



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper.

Utvärdering av ljusmikroskopisk undersökning av vagina och livmoder som metod för att bedöma lodjurshonans brunstcykelstadium

Daniel Holm

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:1

Utvärdering av ljusmikroskopisk undersökning av vagina och livmoder som metod för att bedöma lodjurshonans brunstcykelstadium

Daniel Holm

Handledare: Ann-Sofi Bergqvist, Avd. för reproduktion, Institutionen för Kliniska vetenskaper.

Biträdande handledare: Eva Axné, Avd. för reproduktion, Institutionen för Kliniska vetenskaper.

Biträdande handledare: Patrice Humblot, Avd. för reproduktion, Institutionen för Kliniska vetenskaper

Examinator: Bernt Jones. Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Lynx, Reproduction, Uterus, Vagina, Histology

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:1*

INNEHÅLL

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
Det övergripande projektet	3
Det eurasiska lodjuret	4
Reproduktion	5
SYFTE	5
MATERIAL OCH METODER	6
RESULTAT	8
Brunstcykelstadium och vaginalepitel	8
Brunstcykelstadium och förhorning av vaginalepitlet.	10
Antal cellager i vaginalepitel och förhorning eller ej.	10
Brunstcykelstadium och endometriella körtlar	11
ANOVA för de kontinuerliga variablerna relaterat till brunstcykelstadium	11
Endometriets tjocklek i relation till körtlar, vaginalepitel och interaktion mellan körtlar och vaginalepitel.	12
Inre myometriets tjocklek i relation till körtlar, vaginalepitel och interaktion mellan körtlar och vaginalepitel.	12
Hela myometriets tjocklek i relation till körtlar, vaginalepitel och interaktion mellan körtlar och vaginalepitel.	12
Analys av brunstcykelstadium och de kontinuerliga variablerna med Scheffes metod.	12
DISKUSSION.....	13
LITTERATURFÖRTECKNING.....	15

SAMMANFATTNING

Detta arbete är en del av den forskning som bedrivs inom Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) för att öka kunskapen om den svenska lodjursstammen. Det övergripande projektet, varav detta projekt är en del, syftar till att studera könsfunktionerna hos svenska lodjur. Ett mål inom det övergripande projektet är att öka kunskapen om lodjurets reproduktionsfysiologi

Alla lodjur som dödas eller som påträffas döda ska sändas till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). Det ger möjligheter att studera reproduktionsorgan från ett stort antal individer. Preparaten som används i denna studie är från eurasiska lodjur som inkommit till SVA under åren 2009, 2010 och 2011. Preparaten var uppdelade efter vilket år lodjuren hade inkommit till SVA.

För att säkerställa att resultatet ej påverkades av bakgrundsfakta om individerna var allt material kodat. Jag hade ingen kunskap om, eller insikt i, hur koderna var kopplade till stadium, ålder eller dylika bakgrundsfakta. Det var således en blindstudie.

Syfte i detta delprojekt är att testa om det angreppssätt som valts kan användas för utvärdering av vilka mått och metoder som är relevanta för bedömning av lodjurshonans brunstcykelstadium med hjälp av ljusmikroskopi.

Huvudhypotes är att utvärdera om det finns samband mellan den fördefinierade indelningen i brunstcykelstadier och de parametrar som bedöms och mäts med ljusmikroskop.

Bedömning och mätningar gjordes av antal cellager i vagina, om vaginalepitelet var förhornat eller ej, körtelaktivitet i endometrium, samt endometriets och myometriets tjocklek. När ljusmikroskoperingen genomförts och data insamlats, gjordes en statistisk analys mot den kodning som gjorts av handledarna. Materialet var begränsat med preparat från 40 individer, med ett bortfall av upp till 7 mätvärden i vissa delar av analysen. Det skapar en statistisk osäkerhet, men utifrån genomförda statistiska analyser tyder resultatet på att det är möjligt att med ljusmikroskopisk undersökning av vagina och livmodern går att fastställa vilken fas i brunstcykeln en lodjurshona befinner sig i. Detta trots att några av preparaten delvis var förruttnade.

Slutsatsen är utifrån gjord studie att ljusmikroskopering är en bekräftelse av huvudhypotesen, det finns tydliga samband mellan den fördefinierade bedömningen i brunstcykelstadier och de parametrar jag bedömt och mätt med ljusmikroskopet. Därmed kan den använda metoden med ljusmikroskopering och mätning och bedömning av preparaten vara en användbar metod som kan användas för att öka kunskapen om lodjurens reproduktion.

SUMMARY

This project is part of the research conducted at the Swedish University of Agricultural Sciences to increase knowledge about the Swedish lynx population. The larger project, of which this project is a part, aims to study the reproductive physiology of the Eurasian lynx.

All lynx killed or found dead in Sweden has to be sent to the National Veterinary Institute (SVA). This provides the possibility to study the reproductive organs from a large number of individuals. The microscopic slides used in this study originate from Eurasian lynx carcasses which arrived at SVA during the years 2009, 2010, 2011.

To ensure that the results were not affected by background data about the individuals, all material in this study was coded. I had no knowledge of how the codes were connected to the estrus cycle, age or other background facts about the animals. It was thus a blind study.

The aim of this project is to test if the selected method can be used to evaluate which parameters and methods are relevant to determining which stage of the estrus cycle a lynx female is in, using light microscopy.

The main hypothesis is to investigate if there is a relation between the pre-defined stages of the estrus cycle the subject was in, and the parameters I measure using a light microscope.

Assessment was made of the number of cell layers in the vaginal epithelium, if the vaginal epithelium was keratinized or not, glandular activity in the endometrium, as well as the thickness of the endometrium and myometrium. When the practical work with light microscopy was finished and all data collected, statistical analysis was performed. The data was limited, with samples from 40 individuals, with a loss of up to 7 individuals in parts of the analysis. This leads to increased uncertainty, but based on the statistical analyses performed, the results indicate that it is possible to determine which estrus cycle stage a female lynx is in using light microscopy, this in spite of post mortem degeneration in some of the samples.

The conclusion is that the results confirm the main hypothesis. There are clear correlations between the estrus cycle stages, and the parameters measured with the light microscope. Thus, this method of measuring and evaluating tissue using light microscopy could be a useable method to increase the knowledge of the reproductive physiology of the lynx.

INLEDNING

Det övergripande projektet

Detta arbete är en del av den forskning som bedrivs inom Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) för att öka kunskapen om den svenska lodjursstammen. Det övergripande projektet, varav detta projekt är en del, syftar till att studera könsfunktionerna hos svenska lodjur. Ett mål inom det övergripande projektet är att öka kunskapen om lodjurets reproduktionsfysiologi. Utökad kunskap om lodjurens reproduktion kan leda till att man får bättre verktyg inom flera områden.

Då lodjuret är en predator i toppen av näringskedjan kan man söka efter effekter på deras reproduktionsorgan och reproduktiva förmåga, som kan vara orsakade av miljöföroreningar upptagna från deras bytesdjur. Det bedrivs årligen licensjakt på lodjur i syfte att hålla populationen under kontroll, detta trots att man saknar tillförlitliga metoder för att bedöma populationens storlek. Fram till idag har studier av lodjur främst bedrivits med hjälp av halsband försedda med radiosändare och räkning av spår i snö (Linnell et al. 1998).

Alla lodjur som dödas eller som påträffas döda ska sändas till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). Det ger möjligheter att studera reproduktionsorgan från ett stort antal individer. Studierna av organ från dessa lodjur kan bland annat ge ökad kunskap om ålder för könsmognad, parningstid, säsongsmässighet, fertilitet, kullstorlek, förekomst av patologiska tillstånd i könsorganen, infertilitet och spermie kvalitet. Många faktorer kan påverka lodjurens överlevnadsförmåga. Exempel kan vara inavel, miljögifter och klimatförändringar. Då historiska data är bristfälliga är det svårt att utvärdera dessa effekter.

I det överordnade projektet ingår att undersöka organ både från handjur och från hondjur. Förutom brist på historiskt insamlad och systematiserad data, saknas även verktyg som ger möjlighet att bedöma vilka faktorer som påverkar stammens utveckling över tiden. Eftersom vissa miljögifter har visat sig kunna påverka andra djurslag, så kan de även påverka lodjuren och deras livsbetingelser.

För att kunna analysera lodjursstammens utveckling och olika faktorer eventuella påverkan på populationen, krävs insamling och kategorisering av tillräcklig mängd grunddata. Dessa grunddata kan utgöra en del av basen för framtida studier av stammens utveckling och bidra till förståelse för orsaker till denna. För att kunna tolka insamlade data behövs metoder och verktyg.

Det eurasiska lodjuret

Lodjur är solitära djur, förutom honor när de lever tillsammans med årets avkomma. Både hanar och honor har individuella revir, som markeras med körtelsekret, urin och troligen faeces (Breitenmoser et al. 2000). Historiskt sett har intensiv jakt bedrivits på lodjur i Skandinavien, och man uppskattar att det under tidigt 1900-tal fanns endast cirka 100 individer i Sverige och Norge tillsammans (Hellborg et al. 2002). I Sverige finns idag lodjur i de flesta delar av landet norr om 60:e breddgraden, som går nära Uppsala. Antalet lodjur uppskattades 2001 till ca 1500 (Lutz et al. 2005).

Det skandinaviska lodjuret kan baserat på genetiska analyser struktureras in i tre distinkta grupper (Jakobsen et al. 2003), troligen uppdelade i nordliga, centrala och sydliga subpopulationer inom Skandinavien. I studien visar de också att lodjur från den Skandinaviska halvön representerar en gren som tydligt skiljer sig från de europeiska artfränderna. De anser vidare att förekomsten av dessa substrukturer inom populationen tidigare varit okända och oväntade, utifrån allmänna antaganden om artens rörlighet, historiska data och geografiska barriärer. Detta anser jag vara ytterligare belegg för att mer forskning krävs, då det uppenbarligen dragits felaktiga slutsatser orsakade av bristfällig data och kunskap.

Det anses att lodjuret inte får samma uppmärksamhet i media, som de andra stora rovdjuren vargen och björnen får (Breitenmoser et al. 2000). Trots detta skall lodjuren enligt författarna ha ett rykte som är minst lika negativt, om inte värre, hos jägare och bönder. Det eurasiska lodjuret (*Lynx lynx*) är en av fyra arter inom släktet *Lynx* (Dehnhard et al. 2010). De andra arterna är rödlo (*Lynx rufus*), kanadensiskt lodjur (*Lynx canadensis*) och panterlo (*Lynx pardinus*). Det eurasiska lodjuret är den största lodjursarten, den tar större byten jämfört med de tre andra lodjursarterna (Breitenmoser et al. 2000). De tre mindre lodjursarterna benämns i artikeln som medelstora rovdjur, vilka livnär sig främst på lagomorpher, som i vår del av världen representeras av kaninen och haren.

Panterlon, som endast återfinns i Spanien och i gränstrakterna mellan Spanien och Portugal, är världens mest utrotningshotade kattdjur (Andren och Liberg 2006). Det finns endast ca 200 individer kvar i vilt tillstånd (Carnaby et al. 2012). De huvudsakliga anledningarna till att panterlon har minskat så kraftigt i antal och nu nästan är utrotad, tros vara förlust av habitat samt att deras bytesdjur, europeisk vildkanin (*Orytolagus cuniculus*), decimerats kraftigt av sjukdom (Von Arx och Breitenmoser-Würsten 2012).

Det eurasiska lodjurets utbredning sträcker sig genom Skandinavien, Ryssland och Kina, med gles population i resten av Europa och Östasien (Breitenmoser et al. 2007).

Reproduktion

Även i Kanada är kunskapen om lodjursstammarna relativt begränsad. Enligt en studie (Lucas et al, 2010) har kanadensiska lodjur två unika begränsningar gällande reproduktion, som kan påverka dynamiken i hur populationen utvecklas. Den första faktorn är att lodjurets säsong gällande förökning sträcker sig från sent i februari till tidigt i april och de föder huvudsakligen i maj, vilket betyder att deras fortplantning är beroende av en förhållandevis kort säsong. Den andra begränsningen de nämner är det samband som visats gälla mellan rekryteringen till lodjurspopulationen och tillgången av deras huvudsakliga byte, som i Kanada är haren *Lepus americanus*.

Lodjurens parningssäsong i Skandinavien sträcker sig från februari till början av april, där parningsaktiviteten är som högst i mars (Kvam 1991). Kanadensiska lodjur har en parningssäsong som sträcker sig från sent i februari till början av april (Fanson et al. 2010). För de enskilda individerna kan det dock röra sig om en kortare period, då man har observerat honor i fångenskap som uppvisat parningsbeteende under en så kort tidsperiod som en vecka. Man har genom att studera fekalt östrogen kunnat se hur cykeln för de kanadensiska lodjuren påverkas av breddgraden. Fanson et al. tror att variationen beror på att breddgraden påverkar dagslängden.

Till skillnad från andra kattdjur har lodjuren kvarstående och aktiva corpora lutea fram till nästa parningssäsong (Göritz et al. 2009, Woshner et al. 2001, Fanson et al. 2010). Lodjurshonor blir könsmogna vid två års ålder (Kvam 1991). Tvååringar har en signifikant lägre dräktighetsprocent, 58,8 % jämfört med 89,2 % för honor äldre än tre år (Axné et al. 2012). Rödlons persisterande gulkroppar är hormonellt aktiva över flera säsonger (Woshner et al. 2001). Studiens resultat antyder att rödlon har en reproduktiv strategi där dräktighet bibehålls genom funktionell inverkan från de persisterande gulkropparna.

SYFTE

Syfte i detta delprojekt är att testa om det angreppssätt som valts kan användas för utvärdering av vilka mått och metoder som är relevanta för bedömning av lodjurshonans brunstcykelstadium med hjälp av ljusmikroskopi.

Huvudhypotes är att utvärdera om det finns samband mellan den fördefinierade bedömningen i brunstcykelstadiet och de parametrar jag bedömer och mäter med ljusmikroskopet.

Undersökning om en korrelation finns mellan parametrarna i livmoder och vagina utförs också.

MATERIAL OCH METODER

Lodjuren som används i denna studie är eurasiska lodjur som inkommit till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) under åren 2009, 2010 och 2011.

Preparaten var uppdelade efter vilken säsong lodjuren hade inkommit till SVA. Snitten från 2009 och 2010 hade gjorts i samband med ett examensarbete från år 2010 (Setterlind 2010). Snitten från 2011 bekostades med pengar budgeterade inom detta projekt. Snittens kvalitet diskuterades och jag fick intryck av att de senast gjorda snitten, de från 2011, var av bäst kvalitet, då laboratorieassistenten som utförde arbetet när preparat snittades och fixerades hade mer erfarenhet och kunskap vid det senare tillfället. Därför valdes att analysera snitten från 2011 först, för att sedan gå genom snitten från 2010 följt av snitten från 2009. Detta för att få en bra referens baserad på det bästa materialet.

Med hjälp av ljusmikroskop bedömdes antal cellager i vagina, om vaginalepitelet var förhornat eller ej, körtelaktivitet i endometrium, samt endometriets och myometriets tjocklek. För att säkerställa att resultatet ej påverkades av bakgrundsfakta om individerna var allt material kodat. Jag hade ingen kunskap om, eller insikt i, hur koderna var kopplade till stadium, ålder eller dylika bakgrundsfakta. Det var således en blindstudie.

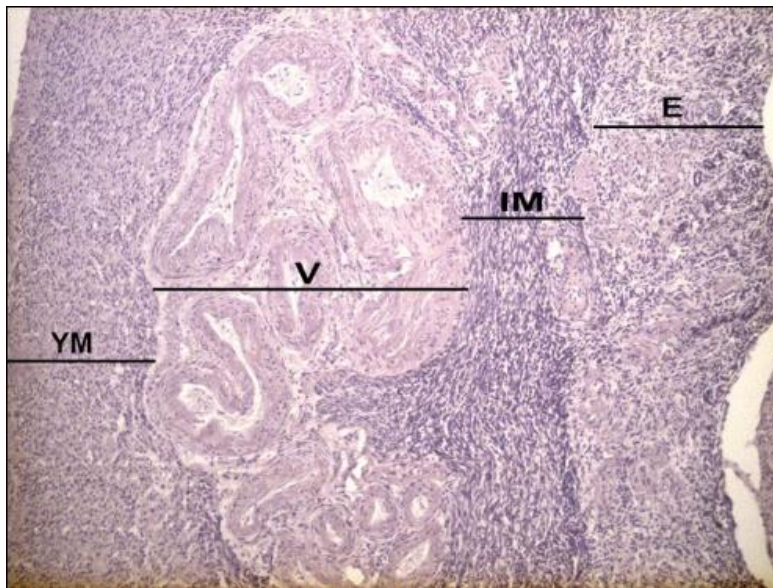
Mätningar utfördes med hjälp av ett mätokular. Mätokularet kalibrerades för 10x10 samt 10x40 gånger förstoring. Kalibrering utfördes med hjälp av ett objektglas med en skala på, en så kallad objektmikrometer. Vid 10x10 gånger förstoring motsvarar mätskalan i mätokularet millimeterskalan på objektmikrometern väl, där minsta enheten på båda blir 0,1 mm. Vid 10x40 gånger förstoring verifierades att minsta enheten på mätokularet blir 0,025 mm med hjälp av objektmikrometern.

Mätning av vaginalepitelets tjocklek utfördes endast om epitelcellerna bildade fler än tre lager. På grund av vävnadens skick vid fixeringstillfället saknade många preparat intakta cellager i vaginalepitelet, vilket är en tänkbar felkälla gällande hur representativt vaginalepitelets mikroskopiska utseende är för ett levande djur. Epitelet i vaginalslemhinnan bedömdes om det var förhornat eller ej. Då det var så få av dessa cellager som kunde mätas utfördes bara statistisk analys av antalet cellager och inte exakta måtten.

För varje preparat på vilka mätningar skulle utföras, gjordes först en bedömning av vad som var representativa områden. När detta gjorts valdes om möjligt fem områden ut, där två områden låg under ett uppskattat medelvärde, två områden över och ett som bedömdes som nära mitten av den variation som fanns. Dessa fem värden lades sedan ihop och dividerades med fem. Syftet var att få ett representativt medelvärde.

I början av mikroskoperingsarbetet mättes muskellagret i livmodern i sin helhet. Efter ett tag noterades att det lager med kärl (vaskulärlager) som ofta uppträder mellan inre och yttre lagren i myometriet varierade från att ibland inte vara

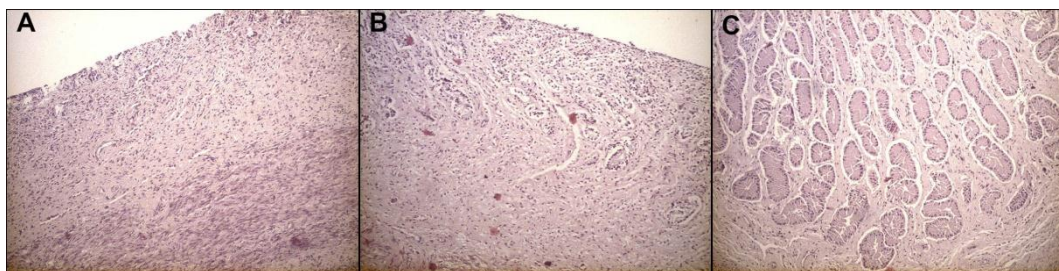
skönjbart till att vara så tjockt att det inte gick att utesluta att det kunde påverka mätningarna av endometriets muskulatur (se figur 1).



Figur 1. Det vaskulära lagret mellan de inre och yttre lagren av myometriet är tydligt och tjockt. E = endometrium, IM = inre myometrium, V = vaskulärlager, YM = yttre myometrium.

Myometriets tjocklek mättes om, nu med en parameter för inre myometrium (IM), samt en där inre och yttre myometrium mäts tillsammans, med vaskulärlagret däremellan (IM+V+YM).

Antal körtlar i livmoderslemhinnan har bedömts på en tregradig skala, där "1" anses vara lindrigt körtelinslag i bilden, "2" måttligt och "3" kraftigt (se figur 2). Den tregradiga skalan valdes i samråd med handledare Ann-Sofi Bergqvist samt Eva Axné.



Figur 2. 10x10 förstoring. A: Körtlar bedömda som 1. B: Körtlar bedömda som 2. C: Körtlar bedömda som 3.

Lodjuren var i blindstudien på förhand indelade i grupper som baserades på deras brunstcykelstadium, vilka grundas på de makroskopiska strukturer som hittats i äggstockarna. Dessa kriterier var definierade av handledare Ann-Sofi Bergqvist och Eva Axné. Efter de statistiska analyserna var definierade och genomförda av handledare Patrice Humblot, presenterades de av Ann-Sofi Bergqvist använda kriterierna för indelningen i brunstcykelstadium, se nedan.

Stadium	Kriterier
Juvenil	Inga folliklar eller Corpus Luteum (CL)
Lutealfas	Färska CL med eller utan gamla CL.
Follikelfas	Folliklar med eller utan gamla CL.
Anöstrus	Bara gamla CL.

De statistiska analyserna utfördes i SAS (Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). För att undersöka sambanden mellan de icke kontinuerliga variablerna (bedömning av körtlar, cellager i vaginalepitel, förhornning av vaginalepitel) användes Chi² test. De kontinuerliga variablerna (endometriets och myometriets tjocklek) analyserades först med ANOVA och sedan Scheffes test.

RESULTAT

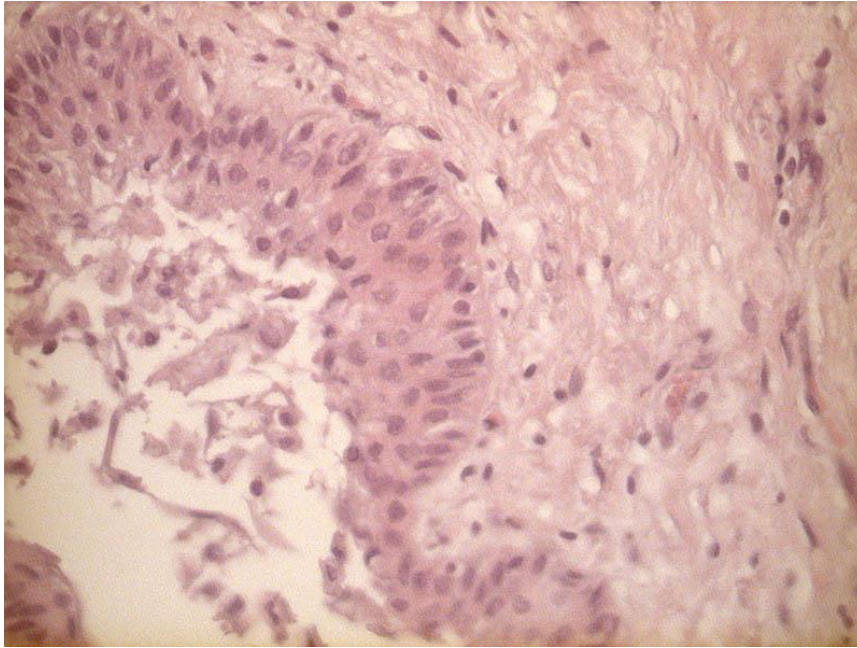
Brunstcykelstadium och vaginalepitel

Antalet cellager i epitel bedömdes utifrån en indelning i fyra kategorier. Kategorierna baserades på antalet cellager i vaginalepitelet (se tabell 1). I de fall där antalet cellager var få, var det oftast svårt att entydigt bedöma antalet lager. I de fall där epitelet var förhornat, var det enkelt att klassificera preparatet (se figur 3 och figur 4). Vid förhornning finns alltid mer än fyra lager celler på grund av fysiologin bakom förhorningsprocessen. En del av preparaten hade troligen påverkats avseende tydlighet i avgränsningen mellan cellagren på grund av förruttelseprocesser i materialet post mortem (se figur 5).

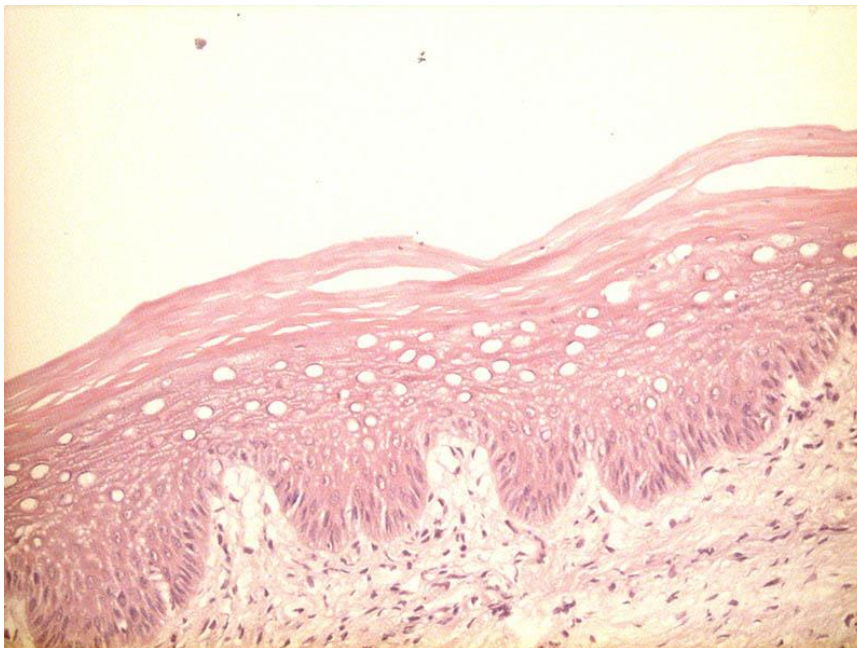
Totalt 40 individer studerades med ett bortfall av 6 individer på grund av degenererat material. Av de kvarvarande 34 individerna bedömdes 17 ha 1 cellager. Av dessa 17 tillhörde 6 gruppen juvenil, 6 gruppen lutealfas och 5 gruppen anöstrus. 9 individer bedömdes ha mer än 1 och mindre än 4 cellager. Av dessa 9 tillhörde 2 gruppen juvenil, 2 gruppen follikelfas, 2 gruppen lutealfas och 3 gruppen anöstrus. 8 individer bedömdes ha mer än 4 cellager. Av dessa 8 tillhörde 7 gruppen follikelfas och 1 gruppen lutealfas.

Tabell 1. Antal individer i brunstcykelstadierna, indelade efter antal cellager i vaginalepitelet.

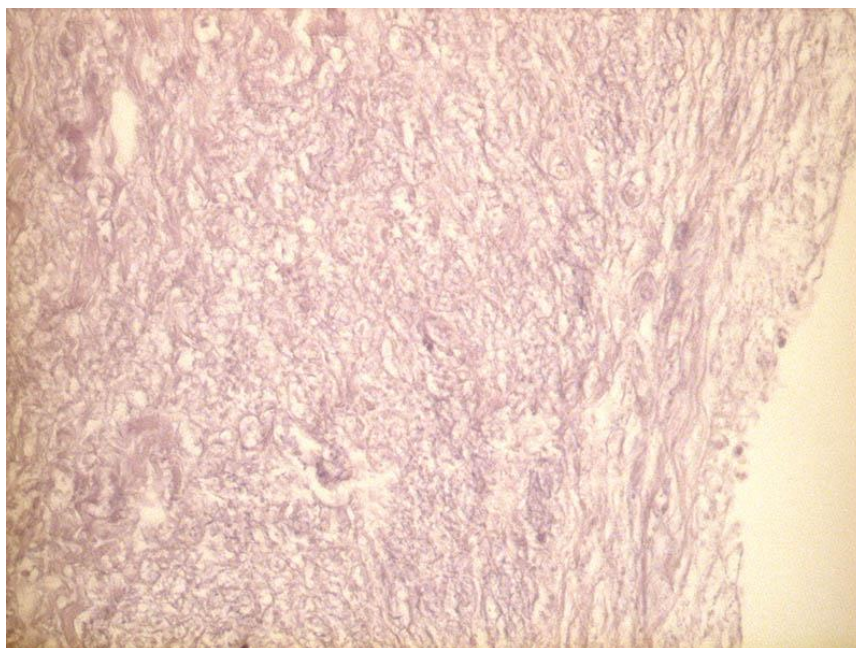
Stadium	Cellager		
	1	>1<4	≥4
Juvenil	6	2	0
Follikelfas	0	2	7
Lutealfas	6	2	1
Anöstrus	5	3	0



Figur 3. 40x10 förstoring. Preparat där cellagren var svårare att räkna. Detta preparat bedömdes ha tre cellager.



Figur 4. 20x10 förstoring. Preparat där cellagren tydligt framgår som mer än 4 lager. Närmast lumen kan man se att tydlig förhorning föreligger.



Figur 5. Förstoring 40x10. Endometrium med långt gången karyolys.

En Chi-2 analys utfördes, sambanden mellan brunstcykelstadium och de tre kategorierna för antalet cellager analyserades och visade ett signifikant samband mellan brunstcykelstadium och antalet vaginalepitelcellslager ($p=0,0010$).

Brunstcykelstadium och förhorning av vaginalepitelet.

Chi-2 analys visar ett signifikant samband mellan stadium och förhorning av vaginalepitelet ($p<0,0001$).

Av totalt 34 individer bedömdes 8 ha förhornat vaginalepitel. Av dessa 8 hörde 7 till gruppen follikelfas och 1 till lutealfas (se tabell 2).

Tabell 2. Förekomst av förhornat vaginalepitel relaterat till stadium.

Stadium	Förhorning	
	Ja	Nej
Juvenil	0	8
Follikelfas	7	2
Lutealfas	1	8
Anöstrus	0	8

Antal cellager i vaginalepitel och förhorning eller ej.

Chi-2 analys visar ett signifikant samband mellan förhornat vaginalepitel och antalet cellager i vaginalepitelet ($p<0,0001$). Av totala populationen på 40 individer saknas värdet för 5 preparat. Rätt typ av vävnad kunde ej med säkerhet identifieras i alla preparat, vilket ledde till bortfall. Detta troligtvis på grund av tidigare nämnd degenerering av materialet.

I gruppen för 1 cellager hamnade totalt 18 preparat, i denna grupp hittade jag ingen förekomst av förhornat epitel. I grupp 2, som innefattar fler än 1 och mindre än 4 cellager, hamnade 9 preparat totalt. Inte heller här hittade jag förhornade epitelceller. I grupp 3 som är de med fler än 3 cellager, hade alla 8 preparat förhornat epitel (se tabell 3).

Tabell 3. Förekomst av förhornat vaginaepitel relaterat till antal cellager.

Cellager	Förhorning	
	Ja	Nej
1	0	18
>1<4	0	9
≥4	8	0

Brunstcykelstadium och endometriella körtlar

Chi-2 analys visar ett tydligt samband mellan antalet endometriella körtlar och brunstcykelstadium. I den studerade populationen var sambanden starka och signifikanta ($p < 0,0001$).

Den fördelning som uppvisas efter databearbetning visar på tydliga grupperingar trots de få observationer som materialet representerar. Juvenila uppvisar lindrigt utvecklade körtlar. Preparaten från follikelfas uppvisar måttligt utvecklade körtlar. I gruppen lutealfas ligger 6 klassificerade som kraftigt utvecklade och 3 klassificerade som måttligt utvecklade. I gruppen anöstrus har 7 klassificerats som lindriga och 3 som måttliga. Sammantaget kan sägas att klassificeringen av populationen, baserat på körtlarnas utveckling, tydligt fördelar sig inom de fyra i förväg definierade klasserna.

Tabell 4. Observerad förekomst av körtelinslag fördelat per stadium.

Stadium	Gradering av körtelförekomst		
	1	2	3
Juvenil	7	2	0
Follikelfas	1	7	1
Lutealfas	0	3	6
Anöstrus	7	3	0

ANOVA för de kontinuerliga variablerna relaterat till brunstcykelstadium

ANOVA utfördes med General Linear Model (GLM) i SAS. Endometriets tjocklek, inre myometriets tjocklek, samt hela myometriets tjocklek (inre myometrium, vaskulärlager samt yttre myometrium tillsammans) har ett signifikant samband med brunstcykelstadium ($p < 0,0001$).

Endometriets tjocklek i relation till körtlar, vaginalepitel och interaktion mellan körtlar och vaginalepitel.

Tjockleken på endometrium i millimeter är signifikant relaterad till förekomsten av aktiva körtlar i endometriet ($p < 0,0001$). Vi hittade inget signifikant samband mellan endometrietjocklek och antalet cellager i vaginalepitlet ($p = 0,4232$). Det fanns inte heller något signifikant samband mellan mängden körtlar och vaginalepitelcellslager ($p = 0,1192$).

Inre myometriets tjocklek i relation till körtlar, vaginalepitel och interaktion mellan körtlar och vaginalepitel.

Tjockleken på det inre myometriet i millimeter är signifikant relaterad till förekomsten av aktiva körtlar i endometriet ($p < 0,0001$). Ett signifikant samband fanns även mellan det inre myometriet och cellager i vaginalepitlet ($p = 0,0118$). Men inget signifikant samband mellan mängden körtlar och vaginalepitelcellslager förelåg ($p = 0,0855$).

Hela myometriets tjocklek i relation till körtlar, vaginalepitel och interaktion mellan körtlar och vaginalepitel.

Tjockleken på hela myometriet är signifikant relaterad till förekomst av aktiva körtlar i endometriet ($p = 0,0014$). Vi fann inget signifikant samband för hela myometriets tjocklek och cellager i vaginalepitlet ($p = 0,4145$). Det fanns inte heller något signifikant samband mellan körtlar och vaginalepitelcellslager ($p = 0,3478$).

Analys av brunstcykelstadium och de kontinuerliga variablerna med Scheffes metod.

Scheffes metod används för att testa om det finns signifikant skillnad mellan de olika brunstcykelstadierna med de kontinuerliga variablerna som beroende variabel (se tabell 5, 6 och 7).

Tabell 5. Scheffes med endometriets tjocklek som beroende variabel.

Stadium	Stadium			
	Juvenil	Folikelfas	Lutealfas	Anöstrus
Juvenil	-	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$P = 0,7495$
Folikelfas	$p < 0,0001$	-	$P = 0,0259$	$p < 0,0001$
Lutealfas	$p < 0,0001$	$P = 0,0259$	-	$p < 0,0001$
Anöstrus	$P = 0,7495$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	-

Tabell 6. Scheffes metod med inre myometriets tjocklek som beroende variabel.

Stadium	Stadium			
	Juvenil	Folikelfas	Lutealfas	Anöstrus
Juvenil	-	$p = 0,0003$	$p = 0,0031$	$p = 0,9439$
Folikelfas	$p = 0,0003$	-	$p = 0,7781$	$p = 0,0008$
Lutealfas	$p = 0,0031$	$p = 0,7781$	-	$p = 0,0103$
Anöstrus	$P = 0,9439$	$p = 0,0008$	$p = 0,0103$	-

Tabell 7. Scheffes med hela myometriets tjocklek som beroende variabel.

Stadium	Stadium			
	Juvenil	Folikelfas	Lutealfas	Anöstrus
Juvenil	-	p=0,0002	p=0,0003	p=0,7116
Folikelfas	p=0,0002	-	p=0,9977	p=0,0024
Lutealfas	p=0,0003	p=0,9977	-	p=0,0040
Anöstrus	p=0,7116	p=0,0024	p=0,0040	-

DISKUSSION

Med utgångspunkt i de genomförda statistiska analyserna är det min uppfattning att resultatet indikerar att ljusmikroskopisk undersökning av vagina och livmoder är en användbar metod för bedömning av vilket stadium i brunstcykeln en lodjurshona befunnit sig vid dödsögonblicket.

Av parametrarna i vagina är förhornning av vaginalepitel starkt kopplat till follikelfasen. Under inverkan av östrogen förtjockas och förhornas vaginalepitelet (Setterlind 2010). I resultaten som erhållits ser vi förväntade effekter. Vaginalepitelet är som tjockast och därav också förhornat i follikelfasen (se tabell 1, 2 och 3). I min bedömning av vaginalepitelets förhornning finns tre individer med värden som kan anses avvika från det förväntade. Det är två i follikelfas som jag bedömt som ej förhornade, samt en i lutealfas som jag bedömt som förhornad. Ovarierna, som bedömts av Eva Axné, uppvisar för individerna i follikelfas folliklar men inga CL. Den individ som bedömts som lutealfas har tre färskas CL samt en liten follikel. De tre individerna sköts alla efter 20:e mars och bör således vara i en aktiv fas. Lutealfasen följer follikelfasen och förändringen i slemhinnan sker gradvis. Jag tycker därför att det är naturligt, att gränserna vid bedömning inte är skarpa. Därför kan en individ som i lutealfasen uppvisar förhornad slemhinna, forfarande ha en slemhinna som ännu inte helt lämnat follikelfasens stadium med förhornning. De två individer som befinner sig i follikelfas och ej bedöms som förhornade, misstänker jag kan bero på degraderat material och min bedömning av detta.

Jag kan tänka mig att antal cellager i vagina skulle vara en bra parameter även kopplat till lutealfas, om man kombinerar informationen med förhornning eller ej. På grund av det degenererade materialet misstänker jag att utfallet av färre cellager blivit för stort, på grund av förlust av epitelceller.

I bedömningen av körtelförekomst i endometriet, är det i lutealfasen körtlarna bedömts som mest dominerande.

När endometriets medeltjocklek i de olika stadierna jämförs med Scheffes test, skiljer sig tjockleken signifikant mellan alla stadium utom anöstrus och juvenil.

Vid jämförelse av inre och hela myometriets medeltjocklek, är samma parametrar signifikanta för både inre och hela myometriet. Medeltjockleken i juvenilfas skiljer sig signifikant jämfört med follikelfas och lutealfas. Medeltjockleken i

follikelfas skiljer sig signifikant jämfört med juvenil och anöstrus. Medeltjockleken i lutealfas skiljer sig signifikant från medeltjockleken i juvenil och i anöstrus. Medeltjockleken i anöstrus skiljer sig signifikant jämfört med i follikel- och lutealfas.

Av de parametrar som undersökts i livmodern verkar endometriets tjocklek och bedömning av körtlar i endometriet vara de som tydligast kan relateras till lodjurshonans brunstcykelstadium. Även myometriets inre muskellager och hela muskellagrets tjocklek inklusive vaskulärlagret är signifikant kopplade till brunstcykelstadium, fast inte lika starkt. En äldre individ som genomgått flera dräktigheter kan tänkas ha ett mer utvecklat och därav tjockare myometrium, samt rikligare vaskularisering av detsamma, då kärlen utvecklas under dräktigheten för att kunna förse fostren med det blod och den näring de behöver.

Som tidigare noterats har 2-åriga lodjurshonor lägre dräktighetsprocent än de äldre honorna (> 3 år), vilket också kan tänkas ha koppling till progesteronets funktion, att påverka de endometriella körtlarna så de bildar substanser som skapar en miljö i livmodern ämnad att bibehålla dräktighet. Då både östrogen och progesteron påverkar de endometriella körtlarna, kan man tänka sig att lodjuren med sina persisterande gulkroppar över flera säsonger kan få förstärkt effekt gällande körteltillväxt i follikel- och lutealfaserna under inverkan av progesteron. Det finns dock mig veterligen för tillfället inga tydliga tecken på att progesteronet har någon effekt på körtlarna i anöstrus, vilket styrks av resultaten i denna studie. Endometriet i anöstrus har nästan identisk bedömning, som endometriet i juvenilt stadium. Något ytterligare som kan tyda på att progesteron påverkar körtlarna i endometriet, är att tamkatter som fått progestagener tillfört över längre tid som preventivmedel, har fått förtjockat endometrium som bieffekt (Chatdarong 2005).

Då den enskilda individen tycks kunna ha en förhållandevis kort säsong jämfört med spannet inom arten, finner jag det möjligt att parningssäsongen i ett så avlångt land som Sverige påverkas av skillnaden i breddgrad.

Det kan finnas ytterligare värde i att studera det eurasiska lodjurets reproduktion, med tanke på hur nära besläktade det eurasiska lodjuret och panterlon tycks vara, gällande reproduktiv funktion. Det finns inte tillräckligt med individer av panterlo för att kunna göra studier av samma magnitud som man kan göra för de eurasiska lodjuren, då de är så nära utrotning idag som tidigare nämnts.

Materialet är litet, $n=40$ med ett bortfall på $n=7$ vilket i sig påverkar säkerheten i slutsatserna. Det insamlade materialet har hanterats på olika sätt från dödsögonblicket och tills det nått SLU. Min bedömning är att huvuddelen av bortfallet beror på att djurkropparna i några fall varit delvis förruttnade. I dessa fall, där jag kände osäkerhet vid klassificeringen valde jag att avstå från att klassificera dessa preparat. Den största svårigheten vid klassificeringen av de delvis ruttna proven gällde antalet cellager, eftersom de i några fall troligen förstörts och i några fall hade fått oklara gränser mellan cellagren.

Den statistiska analysen av populationen är entydig, med de begränsningar som populationens litenhet och bortfallet utgör. En annan komplicerande faktor är att det finns bakomliggande faktorer som påverkar brunstcykeln. Ett exempel på bakomliggande faktorer är det samspel mellan hormoner som ligger bakom

brunststadierna. Det är mer eller mindre givet att dessa substanser från en övergripande och bakomliggande nivå påverkar de undersökta substraten.

Erkännanden

Jag vill tacka mina handledare Ann-Sofi Bergqvist och Eva Axné för deras goda råd och konstruktiva kritik som gång på gång hjälpt mig framåt under arbetets gång. Jag vill också tacka handledare Patrice Humblot, som inte bara hjälpte mig genom att utföra de statistiska beräkningarna i SAS, utan också tog sig tid att sitta ned och förklara dem i flera timmar för mig. Slutligen vill jag tacka Annika Rikberg för de vackra snitten hon gjort, som är en viktig grundsten i mitt arbete.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Axnér, E., Payan-Carreira, R., Setterlind, P., Åsbrink, J., Söderberg, A. 2012. Evaluation of Reproductive Organs in the Swedish Eurasian Lynx. *Reproduction in domestic animals* 2012; 47 suppl 5; 75.
- Andrén, H och Liberg, O. 2006. *Lodjuret-Artfakta, Rapport till Rovdjursutredningen 2006*, Grimsö forskningsstation, SLU.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Okarma, H., Kaphegyi, T., Kaphegyi-Wallmann, U. & Müller, U.M. 2000. The Action Plan for the Conservation of the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) in Europe. Council of Europe, Bern Convention Meeting, Bern, Switzerland.
- Breitenmoser, U., Breitenmoser-Würsten, C., Capt, S., Molinari-Jobin, A., Molinari, P. & Zimmermann, F. 2007. Conservation of the lynx (*Lynx lynx*) in the Swiss Jura Mountains. *Wildlife Biology* 13:340-355.
- Carnaby, K., Painer, J., Söderberg, A., Gavier-Widèn, D., Göritz, F., Dehnhard, M., Jewgenow, K. 2012. Histological and endocrine characterisation of the annual luteal activity in the Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Reproduction* 144:477-484.
- Chatdarong, K., Rungsipat, A., Axné, E., Linde-Forsberg, C. 2005. Hystero-graphic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progestagen treatment in the domestic cat. *Theriogenology* 64:12-29.
- Dhenhard, M., Fanson, K., Frank, A., Naidenko, S. V., Vargas, A., Jewgenow, K. 2010. Comparative metabolism of gestagens and estrogens in the four Lynx species, the Eurasian (*Lynx lynx*), the Iberian (*L. pardinus*), the Canada lynx (*L. canadensis*) and the bobcat (*L. rufus*). *General and Comparative Endocrinology* 167:287-296.
- Woshner, V. M., Miller, D. L., Waldhalm, S. J., Cox, N. M., Jacobson, H. A., Leopold, B. D. 2001. Progesterone in Luteal Bodies of Bobcats. *Proc. Annu. Conf. Southeast. Assoc. Fish and Wildl. Agencies* 55:427-435.
- Fanson, K. V., Wielebnowski, N. C., Shenk, T. M., Vashon, J. H., Squires, J. R., Lucas, J. R. 2010. Patterns of ovarian and luteal activity in captive and wild Canada lynx (*Lynx canadensis*). *General and Comparative Endocrinology* 169:217-224.

- Fanson, K. V., Wielebnowski, N. C., Shenk, T. M., Lucas, T. R. 2012. Comparative patterns of adrenal activity in captive and wild Canada lynx (*Lynx canadensis*). *J Comp Physiol B* 182:157-165.
- Görütz F., Dehnhard, M., Hildebrandt, TB., Naidenko, S. V., Vargas, A., Martinez, F., Palomares, F., Lopez, J. V., Jewgenow, K. 2009. Non cat-like ovarian cycle in the Eurasian and the Iberian lynx – ultrasonographical and endocrinological analysis. *Reproduction in Domestic Animals* 44(suppl. 2):87–91.
- Hellborg, L., Walker, C. W., Knispel Rueness, E., Stacy, J. E., Kojola, I., Valdmann, H., Vila, C., Zimmermann, B., Jakobsen, K. S., and Ellegren, H. 2002. Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conservation Genetics* 3:97-111.
- Kvam, T. 1991. Reproduction in the European lynx, *Lynx lynx*. *Zeitschrift Für Säugetierkunde* 56:146–158.
- Linnell, J.D.C., Swenson, J.E., Landa, A. and Kvam, T. 1998. Methods for monitoring European large carnivores – A worldwide review of relevant experience. *NINA oppdragsmelding* 549:1-38.
- Rueness, E.K., Jorde, P.E., Hellborg, L., Stenseth, N.C., Ellegren, H. & Jakobsen, K.S. 2003. Cryptic population structure in a large, mobile mammalian predator: the Scandinavian lynx. *Mol.Ecol.*, 12:2623-2633.
- Ryser-Degiorgis MP, Hofmann-Lehmann R, Leutenegger CM, Segerstad CH, Morner T, Mattsson R, Lutz H. 2005. Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging Eurasian lynx from Sweden. *J Wildl Dis.* 41:58–66.
- Von Arx, M och Breitenmoser-Würsten, C. 2008. *Lynx Pardinus*. IUCN 2011, IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2. [online] URL: <http://www.iucnredlist.org/details/12520/1>