

Induktion av persisterande gulkropp hos sto – en framtida metod för att dämpa brunstrelaterade störningar?

Malin Santesson

**Handledare: Hans Kindahl
Biträdande handledare: Ylva Hedberg
Inst. för kliniska vetenskaper**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning/Summary	4
Litteraturstudie	6
<i>Inledning</i>	6
<i>Reproduktionsfysiologi</i>	6
Förlängd lutealfas	8
<i>Corpus luteum</i>	8
<i>Normal luteolys</i>	8
<i>Definitioner</i>	11
<i>Orsaker till förlängd lutealfas</i>	11
Experimentell studie	16
<i>Inledning</i>	16
Material och metoder	16
<i>Utförande</i>	16
<i>Stomaterial</i>	17
<i>Analyser och uppmätta parametrar</i>	17
Resultat	18
<i>Intensivstudiens försöksgrupp</i>	18
<i>Intensivstudiens kontrollgrupp</i>	26
<i>Fältstudien</i>	31
Diskussion	32
Tack	35
Litteraturförteckning	36

SAMMANFATTNING

Uppsatsen börjar med en sammanställning av litteratur som tar upp stons normala reproduktionsfysiologi, normal luteolys och olika orsaker till förlängd lutealfas. I uppsatsen redovisas också en studie där det undersökts om behandling med humant choriogonadotropin (hCG) under lutealfas hos ston orsakar en förlängd lutealfas och på så sätt förhindrar brunst. Studien bestod av två delar: en intensivstudie av åtta ston på f.d. institutionen för obstetrik och gynekologi (numera institutionen för kliniska vetenskaper), SLU, Uppsala och en fältstudie av sju ston på ett stuteri sju mil norr om Uppsala. De ston som ingick i intensivstudien delades in i en försöksgrupp som injicerades med hCG under lutealfas när de hade en follikel > 30 mm och en kontrollgrupp som injicerades med NaCl. Stona undersöktes med ultraljud och blodprover, som analyserades för progesteron. I fältstudien injicerades endast två ston med NaCl, övriga ston fick hCG. Dessa ston studerades med ultraljud under en kortare period efter injektionen.

Studien visar att det finns ett antal begränsningar med denna behandlingsmetod med hCG för att förhindra brunst. Endast två av de behandlade stona i intensivstudien visade en förlängd lutealfas. Två av stona i fältstudien visade också symptom på förlängd lutealfas, men detta konfirmerades aldrig med blodprover för analys av progesteron. Några av stona fick aldrig folliklar > 30 mm under lutealfas och de ston med folliklar < 30 mm, som behandlades med hCG ovulerade inte. Inte heller inträffade ovulation om hCG gavs för tidigt under lutealfasen. Ett sto ovulerade tidigt i lutealfas, men den bildade gulkroppen försvann ett par dagar senare i samband med luteolys.

Slutsatsen av studien blir att denna metod för att förhindra brunst fungerar om hCG ges till stona dag 11 eller senare post ovulation och om de då har en follikel som är > 30 mm, samt att denna follikel är mogen för ovulation.

SUMMARY

This article starts with a review of the literature regarding the normal reproductive physiology of the mare, normal luteolysis, different causes of prolonged luteal phase and theories behind these. The article also presents a study where it was examined if treatment with human choriongonadotropic hormone (hCG) during the luteal phase induces prolonged luteal phase in mares, thus preventing estrus. The study consisted of two parts: one intensive study of eight mares at the former Department of Obstetrics and Gynaecology at SLU, Uppsala, Sweden and one field study of seven mares at a stud farm 70 km north of Uppsala. The mares in the intensive study were divided in two groups: one with four mares that were injected with hCG in luteal phase when they had a follicle of minimum 30 mm and a second group with four mares that were injected with sodium chloride at the same time. These mares were examined with ultrasonography and blood samples. The blood samples were analyzed for progesterone with a solid phase radioimmunoassay. In the field study only two mares were injected with NaCl and the remaining with hCG. These mares were only observed by ultrasonography and only during a short period after treatment.

The study showed that there are several limitations with this kind of treatment to prevent estrus in mares. Only two of the mares in the intensive study treated with hCG showed prolonged luteal activity. Also two of the mares in the field study had signs of a prolonged luteal phase, but this was never confirmed with plasma analysis for progesterone. Some of the mares seldom or never had follicles > 30 mm during luteal phase and those that were treated with hCG and had follicles < 30 mm did not ovulate. Furthermore, if hCG was injected too early in the luteal phase, no ovulations occurred. One mare did ovulate, but the corpus luteum of that ovulation disappeared during luteolysis a few days later.

In conclusion, this method to prevent estrous in mares works if you give hCG to mares day 11 or later post ovulation and if there is a follicle of a minimum 30 mm and that this follicle is mature to ovulate.

LITTERATURSTUDIE

Inledning

En av de vanligaste orsakerna till anöstrus under den reproduktiva säsongen hos ston är förlängda lutealfaser av olika anledningar. Syftet med denna studie är att ge klarhet i begreppet förlängd lutealfas och orsakerna till denna. Uppsatsen inleds dock med en beskrivning av den normala reproduktionsfysiologin, med tyngdpunkt på progesteronfasen och den avslutande luteolysen.

Reproduktionsfysiologi

Ston är säsongsmässigt polyöstrala och har, på norra hemisfären, sin aktiva period under sommaren. Brunstcykeln är 20-23 dagar (Noakes, 2001) eller $18,5 \pm 3,4$ dagar (Stabenfeldt *et al*, 1971). I en studie där sammanlagt 333 brunstcykler studerades var de interovulatoriska intervallen längre under november till mars och var i genomsnitt 20,6 dagar (Hughes *et al*, 1972). En brunstcykel delas in i östrus och diöstrus, eller follikelfas och progesteronfas. Vidare finns en inledning till östrus i form av proöstrus. Enligt studien av Hughes *et al*, 1972, varar östrus i 5,7 dagar och diöstrus är 15,4 dagar lång (Hughes *et al*, 1972).

Stabenfeldt *et al*, 1971, beskriver att ovulation sker $4,6 \pm 1,5$ dagar in i östrus. Den preovulatoriska follikelstorleken varierar under året enligt en studie gjord av Ginther & Pierson, 1989. Denna studie visade att den preovulatoriska follikelstorleken är minst mitt i sommaren och varierar mellan 42-48 mm (35-55 mm enligt Hughes *et al*, 1972). Enligt Hughes *et al*, 1980, visade det sig att det oftast var den follikel som var störst vid början av östrus som växte till och ovulerade, men det förekom även att mindre folliklar växte om och ovulerade. Ovulation inträffade från tre dagar före brunstens slut till tre dagar efter. Sjuttioåtta procent inträffade 24 timmar före eller efter brunstens slut (Hughes *et al*, 1980). Efter ovulation sker en regression av övriga folliklar och dag 4-9 post ovulation är inga folliklar $> 1\text{cm}$ (Noakes, 2001). Gulkroppen (corpus luteum) bildas snabbt efter ovulationen och kvarstår i 12-13 dagar. Den luteala aktiviteten avslutas dag 15 post ovulation (Hughes *et al*, 1972).

Den reproduktiva säsongen styrs av ljuset via melatoninfrisättning från epifysen, vilket i sin tur påverkar hypothalamus produktion av GnRH (gonadotropin frisättande hormon). GnRH stimulerar hypofysen att syntetisera FSH (follikel stimulerande hormon) och LH (luteiniserande hormon), vilka på olika sätt har effekt på ovariernas follikulogenes, follikelmognad, ovulation och bildandet av en gulkropp. Ovarierna har i sin tur effekt på hypofysen via sin östrogen- och progesteronproduktion (Noakes, 2001).

Inom 24 timmar efter ovulation har den bildade gulkroppen kommit igång med sin progesteronproduktion. Progesteronnivåerna når maximala värden dag 5-6 och sjunker till under 1 ng/ml^1 inom 48 timmar efter luteolys (Hughes *et al*, 1972). Progesteron avbryter brunst, men hämmar ej follikeltillväxt helt och hållet (Hughes *et al*, 1980). FSH förhöjs under två faser under brunstcykeln. Den första

¹ I denna text används ng/ml eller nmol/l beroende på vilken artikel som det refereras till. Omvandlingen mellan dessa är ungefär $1\text{ ng/ml} = 3\text{ nmol/l}$.

höjningen ses i sen östrus till tidig lutealfas och den andra ses mitt i diöstrus, 10-13 dagar före nästa ovulation (Evans & Irvine, 1975). Även LH kvarstår högt ett par dagar post ovulation, vilket tros ha betydelse för den tidiga höjningen av progesteron (Ginther, 1992). Man tror att denna LH-peak är ett svar på positiv feedback från de höga östradiolnivåerna under östrus. Dock finns det även de som menar att progesteron har en negativ feedback på LH och att det därför successivt börjar stiga i samband med att progesteron sjunker vid luteolysen (Evans & Irvine, 1975). LH är därefter lågt under dag 5-16 post ovulation för att sedan stiga successivt. LH kvarstår högt under hela östrus, vilket tros ha betydelse för den slutliga tillväxten och mognaden av den preovulatoriska follikeln (Hughes *et al*, 1980). Vid luteolysen ser man en stegring av PGF_{2α}-frisättningen och en samtidig sänkning av progesteron (Neely *et al*, 1979). Östrogen når maximala nivåer 2 dagar före ovulation, för att återigen vara nere på minimivärden två dagar efter ovulation. Östrogen leder till brunstbeteende och förändrar könsvägarna så att spermatransport underlättas (Hughes *et al*, 1980). Stabenfeldt *et al*, 1971, visade att östrus inte kommer igång förrän progesteron har nått < 1 ng/ml och att detta oftast inträffar 3 dagar efter att progesteron börjat sjunka.

Under hela stoets brunstcykel sker tillväxt och atresi av folliklar. Follikeltillväxten sker i två vågor. Dessa follikelvågor stämmer överens i tid med de två FSH-toppar som beskrivits i ovanstående text, enligt Hughes *et al*, 1980. Även Evans & Irvine, 1975, ha påvisat två FSH-vågor. De såg att den tidiga vågen faller samman med den follikelproliferation som man ser i tidig diöstrus. En andra våg ser man mitt i diöstrus, 10-13 dagar före nästa ovulation och i samband med denna ses även då en follikelutveckling. Man såg i samma studie att FSH kunde vara högt under tidig dräktighet och man drog därför slutsatsen att FSH och follikelutvecklingen inte hämmas av progesteron. Fortune (1994) skriver att det bara är en tredjedel av stona som har en andra follikelvåg. Folliklarna under diöstrus kan bli ≥ 25 mm (King & Evans, 1988). Dessa folliklar innehåller dock en mindre mängd östradiol än de folliklar som växer till under östrus visade Vandeplasseche *et al* i en studie på 694 könsorgan 1979.

Ovulationer som sker under diöstrus kallas i litteraturen för diöstrusovulationer. Frekvensen diöstrusovulationer hos fullblod är upp till 20 %, men är mycket sällsynt på ponnyraser (Noakes, 2001). I en annan artikel hävdas att frekvensen diöstrusovulationer är 21,4 % (Hughes *et al*, 1985). Enligt den studie som gjordes av Hughes *et al*, 1972, under en tvåårsperiod, så skedde diöstrusovulationer hos 10 av 11 ston och totalt 64 ggr. Ovulationerna skedde mellan dag 2 och 15 post ovulation. Dessa ovulationer ledde inte till några brunstsymptom. I en annan studie där 40 ston studerades under perioden maj till juni uppstod diöstrusovulationer hos fyra ston dag 2, 7, 9 respektive 11 (Ginther & Pierson, 1989). I en studie som gjordes av Vandeplasseche *et al* (1979) gjordes makroskopiska och histologiska fynd, vilka talar för att de flesta folliklar som rupturerar under diöstrus degenererar och blir hormonellt inaktiva.

Förlängd lutealfas

Corpus luteum

Corpus luteum är en endokrin körtel som bildas utifrån follikelns theca- och granulosaaceller och vars uppgift är att producera progesteron. Direkt efter ovulationen fylls kaviteten med blod och redan efter 2-3 dagar har corpus luteum nått sin maximala storlek. Corpus luteum är en av få adulta, icke patologiska, vävnader som växer. Den växer dessutom mycket snabbt. Tillväxthastigheten kan liknas med en av de mest snabbväxande tumörförformerna. Redan före ovulationen sker så börjar follikelcellerna att differentieras till att bli lutealceller och snart efter ovulationen har cellerna förmåga att producera progesteron. Cellmassan och vaskulariseringen är dock fortfarande så liten, vilket gör att de systemiska progesteronvärdena kvarstår låga. Tillväxten av cellerna och vaskulariseringen avslutas i mitten på diöstrus och då når också progesteronnivåerna i blodet sina maximala koncentrationer (Reynolds & Redmer, 1999).

Corpus luteum består av små och stora steroidproducerande lutealceller. Dessutom består den av fibroblaster, glatt muskulatur, pericyter och endothelceller. Vad som styr uppbyggnaden och underhållet är osäkert, men man tror att FSH, LH och prolaktin har stor betydelse för uppbyggnaden, men att FSH sedan har en mindre roll för underhållet (Noakes, 2001). Enligt Reynolds & Redmer (1999), så innehåller corpus luteum mer kärl än någon annan vävnad. På grund av detta så anser de att angiogenesen har stor betydelse för gulkroppens utveckling och funktion. Dessutom beskriver de gap-junctions som den huvudsakliga kommunikationsvägen mellan corpus luteums celler. Antalet gap-junctions varierar under corpus luteums livstid och styrs troligen av luteotropa och luteolytiska hormoner och de skulle därför också ha stor betydelse för gulkroppens utveckling och funktion. Bland annat beskriver de ett försök där man lyckats att minska koncentrationen av gap-junctions och då sett en samtidig sänkning av LH-inducerad progesteronsekretion (Reynolds & Redmer, 1999).

Gulkroppen går att palpera i ca 8-9 dagar. Den har oftast samma storlek som follikeln, men det förekommer fall då den blir upp till 12 cm. Dessa stora gulkroppar går att palpera under en längre tid, men de leder ej till några förändringar i cykliciteten (Hughes *et al*, 1972).

Normal luteolys

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) fungerar som luteolysin hos ston. $PGF_{2\alpha}$ produceras i endometriet och frisätts i pulsvågor. Luteolysen kan delas in i två faser. I den första fasen så hämmas corpus luteums funktion. Denna fas går fort. Den andra fasen består av nedbrytning av corpus luteum och den tar betydligt mycket längre tid. Nedbrytning av gulkroppen börjar redan dag 12 post ovulation och man ser då en samtidig sänkning av progesteron (Noakes, 2001). Vid två olika studier har man visat att gulkroppens normala livslängd är 14,1 respektive 14,4 dagar. I samma studie har man visat att den luteala aktiviteten avslutas i samband med att $PGF_{2\alpha}$ frisätts (Neely *et al*, 1979). Den funktionella luteolysen skedde i dessa studier inom 38 timmar (Stabenfeldt *et al*, 1981).

I en studie, Neely *et al* (1979), såg man en stegring av $PGF_{2\alpha}$ -frisättning dag 15 och 16 postovulation. Man såg samtidigt en snabb sänkning av progesteron under

dessa två dagar. I studien såg man först en topp av $\text{PGF}_{2\alpha}$ -metaboliter dag 15. Efter ytterligare en till två dagar sågs återigen en höjning av metaboliter från $\text{PGF}_{2\alpha}$, som dock inte verkade komma förrän progesteron hade sjunkit till $< 50\%$ (Neely *et al*, 1979).

Enligt Ginther (1990), så har livmodern stor betydelse för när och om luteolys kommer att ske. Vid frånvaro av ett embryo i livmodern kommer $\text{PGF}_{2\alpha}$ att produceras och transporteras till ovarierna och där orsaka luteolys. Hos det dräktiga stoet så tror man att det är embryots vandring fram och tillbaka i livmodern, som hindrar luteolysen från att ske. Ginther beskriver studier där man hysterektomerat ston och därmed har ingen luteolys skett. Det finns också studier där man har stoppat in föremål eller irriterande ämnen i livmodern och på så sätt orsakat en tidigare luteolys. Han beskriver också olika patologiska tillstånd som kan leda till att inget luteolysin når ovarierna av en eller annan orsak.

Vad det är som startar prostaglandinfrisättningen från livmodern är osäkert. En teori är att frisättningen inte kan ske före livmodern har utsatts för progesteron under en viss tid. Man tror även att follikelaktiviteten under diöstrus och ovariernas möjlighet att frisätta östrogen har betydelse. Dock ser man ökade nivåer av östradiol- 17β och östron hos dräktiga ston i samband med att man hos det icke-dräktiga stoet skulle ha sett en prostaglandinfrisättning och efterföljande luteolys (Stabenfeldt *et al*, 1981). Ginther, 1992, skriver att ovariektomerade ston som behandlas med progesteron under 14 dagar har ökade nivåer av $\text{PGF}_{2\alpha}$ i livmodern och att det troligtvis är den tiden av progesteronexponering, som krävs för att $\text{PGF}_{2\alpha}$ ska frisättas. Eventuellt är det under denna exponering som enzymer och prekursorer för prostaglandinsyntesen syntetiseras och rekryteras (Ginther, 1992).

I en studie där 16 ston studerades med dagliga blodprover för progesteron, östrogen och prostaglandin drog man slutsatsen att mot mitten till slutet av diöstrus växer folliklarna till och man får en höjning av östradiol i blodet. Samtidigt som detta sker ser man en höjning av $\text{PGF}_{2\alpha}$ i blodet och luteolys sker snart därefter, vilket skulle kunna indikera att $\text{PGF}_{2\alpha}$ -frisättningen är beroende av östradiol (King & Evans, 1988).

Oxytocin har också effekt på luteolysen (Noakes, 2001). Det har visat sig att ston blir okänsliga för oxytocin vid en upprepad giva och i en studie där man gav oxytocin upprepade gånger så kom stona inte i brunst, vilket indikerar att ingen luteolys skedde. Man har sett att hypofysen utsöndrar oxytocin samtidigt som livmodern frisätter prostaglandin. Det finns flera faktorer som påverkar om livmodern kommer igång att frisätta $\text{PGF}_{2\alpha}$ vid oxytocinpåverkan. Dessa faktorer är mängden arakidonsyra som finns i endometriet som det går att syntetisera $\text{PGF}_{2\alpha}$ från, mängden enzymer som ingår i prostaglandinsyntesen, samt koncentrationen av oxytocinreceptorer i endometriet. Det finns studier där man har sett att livmodern svarar bäst på oxytocin dag 15 post ovulation, dvs. den normala dagen för luteolysens början. I samband med dessa studier har man också sett att livmodern har störst koncentration av oxytocinreceptorer vid samma tidpunkt. Oxytocin verkar dock inte ha någon effekt om inte livmodern först har exponerats sju dagar för östradiol och ytterligare 14 dagar för progesteron. Dessa resultat har man fått fram i en studie på ovariektomerade ston där man först gav

östradiol, sedan progesteron och slutligen oxytocin och då fick ett prostaglandinsvar, vilket man inte fick vid en ensam oxytocingiva (Betteridge *et al.*, 1985). I Neelys avhandling från 1979 beskriver han ett försök där man gav ston oxytocin dag 4-8 utan att ha någon effekt på prostaglandinfrisättningen. Han förklarar detta som att närvaron av endogent progesteron minskar antalet oxytocinreceptorer i endometriet, samt att det hämmar östradiol, vilket annars ökar antalet receptorer (Neely, 1979).

De flesta av lantbrukets djur har en lokal anatomisk förbindelse mellan livmodern och äggstockarna, i vilken man tror att $\text{PGF}_{2\alpha}$ transporteras. Detta har man fastställt genom flera olika studier där man har placerat föremål på olika ställen i livmodern och då fått luteolys eller ej, beroende på i vilket livmoderhorn som föremålet placerats i och i vilken äggstock som gulkroppen sitter i. Man har även gjort studier där man gjort en unilateral hysterektomi och då fått fram samma resultat. Ytterligare försök som har gjorts på nöt har visat att om man lägger prostaglandin intrauterint kan man ge en lägre dos prostaglandin än vid en intravenös giva. Dock har det visats i liknande studier på ston att det inte har någon betydelse var i livmodern man placerar ett föremål; luteolys sker alltid. Man har också visat att unilateral hysterektomi leder till luteolys i 3 av 5 fall, dock är det oberoende av i vilken äggstock som corpus luteums sitter i. Man har ej heller lyckats att sänka dosen prostaglandin vid intrauterin giva. Alla dessa resultat talar emot att även ston skulle ha en lokal förbindelse mellan livmodern och äggstockarna. Dessutom skiljer sig anatomin mellan ston och övriga djurslag. På bl.a. nöt så ligger vena uteroovarica och arteria ovarica mycket nära varandra och artären slingrar sig längst venen, till skillnad från häst där ven och artär har mycket liten kontaktyta. Troligtvis sker den lokala kommunikationen här hos lantbrukets djur, men inte på häst (Ginther, 1981; 1992).

I flertalet studier har det visat sig att corpus luteum till en början är refraktär och därför inte svarar på prostaglandiner (Ginther & Pierson, 1989). I en studie gav man ston en intrauterin infusion av NaCl, för att se om detta orsakar en $\text{PGF}_{2\alpha}$ -frisättning och en påföljande luteolys. De ston som ingick i studien fick NaCl, intrauterint, vid olika tidpunkter under lutealfasen och det visade sig att ingen luteolys skedde vid infusion dag 1-4, vilket man dock såg vid infusion under dag 5-9. Studien talar för att en intrauterin infusion med NaCl leder till en frisättning av $\text{PGF}_{2\alpha}$, men att corpus luteum är refraktär under de första 4 dagarna (Arthur, 1975). I en annan liknande studie fick man fram samma resultat och man drog slutsatsen att corpus luteum svarar på prostaglandiner med luteolys först när den är 4-5 dagar gammal (Neely *et al.*, 1975). Det finns ytterligare en studie där man studerat prostaglandinets effekt på gulkroppen. I denna studie ingick 20 ston, som delades in i sju grupper. De sex första grupperna gav man $\text{PGF}_{2\alpha}$ vid olika tidpunkter i brunstcykeln och den sjunde gruppen fungerade som kontrollgrupp. Man studerade i detta fall ovulationsintervallet, dvs. tiden från en ovulation till nästa, och det visade sig att intervallet kortades endast vid prostaglandingiva dag 4 eller 7, men inte dag 1, 10 eller 13. Man drog slutsatsen att det oförändrade intervallet vid giva dag 10 eller 13 berodde på att detta låg nära den normala tidpunkten för luteolys och att det oförändrade intervallet vid giva dag ett berodde på att gulkroppen var refraktär (Douglas & Ginther, 1975).

Definitioner

I en artikel av Ginther (1990), delar man in corpus luteum i primär och sekundär. En primär corpus luteum beskrivs här som den corpus luteum, som uppstått efter ovulation under follikelfasen. En sekundär corpus luteum har däremot bildats under progesteronfasen, antingen från en follikel som gått i atresi eller från en diöstrusovulation.

Terminologin är varierande inom detta område. Bland annat ser man ofta begreppet persisterande corpus luteum, vilket enligt Ginther (1990), skulle vara de fall då det är en och samma corpus luteum som kvarstår och producerar progesteron under en viss period. Begreppet förlängd lutealfas eller förlängd progesteronfas, som också används mycket i litteraturen säger inte om det är en och samma corpus luteum som kvarstår hela tiden eller om det under tiden bildas sekundära corpora lutea som håller igång den luteala aktiviteten. Med förlängd lutealfas menas bara att progesteronnivåerna kvarstår längre än de normalt gör hos ett icke dräktigt sto. Även begreppet pseudopregnancy eller på svenska, skendräktighet, finns i litteraturen. Där menar dock Ginther att detta begrepp bara kan användas på icke dräktiga, men betäckta ston, som ändå har uterustonius som vid dräktighet, och ej kommer i brunst igen (Ginther, 1990).

Vad som klassas som en förlängd lutealfas varierar i olika studier. I en studie klassades det interovulatoriska intervallet som förlängt när det avvek med tre standardavvikelser från försöksgruppens medellängd på intervallet (Ginther & Pierson, 1989). I en annan studie av King & Evans (1988) klassades lutealfasen som förlängd när ett diöstrusmönster kvarstod i > 30 dagar postovulation.

Under den förlängda lutealfasen fortsätter stoet att producera progesteron, 2-5 ng/ml och visar inga tecken på östrus. Dock kvarstår follikelaktiviteten och ibland ses även ovulationer (Hughes *et al*, 1972).

Orsaker till förlängd lutealfas

Fysiologiskt förlängd lutealfas

Detta är vad som sker i början av en dräktighet. Fram till dag 14 post ovulation har det dräktiga och icke dräktiga stoet samma sekretion från endometriet. Närvaron av ett embryo i det dräktiga stoets livmoder gör dock att ingen prostaglandinfrisättning sker och den primära gulkroppen kvarstår (Kindahl *et al*, 1982). En teori är att detta beror på en ökad produktion av östradiol-17 β och östron (Stabenfeldt *et al*, 1981).

Förlängd lutealfas på grund av infektion eller annan skada i livmodern

Skador i endometriet i samband med kroniska infektioner, ofta purulenta, kan leda till oförmåga hos endometriet att producera PGF_{2 α} . Ju större dessa skador är, desto sämre blir produktionen. Det finns ett fall beskrivet där lutealfasen förlängdes i 425 dagar. I detta fall fanns en underliggande infektion, men under lutealfasen skedde också ovulationer, som ledde till att nya gulkroppar bildades och blev persistenta, vilket också bidrog till den förlängda lutealfasen. Det finns också fall beskrivna där ston fått förlängda lutealfaser flera gånger efter varandra på grund av infektioner i livmodern (Stabenfeldt *et al*, 1981).

Neely (1979) beskriver en studie där han gett ston med kvarstående gulkropp på grund av kroniska infektioner en intrauterin infusion med NaCl utan att få luteolys, till skillnad från normala ston där en intrauterin infusion orsakar luteolys. Detta talar för att skadorna i endometriet som en kronisk infektion leder till orsakar en minskad förmåga att syntetisera och frisätta prostaglandiner (Neely, 1979).

I en studie på 16 ston med pyometra konstaterades att ovulationsintervallen hos dessa ston kunde vara kortare, längre än normalt, samt normala. Stona studerades i 2-20 månader och obducerades därefter. Stona hade inga kliniska symptom och de hade ett normalt brunstbeteende när de väl kom i brunst. De ston som fick förlängd lutealfas visade sig ha grava skador i endometriet med näst intill fullkomlig erosion och atrofi. Ett av dessa ston visade ingen ovarieaktivitet under de 14 månader som hon studerades. Den längsta perioden som ett sto stod med höga progesteronvärden var 613 dagar. Ett av stona med förlängd lutealfas visade en frisättning av $\text{PGF}_{2\alpha}$ vid rätt tidpunkt för luteolys, men ingen luteolys observerades. En del av stona visade en oförmåga att syntetisera och utsöndra $\text{PGF}_{2\alpha}$. På flera av dessa ston såg man en frisättning av prostaglandin flera dagar till veckor senare, men denna var oftast för liten för att kunna orsaka luteolys. De ston som fick förkortade ovulationsintervall hade tecken på inflammation, men förändringarna var lindriga. Att deras lutealfas förkortades tros ha berott på en inflammationsmedierad frisättning av prostaglandiner (Hughes *et al*, 1979).

Ginther (1992) skriver att den enda orsaken till att en primär corpus luteum blir persisterande är en kronisk endometrit.

Spontan förlängning av lutealfasen

Spontan kvarstående gulkropp hos ett icke dräktigt sto är en av de vanligaste orsakerna till infertilitet på ston under den reproduktiva säsongen. Incidensen är ej helt känd, men uppskattas till 20 %. Gulkroppen kvarstår i 30-90 dagar och under denna tid syns inga genitala eller beteendemässiga tecken på brunst. Orsaken tros vara en inadekvat syntes och frisättning av $\text{PGF}_{2\alpha}$ trots en normal livmoder. I enstaka fall kan även en kvarstående corpus luteum uppstå efter en diöstrusovulation. Detta sker om diöstrusovulationen sker 4-5 dagar före luteolysen, vilket gör att den nya gulkroppen då fortfarande är refraktär och inte svarar på prostaglandiner (Stabenfeldt *et al*, 1981). Det finns mycket som talar för att icke dräktiga fullblodsston ofta går in i spontan förlängda lutealfaser framför allt senare under den reproduktiva säsongen (Allen & Rosedale, 1973).

Stabenfeldt *et al* gjorde en studie 1974, då de studerade ston med spontan persisterande gulkroppar. Gulkropparna på dessa ston kvarstod i $63 \pm 15,6$ dagar. Man såg att dessa stons progesteronmönster liknar normalt cyklade stons fram till dag 13-14 post ovulation. Därefter stannar progesteron på 4-5 ng/ml för att sedan sjunka gradvis. När ston återigen kommer igång att cykla ser man slutligen en snabb sänkning av progesteron. Man beskriver här att orsaken till detta syndrom är en oförmåga hos livmodern att frisätta prostaglandin. I artikeln beskrivs också en annan studie där man sett att ston med spontan persisterande corpus luteum har ett liknande progesteronmönster som hysterektomerade ston. Dessutom liknar deras gulkroppar varandra med distinkta bindvävstråk och en reducerad mängd luteal vävnad. I studien var det ett av stona vars

progesteronkurva talade för att hennes primära corpus luteum gick i luteolys, men hon hade två diöstrusovulationer sent i lutealfasen, vilka gav upphov till persisterande gulkroppar (Stabenfeldt *et al*, 1974).

I en studie där man studerade ston av annan anledning uppstod en förlängd lutealfas på 45 dagar efter att det stoet hade haft en diöstrusovulation (Daels *et al*, 1996). På samma sätt i en studie där man gav ston intrauterin koksaltsinfusion så observerade ett sto som hade två diöstrusovulationer, redan dag 4 och 9, vilka båda gav upphov till persisterande gulkroppar i två månader (Neely *et al*, 1975).

Ginther, 1992, beskriver en tvåårig studie på ston där förlängd lutealfas uppkom 12 gånger utan att man hittade några patologiska eller infektiösa fynd. Dessa lutealfaser kvarstod i ca 63 dagar. Man beskriver här att förekomsten av dessa spontant förlängda lutealfaser är så vanligt som upp till 25 % av det totala antalet brunstcykler (Ginther, 1992).

I en två år lång studie i Davis, studerades 10 ston med avseende på deras cyklicitet. Under studien uppvisade 5 av stona en spontant persisterande corpus luteum. Man drog slutsatsen att dessa orsakades av att livmodern inte kunde producera eller frisätta luteolysin² i rätt mängd vid rätt tidpunkt. Lutealfaserna varade mellan 60 och 93 dagar. Dessa ston hade en fortsatt follikelaktivitet och man observerade även ovulationer (Hughes *et al*, 1972).

I en studie studerades totalt 213 ovulatoriska perioder och 69 interovulatoriska intervall. Sex av de interovulatoriska intervallen visade spontant förlängda lutealfaser. En av dessa förlängda lutealfaser orsakades av en diöstrusovulation dag 11 post ovulation. På detta sto såg man att den primära gulkroppen tillbakabildades och att det var den sekundära gulkroppen som förlängde lutealfasen. Denna förlängda lutealfas varade i 47 dagar. Man såg ytterligare tre diöstrusovulationer under studien, vilka skedde dag 2, 7 och 9. Dessa ledde inte till förlängd lutealfas. Tre av stona med förlängd lutealfas hade hemorrhagiska folliklar med en yttre vägg troligtvis bestående av luteal vävnad. Dessa folliklar verkade producera progesteron, men man tog inga sådana prover i försöket. Lutealfaserna hos dessa ston varade i 34, 41 respektive 49 dagar. De hemorrhagiska folliklarna försvann dock inom en månad. Hos två av stona med spontant förlängd lutealfas kunde man inte hitta någon trolig förklaring. Hos dessa kvarstod progesteron högt i 30 respektive 33 dagar. Hos det sjätte stoet med förlängd lutealfas var den kvarstående gulkroppen orsakad av en metrit (Ginther & Pierson, 1989).

I en studie där man gav en intrauterin infusion med NaCl till ston beskrivs att man givit detta till ett sto med persisterande lutealfas dag 16, 19, 38 och 47. Dag 16 fortsatte lutealaktiviteten opåverkad av infusionen, vilket tros ha berott på att en ovulation hade skett 3 dagar tidigare och att man därför hade närvaron av en refraktär gulkropp. Troligtvis försvann den primära gulkroppen. Vid infusion dag 19 och 38 såg man en höjning av PGF_{2α}, men denna var ej tillräcklig för att orsaka luteolys. Infusionen dag 47 ledde dock till luteolys 3-4 timmar efter infusion (Neely, 1979).

²
= PGF_{2α}

Neely *et al* (1979) gjorde en studie där man studerade ston varannan dag under augusti till november med rektalisering, teaserhingst och blodprover för analys av progesteron och prostaglandiner. Under denna studie fick två ston en spontant förlängd lutealfas. Det ena stoet hade en diöstrusovulation dag 16. På detta sto såg man höga nivåer av PGF_{2α} dag 16-19, men luteolysen blev aldrig fullständig. På det andra stoet såg man aldrig någon ordentlig prostaglandinstegring vid den normala tidpunkten för luteolys. Dessutom skedde två stycken diöstrusovulationer dag 13 och 19, vilket också kan ha bidragit till den förlängda lutealfasen. I denna studie drog man bl.a. slutsatsen att en spontan förlängning av lutealfasen kan uppkomma på grund av diöstrusovulationer sent i diöstrus, men att det också kan bero på en ej adekvat frisättning av PGF_{2α} i rätt tid från livmodern av okänd anledning (Neely *et al*, 1979).

King & Evans (1988) beskriver en studie där de studerade östradiol och follikeltillväxten på normalt cyklade ston och jämförde detta med ston som hade en spontant persisterande corpus luteum. Hos normalt cyklade ston såg man en follikeltillväxt dag 8-14 med folliklar på >25mm. Denna follikeltillväxt var korrelerad till en samtidig östradiolhöjning. På inget av stona med förlängd lutealfas såg man folliklar på >25 mm vid samma tidpunkt. Hos dessa ston var follikeltillväxten senarelagd till dag 19 ± 1,4 dagar. Man såg heller ingen positiv korrelation mellan follikeltillväxt och östradiol i plasma. Hos normalt cyklade ston såg man en höjning av östradiol vid tidpunkten för luteolys, vilket man ej observerade på de ston som hade en förlängd lutealfas. Utifrån dessa resultat drog man slutsatsen att luteolysen är beroende av att östradiol stimulerar livmodern till frisättning av PGF_{2α} och att östradiolhöjning åstadkoms genom en follikeltillväxt dagarna före. I studien såg man också att stons follikeltillväxt varierar mer än vad den gör på andra djurslag och att det skulle kunna vara en förklaring till varför ston har en högre frekvens av spontant persisterande corpus luteum (King & Evans, 1988). Stabenfeldt *et al* (1975) skriver dock att ston har en varierande follikelutveckling med folliklar som växer till och ovulerar även under diöstrus, men att dessa ovulationer inte leder till förlängda lutealfaser.

I en studie 2000 av Kindahl *et al*, inducerade man persisterande gulkroppar på ston och jämförde dessa med normalt cyklade ston. Studien visade att ston med persisterande gulkropp saknade den frisättning av PGF_{2α} som de normala stona hade. Man såg att stona hade både lägre koncentrationer och färre antal toppar av prostaglandiner. I studien gav man även en del av stona en oxytocininjektion dag 13-16 post ovulation. Det visade sig då att de ston som hade en persisterande gulkropp hade signifikant lägre oxytocininducerad frisättning av prostaglandiner. Dag 13 var det ej någon signifikant skillnad. Dessa resultat tolkades som att den bristande luteolysen av gulkroppen hos ston med spontant förlängd lutealfas troligen orsakas av att livmodern frisätter en minskad mängd PGF_{2α}, antingen på grund av en minskad syntetiserad mängd eller på grund av att livmodern ej svarar på oxytocin. En annan teori som tas upp i artikeln är att spontant förlängd lutealfas skulle kunna orsakas av förhöjda progesteronvärden under östrus på grund av någon form av stress, som gjort att binjuren producerat en ökad mängd progesteron. Denna teori stöds av studier där man sett att livmodern måste utsättas för östrogen utan närvaro av progesteron efter luteolysen för att en ny prostaglandinfrisättning ska kunna ske 12-14 dagar in i påföljande diöstrus. Det

stöds också av att de ston i studien som inte fick persisterande gulkroppar när man behandlade de med altrenogest och sedan hCG (se förklaring i nedan text), hann ha ca två dagars brunst före altrenogest sattes in (Kindahl *et al*, 2000).

Att en spontant förlängd lutealfas kan uppstå på grund av en diöstrusovulation 1-4 dagar före luteolys stöds av ett flertal studier där man gett antingen koksaltsinfusioner intrauterint eller sprutat prostaglandiner. Alla dessa studier visar att en gulkropp som är < 4 dagar ej svarar på prostaglandiner (Arthur, 1975, Neely *et al*, 1975, Douglas & Ginther, 1975, Neely, 1979).

Det finns äldre studier där man gett ston östradiol under en längre period med början under lutealfas och då inducerat en förlängd lutealfas under 32 dagar. Man har då haft teorier om att förlängda lutealfaser skulle kunna orsakas av fortsatt höga nivåer av endogent östradiol under lång tid. Man stödde även denna teori på att man hade hittat höga nivåer östradiol i urinen på ston med persisterande gulkroppar. Neely (1979) gjorde ett försök där han gav ston östradiol under tidig respektive sen lutealfas för att se om dessa teorier stämde. Han fick dock inga signifikanta förändringar i lutealfasens längd på dessa ston. Det sto som fick en förlängd lutealfas fick det på grund av en diöstrusovulation (Neely, 1979).

Förlängd lutealfas i samband med hCG-inducerad ovulation under altrenogestbehandling

Altrenogest är ett progesteronpreparat, som man ger till ston för att förhindra brunst. Stona kommer i brunst direkt efter avslutad behandling. I en studie av Daels *et al* (1996) gav man tio ston altrenogest dag 14 post ovulation och sedan dagligen fram till ovulation. När stona hade en follikel på >35 mm injicerades 3.300 enheter hCG i.m. Stona följdes därefter med ultraljud och blodprover för progesteronanalys. Man hade även 10 kontroller, vilka alla tillbakabildade sina gulkroppar dag $14 \pm 0,3$ dagar. Fyra av stona i försöksgruppen ovulerade aldrig under altrenogestbehandlingen. Sex av stona ovulerade ca 8 dagar efter påbörjad behandling. Samtliga av dessa ston tillbakabildade sin primära gulkropp i samband med att man satte in altrenogest. Hos fem av de sex stona förlängdes progesteronfasen i $45,6 \pm 2,4$ dagar. Det var bara ett av dessa ston som fick en förlängd lutealfas på grund av en diöstrusovulation. Inget av stona hade endometrit, vilket hade kunnat vara en förklaring till den förlängda lutealfasen. Orsakerna till dessa resultat är osäkra, men en äldre teori menar att det finns en biologisk klocka som styr när luteolys ska ske och att denna skulle få en signal om att luteolys ska ske 14 dagar efter att progesteron stigit från låga till höga nivåer. Man menar då att förklaringen till denna studies resultat skulle vara att progesteronbehandlingen maskerar en förändring av progesteronnivåerna och därför sker ingen luteolys 14 dagar efter den hCG-inducerade ovulationen. En annan teori är att det av någon anledning sker en otillräcklig frisättning av prostaglandin från livmodern runt tiden för luteolys och att även den oxytocininducerade frisättningen är mindre. Ovan studie menar forskarna går att jämföra med diöstrusovulationer som leder till förlängd lutealfas. I samma studie visade man även att ston som ovulerade spontant under eller strax efter behandlingen med altrenogest till mycket stor del utvecklade persisterande gulkroppar (Daels *et al*, 1996).

EXPERIMENTELL STUDIE

Inledning

Ston som ovulerar i sen diöstrus, d.v.s. 1-3 dagar före man ser normal luteolys får ofta en persisterande gulkropp och därmed också en förlängd lutealfas (Neely *et al*, 1979, Stabenfeldt *et al*, 1981, Daels *et al*, 1996). Även en hCG-inducerad ovulation under behandling med altrenogest leder till en förlängd lutealfas. Syftet med denna studie var att se om ston kan få en persisterande gulkropp efter behandling med hCG under endogen progesteronfas och om djuren kvarstår i denna under en längre tid. På så sätt skulle brunst kunna förhindras. Detta skulle i så fall kunna bli en metod att dämpa ett besvärligt beteende relaterat till brunst, vilket idag ställer till med problem vid hantering av ston i olika sammanhang. Denna metod att förhindra brunst skulle med dagens regelverk ej klassas som doping.

Material och metoder

Utförande

Studien är uppdelad i två delar, en intensivstudie och en fältstudie.

I intensivstudien ingick åtta ston ägda av och uppstallade vid f.d. institutionen för obstetrik och gynekologi (nuvarande institutionen för kliniska vetenskaper), SLU. Stona lottades slumpvis in i en försöksgrupp på fyra ston och en kontrollgrupp på fyra ston. Försöket pågick under april till september månad 2004 .

Stona kontrollerades dagligen med teaserhingst tills de började visa tecken på brunst. När tecken på brunst sågs, studerades stona med rektalisering och ultraljud varannan dag tills ovulation observerades. Dag 8 efter ovulation återupptogs kontrollen med rektalpalpation och ultraljundsundersökning varannan dag. När en follikel på minst 30 mm observerades, injicerades ston i försöksgruppen med humant choriogonadotropin, hCG (Pregnyl®) 3000 IE och ston i kontrollgruppen injicerades med NaCl, 2 ml. I samband med detta togs ett första blodprov för analys av progesteron. Därefter kontrollerades stoet dagligen tills follikeln ovulerade eller tills det att stoet återigen blev brunstigt. Blodprover för progesteron fortsattes sedan att tas två gånger i veckan under 2 månaders tid. Under de tre första veckorna efter injektionen följdes även stona med rektalisering och ultraljud för kontroll av eventuell ny brunst eller förekomst av eventuell persisterande gulkropp. Fynden journalfördes noggrant med rektalfynd och utskrifter från ultraljudet. På de ston som ej fick tillräckligt stora folliklar under diöstrus studerades nästa lutealfas igen. Dock upprepades detta bara under max tre lutealfaser. Detta gällde även ston, som ej ovulerade på första givan hCG.

I fältstudien ingick sju ston, varav fem ingick i försöksdelen och två ingick i kontrollgruppen. Försöket genomfördes på samma sätt som intensivstudien, dock togs inga blodprov för progesteron under de två efterföljande månaderna.

Stomaterial

Intensivstudien:

I studien ingick 8 varmlodiga travare i åldrarna 9-14 år, alla uppstallade på institutionen för obstetrik och gynekologi, SLU. Stona användes i undervisning under försökets gång. Fyra av stona ingick i kontrollgruppen.

Fältstudien:

I denna studie ingick 7 varmlodiga travare i åldrarna 2-7 år. Alla stona var i full träning och uppstallade på Västerbo Stuteri, Heby. Två av stona ingick i kontrollgruppen.

Analyser och uppmätta parametrar i intensivstudien

Kontroll med teaserhingst:

Stona kontrollerades med avseende på om de ställde upp sig för hingsten, vek svansen åt sidan, samt blinkade med vulva, vilket är den gängse metoden för brunstkontroll av ston vid institutionen för obstetrik och gynekologi, SLU. Ston som visade ett eller flera av dessa tecken bedömdes vara i östrus. Dock ansågs ej ston vara i brunst om de enbart vek svansen åt sidan.

Klinisk undersökning och rektalpalpation:

Denna undersökning innefattade bedömning av vulvas utseende, vaginalslemhinnans utseende, tonus i cervix och uterus, uterusslemhinnans tjocklek, äggstockarnas storlek, samt eventuella palpabla folliklar. Dessa parametrar tolkades med den gängse metod som används vid institutionen för obstetrik och gynekologi, SLU.

Ultraljudsundersökning:

Livmodern ultraljudsundersöktes med avseende på ödem. Äggstockarna undersöktes med avseende på storlek, men framför allt med avseende på närvaro av folliklar och deras storlek, samt närvaro av en eller flera gulkroppar.

Progesteronanalys:

För att bestämma progesteronnivåerna i plasma användes den gängse metoden vid institutionen för klinisk kemi, SLU, Count-A-Count® Progesterone (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Metoden bygger på en ”solid-phase radioimmunoassay”. Minsta detektionsgräns i studien var 0,1 nmol/l.

Analyser och uppmätta parametrar i fältstudien

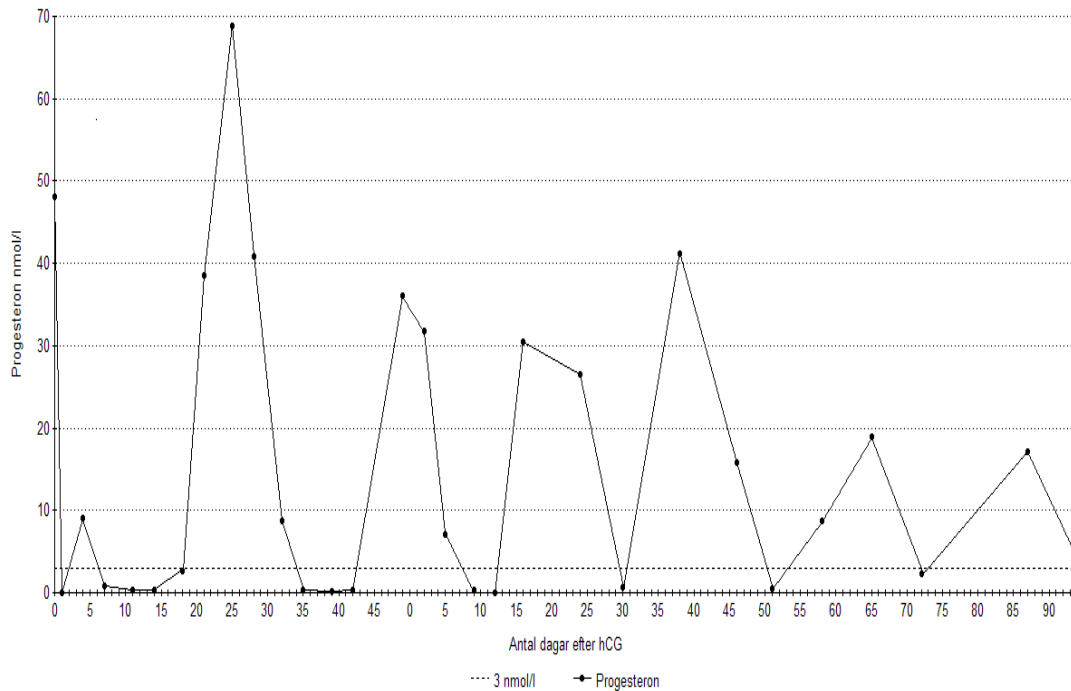
Stona som ingick i fältstudien undersöktes med rektalpalpation och ultraljud enligt ovan beskrivning. Blodprover för progesteronanalys togs enbart dagen för injektion.

Resultat

Intensivstudiens kontrollgrupp

Tanga

Tanga injicerades med hCG i två olika diöstrusperioder. Första gången gavs 3000 IE hCG (Pregnyl) dag 11 post ovulation (22 april). Största follikeln var då 26,5 mm (se Tabell 1). Injektionen ledde ej till någon ovulation och lutealfasen förlängdes ej. Nästa ovulation sågs 17-19 dagar efter injektionen. Under den efterföljande lutealfasen sågs aldrig några stora folliklar. Under den tredje lutealfasen som studerades observerades en follikel i vänster äggstock, som var 31,8 mm och en ny injektion med hCG gavs (12 juni). Nio dagar efter denna var progesteronnivåerna återigen låga (se fig. 1). Tanga hade därefter normala ovulationsintervall under resten av studien.



Figur1. Tangas progesteronnivåer

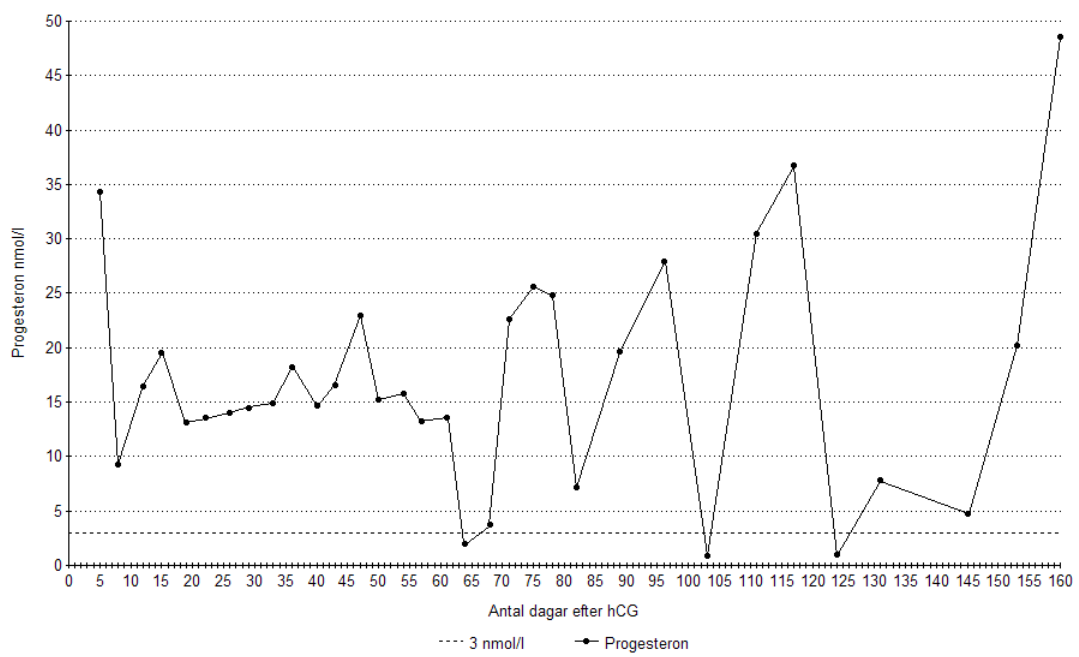
Datum /antal dagar efter hCG	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL* höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL* vänster äggstock	Tecken på brunst
6 april	31,0		27,9		+++
11 april	< 10	1	< 15	1	+++
19 april	22,6	1	25,1	1	
20 april	-	-	27,7	1	
21 april	18,8	1	26,1	1	
22 april /0	18,9	1	26,5	1	
23 april /1	< 15	1	26,0	1	
24 april /2	13,7	1	27,3	1	
25 april /3	< 10	1	28,1	1	
26 april /4	-	-	23,3	1	
27 april /5	< 15	1	27,5	1	
4 maj /12	22,6		40,4		
9 maj /17	19,8		56,7		+++
11 maj /19	< 10		< 10	2	
16 maj /24	< 10		15,0	2	
18 maj /26	< 10		25,0	1	
20 maj /28	< 10		26,3	1	
22 maj /30	15,0		21,6	1	
24 maj /32	-		16,6	1	
1 juni /40	41,7		34,2		+++
3 juni /42	< 15	1	24,3		+++
8 juni /47	19,3	1	20,8		
10 juni /49	25,7	1	19,7		
12 juni /0	< 15	1	31,8		
14 juni /2	14,6	1	34,0		
16 juni /4	26,9	1	20,0		
19 juni /7	26,4	1	31,4		
24 juni /12	2,09		38,6		

* = corpus luteum

Tabell 1. Tangas äggstocksaktivitet

Evita

Evita injicerades med 3000 IE hCG (Pregnyl) i.m. dag 10-11 post ovulation (10 april) och hon hade då en follikel i höger äggstock på 40,3 mm (se tabell 2). Samma dag skedde en diöstrusovulation. Tre dagar efter injektionen ovulerade en follikel i höger äggstock. Progesteronvärdena kvarstod höga i 61 dagar (se fig. 2). Under denna period sågs lindriga tecken på brunst. Efter de låga progesteronvärdena mellan dag 61 och 68 kom återigen en förlängd lutealfas på ca 40 dagar.



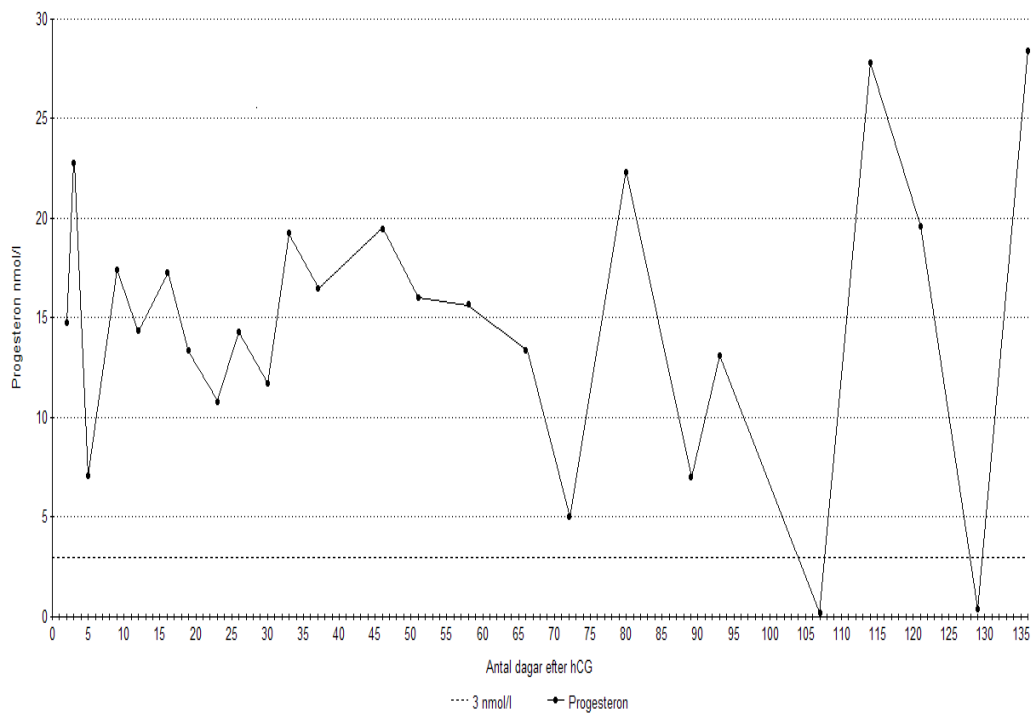
Figur 2. Evitas progesteronnivåer

Datum / antal dagar efter hCG	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL vänster äggstock	Tecken på brunst
4 april	27,9		18,4	1	
6 april	43,3		19,9	1	
8 april	36,2		21,6	-	
10 april / 0	40,3	1	20,0	1	
11 april / 1	39,9	1	20,0	1	
12 april / 2	40,4	1	< 15	1	
13 april / 3	20,0	2	< 10	1	-+-
14 april / 4	< 10	2	< 10	1	-?-
21 april / 11	20,0	2	15,0	1	++-
28 april / 18	24,6	2	39,6	1	
5 maj / 25	31,3	2	45,0		++-

Tabell 2. Evitas ovarieaktivitet

Express

Under den första lutealfasen som studerades blev den största follikeln 21,5 mm (se tabell 3) (11 april) och därför kunde hCG ej ges. Express var nyovulerad 22 april. Dag 9 post ovulation (1 maj) observerades en follikel på 42,8 mm i vänster äggstock och 3.000 IE hCG injicerades. I denna äggstock fanns redan en corpus luteum, men 3 dagar efter injektionen hade follikeln ovulerat och 2 corpus luteum fanns i vänster äggstock (se tabell 3). Dessa kvarstod under hela perioden med ultraljudsundersökningar. Progesteron kvarstod högt i ca 100 dagar (se fig. 3).



Figur 3. Express progesteronnivåer

Datum / antal dagar efter hCG	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL vänster äggstock	Tecken på brunst
4 april	< 15	1	< 15	1	
6 april	12,7	1	15,9	1	
8 april	< 10	1	< 10	1	
11 april	< 10	1	21,5	1	
22 april	< 10		< 20	1	-+-
29 april	25,0		28,2	1	
30 april	< 20		28,9	1	
1 maj / 0	< 15		42,8	1	
2 maj / 1	< 10		38,8	1	
3 maj / 2	< 15		4,16	1	
4 maj / 3	< 10		19,7	2	
11 maj / 10	39,6		20,0	2	
18 maj / 17	45,0		< 10	-	
26 maj / 25	< 10		38,1	2	

Tabell 3. Express ovarieaktivitet

Ocho

Ocho visade inga tecken på brunst under perioden 11 maj till 1 juni och injicerades därför med prostaglandin (1 ml Dinolytic) den 1 juni. Därefter kom hon återigen igång med normal cyklicitet. Stoet fick under de tre lutealfaser som hon studerades inga folliklar på > 30 mm och kunde därför aldrig injiceras med hCG (se tabell 4).

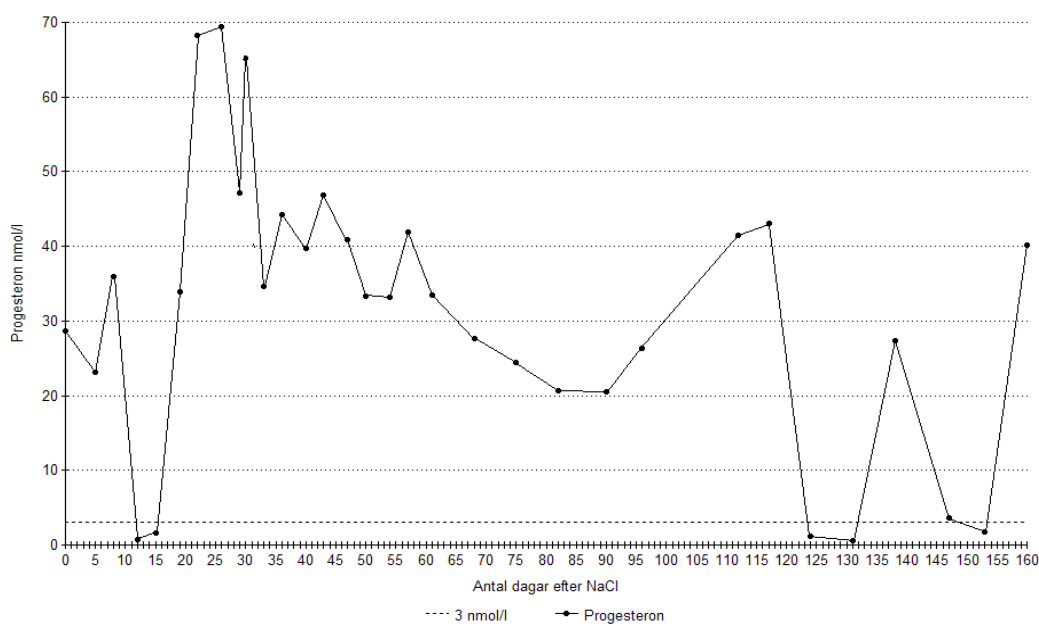
Datum	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL vänster äggstock	Tecken på brunst
4 april	17,5		22,0		+++
6 april	< 20		31,4		+++
8 april	< 10		35,8		+++
11 april	< 15		42,5		+++
15 april	19,3		< 20	1	-+?
21 april	< 15		20,6	1	
24 april	20,2		24,2	1	
25 april	21,0		23,0	1	
26 april	15,9		18,1	1	
3 maj	22,0		29,0		+++
6 maj	27,6		34,0		+++
7 maj	31,6		43,5		+++
9 maj	37,4		46,0		+++
11 maj	saknas		saknas	1	
16 maj	< 15		< 15	1	
18 maj	21,0		< 15	1	
20 maj	23,0		< 15	1	
22 maj	< 20		< 15	1	
24 maj	16,5		< 15	1	
1 juni	< 15		27,2	1	
6 juni	25		36,2		+++
8 juni	< 25		47,4		+++
10 juni	< 10		< 10	1	+++
17 juni	< 15		< 15	1	
19 juni	19,5		< 15	1	
21 juni	< 15		< 15	1	
22 juni	< 10		< 10	1	
24 juni	< 10		< 15	1	

Tabell 4. Ochos ovarieaktivitet

Intensivstudiens kontrollgrupp

Malin

Malin tillhörde kontrollgruppen och injicerades med 2 ml NaCl i.m. när hon hade en follikel som var 33 mm i vänster äggstock, dag 10 post ovulation (11 april) (se tabell 5). Tio dagar efter injektionen sågs tecken på brunst. En dubbelovulation skedde i denna follikelfas. Efter denna östrus kvarstod progesteron högt i 100 dagar (se fig. 4). Stoet studerades med ultraljud till dag 9 post ovulation. Under denna period sågs inga diöstrusovulationer eller andra orsaker till en förlängd lutealfas (se tabell 5).



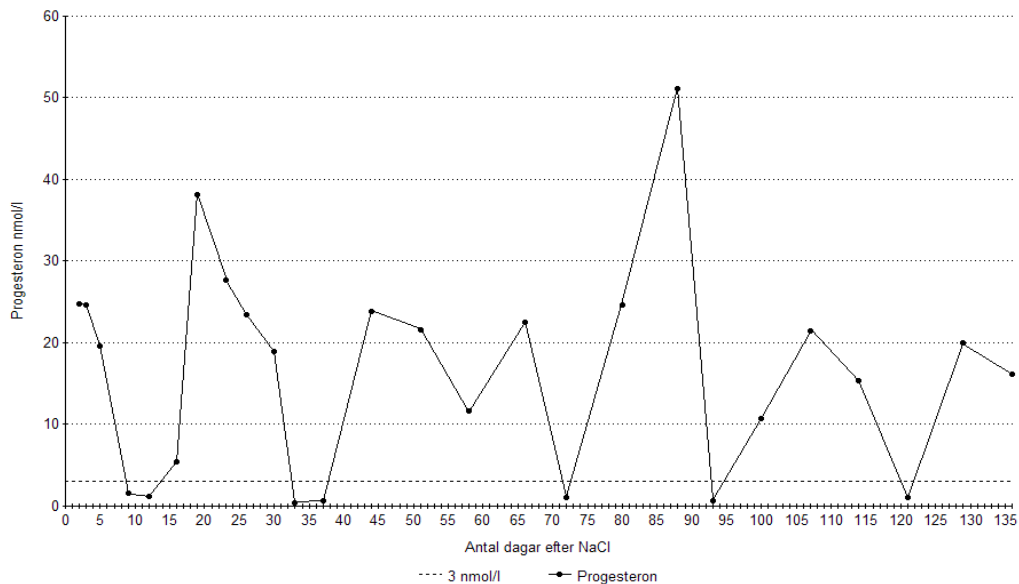
Figur 4. Malins progesteronnivåer

Datum /Antal dagar efter NaCl	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL vänster äggstock	Tecken på brunst
1 april					+++
4 april	28,6		32,9	1	
6 april	28,6		23,9	1	
8 april	29,4		31,1	1	
11 april /0	20,0		33,0	1	
12 april /1	18,4		33,0	1	
13 april /2	< 15		29,0	1	
14 april /3	< 15		35,8	1	
21 april/10	34,2		35,7		+++
28 april /17	< 10	1	18,6	1	
5 maj /24	< 10	1	< 10	1	??-

Tabell 5. Malins ovarieaktivitet

Lupin

Lupin var sannolikt anöstral och injicerades därför med prostaglandiner den 22 april. Svag brunst observerades i samband med detta. Dag 9 (1 maj) efter sista tecken på brunst sprutades hon med 2 ml NaCl. Hon hade då en follikel på 31,1 mm i höger äggstock (se tabell 6). Nio dagar senare skedde luteolys med kraftig sänkning av progesteron (se fig. 5) med östrus och ovulation som följd. Lupin har därefter haft en normal cyklicitet. Dock sågs förhöjda progesteronnivåer under 30 dagar mitt i studien.



Figur 5. Lupins progesteronnivåer

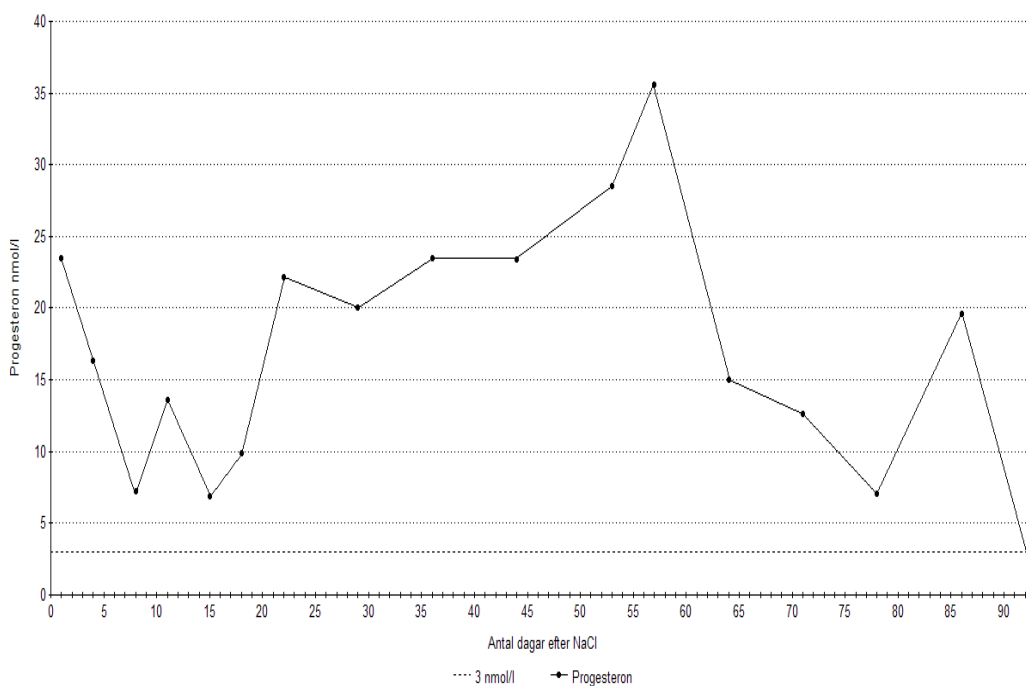
Datum /antal dagar efter NaCl	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL vänster äggstock	Tecken på brunst

4 april	15,0		< 10	1	
6 april	14,9		< 10	1	-?-
8 april	12,4		10,0	1	
11 april	16,3		19,4	1	-?-
21 april	40,0		< 10		??+
28 april	19,1	1	< 10		
1 maj /0	31,1	1	26,4		
2 maj /1	30,0	1	24,0		
3 maj /2	30,1	1	24,6	1	
4 maj /3	31,1	1	33,0	1	
11 maj /10	< 15	1	33,9		
18 maj /17	< 15	1	< 15	1	
26 maj /25	< 10		18,5	1	

Tabell 6. Lupins ovarieaktivitet

Mermaid

Under första lutealfasen som studerades hade stoet inga folliklar >30 mm (se tabell 7). Den andra lutealfasen förlängdes spontant och dag 22 post ovulation injicerades hon med prostaglandiner (1 ml Dinolytic). Brunst sågs 5 dagar senare och ledde till ovulation. Dag 8 (6 juni) post ovulation sågs en follikel på 35,1 mm i vänster äggstock och stoet injicerades med 2 ml NaCl i.m. Progesteron kvarstod högt i 93 dagar (se fig. 6).



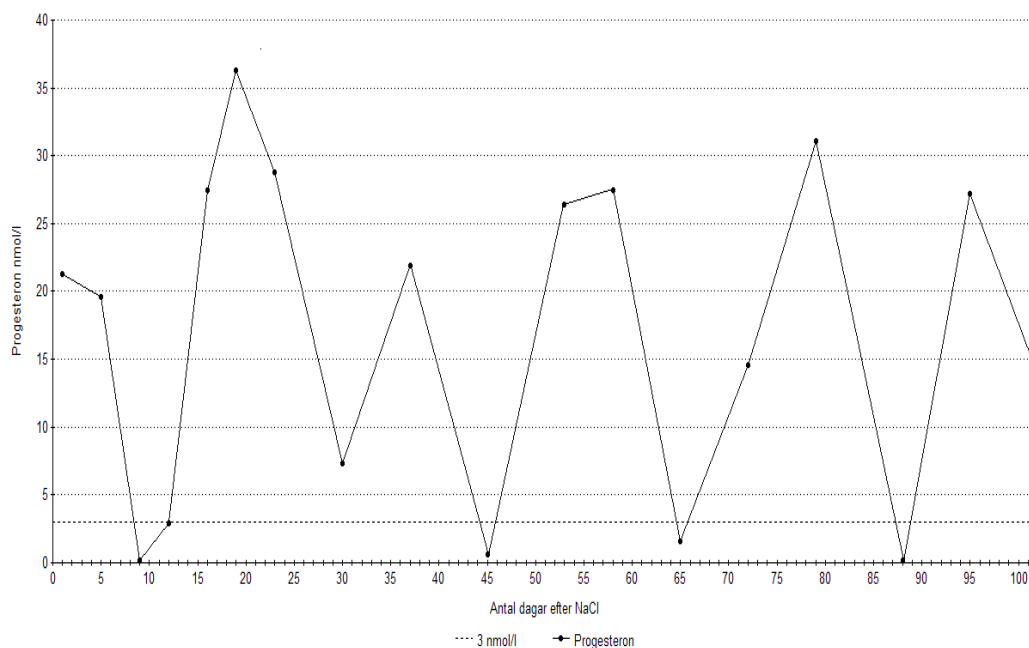
Figur 6. Mermaids progesteronnivåer

Datum / antal dagar efter NaCl	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL vänster äggstock	Tecken på brunst
4 april	< 10		< 10	1	
6 april	< 10		< 10	1	
11 april	17,7		< 10	1	
25 april	40,0		30,0		+++
26 april	42,3		< 10	1	+++
27 april	32,0	1	< 10	1	+++
4 maj	22,5	1	< 10	1?	
6 maj	< 20	1	< 10	1?	
7 maj	< 25	1	< 10		
9 maj	23,0	1	< 20		
19 maj	< 15	1	20,0	1?	
22 maj	30,0	1	< 15	1?	
24 maj	-	-	-	-	+++
26 maj	45,0		30,0		+++
28 maj	52,0		30,0		+++
31 maj	< 10	1	30,0		
6 juni / 0	22,0	1	35,1		
8 juni / 2	< 20	1	34,7		
10 juni / 4	32,7	1	35,8		
17 juni / 11	47,7		22,0	1?	
24 juni / 18	25,6	1	24,9		
1 juli / 25	22,2	1	2,04		

Tabell 7. Mermaids ovarieaktivitet

Julia

Julia var svårundersökt under första delen av studien. Under den sista lutealfasen som studerades fick hon dag 7 post ovulation (6 juni) en follikel på 44,3 mm (se tabell 8). Hon ingick i kontrollstudien och injicerades med 2 ml NaCl i.m. En ny ovulation skedde 11 dagar senare (se tabell 8). Julia behöll normala lutealfaser under hela studien, ev. ses en förlängd lutealfas på 28 dagar mitt i studien (se fig. 7).



Figur 7. Julias progesteronnivåer

Datum / Antal dagar efter NaCl	Follikel höger äggstock (mm)	Antal CL höger äggstock	Follikel vänster äggstock (mm)	Antal CL vänster äggstock	Tecken på brunst
1 maj	-	-	30,3		
3 maj	< 10		32,1		
5 maj	< 10		38,5	1?	
6 maj	< 10		38,8		
7 maj	22,4		35,2		+++
9 maj	< 15		< 10	1	+++
15 maj	< 15	1	< 15	1	
18 maj	18,0	1	< 10	1	
20 maj	18,1		< 10	1	
22 maj	21,0		< 15	1	
31 maj	< 10	1	< 15		+++

6 juni / 0	< 10	1	44,3	
8 juni / 2	< 10	1	35,9	
10 juni / 4	< 10	1	34,7	
17 juni / 11	14,6		21,5	1
24 juni / 18	26,0		< 10	1
1 juli / 25	39,6		2,07	

Tabell 8. Julias ovarieaktivitet

Sammanfattningsvis fick två av stona i försöksgruppen förlängda lutealfaser efter injektion med hCG (se tabell 9). Ett av dessa två ston fick därefter en spontant förlängd lutealfas. I kontrollgruppen fick ett sto en förlängd lutealfas på 93 dagar efter injektionen med NaCl. De övriga tre stona i kontrollgruppen fick samtliga spontant förlängda lutealfaser på 28-110 dagar (se tabell 9).

Sto	Längd på lutealfas efter hCG	Längd på lutealfas efter NaCl (dagar)	Längd på spontant förlängd lutealfas
Tanga	15 dagar	-	-
Evita	61 dagar	-	ca 40 dagar
Express	ca 100 dagar	-	-
Ocho	-	-	-
Malin	-	10 dagar	110 dagar
Lupin	-	9 dagar	30 dagar
Mermaid	-	93 dagar	-
Julia	-	9 dagar	28 dagar

Tabell 9. Sammanfattande tabell över stonas lutealfaser

Fältstudien

Även i fältstudien fick flera brunstcykler studeras på tre av stona eftersom de ej fick folliklar > 30 mm. Två av stona fick aldrig någon follikel över 30 mm, utan injicerades med hCG (Pregnyl® 3.000 IE) när folliklarna var 20,4 respektive 28,9 mm. Det tredje stoet fick en follikel > 30 mm under den andra lutealfasen som studerades och kunde då injiceras med hCG. På två av de ston i studien som injicerades med hCG skedde ingen ovulation. Ett av dessa ston hade en follikel på 34,4 mm vid injektionen. Det andra stoet hade endast en follikel på 20,4 mm. Den lutealfas under vilken man injicerade hCG varade i 15-38 dagar, varav två av stona hade en lutealfas på 27 respektive 38 dagar (se tabell 10). De två lutealfaser under vilka man injicerade NaCl varade i 14 respektive 20 dagar (se tabell 10).

Sto	Längd på lutealfas efter hCG	Längd på lutealfas efter NaCl
Mistress	19 dagar	-
Deuxmille	15 dagar	-
Bullan	16 dagar	-

Cher	38 dagar	-
Piece Crossing	27 dagar	-
Memory	-	20 dagar
Velvet	-	14 dagar

Tabell 10. Sammanfattande tabell över lutealfaserna hos de ston som ingick i fältstudien.

Diskussion

På två av fyra ston som fick hCG i intensivstudien förlängdes den lutealfas under vilken injektionen skedde med ca 61 dagar respektive ca 100 dagar. I fältstudien fick ett sto en förlängd lutealfas på 38 dagar. Dock har ej detta kunnat fastställas med progesteronanalys. Ytterligare ett sto i fältstudien fick en förlängning av lutealfasen till 27 dagar. Om en 27 dagar lång lutealfas är en förlängd lutealfas är tveksamt. I King & Evans studie (1988) ansågs en lutealfas vara förlängd när den kvarstod i > 30 dagar post ovulation. Dock är den normala längden på en lutealfas ca 15 dagar (Hughes *et al*, 1972). Utgår man från detta värde så är även en lutealfas på 27 dagar förlängd. Vad som också måste vägas in är att stoet under denna period bara studerades med rektalisering och ultraljud en gång i veckan. Man har därför aldrig observerat någon brunst under studien, men man har dock sett att en ovulation har skett mellan dag 27 och 30 post ovulation (17-24 dagar efter injektionen med hCG). Detta kan alltså ha varit en ovulation under progesteronfas utan några brunstsymptom.

Express, ett av stona i intensivstudien som fick en förlängd lutealfas efter hCG-injektionen injicerades dag 9 post ovulation och tre dagar senare skedde en ovulation dvs. dag 12 post ovulation. Allen & Rosedale (1973) skriver att en diöstrusovulation inom 4-5 dagar före luteolys dvs. dag 10-12 leder till persisterande gulkropp. Ovulationen som skedde hos ovan sto tre dagar efter behandlingen med hCG skulle kunna liknas vid en diöstrusovulation dag 12 och skulle därför kunna vara orsaken till den förlängda lutealfasen på ca 100 dagar. Denna teori stöds även av Daels *et al* (1996) och Kindahl *et al* (2000) där man inducerat förlängda lutealfaser genom ovulationer under exogen progesteronpåverkan efter behandling med hCG. Hos Evita det andra stoet i intensivstudien, som fick en förlängd lutealfas på 61 dagar skedde behandling med hCG dag 10-11 post ovulation och man såg även här en ovulation tre dagar senare dvs. ca dag 13-14 post ovulation. Dessutom skedde en spontan diöstrusovulation dag 11. På grund av detta är det svårt att avgöra om detta stos förlängda lutealfas orsakades av den hCG-inducerade ovulationen eller av diöstrusovulationen. Båda ovulationerna skedde inom 4-5 dagar innan luteolys normalt skulle ha skett och skulle därför kunna ha gett upphov till persisterande gulkroppar. Ultraljudsresultaten talar för att båda gulkropparna kvarstod i åtminstone 25 dagar efter injektionen med hCG. På stoet i fältstudien injicerades hCG dag 12 post ovulation och den hCG-inducerade ovulationen sågs tre dagar senare, vilket också är inom 4-5 dagar före luteolys normalt skulle ha skett. Vad som talar emot att det skulle vara ovulationer under progesteronfasen som orsakat dessa förlängda lutealfaser är en artikel av Stabenfeldt *et al* (1975) där man skriver att ovulationer kan ske under lutealfas, men att de inte orsakar några förlängda lutealfaser. Det finns även en annan studie där man har både

makroskopiska och histologiska fynd som talar för att det flesta rupturerade diöstrala folliklarna degenererar och blir hormonellt inaktiva (Vandeplassche *et al*, 1979).

På stoet Tanga som ingick i intensivstudien och injicerades med hCG skedde ingen ovulation. Behandlingen upprepades under två olika lutealfaser, men ovulation skedde inte vid något av dessa tillfällen. Den första injektionen gavs dag 11 post ovulation då den största follikeln var 26,5 mm. Den andra injektionen gavs dag 7 post ovulationen och då var den största follikeln 31,8 mm. Vandeplassche *et al* (1979) skriver att sannolikheten för att spontan ovulation ska ske minskar ju längre in i diöstrus som stoet är. En teori man har om orsaken till detta är att nivåerna av LH är låga under diöstrus och att även progesteron skulle kunna ha en hämmande effekt på ovulation. Dock har hCG en LH-liknande effekt och låga LH-nivåer borde därför inte vara orsaken till att ovulation inte sker i detta fall. Fortune (1994) skriver att follikeltillväxten sker i form av 10 generationer av granulosa-celler och att det bara är celler som uppnått generation 9 och 10 som svarar på FSH och fortsätter att växa. Av dessa är det bara enstaka som kommer att kunna ovulera. Hon tror att den dominanta follikelns östrogen- och androgenproduktion har stor betydelse för den slutliga mognaden före ovulation. Folliklar som växer till under lutealfas producerar mindre mängd östrogener och hon menar att det är därför dessa på de flesta djurslag inte leder till någon ovulation (Fortune, 1994). I detta fall skulle man kunna tänka sig att folliklarna som man såg när hCG injicerades ej ännu var mogna enligt Fortunes teori och att det var därför som ingen ovulation skedde. Framför allt skulle man kunna tänka sig att detta stämmer då den första follikeln var enbart 26,5 mm. Vad som stödjer denna teori när det gäller den andra injektionen är att denna injektion gjordes tidigt under diöstrus och den största follikeln var då inte tillräckligt mogen. Även i fältstudien var det ett sto som inte ovulerade efter behandlingen med hCG. Detta sto hade en follikel på 29,4 mm. Behandlingen skedde dag 11 post ovulation. Daels *et al* (1996) fick ett liknande resultat när de gav hCG till ston under altrenogestbehandling. I den studien var det 4 av 10 ston som aldrig ovulerade.

På ett sto i fältstudien injicerades hCG dag 9 post ovulation och ovulation observerades dag 11. Detta stos lutealfas förlängdes ej. En trolig orsak till detta var att gulkroppen som bildades efter den hCG-inducerade ovulationen inte längre var refraktär när luteolysen kom igång. Denna teori stöds av flera studier där man gett en infusion med NaCl intrauterint till ston under olika tidpunkter under stons brunstcykel och fått en stegring av prostaglandinmetaboliter. Denna stegring har dock visat sig inte orsaka någon luteolys på gulkroppar yngre än 4-5 dagar och man har därför dragit slutsatsen att dessa är refraktära (Arthur, 1975, Neely *et al*, 1975). Det finns även studier där man visat att diöstrusovulationer enbart leder till förlängda lutealfaser om dessa sker 4-5 dagar före luteolys eller tidigast dag 11 post ovulation (Neely *et al*, 1979, Stabenfeldt *et al*, 1981, Ginther & Pierson, 1989). Man kan även jämföra detta med Daels *et al* (1996) där man behandlade ston med hCG under altrenogestbehandling och då orsakade förlängd lutealfas hos 5 av de 6 ston som ovulerade av hCG.

Flera av stona både i intensivstudien och i fältstudien utvecklade sällan eller aldrig folliklar på > 30 mm under diöstrus. Detta skulle kunna stödjas av Fortune (1994)

som skriver att bara en tredjedel av alla ston har en andra follikelvåg. I hennes studie sågs bara en follikelvåg med folliklar som nådde maximal storlek under östrus. Hon såg dock diöstrala folliklar på ≥ 25 mm. Noakes (2001) har visat att dag 4-9 post ovulation är inga folliklar > 10 mm. Dock finns det många studier som visat att ston har en follikelvåg även under diöstrus, med stora folliklar, som även kan leda till ovulation, vilken dessutom sammanfaller med en höjning av FSH (Evans & Irvine, 1975, Hughes *et al*, 1980).

Tre av stona i intensivstudiens kontrollgrupp uppvisade spontant förlängda lutealfaser på 28, 30 respektive 110 dagar. Stabenfeldt *et al* (1981) har sett att spontant förlängda lutealfaser varar i ca 30 till 90 dagar. Även ett av stona i försöksgruppen som först hade en hCG-inducerad förlängd lutealfas på 61 dagar fick en spontan förlängning av den nästkommande lutealfasen på ca 40 dagar. På inget av dessa 4 ston har man kunnat konstatera en eventuell diöstrusovulation som orsak till de förlängda lutealfaserna. En annan orsak till de spontant förlängda lutealfaserna kan var att stona av någon anledning haft en inadekvat syntes eller frisättning av PGF_{2 α} . Alternativt att prostaglandinet av någon anledning ej nått äggstocken eller att gulkroppen ej svarat på prostaglandinet. Det finns flera studier som beskriver diöstrusovulationer eller inadekvat syntes eller frisättning av PGF_{2 α} som en trolig orsak till spontant förlängd lutealfas (Hughes *et al*, 1972, Neely *et al*, 1979, Stabenfeldt *et al*, 1981, Ginther *et al*, 1989). Kindahl *et al* (2000) har en teori om att den inadekvata frisättningen av prostaglandin skulle kunna orsakas av att livmodern ej svarar på oxytocin som den ska. Man har också en teori om att höjda progesteronvärden under östrus på grund av stress också skulle kunna leda till en försämrad eller utebliven luteolys eftersom livmodern måste utsättas för östrogen utan närvaro av progesteron en viss tid före luteolys kan ske (Kindahl *et al*, 2000). Vad som ej undersöktes varken i intensiv- eller fältstudien är om något av stona hade en kronisk infektion som orsakade den förlängda lutealfasen eftersom ingen närmare undersökning av deras livmödrar gjordes. Enligt Hughes *et al* (1979) kan en kronisk infektion leda till mer eller mindre förlängda lutealfaser. Det är anmärkningsvärt att så många ston i denna studie utvecklar förlängda lutealfaser. Det finns sedan tidigare beskrivet i litteraturen att frekvensen spontant förlängda lutealfaser är ca 20 % (Stabenfeldt *et al*, 1981). I intensivstudien är det dock 50 % av stona som får en förlängd lutealfas någon gång under studiens gång. Orsaken till detta är osäker. Under den period som stona i fältstudien observerades så var det inget av stona som fick spontant förlängd lutealfas.

Eventuellt hade försöket visat på andra resultat om fler ston ingått i studien, om blodprover för progesteronanalys hade tagits på samtliga ston, om tätare rektalundersökningar utförts under en längre period och om stona hade varit mer representativa för den normala stopopulationen, dvs. ej försöksston som ofta hormonbehandlas och undersöks av många olika personer flera gånger i veckan året runt.

Sammanfattningsvis visas att hCG-behandling under progesteronfas ej är någon enkel metod för att förhindra brunst hos ston. Problem som man stöter på är att många ston inte får tillräckligt stora eller mogna folliklar under alla progesteronfaser, vilket innebär att man tvingas ultraljudsundersöka stoet under en längre period före behandling kan sättas in, om den ens kommer kunna sättas in.

Dessutom finns det då en risk att man behandlar stoet för tidigt under diöstrus och att den gulkropp man orsakat ej är refraktär vid tidpunkten för luteolys och lutealfasen förlängs ej. Det är dessutom mycket osäkert hur lång förlängning av lutealfasen man får. Kanske måste behandlingen upprepas redan om en månad igen. Dock fungerar metoden bra om man har ett sto som alltid får mogna folliklar på > 30 mm under diöstrus och att man får dessa att ovulera tidigast dag 11 i diöstrus, så att den uppkomna gulkroppen fortfarande är refraktär vid luteolysen.

TACK

Hans Kindahl, min handledare – tack för all hjälp med att få till denna uppsats och även ett stort tack för de gånger du åkte ut till Västerbo och undersökte stona!

Ylva Hedberg, min biträdande handledare - det har varit jätteroligt att få genomföra det här försöket tillsammans med dig. Tillsammans har vi slitit och stöttat varandra!

Susanne och Mikael Demmers – tack för att vi fick låna era hästar till studien. Och Sussie tack för ditt tålamod med mig mitt under din högsäsong! Även stort tack till alla anställda på Västerbo stuteri, som också hjälpte till under försökets gång!

Anne-Marie Dalin – tack för att du hjälpt oss med att undersöka stona de gånger det kört ihop sig för mig och Ylva och även ett stort tack för att du hjälpte mig att hitta det här projektet!

Personalen i OG's stall: Marie Wallbring, Carola Jansson och Ulrika Mattsson – ett stort tack för all praktisk hjälp med stona!

Mari-Anne Carlsson och Åsa Karlsson, personal på klinisk kemis hormonlab – tack för all hjälp med mina progesteronanalyser!

Slutligen ett stort tack till mina kursare – tillsammans har vi stöttat varandra för att klara av denna sista termin!

LITTERATURFÖRTECKNING

- Allen, W.R., Rossdale, P.D. 1973. A preliminary study upon the use of prostaglandins for inducing oestrous in non-cycling thoroughbred mares, *Equine Veterinary Journal* 5, 137-140.
- Arthur, G.H. 1975. Influence of intrauterine saline infusion upon the oestrous cycle of the mare, *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 23, 231-234.
- Betteridge, K.J., Renard, A., Goff, A.K. 1985 Uterine prostaglandin release relative to embryo transfer procedure and maintenance of the corpus luteum, *Equine Veterinary Journal, Supplement* 3, 25-33.
- Daels, P.F., McCue, P.M., DeMoraes, M.J., Hughes, J.P. 1996. Persistence of the luteal phase following ovulation during altrenogest treatment in mares, *Theriogenology* 46, 799-811.
- Douglas, R.H., Ginther, O.J. 1975. Effects of prostaglandin F_{2α} on estrous cycle or corpus luteum in mares and gilts, *Journal of Animal Science* 40, 518-523.
- Evans, M.J., Irvine, C.H.G. 1975. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare, *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 23, 193-200.
- Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals, *Biology of Reproduction* 50, 225-232.
- Ginther, O.J. 1992. Endocrinology of the ovulatory season. In: *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects* 2nd ed. Equiservices, Wisconsin, pp. 233-290.
- Ginther, O.J. 1981. Local versus systemic uteroovarian relationships in farm animals, *Acta veterinaria scandinavica, Supplement* 77, 103-115.
- Ginther, O.J. 1990. Prolonged luteal activity in mares – a semantic quagmire, *Equine Veterinary Journal* 22, 152-156.
- Ginther, O.J., Pierson, R.A. 1989. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares, *Journal of Equine Veterinary Science* 9, 4-12.
- Hughes, J.P., Couto, M.A., Stabenfeldt, G.H. 1985. Luteal phase ovulations: What are the options?, *Proceeding of Annual Meeting of Society of Theriogenology* 1985, 123-125.
- Hughes, J.P., Stabenfeldt, G.H., Evans, J.W. 1972. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. *Proc 18th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners, San Francisco, CA*, 119-151.
- Hughes, J.P., Stabenfeldt, G.H., Kennedy, P.C. 1980. The estrous cycle and selected functional and pathological ovarian abnormalities in the mare, *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practise* 2, 225-239.

- Hughes, J.P., Stabenfeldt, G.H., Kindahl, H., Kennedy, P.C., Edqvist, L.-E., Neely, D.P., Schalm, O.W. 1979. Pyometra in the mare, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 27, 321-329.
- Kindahl, H., Knudsen, O., Madej, A., Edqvist, L.-E. 1982. Progesterone, prostaglandin F_{2α}, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 32, 353-359.
- Kindahl, H., Odensvik, K., Hansen, B., Daels, P.F. 2000. Changes in PGF_{2α} secretion during prolonged luteal phase in mares, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 56, 305-315.
- King, S.S., Evans, J.W. 1988. Follicular growth and estradiol influence on luteal function in mares, *Journal of Animal Science* 66, 98-103.
- Neely, D.P. 1979. Studies on the Control of Luteal Function and Prostaglandin Release in the Mare, PhD. Thesis, University of California, Davis, 1979.
- Neely, D.P., Hughes, J.P., Stabenfeldt, G.H., Evans, J.W. 1975. The influence of intrauterine saline infusion on luteal function and cyclical activity in the mare, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 23, 235-239.
- Neely, D.P., Kindahl, H., Stabenfeldt, G.H., Edqvist, L.-E., Hughes, J.P. 1979. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological and therapeutic responses, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 27, 181-189.
- Noakes, D.E., 2001 Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In; Arthur's *Veterinary Reproduction and Obstetrics* 8th ed. W B Saunders, Philadelphia, pp. 3-53.
- Reynolds, L.P., Redmer, D.A. 1999 Growth and development of the corpus luteum, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 54, 181-191.
- Stabenfeldt, G.H., Hughes, J.P., Evans, J.W. 1971. Ovarian acitivity during the estrous cycle of the mare, *Endocrinology* 90, 1379-1383.
- Stabenfeldt, G.H., Hughes, J.P., Evans, J.W., Geschwind, I.I. 1975. Unique aspects of the reproductive cycle of the mare, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 23, 155-160.
- Stabenfeldt, G.H., Hughes, J.P., Evans, J.W., Neely, D.P. 1974. Spontaneous prolongation of luteal activity in the mare, *Equine Veterinary Journal* 6, 158-163.
- Stabenfeldt, G.H., Kindahl, H., Hughes, J.P., Neely, D.P., Liu, I., Pascoe, D. 1981. Control of luteolysis in the mare, *Acta veterinaria scandinavica*, Supplement 77, 159-170.
- Vandeplassche, M., Henry, M., Coryn, M. 1979. The mature mid-cycle follicle in the mare, *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 27, 157-162.