



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

Vaskularisering, körtlar och leukocyt förekomst i endometrium hos tik under metöstrus och tidig dräktighet

Malin Parming

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:13

Vaskularisering, körtlar och leukocytförekomst
i endometrium hos tik under metöstrus
och tidig dräktighet

Blood vessels, glands and leucocytes
in the canine endometrium during
metoestrus and early pregnancy

Malin Parming

Huvudhandledare: Elisabeth Persson, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, SLU

Biträdande handledare: Bodil Ström Holst, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU

Examinator: Lena Holm, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, SLU

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi
Kurskod: EX0754, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: diöstrus, reproduktion, livmoder, hund
Key words: dioestrus, reproduction, uterus, bitch, dog*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:13*

INNEHÅLL

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
Reproduktionsfysiologi	4
Proöstrus.....	4
Östrus	4
Metöstrus.....	4
Anöstrus	5
Dräktighet.....	5
Implantation och placentabildning.....	5
Anatomi.....	6
Morfologiska förändringar i uterus under löpcykeln	7
Proöstrus.....	7
Östrus	7
Tidig/mitt metöstrus.....	7
Sen metöstrus.....	8
Anöstrus	8
Immunförsvarsceller	8
Äggstocksmorfologi under metöstrus.....	8
Morfologiska förändringar i uterus under tidig dräktighet.....	8
Maternal recognition of pregnancy.....	10
Angiogenes i metöstrus och tidig dräktighet	10
MATERIAL OCH METODER	12
Uterusvävnad.....	12
Histologisk undersökning.....	12
Statistik	14
RESULTAT	15
Kärl	15
Körtlar	16
Immunceller	17
DISKUSSION	19
REFERENSER.....	21

SAMMANFATTNING

I denna studie har kärl-, körtel- och leukocytförekomst jämförts på olika djup i endometriet hos 27 tikar, 12 under tidig dräktighet (från dag 8-18) samt 15 under metöstrus.

God kärlförsörjning är väsentlig under placentabildning hos tik för dels borttransport av degenererad maternell uterusvävnad, dels embryots näringsförsörjning. Det finns dock få studier om kärlförekomst i uterus under tidig dräktighet hos hund. Vid histologisk undersökning av endometriet sågs skillnad i totala antalet kärl i anslutning till ytepitel under tidig dräktighet dag 8-9 vid jämförelse med tidig och mitt-metöstrus, men för dräktighet dag 13-15 samt 18 kunde ingen skillnad påvisas. Generellt sågs lägre medelvärden för antal kärl i endometriet under tidig dräktighet jämfört med tidig metöstrus. Ingen skillnad avseende totala antalet kärl i ytlig respektive basal zon av endometriet kunde ses mellan de olika grupperna. Någon skillnad avseende kärlets närhet till körtlar mellan dräktiga och icke-dräktiga kunde inte heller påvisas i denna studie.

Näringsförsörjning till embryot före implantation anses ske via uterussekret. Densiteten av körtelvävsnitt i de histologiska preparaten beräknades därför, som ett mått på förändringar under olika reproduktionsstadier. Ingen signifikant skillnad kunde ses i denna studie, men en tydlig tendens till ett lägre antal körtelvävsnitt i den ytliga och basala zonen av endometriet sågs under tidig dräktighet (dag 8-9) jämfört med tidig metöstrus. Detta skulle kunna bero på ödem bildning vid inflammation efter parning.

Immunförsvaret behöver troligen modereras under tidig dräktighet för att implantation ska kunna ske. I denna studie sågs signifikant högre antal lymfocyter i anslutning till ytepitel under dräktighet dag 18 jämfört med mitt- och sen metöstrus. Antalet neutrofiler i den ytliga zonen var högre under sen metöstrus jämfört med övriga stadier vilket var ett oväntat fynd och kan bero på individuella skillnader. Ingen skillnad kunde ses avseende förekomsten av plasmaceller och monocyter/makrofager.

Sammanfattningsvis har en minskad kärlförekomst påvisats i anslutning till ytepitel under tidig dräktighet dag 8-9 jämfört med tidig och mitt-metöstrus men mellan övriga stadier ses ingen skillnad. För densiteten av körtelvävsnitt kunde ingen skillnad visas även om tendens till ett lägre antal under tidig dräktighet förelåg. Viss skillnad kunde påvisas avseende immunceller, med fler lymfocyter under dräktighet dag 18 jämfört med mitt- och sen metöstrus. Ytterligare studier med fler individer och ett mera enhetligt djurmaterial behövs för att kunna avgöra om, hur och när parning och tidig dräktighet påverkar endometriet jämfört med situationen hos den icke-dräktiga tiken.

SUMMARY

This study is concentrating on the presence of blood vessels, glands and leucocytes in different layers of the endometrium from 27 bitches, 12 during early pregnancy (day 8-18) and 15 during metoestrus.

Sufficient vascularity is important during placentation in the bitch for removal of degenerated endometrium and to enable nutritious supply of the embryo. However, few studies have focused on the vascularity of the canine uterus during early pregnancy. By histological inspection of the endometrium, a difference between pregnancy day 8-9 compared with early and mid metoestrus was seen for the total number of blood vessels close to the surface epithelium. The difference did not exist for day 13-15 and 18 of pregnancy. However the means in general showed a lower number of blood vessels in the endometrium during early pregnancy compared to early metoestrus. No difference could be seen in total number of blood vessels in the superficial and basal zones of the endometrium between the different groups of bitches, nor could any difference be seen regarding the proximity of blood vessels to glands.

Before implantation, nutrition of the embryo is likely to occur through secretions from the uterine glands. The density of cross sectioned glands during the different reproductive stages were therefore counted on the histology slides. There was no significant difference, but a tendency of a lower number of glands in the superficial and basal zones of the endometrium during early pregnancy (day 8-9) compared to early metoestrus. This could be due to oedema, as an inflammatory reaction after the mating.

The immune system is probably altered during early pregnancy to allow implantation. This study showed a significantly higher numbers of lymphocytes during early pregnancy day 18 compared to mid and late metoestrus. The numbers of neutrophils appeared to be higher in late metoestrus compared to the other stages studied, a finding that was unexpected and maybe due to individual differences. The number of plasma cells and monocytes/macrophages did not differ between the groups.

In conclusion, a lower number of blood vessels have been identified in the surface epithelium during early pregnancy day 8-9 compared to early and mid metoestrus, but for other stages no differences could be seen. The density of cross section glands did not differ, but a tendency of lower numbers during early pregnancy could be seen. Some difference was shown regarding the immune system with more lymphocytes during pregnancy day 18 compared to mid and late metoestrus. More studies on this subject with a more homogenous and a larger group of animals is necessary to be able to distinguish if, how and when mating and early pregnancy affect the canine endometrium compared to the non-pregnant situation.

INLEDNING

Hos däggdjur är placentabildning väsentlig eftersom embryon och foster får huvuddelen av sin näring via placentan. Tikar har endoteliochorial zonär placenta där den fetala delen av placentan invaderar och bryter ned delar av det maternella endometriet. Det är därför viktigt med god kärlförsörjning, både för borttransport av material som brutits ned men också för att ge näring åt celler i placentan samt till avkomman. Innan placentabildning sker är uterussekret en potentiell näringskälla för embryona. Sekretet bildas i endometriella körtlar vars aktivitet kan variera med reproduktionsstadium. Embryot måste därefter signalera sin ankomst till uterus så att placentabildningen sätter igång. I nuläget är det inte helt klarlagt hur detta sker hos hund, men tillväxtfaktorer anses vara involverade då en del har identifierats vid tidig dräktighet men saknas hos icke-dräktiga.

Immunförsvaret behöver troligen modereras under tidig dräktighet för att implantation ska kunna ske. Om situationen vid dräktighet skiljer sig från den icke-dräktiga tikens metöstrus är oklart då få studier har gjorts angående leukocytinfiltration och -aktivitet under metöstrus jämfört med tidig dräktighet. Om det finns en skillnad kan det tyda på inblandning från embryots sida eller en effekt av parningen, alternativt endast hämning av immunförsvaret till följd av stigande progesteron- och sjunkande östrogennivåer som även ses hos icke-dräktiga tikar.

Syftet med denna studie var att påvisa eventuella skillnader i kärl-, körtel- och leukocytförekomst under metöstrus och tidig dräktighet på olika djup i endometriet hos tik och vid vilken tidpunkt förändringar kan ses.

LITTERATURÖVERSIKT

Reproduktionsfysiologi

Tikar är monoöstrala, icke säsongberoende med spontan ovulation och blir pubertala vid en ålder av 6-14 månader, korrelerat till ras enligt en sammanställning av Concannon (2011). Östralcykeln hos hund delas in i fyra faser: proöstrus 5-20 d, östrus 5-15 d, metöstrus 50-80 d och anöstrus 80-240 d.

Proöstrus

Proöstrus är den period då tiken visar tecken som har sin grund i ökade östrogennivåer och attraherar hanhundar men är ännu inte villig att para sig (Concannon, 2011). Perioden varar i genomsnitt nio dagar. Kliniska tecken är svullen vulva och blodblandad vaginal flytning. I början av proöstrus är tiken avvisande men blir successivt mera vänligt inställd mot hanhundar. De blodblandade vaginala flytningarna inkluderar intakta och lyserade erythrocyter. Detta är omdiskuterat och man vet inte säkert hur blodinnehållet i flytningen uppkommer, men enligt Walter *et al.* (2010) är det troligen läckage från endometriella venuler.

En ökad frisättning av FSH och LH sker och därmed även en ökad sekretion av östrogen från folliklar i äggstocken (Concannon, 2011). Ökade östrogennivåer leder till kärlltillväxt och ödem i reproduktionsorganen som ger en förtjockning av vaginalslemhinnan.

Östrus

I östrus är tiken mottaglig för parning och ödem och vaginala flytningar minskar (Concannon, 2011). Östrus varar i genomsnitt fem till tio dagar.

Hos tik har det visats att östrus karaktäriseras av att östrogennivåerna faller efter att ha haft sitt maximum sent i proöstrus och därefter ses en påföljande LH-topp 1-3 dagar senare (Concannon *et al.*, 1975). När LH-nivåerna ökar börjar progesteron sakta stiga (Concannon, 2011) till följd av ändring i steroidogenesen, d.v.s. en luteinisering redan före ovulation. Tik har spontan ovulation som för primära oocyter sker 48-60 h efter att LH stiger. Högre progesteronnivåer tillsammans med ett snabbt sjunkande östrogen anses resultera i en högre LH-topp med tydligare tecken på löpning som följd.

Metöstrus

Den preovulatoriska luteineringen hos hund har lett till begreppsförvirring i litteraturen då lutealfasen börjar redan i östrus och följs därefter av ca två månaders progesterondominans (Concannon, 2011). För hund förekommer begreppen metöstrus och diöstrus som synonymer för den perioden. I detta arbete väljs benämningen metöstrus.

Periodens slut är enklare att definiera då progesteronnivåerna sjunkit till sin basnivå samt att endometriet genomgått degeneration. Progesteron har sin topp drygt 2-3 veckor in i metöstrus för att därefter sjunka.

Lutealfasen hos icke-dräktiga tikar är ungefär lika lång som hos dräktiga, ca två månader, eller några dagar längre (ca 5 dagar) eftersom ingen luteolys initieras då (Concannon, 2011). Upprätthållandet av gulkroppen är efter två veckor beroende av LH och prolaktin vilka är luteotropa tillsammans med progesteron. Även hos icke-dräktiga ses förhöjt prolaktin som i vissa fall ger skendräktighet hos tik.

Anöstrus

Anöstrus definieras som en period med avsaknad av äggstocksaktivitet (Concannon, 2011). Basal utsöndring av LH och FSH har visats vara pulsatil (Concannon *et al.*, 1993) och i slutet av anöstrus ökar frekvensen av LH- och FSH-topparna (Concannon, 2011). Serumnivåer av östrogen och progesteron är låga.

Dräktighet

Lutealfasen är 64 ± 1 dagar (65 ± 1 d från LH-topp till förlossning) och progesteron produceras från corpus luteum under hela dräktigheten (Concannon, 2011). I början ses ingen signifikant skillnad mellan dräktiga jämfört med icke-dräktiga tikar, men efter knappt halva dräktigheten ses ofta högre plasmakoncentrationer av progesteron hos dräktiga tikar trots ökad distributionsvolym. Koncentrationen av progesteron fortsätter därefter att vara hög under hela dräktigheten även om en ökad metabolism och fekal utsöndring sker. Detta beror sannolikt på ökade prolaktinnivåerna som anses upprätthålla progesteronutsöndringen.

Progesteronnivåerna i plasma börjar sjunka strax före partus och luteolys har visats ske till följd av förhöjda nivåer av PGFM (prostaglandinmetabolit) i plasma 24-36 tim före partus, som antas ha sitt ursprung från den fetala delen av placentan (Concannon, 2009). Detta sågs inte hos icke-dräktiga tikar där regression av gulkroppen troligen är en passiv degenerationsprocess, även om receptorer för PGFM har påvisats i gulkroppen (Kowalewski, 2012). Före partus (24-36 timmar) har även förhöjda nivåer av kortisol visats, sannolikt med fetalt ursprung (Concannon *et al.*, 2001b).

Implantation och placentabildning

Embryon har setts lämna äggledaren vid dag 11 efter påbörjad LH-topp hos labrador, och transporten fullbordades inom 24 tim så vid dag 13 befann sig alla embryon i uterus (Yasuyuki *et al.*, 2008). Utvecklingen till morula och därefter blastocyst skedde inom 14 dagar efter LH-toppen. Den studien påvisade också embryon i olika utvecklingsstadier från samma tik vilket indikerar att ovulation kan ske under en längre period hos vissa individer. Shimizu *et al.*, (1990) visade att embryon kan ha en jämn distribution i uterus till följd av transuterin migration som sker dag 12-17 från LH-toppen. I en annan studie sågs blastocysten expandera

något dag 14-18 efter LH-toppen, innesluten i zona pellucida vilket den visats kunna vara till dag 18-19 (Concannon *et al.*, 2001b).

Histotrof-upptag, d.v.s. av uterussekret, till embryot har visats ske via cylindriskt trofoblastepitel (Enders & Carter, 2005). För att den kärlbaserade näringsförsörjningen därefter ska kunna ske krävs placentabildning. Implantationen hos hund kan delas in i apposition, nedbrytning av endometriet och till slut i etablerad placenta (Dantzer, 1999) samt har visats ske vid dag 21-22 efter LH-toppen enligt Concannon *et al.* (2001b). Endoteliochorial placenta, vilket innebär att chorion invaderar det maternella epitelet i uterus, är karakteristiskt för karnivorer (Dantzer, 1999). Placentan kan delas in i olika lager där endotel, mesenkym och trofoblaster som cytotrofoblaster och syncytiotrofoblaster kan ses på den fetala sidan. Den maternella sidan består av interstitium, maternellt endotel samt enstaka decidualceller, d.v.s. maternella stromala celler som omvandlats till att ha aktivitet av okänd betydelse. Hos tik ses en zonär lamellärl placenta som har visats omge hela fostret till skillnad från katt där den ofta är inkomplett (Miglino *et al.*, 2006). Gulesäcken är t-formad hos karnivorer och framträdande till en början men minskar sedan i volym i förhållande till fostret. Den kvarstår dock hela dräktigheten. Amnion är först avaskulär men vaskulariseras senare i dräktigheten via kärl från allantois. Chorion får all sin kärlförsörjning från allantois (Dantzer, 1999).

Anatomi

Hundens uterus består av två långa livmoderhorn och en kort corpus. Livmoderväggen består av tre lager med perimetrium (serosan), myometrium innanför och endometrium (mukosan) lumbinalt. Myometriet delas in i ett tjockt inre cirkulärt lager mot lumen och ett tunt yttre longitudinellt lager. Endometriet består av ett bindvävsstroma genomsatt av tubulära körtlar, som vindlande i olika grad sträcker sig från myometriet till lumen (Figur 1).



Figur 1. Tvärsnitt av uterus hos tik

Morfologiska förändringar i uterus under löpcykeln

Proöstrus

Under proöstrus visades interstitiellt ödem och hyperemi i endometriets stroma (Mulligan, 1942) samt en ökande körtellängd (Barrau *et al.*, 1975a). Orsaken föreslogs vara det östrogenpåslag som anses leda till att körtelcellerna genomgår både hypertrofi och hyperplasi, d.v.s. att en ökad mitosaktivitet ses. Epitelet förändras och börjar producera mycket uterussekret vilket illustrerades av att den apikala delen av epitelcellerna innehöll rikligt med neutrala mukopolysackarider. Efter den snabba tillväxten sågs en period på sju till tio dagar i follikelfasen utan tillväxt av körtelepitelet, trots en fortsatt höjd östrogennivå. Mukopolysackaridmängden i epitelcellerna minskade samtidigt som sekret kunde identifieras i lumen. I proöstrus kunde röda blodkroppar ses extravasalt i den luminala delen av tikendometriet tillsammans med makrofager som fagocyterade hemolyserade erythrocyter, vid samma tid som blodiga flytningar kunde ses från vulva.

Östrus

Under de första dagarna av östrus skiljer sig inte histologin nämnvärt från sent i proöstrus, men ungefär fyra dagar in i östrus sågs ytterligare kraftig tillväxt i endometriet som kunde korreleras till folliklarnas luteinisering, vilket innebär stigande nivåer av progesteron och sjunkande östrogen (Barrau *et al.*, 1975a). Körtellängden ökade, epitelcellerna i körtlarna blev hypertrofiska, mitosaktiviteten ökade drastiskt och mot slutet av östrus blev de basala körtlarna, d.v.s. närmast myometriet, något mer spolformade. Makrofager som fagocyterade extravasala erythrocyter kunde fortfarande ses. Jämfört med proöstrus sågs mindre ödem (Mulligan, 1942).

Tidig/mitt metöstrus

Vid metöstrus början visades myometriet och endometriet vara hyperplastiskt och ansvällt med ett ödematöst stroma (Galabova *et al.*, 2003). Hyperemiska blodkärl och spolformade körtlar med utspända lumen kunde ses. Kryptor hade bildats från ytepitelet och mycket uterussekret kunde ses lumnalt. Proliferation kunde ses i det cylinderformade ytepitelet och i epitelcellerna vid basen av kryptorna samt i körtelepitel i den basala zonen.

I mitten av metöstrus var mitosaktiviteten som störst och körtlarna i uterus växte till snabbt (Barrau *et al.*, 1975a). Det mesta av tillväxten visades ske i de basala körtlarna. Vid dag sex i metöstrus var endometriet tillväxt nästan avslutad och mitosaktiviteten gick närmast ner till noll hos icke-dräktiga tikar, endast vid dräktighet fortsatte tillväxten av endometriet. Hos icke-dräktiga tikar förblev körtellängden och bredden i uterus relativt konstant fram till dag 16 i metöstrus, då progesteronnivåerna sjönk och regression av uterus sågs.

Sen metöstrus

I sen metöstrus var epitelcellerna i kryptorna större och hade flera vakuoler i cytoplasman, många hade även pyknotiska kärnor (Galabova *et al.*, 2003). Stromat kunde ses tunna ut och proliferation sågs nu endast i körtlar i den basala zonen. Sekretorisk aktivitet av olika karaktär kunde ses enligt Barrau *et al.*, (1975a). Mot slutet av metöstrus nådde epitelcellerna snabbt den mindre storlek som de kom att ha även under anöstrus medan körtellängden minskade mera gradvis. Mycket debris samlades i körtellumen, rikligt med makrofager kunde ses i stromat och snabb involution följde.

Anöstrus

I kryptozonen var stromat nästan borta, och ytepitelet var cylinderformat, hypertrofiskt och kraftigt vakuoliserat med pyknotiska cellkärnor (Galabova *et al.*, 2003). Proliferation kunde ses i körtelepitel till en början, men sågs därefter till största del i ytepitel. Körtellängden och diametern var som lägst till följd av de låga nivåerna av progesteron och östrogen. Mycket debris kunde också ses i körtellumen (Barrau *et al.*, 1975a). Sent i anöstrus saknas nästan kryptorna och erythrocyter kunde ses extravasalt i stromat (Galabova *et al.*, 2003). Ökad sekretorisk aktivitet visades från basala och ytliga körtlar och proliferation sågs framför allt i basala körtlar.

Immunförsvarsceller

Under metöstrus hos hund sågs generellt ett lågt antal leukocyter i endometriet enligt Groppetti *et al.* (2010), vilket därefter ökade vid dag 42 i metöstrus för att ha sitt maximum vid dag 89 jämfört med resterande stadier i östralcykeln (Chu *et al.*, 2006). Den mest frekvent förekommande av leukocyterna var lymfocyten. Inga studier av immunförsvarsceller i endometriet hos tidigt dräktiga tikar har emellertid kunnat påvisas.

Äggstocksmorfologi under metöstrus

Enligt Andersen & Simpson (1973) ses tidigt i metöstrus en transformation i gulkroppen där theca- och granulosa celler omvandlas till luteinceller vilka växer in i det blodkoagel som bildats i follikelns antrum efter ovulation. Deras studier visade att blodkoaglet ersattes med bindväv drygt två veckor efter ovulation och vesikler kunde ses i luteincellerna: mitt-metöstrus anses träda in då. Sex veckor efter ovulation sågs början till regression av corpus luteum som kluster av luteinceller omgivna av endotelceller och fibroblaster vilket angavs som karakteristiskt för sen metöstrus.

Morfologiska förändringar i uterus under tidig dräktighet

Det är svårt att bedöma tidsaspekter hos hund under tidig dräktighet då olika studier använder olika händelser som utgångspunkt. Antal dagar från ovulation till förlossning har visats vara konstant hos tik oavsett när parning skett (Tsutsui *et al.*, 2006). Detta trots att parning visades

ske med ett intervall på 57-72 dagar innan förlossning. Enligt Concannon *et al.* (2001b) ses en ökad hastighet i embryoutveckling mellan två-cellsstadiet och 16-cellsstadiet hos oocyter som genomgått en längre oocytomognad, vilket skulle göra att tidsaspekten vid implantation hos hund blir relativt konstant i förhållande till LH-toppen och ovulation.

Perioden mellan blodflytning från vulva till ovulation har också visats ha stor variation (3-31 d) med ett medeltal på ca 11 dagar (Hori *et al.*, 2012).

Med en genomsnittlig längd av östrus på 5-10 dagar och det faktum att LH-toppen sker ca ett dygn innan ovulation (Concannon, 2011) motsvarar exempelvis dag 10 efter östrus slut 16-21 dagar efter LH-toppen.

Barrau *et al.* (1975b) har beskrivit hur livmodern hos tik förändras under första halvan av dräktighet enligt följande:

Dag 10 (efter östrus slut, dvs motsvarande 16-21 dagar efter LH-toppen): Ökad svullnad kunde ses vid respektive implantationsplats i uterushornen till följd av ödem.

Dag 12: Tillväxt av kryptor och bildning av lacunae (håligheter) kunde ses i endometriet. I kryptornas epitel kunde mitotisk aktivitet ses.

Dag 13: Invasion av endometriet påbörjades. Syncytiotrofoblaster kunde ses utanför cytotrofoblaster i förhållande till fosterhinnans bindväv och kilades gradvis in i det maternella epitelet som delvis lossnade från basalmembranet. Trofoblastceller sågs därefter växa in i den maternella kapillärbädden och spred ut sig successivt. Samtidigt gick syncytialcellerna djupare in mot de maternella körtlarna och penetrerade körtelepitelet som separerades från sin blodförsörjning. Syncytiotrofoblaster sågs utöva fagocytos av omgivande maternell vävnad.

Dag 16: Implantationsplatsen expanderades ytterligare. I kryptregionen sågs fokal nekros och kryptorna vid implantationsplatsen blev längre och tätt packade. Vid kryptbasen förstörades lacunae och närliggande lacunae separerades av ett tunt lager med bindväv. Körtlarna i den basala zonen var förstörade och decidualceller kunde ses. Ytterligare nekros kunde ses med extravasalt blod, troligen maternellt, som resultat och som fagocyterades av de omgivande syncytiotrofoblasterna.

Dag 18: Trofoblaster kunde ses djupt in i endometriet och utlinjerade den nekrotiska zonen som hade ökat kraftigt i storlek.

Dag 26: Trofoblasterna nådde sitt maximala djup i endometriet och syncytiet expanderade till att omge de maternella kärlen.

Dag 35: Syncytiet tunnades ut och endast få cytotrofoblaster kvarstod. Decidualceller kunde ses nära maternella kärl omgivna av syncytialceller. Barriären mellan fetala och maternella kärl var mycket tunn.

Maternal recognition of pregnancy

Det är inte helt klarlagt i litteraturen om MRP (maternal recognition of pregnancy) finns hos tik men mycket tyder på det. Schäfer *et al.* (2008) har påvisat mRNA för interferon- γ (IFN- γ), CD-8 och interleukin-4 (IL-4) i uterus hos dräktiga tikar före implantation (d 10-12 efter parning), vilka saknas hos icke-dräktiga tikar vid motsvarande tidpunkt.

Matrix metalloproteinaser (MMP-2 och MMP-9) har setts hos dräktiga och icke-dräktiga tikar men med olika distribution (Beceriklisoy *et al.*, 2007). Uttryck av MMP-2 har hittats i endotel, glatt muskulatur, myometrium och vid bildning av placenta även i fetala blodkärl samt trofoblaster. Förhöjt MMP-2 har setts i endometriet hos dräktiga tikar jämfört med icke-dräktiga tikar, men ingen signifikant skillnad kunde ses mellan olika dagars dräktighet. MMP-9 har påvisats i blodkärl, glatt muskulatur och i maternellt ytepitel samt körtelepitelceller. De högsta nivåerna av MMP-9 kunde ses vid preimplantation. Staun-Ram *et al.* (2004) visade att MMP-2 var involverad i trofoblast-invasion vid 6-8 veckor hos människa och även MMP-9 några veckor senare.

HSP 70 (heat shock protein) i serum har visats ha betydelse som markör för tidig dräktighet hos hund och tros understödja bibehållen dräktighet enligt en sammanställning av (Schäfer-Somi, 2012). Lägre nivåer påvisades hos tikar under tidig dräktighet (ca 7-15 d efter ovulation) jämfört med icke-dräktiga tikar. Avsaknad av mRNA för MHC klass I och II beskrivs som en ytterligare skyddande åtgärd för att embryot inte ska uppfattas som kroppsfrämmande. Även apoptossystemet FasL föreslås vara involverad i embryots försvar mot tikens immunförsvar, och uttryck av Fas och FasL har visats ha sitt maximum under preimplantation för att vid implantation sjunka drastiskt. Dessutom har cytokinuttrycket i uterus under preimplantation och implantation visats ge ett Th2-svar, vilket är viktigt för embryoöverlevnad.

Angiogenes i metöstrus och tidig dräktighet

Under pre-implantation (d 10-12 efter parning) sågs ett ökat genuttryck för Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) och en av dess receptorer, VEGFR-2, vid jämförelse med metöstrus, och som sedan sjönk då placentan hade etablerats (Schäfer-Somi *et al.*, 2012) vilket även visats av Bukowska *et al.* (2011). VEGFs betydande roll vid tidig dräktighet har visats av Douglas *et al.* (2009) på möss där antikroppar mot receptorn VEGFR-2 orsakade abort p.g.a. reducerad angiogenes. Hos människa har interferon- α (IFN- α) setts hämma genuttrycket av tillväxtfaktorn VEGF i tumörer och därmed även hämma angiogenes via minskad densitet av mikrovaskularisering (Marschall *et al.*, 2003). Sugiura *et al.* (2004) visade att uttryck av IFN- γ hos hund hämmas av progesteron med en ökad infektionsbenägenhet som följd medan östrogen stimulerade IFN- γ uttrycket. Hos mink, som också har endoteliochorial placenta, har prostaglandin E₂ (PGE₂) visats ha en betydande roll för vaskularisering i uterus och vid placentabildning genom att påverka VEGF (Lopes *et al.*, 2006).

Desmarais *et al.* (2008) har visat att ökade nivåer av tillväxtfaktorn progranulin leder till en aktiv cellproliferation, remodulering samt ökad angiogenes i livmodern hos mink. Progranulin sågs i cytotrofoblaster och fetala kapillärer samt i maternellt endotel med hjälp av immunohistokemi. De visade även att sekvensen för exon 1 och 2 för progranulin hos mink har en överensstämmelse med hund på 94.9%.

Vid ovulation och implantation har Platelet-Activating Factor (PAF) visats stimulera till proliferation och angiogenes enligt sammanfattning av Schäfer-Somi *et al.* (2012). Schäfer-Somi *et al.* (2012) presenterade även en egen studie som visade uttryck av PAF och dess receptor (PAF-R) vid pre-implantation jämförbara med metöstrus hos icke-dräktiga tikar. Därefter sågs de sjunka mera hos dräktiga jämfört med icke-dräktiga individer. Samma studie visade att epithelial growth factor (EGF) hade sin maximala nivå under implantation med högre värden jämfört med metöstrus (dock ej signifikant) för att sedan falla till och med dag 45.

MATERIAL OCH METODER

Uterusvävnad

I samband med kastration samlades vävnadsmaterial från tiklivmödrar i olika stadier av metöstrus samt under tidig dräktighet vid Veterinärhögskolan i Vila Real i Portugal (Rita Payan Carreira, PhD, DVM, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias) under åren 2005-2012.

Tikarnas cyklusstadium fastställdes baserat på progesteronprov (Concannon *et al.*, 1975), vaginalcytologisk undersökning enligt Schutte (1967), morfologisk (makro och mikro) inspektion av äggstockar (Andersen & Simpson, 1973) och en histologisk bedömning av uterus. LH-toppen (baserat på progesteronprov) användes som utgångspunkt för antalet dräktighetsdagar. Vid osäkerhet om reproduktionsstadium exkluderades materialet från föreliggande studie.

Totalt inkluderades 29 kliniskt friska tikar (Tabell 1). I metöstrus valdes 17 individer ut baserat på kriterierna ovan, d.v.s tidig metöstrus motsvarar ungefär de två första veckorna under metöstrus, mitt-metöstrus de kommande fyra veckorna och därefter sen metöstrus de sista två veckorna av lutealfasen. De 12 dräktiga tikarna delades in i tre grupper baserat på antal dräktighetsdagar.

Histologisk undersökning

Vävnadsmaterial, i form av tvärsnitt från mittregionen av ett av livmoderhornen, togs omgående efter kastration och fixerades samt förvarades i 4 % buffrad formalin. Inför inbäddning trimmades vävnadsproverna till ca 2 mm tjocka skivor som sköljdes i fosfatbuffert. Efter dehydrering i ökande koncentrationer av etanol, bäddades vävnadsproverna i vattenlöslig resin (Leica Historesin, Heidelberg, Germany), snittades i 2 µm tunna snitt och färgades med haematoxylin-eosin.

I ett Nikon Microphot-FXA mikroskop med objektiv x40 (Bergström Instrument AB, Stockholm, Sweden) utvärderades uterus histologiskt, speciellt avseende kärl-, körtel- och leukocytförekomst i endometriet varefter bilder togs av utvalda preparat (se nedan). Utvärderingen blindades genom kodade glas och alla histologiska bedömningar respektive morfometriska beräkningar utfördes av samma person (Malin Parming).

I varje snitt valdes tre artefaktfria och representativa områden i endometriet ut (i anslutning till ytepitel och ytlig respektive basal zon, d.v.s. nära myometriet) med en area på 0.04 mm² (230 x 173 µm), d.v.s. totalt 0.12 mm² studerades per individ. Avsikten var att jämföra kapillärbädd, körtel- och leukocytantal. Inom den bestämda fotomikroskopsarean (se ovan) räknades antalet kapillärer och venulae med fyra eller färre endotelcellskärnor i tvärsnitt samt antalet leukocyter (plasmaceller, lymfocyter, neutrofiler och monocytter/makrofager) i bindvävsstromat. Räkning gjordes av totala antalet kärl, kärl angränsande till körtlar samt kärl som ses bukta in i körtelepitelets basallamina, för att se eventuell skillnad i närhet till körtlar. Antalet körteltvärsnitt i denna area räknades också.

Tabell 1. Beskrivning av hundarna i denna studie

Individ	Ras	Ålder	Övrig info	Reproduktionsstatus
Gr 1 (9 st)				
	Blandras*	18 mån		Tidig metöstrus
	Blandras*	2 år		Tidig metöstrus
	Blandras*	18 mån		Tidig metöstrus
	Blandras*	16 mån		Tidig metöstrus
	Blandras pointer	6 år		Tidig metöstrus
	Blandras*	12 mån		Tidig metöstrus
	Blandras*	19 mån		Tidig metöstrus
Gr 2 (5 st)				
	Blandras pudel	12 m		Mitt-metöstrus
	Blandras*	18 m		Mitt-metöstrus
	Blandras*	2 år		Mitt-metöstrus
			30d i metöstrus	Mitt-metöstrus
	Podenco	18 mån		Mitt-metöstrus
Gr 3 (3 st)				
	Boxer	3 år		Sen metöstrus
	Blandras*	18 mån		Sen metöstrus
	Schäfer	10 mån		Sen metöstrus
Gr 4 (6 st)				
	Labrador	11 mån		Dräktig d 8-9
	Labrador	14 mån		Dräktig d 8-9
	Labrador	9 mån		Dräktig d 8-9
	Labrador	9 mån		Dräktig d 8-9
	Labrador	12 mån		Dräktig d 8-9
	Blandras labrador	8 mån		Dräktig d 8-9
Gr 5 (3 st)				
	Labrador	7 år**	Tid dräktighet	Dräktig d 13-15
	Pincher	12 mån		Dräktig d 13-15
	Blandras	12 mån		Dräktig d 13-15
Gr 6 (3 st)				
	Labrador	12 mån		Dräktig d 18
	Labrador	12 mån		Dräktig d 18
	Labrador	10 mån		Dräktig d 18

*Blandras <12-13 kg

**Utskiljer sig i ålder och det faktum att individen tidigare varit dräktig

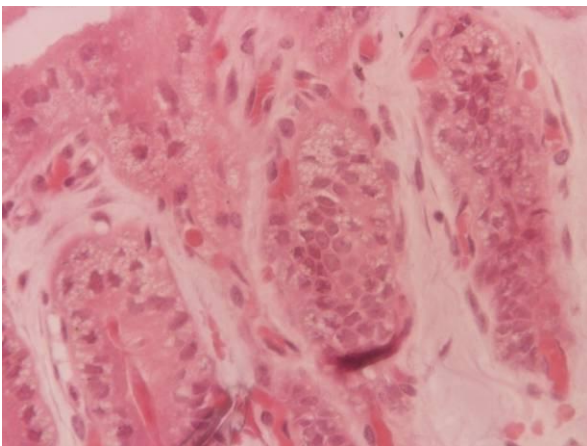
Statistik

Statiska beräkningar gjordes i SAS english version 9.2 med Anova och för att jämföra om skillnad förelåg mellan de olika grupperna (1-6) användes Sheffé's test (icke-parametriskt). Därefter beräknades medelvärde och standardfel (SE). Även Mann Whitney test (icke-parametriskt) användes för att jämföra skillnad mellan två av grupperna parvis där tendens till skillnad förelåg i Sheffé's test. Figurerna är gjorda i Graph pad Prism 5 för Windows version 5.02.

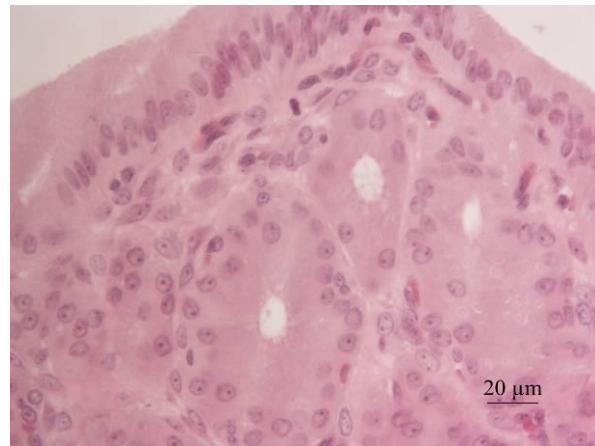
RESULTAT

Kärl

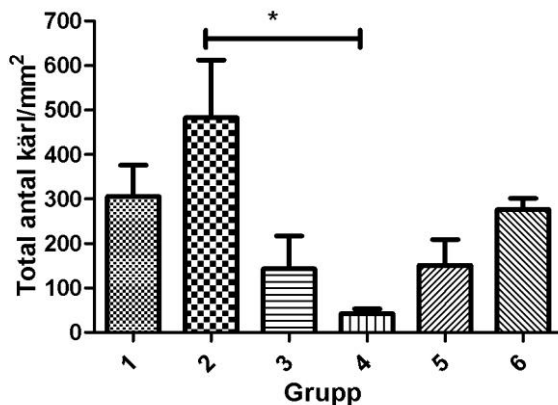
Signifikant skillnad ($p < 0,05$) kunde ses i totala antalet kärl i anslutning till ytepitel mellan mitt-metöstrus (grupp 2, $482,5 \pm 129,7$) och tidig dräktighet dag 8-9 (grupp 4, $42,3 \pm 10,3$) (Fig. 2-4). Övriga grupper visade ingen signifikant skillnad i Sheffé's test. Med Mann Whitney test kunde även signifikant skillnad ($p \approx 0,037$) påvisas under tidig metöstrus (grupp 1, $305,2 \pm 70,5$) jämfört med tidig dräktighet dag 8-9 (grupp 4, $42,3 \pm 10,3$) som hade ett lägre totalt antal kärl. Generellt sågs lägre medelvärden med en mindre variation under tidig dräktighet dag 8-18 jämfört med tidig och mitt-metöstrus.



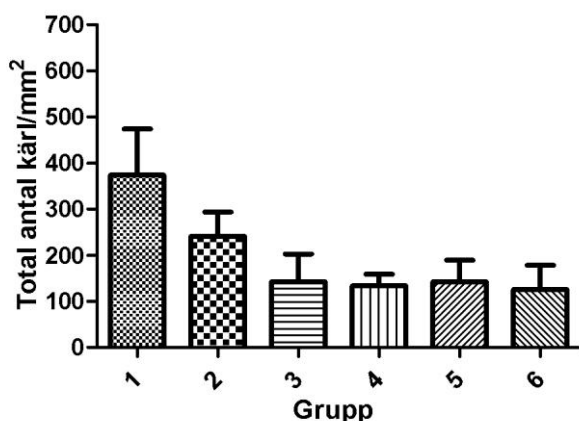
Figur 2: Kärl i anslutning till ytepitel under tidig metöstrus.



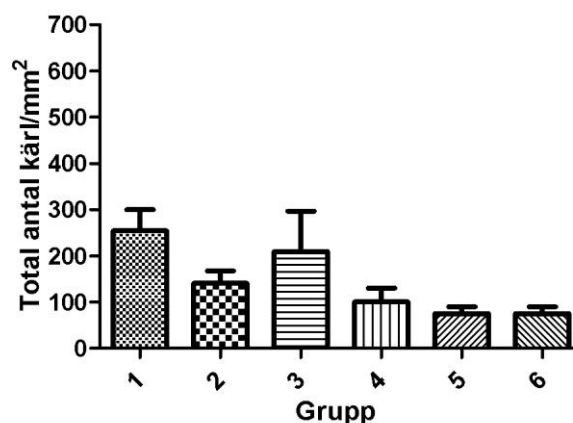
Figur 3: Kärl i anslutning till ytepitel vid tidig dräktighet d 8-9.



Figur 4. Totala antalet kärl i anslutning till endometriets ytepitel i olika stadier av metöstrus (grupp 1-3) och tidig dräktighet (grupp 4-6). Medelvärde \pm SE. Signifikant skillnad kan ses mellan Gr 2 och 4 ($p < 0,05$). Med Mann Whitney test kunde även signifikant skillnad mellan Gr 1 och 4 ($p \approx 0,037$).



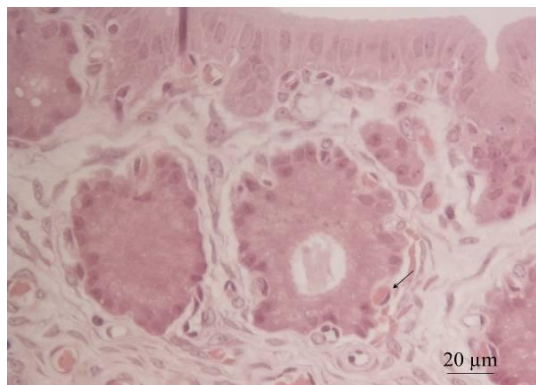
Figur 5. Totala antalet kärl i ytlig zon av endometriet i olika stadier av metöstrus (grupp 1-3) och tidig dräktighet (grupp 4-6). Medelvärde \pm SE.



Figur 6. Totala antalet kärl i basal zon av endometriet i olika stadier av metöstrus (grupp 1-3) och tidig dräktighet (grupp 4-6). Medelvärde \pm SE.

Ingen signifikant skillnad förelåg mellan de olika reproduktionsstadierna avseende totala antalet kärl i varken den ytliga (Fig. 5) eller basala zonen (Fig. 6) av endometriet, men generellt sågs låga medelvärden vid tidig dräktighet dag 8-18 och med en mindre variation i jämförelse med tidig metöstrus.

Ingen signifikant skillnad kunde ses avseende antalet kärl i anslutning till körtlar eller kärl som ger en inbuktning av körtelepitelets basallamina (Fig. 7), vare sig i anslutning till ytepitel, ytlig eller basal zon av endometriet.

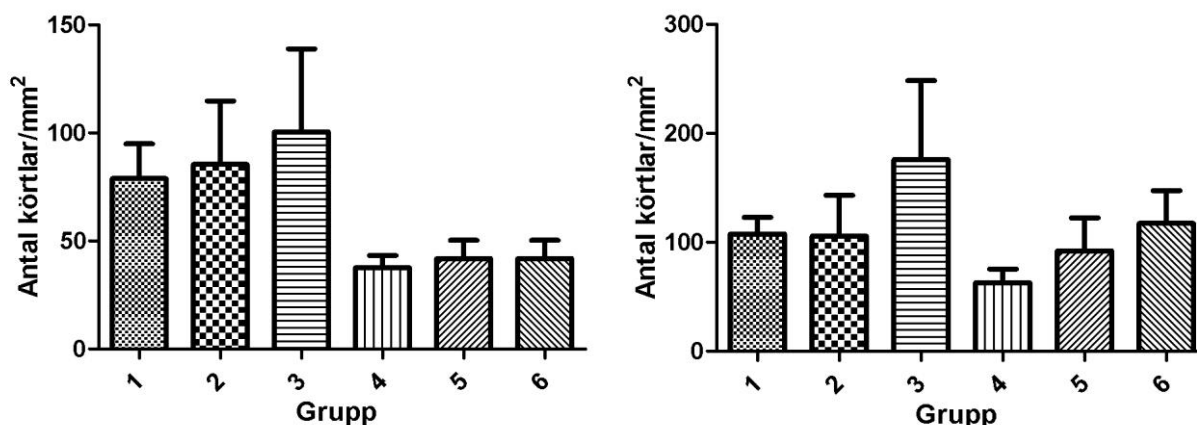


Figur 7. Kärl i närhet till körtlar inklusive kärl som ger inbuktande basallamina i körtelepitelet.

Körtlar

Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan de undersökta grupperna avseende antalet körtelvärsnitt i anslutning till ytepitel.

Vid jämförelse av de olika grupperna avseende antalet körtelvärsnitt per mm² i den ytliga zonen av endometriet sågs ingen signifikant skillnad med Sheffé's test (Fig. 8). Med Mann Whitneytest sågs dock en tydlig tendens ($p \approx 0.052$) till skillnad mellan tidig metöstrus (grupp 1, $79 \pm 15,9$) och tidigt dräktiga dag 8-9 (grupp 4, $37,7 \pm 5,6$) som hade ett lägre antal körtelvärsnitt.

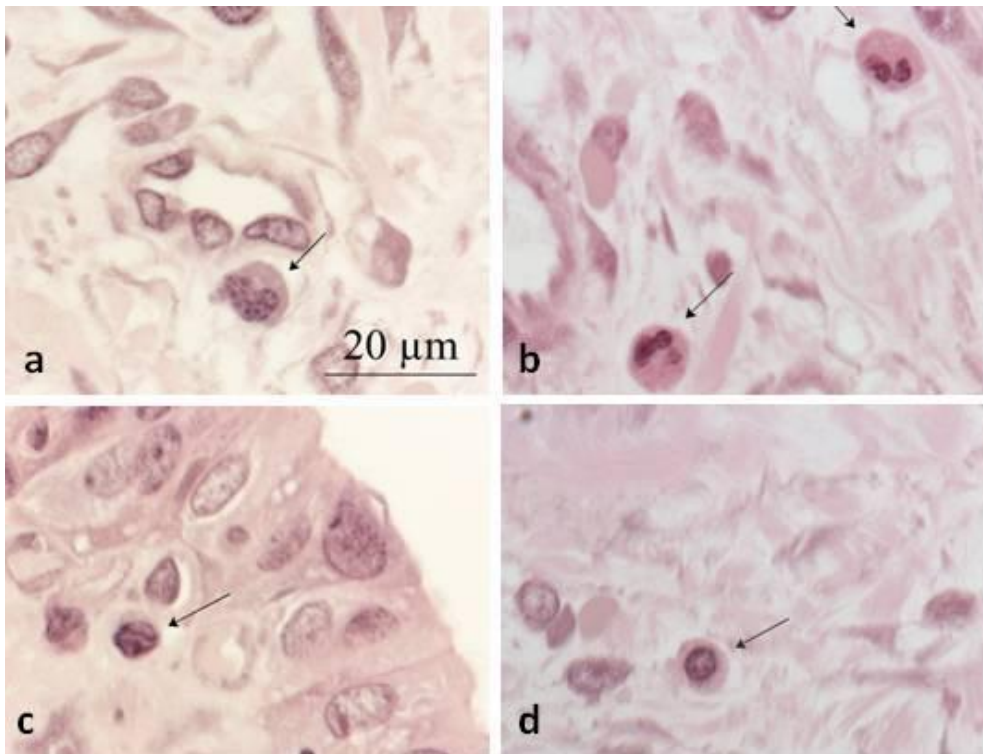


Figur 8-9. Totalantal körteltvärsnitt i endometriet i olika stadier av metöstrus (grupp 1-3) och tidig dräktighet (grupp 4-6). Medelvärde \pm SE. Fig. 8 (till vänster): Ytlig zon av endometriet. Fig. 9 (till höger): Basal zon av endometriet. Ingen signifikant skillnad kan ses mellan grupperna 1-6 med Sheffé's test. Med Mann Whitneytest kunde dock tendens till skillnad visas mellan gr 1, tidig metöstrus, och 4, tidig dräktighet dag 8-9, i både ytlig zon av endometriet ($p \approx 0,052$) och basal zon av endometriet ($p \approx 0,056$).

Vid jämförelse av de olika grupperna avseende antalet körteltvärsnitt per mm^2 i den basala zonen av endometriet sågs ingen signifikant skillnad med Sheffés test (Fig. 9). Dock sågs en tydlig tendens till skillnad ($p \approx 0,056$) med Mann Whitney test mellan tidig metöstrus (grupp 1, $107,7 \pm 15,2$) och tidig dräktighet dag 8-9 (grupp 4, $62,8 \pm 12,6$), som hade ett lägre antal körteltvärsnitt i den basala zonen.

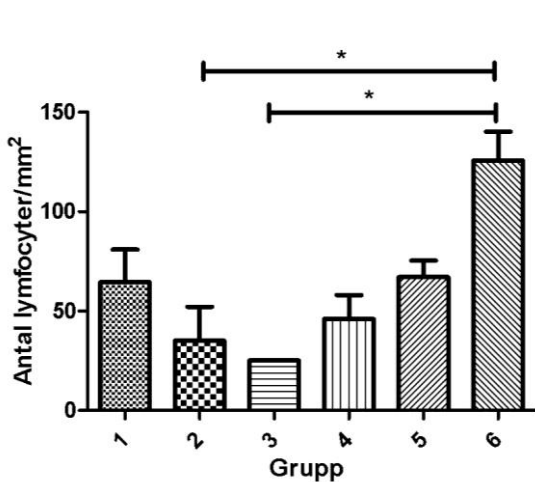
Immunceller

Enstaka monocyter/makrofager och plasmaceller (Fig. 10a och 10d) kunde generellt ses i endometriets bindväv men ingen skillnad förelåg mellan de olika reproduktionsstadierna. Den mest frekvent förekommande typen av immuncell var lymfocyten (Figur 10c). Antalet lymfocyter i anslutning till endometriets ytepitel (Fig. 11) var signifikant högre ($p < 0,05$) vid dräktighet dag 18 (grupp 6, $125,7 \pm 14,5$) både jämfört med mitt-metöstrus (grupp 2, $35,2 \pm 17,1$) och sen metöstrus (grupp 3, $25,1 \pm 0$), men inte med tidig metöstrus. Ingen skillnad i förekomst av lymfocyter sågs i den ytliga eller basala zonen av endometriet.

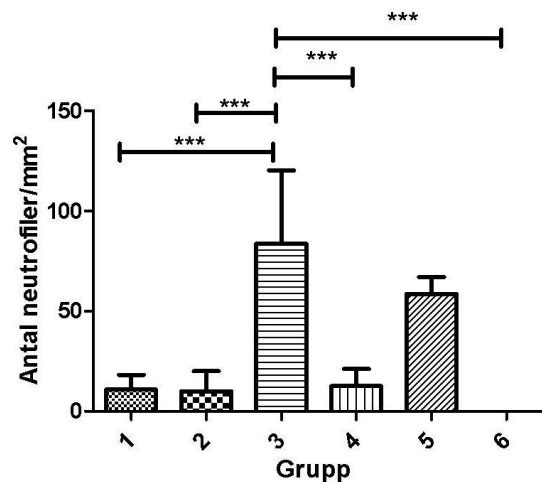


Figur 10. Pilar markerar a: monocy/makrofag; b: neutrofiler; c: lymfocyt i anslutning till ytepitel; d: plasmacell.

Antalet neutrofiler (Fig. 10b) i den ytliga zonen av endometriet (Fig. 12) var signifikant högre ($p < 0,05$) hos individer sent i metöstrus (grupp 3, $83,8 \pm 36,5$) jämfört med övriga grupper förutom tidigt dräktiga dag 13-15. I övriga delar av endometriet sågs inga skillnader.



Figur 11. Antal lymfocyter i anslutning till endometriets ytepitel i olika stadier av metöstrus (grupp 1-3) och tidig dräktighet (grupp 4-6). Medelvärde \pm SE. Signifikant skillnad ($p < 0,05$) kan ses mellan gr 2 och 6 samt mellan gr 3 och 6.



Figur 12. Antal neutrofiler i den ytliga zonen av endometriet i olika stadier av metöstrus (grupp 1-3) och tidig dräktighet (grupp 4-6). Medelvärde \pm SE. Signifikant skillnad ($p < 0,05$) kan ses mellan gr 3 och gr 1,2,4 respektive 6.

DISKUSSION

I den här studien jämfördes förekomsten av kärl, körtlar och immunförsvarsceller i tikendometrium under metöstrus och tidig dräktighet (d 8-18).

Man skulle kunna förvänta sig en ökad vaskularisering i endometriet inför placentabildning. Dock påvisades en lägre förekomst av totalt antal kärl nära ytepitellet hos tidigt dräktiga dag 8-9 jämfört med tikar i tidig metöstrus, men dräktighetsdag 13-18 skiljde sig inte statistiskt från de andra stadierna. Generellt sett var medelvärden och variation (SE) under tidig dräktighet lägre än vid tidig metöstrus, som de närmast motsvarar tidsmässigt, vilket skulle kunna tyda på en beredskap inför den degeneration av endometriet som sker under placentabildningen vilken är invasiv hos hund. Det skulle också kunna vara så att signaler, t.ex. tillväxtfaktorer, specifika för dräktighet har fördröjd påverkan på kärlförekomst i endometriet och därmed ännu inte har givit effekt innan 18 dagars dräktighet efter LH-toppen, vilket också är tidigt i förhållande till placentabildningens start. Alternativt var antalet tikar i denna studie för få för att skillnader skulle kunna ses. Skillnad sågs också i förekomst av kärl i anslutning till endometriets ytepitel mellan dräktighet dag 8-9 och mitt-metöstrus (ca från dag 14 till 42) som hade ett större totalt antal kärl, men då de var i olika skeenden av lutealfasen är det svårt att dra slutsatser från detta. Sannolikt är tidig metöstrus och början av mitt-metöstrus de delar av metöstrus som är mest lika tidig dräktighet dag 8-18 ur ett fysiologiskt perspektiv.

Teoretiskt anses det inte kunna ske någon utsöndring från embryot medan det fortfarande är inneslutet i zona pellucida, men ändå kan förändring ses i endometriet hos tik redan före implantation (Barrau *et al.*, 1975b). Det är inte klarlagt hur detta sker, men skulle kunna bero på en ren mekanisk påverkan från embryon i zona pellucida alternativt att parning inklusive komponenter i sperman påverkar. Hos mus har zona pellucida visat sig vara permeabel för vissa molekyler som immunoglobuliner samt ferritin vilket även har setts hos mink (Hastings *et al.*, 1972) men detta har inte visats hos hund. Tillväxtfaktorer som VEGF har setts öka under preimplantation (d10-12 efter parning) och likaså MMP-2 och -9 (Beceriklisoy *et al.*, 2007) som hos andra arter visats vara relaterat till invasion av endometriet (Staun-Ram *et al.*, 2004). Även faktorer som IFN- γ , CD-8 samt IL-4 i uterus har föreslagits vara involverade i Maternal Recognition of Pregnancy hos hund (Schäfer *et al.*, 2008). Ytterligare studier behövs för att klargöra signalering under den perioden och vilka vävnadsförändringar inklusive kärlutveckling som eventuellt skiljer mellan dräktiga och icke-dräktiga tikar.

Denna studie visade tendens till lägre antal körteltvärsnitt i ytlig och basal zon av endometriet under tidig dräktighet dag 8-9 jämfört med tidig metöstrus. Detta skulle kunna vara till följd av ödem som en inflammatorisk vävnadsreaktion efter parning, vilket gör att antalet körtlar förefaller vara färre i en given snittarea, även om det faktiska körtelantalet är detsamma. I denna studie har inte arean på körtlarna mätts och körtlar har inte delats in beroende på storlek vilket kan påverka resultaten.

De mest frekvent förekommande av leukocyterna under alla reproduktionsstadier i denna studie av tikendometrium är lymfocyter, vilket även har visats av Chu *et al.* (2006). I denna studie sågs signifikant högre antal lymfocyter i anslutning till ytepitel vid tidig dräktighet dag

18 jämfört med mitt-metöstrus och sen metöstrus. Ingen skillnad kunde ses gentemot tidig metöstrus, men dräktighet dag 18 är dock motsvarande början av mitt-metöstrus. Det låga antalet lymfocyter i anslutning till ytepitelet under sen metöstrus skulle kunna ha ett samband med att progesteron generellt sett visats hämma immunförsvaret i tiklivmodern (Sugiura *et al.*, 2004). Hos de tidigt dräktiga är progesteronnivån också hög, men det signifikant högre lymfocytantalet dag 18 efter LH-toppen jämfört med både mitt- och sen metöstrus kan därmed antas bero på effekter av parning och/eller dräktighet. I studier av Chu *et al.* (2006) sågs dock ett högt antal lymfocyter i anslutning till ytepitel i sen metöstrus jämfört med tidig och mitt-metöstrus.

Endast ett fåtal neutrofiler kunde påvisas under tidig dräktighet, men antalet neutrofiler var högt sent i metöstrus i den ytliga zonen av endometriet. Detta skulle kunna vara en tillfällighet att dessa djur ligger högt då antalet individer i sen metöstrus är få. Vid artificiell insemination av sperma i tik har det dessutom påvisats ett inflammatoriskt svar med neutrofiler (England *et al.*, 2012), vilket gör resultatet med ett högt neutrofilantal i sen metöstrus i denna studie ytterligare motsägelsefullt.

Ingen signifikant skillnad kunde ses för monocytter/makrofager och plasmaceller i de olika stadierna, och båda celltyperna förekom sällan. Om det finns kvalitativa skillnader i de celltypernas aktivitet krävs andra metoder än den här studien använt. Då väldigt få studier är gjorda om immunceller vid tidig dräktighet hos hund behövs ytterligare studier inom ämnet.

De flesta av individerna i denna studie var 1-2 år vid kastrationstillfället. Dock särskilde sig en av individerna i gr 5, d.v.s. dräktiga dag 13-15, från resterande med en ålder på 7 år och tidigare genomgången dräktighet vilket skulle kunna påverka resultatet. De flesta dräktiga tikar tillhörde rasen labrador vilket gav en ökad homogenitet jämfört med individerna i metöstrus där de flesta var blandraser, ibland även av en mindre storlek samt i olika åldrar.

Förutom av variationen i djurmateriel kan resultaten i denna studie även ha påverkats av att antalet hundar i en del av grupperna var på gränsen till för få. Värdena inom grupperna under tidig dräktighet varierar dock inte lika mycket som de icke-dräktiga djurens, men detta kan också påverkas av rasens homogenitet. Hos varje individ valdes tre representativa platser i endometriet ut (i anslutning till ytepitel, ytlig respektive basal zon). Även om vävnadssnittet generellt sett inte såg ut att skilja sig mellan olika platser på respektive nivå, kan detta ha påverkat och ytterligare studier där man istället tittar på flera områden hos samma individ skulle kunna ge en större säkerhet i resultaten.

Sammanfattningsvis har en minskad kärlförekomst påvisats i anslutning till ytepitel under tidig dräktighet dag 8-9 jämfört med tidig och mitt-metöstrus men mellan övriga stadier ses ingen skillnad. För densiteten av körteltvärsnitt kunde ingen skillnad visas även om tendens till ett lägre antal under tidig dräktighet förelåg. Viss skillnad kunde påvisas avseende immunceller, med fler lymfocyter under dräktighet dag 18 jämfört med mitt- och sen metöstrus. Ytterligare studier med fler individer och ett mera enhetligt djurmateriel behövs för att kunna avgöra om, hur och när parning och tidig dräktighet påverkar endometriet jämfört med situationen hos den icke-dräktiga tiken.

REFERENSER

- Andersen, A.C. & Simpson, M.E. (1973). *The ovary and reproductive cycle in the dog (Beagle)*. ss. 128-163. Kalifornien, Los Altos: Geron-X Inc.
- Barrau, M. D., Abel, J. H., Verhage, H. G. & Tietz, W. J. (1975a). Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. *American Journal of Anatomy*, 142, 47-65.
- Barrau, M. D., Abel, J. H., Verhage, H. G. & Tietz, W. J. (1975b). Development of the implantation chamber in the pregnant bitch. *American Journal of Anatomy*, 143, 115-130.
- Beceriklisoy, H.B., Walter, I., Schäfer-Somi, S., Miller, I., Kanca, H., Izgur, H. & Aslan, S. (2007). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the canine uterus before and during placentation. *Reproduction of Domestic Animals*, 42, 654-659.
- Bukowska, D., Kempisty, B., Jackowska, M., Woźna, M., Antosik, P., Pitrowska, H., Jaśkowski, J.M. (2011). Analysis of integrins and vascular endothelial growth factor isoforms mRNA expression in the canine uterus during perimplantation period. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14 (2), 253-258.
- Chu, P., Lee, C.S. & Wright, P.J. (2006). Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Theriogenology*, 66, 1545-1549.
- Concannon, P.W., Hansel, W., Visek, W.J. (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of Reproduction*, 113, 112-121.
- Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J., Russel, H. (1993). Fertility and infertility of dogs, cats and non-domestic carnivores. *The Journals of Reproduction and Fertility Ltd*, Cambridge, 569.
- Concannon, P.W., Tsutsui, T., Shille, V. (2001b). Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 57, 169-179.
- Concannon, P.W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction of Domestic Animals*, 44, Suppl 2, 3-15. Review.
- Concannon, P.W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124, 200-210. Review.
- Dantzer, V. (1999). Endotheliochorial placentation. *Encyclopedia of Reproduction*, 1, 1078-1084.
- Desmarais, J., Cao, M., Bateman, A. & Murphy, B.D. (2008). Spatiotemporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodeling, and angiogenesis. *Society for Reproduction and Fertility*, 1470-1626 (paper) 1741-7899 (online).
- Douglas, N.C., Tang, H., Gomez, R., Pytowski, B., Hicklin, D.J., Sauer, C.M., Kitajewski, J. & Zimmermann, R.C. (2009). Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. *Endocrinology*, 150 (8), 3845-3854.
- Enders, A.C. & Carter, A.M. (2005). Comparative placentation: some interesting modifications for histiotrophic nutrition- A review. *Placenta* (2006), 27, Suppl A:S11-6.
- England, G.C., Russo, M. & Freeman, S.L. (2012). The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. *The Veterinary Journal*, Tillgänglig: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.027>[2012-12-17].
- Galabova, G., Egerbacher, M., Aurich, J.E., Leitner, M. & Walter, I. (2003). Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 415-420.
- Groppetti, D., Pecile, A., Arrighi, S., Di Giancamillo, A. & Cremonesi, F. (2010). Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch. *Theriogenology*, 73, 927-941.

- Hastings, R.A., Enders, A.C. & Schlafke, S. (1972). Permeability of the zona pellucida to protein tracers. *Biology of Reproduction*, 7, 288-296.
- Kowalewski, M.P. (2012). Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, Suppl 6, 19-24.
- Lopes, F.L., Desmarais, J., Ledoux, S., Gévry, N.Y., Lefevre, P. & Murphy, B.D. (2006). Transcriptional regulation of uterine vascular endothelial growth factor during early gestation in a carnivore model, *Mustela vison*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (34), 24602-24611.
- Marschall, Z., Scholz, A., Cramer, T., Schafer, G., Schirner, M., Öberg, K., Wiedenmann, B., Hocker M. & Rosewicz, S. (2003). Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (6), 437-448.
- Miglino, M.A., Ambrósio, C.E., dos Santos Martins, D., Wenceslau, C.V., Pharrer, C. & Leiser, R. (2006). The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology*, 66, 1699-1702.
- Mulligan, R.M. (1942). Histological studies on the canine female genital tract. *Journal of Morphology*, 71(3), 431-448.
- Schäfer-Somi, S. (2012). Early canine pregnancy- A battle for successful growth and angiogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, Suppl 6, 165-168.
- Schäfer-Somi, S. Beceriklisoy, H.B., Budik, S., Kanca, H., Aksoy, O.a., Polat, B., Cetin, Y., Ay, S.S. & Aslan, S. (2008). Expression of genes in the canine pre-implantation uterus and embryo: Implications for an active role of the embryo before and during invasion. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 656-663.
- Schäfer-Somi, S., Sabitzer, S., Klein, D., Reinbacher, E., Kanca, H., Beceriklisoy, H.B., Aksoy, O.A., Kucukaslan, I., Macun, H.C. & Aslan, S. (2012). Vascular endothelial (VEGF) and epithelial growth factor (EGF) as well as platelet-activating factor (PAF) and receptors are expressed in the early pregnant canine uterus. *Reproduction in Domestic Animals*, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02019.x>[2012-12-17].
- Shimizu, T., Tsutsui, T., Murao, I. & Orima, H. (1990). Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52 (6), 1273-1275.
- Schutte, A.P. (1967). Canine vaginal cytology – I. Technique and vaginal cytology. *Journal of Small Animal Practice*, 8, 301-306.
- Schutte, A.P. (1967). Canine vaginal cytology – II. Cyclic changes. *Journal of Small Animal Practice*, 8, 307-311.
- Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D. & Shalev, E. (2004). Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2 (59), <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-2-59>[2012-12-17].
- Sugiura, K., Nishikava, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R., Hatoya, S., Wijewardana, V., Kumagai, D., Tamada, H., Sawada, T., Ikehara, S. & Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209, 619-627.
- Tsutsui, T., Hori, T., Kirihara, N., Kawakami, E. & Concannon, P.W. (2006). Relation between mating or ovulation and the duration of gestation in dogs. *Theriogenology*, 66, 1706-1708.
- Walter, I., Galabova, G., Dimov, D. & Helmreich, M. (2010). The morphological basis of proestrus endometrial bleeding in canines. *Theriogenology*, 75, 411-420.
- Yasuyuki, A., Yoshinori, S., Yoshiko, Y. & Hiroshi, S. (2008). Preimplantation development of embryos in labrador retrievers. *Journal of Reproduction and Development*, 54 (2), 135-137.