



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

# **Diapaus**

## En uråldrig strategi med en framtida roll?

*Lisa Dahlin*

*Uppsala  
2017*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2017:9*



# Diapaus

En uråldrig strategi med en framtida roll?

*Lisa Dahlin*

**Handledare:** Elisabeth Persson, institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**Examinator:** Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grund nivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2017:9

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** diapaus, fördröjd implantation, blastocyst, mink, mus, rådjur

**Key words:** diapause, delayed implantation, blastocyst, mink, mouse, roe deer

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING .....	1
SUMMARY .....	2
INLEDNING .....	3
MATERIAL OCH METODER .....	4
LITTERATURÖVERSIKT .....	5
Fördröjning av dräktigheten .....	5
Blastocystens tidiga utveckling .....	6
Diapausen .....	7
Inträdet i diapausen.....	8
Fysiologiska mekanismer under diapausen .....	8
Blastocystens energikällor under diapausen.....	9
Blastocystens återaktivering .....	10
Diapausens evolution.....	11
DISKUSSION .....	13
LITTERATURFÖRTECKNING .....	15



## SAMMANFATTNING

Rådjur, mink och mus är tre däggdjursarter som alla tre har förmågan att fördröja sin avkommas utveckling. Detta sker genom en strategi som kallas diapaus och infaller innan det tidiga embryot, blastocysten, implanteras i livmoderslemhinnan. Hur länge diapausen pågår varierar hos olika djurslag och kan vara i allt från ett par dagar till flera månader.

Diapausen delas oftast upp i två olika typer, obligat och fakultativ. Den obligata diapausen infaller vid varje dräktighet och har en koppling till säsongsmässig förändring i antalet ljusa timmar per dygn, och återfinns oftare hos större djur som föder färre avkommor per säsong, till exempel rådjur och mink. Fakultativ diapaus har istället en koppling till endogena faktorer såsom metabol stress på grund av laktation. Denna typ ses oftare hos mindre djur som föder fler avkommor per kull och får flera kullar per år, till exempel mus.

Diapausen som fenomen är intressant ur evolutionärt perspektiv då dess förekomst varierar kraftigt mellan djurslagsgrupper. Över 100 däggdjursarter har förmågan att gå in i diapaus och en av de familjer där den är mest representerad är *Mustelidea*, mårddjuren. Dock uppvisas en stor diversitet och närbesläktade arter skiljer sig tydligt åt. Till exempel besitter den till minken närbesläktade illern inte förmåga att gå in i diapaus. Gnagare, *Rodentia*, är även de välrepresenterade bland arter som har diapaus. Inom familjen *Cervidae*, hjortdjur, återfinns dock enbart en ensam representant för diapausen, rådjuret eller europeiskt rådjur som det kallas i vissa delar av världen. Den vitt spridda fördelningen av diapausen över djurriket talar för att mekanismen är mycket gammal och att den har nedärvts under flera miljoner år, men huruvida den utvecklats i flera steg eller selekterats fram i ett fåtal steg är ännu omtvistat.

Nyare forskning inom ämnet har visat att även blastocyster från djur som normalt inte genomgår diapaus kan induceras till denna vilofas, återaktiveras och utvecklas till en frisk avkomma. Msx-generna som bedöms vara en viktig del i diapausens reglering har även kartlagts i människans genom och diapaus-mekanismen har observerats hos människa, dock väldigt få gånger.

Sammantaget är diapausen ett intressant fenomen som det än så länge finns begränsade kunskaper om, även om många framsteg har gjorts de senaste åren. Forskningen är på frammarsch och det är möjligt att ett flertal av de reproduktionsbiologiska frågeställningar vi har om diapausen idag blir besvarade imorgon.

## SUMMARY

Roe deer, mink and mouse are three different mammals who all have the ability to delay the development of their offspring. This is done through a strategy called diapause, which occurs before the early embryo, the blastocyst, implants in the uterus. The length of the diapause varies between species and can last from a couple of days up to several months.

There are two different types of diapause; obligate and facultative. The obligate kind appears in every gestation and is connected to seasonal changes in the length of daylight. It most often occurs in larger animals whom give birth to fewer offspring per season, for example roe deer and mink. Facultative diapaus is instead connected to endogenous factors, as metabolic stress due to lactation. This type occurs more often in smaller animals with several litters and a large number of offspring per year.

The diapause is an interesting phenomenon from an evolutionary perspective. The distribution of animal species with the ability to enter diapaus varies widely and it occurs in over 100 species of mammals. *Mustelidae*, the mustelids, is one of the families where the mechanism is widely spread. However, the diversity between species is big and closely related species differ in the matter. For example, diapaus does occur in the mink but do not occur in the closely related ferret. *Rodentia*, rodents, is another family where the mechanism is widely spread. Within the family *Cervidae*, deers, there is only one species in which diapause occurs; the European roe deer. The widespread distribution of diapause over the animal kingdom indicates that the mechanism itself is ancient and has been inherited during several millions of years, but whether it has been evolved in several steps or selected in a few is still debated.

More recent studies have shown that blastocysts taken from animals in which diapause normally does not occur can be induced to this mechanism of rest, then become reactivated and undergo normal progress and develop into a healthy offspring. The Msx genes believed to have an important part in the diapause has been discovered in the human genome and the mechanisms of diapause has been observed in humans, although very few times.

Altogether, the diapaus is an interesting phenomenon on which the available knowledge is still limited, but a lot of progress has been made in the field the last couple of years. The research is making progress and there is a possibility that some of today's questions about diapause will be answered shortly.



## INLEDNING

Diapaus är en reproduktionsmekanism som fördröjer fosterutvecklingen (Renfree & Shaw, 2000). Mekanismen innebär att det under blastocystens tidiga utvecklingsstadium infaller en vilofas vilket leder till att dräktighetstiden förlängs och embryots utveckling samt partum förskjuts.

Diapaus är relativt vanligt förekommande i djurriket och ses hos både insekter, fåglar, fiskar, pungdjur och ryggradsdjur (Mead, 1993). Inom släktet *Eutheria*, på svenska kallat ”högre däggdjur”, förekommer diapaus hos flera olika familjer, såsom gnagare, mårddjur, fladdermöss, trögdjur och partåiga hovdjur (Renfree & Shaw, 2000).

Ett flertal olika funktioner är inblandade i diapausen – troligtvis eftersom en fungerande reproduktion är ett av djurens viktigaste verktyg för artens överlevnad (Renfree & Shaw, 2000). Den befruktade äggcellen utvecklas till blastocyst-stadiet, vars beteende skiljer sig mellan djurslag; i vissa fall saktar blastocystens utveckling ner kraftigt och i andra fall stannar den upp helt och behåller under denna paus i dräktigheten både antal celler och storlek på cellerna.

Diapausen upptäcktes första gången så tidigt som under 1600-talet av William Harvey (Hunter, 1995). Harvey undersökte ett flertal livmödrar från rådjur och var även den första att föreslå att ägget innehåller den huvudsakliga grunden till avkomman och inte spermerna, en teori som fick vetenskapliga, observerade, belegg först 200 år senare.

I denna litteraturöversikt har jag valt att beskriva tre däggdjursarter som finns i Sverige och därmed har liknande geografiska och miljörelaterade förutsättningar: rådjur (*Capreolus capreolus*), mink (*Mustela vison* enligt äldre taxonomi, *Neovison vison* enligt nyare taxonomi) och mus (*Mus musculus*). Syftet är att undersöka skillnaderna mellan dessa djurslags diapauser, dess förekomst och mekanismerna bakom samt diapausens evolutionära utveckling.

## **MATERIAL OCH METODER**

Artikelsökning har gjorts i databaserna Web of Science, PubMed och Scopus. Vid artikelsökning har först sökorden “embryonic diapause AND vertebrat\*” använts och sökningen förfinats med “mammal\* AND capreolus capreolus”. Sökning har även gjorts på “embryonic diapause” och förfinats med “other animals” och “veterinary sciences”. Även “diapause AND mouse”, “diapause AND mink” och “diapause AND roe deer” har använts. Vidare har de avgränsats med “AND implantation” och “AND blastocyst”. Ett antal artiklar har även hittats via vetenskapliga artiklars referenslistor.

Några böcker har även använts, se litteraturförteckningen.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Fördröjning av dräktigheten

Inom djurriket finns ett antal strategier för att fördröja dräktighet och avkommans ankomst (Orr & Zuk, 2014). Den generella synen är att både betäckning och partus utvecklats till att ske vid optimal säsong när tillgången på föda är som störst (Sandell, 1990). Delvis för att tillräcklig energi ska finnas för den nyblivna modern och avkomman, men hos vissa raser även för hannarna, som till exempel tävlar om att få betäcka honorna vilket är mycket energikrävande (Orr & Zuk, 2014). Generellt är mekanismer för att förlänga dräktigheten ovanliga i tropiska områden och mer frekventa vid högre latituder (Renfree & Shaw, 2000).

Diapaus är en av dessa strategier och i denna text används definitionen av Orr & Zuk: en paus som uppstår i blastocyst-stadiet då embryots celledelning saktar ner kraftigt eller avstannar helt (Orr & Zuk, 2014). Fördröjningen kan vara antingen fakultativ eller obligat (Sandell, 1990; Mead, 1993; Renfree & Shaw, 2000). Den obligata är säsongsbunden och inträffar vid varje dräktighet medan den fakultativa är bunden till huruvida modern lakterar eller ej, och inträffar därmed inte vid varje dräktighet (Sandell, 1990). I nyare studier framförs dock synen att termen obligat inte är korrekt, eftersom den obligata diapausen snarare är kopplad till geografiska områden än till specifika arter (Ptak *et al.*, 2012). "Flexibel" anses till exempel vara en lämpligare fras än obligat för att beskriva egenskapen. I flertalet av de artiklar och studier som använts till denna litteraturöversikt används dock termen obligat, varför jag kommer att fortsätta använda den.

Tabell 1. Djurslagsskillnader mellan rådjur, mink och mus (Aitken, 1974; Mead, 1993; Hyttel *et al.*, 2010; Ptak *et al.*, 2013)

	Djurslag		
	Rådjur	Mink	Mus
Typ av diapaus	Obligat	Obligat	Fakultativ
Dräktighetslängd	10 månader	40-75 dagar	19 dagar
Diapaus-längd	5 månader	8-45 dagar	4-5 dagar
Kullar/år	1	1	5-10
Avkommor/kull	1-2 (3)	4-6	3-15

Hos arter med obligat och säsongsbunden diapaus så inträffar denna under samma tidsperiod för alla honor och varar generellt en längre period (Sandell, 1990). Många av dessa djurarter får en eller ett fåtal avkommor varje säsong. Rådjurets dräktighetsperiod är cirka 10 månader lång och börjar under sommaren i juli-augusti, diapausen är cirka fem månader lång och blastocysten aktiveras igen i slutet av december varefter implantation sker i januari (Aitken, 1974). Avkomman föds sedan under senhösten, vanligen i maj. Mårddjurens parningssäsong pågår från februari till april och partus sker vanligen under april-maj, diapausens längd hos just mink kan därmed variera mycket. Parning sker oftast efter avvänjning av föregående kull med avkommor (Sandell, 1990). Musens brunstcykel är mycket kortare och dess dräktighetsperiod är enbart 19 dagar lång (Hyttel *et al.*, 2010). Ytterligare information om respektive djurart finns i tabell 1 på sidan 5.

Rådjuret är den enda arten inom familjen hjortdjur (*Cervidae*) där obligat diapaus förekommer (Renfree & Shaw, 2000). Davidshjorten (*Elaphurus davidianus*) har nästan lika lång dräktighetsperiod, 280 dagar jämfört med rådjurets 300 dagar, men de studier som utförts har inte kunnat visa på obligat diapaus, utan pekar snarare mot en fakultativ diapaus på 30 dagar eller att davidshjortens embryo utvecklas långsammare än andra arters (Brinklow & Loudon, 1993).

Fakultativ diapaus styrs som tidigare nämnts av endogena processer, exempelvis laktation, och pausen är fakultativ i det avseendet att diapausen inte måste inträffa. Om moderns redan födda avkomma/avkommor avlider, till exempel en avkomma i pungen hos en känguru, går den befruktade blastocysten inte in i diapaus, utan utvecklingen fortgår (Sandell, 1990). Generellt ses den fakultativa varianten hos mindre djur med flera avkommor i samma kull och kortare brunstcykel. Diapausens längd varierar mycket mellan arter, allt från fyra dagar upp till ett år (Mead, 1993; Hyttel *et al.*, 2010).

Det faktum att diapaus går att inducera hos arter där det normalt sett inte förekommer är känt sedan länge (Chang, 1968). På senare år har till exempel försök gjorts där blastocyster från tamfår (*Ovis aries*) förts in i möss med hjälp av embryotransfer (Ptak *et al.*, 2012). Hos mössen inducerades skendräktighet med hjälp av ovariektomi och progesteronbehandling, varpå ett diapaus-liknande tillstånd uppnåddes. Efter sju dagar sköljdes livmödrarna hos mössen och av de 856 blastocyster som förts in överlevde 180 stycken, dvs 21 %. Dessa fördelades sedan i 20 synkroniserade får och totalt föddes åtta friska lamm per 18 överförda blastocyster. Intressant med dessa siffror är att den procentuella överlevnaden i kontrollgruppen (embryon som odlats *in vitro* i sju dagar) förvisso var betydligt högre, 49 %, men resulterade i enbart sex födda friska lamm per 22 överförda blastocyster, en siffra jämförbar med gruppen som studerades. Resultatet för kontrollgruppen indikerar att *in vitro*-miljön inte var optimal för blastocysternas fortsatta utveckling. Samtliga lamm som föddes var friska och av normal födelsevikt.

### **Blastocystens tidiga utveckling**

Ägg-komplexet består av tre delar; oocyten, zona pellucida (det extracellulära matrix som omger oocyten) och cumulus-celler, vilka omger zona pellucida (Hyttel *et al.*, 2010). Vid befruktning penetrerar spermien zona pellucida samt adhererar till och sammansmälter sedan med oocyten plasmamembran. De två gameternas sammansmältning utgör starten för embryots utveckling. Den första celldelningen (klyvning) infaller normalt inom ett dygn efter ovulation.

Efter ytterligare klyvningar bildas en morula (Hyttel *et al.*, 2010). När morulan växer bildas en vätskefylld hålighet, blastocoel. De yttersta cellerna, närmast zona pellucida, bildar trofoblast och de centralt belägna cellerna ansamlas och bildar en inre cellmassa i embryots ena pol – morulan har utvecklats till en tidig blastocyst. Den inre cellmassan ger huvudsakligen upphov till den nya individen och trofoblasten ingår i fosterhinnornas utveckling. Tidpunkten för detta skiljer sig något mellan djurarter, hos större däggdjur inträffar den runt fem till åtta dagar efter ovulation och hos mindre däggdjur, exempelvis mus, inträffar den redan efter tre dagar. När det osmotiska trycket i blastocystens hålrum ökar, ökar blastocysten i storlek.

När blastocysten expanderar spricker till slut zona pellucida och blastocysten ”kläcks”, varefter embryot är fritt i livmoderlumen (Hyttel *et al.*, 2010). Detta möjliggör implantation, vari djurslagsskillnader föreligger. Hos gnagare är blastocysten invasiv och penetrerar slemhinnan för att bädda in sig i endometriets bindväv. Hos hov- och klövdjuren är implantationen icke-invasiv och fäster enkom (apposition) mot endometriets luminala lager, medan karnivorer har en viss invasion av livmoderslemhinnan. Implantation/placentabildning sker hos små idisslare utan diapaus, som t ex får, normalt efter 15 till 20 dagar och hos mus vanligen dag 4 (när diapaus inte förekommer). Hos mustelida karnivorer utan diapaus sker implantation runt dag 12 (Enders & Mead, 1996).

Hos mink befinner sig blastocysterna under diapausen liggandes i kluster i de kraniala delarna av livmoderhornen (Fenelon *et al.*, 2014). Migration och utspridning av blastocysterna sker först efter att reaktivering skett. Hos mus ligger blastocysterna jämt fördelade i livmoderns luminala epitel, vilket bildar stängda kryptor som skyddar blastocysterna. Blastocysterna hos rådjur rör sig fritt i uterus under diapausen (Aitken *et al.*, 1973).

## Diapausen

Hos rådjur infaller diapausen innan blastocysten förlängs och etablerar appositionen till livmodern (Aitken, 1974), efter att zona pellucida kläcks (Lopes *et al.*, 2004). Blastocysten består då av cirka 30–40 celler. Även hos mink infaller diapausen innan implantation i livmodern, dock kvarstår zona pellucida runt blastocysten fram till implantation, det vill säga under hela diapausen. Minkens blastocyst består då av 200–400 celler. Hos karnivorer finns utöver zona pellucida ett extra skyddande lager runt blastocysten, bestående av glykoproteiner från reproduktionskanalen, vilket fungerar som ett extra skydd när blastocysten färdas till livmodern från äggladaren. Fördröjningen av implantationen hos mink och rådjur är obligat samt säsongsbunden och stimuleras av endogena faktorer, såsom prolaktinfrisättning, och exogena faktorer, såsom dagsljusförändringar (Mead, 1993; Lopes *et al.*, 2004).

Längden på minkens diapaus varierar beroende på när befruktning sker, hos en hona som befruktas tidigt på säsongen kommer diapausen vara längre och vice versa (Mead, 1993). Minkens diapaus varar i upp till 47 dagar, men inom mårddjuren finns arter vars diapaus kan pågå i upp till ett år.

Möss har fakultativ diapaus som infaller innan blastocystens implantation i livmodern och blastocysten består då av cirka 130 celler (Lopes *et al.*, 2004). Hos möss är diapausen en nödvändig mekanism då deras dräktighetsperiod som tidigare nämnts är kort (Hyttel *et al.*, 2010). Honorna går in i östrus direkt efter partus och kommer att para sig direkt om möjligheten finns. Diapausen förlänger dräktighetstiden med fyra till fem dagar, vilket totalt gör dräktigheten ungefär lika lång som laktations- och avvänjningsperioden för avkommorna.

Blastocystens aktivitet under diapausen skiljer sig mellan olika arter (Lopes *et al.*, 2004). Hos rådjur och mink, som har obligat eller säsongsbunden diapaus, ses viss storlekstillväxt hos cellerna. Hos mus, som har fakultativ diapaus och kvarstående zona pellucida är blastocysten helt vilande och ingen celltillväxt sker. I försök att inducera diapaus har man sett att gener som

normalt uppreglerar cellernas proliferation och signalering nedreglerades och att gener som normalt nedreglerar proliferation uppreglerades (Ptak *et al.*, 2012).

### **Inträdet i diapausen**

Varför blastocysten går in i diapaus är ännu inte helt klarlagt. En av teorierna är att avsaknaden av maternella signaler gör att embryot går in i en vilofas, eftersom implantation inte sker (Ptak *et al.*, 2012). Aktiviteten hos en blastocyst är väldigt låg, klart lägre än i tidigare utvecklingssteg och det finns knappt något behov av maternell näringsförsörjning i detta stadium - därav är det en optimal tidpunkt för en vilofas, en diapaus.

Mycket talar för att livmoderns miljö är viktig för induktion av diapausen (Lopes *et al.*, 2004). Som tidigare nämnts har lyckade försök gjorts där en icke diapausande djurarts blastocyster överförts till djur med möjlighet att gå in i diapaus (Ptak *et al.*, 2012). Blastocysten behåller sin förmåga att genomgå normal embryonalutveckling, vilket i sig är en indikator på att livmodern är en viktig faktor för upprätthållandet av diapausen (Lopes *et al.*, 2004). Huruvida detta beror på avsaknad av signaler från livmodern alternativt inhibering av blastocystens utveckling är dock okänt. Nyare studier lutar dock mer åt att det är avsaknaden av maternella signaler som styr inträdet i diapausen (Ptak *et al.*, 2012).

Speciellt för mårddjurs obligata diapaus är att den bedöms vara ett resultat av otillräcklig sekretion av hormoner från hypofysen, vilket i sin tur leder till otillräcklig utveckling av corpus luteum och därmed även minskad luteal sekretion (Mead, 1993). Detta menar författaren skulle kunna leda till en vilofas för blastocysten då dess utveckling kräver tillräckligt höga plasmanivåer av progesteron, som påverkar livmodern så att denna ska kunna stimulera blastocystens utveckling. Denna ökning i utsöndring av progesteron sker till exempel när hypofysen aktiveras vid en ökning av antalet ljusa timmar per dygn.

Vid fakultativ diapaus är stress en viktig faktor för inträdet (Lopes *et al.*, 2004). Metabol sådan kan till exempel orsakas av laktation och förekomsten av diande avkommor som ännu inte är avvanda. Storleksmässigt större avkommor än normalt i en kull kan orsaka längre fördröjning av fosterutvecklingen. Hos gnagare kan diapaus triggas av social stress som exempelvis tillkomst av nya flockmedlemmar eller trängsel.

Andra miljöfaktorer kan också påverka inträdet i diapaus, till exempel tillgången på näring, vilket är avhängigt temperatur och väderlek (Lopes *et al.*, 2004).

### **Fysiologiska mekanismer under diapausen**

Ett av de viktigaste hormonerna under både obligat och fakultativ diapaus är prolaktin (Renfree & Shaw, 2000). Hos mink är sekretion av prolaktin nödvändigt för blastocystens utveckling och det påskyndar implantationen i endometriets slemhinna. Hormoner som östradiol och progesteron är viktiga för interaktioner mellan blastocysten och livmodern, men då reglering av diapaus skiljer sig mycket mellan olika djurarter menar författarna att ett flertal andra hormoner troligtvis är inblandade och minst lika viktiga. Vidare tror de även att en rad tillväxtfaktorer kan vara inblandade i den fysiologiska regleringen av diapausen. Minkens blastocyst är helt vilande fram till aktiveringssignalerna, då blastocystens diameter ökar och

cellproliferation startar (Desmarais *et al.*, 2004). Musens blastocyst inhiberas av livmoderns miljö (Renfree & Shaw, 2000), som därigenom upprätthåller diapausen (Lopes *et al.*, 2004).

Livmoderns miljö är väldigt viktig för upprätthållande av diapausen (Lopes *et al.*, 2004). Det finns olika teorier om huruvida diapausen inträffar på grund av signaler från livmodern eller avsaknaden av dessa och den senare, avsaknaden av signaler, är den mer vedertagna teorin (Lambert *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2004).

Lopes *et al.* (2004) förevisar dock en rad argument för att livmodern aktivt förhindrar embryots utveckling och därigenom upprätthåller diapausen, vilket går emot den vedertagna teorin. Vid sköljning av livmodern på ovariektomerade möss som behandlats med progesteron, vilket görs för att inducera diapaus, har rester av proteiner hittats som *in vitro* visat sig inhibera embryots DNA-syntes. Vidare har även låga men relevanta nivåer av anandamid setts, en cannabinoid vars uttryck varierar och kan ge olika effekter. Till exempel har anandamid visat sig kunna både inhibera den embryonala utvecklingen och aktivera den vilande blastocysten hos mus. Detta föreslår författarna kan ha del i regleringen av den fakultativa diapausen.

Hos rådjur är corpus luteum konstant aktiv augusti-december och livmoderns miljö upprätthålls oavsett om rågeten är dräktig eller inte och det finns ingen större variation i hormonsekretionen (Lambert *et al.*, 2001). Under de sista sex veckorna av diapausen hos rådjur sker mitos, vilket indikerar att blastocysten själv kontrollerar sin tillväxt.

Relativt nya studier har visat att Msx-generna, Muscle segment homeobox-generna, troligtvis spelar en viktig roll för induceringen av diapausen och implantationen (Cha *et al.*, 2013). Under diapaus är Msx-generna uppreglerade och persisterande och för att diapausen ska avslutas måste generna nedregleras, till exempel genom en ökning av östradiol eller LIF (leukemia inhibitory factor). Detta visades vid både obligat och fakultativ diapaus hos mink respektive mus. Msx-generna verkar även ha en roll i synkroniseringen av blastocystens och uterus vilostadier. I försök nedreglerades Msx-genernas uttryck helt, vilket ledde till betydligt fler skadade blastocyster och generellt sämre överlevnad hos blastocysterna. Msx-generna verkar således både ha betydelse i aktivt och inaktivt stadie.

### **Blastocystens energikällor under diapausen**

Hos rådjuret och minken försörjs blastocysten under diapausen histotroft av bland annat glukos och glykogen, samt olika proteiner, aminosyror och fetter (Aitken, 1974; Dean *et al.*, 2014). Aitken (1974) upptäckte inlagrade granula som gradvis reducerades medan diapausen fortgick, ett tydligt tecken på att blastocysten använde dessa som energireserv. Densiteten och elektrontätheten hos granulan tyder på ett innehåll bestående av lipider.

Glykogen lagras i höga koncentrationer i livmodern innan östrus, hos både mink och gnagare, och sjunker sedan genom diapausen (Dean *et al.*, 2014). Troligtvis är det glykogen som lagras i livmodern en viktig energikälla för blastocysten i detta stadium, då mängden glykogen som lagrats in i endometrieepitelet sjunker under diapausen. I endometriets epitel har även enzymatisk aktivitet påvisats under diapausen och östrus, men inte under blastocystens aktiva del av dräktigheten, även detta pekar på att glykogen metaboliserat till glukos är energikällan för den vilande blastocysten. Eftersom livmoderns miljö är syrefattig, är det viktigare för

embryon som genomgår diapaus än andra, att en energikälla för anaerob metabolism finns. Genom att glykogen transporteras från den maternella cirkulationen till livmodern görs glykogen tillgängligt för detta.

Avseende mink tror Dean *et al.* (2014) att glykogenreserverna kan vara en av de faktorer som avgör hur många embryon som överlever diapausen och storleken av dessa vid partus.

### **Blastocystens återaktivering**

Återaktivering av rådjurets blastocyst sker tidigt i januari och då består blastocysten av cirka 100 celler (Lambert *et al.*, 2001). Blastocysten förlängs, fäster in till livmodern och den embryonala tillväxten tar fart (Lambert, 2005). Hos rådjur induceras detta inte av maternella hormoner enligt Lambert *et al.* (2001), då studier påvisat att proteinsyntes startas hos blastocysten innan aktivitet i endometriet syns. Av detta drar författarna slutsatsen att rådjurets blastocyst återaktiveras av sig själv efter en viss tid. Troligtvis är längden på diapausen genetiskt styrd och återaktivering sker vid en bestämd årstid eller en för blastocysten given ålder.

”Pregnancy-associated glycoproteins” (PAG) har upptäckts, proteiner som är unika för rådjur och som antas ha stor del i återaktiveringen av blastocysten (Lambert, 2005). PAG bildas av trofoblast-cellerna i blastocysten, utsöndras från denna och inducerar sedan den maternella responsen. Rådjuret är det enda däggdjuret som visats avsluta diapausen på detta sätt.

Avslutning av diapaus hos mink induceras runt vårdagjämningen med den melatoninfrisättning som sker vid förlängningen av dygnets ljusa timmar, genom aktivering av hypofysen (Bonfond *et al.*, 1990). Samtidigt sker även en ökning av prolaktin-nivån i plasman hos minken, vilket leder till en aktivering av corpus luteum och påföljande ökning av progesteron (Murphy, 2012). Genom att tillsätta exogent prolaktin har Desmarais *et al.* (2004) i försök lyckats inducera implantation. I andra försök har minkar fått infusioner med melatonin och exponerats för extra ljus vilket påskyndat implantationen (Lopes *et al.*, 2004). Varken melatoninets eller prolaktinets verkan är ännu helt klarlagd, men den huvudsakliga teorin är att prolaktin är den viktigaste faktorn för återaktivering av blastocysten hos minken under diapaus (Lopes *et al.*, 2004; Murphy, 2012).

En av teorierna är att mårddjurens corpus luteum utsöndrar ett endogent ämne som är av betydelse (Mead, 1993). I en nyare studie där författarna tittade närmare på två gener, varav en kodar för ett glykoprotein, presenterades samma teori (Lefevre *et al.*, 2011). Glykoproteinet som misstänks komma från corpus luteum kan vara förknippat med återaktiveringen av blastocysten då det tidigare även har rapporterats svara positivt på progesteron. Dock är mycket än så länge okänt om detta och ytterligare forskning krävs.

När minkens blastocyst återigen aktiveras börjar den först ta upp vätska, inom 72 timmar ökar sedan protein- och DNA-syntesen och själva implantationsprocessen börjar cirka 10 dagar efter första signalen om återaktivering (Dean *et al.*, 2014). Implantation av fosterhinnan i endometriet och placentabildning sker under mars eller början av april.



Hos musen återaktiveras blastocysten genom en ökning i sekretionen av östrogen från livmodern (Renfree, 2015). Även progesteron krävs för att stimulera den proliferation i endometriet och cytokinbildning som krävs för såväl fortsatt utveckling av embryot och endometriet som för implantationen. Implantation sker inom två dygn efter denna första signalering (Desmarais *et al.*, 2004). Hos mus går återaktiveringen snabbt och mitos induceras inom de första 12 timmarna.

Mink och rådjur besitter vissa likheter gällande utvecklingen vid återaktiveringen, till exempel börjar båda arternas blastocyster expandera långsamt innan implantation sker (Desmarais *et al.*, 2004). Musens utveckling går däremot mycket snabbare, detta beror bland annat på att dess blastocyst implanteras redan efter 48 timmar och på att deras reproduktionscykel är kortare. Musen kräver inte heller lika stor utveckling av fosterhinnorna innan implantation och placentabildning kan ske, till exempel bildas amnion redan hos blastocysten medan amnions bildning hos de större däggdjuren kräver mer utveckling (Hyttel *et al.*, 2010). Även implantationen hos mus ser lite annorlunda ut, istället för att fästa vid slemhinnan så är bäddar blastocysten in sig i endometriets bindväv

Hos de flesta djur med diapaus återfinns ett antal kända tillväxtfaktorer och cytokiner vars funktion ännu inte är helt klarlagda, men att de har ett samband med implantationen och återaktiveringen står klart (Renfree, 2015). Exempel på dessa är till exempel LIF och Msx-generna som nämndes tidigare, men även insulin-like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF och HB-EGF) och fibroblast growth factor (FGF) med flera. Ptak *et al.* (2012) har i sina försök med mus och får noterat både nedreglering av gener vars uttryck inducerar cellproliferation och uppreglering av gener vars uttryck inhiberar cellproliferation under diapausen.

## **Diapausens evolution**

Obligat diapaus förekommer hos nästan 50 olika djurarter världen över och en fylogenetisk analys har visat att fördröjd implantation troligtvis har utvecklats hos olika arter inom flera oberoende familjer minst 17 gånger (Sandell, 1990). Inom familjen *Mustelidae*, mårddjur, förekommer diapaus hos flera olika arter, dock inte enhetligt. Ett flertal exempel finns på arter som är närbesläktade med minken men där diapaus inte förekommer.

Den fakultativa diapausen tyder enligt vissa forskare dock på att diapausen har utvecklats vid antingen ett enda eller ett fåtal tillfällen under djurens utveckling eftersom den inte alltid måste inträffa (Fenelon *et al.*, 2014). Till exempel har pungdjur fakultativ diapaus och om de av någon anledning förlorar avkomman i pungen innan blastocysten gått in i diapaus så kommer diapausen inte att inträffa utan dräktigheten fortsätter utan vilofas. Vidare skiljer sig diapausen hos olika djurslag inte alltför mycket, utan styrs i viss mån av liknande signaler och inträffar alltid i blastocyst-stadiet. Den fakultativa diapausen ska enligt denna teori ha selekterats fram eftersom den för honan innebär en överlägsen fördel.

Som tidigare nämnts går diapaus att inducera på djur som normalt inte uppträder med diapaus, vilket anses vara ett argument för att diapausen är ett evolutionärt bevarat fenomen (Ptak *et al.*, 2012). Både djur med obligat och fakultativ diapaus besitter Msx-gener och båda typerna av

diapaus störs när dessa nedregleras (Cha *et al.*, 2013). Vid genomsekvensering har generna hittats inom stora delar av djurriket, även i delar som är mycket avlägset besläktade och även hos människan.

Det finns teorier om att mänskliga embryon skulle kunna vara mottagliga för en fördröjning av implantationen (Lopes *et al.*, 2004), vilket har setts ett fåtal gånger, men i dessa fall bedömdes den snarare vara kopplad till en brist av eller fördröjning i frisättningen av ett gonadotropin som är nödvändigt för implantation (Tarin & Cano, 1999). Ett fall av diapaus misstänks ha uppkommit efter en *in vitro*-befruktning (Tarin & Cano, 1999), men ännu är ämnet okänd mark och eventuella studier på människa är komplicerat, då många etiska aspekter tillkommer (Ptak *et al.*, 2013).

Exakt varför diapausen förekommer hos vissa djur är inte helt klarlagt, men sedan flera år tillbaka är forskare relativt ense om att den obligata formen utvecklats för att både parning och partus ska kunna ske under optimal säsong (Sandell, 1990). Något som talar för detta är det faktum att mekanismen är vanligare vid högre latituder, längre ifrån ekvatorn, där säsongerna är mer distinkta (Thom *et al.*, 2004). Skulle denna teori stämma pekar det mot att mekanismen utvecklats hos en gemensam anfader och sedan ärvts ner till vissa av dagens mårddjur. I denna teori finns dock vissa motsägelser; det äldsta kända mårddjuret levde under Miocene för cirka 21 miljoner år sedan, en tid när Eurasia antas ha haft subtropiskt klimat. Detta kullkastar teorierna om ”den optimala säsongens” inverkan. Dock finns även exempel på distinkta skillnader inom samma familj som är direkt kopplade till geografi, t ex inom släktet hjorträttor (*Peromyscus spp*), där den nordamerikanska varianten har fakultativ diapaus medan den sydamerikanska inte visar upp någon diapaus alls (Lopes *et al.*, 2004).

Hos djur som inte är monogama föregås själva befruktningen ofta av att hanarna visar upp sig, slåss och tävlar om honorna, beteenden som kostar mycket energi (Sandell, 1990). Vissa djurarter strövar mer men tenderar att ansamlas under vissa säsonger. Vid båda dessa beteenden finns det en vinst för både hona och hane att kunna fördröja fosterutvecklingen. Sandell föreslår att mekanismen har haft större betydelse längre tillbaks i tiden, vid kallare klimat, och att det kvarstår eftersom det inte har någon negativ inverkan på djuret. Andra hävdar dock att så inte är fallet då diapausen enligt dem innebär en energimässig kostnad för djuret, eftersom det går dräktigt under en betydligt längre period (Thom *et al.*, 2004).

En annan teori om varför diapaus skulle ha selekterats bort hos djur är den tidsmässiga kostnaden den faktiskt innebär (Thom *et al.*, 2004). Något som talar för detta är det faktum att diapausen, framförallt den obligata, generellt är vanligare hos arter som lever längre liv. Genom att diapausen selekteras bort kan brunstcykeln förkortas och artens fortplantning påskyndas. Författarna själva förbehåller sig dock denna teori, då inte tillräckligt med bevis finns för att styrka det.

## DISKUSSION

Diapausen är en intressant företeelse med vid spridning inom djurriket. Mycket forskning har gjorts men ännu kvarstår en rad frågetecken om de exakta mekanismerna bakom fenomenet i sig och förekomsten av den. Ett av de största problemen med de djur jag valt att jämföra är dess miljöer idag. Rådjur och mink lever i liknande miljö; de förekommer naturligt vilt och deras vilda stammar är relativt naturliga, det vill säga utan större ingrepp från människan. Musen som beskrivs i de citerade studierna är oftast en laboratoriemus inavlade i 20-talet generationer, där varken miljö eller geografi har någon större inverkan på rasen som sådan idag. Även dess reproduktionsegenskaper och brunstcykellängd skiljer sig markant från mink och rådjur, vilket eventuellt gör den mindre lämplig som kandidat till en dylik jämförelse (Renfree & Shaw, 2000), men de faktiska skillnaderna är ju också intressanta att jämföra.

Skillnaden i att mink och rådjur besitter obligat diapaus och mus fakultativ diapaus är en viktig aspekt i jämförelsen. Påverkan av latitud och säsong verkar vara obetydlig vid fakultativ diapaus, som istället styrs av miljöanknutna och metabola förutsättningar, såsom stress och laktation.

Hos alla de tre djurslagen finns en vinning i diapausen. För mink och rådjur skjuts parning och partus isär och båda kan ske under perioder när energitillgången är hög, vilket höjer chanserna för överlevnad och god tillväxt för både moder och avkomma (Thom *et al.*, 2004). För musen som föder många kullar per år med många avkommor är diapausen kanske av ännu större betydelse eftersom hon utan blastocystens vilofas hade riskerat att föda nästa kull innan den förra är avvand. Detta skulle kunna innebära stor stress för både moder och avkommor och potentiella risker för de nyfödda som troligtvis inte skulle kunna hävda sig mot den äldre kullen vad gäller diande etcetera.

Att diapausen skulle innebära en kostnad för modern, som bland annat Thom *et al.* (2004) påstår verkar otroligt. Blastocysten befinner sig i ett vilostadium och energiåtgången för modern torde i detta fall vara väldigt låg. Den "kostnad" som möjligtvis kan uppskattas är den att artens förökning, och därmed spridning, sker långsammare. Om förökning istället sker oftare skulle avkommorna å andra sidan riskera att födas vid olämplig säsong både ur vädermässigt och fodermässigt perspektiv, vilket troligtvis skulle sänka deras chans till överlevnad.

Utöver diapausen finns liknande reproduktionsstrategier att finna i stora delar av djurriket (Orr & Zuk, 2014). Frågan är om till och med alla djur har möjlighet att på något sätt fördröja sin dräktighet under rätt förutsättningar. Diapausen är bara ett exempel, det finns djur som kan fördröja ovulationen, förvara och spara sperma, fördröja embryots utveckling efter implantationen med mera. Även djur som går i ide uppvisar ett diapaus-liknande tillstånd, där fördröjningen styrs av sänkt kroppstemperatur hos modern. Den utbredda förekomsten av Msx-gener hos däggdjur talar även för en utbredd möjlighet att inducera diapaus och liknande reproduktionsstrategier.

Försöket där får-embryon injicerats i möss, som tidigare nämnts, leder till ifrågasättande av teorin om den evolutionärt oberoende utvecklingen av diapaus (Ptak *et al.*, 2012). Författarna menar att deras försök "erbjuder en startpunkt för att kunna verifiera flexibel förekomst av

diapaus hos däggdjur” och öppnar upp för nya infallsvinklar och teorier inom reproduktionsbiologi och dess evolution. Något som står klart i försöket är även att livmoderns miljö är väldigt viktig i sammanhanget, genom att de bevisar att blastocyster från djurarter som normalt inte har diapaus kan gå in i detta vilostadium.

Sammantaget blir det evolutionära perspektivet lätt en gissningslek. Vissa menar att mekanismen troligtvis finns av flera anledningar, att både den geografiska aspekten och artens livshistoria spelar in. En av svårigheterna med just detta område och dessa djurslag är att relativt lite forskning gjorts, då fältet i dagsläget inte erbjuder någon större ekonomisk vinning. Utöver detta tillkommer det uppenbara problemet med att vi (troligtvis) aldrig kommer att kunna återskapa evolutionen. Den övergripande åsikten till dags dato är dock att diapausen är ett uråldrigt fenomen som ärvt ner under miljoner år.

Med de nyare studier som gjorts där kopplingar till human-sidan kunnat göras tillkommer helt nya möjligheter och drivkrafter. Möjligheter att forska på och lösa diverse reproduktionsproblem för människor utgör en enorm plattform, men medför också tunga etiska aspekter och gränsdragningar – vilken typ av forskning kan och vill vi bedriva? När blir ett embryo ett liv?

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Aitken, R.J. (1974). Delayed implantation in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 39:225–233.
- Aitken, R.J., Burton, J., Hawkins, J., Kerr-Wilson, R., Short, R.V. & Steven, D.H. (1973). Histological and ultrastructural changes in the blastocyst and reproductive tract of the roe deer, *Capreolus capreolus*, during delayed implantation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34:481–493.
- Bonnefond, C., Martinet, L. & Monnerie, R. (1990). Effects of timed melatonin infusions and lesions of the suprachiasmatic nuclei on prolactin and progesterone secretions in pregnant or pseudopregnant mink (*Mustela vison*). *Journal of Neuroendocrinology*, 2:583–591.
- Brinklow, B.R. & Loudon, A.S. (1993). Gestation periods in the Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*): evidence for embryonic diapause or delayed development. *Reproduction, Fertility and Development*, 5:567–575.
- Cha, J., Sun, X., Bartos, A., Fenelon, J., Lefèvre, P., Daikoku, T., Shaw, G., Maxson, R., Murphy, B.D., Renfree, M.B. & Dey, S.K. (2013). A new role for muscle segment homeobox genes in mammalian embryonic diapause. *Open Biology*, 3:13-35.
- Chang, M.C. (1968). Reciprocal insemination and egg transfer between ferrets and mink. *Journal of Experimental Zoology*, 1:49-59.
- Dean, M., Hunt, J., McDougall, L. & Rose, J. (2014). Uterine glycogen metabolism in mink during estrus, embryonic diapause and pregnancy. *The Journal of Reproduction and Development*, 60:438–446.
- Desmarais, J.A., Bordignon, V., Lopes, F.L., Smith, L.C. & Murphy, B.D. (2004). The escape of the mink embryo from obligate diapause. *Biology of Reproduction*, 70:662–670.
- Enders, A.C. & Mead, R.A. (1996). Progression of trophoblast into the endometrium during implantation in the western spotted skunk. *The Anatomical Record*, 244:297–315.
- Fenelon, J.C., Banerjee, A. & Murphy, B.D. (2014). Embryonic diapause: development on hold. *International Journal of Developmental Biology*, 58:163–174.
- Hunter, R.H.F. (1995). Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals. Cambridge: Cambridge University Press Tillgänglig elektroniskt via Stockholms Universitet. Kapitel 1. [2007-02-23]
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M. & Betteridge, K. (2010). Essentials of domestic animal embryology. Edinburgh: Elsevier. Kapitel: 1-6, 20
- Lambert, R.T. (2005). A pregnancy-associated glycoprotein (PAG) unique to the roe deer (*Capreolus capreolus*) and its role in the termination of embryonic diapause and maternal recognition of pregnancy. *Israel Journal of Zoology*, 51:1–11.
- Lambert, R.T., Ashworth, C.J., Beattie, L., Gebbie, F.E., Hutchinson, J.S., Kyle, D.J. & Racey, P.A. (2001). Temporal changes in reproductive hormones and conceptus-endometrial interactions during embryonic diapause and reactivation of the blastocyst in European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Reproduction*, 121:863–871.
- Lefèvre, P.L.C., Palin, M.-F., Beaudry, D., Dobias-Goff, M., Desmarais, J.A., V, E.M.L. & Murphy, B.D. (2011). Uterine signaling at the emergence of the embryo from obligate diapause. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 300:E800–E808.

- Lopes, F.L., Desmarais, J.A. & Murphy, B.D. (2004). Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction*, 128:669–678.
- Mead, R. (1993). Embryonic diapause in vertebrates. *Journal of Experimental Zoology*, 266:629–641.
- Murphy, B. (2012). Embryonic diapause: advances in understanding the enigma of seasonal delayed implantation. *Reproduction in Domestic Animals*, 47:121–124.
- Orr, T.J. & Zuk, M. (2014). Reproductive delays in mammals: an unexplored avenue for post-copulatory sexual selection. *Biological Reviews* 89:889–912.
- Ptak, G.E., Modlinski, J.A. & Loi, P. (2013). Embryonic diapause in humans: time to consider? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11:92.
- Ptak, G.E., Tacconi, E., Czernik, M., Toschi, P., Modlinski, J.A. & Loi, P. (2012). Embryonic diapause is conserved across mammals. *PLOS ONE* 7, e33027.
- Renfree, M.B. (2015). Embryonic diapause and maternal recognition of pregnancy in diapausing mammals. I: Geisert, R.D., Bazer, F.W. (red), *Regulation of implantation and establishment of pregnancy in mammals: tribute to 45 year anniversary of Roger V. Short's "Maternal recognition of pregnancy"*. Cham: Springer International Publishing, 239–252.
- Renfree, M.B. & Shaw, G. (2000). Diapause. *Annual Review of Physiology*, 62:353-75
- Sandell, M. (1990). The evolution of seasonal delayed implantation. *The Quarterly Review of Biology*, 65-1:23-42
- Tarín, J.J. & Cano, A. (1999). Do human concepti have the potential to enter into diapause? *Human Reproduction* 14:2434–2436.
- Thom, M.D., Johnson, D.D.P. & Macdonald, D.W. (2004). The evolution and maintenance of delayed implantation in the *Mustelidae* (mammalia: *Carnivora*). *Evolution*, 58:175–183.