

**Cytologiska bedömningens påverkan på
analysen av bronkoalveolärt lavage (BAL) samt
förhållandet mellan andelen mastceller och
proinflammatoriska cytokinmediatorer i BAL hos
häst**

Anna Eriksson

**Handledare: John Pringle
Inst. för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Inger Lilliehöök
Inst. för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INNEHÅLLSFÖRTECKNING.....	1
SUMMARY.....	2
INLEDNING.....	3
MATERIAL OCH METODER.....	4
Hästar.....	4
Klinisk undersökning och provtagningsteknik.....	4
BAL-provspreparering.....	4
Cytologisk undersökning.....	5
För jämförelse med proinflammatoriska cytokiner.....	5
För kontroll av repeterbarhet samt jämförelse mellan antalet räknade celler..	5
RNA-extraktion och real time-PCR.....	5
Statistiska metoder.....	6
RESULTAT OCH DISKUSSION.....	6
Effekt på cytologisk bedömning.....	6
Beroende på antalet bedömda celler.....	6
Beroende på olika personers bedömning.....	7
Korrelation av en ökad andel mastceller och proinflammatoriska cytokiner.....	9
KONKLUSION.....	10
LITTERATURFÖRTECKNING.....	12

SUMMARY

Inflammatory airway disease (IAD) is a respiratory disorder that most commonly affects young horses performing at a high level. The clinical signs are often mild but the disorder can cause a marked decrease in performance to a point where the horse has to be taken of training and competing. The aetiology underlying IAD is not yet fully understood. One current theory is that a type I-hypersensitivity reaction due to allergens in the environment is the cause in some horses. The most reliable diagnostic method is a bronchoalveolar lavage (BAL) since it reflects the inflammatory status in the most distal parts of the lungs, which are affected in IAD. Elevated mast cells in the BAL are thus interpreted as reflecting a type I pulmonary hypersensitivity. However, the normal values for mast cell numbers in BAL can vary between laboratory and cell counting methodology.

The first aim of the study is to examine how factors such as the number of cells counted during the cytological evaluation of the BAL-fluid as well as between reader variation affect the final result of the BAL-analysis. For this purpose, BAL cytology slides from 12 horses taken on three occasions were assessed independently by three readers; AE, JP and IL, and intrareader as well as interreader comparisons for all major cell types were made. The results show a marked between reader variation, especially in the evaluation of lymphocytes, macrophages and mast cells where as the evaluation of eosinophils and neutrophils appeared to be more consistent between readers. The number of cells counted during the cytological evaluation of the BAL-fluid for the same reader did not seem to significantly affect the result of the BAL-analysis.

The accompanying aim of this study was, after examination of the repeatability and comparability of assessment of BAL mast cells, to examine the relationship between an increase in mast cells and selected mRNA gene products of proinflammatory cytokines, interleukins (IL)-4 and IL-5 of the T_h2 or allergic reaction, and IL-6 in its association with inflammation. Defining such relationships can help to clarify whether the aetiology behind IAD where BAL mast cells are elevated has cytokine changes associated with the type I-hypersensitivity reaction or whether the elevation is associated with a more general inflammatory process where upregulation of IL-6 would be expected. Examination and BAL were performed on 12 horses on three different occasions. Using BAL cell counts from these original assessments, individual horses that had sampling periods with low percent mast cells as well as sampling periods where mast cells were considered high, being at least a two fold increase over the low sampling episode were selected. This resulted in seven horses for which results of real time-PCR mRNA to IL-4, IL-5 and IL-6 from their BAL fluid were compared between sampling episodes of low versus high mast cells. While there was no relationship between an increased level of mast cells and altered regulation of mRNA of IL-4 or IL-5 there was a significant ($p=0,022$) downregulation of IL-6 mRNA in association with increased BAL mast cell percentage. The horses in this selected group concomitantly had significantly increased neutrophils ($p=0,043$) when mast cells were low, which was the most probable reason for the unexpected changes to mRNA to IL-6. Nonetheless, the study failed to support the role of mast cells as contributing to the inflammation seen in horses with IAD.

INLEDNING

Under lång tid har termen chronic obstructive pulmonary disease (COPD) använts för att beskriva alla tillstånd med ackumulering av mucus och neutrofiler i frånvaro av infektion i luftvägarna hos häst, vilket täcker in såväl vuxna hästar med kraftigt kvickdrag som yngre hästar med nedsatt prestationsförmåga i kombination med hosta. Förutom det faktum att begreppet COPD har använts för att täcka in ett brett spektrum av sjukdomstillstånd som inte nödvändigtvis behöver ha någon relation till varandra så råder en oförenlighet mellan veterinärmedicinen och humanmedicinen där termen används för att beskriva ett sjukdomstillstånd hos äldre rökare med kraftigt nedsatt lungfunktion med en icke-reversibel obstruktion av luftvägarna. Således har man internationellt beslutat att termen COPD inte bör användas för att beskriva sjukdomstillstånd hos häst, utan att termen kvickdrag istället bör användas för att beskriva den grava, men reversibla luftvägsobstruktionen som kan ses hos vuxna hästar. Eftersom tillståndet ofta återkommer i till exempel dålig stallmiljö är uttrycket recurrent airway obstruction (RAO) även accepterat som en adekvat nomenklatur. För att beskriva övriga icke-infektiösa orsaker till hosta hos häst används termen inflammatory airway disease (IAD).^(10,16,17,21)

IAD är en lindrig form av luftvägssjukdom som främst ses hos unga, högpresterande hästar. De kliniska symptom som hästarna uppvisar inkluderar hosta framför allt vid ansträngning och/eller utfodring, ökad sekretion från luftvägarna, nedsatt prestationsförmåga, vilket i vissa fall också leder till hästen tas ur tävling och träning samt en förlängd återhämtningstid efter hårt arbete. Etiologin till IAD är ännu ej helt fastställd, men man har sett samband med såväl omgivningsmiljö, allergener som till tidigare bakteriella infektioner som affekterat respirationsorganen. Huruvida det finns ett samband till virala luftvägsinfektioner är ännu ej helt fastställt. Då mycket tyder på flera olika etiologier förefaller IAD vara ett symptomkomplex för att beskriva de såväl kliniska förändringar som förändringar i respirationsorganens utseende samt i bronchoalveolärt lavage (BAL) och trachealaspirat som ses vid denna typ av inflammation i respirationsorganen.^(3,10,16,21)

Diagnosen ställs genom anamnestiska uppgifter, den kliniska bilden, undersökning av luftvägarna med fiberoptik, trachealaspirat, eventuellt kombinerat med en bakteriologisk undersökning av mucus samt BAL, där BAL anses vara den mest pålitliga diagnostiska metoden då den återspeglar den inflammatoriska bilden i lungornas minsta och mest distala delar vilka är de som primärt är affekterade vid IAD^(3,14,21). Även om BAL-prover endast tas från en liten del av lungan har de visat sig vara representativa för utseendet i hela lungan⁽⁶⁾. BAL-provet analyseras med avseende på totalt cellinnehåll samt fördelningen av inflammatoriska celler i form av en differentialräkning. Terapeutiska rekommendationer baseras i många fall på denna cytologiska undersökning och då framförallt på differentialräkningen, varför det är intressant att se hur resultatet av denna påverkas av olika faktorer^(10,21).

Syftet med denna studie är att undersöka hur resultatet av en differentialräkning kan påverkas av personen som utför den cytologiska bedömningen samt hur stor betydelse det har för resultatet av differentialräkningen hur många celler som bedöms vid den cytologiska undersökningen. Studien syftar även till att undersöka förhållandet mellan genuttryck av mRNA för vissa proinflammatoriska cytokiner, interleukin (IL)-4, IL-5 samt IL-6, och en ökad andel mastceller i BAL-vätskan.

MATERIAL OCH METODER

Studien är godkänd av Djurförsöksetiska kommittén, Uppsala (diarienummer C 235/3).

Hästar

Tolv varmblodiga travhästar, varav åtta ston, tre valacker och en hingst med en medelålder av 4.25 ± 1.4 år (medelvärde \pm SE, intervall 3-7 år) ingår i studien. Samtliga individer ingick i en parallellt pågående studie, vilken utvärderar stallmiljöns påverkan på inflammation i respirationsorganen. Hästarna har undersökts och provtagits vid tre separata tillfällen; under stallperioden i februari 2004, efter betesperioden i september 2004 samt under stallperioden i mars 2005. Vid undersökningstillfället i september 2004 sågs en uttalad eosinofili hos tre av hästarna, vilka även undersöktes och provtogs i november 2004.

Klinisk undersökning och provtagningsteknik

Samtliga hästar genomgick en grundlig klinisk undersökning som inkluderade auskultation av thorax före samt efter återandning, blodprovsanalys för röda samt vita blodcellsparametrar, plasma-fibrinogen, arteriell blodgasanalys samt arteriell pH. Endoskopi av övre och nedre luftvägar, BAL samt endoskopiguidad bronkialbiopsitagning utfördes på samtliga hästar under sedering med detomidin (Domosedan vet., Orion, Animal Health) och butorfanoltartrat (Torbugesic®, Fort Dodge). Farynx, luftsäckar, trachea samt delar av bronkträdet undersöktes med hjälp av endoskop. Lokalanestetika i form av mepivacain (Carbocain®, Astra Zeneca) gavs via endoskopet vid bifurkationen. Lokalanestetika användes även på flera nivåer i bronkialträdet före biopsiprovtagning och även vid behov före BAL-provtagning. BAL utfördes med endoskop för att säkerställa att sköljprovet inte utfördes på sidan för biopsitagning. BAL utfördes med 3x 100 ml steril, isoton, förvärmad (37°C) natriumkloridlösning. Provet placerades omgående på is, 30 ml togs för omedelbar preparation för cytologisk bedömning och återstoden preparerades för real time-PCR analys.

BAL-provspreparering

För att erhålla lämpliga cytospinpreparat användes två olika koncentrationer på BAL-vätskan, en icke-centrifugerad och en centrifugerad lösning. Det icke-centrifugerade preparatet framställdes genom att addera 50 μ l albuminlösning till 250 μ l av BAL-vätskan. Albuminlösningen hade tidigare framställts genom att använda 1g bovint serumalbumin och 0,002 g NaN_3 vilka löstes i 10 ml natriumklorid och lagrades vid 4°C. Det centrifugerade preparatet erhöles genom att centrifugera ett rör med 10 ml BAL-vätska vid 400xg i 5 minuter, varefter supernatanten togs bort. Återstående cellfraktion löstes upp i och blandades med

50 µl av albuminlösningen. Cytospinpreparat erhöles genom att placera 100 µl från den icke-centrifugerade (ej koncentrerade) respektive den centrifugerade (koncentrerade) lösningen i cytocentrifugkassetter. Då utstryken hade torkat färgades de automatiskt med modifierad Wrightfärgning i en Hematec (Ames, Elkhart, US).

Cytologisk undersökning

För jämförelse med proinflammatoriska cytokiner

Bedömningen av de cellutstryk samt den differentialräkning som användes för jämförelse med proinflammatoriska cytokiner utfördes av en och samma cytolog. Vid denna cytologiska undersökning bedömdes såväl det centrifugerade som det icke-centrifugerade preparatet och det utsvarede värdena utgörs av ett sammantaget intryck av de båda preparaten. Total leukocyträkning utfördes med hjälp av Cell-Dyn 3500 (Abbot Laboratories, Illinois, USA). Då den optiska räkningen och impedansräkningen som utfördes av Cell-Dyn ej stämde överens utfördes en manuell räkning med hjälp av en räkningskammare.

För jämförelse mellan andelen mastceller och proinflammatoriska cytokiner hos individuella hästar valdes hästar som under en provtagningsperiod hade låg (<3%) procentandel mastceller och som också under en annan provtagningsperiod hade en minst två gångers ökning av procentandelen mastceller. Hästar med förhöjd andel eosinofiler (>1%) exkluderades för att minimera den effekt som eosinofiler har på regleringen av lungcytokiner.

För kontroll av repeterbarhet samt jämförelse mellan antalet räknade celler

För den del av studien som syftar till att utvärdera eventuella variationer i vem som utför differentialräkningen samt i antalet räknade celler utfördes differentialräkning av 200 respektive 400 celler av såväl centrifugerat som icke-centrifugerat preparat av två olika personer (AE och JP). Denna cytologiska bedömning gjordes blint, personerna hade ej tillgång till anamnesticke uppgifter. En tredje person (IL) har på liknande sätt utfört differentialräkning på 200 celler på samtliga prover. Epitelceller, vilka ofta aggregerar, samt icke-intakta celler ingick ej i differentialräkningen.

RNA-extraktion och real time-PCR

BAL-proverna centrifugerades vid 500xg i 5 minuter. Resultterande cellfraktion späddes i 1 ml STE-buffert (0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris; pH 8,0) och centrifugerades på nytt i 500xg i 5 minuter. Extraktion av totalt RNA från BAL-celler utfördes med hjälp av Trizol® enligt tillverkarens instruktioner, upplöst i DMPC-H₂O, lagrat vid -80°C till dess att provet analyserades. Kvantifiering av IL-4, IL-5 samt IL-6 mRNA uttryck utfördes genom en enstegs real time-PCR, med hjälp av ett Rotor-Gene 3000 system (Corbett Research, Sydney, Australien). PCR-reaktioner (25 µl totalvolym) innehöll 0,5 mM av varje dNTP, 2,5 mM Mn, 2,5 enheter GeneAmp®rTth polymeras, 40 ng totalt RNA samt den aktuella primern/proben. Enstegsreaktionen kördes i 42°C i 5 minuter och i 60°C i 20 minuter, följt av 45 cykler bestående av 95°C i 5 sekunder, 60°C i 30 sekunder. Samtliga prover kördes i tre exemplar och non template controls inkluderades i

varje omgång. Uttrycket av målgener normaliserades mot uttryck av housekeepinggenen för equint GAPDH. Valideringsprövningar utfördes för att säkerställa att PCR-effektiviteten var jämförbar mellan målgener och housekeeping-gener.

Statistiska metoder

För att beräkna relativa cytokin mRNA-nivåer användes den komparativa C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)-metoden. För att utvärdera sambandet mellan antalet bedömda celler under den cytologiska undersökningen, sambandet mellan olika cytologers bedömning samt sambandet mellan relativa cytokin mRNA-nivåer i relation till absolut antal och procentandel mastceller i BAL-vätskan användes enkel korrelation och regression (MINITAB™, release 14.20, med $p < 0.05$ som signifikansnivå). Vid undersökning av samband mellan en hög andel mastceller och interleukinnivåer hos enskilda individer användes Sign test och Wilcoxon signed rank test (MINITAB™, release 14.20).

RESULTAT OCH DISKUSSION

Effekt på cytologisk bedömning

Diagnos samt terapeutiska rekommendationer vid luftvägssjukdom hos häst grundas ofta, i kombination med den kliniska bilden, på den cytologiska bedömningen av ett utfört BAL-prov. Det är därför av vikt att ta hänsyn till olika faktorer som kan påverka resultatet av denna cytologiska bedömning då dessa kan påverka hur hästen slutligen kommer att behandlas.

Flera studier har genomförts med syftet att undersöka hur analysen av BAL-provet påverkas av faktorer som hur preparatet förvaras och hanteras innan analysen genomförs, betydelsen av vilken fraktion av BAL-vätskan som analyseras samt vilken effekt centrifugering av preparatet har på resultatet av differentialräkningen^(13,18,19,20,22). Ytterligare faktorer som tänkbart kan inverka på analysresultatet av BAL-vätskan är hur många celler som bedöms per preparat samt skillnader i hur olika personer bedömer preparatet, vilka är två faktorer som har undersökts i denna studie.

Beroende på antalet bedömda celler

Vid avdelningen för klinisk kemi, Institutionen för bildiagnostik och veterinär folkhälsovetenskap, SLU, Uppsala sker den cytologiska bedömningen av BAL-vätska rutinmässigt genom bedömning av såväl icke-centrifugerade som centrifugerade preparat. Ett helhetsintryck fås genom att överskådligt se över vartdera preparat och cellräkning sker i områden där ingående celler ligger på ett för preparatet representativt sätt. 200 celler bedöms vanligen från vartdera preparat, och i de fall där det är möjligt räknas ytterligare celler. Därefter vägs cellräkningen ihop med helhetsintrycket av de två preparaten och dessa faktorer sammantaget resulterar i den utsvarade differentialräkningen.

Ett av syftena med denna studie är att utvärdera hur antalet bedömda celler påverkar analysen av BAL-vätskan. Ju fler celler som bedöms i ett preparat, desto säkrare bör resulterande analys vara. Av försöket framgår dock att korrelationen

mellan resultatet av 200 bedömda celler och resultatet av 400 bedömda celler är mycket god ($r^2=85.5\%-99.3\%$) vad gäller samtliga celltyper (se tabell 1). En cytologisk bedömning av 200 celler per preparat kan således betraktas som representativt för BAL-provet och inga skäl föreligger för att analysen skall bli mer precis om ett större antal celler räknas.

Tabell 1. Korrelation (coefficient of determination, r^2) vid cytologiräkning mellan tre olika cytologer, AE, JP, IL..

r^2 (%)	200 vs 400 räknade celler		Beroende på individuell tolkning		
	AE	JP	AE vs IL	AE vs JP	IL vs JP
Neutrofiler	85,4	92,0	55,0	54,9	72,1
Eosinofiler	86,0	99,3	95,4	90,4	87,6
Mastceller	90,6	90,9	49,8	52,9	58,5
Lymfocyter	92,5	92,8	50,1	33,7	57,3
Makrofager	95,9	87,5	59,6	41,4	57,6

Beroende på olika personers bedömning

Vid IAD kan man se någon av följande inflammatoriska profiler vid analys av BAL-vätskan: 1) en blandad inflammation med högt totalantal av nukleära celler, neutrofil, lymfocytos samt monocytos; 2) ökad andel metakromata celler (mastceller); 3) eosinofil inflammation. Ur detta hänseende är de viktigaste parametrarna vid den cytologiska bedömningen av BAL-vätskan andelen neutrofiler, mastceller samt eosinofiler. Internationellt antagna referensvärden vid cytologisk bedömning av BAL-vätska är för friska hästar följande; lymfocyter <30-60%, makrofager <40-70%, neutrofiler <5%, mastceller <2%, eosinofiler <0,5%.^(3,7,9,10,14,15,16,17)

Av studien framgår att korrelationen mellan olika personers differentialräkning är mycket god vad gäller eosinofiler ($r^2=87.6\%-95.4\%$) men sämre vad gäller neutrofiler ($r^2=54.9\%-72.1\%$) (se tabell 1). Störst variation finns i bedömningen av mastceller, lymfocyter och makrofager. Även om man hos en viss andel av IAD-afpekterade hästar kan utläsa en lymfocytos samt en minskad andel makrofager i BAL-vätskan är detta mindre relevant ur klinisk, praktisk betydelse där man i huvudsak grundar sin bedömning på andelen av just neutrofiler, mastceller samt eosinofiler.

En orsak till att korrelationen mellan olika personers bedömning av lymfocyter och makrofager ej är så hög kan bero på att tolkningen av dessa celltyper i vissa fall kan vara svår, då framför allt vad gäller icke-centrifugerade preparat. Försök har visat att cellmorfologin skiljer sig åt mellan icke-centrifugerade och centrifugerade preparat (figur 1). I icke-centrifugerade BAL-preparat är cellerna mindre och färgas starkare, vilket försvårar identifieringen särskilt av små celler. Detta kan leda till att andelen lymfocyter blir relativt överskattade på bekostnad på uppskattningen av andelen makrofager. I centrifugerade preparat är cellstorleken större, vilket accentuerar morfologiska skillnader mellan lymfocyter och makrofager, vilket minskar risken för att dessa celler feltolkas. Cellerna blir också mer jämt fördelade i preparatet, vilket gör bedömningen lättare.^(13,19)

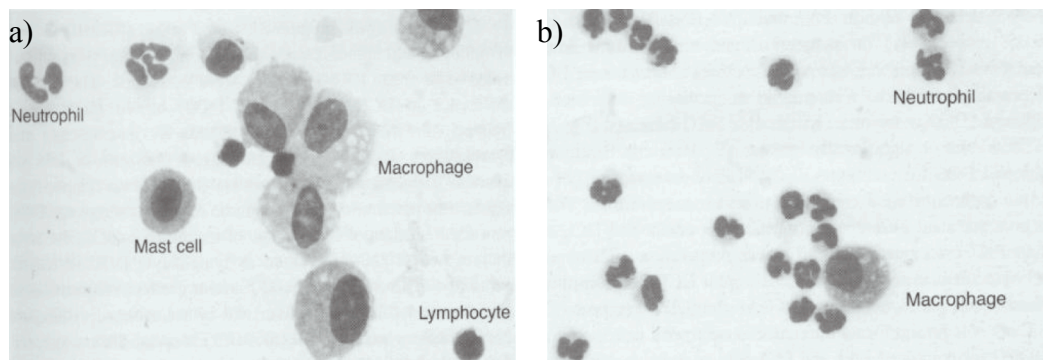


Fig. 1. BAL-preparat från häst (x1000); a) cytocentrifugerat preparat, b) utstryk efter centrifugering. (Modifierade bilder efter Pickles et al, 2001)

Detta resonemang bör dock inte påverka tolkningen av neutrofiler, eosinofiler och mastceller då dessa celltyper har så säregen morfologi att de är svåra att misstolka för någon annan celltyp (figur 2). I det aktuella försöket är dessutom såväl de centrifugerade som de icke-centrifugerade preparaten senare cytocentrifugerade. Således bör morfologiska skillnader på grund av olika hantering av preparaten ej vara av större betydelse här.

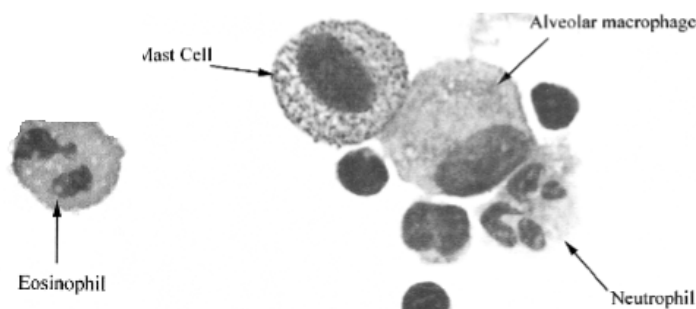


Fig. 2. BAL-cytologi från häst (modifierad bild efter Couëtil, 2002)

Vad gäller eosinofiler var korrelationen mellan olika personers bedömningar mycket god, vilket troligen påverkas av att andelen eosinofiler vanligen är mycket låg i BAL-prover (<0,5%) och att man därför får en bra uppfattning om denna celltyp redan vid ett lågt antal räknade celler. För neutrofiler och mastceller var korrelationen mellan olika personers bedömningar sämre. En faktor som kan bidra till detta är att dessa celltyper förefaller ha en tendens att aggregera och vara ojämnt utspridda i ett preparat. Beroende på vilken del av preparatet som en person bedömer så kan resultatet därför skilja sig markant åt vad gäller dessa två celltyper. Samtidigt är andelen neutrofiler respektive mastceller normalt sett låg (<5% respektive <2%) i BAL-prover, vilket leder till att ett fåtal extra celler av endera celltyp kommer ge relativt större utslag på resultatet än vad några extra lymfocyter eller makrofager, vilka båda förekommer i högt antal (<30-60% respektive 40-70%).

Korrelation av en ökad andel mastceller och proinflammatoriska cytokiner

Etiologin till IAD är ännu ej helt fastställd och det förefaller vara så att den varierar mellan olika hästar och populationer av hästar. Några faktorer som förefaller kunna vara bakomliggande orsak till IAD inkluderar en tidigare infektion med bakterier och/eller mycoplasma, inhalation av proinflammatoriska agens såsom endotoxiner i stall med suboptimal ventilation, inhalation av partiklar vid hårt arbete samt en immunmedierad reaktion, motsvarande en typ I-hypersensitivitets reaktion som svar på allergener i omgivningsmiljön.^(1,2,10,16,17,21,23)

En typ I-hypersensitivitetsreaktion medieras av allergenspecifika IgE-antikroppar som efter att de har exponerats för allergener binder till specifika receptorer på mastceller, vilket leder till att mastcellerna degranulerar. Denna degranulering leder till frisättning av olika inflammatoriska mediatorer såsom histamin, proteaser och cytokiner, vilket i sin tur leder till inflammation i luftvägarna^(15,23). Senare kommer denna inflammation att karaktäriseras av infiltration av T-lymfocyter och eosinofiler i luftvägarna^(8,12,23). Vilken typ av T-lymfocyter som dominerar vid inflammatoriska reaktioner i luftvägarna hos häst är ej fastställt. Flertalet studier är utförda med varierande resultat. Vid användning av *in situ hybridisering* har man sett att BAL-celler från hästar med RAO har ett ökat uttryck för IL-4 och IL-5 mRNA samt ett minskat uttryck av IFN- γ , vilket överensstämmer med ett T_h2-svar, det vill säga en allergisk reaktion^(2,11). Vid användande av real time-PCR vid analys av BAL-vätska har man dock ej sett något konsekvent resultat vad gäller mRNA-uttryck för cytokiner i de studier som hittills utförts^(1,5).

I den aktuella studien har sambandet mellan proinflammatoriska cytokiner och andelen mastceller i BAL-prover undersökts. För att åskådliggöra uttryck av dessa cytokiner har genprodukter av deras mRNA analyserats. De cytokiner som har analyserats är IL-4, IL-5 och IL-6. IL-4 och IL-5 tillhör gruppen T_h2-cytokiner, vilka är direkt involverade i regleringen av IgE-antikroppar och de spelar således en central roll i immunresponsen mot bland annat allergener^(2,6,11). IL-6 är en mer generell inflammationsmarkör som har en funktion som effektormolekyl i inflammationssvaret⁽¹¹⁾.

Resultatet av studien går att utläsa av tabell 2. Det förefaller generellt sett vara ett mycket svagt samband mellan en ökad andel mastceller och de analyserade cytokinerna. Huruvida detta beror på att den inflammatoriska reaktion associerad med en ökad andel mastceller hos en del IAD-afpekterade hästar ej är orsakad av ett T_h2-svar är oklart.

Tabell 2. Korrelation (coefficient of determination, r^2) mellan proinflammatoriska cytokiner och andelen mastceller i BAL-vätska

r^2 (%)	IL-4 mRNA	IL-5 mRNA	IL-6 mRNA
Mastceller (rel)	0,3	2,7	3,6
Mastceller (abs)	1,2	2,9	8,9

IAD förefaller som tidigare nämnts vara av varierande etiologi hos enskilda hästar och möjligen är det så att det enbart är hos hästar med en bakomliggande allergisk reaktion med inflammationsprofil som karaktäriseras av en ökad andel mastceller i BAL-vätskan som detta kan korreleras med de analyserade cytokinerna. Därför har en jämförelse gjorts mellan de hästar med konstant höga mastcells nivåer samt hästar som vid något av provtagningsstillfällena uppvisat en fördubbling i mastcells nivå jämfört med tidigare provtagningsstillfälle och de hästar som konstant uppvisat låga mastcells nivåer vad gäller interleukinnivåer. Resultatet av denna jämförelse går att utläsa i tabell 3.

Tabell 3. Samband mellan interleukin-mRNAnivå hos enskilda individer och låg versus hög (2 fold) nivå BAL-mastceller. (Wilcoxon signed rank test, n=7)

	P
IL-4 mRNA	1,000
IL-5 mRNA	0,834
IL-6 mRNA	0,022

I det aktuella försöket har inget samband kunnat påvisas vad gäller en ökad nivå mastceller och uppreglering av IL-4 samt IL-5 mRNA. Hade ett sådant samband återfunnits skulle detta ha varit ett stöd för att den inflammation karaktäriserad av en förhöjd andel mastceller hos vissa hästar med IAD skulle ha orsakats av en T_h2-reaktion. Däremot har ett signifikant samband kunnat påvisas mellan en förhöjning av andelen mastceller och nedreglering av mRNA för den generella inflammationsmarkören IL-6. En förklaring till detta kan vara andra bakomliggande faktorer såsom att andelen neutrofiler möjligen är låg hos hästar där man ser en hög andel mastceller. Denna hypotes stöds av att det i studien återfanns en signifikant ökning av procentandelen neutrofiler (p=0,043) i BAL-vätskan hos hästar med låga nivåer av mastceller, vilket är en indikation på att nedregleringen av IL-6 är relaterad till andelen neutrofiler snarare än till andelen mastceller.

Tidigare studier på området har vid användning av *in situ-hybridisering* kunnat påvisa förhöjda nivåer av bland annat IL-4 och IL-5 vid IAD medan studier som använt sig av real time-PCR ej kunnat påvisa ett sådant samband. Huruvida det negativa resultat som setts i det aktuella försöket beror på analysmetod eller om den förhöjda nivå mastceller som ses hos en del hästar i studien ej orsakats av en allergisk reaktion är oklart.

KONKLUSION

Antalet celler som bedöms under den cytologiska bedömningen av BAL-vätskan förefaller ej påverka resultatet av BAL-analysen signifikant. Däremot ses en betydande skillnad i resultatet av olika personers bedömning av de cytologiska preparaten, då framför allt vad gäller lymfocyter, makrofager och mastceller medan en större korrelation ses vad gäller eosinofiler och neutrofiler. Detta resultat är viktigt att ha i åtanke vid bedömning av cytologiska preparat då det kan påverka resultatet av BAL-analysen och slutligen vilka terapeutiska

rekommendationer som patienten ges. Det korrekta sättet att utföra den cytologiska bedömningen bör vara att då celler räknas undvika områden med aggregerade celler, täta områden samt utkanten av preparatet för att undvika faktorer som kan påverka resultatet på ett felaktigt sätt. Det är även viktigt att få ett helhetsintryck av preparatet och ta med detta i det slutgiltiga utlåtandet.

Studien har ej visat något generellt samband mellan en förhöjd nivå mastceller och de analyserade proinflammatoriska cytokinerna. Inte heller vid analys av enskilda individer har samband setts mellan höga mastcells nivåer och de T_h2-relaterade cytokinerna IL-4 och IL-5. En uppreglering av dessa cytokiner hos hästar med en inflammatorisk profil karaktäriserad av en förhöjd nivå mastceller har ej påvisats, vilket hade varit att förvänta om denna inflammation orsakats av en typ I-hypersensitivitets reaktion. Således har stöd till teorin om en allergisk reaktion som bakgrund till IAD hos en del individer ej återfunnits i denna studie. En förhöjd andel mastceller i BAL förefaller inte heller på egen hand vara relaterade till att den generella inflammationskaskaden, där IL-6 är en viktig effektormolekyl, aktiveras då studien istället visat på en nedreglering av IL-6 mRNA hos hästar med en förhöjd andel mastceller i BAL. Denna nedreglering beror troligtvis på förändringar i andelen av andra celltyper, såsom neutrofiler, vilket ej har undersökts närmre i denna studie.

LITTERATURFÖRTECKNING

1. Ainsworth, DM et al. 2003. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 96 (2003), 83-91.
2. Cordeau, M et al. 2003. IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 97 (2004), 87-96.
3. Couëtil, LL et al. 2001. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assesment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am J Vet Res* vol 62 (2001), 4, 538-546.
4. Couëtil, LL. 2002. IAD: cough, poor performance, mucus in the airways-what is so important about that?. *AAEP Proceedings*, vol 48 (2002), 200-207.
5. Debrue, M et al. 2004. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet immunol Immunopathol* 105 (2005), 25-31.
6. Dewachi, O et al. 2005. Expression of interleukin (IL)-5 and IL-9 receptors on neutrophils of horses with heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 109 (2006), 31-36.
7. Fogarty, U and Buckley, T. 1991. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. *Equine Vet J*, 23 (6), 434-437.
8. Giguère, S et al. 2001. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol* 85 (2002), 147-158.
9. Hoffman, AM et al. 1998. Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res*, vol 5(1998), 2, 176-181.
10. Hoffman, A et al. 2002. Proceedings of a workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the syndrome. *Havemeyer foundation Monograph Series No 9*.
11. Horohov, DW. 2003. Equine cytokines: Past, present and future. *Journal of equine veterinary science*, vol 23, 7, 331-332.
12. Horohov, DW et al. 2005. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 108 (2005), 237-245.
13. Lapointe, JM et al. 1994. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine Vet J*, 26 (3), 227-229.
14. Mair, TS et al. 1987. Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Vet J*, 19 (5), 458-462.
15. Mair, TS et al. 1988. Distribution and ultrastructure of mast cells in the equine respiratory tract. *Equine Vet J*, 20 (1), 54-58.
16. Moore, BR et al. 1995. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from Standardbred racehorses with inflammatory airway disease. *Am J Vet Res*, vol 56 (1995), no 5, 562-567.

17. Moore, BR et al. 1997. Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid of Standardbred racehorses with inflammatory airway disease: response to interferon-alpha. *Equine Vet J* vol 29(1997), no 2, 142-147
18. Pickles, K et al. 2002. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: comparison of sequential and pooled aliquots. *Equine Vet J*, 34 (3), 288-291.
19. Pickles, K et al. 2002. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 2: comparison of smear and cytocentrifuged preparations. *Equine Vet J*, 34 (3), 292-296.
20. Pickles, K et al. 2002. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: the effect of time, temperature and fixatives. *Equine Vet J*, 34 (3), 291-301.
21. Robinson, NE. 2001. International workshop on equine chronic airway disease, Michigan State University, 16-18 June 2000. *Equine Vet J*, vol 33(2001), no 1, 5-19.
22. Sweeney, CR et al. 1992. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res*, 53 (8), 1376-1379.
23. Van der Haegen, A et al. 2005. Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses. *Vet Immunol Immunopathol* 108 (2005), 325-334.