



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**

Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Kärlförekomst i livmodern hos tik

Thebi Claeson

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:13*

Kärlförekomst i livmodern hos tik

Distribution of blood vessels in the canine endometrium

Thebi Claeson

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

Examinator: *Bodil Ström Holst, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0754

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:13

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: *kärl, livmoder, hund*

Key words: *blood vessels, endometrium, canine*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

SAMMANFATTNING

Livmodern hos alla djurslag genomgår morfologiska förändringar inför dräktighet i syfte att säkerställa näringsförsörjning till fostret/fostren. En viktig del av denna förändring är att utveckla ett kärlnätverk som kan transportera näring och syre till fostret.

I en preliminär studie av kärlförekomst i endometriet hos hund (Parming, 2013) kunde man se att till skillnad från andra husdjur, t ex gris, har tikar i tidig dräktighet färre kärl nära ytepitelet jämfört med tikar i metöstrus.

I denna studie togs det prover på livmödrar från sex tikar i tidig dräktighet (dag 8-9 från LH-pulsen) och elva tikar i metöstrus. Hos fyra av tikarna i metöstrus togs även prover från två platser i livmodern, ena hornet samt kroppen. Hos övriga tikar togs bara ett prov från ena hornet. Förekomsten av kapillärer och postkapillära vener i två av livmoderns tre zoner jämfördes (kryptzon och intermediärzon). Kärlen delades in i tre olika kategorier; bindvävskärl (kärl i bindvävsstromat utan kontakt med ytepitel eller körtelepitel), körtelkärl (kärl som buktar in i körtelepitel) och epitelkärl (kärl som ligger i kontakt med ytepitel).

Resultaten visade att endometrium från studerade tikar i tidig dräktighet hade färre kärl i kryptzonen än tikar i metöstrus men att de istället hade signifikant fler kärl djupare ned i livmodern. Detta kan förklaras av att hundar har invasiv placentabildning. Då ytepitelet bryts ned under tidig placentabildning kan det vara av värde att inte ha ett rikt utvecklat kärlnät där utan att ha det djupare ned istället som beredskap för den kommande tillväxten av kärlbädden i en endoteliochorial placenta.

SUMMARY

In all domestic animals the uterus changes morphologically in preparation for pregnancy to ensure sufficient nutrition of the fetus/fetuses. An important part of this change is to develop the uterine vascular network.

In a preliminary study of the vascular structure in the endometrium in canines (Parming, 2013) they found that contrary to other domestic animals, e.g., the pig, canines have fewer blood vessels close to the luminal epithelium in early pregnancy compared to in metestrus.

In this study we took samples from the uterus from six bitches in early pregnancy (day 8-9 after the LH-peak) and compared them to eleven bitches in metestrus. From four of the bitches in metestrus we also took samples from two parts of the uterus, from one of the horns and the body. From the rest of the bitches only one sample from one of the horns was studied. The number of capillaries and post capillary veins were counted and compared between the groups. Differentiations between types of capillaries were made: vessels in the extracellular matrix, vessels in close contact with endometrial glands and vessels in close contact with luminal epithelium. The blood vessels in two layers of the endometrium (crypt zone and intermediary zone) were also compared.

It was found that the bitches studied had fewer blood vessels in the crypt zone but significantly higher numbers deeper down in the endometrium. This can be explained by their type of placentation. Dogs have an invasive type of placenta which makes it logical to avoid the risk of bleeding associated with a rich blood supply in the part of the endometrium that will be degenerated. A more developed capillary bed deeper down in the endometrium in preparation for the future growth of blood vessels in the endotheliochorial placenta would therefore be of value.

INNEHÅLL

Inledning	1
Litteraturoversikt	1
Löpcykeln hos hund.....	1
Vaginalutstryk.....	2
Förändringar i endometriet under löpcykeln och tidig dräktighet	3
Kärl i livmodern.....	4
Immunohistokemi	5
Material och metoder.....	7
Livmodervävnad	7
Histologi.....	9
Immunohistokemi	10
Statistik.....	10
Resultat	12
Diskussion	13
Referenser.....	16

INLEDNING

Inför placentabildning och under dräktighet genomgår livmodern morfologiska förändringar, av olika karaktär beroende på art, för att säkerställa näringsförsörjning av fostret/fostren.

I en preliminär studie av kärlförekomst i endometriet hos hund (Parming, 2013) visades färre kärl nära ytepitelet i tidig dräktighet jämfört med i metöstrus hos icke dräktiga tikar. Detta skulle kunna bero på ökad blödningsrisk vid implantation hos karnivorer eftersom epitelet bryts ned under placentabildningen. Hos andra husdjur, t.ex. gris (Kaeoket *et al.*, 2003), har man istället kunnat se att vaskulariseringen ökar nära ytepitelet i tidig dräktighet.

Syftet med denna studie var att verifiera tidigare resultat genom en mer omfattande studie av kärlförekomst i endometriet hos hund samt att särskilja olika käriltyper och i vilka zoner av endometriet de befinner sig.

LITTERATURÖVERSIKT

Löpcykeln hos hund

Tikar är monoöstrala, icke säsonsberoende och spontanovulerande djur. Speciellt med tikar är att de har en spontan lutealfas som är lika lång eller lite längre än dräktighet (Concannon, 2011). Såväl lutealfasen som dräktighet följs av en anöstral period på i genomsnitt fem månadermen kan variera mellan 3-10 månader.

Proöstrus varierar mellan 5 och 20 dagar. Perioden karaktäriseras av en blodblandad serös flytning från vulva. Fysiologin bakom blodflytningarna är inte helt klarlagd men enligt en studie föreslås det att blodet kommer från försvagade venulae i endometriet (Walter *et al.*, 2011). Proöstrus sägs börja när yttre tecken på svullen vulva kan ses tillsammans med blodflytningarna (Concannon, 2011). Tiken är i början av proöstrus negativ till uppvaktning från hanar men allteftersom tiken närmar sig östrus blir hon mer välvilligt inställd till dem. Under proöstrus ökar nivåerna av serumöstrogeron från 5-15 pg/ml till 40-120 pg/ml. Proöstrus slutar med en preovulatorisk LH-puls.

Östrus inträffar när tiken accepterar parning. Östrus varierar i tid från 5 till 10 dagar men är vanligen nio dagar. Serumöstrogeron minskar från de höga värdena under proöstrus till nivåer kring 10-20 pg/ml. Serumprogesteron ökar snabbt efter LH-pulsen till 1-3 ng/ml och ökar sedan ytterligare till nivåer kring 10-25 ng/ml runt dag 10 efter LH-pulsen. LH-pulsen får follikeln att mogna och ägglossning sker normalt ca 2 dagar därefter (Concannon *et al.*, 1989). Luteiniseringen av follikeln påbörjas redan innan ägglossning sker. Vid ägglossningen är oocyterna inte helt mogna än utan genomgår mognad i äggledarna och blir inte befruktningssugliga förrän ca 2-3 dagar efter ägglossning varför befruktning av oocyterna inte kan ske förrän ca 4-5 dagar efter LH-pulsen. Obefruktade oocyter bryts ned ca dag 7-8 efter LH-pulsen.

Om oocyterna blir befruktade genomgår de sina första celldelningar i äggledarna innan de passerar ut i hornen av livmodern vid dag 10. Under de närmaste dagarna är embryona fria i

hornen. Vid dag 16 försvinner zona pellucida och det bildas jämnt fördelade implantationsplatser i livmodern där embryona fäster.

Metöstrus är hundens lutealfas (Concannon, 2011). Perioden kallas synonymt för diestrus av vissa författare. Metöstrus börjar när östrusbeteendet avtar kliniskt. Morfologiskt anses perioden börja när man kan se typiska celler i vaginalutstryk. Serumprogesteronnivåerna under metöstrus ökar till 15-80 ng/ml fram till dag 20-35 i cykeln för att sedan börja sjunka. Serumöstrogennivåerna varierar kring 15-30 pg/ml. I mitt-metöstrus börjar även den nivån sjunka. Metöstrus varar tills serumprogesteronnivåerna sjunker till under 1-2 ng/ml.

Anöstrus är perioden mellan löpcyklerna när vävnaderna återhämtar sig. Serumöstrogennivåerna är låga på 5-10 pg/ml. Basala LH-nivåer är låga, under 1-2 ng/ml, men ökar kraftigt i sporadiska pulser på 3-30 ng/ml. FSH ligger generellt högt, 50-400 ng/ml, men kan öka till strax över den förhöjda basnivån i korrelation till LH-pulserna. De förhöjda koncentrationerna av FSH är inte alltid tillräckligt stora för att vara tydliga utan kan tolkas som normalvariation.

Vaginalutstryk

Vaginalutstryk kan användas för att se var i löpcykeln tiken befinner sig för att optimera parningen eller för att hjälpa till att diagnostisera vissa sjukdomar (Wright, 1989).

De olika celltyperna man kan se i vaginalutstryk är:

- Parabasalceller - små, runda till ovala celler med stor vesikulär cellkärna.
- Små intermediärceller - större celler än parabasalcellerna. Vesikulär cellkärna, har oftast rundade cellkanter.
- Intermediära superficialceller - ytterligare lite större celler än små intermediärceller med liknande cellkärna. Är polygonala i sin form.
- Superficialceller - stora, polygonala, kantiga celler med vikta kanter. Ingen eller pyknotisk cellkärna.
- Metöstrusceller - parabasalceller med en neutrofil i cytoplasman, ses endast under metöstrus.
- Skumceller - parabasalceller med fettvakuoler, ses vanligtvis sent under metöstrus och ibland i anöstrus.

I proöstrus ses tidigt parabasal- och små intermediärceller. I takt med att tiken närmar sig östrus blir de dominerade cellerna alltmer intermediära superficialceller. En del erythrocyter kan ses i utstryken. I tidig proöstrus kan även en del neutrofiler ses. I takt med att epitelet blir tjockare blir det färre neutrofiler.

I östrus domineras bilden av superficialceller och enstaka superficiala intermediärceller. Vissa tikar kan även ha en del erythrocyter i sina utstryk under östrus.

I metöstrus blir cellbilden snabbt förändrad till att domineras av små intermediärceller och parabasalceller samt neutrofiler. Metöstrusceller och skumceller kan ses.

Anöstrus är generellt en cellfattig period, det finns enstaka parabasalceller. Normalt finns det inte mycket leukocyter.

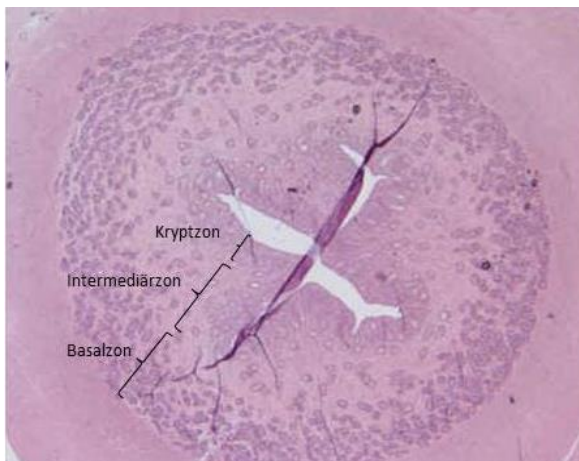
Celler samlas genom införande av en tops i vagina som rullas mot slemhinnan. Topsen rullas sedan över ett objektglas för färgning. Det är viktigt att provet tas från vagina och inte vestibulum vilket kan ge felaktiga resultat.

Förändringar i endometriet under löpcykeln och tidig dräktighet

Livmodern är i uppbyggd i tre lager, varav perimetrium är utsidan mot övriga bukorgan. Myometrium är mellanlagret som består av två lager av glatta muskelceller. Det yttre lagret har longitudinell riktning och är tunnare än det inre lagret som har en transversell riktning. Mellan muskellagren finns *stratum vasculare* som är rikligt innerverat och kärlrikt. In mot lumen finns endometriet som består av epitel, basallamina och bindvävsstroma. Epitelet är enkelt kubiskt till cylindriskt. Körtlar förgrenar sig ner i bindväven.

Hos hund kan körtellagret i endometriet delas in i tre olika zoner; krypt- intermediär- och basalzon (Barrau *et al.*, 1975a) (Se figur 1).

Kryptzonen består av små/korta körtlar som tömmer sig ut i lumen. Ett fåtal körtlar sträcker sig in i intermediärzonen som till största delen består av ett bindvävsstroma. De körtlar som ses i intermediärzonen går ned i basalzonen där de anastomoserar med andra körtlar, blir vindlande och slutar. Nere i basalzonen är det rikligt med körtlar.



Figur 1. Översikt av de olika zonerna i livmodern.

I anöstrus ligger endometriet i vila. Epitelet i körtlarna är enkelt kubiskt eller lågt cylindriskt. Debris kan ses i körtellumen. Muskellagret är tunt (Mulligan, 1942).

Under proöstrus blir interstitiet tydligt ödematöst och det blir hyperemi i stromat. Fokala ansamlingar av extravasala erythrocyter ses särskilt nära lumen. I körtlarna finns det högt cylindriskt epitel (Mulligan, 1942). Cellerna i körtlarna genomgår även hyperplasi och markerad hypertrofi och börjar producera sekret som kan ses i lumen i början av östrus (Barrau *et al.*, 1975a).

Under östrus ökar basalzonen i tjocklek genom proliferation (Mulligan 1942). Körtelepitelet visar på ökad mitosaktivitet, pseudostratifiering och ökar i höjd. Stromat blir mindre ödematöst och får mer matrix. Även epitelet prolifererar (Barrau *et al.*, 1975a). Den snabba tillväxten av körtelepitelet fortsätter några dagar in i östrus för att sedan avta i hastighet. Mikrovilli utvecklas på ytepitelet, speciellt i kryptorna.

Endometriet hos icke-dräktiga tikar når sin maximala tillväxt i början av metöstrus (Barrau *et al.*, 1975a). Den största tillväxten under metöstrus sker i basalkörtlarna vilka blir mycket

vindlande och förgrenade. Efter första veckan in i metöstrus avstannar tillväxten av endometriet. Efter ca 2 veckor av metöstrus kan man se regression av endometriet hos icke-dräktiga tikan. Denna regression fortgår långsamt tills anöstrus börjar. I slutet av metöstrus bildas så kallade skumceller i epitelet som innehåller fettvakuoler (Mulligan, 1942). Dessa celler stöts sedan bort och ersätts med nytt epitel.

Om tiken blir dräktig kan man makroskopiskt se implantationsplatserna i livmoderhornen som ansvallningar dag 10 efter östrus slut, beräknat på dag 0 som första dagen då tiken inte längre tillåter parning (Barrau *et al.*, 1975b). Dessa svullnader beror på ödembildning samt uträtning av körtlarna snarare än verklig tillväxt.

Vid dag 12 kan man se tillväxt av kryptorna samt bildning av så kallade lacuner, vilket är vidgning av kryptorna.

Invasion av endometriet börjar vid dag 13. Syncytiotrofoblasterna från fosterhinnorna uppstår på ytan av cytotrofoblasterna mot livmoderväggen. Dessa celler växer sedan gradvis ned mellan de maternella epitelcellerna. Till slut omges de maternella epitelcellerna av embryonala celler och lossar från basalmembranet. Trofoblasterna tar sig då igenom basalmembranet och växer ned till kapillärbädden där de bildar en nära kontakt med kärlen. Trofoblasterna fortsätter att sprida sig och syncytiet växer in bland de maternella körtlarna där de går emellan epitelcellerna och separerar dem från sin blodförsörjning.

Vid dag 16 har implantationsplatsen expanderat och sträcker sig längs hela livmoderns omkrets förutom precis under embryots ventrala sida. I kryptozonen kan fokala områden av nekros ses framför de invaderande trofoblasterna. Kryptorna vid implantationsplatserna blir långa och vridna samt tätt packade. Lacunerna i kryptbaserna blir stora med endast ett tunt lager bindväv som separerar de olika lacunerna. I basalzonen blir körtlarna svullna och dilaterade. I körtlarna i basalzonen mellan implantationsplatserna ses inga förändringar.

Vid dag 18 har zonerna med nekros ökat markant och dessa utlinjeras av trofoblasterna.

Vid dag 26 har trofoblasterna nått sitt maxdjup i endometriet. Kryptorna vid lacunernas öppning har då eroderat bort och syncytiet har expanderat till att omge de maternella kärlen i hela placentazonen.

Kärl i livmodern

Kärlsystemet består av artärer, vener och kapillärer. Kärlväggen hos artärer och vener består av tre lager; *tunica intima*, *media* och *adventitia*.

Intiman består av endotelcellerna samt basallamina och är lokaliserad närmast lumen. *Tunica media* består av glatta muskelceller och *adventitia* är uppbyggd av bindväv med elastiska egenskaper.

Tjockleken på muskelskiktet och *adventitia* beror på storlek på kärlet, var i kroppen det sitter samt om det är en ven eller en artär. Vener har normalt tunna muskel- och bindvävslager.

Kapillärer och postkapillära vener är endast uppbyggda av endotelceller, basalmembran och pericyter.

Endotelceller är oftast polygonala, tunna celler som är utdragna i blodets riktning. Cellkärnan skapar en utbuktning av cellen uti lumen av kärlet. Pericyter återfinns på flertalet ställen längs kapillärer och postkapillära vener. De har cytoplasmiska förgreningar som omger endotelcellerna. Pericyterna har även sitt eget basalmembran. Pericyterna är en heterogen grupp av celler med flertalet olika funktioner men de har även en viktig roll i angiogenesen (Birbrair *et al.*, 2014).

Parming (2013) kunde se skillnad i antalet kärl hos tidigt dräktiga i dag 8-9 samt hos tikar i metöstrus. Studien visade att endometriet från dräktiga tikar innehöll färre antal kärl i kryptzonen samt totalt i hela livmodern jämfört med tikar i metöstrus. Slutsatsen var att hos hundar kan det vara en nackdel att ha omfattande vaskularisering under ytepitelet i tidig dräktighet då deras placentabildning är invasiv och det då föreligger risk för blödningar.

Angiogenes är nytillväxt av kärl från existerande kärl hos vuxna individer (Clemente *et al.*, 2009). Detta sker normalt i kroppen vid sårsläkning samt vid tumörtillväxt (McGavin och Zachary 2007). Angiogenes sker genom tillväxt från ett existerande kärl eller genom delning av kärl (Saaristo *et al.*, 2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) har bevisats ha stor betydelse för angiogenes. Den tillväxsfaktorn finns i ett flertal isofomer och aktiveras av hypoxi i vävnaden. Det har även visats på människa att vissa typer av VEGF uppregleras av östrogener. Speciellt för honor är att normal angiogenes sker i livmodern under sexualcykeln vilket visats för tik av Sağsöz *et al.*, 2013. Hos hund finns VEGF uttryckt i livmoderns alla vävnader även om koncentrationerna och typen av receptorer i de olika vävnaderna varierar med cykelstadium. Även dräktiga livmödrar uttrycker höga nivåer av VEGF (Bukowska *et al.*, 2011).

Immunohistokemi

Immunohistokemi är en specialfärgning av histologiska preparat för att kunna se specifika antigen (Naish *et al.*, 1989). Metoden fungerar genom att man har en antikropp mot det önskade antigenet, oftast taget från mus eller kanin. Det finns flera metoder för färgning:

- Direkt metod är att antikroppen är länkad till ett enzym som sedan reagerar med en kromogen buffert och färgas. Det kräver endast en antikropp och kan därför utföras snabbt. Det ger dock svagare färgning av preparatet.
- Tvåstegsfärgning är när man först tillsätter en antikropp mot det sökta antigenet och sedan tillsätts ytterligare en antikropp som fäster till den första antikroppen, denna försedd med ett enzym som reagerar med den kromogena bufferten och färgas. Denna metod är känsligare än den direkta då den sekundära antikroppen kan fästa på flera platser på den första antikroppen och på så vis ge ett starkare resultat. Den är dock mindre specifik då den sekundära antikroppen kan korsreagera med endogena immunoglobuliner i preparatet. Detta kan motverkas genom att använda preabsorberande antiserum.

- Trestegsfärgning är när man tillsätter ytterligare en enzymkonjugerad antikropp till tvåstegsmetoden. Den tredje antikroppen är riktad mot den andra antikroppen men de ska vara konjugerade till samma enzym. Detta ger en mer intensiv färgning av preparatet.
- Lösligt enzym-immun-komplexmetoden är att man färgar med färdiga komplex av enzym och antikroppar. Man tillsätter sedan en sekundär antikropp som riktar sig mot antikropparna i immunkomplexet. Det finns flera olika immunkomplex, det vanligaste är dock PAP, peroxidase-antiperoxidasekomplexet.

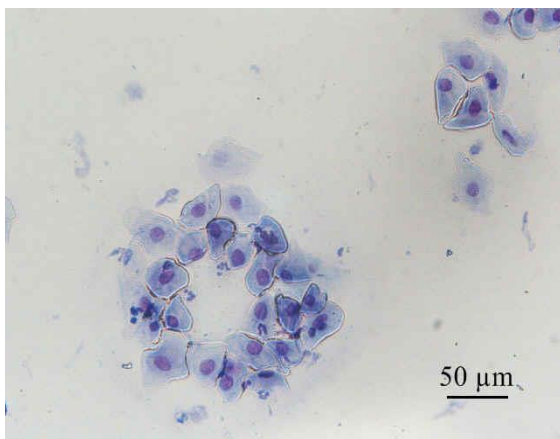
Endotelceller uttrycker ett flertal cellspecifika markörer som man kan färga i histologiska preparat (Sleeckx *et al.*, 2013). De flesta markörer är utprovade på människa men man har visat att von Willebrand-faktor (vWf) och ytantigenet CD31 även funkar på snitt från hund. Resultaten visade att CD31 var en bättre markör än vWf för endotelceller. För att kunna se tecken på angiogenes vill man se vilka celler som ligger i proliferationsfas vilket kan demonstreras med t ex Ki-67 (Neuman och Kaup, 2005). Det är ett endogent antigen som uttrycks i alla stadier av cellcykeln förutom vid G₀.

MATERIAL OCH METODER

Livmodervävnad

Livmodervävnaden samlades in under normal kastrering av friska tikar i olika cykelstadium och tidig dräktighet, dels i Portugal vid veterinärhögskolan i Vila Real under åren 2005-2012, dels i Thailand under 2012.

Livmödrarna från Portugal insamlades av Rita Payan-Carreira, PhD, DVM, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias. Cykelstadium fastställdes genom progesteronprov, vaginalcytologi enligt Schutte (1967) samt en morfologisk inspektion av äggstockarna, makroskopisk och mikroskopisk enligt Anderson och Simpson (1973). Dräktighet konfirmerades genom påvisande av tidiga embryon i äggledarna. Antalet dräktighetsdagar baserades på LH-toppen uträknat från progesteronprover. Alla analyser utfördes av Rita Payan-Carreira med medarbetare.



Figur 2. Vaginalcytologi hos tik vid metöstrus. Rikligt med celler ses varav flera neutrofiler samt metöstrusceller.

Livmödrarna från Thailand samlades in av veterinärer vid veterinärhögskolan i Khon Kaen samt av svenska veterinärstudenter på veterinärhögskolor i Bangkok (Chulalongkorn), Khon Kaen och Mahidol. Ålder, ras och eventuell tidigare behandling, dräktigheter samt sjukdomar fastställdes genom anamnes från djurägaren. Cykelstadium bestämdes genom vaginalcytologi enligt Wright (1989) (se Figur 2), samt makroskopisk morfologisk inspektion av äggstockarna för närvaro av gulkropp. Makroskopisk inspektion skedde på formalinfixerat material. Cykelstadium bestämdes av Thebi Claeson.

Från Portugal valdes sex tikar dräktiga i dag 8-9 samt fem tikar i tidig metöstrus. Hänsyn till ålder samt ras togs vid urvalet för att få en så homogen grupp som möjligt.

Från Thailand valdes elva tikar ut i metöstrusstadiet. Urvalet baserades på ålder samt anamnestiskt avsaknad av tidigare dräktighet då det ej gick att få ett tillräckligt stort urval från en ras. Från fem av tikarna togs det prover från två ställen i livmodern för jämförelse (ena hornet samt kroppen). Från övriga tikar togs endast ett prov från ena hornet för undersökning. Vid mikroskopisk undersökning visade det sig att två av tikarna hade patologiska förändringar i livmodern och två av dem hade excessivt med extravasala erythrocyter i bindväven varför det blev omöjligt att räkna blodkärl. Dessa tikar exkluderades ur studien. En av tikarna från vilken det togs prover från två ställen i livmodern var i sen metöstrus. Den togs bort ur beräkningarna eftersom resultaten ej var jämförbara med tidig dräktighet (se Tabell 1).

Tabell 1. Tabell över hundar i studien. I kommentarsfältet anges orsak för dem som exkluderades, hundar utan kommentar ingick i studien

Grupp	Ras	Ålder	Vikt	Kommentar
Metöstrus Thailand				
	Blandras	1 år	16,4 kg	Patologisk
	Bangkaew	8 mån	12,2 kg	Patologisk
	Blandras	1 år	18,4 kg	
	Blandras	1,5 år	8,2 kg	Extravasalt blod
	Blandras	8 mån-1 år	13 kg	
	Bangkaew	1,5 år	14 kg	Extravasalt blod
Metöstrus Thailand prover tagna på flera platser i livmodern				
	Blandras	1 år	16 kg	
	Blandras	1 år	15 kg	
	Tax	2 år	16,6 kg	
	Blandras	1 år	14,6 kg	
	Pudel	1 år	4 kg	Sen metöstrus
Metöstrus Portugal				
	SRD	18 mån		Extravasalt blod
	SRD	2 år		
	Labrador	8 mån		
	SRD	16 mån		
	SRD	18 mån		
Dräktiga dag 8-9 Portugal				
	Labrador	1 år		
	Labradormix	8 mån		
	Labrador	11 mån		
	Labrador	14 mån		
	Labrador	9 mån		
	Labrador	9 mån		

Histologi

Vävnadsmaterial från livmödrarna eller hela livmodern fixerades och förvarades i 4 % buffrad formalin direkt efter operation. Tvärsnitt eller bitar av livmödrarna plockades ut och sköljdes i fosfatbuffert. Proverna dehydrerades i ökande koncentrationer av etanol innan de bäddades i vattenlösligt resin och snittades i 2 µm tunna snitt och färgades med haematoxylin-eosin.

Mikroskopering skedde med ett Nikon Microphot FXA mikroskop i x20 förstoring (Bergström Instrument AB, Stockholm, Sverige). Inventering gjordes av endometriets kapillärer och postkapillära vener avseende:

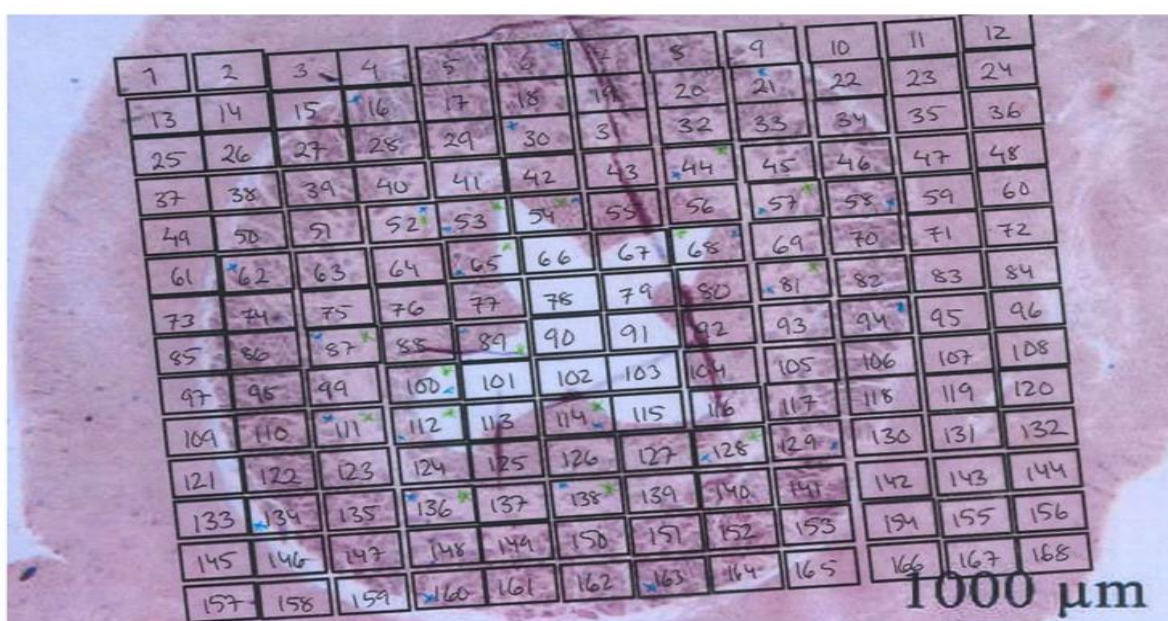
Bindvävskärl: Kärl som ligger fritt i bindväven (BK)

Körtelkärl: Kärl som ligger i anslutning till körtelepitel (KK)

Epitelkärl: Kärl som ligger i direkt anslutning till lumenepitel (EK)

Den mikroskopiska bedömningen gjordes blindad genom kodade glas. Alla bedömningar och mätningar gjordes av samma person (Thebi Claeson). Alla mätningar gjordes i programmet Eclipse Net, version 1.20, Developed by Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic.

Översiktsbilder av alla preparat togs i x1 förstoring. På dessa lades sedan ett numrerat rutmönster. Varje ruta representerade ett synfält i x20 förstoring (se Figur 3). 8-10 synfält valdes ut från kryptzonen respektive intermediärzonen i livmodern. Försök gjordes att fördela synfälten jämnt över preparatet för att få en så korrekt tolkning som möjligt. Stora artefakter undveks. Körtelarea räknades bort, endast bindvävsarean räknades (se Figur 4). Även den tomma arean i lumen vid kryptzonen räknades bort. Genomsnittlig area per synfält var 0,12 mm² i intermediärzonen och 0,076 mm² i kryptzonen.

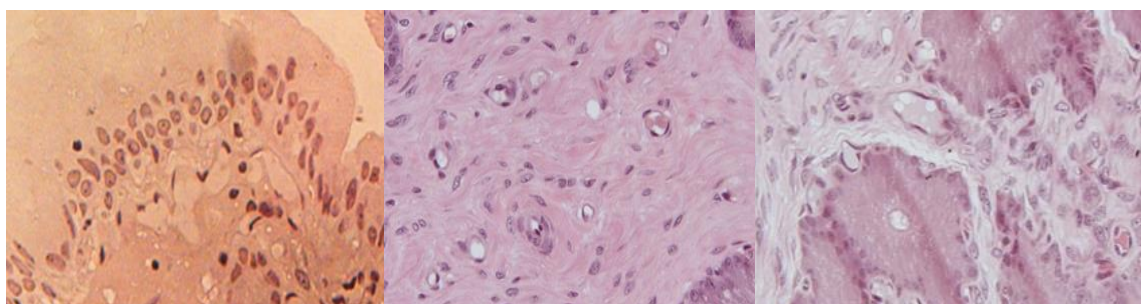


Figur 3. Översiktsbild av hundlivmoder i tvärsnitt med det rutmönster som användes för markering av beräkningsrutor.



Kärlen delades upp i tre kategorier; kärl som låg fritt i bindväven, kärl som låg inbuktande i körtelepitelet samt kärl som låg i direkt anslutning till lumenepitelet (se Figur 5). För att räknas som kärl behövdes det tydligt synas en endotelkärna eller röda blodkroppar i lumen. Medelvärden av totalantalet kärl per snitt och zon användes sedan i statistiska beräkningar.

Figur 4. Exempel på hur körtelarean samt lumenarean räknades bort från bindvävsarean.



Figur 5. Exempel på olika typer av kärl från vänster till höger: epitelnära kärl, bindvävskärl och körtelkärl.

Immunohistokemi

På endometrium från de fem tikar från Thailand där prov togs från två ställen i livmodern gjordes det även immunohistokemi avseende kärlendotel och en proliferationsmarkör. Alla prover korttidsfixerades i 4% formalin innan de bäddades i paraffin. Blocken snittades sedan i 4 μm tjocka snitt. De antigen som valdes ut var CD31 (Dako M082301-2) för kärlendotel och Ki67 (Dako M724029-2) som proliferationsmarkör. Färgning utfördes enligt protokoll från Sleenckx *et al.* (2013) för CD31 men med användning av Vectastains ABC-kit (PK6102) för vissa steg (se Tabell 2). För Ki67 användes standardprotokoll. Som negativ kontroll användes Mus IgG (Santa-Cruz sc-2025) för båda färgningarna. Spädningar, behandling av sekundärantikropp och neutraliserande serum gjordes enligt tillverkarens rekommendationer.

Statistik

Statistiska beräkningar gjordes i Minitab 16 för Windows. Tvåstickprovs t-test gjordes för att se skillnad mellan kärlförekomst hos dräktiga/ej dräktiga samt skillnader i kärlförekomst i de olika zonerna i livmodern. Parat T-test utfördes på skillnaden mellan antalet kärl i olika lokaliseringar i livmodern. Medelvärde och standardfel (SD) beräknades. Normalvariationen bestämdes genom normalfördelningstest, alla värden bedömdes ligga inom normalvariation. Signifikansnivån bestämdes som $P < 0,05$.

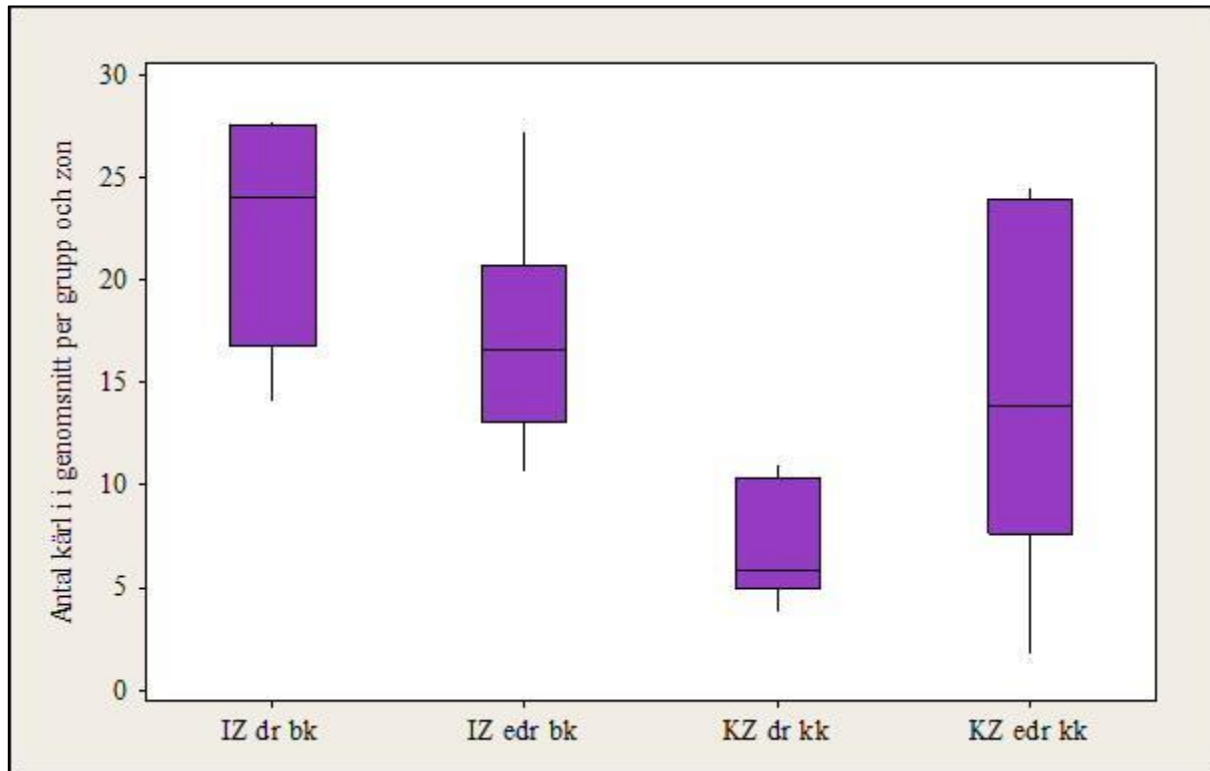
Tabell 2. *Protokoll över immunohistokemin. Mellan alla steg sköljdes proverna i PBS-buffert pH 7,4 eller milliporvatten. Spädningar av de olika reagenterna gjordes med PBS-buffert pH 7,4*

Moment	CD 31	Ki67
Förberedning	Torkats i värmeskåp 60° C i 60 min Dehydrerats i xylén och nedtrappade koncentrationer av etanol Tryckkokning i Vectastain unmasking solution (H-3301) pH 9 i 60 min	Torkats i värmeskåp över natten i 37° C Dehydrerats i xylén och nedtrappade koncentrationer av etanol Tryckkokning i citratbuffert pH 6 i 60 min
Neutralisering peroxidas och AK	3% väteperoxid i metanol i 10 min Normalserum horse Vectastain PK 6102 elite RT 30 min sp 67,7x	3% väteperoxid i metanol i 10 min Normalserum horse Vectastain PK 6102 elite RT 30 min sp 67,7x
Primär AK	Mus-anti CD 31 Dako sp 20x över natt 4°C	Mus-anti Ki67 MM1 sp 250x 60 min 37° C
Sekundär AK	Horse anti-mouse biotylinerad Vectastain PK 6102 elite sp 200x RT 30 min	Horse anti-mouse biotylinerad Vectastain PK 6102 elite sp 200x RT 30 min
Enzymkomplex	Vectastain PK 6102 elite sp 50x RT 30 min	Vectastain PK 6102 elite sp 50x RT 30 min
Framkallning	DAB (Saveen Biotech) i PBS pH 7,4 8 min	DAB (Saveen Biotech) i PBS pH 7,4 8 min (hälften av preparaten i samma batch som CD31 och andra hälften i en annan batch)
Färgning	Hematoxylin 15 s	Hematoxylin 10 s

RESULTAT

Signifikant fler bindvävskäril kunde ses i intermediärzonen jämfört med i kryptzonen både hos de dräktiga ($p=0,001$) och de ej dräktiga ($p=0,02$) tikarna.

Det fanns signifikant ($p=0,023$) fler bindvävskäril i intermediärzonen, men färre körteikäril i kryptzonen ($p=0,004$) hos de dräktiga än de ej dräktiga tikarna (se Figur 6).



Figur 6. Diagram över antalet bindvävskäril (BK) och körteikäril (KK) i genomsnitt per grupp (dräktiga/Dr, ej dräktiga/Edr) och zon (IZ= intermediärzon, KZ= kryptzon)

Ingen signifikant skillnad kunde påvisas mellan antalet körteikäril i intermediärzonen och kryptzonen eller antalet epitelnära käril hos dräktiga jämfört med ej dräktiga tikar. Ingen skillnad kunde ses mellan antalet käril i livmoderkroppen jämfört med antalet käril i livmoderhornen.

Resultatet från immunohistokemin var negativt för både Ki67 och CD31 vilket var oväntat eftersom antikropparna visat sig fungera för hundvävnad enligt Sleenckx *et al.*, (2013). På grund av tidsbrist kunde inte orsaken utredas inom ramen för det här arbetet.

DISKUSSION

Resultaten i denna studie bekräftar den tidigare studie (Parming, 2013) som visat att det fanns färre kärl i kryptzonen hos tidigt dräktiga tikar jämfört med tikar i metöstrus. Dock kan man se att de dräktiga istället har ökad vaskularisering i intermediärzonen jämfört med tikar i metöstrus. Detta stöder teorin att hundar på grund av sin invasiva placentabildning skulle ha färre kärl i kryptzonen som ska degenereras men att de har fler kärl i intermediärzonen i beredskap för att näringsförsörja fostret. Schäfer-Somi (2012) har gjort studier på dräktighetsmarkörer hos hund och funnit att tikar dräktiga i pre-implantationsfas uttrycker signifikant högre nivåer av VEGF (vascular endothelial growth factor) än icke-dräktiga tikar och tikar i andra dräktighetsstadier. Man fann även att fostret uttrycker ett flertal cytokiner, bland annat metallomatrixproteinaser vilka har som funktion att de bryter ned bindväv. Det tyder på att de utsöndrar enzymer som faciliterar trofoblasternas invasion av endometriet.

Hos de flesta husdjur har man identifierat cytokiner som fostren utsöndrar för att förhindra luteolys och på så sätt upprätthålla dräktigheten, s.k. maternal recognition of pregnancy (MRP). Hos hund har man än så länge inte kunnat identifiera en sådan signal (Verstegen-Onclin och Verstegen, 2008). Dock borde den finnas då det finns olikheter i livmodern under pre-implantation jämfört med i metöstrus. Det skiljer inte bara i distributionen av kärl utan det bildas även ansvällningar i endometriet på implantationsplatserna redan innan implantation sker (Barrau *et al.*, 1975b).

I föreliggande studie kunde man även se att det fanns fler körtelkärl i kryptzonen hos de ej dräktiga jämfört med de dräktiga tikarna. Det kan vara en effekt av att det generellt finns fler kärl totalt i denna zon hos de ej dräktiga än hos de dräktiga. Det kan även vara en effekt av det inte bildas några ansvällningar hos tikar i metöstrus varför det blir tätare mellan kärlen hos de ej dräktiga. Dock var det väldigt stor spridning på antalet körtelkärl i denna grupp varför det eventuellt kan bero på biologisk variation.

I Parmings studie (2013) räknades det totala antalet kärl hos sex dräktiga tikar dag 8-9 efter LH-pulsen samt 14 tikar i metöstrus. Ingen differentiering avseende typen av kärl gjordes. Tre synfält i x40 förstoring räknades per individ, fördelade på de tre olika lagren i livmodern vilket ger en total area per individ på 0,12 mm². I föreliggande studie delades kärnen in i tre olika kategorier och endometriet i olika zoner. Man kunde då se att den största skillnaden fanns avseende kärnen i bindväven. En mycket större area räknades också, i genomsnitt 1,2 mm² per individ i intermediärzonen och 0,68 mm² per individ i körtelzonen, vilket ger större säkerhet i beräkningarna. Dock ingick färre antal hundar i denna studie.

Generellt sågs en större standardvariation hos hundarna i metöstrus vilket skulle kunna förklaras av att det fanns större heterogenitet i den gruppen. De livmödrar som erhöles från Portugal var alla i samma cykelstadium men de från Thailand befann sig troligen i ett större spektrum av metöstrus tidsmässigt. Det fanns ingen tillgång till progesteronprover från hundarna från Thailand varför det inte kunde göras mer specifika bedömningar än vaginalcytologi samt kontroll av närvaro av gulkropp. Att observatören var ovan är även det en felkälla.

Flera hundar från Thailand exkluderades ur studien pga. extravasalt blod i bindväven i kryptzonen vilket omöjliggjorde identifiering av kärl. Varför dessa preparat var så blodiga finns det ingen klar förklaring till. En teori var att livmodermaterialet samlats nära äggstocken och att blodet är en rest av stas under kastreringen. Denna teori motbevisas dock av att det fanns preparat som var märkta att de tagits från ett område nära äggledaren och de hade inte samma utseende. Det skulle även kunna vara en rest efter proöstrus, då tikar blöder olika mycket och det kan variera hur snabbt makrofagerna kan hantera upprensningen av vävnaden. Det kan även vara så att dessa hundar befann sig i fel cykelstadium och blivit felidentifierade av observatören. Proöstrus och metöstrus är lika varandra vaginalcytologiskt. Dock är gulkroppar tydligt olika folliklar vid makroskopisk bedömning så det borde inte ha blivit fel.

Det gjordes under denna studie immunohistokemiska färgningar av endotelceller samt proliferationsmarkörer för att tydligare se om man har missat att räkna vissa kärl och se var den största angiogenesen äger rum. Tanken bakom detta var att hitta en pålitlig metod för att kvantifiera antalet kärl i livmodern. En förhoppning var att det skulle bli möjligt att se kärl i de preparat som var för blodiga att utvärdera i HE-färgning. Proliferationsmarkören inkluderades för att undersöka om det stämde med teorin att angiogenesen var olika i de olika zonerna i livmodern.

Tyvärr visade de båda immunohistokemiska färgningarna negativa resultat. CD31 gjordes enligt ett omarbetat protokoll från Sleenckx *et al.* (2013). Skillnaderna var hur antigenet hämtades genom värmning och man använde sig av ett annat fabrikat på sekundäantikropp och enzymkomplex. Annars följdes alla steg. För att utesluta att det skulle vara något fel på framkallningsvätskan valde vi att på Ki67-färgningen använda framkallningsvätska från två olika batchnummer. Hälften av preparaten framkallades med samma batchnummer som CD31 och resten med en annan batch. Båda framkallningarna blev negativa. Då framkallningen var det enda förutom sekundäantikropparna och enzymkomplexet som de båda protokollen hade gemensamt är det troligt att felet ligger i sekundäantikroppen. Tyvärr fanns inte tid att testa denna teori genom att göra nya färgningar. Det bör göras innan man går vidare och gör om protokollen.

Att felet skulle ligga hos primäantikroppen kan inte uteslutas men Ki67 används ofta i olika tumörklassificeringar och är väl testat på hund. Även CD31 har framgångsrikt använts på hundvävnad. Dock användes ett annat fabrikat på sekundäantikropp i studien av Sleenckx *et al.* (2013) men detta borde inte påverka resultatet.

Kärlen i basalzonen räknades inte då det inte fanns tid till det och det bedömdes okulärt att det fanns avsevärt färre kärl i denna zon jämfört med de två andra på grund av tätt med körtelvävnad. Inga beräkningar är gjorda för att bekräfta detta. Det kan dock vara intressant att göra fler studier och jämföra alla lager av livmodern.

För att testa teorin att hundar pga. av sin invasiva placentabildning har färre kärl i kryptzonen kan det vara en idé att jämföra med katter i tidig dräktighet då de har liknande placentabildning och bör uppvisa samma mönster. Man har visat att katt har likande mönster i vävnadsförändringarna vid implantation som hund (Leiser och Koob, 1993).

Sammanfattningsvis har föreliggande studie visat att det förekommer fler kärl i bindväven i intermediärzonen och färre körtelkärl i kryptzonen hos tidigt dräktiga tikar jämfört med hos tikar i metöstrus. Detta stödjer teorin att kärltillväxten hos tik börjar djupare i endometriet inför placentabildning för att undvika risk för blödningar när fosterhinnorna börjar invadera och bryta ned kryptzonen.

REFERENSER

- Barrau, M.D., Abel, J.H., Verhage, H.G. & Tietz, W.J. Jr (1975a) Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch *American Journal of Anatomy* vol. 142 ss. 47-65
- Barrau, M.D., Abel, J. H. Jr, Torbit, C.A. & Tietz, W.J. Jr (1975b) Development of the implantation chamber in the pregnant bitch *American Journal of Anatomy* vol. 142 ss. 115-130
- Bukowska, D., Kempisty, B., Jackowska, M., Woźna, M., Antosik, P., Piotrowska, H. & Jaśkowski J.M. (2011) Analasys of intergrins and vascular endothelial growht factor isoforms mRNA expression in the canine uterus during perimplantation period *Polish Journal of Veterinary Sciences* vol. 14, nr 2, ss. 253-258
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M. L., Olson, J. D., Mintz, A. & Delbono, O (2014) Type-2 pericytes paticipate in normal and tumoral angiogenesis *American Journal of Physiology. Cell Physiology* vol. 307, ss. C25-C38
- Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D., Illera, J.C. & Peña, L. (2009) Histological, imuunohistological and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer *Veterinary Pathology* Online version of record mars 30, 2010
- Concannon, P.W., McCann, J.P. & Temple, M. (1989) Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog *Journal of Reproduction & Fertility suppl.* vol. 39 ss. 3-25
- Concannon, P.W. (2011) Reproductive cycles of the domestic bitch *Animal Reproduction Science* vol. 124 ss. 200-210
- Kaeoket, K., Persson, E. & Dalin, A.-M. (2003) Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium *Animal Reproduction Science* vol. 75 ss. 55-71
- Leiser, R. & Koob, B. (1993) Development and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat *The Journal of Experimental Zoology* vol. 266 ss. 642-656
- Naish, S.J., Boenisch, T., Farmilo, A.J. & Stead, R.H. (1989) *Handbook - Immunochemical staining methods* Dako
- Neuman, S. & Kaup, F.J. (2005) Usefulness of Ki-67 proliferation marker in the cytologic identification of liver tumors in dogs *Veterinary Clinical Pathology* vol. 34 nr 2 ss. 132-136
- McGavin, M.D. & Zachary, J.F. (2007) *Pathologic basis of veterinary disease* 4th ed Mosby Elsevier
- Mulligan, R. M. (1942) Histological studies on the canine female genital tract *Journal of Morphology* vol. 71 (3) ss. 431-448
- Parming, M. (2013) *Vaskularisering, körtlar och leukocyt förekomst i endometrium hos tik under metöstrus och tidig dräktighet*. Sveriges lantbruksuniversitet, Veterinärprogrammet (Examensarbete 2013:13)
- Saaristo, A., Karpanen, T. & Alitalo, K. (2000) Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis *Oncogene* vol. 19 ss. 6122-6129
- Sağsöz, H., Liman, N., Küçükaslan, I. & Güney Saruhan, B. (2013) Immunolocalisation of vascular endothelial groth factor, its receptors (flt 1/fms, flk 1/KDR, flt 4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bitch uterus during the sexual cycle *Animal Reproduction Science* vol. 140 ss. 241-254
- Sleeckx, N., Van Brantegem, L., Fransen, E., Van den Eynden, G., Casteleyn, C., Veldhuis Kroeze, E. & Van Ginneken, C. (2013) Evaluation of immunohistochemical markers of lymphatic and blood vessels in canine mammary tumours *Journal of Comparative Pathology* vol. 148 ss. 307-317
- Verstegen-Onclin, K. & Verstegen, J. (2008) Endocrinology of the pregnancy in the dog: A review *Theriogenology* vol. 70 ss. 291-299
- Wright, P.J (1989) Cytology of the canine reproductive system *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* vol. 19 (5) ss. 851-874