kymmenkertainen verrattuna päivään 7 (päivä 0 = estrus). Endometriumin kalvoproteiineihin sitoutuneen oksitosiinin määrän vaihteluita kiimakierron eri vaiheissa ei pystytty määrittämään. Oksitosiinireseptoreiden affiniteetti saattaa vaihdella kiimakierron eri vaiheissa, mikä hankaloittaa asian tutkimista.

Jennerin ym. (1991) tutkimustulokset ovat samansuuntaisia. Ne tarkentavat oksitosiinireseptorien ilmentymisen aikataulua ja valottavat asiaa myös endometriumin osalta. Tutkimuksessa todetaan, että sykloivilla naudoilla oksitosiinin sitoutuminen endometriumiin alkaa lisääntyä kiimakierron päivänä 15 (päivä 0 = estrus). Myometriumissa vastaava lisääntyminen nähdään päivänä 17. Sitoutuneen oksitosiinin määrä pysyy suu-

rena endometriumiissa päivään 3 ja myometriumiissa päivään 5 asti. Endometriumin oksitosiinireseptoripitoisuus on pienimmillään päivänä 9. Endometriumiin sitoutuu oksitosiinia enemmän kuin myometriumiin.

Jennerin ym. (1991) aineistossa oli sykloivien eläinten lisäksi myös siemennettyjä eläimiä. Osa näistä tiinehtyi, ja tiineys varmistettiin teurastuksen jälkeen huuhtelemalla kohtu keittosuolaliuoksella alkion havaitsemiseksi. Tutkimuksen mukaan tiineillä lehmillä havaitaan päivänä 18 selvä ero oksitosiinin sitoutumisessa ja veren progesteronipitoisuuksissa tyhjiin lehmiin verrattuna. Tiineillä lehmillä ei havaita sitä oksitosiinireseptorien lisääntymistä, joka ilmenee sykloivilla lehmillä endometriumiissa päivänä 15 ja myometriumiissa päivänä 17. Osalla sykloivista lehmistä oksitosiinireseptorit eivät kuitenkaan lisääntyneet myöhäisen luteaalivaiheen aikana, kuten olisi ollut odotettavissa. Näillä lehmillä havaittiin epänormaalin suuri progesteronipitoisuus kiimakierron vaiheeseen nähden. Toisaalta kaikilla sykloivilla lehmillä, joilla oksitosiinireseptorit lisääntyivät myöhäisen luteaalivaiheen aikana, oli pieni progesteronipitoisuus. Progesteronipitoisuuden ja oksitosiinireseptoreiden määrän välillä todettiin merkitsevä negatiivinen yhteys. Tuloksista voidaan päätellä, että oksitosiinireseptoreilla on ratkaisevan tärkeä rooli luteolyysin käynnistymisessä ja tiineyden pysymiseksi yllä oksitosiinireseptorien lisääntymisen täytyy estyä.

Naudalla kohdun oksitosiiniherkkyyden lisääntymistä edeltää oksitosiinireseptoreita koodaavan lähetti-RNA:n (mRNA) ekspression vauhdittuminen. Muutos havaitaan lähinnä kohdun epiteelisoluissa (Robinson ym. 1999), jotka taas ovat päävastuussa PGF_{2α}:n erityksestä (Fortier ym. 1988). Reseptoreita havaitaan kohdun syvemmissä kerroksissa vasta sen jälkeen, kun luteolyysi on jo alkanut (Wathes ja Lamming 1995).

Varhaistiineillä uuhilla sekä oksitosiini- että estrogeenireseptoreiden ekspressio on vähäistä (Spencer ja Bazer 1995; Wathes ja Lamming 1995). Interferoni τ:n oksitosiinireseptorien määrää vähentävän vaikutuksen on arveltu välittyvän estrogeenireseptoreiden vähentymisen kautta. Lehmillä on kuitenkin todettu, että kiimakierron päivänä 16 alkion olemassaololla ei ole vaikutusta estrogeenireseptorin mRNA:n tai valmiin proteiinin määrään. Oksitosiinireseptoreita on tiineillä kuitenkin selvästi vähemmän (Robinson ym. 1999). IFN-τ vähentää eristetyissä naudan endometriumin epiteelisoluissa suoraan oksitosiinireseptoria koodaavan geenin transkriptiota (Horn ym. 1998).

2.4.2 Oksitosiinireseptorien sijainti

Cerbito ym. (1997) tutkivat oksitosiinin, oksitosiinireseptoreiden ja $\text{PGF}_{2\alpha}$:n pitoisuutta endometriummassa suhteessa siihen, kummassa munasarjassa keltarauhanen sijaitsee. Näyttemateriaali saatiin teurastetuista lypsylehmistä. Karunkkelialueen ulkopuolista endometriumia otettiin näytteeksi molempien kohdunsarvien keskivaiheilta. Luteaalivaiheessa oksitosiinipitoisuus oli merkitsevästi suurempi keltarauhasen puoleisessa kohdunsarvessa, mutta oksitosiinireseptori- ja $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pitoisuuksissa ei ollut eroa. Follikulaarivaiheessa surkastuvan keltarauhasen puoleisessa kohdunsarvessa oli selvästi suurempi oksitosiini-, oksitosiinireseptori- ja $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pitoisuus kuin vastakkaisessa sarvessa. Ovulaation jälkeen oksitosiinipitoisuus pysyi suurena suhteessa vastakkaiseen puoleen, mutta oksitosiinireseptori- ja $\text{PGF}_{2\alpha}$ -pitoisuuksissa ei ollut enää eroa kohdunsarvien välillä. Tulokset vahvistavat aiempaa käsitystä kohdun ja munasarjan paikallisesta kommunikaatiosta luteolyysin säätelyssä.

Endometriumin oksitosiinireseptorien sijainnista suhteessa kohdun seinämän kerroksiin on tehty useita tutkimuksia (Fortier ym. 1988; Wathes ja Lamming 1995; Robinson ym. 1999). Niiden perusteella voidaan todeta, että oksitosiinireseptorien määrä lisääntyy ensin epiteelillä (lievä nousu) ja myöhemmin syvemmissä kerroksissa (selvä nousu).

2.4.3 Steroidihormonien vaikutus oksitosiinireseptoreihin

Ovariektomoitujen lehmien endometriummassa on oksitosiinireseptoreita enemmän kuin syклоivilla lehmillä luteolyysin aikaan. Eksogeeninen oksitosiini ei silti saa aikaan $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautumista (Lamming ja Mann 1995). Eksogeeninen oksitosiini kuitenkin aiheuttaa $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautumisen, jos oksitosiinin antoa edeltää progesteronihoito. Estradiolihoidolla ei ole tätä vaikutusta. Vaste oksitosiinille ilmenee jo kahden vuorokauden kuluttua progesteronihoidon alkamisesta ja on voimakkaimmillaan neljä vuorokautta myöhemmin. Oksitosiinireseptorit vähenevät huomattavasti kuuden vuorokauden progesteronikäsittelyn jälkeen, vaikka samaan aikaan $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautuminen vasteena oksitosiinille on voimakkaimmillaan (Mann ym. 2001).

Mann (2001) on julkaissut tutkimustuloksia myös hormonikäsittelyiden vaikutuksista

lehmän endometriumista peräisin oleviin kudosisviljelmiin. Endometriumin oksitosiini-reseptoripitoisuus vähenee merkittävästi, kun kudosisviljelmä altistetaan progesteronille. Vaikutus on annosriippuvainen. Estradiolilla käsiteltyjen kudosisviljelmien reseptoripitoisuudessa ei ole eroa kontrolliviljelmiin. Sekä progesteronilla ja estradiolilla käsitellyissä että kontrolliviljelmissä kuitenkin huomataan herkistyminen oksitosiinille inkubaation kuluessa. Oksitosiinireseptoripitoisuus on pieni, mutta oksitosiinin aiheuttama $\text{PGF}_{2\alpha}$ -eritys silti voimakasta. Kuten ovariektomoiduilla lehmillä tehdyissä kokeissakin havaittiin, pelkkä oksitosiinireseptorien määrä ei siis säätele oksitosiinin välityksellä tapahtuvaa $\text{PGF}_{2\alpha}$ -eritystä.

Steroidihormonien oksitosiinireseptoreihin kohdistama säätely ei ole kaikilta osin selvillä. Robinson ym. (2001) havaitsivat sykloivilla lehmillä oksitosiinireseptorien lisääntymisen kohdun epiteelillä kiimakierron päivänä 16 (päivä 0 = estrus), mutta tätä ei edeltänyt estrogeeni- eikä progesteronireseptorien lisääntynyt ekspresio.

2.5 Endometriumin steroidireseptorit

Munasarjojen tuottamien steroidihormonien esiaste on kolesteroli. 27-hiilisestä kolesterolimolekyylistä valmistuu monimutkaisten entsyymaattisten reaktioiden seurauksena muun muassa 21-hiilistä progesteronia ja 18-hiilistä estradiolia. Steroidihormonit ovat rasvaliukoisia, joten niiden kuljetus verenkierrossa tapahtuu plasmaproteiineihin sitoutuneena. Kohdekudoksessa steroidit vapautuvat kantajaproteiineista ja diffundoituvat solukalvon läpi sytoplasmaan ja edelleen tumaan. Steroidihormoni sitoutuu kohdesolun spesifiseen tumareseptoriin, mikä saa aikaan transkription ja edelleen proteiinisynteesin (Senger 2003).

Steroidiset sukupuolihormonit säätelevät steroidireseptorien määrää ja sijaintia. Naudan kohdussa steroidireseptoreita säädellään parakriinisesti. Estrogeeni kiihdyttää kohdun steroidireseptorien ekspressiota ja progesteroni vaikuttaa päinvastaisesti. Sekä estrogeeni- että progesteronireseptoreiden määrä on siis suurimmillaan kiiman ja jälkikiiman aikaan ja vähenee diestuksen edetessä (Boos ym. 1996). Estrogeenia saaneilla ovariektomoiduilla lehmillä havaitaan enemmän estrogeeni- ja progesteronireseptoreita kuin progesteronilla käsitellyillä lehmillä. Ovariektomoiduilla lehmillä, joita ei altisteta est-

rogeenille tai progesteronille, steroidireseptoriekspressio säilyy jatkuvana (Kimmins ja MacLaren 2001).

Steroidireseptorien hormonaalista säätelyä on tutkittu myös soluviljelmien avulla. Estradioli lisää estrogeeni- ja progesteronireseptoreiden määrää naudan endometriumin epiteeli- ja stroomasoluviljelmissä, ja lisääntyminen on annoksesta riippuvaista (Xiao ja Goff 1999).

Estrogeeni- ja progesteronireseptoreiden määrä on pieni diestruksen ja varhaistiineyden aikana sekä progesteronikäsitellyillä ovariektomoiduilla lehmillä. Progesteroni siis vähentää estrogeeni- ja progesteronireseptoreiden transkriptiota tai translaatiota. Kun ovariektomoidulle lehmälle annetaan sekä estrogeenia että progesteronia, estrogeeni- ja progesteronireseptoreiden määrä lisääntyy. Estrogeeni on siis naudalla tärkeämpi steroidireseptorien määrää säätelevä tekijä kuin progesteroni (Kimmins ja MacLaren 2001). Lampailla tehdyissä kokeissa on aiemmin saatu vastaavia tuloksia (Spencer ja Bazer 1995).

2.5.1 Estrogeenireseptorit

Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että estrogeeni lisää ja progesteroni vähentää estrogeenireseptoreiden määrää. Estrogeenipitoisuuden suureneminen lisää positiivisen palautemekanismin kautta estrogeenireseptorien määrää. Estrogeenireseptoreita on siis eniten kiiman aikoihin ja vähiten luteaalivaiheen aikana (Meyer ym. 1988, Boos ym. 1996, Xiao ja Goff 1999, Kimmins ja MacLaren 2001). Asia paljastuu kuitenkin monisyisemmäksi, kun aletaan tutkia estrogeenireseptoreiden määrää endometriumin erilutyypeissä.

Boos ym. (1996) ottivat kohtubiopsiat viideltä normaalisti sykloivalta lehmältä päivinä 1 (näkyvä kiima), 8, 15 ja 19. Biopsiat otettiin ovuloituvan follikkelin tai keltarauhasen puoleisesta kohdunsarvesta heti sarvien välisten ligamenttien etupuolelta. Näytteet otettiin joka kerralla eri kohdasta (kohdunsarven dorsaali-, lateraali-, mediaali- tai ventraaliosasta). Kokeissa todettiin, että endometriumin rauhasissa ja stroomassa estrogeenireseptoreita on eniten kiiman aikana ja vähiten päivänä 15. Kimmins ja MacLaren

(2001) ottivat biopsioita tiheämmin ja totesivat endometriumin estrogeenireseptoriekspression olevan suurimmillaan ovulaation jälkeen päivinä 1–3 ja pienimmillään päivinä 7–17 (päivä 0 = estrus). Reseptorien määrä alkaa lisääntyä päivänä 18 tiiviissä stroomassa ja pinnallisissa rauhasissa. Kiiman edetessä reseptorien määrä lisääntyy myös löyhässä stroomassa ja syvissä rauhasissa.

Boos ym. (1996) tekivät tutkimuksissaan yllättävän havainnon, että luminaalisten epiteelisolujen estrogeenireseptoriekspressio jatkuu koko kiimakierroksen ajan ja lisääntyy päivinä 8–15, kun veren progesteronipitoisuus on suurimmillaan. Myös Kimmins ja MacLaren (2001) huomasivat, että luminaalisen epiteelin estrogeenireseptorimäärät eivät noudata muiden endometriumin solutyyppeiden reseptorimäärien kehitystä. He havaitsivat luminaalisen epiteelin soluissa estrogeenireseptorien lisääntymisen päivänä 16 (ja päivänä 14 niillä lehmillä, joiden kierto oli 19 päivän mittainen). Estrogeenireseptoriekspression aktivoituminen päivänä 16 eli ennen veren estradiolipitoisuuden suurentumista antaa aiheita olettaa, että reseptoreilla on jokin estradiolista riippumaton säätelytekijä. Luminaalisten epiteelisolujen estrogeenireseptorit eivät siis ole samalla tavalla steroidihormonien säätelyn alaisia kuin rauhasien ja strooman estrogeenireseptorit. Kimmins ja MacLaren (2001) havaitsivat myös, että tiineiden lehmien luminaalisella epiteelillä ei ole lainkaan estrogeenireseptoreita. Luminaalisen epiteelin estrogeenireseptoreilla on siis todennäköisesti roolinsa luteolyysin käynnistymisessä.

Endometriumin syvissä rauhasissa on paljon estrogeenireseptoreita koko kiimakierroksen ajan sekä lampaalla (Spencer ja Bazer 1995) että naudalla (Robinson ym. 2001). Reseptorit voivat välittää parakriinisesti tietoa veren estrogeenipitoisuudesta endometriumin muille solutyypeille. Koska steroidireseptoreiden määrä vaihtelee kiimakierroksen aikana kohdun osien välillä, eri solutyypit voivat vastata samanlaiseen hormonistimulaatioon eri tavalla.

Robinson ym. (2001) tutkivat naudan kohtubiopsioista erikseen valmiiden reseptorien ja reseptoreita koodaavan mRNA:n määrän. Estrogeenireseptoreita koodaavan mRNA:n ja valmiin proteiinin määrissä havaittiin poikkeavuutta endometriumin pinnallisissa rauhasissa. Estrogeenireseptoreiden määrä väheni luteaalivaiheen edetessä ja veren progesteronipitoisuuden suurentuessa. Kuitenkin samaan aikaan havaittiin mRNA:n määrän lisääntyminen. Estrogeenireseptoreihin kohdistuu siis myös post-transkriptionaalista sää-

telyä.

Estrogeenireseptoreiden ekspressio lisääntyy tyhjillä lehmillä ja vähenee varhaistiineillä lehmillä kiimakierron päivinä 16–18 (päivä 0 = estrus). Oksitosiinireseptoreiden lisääntyminen tapahtuu tyhjillä lehmillä kuitenkin jo ennen tätä estrogeenireseptoreiden lisääntymistä (Robinson ym. 2001).

2.5.2 Progesteronireseptorit

Progesteronireseptoreiden määrä naudan endometriumin pinta- ja rauhasepiteelillä lisääntyy kiiman aikaisesta alhaisesta pitoisuudesta maksimiin kiimakierron päivään 8 mennessä ja vähenee sen jälkeen. Strooman soluissa progesteronireseptoreita on paljon jo kiiman aikana ja määrä lisääntyy päivää 8 kohti mentäessä (Boos ym. 1996). Kokonaisuutena naudan endometriumilla on progesteronireseptoreita enemmän strooman soluissa kuin epiteelisoluissa (Robinson ym. 2001).

Progesteronireseptoreita on endometriumin epiteelisoluissa luteolyysin aikaan hyvin vähän tai ei ollenkaan, mutta karunkkelialueiden stroomassa kohtalaisesti. Sama havainto on tehty sekä lampailla (Spencer ja Bazer 1995) että naudoilla (Boos ym. 1996). Robinson ym. (2001) havaitsivat kiimakierron päivänä 16 progesteronireseptoreita koodaavaa mRNA:ta kohtalaisesti karunkkelialueiden stroomassa. Siellä ei kuitenkaan havaittu reseptoriproteiinia lainkaan. Myös progesteronireseptoreihin voidaan siis päätellä kohdistuvan post-transkriptionaalista säätelyä. Tiineiden ja tyhjien lehmien progesteronireseptoriekspressiossa ei ole eroa, joten näiden ryhmien väliset erot oksitosiinireseptoriekspressiossa vaativat jonkin muun selittävän tekijän. Aikaisemmin on ajateltu, että luteolyysi käynnistyy, kun progesteroni vähentää omien reseptoreidensa määrää, mikä sallii oksitosiinireseptoreiden määrän lisääntymisen. Lisää tutkimustietoa kuitenkin tarvitaan.

2.6 Lyhyet kiimakerrot

Lyhyitä kiimakerroja esiintyy naudalla fysiologisesti puberteetin aikana ja ensimmäisen

poikimista seuraavan ovulaation jälkeen. Odde ym. (1980) tutkivat lyhyitä kiimakiertoja poikineilla liharotuisilla lehmillä. Vasikan vieroittaminen kiimattomalta emolta johti yleensä kiimaan 10–25 päivän kuluttua vieroituksesta, ja lyhyet kierrot olivat tällöin yleisiä. Lyhyen kierron pituus oli tavallisimmin 7–10 päivää. Kaikkein eniten esiintyi 8 päivän mittaisia lyhyitä syklejä. Seerumin progesteronipitoisuus oli pienempi ensimmäisen kuin toisen kiiman jälkeen.

Lyhyitä kiimakiertoja on tutkittu paljon juuri emolehmillä, koska vasikan varhainen vieroittaminen johtaa usein lyhyeen kiertoon. Lyhyet kierrot ovat yleisiä myös lypsyrotuisilla lehmillä ensimmäisen poikimista seuraavan luonnollisen tai GnRH:lla aikaansaadun ovulaation jälkeen (Peter ym. 1989).

Keltarauhanen syntyy ovuloituneen follikkelin paikalle, joten follikulaarivaiheen aikaiset tapahtumat vaikuttavat oleellisesti tulevan keltarauhasen toimintaan. Luteaalivaiheen aikana keltarauhasen progesteronieritystä säätelee luteotrooppisten ja luteolyttisten tekijöiden välinen tasapaino. Keltarauhasen heikko toiminta ja ennenaikainen luteolyysi voivat siis teoriassa johtua luteotrooppisten tekijöiden puutteesta tai keltarauhasen kyvyttömyydestä vastata niihin. Toisaalta keltarauhasen heikko toiminta tai ennenaikainen luteolyysi voivat johtua luteolyttisten tekijöiden lisääntymisestä, ennenaikaisesta vapautumisesta tai keltarauhasen herkistymisestä niille (Garverick ja Smith 1986).

Copelin ym. (1987) huomasivat, että kun kiimattomilta poikineilta emolehmillä poistettiin kohtu varhaisen vieroituksen yhteydessä (23–33 päivää poikimisesta), ensimmäisen ovulaation jälkeinen keltarauhanen säilyi munasarjassa, kunnes lehmille annettiin PGF_{2α}-pistos. Kontrolliryhmän lehmät tulivat kiimaan keskimäärin 8,8 päivän kuluttua ensimmäisestä ovulaatiosta. Hysterektomoitujen lehmien plasman progesteronipitoisuus oli jo ensimmäisen ovulaation jälkeen samaa suuruusluokkaa kuin normaalisti sykleivilä lehmillä. Tutkijat päättelivät, että nopea palaaminen kiimaan ensimmäisen ovulaation jälkeen on kohdun erittämän luteolyttisen tekijän vaikutusta.

Useat erilaiset koejärjestelyt ovat vahvistaneet, että lyhyet kiimakierrat johtuvat nimenomaan PGF_{2α}:n ennenaikaisesta vapautumisesta. Copelin ym. (1989) immunisoivat poikimattomia ja vastapoikineita liharotuisia lehmiä PGF_{2α}:lle. Käsittely pidensi keltarauhasen elinkaarta ja progesteronierityksen kestoa. Vaikutus oli riippuvainen veren vas-

ta-ainepitoisuudesta. Cooper ym. (1991) indusoivat liharotuisille lehmille ovulaation hCG-pistoksella 28–36 päivää poikimisesta. Osalla lehmistä oli yhdeksän päivän ajan progestageeni-implantti, joka poistettiin kaksi päivää ennen ovulaation induktiota. Progestageenikäsittelyn saaneiden lehmien kiimakierto oli normaalipituinen, ja ne toimivat kontrolliryhmänä. PGF_{2α}:n pitoisuus oli 4–9 päivää hCG-pistoksen jälkeen suurempi niillä lehmillä, joille tuli lyhyt kiimakierto.

Zollers ym. (1989) tutkivat liharotuisilla lehmillä, johtaako oksitosiinin antaminen erillaiseen PGF_{2α}:n eritykseen kiimakierron päivänä 5 (päivä 0 = estrus), kun kyseessä on lyhyt tai normaalipituinen sykli. Oksitosiini johti PGF_{2α}:n vapautumiseen päivänä 5 vain niillä lehmillä, joilla oli lyhyt kiimakierto. Vaste oli yhtä voimakas kuin normaalipituisen syklin päivänä 16. Lyhyen kiimakierron aikana kohtu voi siis vapauttaa PGF_{2α}:n vasteena oksitosiinille aikaisemmin verrattuna normaaliin kiimakiertoon. Zollers ym. (1991) ovat saaneet vastaavia tuloksia myös tutkimalla endometriumin prostaglandiinierytystä *in vitro*. He poistivat 16 liharotuiselta lehmältä kohdun kiimakierron päivänä 5 (päivä 0 = estrus) ensimmäisen poikimista seuraavan ovulaation jälkeen. Puolella lehmistä oli ollut progestageeni-implantti, joten niille odotettiin normaalipituista ja muille lyhyttä kiimakiertoa. Endometriumin prostaglandiinierytys *in vitro* (sekä spontaani että oksitosiinin indusoima) oli suurempaa niillä lehmillä, joille odotettiin lyhyttä kiertoa.

Kiimakierron päivänä 5 (päivä 0 = estrus) endometriumissa on enemmän oksitosiinireseptoreita ja vähemmän progesteronireseptoreita lyhyen kierron aikana verrattuna normaalipituisen kiertoon, mikä voi selittää voimakkaampaa vastetta oksitosiinille (Zollers ym. 1993). Ovulaatiota edeltävällä estrogeenipitoisuudella saattaa olla vaikutusta tulevan luteaalivaiheen kestoon, koska estrogeeni vaikuttaa progesteronireseptoreiden määrään. Jos ovulaatiota edeltävä estrogeenipitoisuus on pieni, progesteronireseptoreita syntetisoidaan vähän ja kohtu saattaa menettää progesteronidominanssinsa ennenaikaisesti. Kun liharotuisille lehmille laitettiin kahden päivän sisällä poikimisesta estradioli-implantit, jotka poistettiin 40 päivää poikimisen jälkeen, ensimmäisen ovulaation jälkeinen luteaalivaihe oli pidempi kuin kontrollilehmillä (Day ym. 1990). Mann ja Lamming (2000) käsittelivät ovariektomoituja lehmiä kolmella erilaisella estradioliansokksella 48 tunnin ajan follikulaarivaiheen simuloimiseksi. Ensimmäisessä kokeessa tutkittiin endometriumiin sitoutuneen oksitosiinin määrää, toisessa PGF_{2α}:n vapautumis-

ta vasteena oksitosiinille. Jälkimmäisessä kokeessa oksitosiinin antoa edelsi progesteronikäsittely, koska ovariektomoidut lehmät eivät muuten vastaa oksitosiinistimulaatioon. Estradioliannoksen suurentaminen vähensi selvästi oksitosiinin sitoutumista ja $\text{PGF}_{2\alpha}$:n eritystä. Tutkijat päättelivät, että alhainen estradiolipitoisuus ennen ensimmäistä poikimisen jälkeistä ovulaatiota voi johtaa ennenaikaiseen luteolyysiin, koska estradiolipitoisuus ei ole riittävä estämään oksitosiinireseptorien ekspressiota ja $\text{PGF}_{2\alpha}$:n vapautumista.

Kiimansynkronointiohjelmia kehitettäessä on huomattu, että GnRH:n antaminen liian pian luteolyysin indusoimiseksi annetun $\text{PGF}_{2\alpha}$:n tai sen synteettisen analogin (PG) jälkeen vaikuttaa negatiivisesti tiinehtymistuloksiin. Schmitt ym. (1996) tutkivat hiehojen tiinehtyvyyttä PG-pistoksen jälkeen, kun ovulaatio indusoitiin GnRH:lla tai hCG:lla tai siemennysajankohta arvioitiin kiimaoireiden perusteella. Tiinehtyvyys huonontui selvästi, kun GnRH-pistos annettiin 24 tunnin kuluttua PG-pistoksesta. Kun GnRH- tai hCG-pistos annettiin 48 tuntia PG-pistoksen jälkeen, tiinehtyvyydessä ei ollut eroa kiimaoireiden perusteella tapahtuneisiin siemennyksiin nähden.

Kokeilu yhtä aikaa annettujen PG- ja GnRH-pistosten vaikutuksista johti niin sanottujen indusoitujen lyhyiden kiimakiertojen havaitsemiseen. Stevens ym. (1993) halusivat selvittää, paraneeko kiimojen synkronoituminen lypsylehmillä, jos PG-pistokseen yhdistetään samanaikainen GnRH-pistos kiimakierron päivänä 8 tai 10. Kiimakierron päivänä 8 lääkityistä lehmistä 4/8 ja päivänä 10 lääkityistä 1/8 kehittivät toiminnaltaan vajavaisen keltarauhasen ja palasivat kiimaan 7–13 päivää indusoidun ovulaation jälkeen.

Taponen ym. (1999) tutkivat lypsyrotuisilla hiehoilla ja lehmillä GnRH:n vaikutuksia annettuna 24, 48 tai 72 tuntia PG:n jälkeen. Yksi lehmä (1/3) ja yksi hieho (1/6) tulivat kiimaan 9–10 päivän kuluttua edellisestä kiimasta, kun GnRH-pistos annettiin 24 tunnin kuluttua PG-pistoksesta. Luteolyysi havaittiin päivänä 5 tai 6 ja ovulaatio päivänä 9 tai 10 (päivä 0 = ovulaatiopäivä). Taponen ym. (2002) tekivät myöhemmin vastaavan kokeen suuremmalla eläinmäärällä. 60 lehmälle annettiin PG-pistos kahdeksan päivää luonnollisen kiiman jälkeen. Osa lehmistä sai 24 tunnin kuluttua GnRH-pistoksen ja osa toimi kontrolliryhmänä. Kolmasosalla GnRH-ryhmän lehmistä havaittiin ennenaikainen luteolyysi, kontrolliryhmän lehmistä ei yhdelläkään. Tutkimuksessa seurattiin myös kiimaoireiden voimakkuutta. GnRH-ryhmän lehmillä kiimaoireet olivat merkittävästi heikommat kuin kontrolliryhmän lehmillä.

Lyhyet kierrot, joita näissä tutkimuksissa havaittiin, muistuttavat luteolyysin ajoituksen ja progesteronierityksen suhteen lyhyitä kiertoja, joita havaitaan poikineilla lehmillä ensimmäisen ovulaation jälkeen. Stevensin ja Taposen kokeissa lyhyitä syklejä kuitenkin edelsi normaali luteaalivaihe, jonka on ajateltu estävän lyhyiden syklien esiintymisen.

Taposen ym. (2003) tutkimus vahvisti, että vuorokauden välein annettujen PG- ja GnRH-pistosten aikaansaamat lyhyet kiimakerrot johtuvat PGF_{2α}:n enneaikaisesta vapautumisesta. PGF_{2α}:n vapautuminen muistuttaa normaalipituisen kierron spontaanin luteolyysin aikaisia tapahtumia. Indusoitua lyhyttä kiimakiertoa edeltävä follikkelikasvu, ovulaatio ja keltarauhasen toiminta eivät eroa normaalin kiimakierron aikaisesta.

Rantala ym. (2009a) tutkivat prostaglandiini- ja GnRH-käsittelyjen välisen ajan vaikutusta lyhyiden kiimakerrojen esiintyvyyteen lypsyrotuisilla hiehoilla ja lehmillä. Osalle eläimistä annettiin prostaglandiini- ja GnRH-pistokset samanaikaisesti, osalle GnRH-pistos 24 tuntia prostaglandiinin jälkeen. Lyhyitä kiimakerroja esiintyi enemmän, kun prostaglandiini- ja GnRH-pistokset annettiin samanaikaisesti. Samanaikainen annostelu kuitenkin lisäsi niiden eläinten määrää, jotka eivät ovuloinneet GnRH:n vaikutuksesta. Rantala ym. (2009b) testasivat, vaikuttaako GnRH-annoksen suurentaminen veren LH-pitoisuuteen tai lyhyiden kiertojen esiintyvyyteen. Annoksen suurentamisella ei ollut vaikutusta.

Tutkimukset osoittavat, että ovulaation induktio GnRH:lla selvästi ennen luonnollista LH-piikkiä voi lyhentää keltarauhasen elinkaarta ja vaikuttaa tiinehtymistuloksiin negatiivisesti.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Eläimet

Tutkimus toteutettiin Viikin opetus- ja tutkimustilan lypsylehmillä. Yhdestätoista tutkimukseen käytetystä lehmästä kymmenen edusti ayrshire- ja yksi holstein-friisiläistä ro-

tua. Kolmea lehmää käytettiin kokeessa kahdesti siten, että välissä oli ollut yksi manipuloimaton kiimakierto. Lehmät olivat kliinisesti terveitä, ja niillä oli normaalit kiimakerrot. Poikimakerta vaihteli yhdestä kahdeksaan, ja edellisestä poikimisesta oli kulu-
nut vähintään kaksi kuukautta. Lehmät olivat kytkettyinä parsiin, ja niitä ruokittiin ko-
keen aikana nurmisäilörehulla, heinällä ja väkirehulla suomalaisten ruokintasuositusten mukaisesti. Eläinkoelupa oli myönnetty.

3.2 Koejärjestely

Kokeet suoritettiin maaliskuu-kesäkuussa 2005 ja helmikuu-toukokuussa 2006. Lehmien kiimamat synkronoitiin prostaglandiini $F_{2\alpha}$ -analogilla, dekskloprostenolilla (Genestran® 0,075 mg/ml, Vetcare Oy, Salo, Suomi), 0,15 mg lihaksensisäisesti (i.m.). Peräsuolen kautta tehdyt ultraäänitutkimukset aloitettiin PG-pistosta seuraavana päivänä ja toistettiin vuorokauden välein, jotta saatiin selville ovulaatiopäivä (päivä 0). Päivänä 8 annettiin luteolyysin käynnistämiseksi uusi 0,15 mg annos dekskloprostenolia. 24 tuntia myöhemmin (päivä 9) annettiin ovulaation indusoimiseksi 0,1 mg GnRH:ta i.m., (gonadoreliini, Fertagyl® 0,1 mg/ml, Orion Pharma, Espoo, Suomi). Ultraäänitutkimukset aloitettiin 24 tunnin kuluttua gonadoreliinin antamisesta ja toistettiin 12 tunnin välein, kunnes nähtiin ovulaation tapahtuneen. Tämän jälkeen tutkimuksia jatkettiin vuorokauden välein seuraavaan ovulaatioon asti. Ultraäänitutkimusten yhteydessä kirjattiin ylös myös ulkoiset kiiman oireet, muun muassa havainnot kiimalimasta ja jälkikiimaverestä. Lehmiltä otettiin kohtubiopsiat päivinä 2 ja 5 gonadoreliinillä indusoidun ovulaation jälkeen.

3.3 Verinäytteet

Verinäytteenotot plasman progesteroni- ja estradioli-17 β -pitoisuuksien määrittämistä varten aloitettiin kahdeksan päivää ovulaation jälkeen juuri ennen toista dekskloprostenolipistosta. Näytteitä otettiin vuorokauden välein gonadoreliinillä indusoitua ovulaatiota seuraavaan ovulaatioon asti. Verinäytteet otettiin vakuuminenettelällä häntäsuonista heparinisoituihin näyteputkiin (Vacutainer®, Becton Dickinson Vacutainer Systems, Plymouth, UK). Näytteet sentrifugoitiin heti näytteenoton jälkeen (1400* g , 10 minuut-

tia), ja plasma erotettiin muoviputkiin. Kustakin näytteestä erotettu plasma jaettiin kolmeen putkeen. Näytteet pakastettiin -20 °C:een odottamaan hormonimäärytyksiä.

Plasman progesteroni- ja estradioli-17 β -pitoisuudet määritettiin radioimmunoanalyysillä (RIA). Progesteronipitoisuuden tutkimisessa käytettiin kaupallista testiä (Spectria®, Orion Diagnostica, Espoo, Suomi). Määrytyksen havaitsemisraja oli 0,3 nmol/l ja sisäinen variaatiokerroin 10,7 % (pitoisuudella 25,1 nmol/l) – 12,3 % (pitoisuudella 8,0 nmol/l). Estradioli-17 β -pitoisuus tutkittiin jokaisen näytteen osalta kahdesta rinnakkaisnäytteestä. Hormoni uutettiin näytteistä toluenin avulla. Toluenin haihuttamisen jälkeen näytteisiin lisättiin kanin estradioli- β -antiserumia. Näytteitä inkuboitiin yön yli, ja seuraavana päivänä niihin lisättiin ³H-estradioli-17 β -merkkiainetta. Näytteet käsiteltiin sitoutumattoman merkkiaineen poistamiseksi, ja lopuksi mitattiin tritiumin aktiivisuus. Havaitsemisraja oli 2 pg/ml.

3.4 Munasarjatutkimukset

Munasarjojen tutkimiseen käytettiin reaaliaikaista B-moodi-ultraäänilaitetta 7,5 MHz:n lineaarisella rektaalianturilla (Aloka SSD-210DXII, Aloka, Japani). Ultraäänilaitteen avulla seurattiin keltarauhasen kasvua ja surkastumista, follikkelikasvua ja ovulaation ajoitusta. Munasarjarakenteiden suurin ja pienin halkaisija mitattiin pysäytyskuvasta ja kirjattiin ylös. Vähintään viisi millimetriä halkaisijaltaan olevat follikkelit mitattiin. Jos vähintään seitsemän millimetriä halkaisijaltaan olevia follikkeleita oli useita, niiden sijainti kirjattiin ylös. Ovulaatioksi määriteltiin suuren follikkelin yhtäkkinen häviäminen kahden peräkkäisen tutkimuksen välillä. Ovulaatiopäiväksi (päivä 0) määriteltiin se päivä, jolloin suuri follikkeli nähtiin viimeisen kerran.

3.5 Kohtubiopsiat

Kohtubiopsioiden avulla pyrittiin selvittämään endometriumien progesteronireseptorien, estrogeenireseptori- α :n sekä COX-2-entsyymien määriä endometriumissa. Kohtubiopsiat otettiin päivinä 2 ja 5 gonadoreliinillä indusoidun ovulaation jälkeen. Näytteenottoa varten lehmät rauhoitettiin antamalla suonensisäisesti 15–20 mg ksylytsiinia (Narcoxyl® 20 mg/ml, Intervet Oy, Boxmeer, Alankomaat). Epiduraalipuudutukseen käytettiin

120 mg lidokaiinia (Lidocain® 20 mg/ml, Orion Pharma, Espoo, Suomi). Ulkosynnyttimien alue pestiin useaan kertaan saippualla ja desinfioidiin alkoholilla. Steriilit biopsiapihdit vietiin kohdunkaulan läpi kohtuun peräsuolen kautta ohjailemalla. Endometriumista otettiin pihkien avulla neljä tai viisi palaa molemmilla näytteenottokerroilla. Yksi paloista käsiteltiin immunohistokemiallista tutkimusta varten inkuboimalla 24 tunnin ajan kymmenprosenttisessa fosfaattipuskuroidussa neutraaliformaliinissa 4 °C:n lämpötilassa (näytteen ja formaliinin suhde 1:10). Tämän jälkeen näytettä säilytettiin fosfaattipuskurissa 4 °C:n lämpötilassa viikon ajan, minkä jälkeen se halkaistiin kahteen osaan, kuivattiin, upotettiin parafiiniin ja säilytettiin jääkaapissa analyysiin asti. Loput kolme tai neljä palaa pakastettiin RT-PCR-tutkimuksia varten. Ne upotettiin välittömästi nestemäiseen tyypeen ja säilytettiin -80 °C:ssa RNA:n eristämiseen asti. RT-PCR-tutkimusten tulokset eivät sisälly tähän työhön.

3.6 Immunohistokemialliset tutkimukset

Reseptorien tutkimiseen kudოსleikkeistä käytettiin niin sanottua ABC-menetelmää (avidii-biotiini-kompleksi). Menetelmässä primaarinen vasta-aine tunnistaa reseptori-antigeenin. Biotiinilla leimattu sekundaarinen vasta-aine liitetään primaariseen vasta-aineeseen. Peroksidaasientsyymillä leimattu avidiini sitoutuu sekundaariseen vasta-aineeseen liitettyyn biotiiniin. Peroksidaasi reagoi substraatin kanssa, ja reaktiossa syntävä saostuma voidaan havaita valomikroskoopilla.

Parafiiniin valetut näytepalat pilkottiin mikrotomilla 4 µm:n paksuisiksi leikkeiksi. Ksyleeni- ja alkoholikäsitteilyn jälkeen näytteet kuumennettiin sitraattipuskurissa antigeenin paljastamiseksi. Endogeeninen peroksidaasi salvattiin vetyperoksidilla ja metanolilla. Vasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen estettiin inkuboimalla näytteitä kymmenprosenttisessa hevosen seerumissa. Huuhtelun jälkeen näytteitä inkuboitii yön yli primäärin vasta-aineen kanssa. Primaari vasta-aine progesteronireseptoreille oli hiiren monoklonaalinen IgG2a, klooni 3a9 (Dianova-Immunotech, Hampuri, Saksa), estrogeenireseptori-α:lle hiiren monoklonaalinen IgG2a Ab-8, klooni AER311 (Lab Vision Corporation, Fremont, USA) ja COX-2-entsyymille hiiren monoklonaalinen IgG, klooni 33 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Negatiivisena kontrollina oli hiiren monoklonaalinen vasta-aine MsIgG2a. Seuraavana päivänä näytteitä inkuboitii sekun-

daarisen biotinyloidun vasta-aineen kanssa (anti-hiiri IgG, Ba-2000, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Pesun jälkeen näytteitä inkuboitiin streptavidiini-peroksidaasi-liuoksessa (ABC-system, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Lopuksi näytteitä inkuboitiin substraatin kanssa (Nova RED, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Leikkeet värjättiin hematoksyliinillä ja tutkittiin valomikroskoopilla.

Progesteronireseptorien ja estrogeenireseptori- α :n määrän selvittämiseksi tutkittiin jokaisen näytteen osalta 500 solun värjäytyminen seuraavista endometriumin solutyypeistä: pintaepiteeli, endometriumin rauhaset, rauhasen laskuaukot ja strooman solut. Jos tutkittavaa solutyyppeä oli näytteessä vähemmän kuin 500 solua, kaikki laskettiin ja määrä kirjattiin ylös. Reseptoreiden värjäytyminen arvosteltiin asteikolla negatiivinen (0), heikko (1), keskinkertainen (2) ja voimakas (3). Tilastollisessa käsittelyssä värjäytyneiksi laskettiin ne solut, joiden värireaktio oli keskinkertainen tai voimakas. COX-2-entsyymin määrän selvittämiseksi tutkittiin seuraavien endometriumin solutyyppeiden värjäytyminen: pintaepiteeli, endometriumin pinnalliset rauhaset, endometriumin syvät rauhaset, rauhasen laskuaukot, pinnallinen strooma ja syvä strooma. Värjäytymisen voimakkuus arvosteltiin samalla asteikoilla kuin steroidireseptorit.

3.7 Tilastollinen analyysi

Seerumin hormonipitoisuuksien vertailuun lyhyiden ja normaalipituisten kiimakiertojen ryhmien välillä käytettiin toistomittausten varianssianalyysiä. Koska korrelaatiot ryhmien sisällä eri ajankohtien välillä eivät olleet samanlaiset, P-arvojen laskennassa käytettiin Greenhouse-Geisserin korjauksia. Erot dominoivan follikkelin koossa analysoitiin riippumattomien otosten t-testillä. Immunohistokemiallisten tutkimusten tulokset analysoitiin Mann-Whitneyn U-testillä. Tulokset ilmoitetaan keskiarvona (\pm keskihajonta). Eroa pidettiin tilastollisesti merkitsevänä, kun $P < 0,05$.

4 TULOKSET

4.1 Kiimakierron pituus ja munasarjalöydökset

Tuloksissa on mukana yhteensä 13 kiimakiertoa kymmeneltä eri lehmältä. Yksi kiimakierto jätettiin tulosten analysoinnin ulkopuolelle, koska PG-pistos ei aiheuttanut luteolyyysiä.

Kokeessa havaittiin selkeästi kahdenlaisia kiimakiertoja: lyhyitä ja normaalipituisia. Kahden kiimakierron tarkkaa pituutta ei voitu määrittää, koska ne eivät päättäneet ovulaatioon. Toinen näistä kierroista oli lyhyt ja toinen normaalipituinen. Lyhyitä kiimakiertoja oli kahdeksan (8/13), ja niiden pituus vaihteli 8–12 vuorokauden välillä ollen keskimäärin $8,7 \pm 0,6$ vuorokautta. Normaalipituisia kiertoja oli viisi (5/13), ja niiden pituus vaihteli 18–21 vuorokauden välillä ollen keskimäärin $20,0 \pm 1,5$ vuorokautta. Tulosten jatkokäsittelyä varten eläimet jaettiin kiimakierron pituuden mukaan kahteen ryhmään, lyhyisiin ja normaalipituisiin kiimakiertoihin.

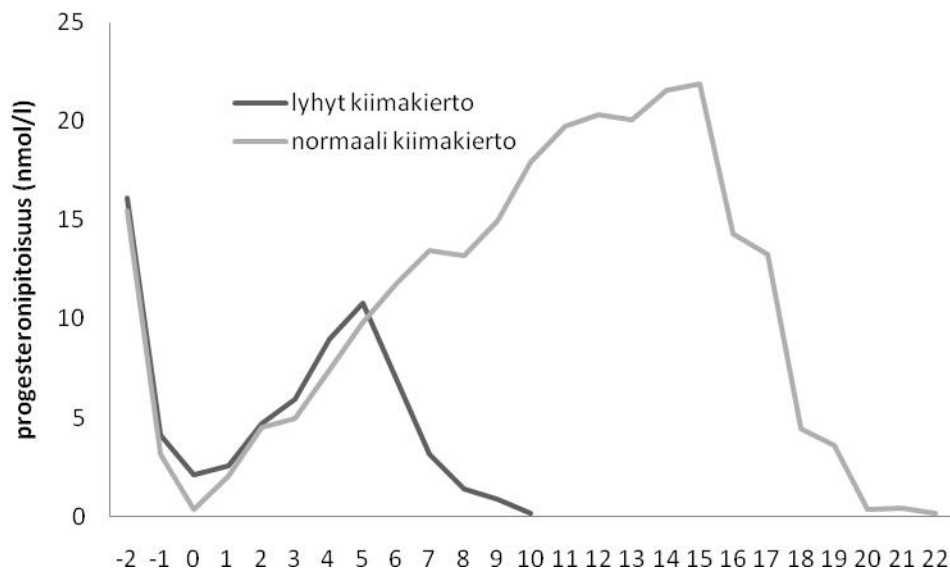
Ovulaatio tapahtui kaikilla lehmillä 24–36 tunnin kuluttua GnRH-pistoksesta. Dominoivan follikkelin keskimääräisessä koossa ei ollut eroa lyhyen ja normaalin kiimakierron ryhmien välillä PG- ja GnRH-pistosten aikaan, eikä 24 tuntia GnRH-pistoksen jälkeen, jolloin ovuloituva follikkeli nähtiin kaikilla lehmillä viimeisen kerran. Ovuloituvan follikkelin keskimääräinen koko lyhyiden kiimakiertojen ryhmässä oli $17,6 \pm 2,5$ mm ja normaalipituisien kiertojen ryhmässä $18,4 \pm 2,5$ mm.

4.2 Hormonitutkimukset

4.2.1 Plasman progesteronipitoisuus

Kuva 1 esittää plasman progesteronipitoisuuden muutoksia ovulaation jälkeen lyhyiden ja normaalipituisien kiimakiertojen ryhmissä. Keskimääräinen plasman progesteronipitoisuus oli kiimakierron päivänä 8 annetun PG-pistoksen aikaan samankaltainen sekä lyhyiden ($16,1 \pm 4,2$ nmol/l) että normaalipituisien syklien ryhmässä ($15,5 \pm 5,9$ nmol/l).

Progesteroni saavutti alimman pitoisuutensa 48 tuntia PG-pistoksen jälkeen sekä lyhyiden ($2,1 \pm 1,3 \text{ nmol/l}$) että normaalipituisten syklien ryhmässä ($0,4 \pm 0,3 \text{ nmol/l}$). Progesteronipitoisuus alkoi suurentua ja saavutti lyhyiden syklien ryhmässä maksiminsa ($10,8 \pm 3,8 \text{ nmol/l}$) neljä ($n=2$), viisi ($n=4$) tai kuusi ($n=2$) päivää ovulaation jälkeen. Normaalipituisten syklien ryhmässä maksimi ($21,9 \pm 7,6 \text{ nmol/l}$) saavutettiin 11 ($n=1$), 12 ($n=1$), 14 ($n=1$) tai 15 ($n=2$) päivää ovulaation jälkeen. Tämän jälkeen progesteronipitoisuus alkoi taas laskea ja jatkoi laskuaan uuteen kiimaan asti.

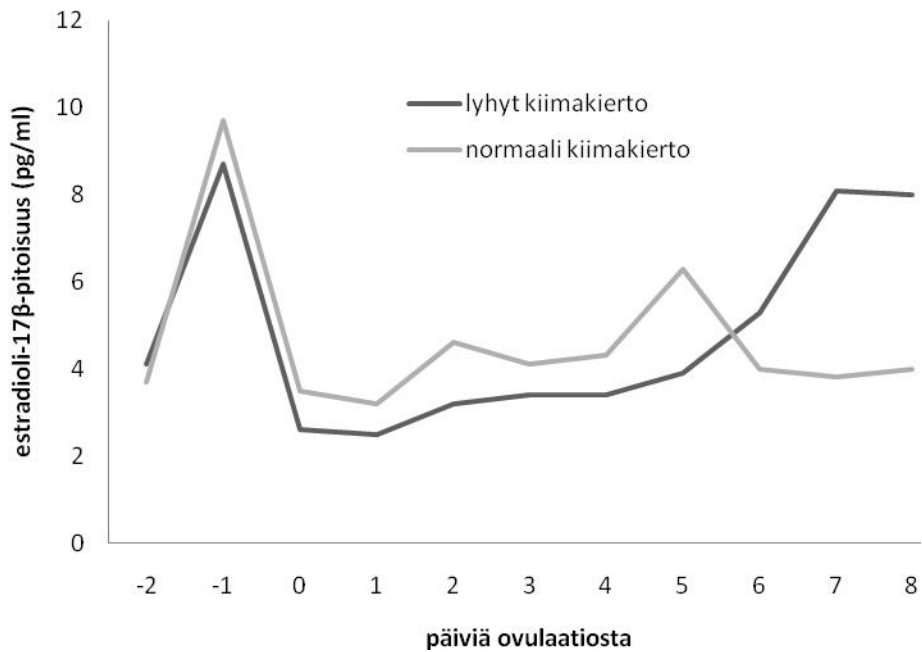


Kuva 1. Plasman keskimääräinen progesteronipitoisuus lyhyiden ja normaalipituisten kiimakiertojen ryhmissä ovulaation jälkeen.

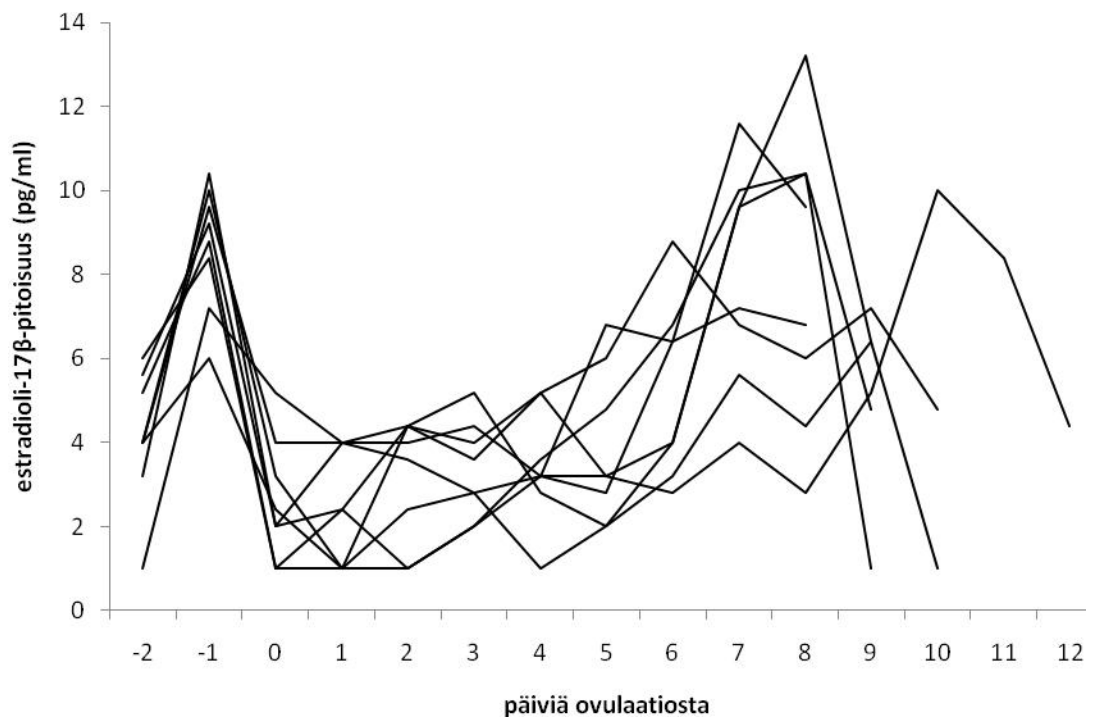
4.2.2 Plasman estradioli-17 β -pitoisuus

Kuvassa 2 on esitetty keskimääräiset plasman estradioli-17 β -pitoisuudet päivinä -2–8 ovulaatiosta eläimillä, joilla oli lyhyt kiimakierto, sekä eläimillä, joilla oli normaali kiimakierto. Kuvassa 3 on esitetty kaikkien lyhyen kiimakierron eläinten päivittäiset estradioli-17 β -pitoisuudet alkaen kaksi päivää ennen ovulaatiota aina seuraavaan ovulaatioon saakka, ja kuvassa 4 vastaavasti kaikkien niiden eläinten, joilla oli normaali kiimakierto. Lyhyiden ja normaalipituisten kiimakiertojen ryhmien estradiolieritys päivinä -2–8 ovulaatiosta erosi merkitsevästi siten, että siinä oli havaittavissa sekä taso- ($P < 0,001$) että profiiliero ($P < 0,001$). Tarkasteltaessa eroja yksittäisten päivien osalta päivänä 7 lyhyen

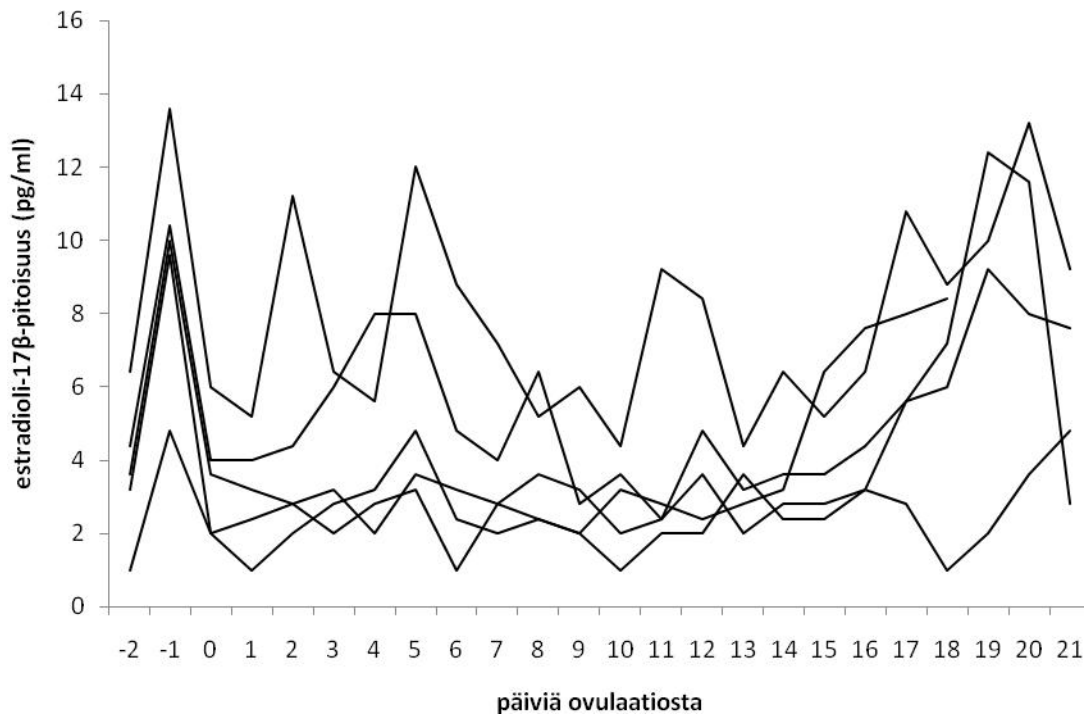
syklin eläimet erittivät merkittävästi enemmän estradiolia.



Kuva 2. Plasman estradioli-17β-pitoisuus lyhyiden ja normaalipituisten kiimakiertojen ryhmässä -2–8 päivää ovulaatiosta.



Kuva 3. Kaikkien lyhyen kiimakierron eläinten estradioli-17β-pitoisuudet alkaen kaksi päivää ennen ovulaatiota seuraavaan ovulaatioon asti.

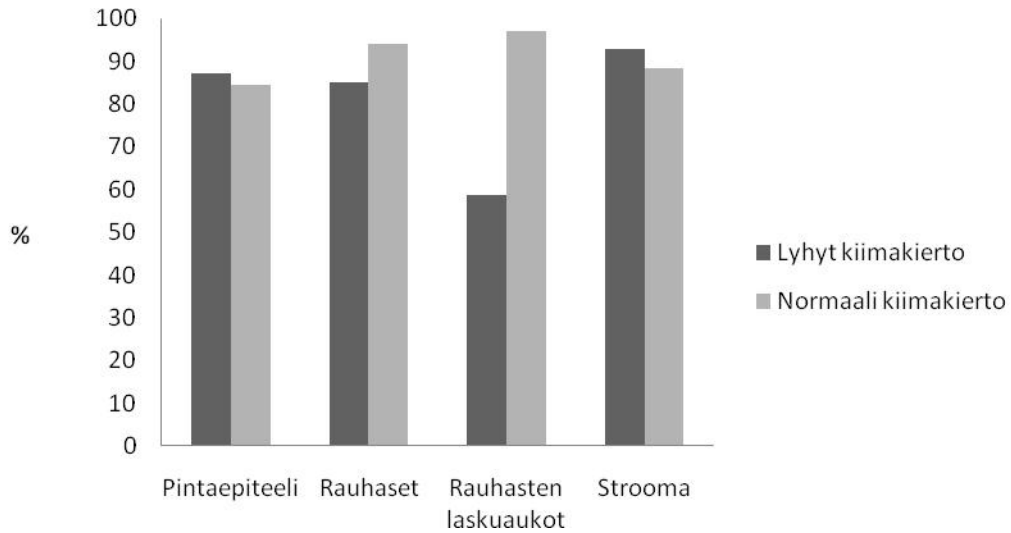


Kuva 4. Kaikkien normaalin kiimakierron eläinten estradioli-17 β -pitoisuudet alkaen kaksi päivää ennen ovulaatiota seuraavaan ovulaatioon asti.

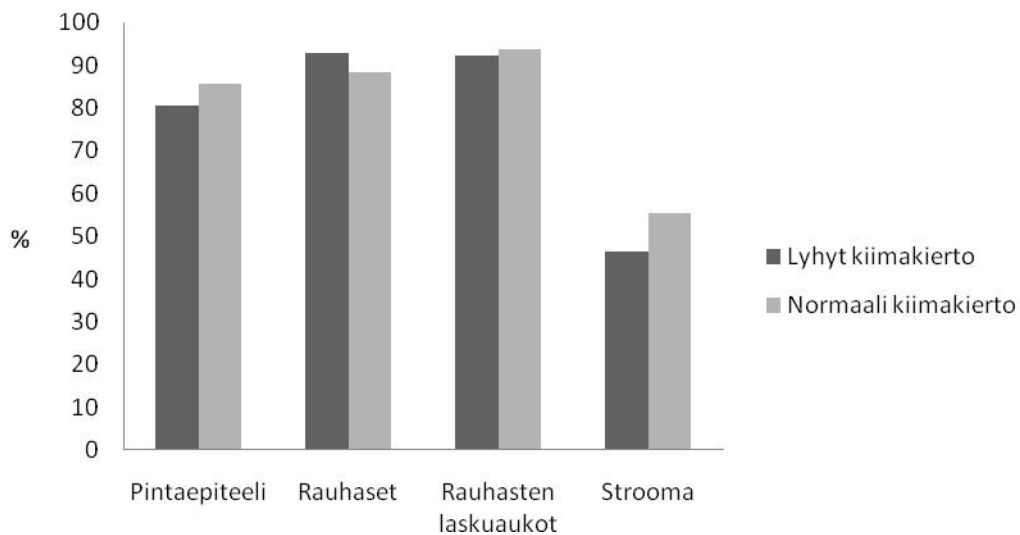
4.3 Immunohistokemialliset tutkimukset

4.3.1 Progesteronireseptorit

Progesteronireseptorien värjäytyminen endometriumin pintaepiteelin, rauhasen, rauhasen laskuaukkojen ja strooman soluissa oli hyvin samankaltaista sekä lyhyiden että normaaliin kiimakiertojen ryhmässä. Progesteronireseptorien värjäytymisessä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa myöskään kiimakierron päivinä 2 ja 5 otettujen biopsioiden välillä. Kuvat 5 ja 6 esittävät värjäytyneiden solujen osuuden kaikista tutkituista soluista solutyyppittäin erikseen lyhyiden ja normaalipituisten kiimakiertojen ryhmien osalta päivinä 2 ja 5.



Kuva 5. Värjäytyneiden solujen osuus kaikista tutkituista soluista solutyypeittäin progesteronireseptorien osalta kiimakierron päivänä 2.

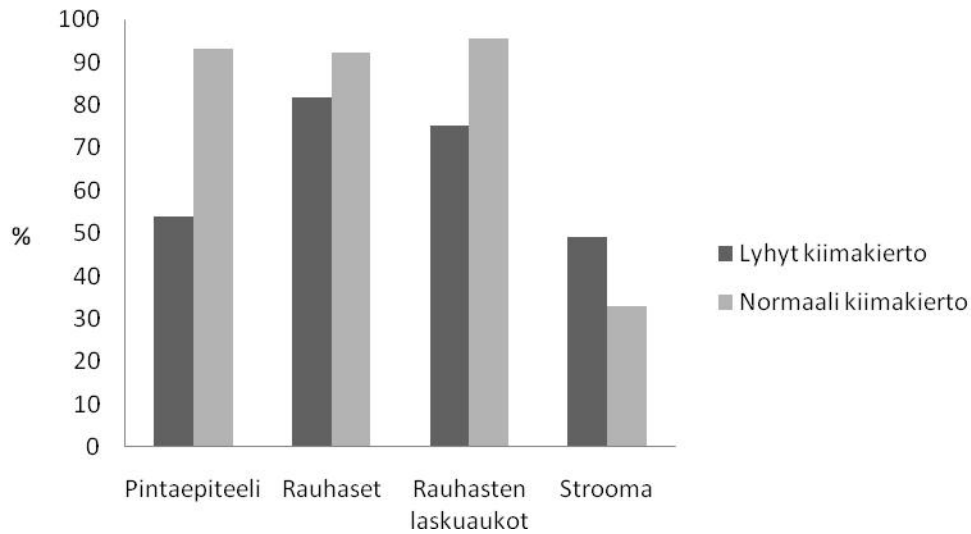


Kuva 6. Värjäytyneiden solujen osuus kaikista tutkituista soluista solutyypeittäin progesteronireseptorien osalta kiimakierron päivänä 5.

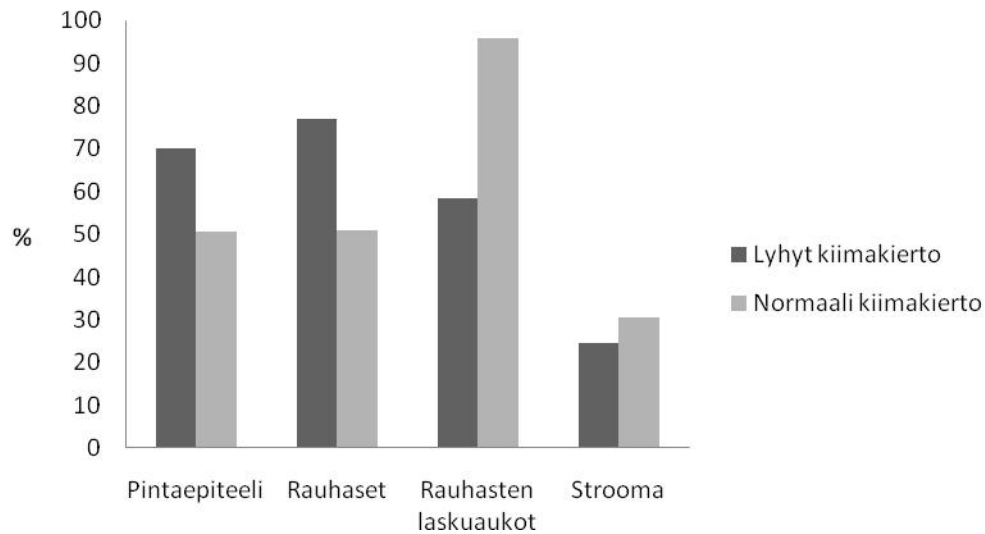
4.3.2 Estrogeenireseptori- α

Estrogeenireseptori- α :n värjäytymisessä havaittiin pieniä eroja eri ryhmien ja eri päivinä otettujen biopsioiden välillä, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Kuvat 7 ja 8 esittävät värjäytyneiden solujen osuuden kaikista tutkituista soluista solutyypeittäin

erikseen lyhyiden ja normaalipituisten kiimakiertojen ryhmien osalta päivinä 2 ja 5.



Kuva 7. Värjäytyneiden solujen osuus kaikista tutkituista soluista solutyypeittäin estrogeenireseptori- α :n osalta kiimakierron päivänä 2.



Kuva 8. Värjäytyneiden solujen osuus kaikista tutkituista soluista solutyypeittäin estrogeenireseptori- α :n osalta kiimakierron päivänä 5.

4.3.3 COX-2-entsyymi

Endometriumin COX-2-pitoisuudessa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa lyhyiden ja normaalien kiimakiertojen ryhmien tai eri päivinä otettujen biopsioiden välillä.

5 POHDINTA

Lyhyiden kiimakiertojen esiintyvyys (8/13) oli suurempi kuin Taposen ym. (2002) aikaisemmassa tutkimuksessa (4/12), jossa käytettiin täysin vastaavia hormonikäsittelyitä. Koska kyse on näin pienistä eläinmääristä, sattuma voi selittää eron. Lyhyiden kiimakiertojen pituus oli samaa luokkaa kuin Taposen ym. (2002) tutkimuksessa.

Plasman progesteronipitoisuus oli päivänä 8 annetun PG-pistoksen aikaan samanlainen riippumatta siitä, oliko lehmälle tulossa indusoidun ovulaation jälkeen lyhyt vai normaalipituinen kiimakierto. Tämä vahvistaa käsitystä, että PG:lla ja GnRH:lla indusoidut lyhyet kiimakerrot eroavat puberteetin aikana ja ensimmäisen poikimista seuraavan ovulaation jälkeen havaituista lyhyistä kiimakerroista. Puberteetin ja poikimisen jälkeisen ajan lyhyitä kiertoja yhdistää edeltävän progesteronivaikutuksen puute, ja ovulaatiota edeltävä progestageenikäsittely estää ennenaikaisen luteolyysin (Garverick ym. 1992). Edeltävä progesteronivaikutus ei estä indusoitujen lyhyiden kiimakiertojen syntyä (Stevens ym. 1993; Taponen ym. 1999; Taponen ym. 2002), mikä tuli esiin myös meidän tutkimuksessamme.

Plasman estradiolipitoisuudessa oli kiimakierron päivinä -2–8 selvä taso- ja profiiliero lyhyiden ja normaalipituisten kiertojen välillä. Yksittäisiä päiviä tarkasteltaessa ryhmien estradiolierityksessä oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä ero ainoastaan päivänä 7, jolloin lyhyen kierron eläinten estradiolipitoisuus oli suurempi kuin normaalin kierron eläinten. Tulos eroaa Garverickin ym. (1988) havainnosta, että lyhyttä kiertoa edeltävän kiiman aikainen estradiolipitoisuus on pienempi kuin normaalipituista kiertoa edeltävän. He tutkivat vastapoikineita liharotuisia lehmiä vasikoiden varhaisen vieroittamisen jälkeen. Lyhyttä kiertoa edeltävän pienen estradiolipitoisuuden on arveltu olevan yhteydessä ennenaikaiseen oksitosiinireseptorien synteesiin ja PGF_{2α}:n vapautumiseen. Tuloksemme osoittaa, että lyhyiden kiimakiertojen taustalla täytyy olla muita tekijöitä kuin kiiman aikainen pieni estradiolipitoisuus.

Endometriumin steroidireseptorien tai COX-2-entsyymien värjäytymisessä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa lyhyiden ja pitkien kiimakiertojen tai eri päivinä otettujen biopsioiden välillä. Tämä johtuu todennäköisesti pienestä aineistokoosta ja käytetyn värjäysmenetelmän epätarkkuudesta. Zollers ym. (1993) raportoivat, että lyhyen kiima-

kierron päivänä 5 endometriumiassa on vähemmän progesteronireseptoreita kuin normaalipituisten kiimakierron päivänä 5. Endometriumin reseptoriekspressiosta lyhyiden kiertojen aikana kaivataan lisää tutkimustietoa, koska reseptoridynamiikan selvittäminen on avain lyhyiden kiertojen syntymekanismin ymmärtämiseen.

6 KIRJALLISUUS

Anderson L.L., Bland K.P., Melampy R.M. Comparative aspects of uterine-luteal relationships. *Recent Progress in Hormone Research* 1969; 25: 57–104.

Armstrong D.T., Hansel W. Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin. *Journal of Dairy Science* 1959; 42: 533–542.

Arosh J.A., Parent J., Chapdelaine P., Sirois J., Fortier M.A. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 161–169.

Barcikowski B., Pichova D., Skarda J., Jerlicka L. The oestrous cycle in cattle after transplantation of the ovary. *Proc. Symp. RIA in Anim. Physiol. Slovak Acad. Sci., Kosice & Czech Acad. Sci., Prague* 1976: 89–100.

Boos A., Meyer W., Schwarz R., Grunert E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Animal Reproduction Science* 1996; 44: 11–21.

Cerbito W.A., Miyamoto A., Sauerwein H., Wijayaguardane M.P.B., Ohtani M., Takagi M. ym. Evidence for uterine horn differences in local concentrations of oxytocin, oxytocin receptor and prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the estrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction in Domestic Animals* 1997; 32: 161–165.

Charpigny G., Reinaud P., Tamby J.P., Creminon C., Martal J., Maclouf J., Guillomot

M. Expression of cyclo-oxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 1997; 138: 2163–2171.

Cooper D.A., Carver D.A., Villeneuve P., Silvia W.J., Inskip E.K. Effects of progestogen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 411–421.

Copelin J.P., Smith M.F., Garverick H.A., Youngqvist R.S. Effect of the uterus on subnormal luteal function in anestrous beef cows. *Journal of Animal Science* 1987; 64: 1506–1511.

Copelin J.P., Smith M.F., Keisler D.H., Garverick H.A. Effect of active immunization of prepartum and postpartum cows against prostaglandin $F_{2\alpha}$ on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. *Journal of Reproduction and Fertility* 1989; 87: 199–207.

Davis A.J., Fleet I.R., Harrison F.A., Maule Walker F.M. Pulmonary metabolism of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the conscious non-pregnant ewe and sow. *Journal of Physiology* 1980; 301: 86.

Davis A.J., Fleet I.R., Hansford P.A., Harrison F.A., Maule Walker F.M. Pulmonary metabolism of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the conscious non-pregnant cow. *Journal of Physiology* 1985; 358: 107.

Day M.L., Dyer R.M., Wilson G.W., Pope W.F. Influence of estradiol on duration of anestrus and incidence of short estrous cycles in postpartum cows. *Domestic Animal Endocrinology* 1990; 7: 111–124.

Dellmann H.-D., Carithers J.R. *Cytology and Microscopic Anatomy*. Williams & Wilkins, Philadelphia 1996: 270–273.

Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. *Textbook of Veterinary Anatomy*. 3. painos. Saunders, Philadelphia 2002.

Fitz A., Mayan M.H., Sawyer H.R., Niswender G.D. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction* 1982; 27: 703–722.

Fortier M.A., Guilbaut L.A., Grasso F. Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 1988; 83: 239–248.

Garverick H.A., Smith M.F. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *Journal of Animal Science* 1986; 62: 92–105.

Garverick H.A., Parfet J.R., Lee C.N., Copelin J.P., Youngqvist R.S., Smith M.F. Relationship of pre- and post-ovulatory gonadotropin secretion to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science* 1988; 66: 104–111.

Garverick H.A., Zollers W.G., Smith M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Animal Reproduction Science* 1992; 28: 111–124.

Goff A.K. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 11–16.

Hixon J.E., Hansel W. Evidence for preferential transfer of prostaglandin F_{2α} to the ovarian artery following intrauterine administration in cattle. *Biology of Reproduction* 1974; 11: 543–552.

Horn S., Bathgate R., Lioutas C., Bracken K., Ivell R. Bovine endometrial epithelial cells as a model system to study oxytocin receptor regulation. *Human Reproduction Update* 1998; 4: 605–614.

Jenner L.J., Parkinson T.J., Lamming G.E. Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 91: 49–58.

Kimmins S., MacLaren L.A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 2001; 22: 742–748.

Knickerbocker J.J., Wiltbank M.C., Niswender G.D. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domestic Animal Endocrinology* 1988; 5: 91–107.

Kombé A., Sirois J., Goff A.K. Prolonged progesterone treatment of endometrial epithelial cells modifies the effect of oestradiol on their sensitivity to oxytocin. *Steroids* 2003; 68: 651–658.

Lafrance M., Goff A.K. Effects of progesterone and oestradiol-17 β on oxytocin-induced release of prostaglandin F_{2 α} . *Journal of Reproduction and Fertility* 1988; 82: 429–436.

Lamming G.E., Mann G.E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin PGF_{2 α} production in the cow by progesterone and oestradiol. *Journal of Reproduction and Fertility* 1995; 103: 69–73.

Leung S.T., Wathes D.C. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 119: 287–292.

Loeb L. The effect of extirpation of the uterus on the life and function of the corpus luteum in guinea pigs. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1923; 20: 441–443.

Mann G.E. Hormone control of prostaglandin F_{2 α} production and oxytocin receptor concentrations in bovine endometrium in explant culture. *Domestic Animal Endocrinology* 2001; 20: 217–226.

Mann G.E., Lamming G.E. Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow. *Veterinary Record* 1994; 22:403–405.

Mann G.E., Lamming G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Animal*

Reproduction Science 2000; 64: 171–180.

Mann G.E., Lamming G.E. Timing of prostaglandin $F_{2\alpha}$ release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. *Animal Reproduction Science* 2006; 93: 328–336.

Mann G.E., Payne J.H., Lamming G.E. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin $F_{2\alpha}$ secretion by the bovine and ovine uterus *in vivo*. *Domestic Animal Endocrinology* 2001; 21: 127–141.

McCracken J.A. Hormone receptor control of $PGF_{2\alpha}$ secretion by the ovine uterus. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research* 1980; 8: 1329–1344.

McCracken J.A., Custer E.E., Lamsa J.C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiological Reviews* 1999; 79: 263–323.

Meyer H.H., Mittermeier T., Schams D. Dynamics of oxytocin, estrogen and progesterin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* 1988; 118: 96–104.

Milvae R.A., Hinckley S.T., Carlson J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996; 45: 1327–1349.

Niswender G.E., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K., McIntush E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 2000; 80: 1–29.

Odde K.G., Ward H.S., Kiracofe G.H., McKee R.M, Kittok R.J. Short estrous cycles and associated serum progesterone levels in beef cows. *Theriogenology* 1980; 14: 105–112.

Oyedipe E.O., Gustafsson B., Kindahl H. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin $F_{2\alpha}$ during the oestrous cycle of oxytocin treated cows. *Theriogenology* 1984; 22: 329–339.

Peter A.T., Bosu W.T., Liptrap R.M., Cummings E. Temporal changes in serum prostaglandin F_{2α} and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. *Theriogenology* 1989; 32: 277–284.

Rantala M.H., Katila T., Taponen J. Effect of time interval between prostaglandin F_{2α} and GnRH treatments on occurrence of short estrous cycles in cyclic dairy heifers and cows. *Theriogenology* 2009a; 71: 930–938.

Rantala M.H., Peltoniemi O.A., Katila T., Taponen J. Effect of GnRH dose on occurrence of short oestrous cycles and LH response in cyclic dairy heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 2009b; 44: 647–652.

Robinson R.S., Mann G.E., Lamming G.E., Wathes D.C. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *Journal of Endocrinology* 1999; 160: 21–33.

Robinson R.S., Mann G.E., Lamming G.E., Wathes D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 2001; 122: 965–979.

Schams D., Schallenberger E., Meyer H.H.D., Bullerman B., Breitingner H-J., Enzenhoffer G., Koll R., Kruip T.A.M., Walter D.L., Karg H. Ovarian oxytocin during the estrous cycle in cattle. Teoksessa: Amico J.A. & Robinson A.G. (toim.) *Oxytocin, Clinical and Laboratory Studies*. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam 1985: 317–334.

Schmitt E.J., Diaz T., Drost M., Thatcher W.W. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of Animal Science* 1996; 74: 1084–1091.

Senger P.L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2. painos. Current Conceptions, Inc. 2003.

Soloff M.S., Fields M.J. Changes in uterine oxytocin receptor concentrations throughout the estrous cycle of the cow. *Biology of Reproduction* 1989; 40: 283–287.

Spencer T.E., Bazer F.W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 1527–1543.

Stevens R.D., Seguin B.E., Momont H.W. Simultaneous injection of PGF_{2α} and GnRH into diestrous dairy cows delays return to estrus. *Theriogenology* 1993; 39: 373–380.

Taponen J., Katila T., Rodríguez-Martínez H. Induction of ovulation with gonadotropin-releasing hormone during proestrus in cattle: influence on subsequent follicular growth and luteal function. *Animal Reproduction Science* 1999; 55: 91–105.

Taponen J., Kulcsár M., Katila T., Kátai L., Huszenicza G., Rodríguez-Martínez H. Short estrous cycles and estrous signs after premature ovulations induced with cloprostenol and gonadotropin-releasing hormone in cyclic dairy cows. *Theriogenology* 2002; 58: 1291–1302.

Thatcher W.W., Terqui M., Thimonier J., Mauleon P. Effect of estradiol-17 beta on peripheral plasma concentrations of 15-keto-13,14-dihydro PGF_{2α} and luteolysis in cyclic cattle. *Prostaglandins* 1986; 31: 745–756.

Villa-Godoy A., Ireland J.J., Wortman J.A., Ames N.K., Hughes T.L., Fogwell R.L. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. *Journal of Animal Science* 1985; 60: 517–527.

Ward K.E., Longwell L.C., Kreider J.L., Godke R.A. Effect of unilateral hysterectomy on cycling beef heifers. *Journal of Animal Science* 1976; 43: 309.

Wathes D.C., Lamming G.E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1995; 49: 53–67.

Woody C.O., First N.L., Pope A.L. Effect of exogenous progesterone on estrous cycle length. *Journal of Animal Science* 1967; 26: 139–141.

Xiao C., Goff A.K. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999; 115: 101–109.

Zollers W.G., Garverick H.A., Smith M.F. Oxytocin-induced release of prostaglandin F_{2α} in postpartum beef cows: comparison of short versus normal luteal phases. *Biology of Reproduction* 1989; 41: 262–267.

Zollers W.G., Garverick H.A., Youngquist R.S., Ottobre J.S., Silcox R.W., Copelin J.P., Smith M.F. *In vitro* secretion of prostaglandins from endometrium of postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. *Biology of Reproduction* 1991; 44: 522–526.

Zollers W.G., Garverick H.A., Smith M.F., Moffatt R.J., Salfen B.E., Youngqvist R.S. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short of normal oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 97: 329–337.