

En proteomisk utvärdering av olika metoder för att samla uterusekret hos sto

Henriette Clasen

Handledare Ulf Magnusson
Institutionen för obstetrik och gynekologi

Bitr. handledare Birger Scholz
Institutionen för farmaceutisk biovetenskap

Examensarbete 2003:4
Veterinärprogrammet
Veterinärmedicinska fakulteten
SLU
ISSN 1650-7045
Uppsala 2003

Innehållsförteckning

1 Litteraturstudie	3
1.1 Inledning.....	3
1.2 Diagnostik	4
1.2.1 Palpation.....	4
1.2.2 Ultraljud	4
1.2.3 Vaginoskopi	4
1.2.4 Bakteriologi.....	5
1.2.5 Cytologi.....	5
1.2.6 Histologi	5
1.3 Stoets försvarsmekanismer	6
1.3.1 Mottaglighet för infektion	6
1.3.2 Faktorer av betydelse för skydd mot endometrit	6
1.3.2.1 Anatomiska barriärer	6
1.3.2.2 Kompetitiv mikroflora	6
1.3.2.3 Fysisk rening av livmodern.	6
1.3.2.4 Immunsystemet.....	6
2 Experimentell studie.....	7
2.1 Uterussekret.....	7
2.2 Syfte med studien	8
2.3 Material och metoder.....	8
2.3.1 Djur och experimentell design.....	8
2.3.1.1 Djur.....	8
2.3.1.2 Brunstkoll, gynekologisk och ultraljudsundersökning	8
2.3.1.3 Cytologisk provtagning	10
2.3.1.4 Uppsamling av uterussekret	10
2.3.1.4.1 Kateter	10
2.4.2 Proteinanalys	10
2.4.2.1 Totala proteinkoncentrationen.....	10
2.4.2.2 Provpreparering för 2DE-analys	11
2.4.2.3 Första dimensionen.....	11
2.4.2.4 Andra dimensionen.....	11
2.4.2.5 Märkning	12
2.4.2.6 Gelanalys.....	12
2.4.2.7 Statistik.....	12
2.5 Resultat och diskussion	12
2.5.1 Ultraljud och cytologi.....	12
2.5.2 Tampong- och aspiratprov - mängd och koncentration.....	13
2.5.3 Proteinanalys	14
2.6 Konklusion	14
2.7 Sammanfatning.....	15
2.8 Summary	15
2.9 Tack.....	16
3 Referenslista.....	18

1 Litteraturstudie

1.1 Inledning

Endometrit är den vanligaste orsaken till subfertilitet hos sto och således ett stort problem inom hästreproduktion (Traub-Dargatz *et al.*, 1991; Tunón, 1999; Watson, 2000). Dessutom ökar risken för persisterande endometrit med ökande ålder och antalet fölningar (Ricketts & Alonso, 1991).

Alla ston drabbas av en övergående endometrit som följd av en naturlig betäckning (Ricketts & Mackintosh, 1987) eller en artificiell insemination (Kenney *et al.*, 1975). Uterus kontamineras med mikroorganismer från de yttre hanliga och honliga genitalia (Kenney *et al.*, 1975), samt från sperman, vilken innehåller stora mängder bakterier (Asbury, 1980). För att embryot skall överleva i uteruslummen, måste kontaminanter vara eliminerade från denna ca 5 dagar efter ovulationen, då det är vid denna tid embryot når uterus. Om uterus inte är renad vid denna tidpunkt har en persisterande endometrit utvecklats (Allen & Pycock, 1989). Den pågående inflammatoriska reaktionen gör att neutrofilerna frisätter substanser som verkar toxiskt på gameter och embryon (Waites & Bell, 1982).

På grund av endometritens multifaktoriella bakgrund har tillståndet delats in i fyra olika undergrupper, baserat på deras olika etiologi och patofysiologi (Troedsson *et al.*, 1995; Troedsson, 1997; Nikolakopoulos & Watson, 1999):

A. Endometros (kronisk, degenerativ endometrit)

En kronisk, degenerativ förändring av endometriet, som anses irreversibel (Watson, 2000), och som troligen är ett resultat av stigande ålder och återkommande inflammationer i uterus (Allen, 1993).

B. Veneralt orsakad endometrit

Agens som överförs veneralt från hingstar är bl.a. *Taylorella equigenitalis*, serotyper av *Pseudomonas aeruginosa* och *Klebsiella pneumoniae* (Platt *et al.*, 1977) och orsakar akuta endometrit hos sto. *T. equigenitalis* har orsaka akuta, grava endometrit och infertilitet hos ston som infekterats, men svarar bra på rätt insatt antibiotikabehandling (Watson, 2000).

C. PMIE (*Persistent mating-induced endometritis*)

Som ovan beskrivits drabbas alla ston av en övergående endometrit efter naturlig betäckning (Ricketts & Mackintosh, 1987) och efter artificiell insemination (Kenney *et al.*, 1975), där denna induceras av sperma och eventuell kontamination av bakterier från perineal regionen, som t.ex. *Streptococcus zooepidemicus* och *Escherichia coli*. Om inflammationen kvarstår kommer den att förhindra dräktighet (Watson, 2000). Ofta ses intrauterina vätskeansamlingar i samband med inflammationen. Denna består av inflammatoriska mediatorer, neutrofiler och plasmaproteiner som immunoglobuliner, komplementfaktorer och enzymer (Watson, 1987; Katila *et al.*, 1990; Pycock & Allen, 1990). Dessa komponenter ökar inom 30 minuter till 12 timmar efter en retning av uterus (Katila *et al.*, 1990; Pycock

& Allen, 1990) och ston som har kvarstående intrauterin vätska mer än 12 timmar efter betäckning anses ha PMIE (Troedsson, 1997).

D. Kronisk infektiös endometrit

Ston som har drabbats av en PMIE tidigt under brunstsäsongen, kan utveckla en kronisk, infektiös endometrit. Alternativt kan ston som inte har haft en tidigare PMIE, stå med en infektion i uterus (Watson, 2000). Kommensala bakterier såsom *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli* och olika svamparter (Hinrichs, 1988; Albiñ *et al.*, 2000) är de vanligaste patogenerna vid endometrit hos sto, även om anaerobier sannolikt också spelar en roll (Ricketts & Mackintosh, 1987).

1.2 Diagnostik

Olika metoder finns för att diagnostisera endometrit hos sto. Det vanligaste är att tillsammans med anamnes basera diagnosen på kliniska fynd vid palpation per rectum, vaginoskopi, ultraljud, endometrietstryk och bakteriologiskt prov (Wingfield Digby & Ricketts, 1982; Asbury, 1986).

1.2.1 Palpation

Vid en akut endometrit kan man vid rektalpalpation känna en ödematös och degig uterus med eventuellt innehåll. Vid en kronisk metrit blir livmodern atonisk och tunnväggig. (Knudsen & Nydahl, 1983).

1.2.2 Ultraljud

Vid en endometrit kan man med ultraljud via rektum ibland se vätska i uterus (Asbury & Lyle, 1993), som ett tecken på den pågående inflammationen. I östrus uppvisas normalt alternerande områden med hyperekogenicitet (vita områden) och hypoekegenicitet (mörka områden). De vävnadstäta centrala delar av vecken i endometriet ger en hyperekogen bild, medan de ödematösa yttre delarna av vecken i endometriet ger en hypoekegen bild (Ginther, 1986). Enligt Ginther (1986), blev ston med små vätskeansamlingar under lutealfasen sällan diagnostiserat dräktiga, och deras interovulatoriska intervall var korta och brunsterna frekventa.

1.2.3 Vaginoskopi

Vid användande av spekulum, kan vagina och cervix studeras (Asbury, 1986). Förändringar i slemhinnefärg, synligt exsudat från portio, eller exsudat som samlats i vagina, samt skador eller anatomiska defekter kan upptäckas med denna teknik (Asbury, 1986) Vid en kronisk endometrit kan vaginoskopi avslöja en liten portio med olika hyperemiska och bleka flikar, vilket ger cervix ett marmorerat utseende (Knudsen & Nydahl., 1983).

1.2.4 Bakteriologi

Bakteriologiskt prov bör kombineras med ett cytologiskt prov, då enbart förekomst av bakterier ej behöver indikera att stoet har en endometrit eftersom kommensala bakterier lätt kan kontaminera provet. (Asbury, 1986). Ett bakteriologiskt prov skall tas med en dubbelskyddad, stängd provtagare/swab för att undvika eventuell kontamination från bakteriefloran i vagina och perinealregionen (Hindrichs *et al.*, 1988).

1.2.5 Cytologi

Ett utstryk för cytologi är en enkel metod för diagnostik av endometrit (Knudsen, 1964). Provet tas också här med skyddad provtagare från endometriet, utstryk görs på objektglas och färgas, och studeras sedan i mikroskop. Närvaro av neutrofiler tyder på en inflammation, då det normalt inte finns några neutrofiler i endometriet hos sto (Asbury, 1986; Asbury & Lyle, 1993).

1.2.6 Histologi

En uterusbiopsi kan göras för att säkerställa diagnosen. De histologiska fynden brukar delas in i en tregradig skala enligt Kenney (1978). Fynden baserar sig på inflammatoriska och fibrotiska förändringar i endometrieslemhinnan, och graderas efter ökande utbredning och ökande gravhet av dessa förändringar, se tabell 1.

Tabell 1. *Indelning av histologiska fynd vid biopsi av uterus.*

Kategorier	Slemhinnans utseende, histologiskt
Grad 1	Ingen hypoplasi eller atrofi av endometriet eller inflammatoriska förändringar.
Grad 2	Utbredda inflammatoriska förändringar, med lindrig till måttlig diffus infiltration av lymfocyter i yttre skikt av bindvävnaden i endometriet, eller spridda men frekventa foci i yttre och inre skikt av bindvävnaden. Fibrotiska förändringar; många, utspridda, som omfattar flera körtelgrenar
Grad 3	Grava inflammatoriska förändringar med en nästan kontinuerlig infiltration av lymfocyter, samt moderat till kraftig infiltration av plasmacyter Utbredd periglandulär fibros Stas av lymfatiska kärl

Kenney (1978) visade också att graden av slemhinnans utseende stod i hög korrelation till reproduktionsförmågan. Vid histologiska fynd av grad 1 var reproduktionsförmågan opåverkad, vid grad 2 var den nedsatt, och vid förändringar av grad 3 var det <10% chans för dräktighet.

1.3 Stoets försvarsmekanismer

1.3.1 Mottaglighet för infektion

Man kan dela in stona som resistenta eller känsliga för endometrit (Hughes & Loy, 1969; Asbury *et al.*, 1984). Med känsliga ston menas de som inte klarar av att rena bort vätskeansamlingar från uterus 12-48 timmar efter betäckning (Katila, 1995; LeBlanc *et al.*, 1995; Troedsson, 1997). Detta misstänks kunna bero på en nedsatt funktion i en eller flera av stoets försvarsmekanismer.

1.3.2 Faktorer av betydelse för skydd mot endometrit

1.3.2.1 Anatomiska barriärer

Slutningen av vulva, vestibulum och cervix är viktig för att förhindra infektion av uterus (Asbury, 1986). För optimal funktion bör vulvas dorsala kommissur inte ligga mer än 4 cm över bäckenbotten, och ca. 2/3 av vulvas öppning bör vara under bäckenbotten. Vulvaläpparna bör också ha en vertikal position med en vinkel, från kranialt till kaudalt, på under 10 grader mot vertikallinjen (Easley, 1993). Den vanligaste och rimligaste åtgärden man kan göra för att kompensera för denna nedsatta funktion är att utföra en sk Caslick operation, där man suturerar vulvaläpparna (Caslick, 1937). Skillnad i anatomisk konstitution, pneumovagina och skador i rektovaginalområdet, vulva och cervix, kan predisponera för faekal kontamination och efterföljande endometrit (Asbury, A.C. *et al.*, 1984). Problem ses ofta hos äldre ston som har haft flera föl (Peterson *et al.*, 1969; Evans *et al.*, 1986).

1.3.2.2 Kompetitiv mikroflora

I vagina, vid portioregionen finns en kompetitiv mikroflora, t.ex. lactobaciller, som normalt skyddar från infektion. Genom konkurrerens med infektiösa agens om näring och adherens till epitelet, samt produktion av antimikrobiella substanser, kan den normala mikrofloran skydda uterus mot infektion (Magnusson, 2002b). Grava störningar i denna kan predisponera för tex. en candidavaginit.

1.3.2.3 Fysisk rening av livmodern.

En fungerande endometriekontraktilitet anses vara viktig för resistensen mot persisterande endometrit (Evans *et al.*, 1986; Troedsson & Liu, 1991). Endometriet kontraherar och tömmer sekret via den i östrus öppna cervix, då kontraktionerna är effektivare i uterus under påverkan av östrogen (Asbury & Lyle, 1993).

1.3.2.4 Immunsystemet

Immunsystemet kan delas in i det cellulära och det humoral. Ett fungerande cellulärt fagocyterande försvar i uterus tros vara en av mekanismerna som bidrar till resistens mot persisterande endometrit (Asbury *et al.*, 1982; Watson, 1987). Det cellulära försvaret består f.f.a. av neutrofiler som migrerar genom endometriet och ut i uteruslumen (Asbury *et al.*, 1980; Magnusson, 2002a). Epitelet utgör en del av immunsystemet, där cellerna står för produktion av cytokiner utöver deras viktiga roll som mekanisk barriär. Cytokinerna rekryterar i sin tur neutrofiler till endometriet från cirkulationen via kemotaxi och stimulerar till förändringar i

epitelets permeabilitet samt i det lokala endotelet. Neutrofilerna fagocyterar bakterier, där fagocytosen stimuleras av opsoniner, exempelvis antikroppar, komplementsystemet och vissa andra proteiner (Magnusson, 2002a). Om detta initiala försvar ej lyckats eliminera kontaminanterna, sätts det specifika immunsystemet med T- och B-lymfocyter igång, och det produceras specifika antikroppar. Neutrofiler, T- och B-lymfocyter finns närvarande i en opåverkad uterus, men antalet varierar beroende på cyklusstadium (Magnusson, 2002a).

Det humoral immunsystemet i uterus spelar en viktig roll i försvaret mot infektion. Denna första försvarslinjen utgörs av uterussekret som innehåller lokala antikroppar och komplementfaktorer. Immunoglobulinklasser som IgA, IgG, IgG(T) och IgM har påvisats i uterussekret. Tunón *et al.* (1998) visar att transudation från plasma till uterulumen är viktig när det gäller uterussekretets innehåll av immunoglobuliner. Immunitet via lokala antikroppar i uterus är en mekanism som bidrar till att vissa ston uppvisar en resistens mot persisterande endometrit (Asbury *et al.*, 1980; Williamson *et al.*, 1983; Widders *et al.*, 1984). Studier är gjorda vilka indikerade att känsliga ston har en ökad mängd IgA, IgG och IgG(T) i sitt uterussekret jämfört med resistent ston (Asbury *et al.*, 1980). Dessa fynd kunde dock inte konfirmeras då Troedsson *et al.* (1993) inte hittade någon skillnad mellan resistent och känsliga ston vid sitt försök där utspädd uterusvätska analyserades efter intrauterin inokulation av bakterier. Man vet ej heller hur uterus immunoglobulinkoncentrationer påverkas med ålder och antal fölningar.

2 Experimentell studie

2.1 Uterussekret

Uterussekret är viktigt för reproduktionen vad gäller spermiekapacitering och befruktning, samt för den tidiga embryonala utvecklingen (Heuer *et al.*, 1993) och uterus immunförsvar, se ovan. Hos subfertila ston ses kliniskt en ökad ansamling av uterussekret under östrus (Adams *et al.*, 1987). Man har visat att efter ovulationen uppvisar känsliga ston en större ansamling av fri vätska i uterulumen än resistent ston (Allen & Pycock, 1988; LeBlanc *et al.*, 1989). Försök med inokulering av bakterier intrauterint hos sto, visade att känsliga ston uppvisar en ökning i producerad volym uterussekret jämfört med hos resistent ston (Troedsson & Liu, 1992). Fortfarande vet man inte om det är samma mekanismerna som ligger bakom produktionen av uterussekretet producerat hos resistent ston och den ökade mängd vätska som ses hos känsliga ston. Man vet ej heller om eller hur denna ökande ackumulering av uterussekret bidrar till subfertiliteten som ses hos känsliga ston, men man tror att det kan ha ett samband med att den antingen hindrar spermernas eller det tidiga embryots överlevnad, eller att den verkar hämmande på de lokala försvarsmekanismerna (Tunón, 1999). För att studera uterus immunförsvar, är samling av uterussekret ett viktigt moment. Det finns många sätt att samla detta sekret. En metod är den så kallade "uterine flushing"-metoden, som kort går ut på att uterus under östrus spolats och sekret aspireras

sedan via en modifierad Foley-kateter (Asbury *et al.*, 1983). Denna metod har diskuterats, då provet blir mycket utspätt och det är svårt att veta den ursprungliga koncentrationen av vätskan man skall analysera (Magnusson & Jonsson, 1991). Ett sätt att kringgå detta problem är att sekret samlas genom att, efter att ha infört en tampong i uterus som får ligga i 20-60 min, pressa ut sekret ur tampongen (Katila *et al.*, 1990). Detta har visat sig ge helt andra resultat än studier baserade på ”uterine flushing”- metoden (Magnusson & Jonsson, 1991). Emellertid kan tampong-metoden misstänkas inducera en lokal inflammation i endometriet och därav förändra sekretets innehåll. Risk finns även för att vissa proteiner fastnar på tampongen (Tunón *et al.*, 1998).

2.2 Syfte med studien

Denna studie syftade till att undersöka om prover som tagits med tampong är representativa för att kunna användas i studier av uterussekret. Därför jämfördes sekret samlat med tampong med sekret som aspirerats via en tunn kateter. Den senare metoden ger sannolikt det mest representativa provet, då ingen utspädning eller eventuell inflammatorisk påverkan från provtagningen bör kunna påverka innehållet i det aspirerade provet.

2.3 Material och metoder

2.3.1 Djur och experimentell design

2.3.1.1 Djur

I försöket ingick sex varmblodstravarston. Dessa ston används normalt i undervisning och i forskningsprojekt och står uppstallade vid Institutionen för Obstetrik och gynekologi, SLU, Uppsala. Fem av stona provtogs på våren, medan det sjätte, Malin, provtogs i september.

Tabell 2. Ålder och antal avkommor på sto som ingick i studien.

Namn	Ålder	Avkommor	Kommentar
Lupin	7	0	Inducerad brunst
Guldet	17	0	Inducerad brunst
Mermaid	10	0	Naturlig brunst
Ocho	7	0	Naturlig brunst
Express	12	2	Naturlig brunst
Malin	18	2	Inducerad brunst

2.3.1.2 Brunstkoll, gynekologisk- och ultraljudsundersökning

Stona kontrollerades dagligen vid institutionen med beteendereaktion inför hingst, och gynekologiska prov togs i mittbrunsten, dvs. 3-5 dagar från ståbrunstens början. Beteendereaktioner som observerades var om stona stod stilla, eventuellt också då med lägre bakdel, om dom lyfte svansen och vek den åt sidan och om de blinkade med klitoris och skvätte urin.

Tabell 3. *Reaktion inför hingst (anges med tre tecken i rad):*

	Första tecknet	Andra tecknet	Tredje tecknet
+	står för hingst	lyfter svansen och viker den åt sidan	blinkar, ev. skvätter urin
?	osäker	viftar på svansen/lyfter lite	går ej att bedöma
-	slår	ingen svansreaktion	blinkar inte

Det gjordes en gynekologisk undersökning per rektum, för att bedöma stadium i brunstcykeln (se tabell 6). För att underlätta arbetet sprutades några ston med prostaglandin för att kunna styra brunsten. I den gynekologiska undersökningen ingick även ultraljudsundersökning per rektum (5 MHz transducer, Aloka SSD-210, Aloka Co. Ltd, Japan), där man undersökte om det var förekomst av ödem i livmodern, ett ytterligare tecken på brunst. Provbilder togs vid uterus bifurkation. En sammanfattning av beteendereaktion och av de gynekologiska fynd för stona vid provtagningsstillfället ges i tabell 6.

Nomenklatur som används vid inst. för OG, vid gynekologisk undersökning av sto, där högre siffror i anger parametrar som indikerar brunst:

Yttre tecken:

Vulva-utseende:

- R1 väldigt rynkig
- R2 rynkig
- R3 slät

Vagina- slemhinnefärg:

- blek
- rosa
- laxrosa
- kärlinjicerad

Inre tecken:

Cervix – palpationsgrad och utsträckning:

- C1 hård, smal och väldefinierad
- C2 mjukare, bredare, sämre avgränsad
- C3 ej kännbar, utfluten

Uterus – tonus:

- Tdr mycket spänd livmoder som vid tidig dräktighet
- T1 kraftig tonus
- T2 måttlig tonus
- T3 tonus saknas, slapp

Uterus - slemhinnestatus

- S0 atrofi, avsaknad av aktiv slemhinna
- S1 slemhinnan kan palperas
- S2 slemhinnan har ökat i omfång, fast konsistens
- S3 slemhinnan är aktiv, tjock och elastisk

Någon dag efter provtagningarna gjordes efterkontroll med ultraljud rektalt. Detta för att undersöka om man kunde se en ökad mängd vätska som tecken på en inflammation efter retning av endometriet vid provtagningstillfället.

2.3.1.3 Cytologisk provtagning

Efter noggrann tvätt av perinealregionen med tvål och vatten, togs ett prov från uterus med skyddad provtagare (Equi-Vet, Köpenhamn, Danmark) för cytologi. Likledes togs ett prov direkt efter samlingen av sekret. Detta för att kunna studera om stoet hade någon pågående inflammatorisk reaktion i uterus innan provtagningarna, samt för att undersöka om provtagningarna i sig orsakat en inflammatorisk reaktion i endometriet. Från det skyddade provet gjordes utstryk på objektsglas och färgades sedan med ”Diff-Quik” (Diagnostica Merck, ”Hemacolor”, Kebo-lab) och studeras i mikroskop (förstoring 100x). Utstryken undersöktes för beräkning av antalet neutrofiler per 100 celler.

2.3.1.4 Uppsamling av uterussekret

2.3.1.4.1 Kateter

Ett aspirat av uterussekretet samlades via hanhundskateter (Neoplex, AC5010 CH 10FR, Swevet Piab), där mandrinen tagits ur. Katetern fördes med handskbeklädd hand in genom cervix och vidare in i uterus där den försiktigt roterades i uterus för att samla tillgängligt sekret. Sekretet aspirerades av medhjälpare med en 20 ml spruta kopplad till en kanyl (2,0 x 80 mm, TreVet) som fästes i andra änden av katetern. Aspiratet samlades sedan då det med tryck via sprutan pressades från katetern över i ett Eppendorfrör. Provet förvarades sedan nedfryst i -20°C.

2.3.1.4.2 Tampong

Tampong som användes var av human typ (OB, Mölnlycke Ltd.Sweden) och fördes in via ett metallrör (Magnusson & Jonsson, 1991) genom cervix och placerades i uterus mha ett plaströr som förde tampongen ur metallröret. Utrustningen var steriliserad innan provtagningen, och vulva tvättad. Tampongen låg i uterus i 20 minuter, och därefter togs den ut där man med handskbeklädd hand försökte skydda den från kontakt med vaginal-väggen. Sekretet pressades ur tampongen med steril vitlökspress över i ett centrifugrör, för vidare förvaring i -20°C innan analys.

2.4.2 Proteinanalys

Både aspirat- och tampongproverna av uterussekret analyserades med avseende på proteinkoncentration och -innehåll, vid Institutionen för farmaceutisk biovetenskap, avd. för toxikologi, Biomedicinskt Centrum, Uppsala, det senare med hjälp av 2D-elektrofores (2DE).

2.4.2.1 Totala proteinkoncentrationen

Innan användningen av 2DE, bestämdes proteinkoncentrationen i proverna. Proteinkoncentrationen i proverna mättes m.h.a. BCA (”Bicinchoninic acid protein assay”) protein analysmetod (Sigma). I korthet sker det en reaktion mellan proteiner och koppar under alkalina förhållanden. Därefter reduceras koppars i kopparjon-proteinkomplexet med hjälp av Folin's reagent till envärd koppar.

Reduktionen är proportionell mot proteinmängden. BCA tillförs och reagerar med reducerad koppar, därigenom bildas ett blått komplex som man mäter av i en spektrofotometer vid 560 nm våglängd. Genom att jämföra med värden från standardprover med en känd mängd BSA (bovint serum albumin) kan man räkna ut proteinkoncentrationerna i okända prover.

2.4.2.2 Provpreparering för 2DE-analys

Det är mycket viktigt att provet prepareras på ett korrekt sätt innan analysen startas, då hela resultatet påverkas av utgångsmaterialet. Målet med provprepareringen är att stoppa den endogena proteasaktiviteten, bryta upp proteinaggregat och få så många proteiner som möjligt i lösning. För att åstadkomma detta, användes en kraftig lyseringsbuffer bestående av 6M urea (Amersham Biosciences), 2M thiourea (Sigma), 4% CHAPS (Amersham Biosciences), 70 mM DTT (Amersham Biosciences) och proteashämmare (Complete Mini; Roche). Urea och CHAPS denaturerar proverna och hjälper till att göra membranassocierade proteiner mera lösliga. DTT har som egenskap att den bl a bryter disulfidbryggor som länkar samman proteinheter eller håller samman proteinernas struktur.

2.4.2.3 Första dimensionen

Proteiner är uppbyggd av aminosyror, som kan ha olika positiva eller negativa laddningar. Proteinens absoluta laddning beror på omgivningens pH. Proteiner har en så kallad isoelektrisk punkt (pI) vid det pH i omgivningen där summan av alla negativa laddningar på proteinet är lika med dess positiva laddningar. I det läge där pI är lika med pH är proteinet neutralt och påverkas därmed inte av elektriska fält.

Vid en så kallad isoelektrisk fokusering (IEF) rör sig proteinerna längs en gel med pH gradient i ett elektriskt fält. Dessa pH gradient geler kallas IPG-strippar (immobilized pH gradient; Amersham Biosciences) och finns med olika pH-intervall beroende på vilket pH man är intresserad av. Ju kortare pH intervall och längre gel, desto tydligare proteinseparation. Proteinerna vandrar tills pH är lika med deras pI och de slutar att känna av det elektriska fältet. Därigenom separeras proteinerna efter sitt pI. IPG-stripparna i denna studie rehydrerades i över 10 timmar för att uppnå sin ursprungliga tjocklek på 0,5 mm, innan de kunde användas. Det finns olika metoder för att ladda proverna på stripparna. Man kan antingen tillsätta provet till rehydreringslösningen, eller använda sig av s k cup loading, som gjordes i denna studie. Beroende på IPG stripparnas pH intervall och längd bestämdes därefter mängden voltthimmar (Vh) som de exponerades för. IEF utfördes i en IPGphor enhet (Amersham Biosciences). Ena körningens prover hade en proteinmängd på 450µg och andra körningens proteinmängd var på 200µg. Antal voltthimmar (Vh) var 54 000 för båda körningarna.

2.4.2.4 Andra dimensionen

Efter första dimensionens IEF ekvibrerades IPG stripparna i två omgångar (2x15min) för att förberedas inför andra dimensionens separation. Först blötlades IPG stripparna i en ekvibreringslösning innehållande DTT (Amersham

Biosciences). DTT bryter proteinernas svavelbryggor. Därefter byttes det till en ny lösning innehållandes en alkylator, iodoacetamide (Sigma) som alkylerar svavelgrupperna och därigenom förhindrar nybildandet av disulfidbryggor mellan och i proteinerna. Alkyleringen är också nödvändig för att ta hand om överflödigt DTT som annars skulle förmörka gelerna vid färgning samt för eventuell senare masspektrometrisk analys av proteiner i gelen.

I andra dimensionen användes SDS-polyakrylamidgeler för att separera proteinerna efter storlek. Elektroforesen kan utföras antingen i ett vertikalt system, eller på ett horisontellt plan i en s.k. Flatbed. De ekvibrerade stripparna läggs an mot gelen och därefter sätts elektroforesen igång. Systemet som användes här (Ettan Iso Dalt; Amersham Biosciences) var av den vertikala typen och kunde maximalt köra tolv geler åt gången.

2.4.2.5 Märkning

Efter att proteinerna separerades, märktes de för att kunna detekteras. Olika metoder finns tillgängliga som silver-färgning, Coomassie-blue-färgning, radioaktiv märkning eller via fluorescens. Coomassie-färgningen är mindre känslig än silverfärgning, men är lättast att använda. Vid användning av konventionella färgningsmetoder såsom silver och Coomassie är det dock bara de mest förekommande proteinerna som åskådliggörs. I dylika 2-DE körningar, med ospecifika prover, missar man ungefär 50% av alla proteiner p.g.a. av deras låga antal (Futcher *et al.*, 1999). Silverfärgning användes i denna studie på körningarna med pH 3-10.

2.4.2.6 Gelanalys

Det finns ett flertal olika 2-DE analys program ute på marknaden. Här användes ImageMaster 2D Elite Software (Amersham Biosciences) tillsammans med en Sharp JX-330 scanner för bildanalys. I programmet finns verktyg för att analysera komplexa proteinprover som har separerats mha 2D-elektrofores. Man kan här detektera proteinfläckar, och bl.a. undersöka deras intensitet och volym, korrigera och justera bakgrunden för att tydligare kunna visualisera svaga fläckar och jämföra fläckar mellan olika geler.

2.4.2.7 Statistik

Students T-test för parade prover användes för att göra jämförelser av resultaten av neutrofilantal, sekretvolym och proteinkoncentration.

2.5 Resultat och diskussion

2.5.1 Ultraljud och cytologi

Ultraljuds- och cytologiska undersökningar gjordes för att bedöma om provtagningarna hade inducerat en inflammation i uterus. Ultraljudsbilderna tagna innan provtagningarna uppvisade en normal brunstig livmoder, och ultraljudsbilderna tagna 1-2 dagar efter provtagningarna uppvisade ingen ökning av uterusvätska eller andra tecken på inflammatorisk reaktion.

Tabell 4. *Antal neutrofiler per 100 celler i utstryk från uterus.*

Namn	Före	Efter
Lupin	18	0
Guldet	0	3
Union Mermaid	0	45
Ocho	0	0
Express	0	0
Malin	0	0
Medelvärden \pm std. error	3 \pm 3	8 \pm 7,5

Ett sto uppvisade några neutrofiler i utstryket innan samlingen av sekret, vilket kan tyda på en inflammatorisk reaktion i uterus. Ett annat sto uppvisade en ökning av neutrofiler efter provtagningarna, och detta kan indikera att hos henne inducerade provtagningen en inflammatorisk inflammation. Sammantaget ökade dock inte andelen neutrofiler signifikant ($p > 0,05$) i utstryk tagna direkt efter provtagningen.

Den samlade bedömning av ultraljuds- och cytologiska undersökningarna är att tampongen ej verkar ge upphov till en inflammatorisk reaktion i slemhinnan.

2.5.2 Tampong- och aspiratprov - mängd och koncentration

Tampongproverna innehöll en större volym sekret jämfört med aspiratprovet, dock gav tampongprover från tre av stona väldigt små volym jämfört med tidigare studier, se Magnusson & Jonsson (1991), och gjorde alltså att proverna inte skilde sig signifikant, statistiskt sett ($p > 0,05$). Anledningen till varför dessa prover gav så liten volym är svårt att förklara. Proteinkoncentrationerna skilde sig inte signifikant ($p > 0,05$) mellan tampong- och aspiratproverna, men vid ett av proverna, från Union Mermaid, tagna med tampong kunde man se en 50% ökning av koncentrationen jämfört med aspiratprovet.

Tabell 5: Resultat mängd sekret, samt proteinkoncentrationen i proverna.

Namn	Mängd		Proteinkoncentration	
	Aspirat (μ l)	Tampong (μ l)	Aspirat (μ g/ μ l)	Tampong (μ g/ μ l)
Lupin	60	60	56	55
Guldet	150	1200	25,5	27,5
Union Mermaid	20	30	40	60
Ocho	15	1300	27,6	26
Express	10	40	27,5	26,5
Malin	500	1000	22	37
Medelvärden \pm std. error	126 \pm 78	605 \pm 254	33 \pm 5	39 \pm 6

2.5.3 Proteinanalys

Tampong och aspiratprover från alla ston kördes på pH 3-10 geler. Bildanalys gjordes av gelerna med avseende intensiteten på infärgningen av proteinerna och deras storlek. Fyra ston uppvisade en starkare infärgning av enstaka proteiner i aspiratprovet jämfört med provet tagit med tampong. Detta indikerar en större mängd av just dessa proteiner. Hos ett sto uppvisades en mindre tydlig infärgning av några proteiner i aspiratprovet jämfört med tampongprovet, vilket således indikerar en lägre proteinmängd av dessa proteiner i aspiratet. Hennes aspiratprov färgades dock lite avvikande, vilket gjorde det svårt att undersöka gelen och således dra några säkra slutsatser utifrån denna. Ett annat sto uppvisade inte någon större skillnad mellan aspirat- och tampongprovet. Trots att man inte ser någon skillnad mellan tampong- och aspiratproverna vad gäller proteinkoncentrationen, visar det sig alltså att proteininnehållet kan skilja sig mellan tampong- och aspiratproverna. Det kan finnas ytterligare skillnader i proteinsammansättningen eftersom 50% av alla proteiner i gelerna aldrig syns (Futcher *et al*, 1999).

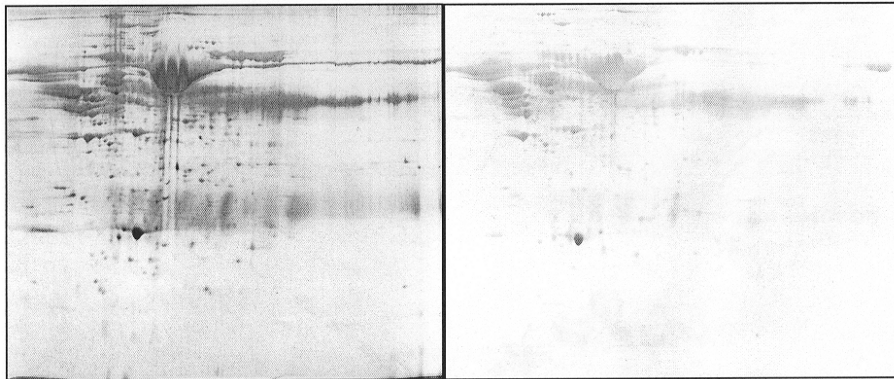


Bild 1. Gel från aspiratprov till vänster, tampongprov till höger.

2.6 Konklusion

Sammanfattningsvis kan man dra slutsatsen från denna pilotstudie att tampongmetoden inte verkar inducera någon inflammatorisk reaktion i uterus. Tampongproverna ger oftast en större volym jämfört med aspiratproverna, men proteinkoncentrationen är densamma för både tampong- och aspiratprover. Dock tycks proteinsammansättningen vara olika i tampongproverna jämfört med aspiratproverna. En möjlig förklaring till skillnaden skulle kunna vara att vissa proteiner fäster sig på tampongen, vilket gör att denna metod skulle kunna vara missvisande beroende på vilka proteiner som skall studeras. Detta innebär att prover samlade med tampong bör tolkas med försiktighet. Vidare undersökning, t.ex. med masspektrometri bör göras för att kunna undersöka vilka proteiner som skiljer sig vad gäller förekomst i tampong- och aspiratproverna.

2.7 Sammanfattning

Denna studie syftade till att undersöka om prover tagna med tampong är representativa för att kunna användas i studier av uterussekret hos sto. Uterussekret samlat med tampong jämfördes med prover samlat via aspiration, vilket anses ge ett fysiologiskt representativt prov, från sex ston vid Institutionen för obstetrik och gynekologi, SLU, Uppsala, och proteinanalyser utfördes vid Institutionen för farmaceutisk biovetenskap, avd. för toxikologi, Uppsala Universitet. Cellutstryk och ultraljud användes för att undersöka om tampongen hade inducerat en inflammatorisk reaktion i uterus som skulle kunna påverka proteininnehållet i proverna.

Resultaten indikerar att proteinkoncentrationen inte skiljer sig mellan tampong- och aspiratmetoden, men att proteininnehållet är olika i prover samlade med respektive metod. Denna skillnaden har troligtvis ej orsakad av proteiner från en inflammation inducerad av tampongen, då varken cytologi- eller ultraljudsundersökningar gav indikationer på inflammation. Således bör troligen uterussekret samlat med tampongmetoden tolkas med försiktighet.

2.8 Summary

This study was performed in order to evaluate if the method of collecting uterine secretion by the tampon-method is representative for use in studies of uterine secretions in mares. Uterine secretion collected by tampon in six mares was compared with secretion collected by aspiration, regarded to be a native sample, at the Institution of Obstetrics and Gynaecology, SLU, Uppsala. Proteinanalysis was made at the Department of Farmaceutic Bioscience, toxicological unit, Uppsala University. Cytological smears and ultrasonography was used to assess if the tampon had caused an inflammatory reaction that could influence the protein content of the samples.

The results suggest that the tampon and aspirat method do not differ when it comes to proteinconcentration, but the distribution of proteins differ between these different collection methods. This difference could not likely be explained by means of proteins due to an inflammatory reaction from the tampon, since neither the cytological nor the ultrasonographical examination gave any indications of inflammation. It is therefore suggested that uterine secretions sampled by the tampon method should be interpreted with caution.

2.9 Tack

Till min handledare Ulf Magnusson vid Institutionen för Obstetrik och gynekologi, SLU, Uppsala, för konstruktiv kritik, gott humör och tålamod!

Till Birger Scholz vid Institutionen för Farmaceutisk biovetenskap, avd. för toxikologi, BMC, Uppsala, som varit till stor hjälp både med utförande av proteinanalyserna och kritik av skriftliga arbetet!

Till Helene Gille, samt övrig OG-personal för utmärkt assistans vid provtagningsstillfällena!

Till Lena Norström för utmärkt assistans vid provpreparering och körningar på BMC!

Till Johan för allt stöd och för hjälp med små och stora datatekniska problem!

Till mamma och pappa för att ni alltid stödjer och ställer upp för mig!

Till övrig familj och mina vänner!

Och sist men inte minst ett stort tack till alla ston som ställt upp utan större protester för att göra denna studie möjlig!

Tabell 6. Bedömning vid gynekologisk undersökning hos sto, vid provtagningstillfället

	Lupin	Guldet	Mermaid	Ocho	Express	Malin
Vulva	R2	R 2-3	R2-3	R2	R 2-3	R2
Vest. Vagina, färg	Rosa	Laxrosa	Rosa	Rosa	Laxrosa	Rosa- laxrosa
Cervix	C2	C2	C3	C2	C2	C2-3
Uterus tonus	T2	T2-3	T2	T2-3	T2-3	T2-3
Uterus slemhinna	S2	S2	S3	S2-3	S2	S3
Ovarier vänster,cm	7,5x4x3	8x4,5x4	8x5,5x4,5	7x4x3	8x4,5x3	7,5x4x3
Ovarier höger,cm	6,5x3x3	7x4x3	7x5x4	7x3,5x2,5	7x4x3	7x4x3,5

3 Referenslista

- Adams, G.P., Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R. & Ginther, O.J. 1987. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. *J. Repr. Fert. Suppl.* 35, 445-454
- Albihn, A., Båverud, V. & Magnusson, U., 2000. Bacteria in uterine samples from swedish mares with fertility problems and antimicrobial susceptibility. *14th I.C.A.R.*, 19
- Allen, W.E. & Pycock, J.F. 1988. Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis. *Vet. Record* 122, 489-490
- Allen, W.E. & Pycock, J.F. 1989. Current views on the pathogenesis of bacterial endometritis in mares. *Vet. Record* 125, 298
- Allen W.R. 1993. Proceedings of the John P. Hughes International Workshop on Equine endometritis. *Equine Vet J* 25, 184-193
- Asbury, A.C., Halliwell, R.E.W., Foster, G.W., Longino, S.J. 1980. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology* 14, 299-308
- Asbury, A.C., Schultz, K.T., Klesius, P.H., Foster, A.W. & Washburn, S.M. 1982. Factors affecting fagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. *J. Repr. Fert. Suppl.* 32, 151-159
- Asbury, A.C., Gorman, N.T. & Foster, G.W. 1984. Uterine defense mechanisms in the mare: serum opsonins affecting phagocytosis of streptococcus zooepidemicus by eqine neutrophils. *Theriogenology* 21, 375-385.
- Asbury, A.C. 1986. Endometritis in the mare. *Current therapy in theriogenology*, ed. Morrow, D.A., W.B.Saunders Company, 718-722
- Asbury, A.C. & Lyle, S.K. 1993. *Equine Reproduction*. Eds McKinnon, A.O. & Voss, J.L. Philadelphia, Lea & Febiger, 381
- Caslick, E.A. 1937. The vulva and vulvo-vaginal orifice and it's relation to genital health of the Thoroughbred mare. *Cornell vet.*, 27, 178-206.
- Easley, J. 1993. External perianal conformation. *Eqine Reproduction*, ed. McCinnon, A.O. & Voss, J.L., Lea & Febiger, Philadelphia, 20-24

- Evans, M.J., Hamer, J.M., Gason, L.M., Asbury, A.C. & Irvine, C.H.G. 1986. Clearance of bacteria and none-antigenic markers following intrauterine inoculation into maiden mares; effect of steroid hormone environment. *Theriogenology* 26, 37-50
- Evans, M.J., Hamer, J.M., Gason, L.M. & Irvine, C.H.G. 1987. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35, 327-334
- Futcher, B., Latter, G.I., Monardo, P., McLaughlin, C.S. & Garrels, J.I. 1999. A sampling of the yeast proteome. *Mol. Cell Biol.* 11, 7357-7368
- Ginther, O.J. 1986. *Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare*. Equisciences, 178-179, 191-192, 161-163
- Hinrichs, K., Cummings, M.R., Sertich, P.L. & Kenney, R.M. 1988. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. *JAVMA*, 193, 72-75
- Heuer, J.A., King, S.S., Gardiner, C.S., Ferreira-Dias, G. & Nequin, L. 1993. Uterine secretions from different endometrial classifications affect the viability of early murine embryos cultured in vitro. *J Equine Vet Sci* 13, 494-497
- Hughes, J.P. & Loy, R.G. 1969. Investigations of the effect of intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. *Proc. 15th Ann Conv Am. Assoc. Eq. Pract.*, 285-289
- Katila, T., Lock, T.F., Hoffmann, W.E. & Smith, A.R. 1990. Lysozyme, alkaline phosphatase and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology* 33, 723-732
- Katila, T. 1995. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol Repro Mono* 1, 515-517
- Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper, W.L. & Morse, G.W. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares : technique and preliminary findings. *Proc. 21st Ann. Conv. Am Assoc. Eq.Pract.*, 327-335
- Kenney, R.M. 1978. Cyclic and pathologic changes of mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death *J. Am. Vet. Med. Assn.* 172, 241-262
- Knudsen, O. 1964. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares *CornellVeterinarian*, 54, 415-422
- Knudsen, O. & Nydahl, C. 1983. Praktisk diagnostik av endometrit hos sto, *Svensk Veterinärtidning* 35, 321-326

- Le Blanc, M.M., Asbury, A.C. & Lyle, S.K. 1989. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. *Am J Vet Res* 50:864-867
- Le Blanc, M.M., Johnson, R.D., Calderwood Mays, M.B. & Valderrama, C., 1995. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biol. Reprod. Mono. Ser 1*, 501-506
- Le Blanc, M.M. 1997. The equine endometrium and pathophysiology of endometritis. *Proc. Reprod. Pathol.*, 78-84
- Magnusson, U. & Jonsson, K., 1991. A method for the accurate measurement of opsonic activity in uterine secretions of the mare. *Theriogenology*, 36, 737-747
- Magnusson, U. 2002a. Examination techniques of the uterus – Cellular and humoral immunology of the uterus *Nova Course, Saari, Finland*
- Magnusson, U. 2002b. Livmoderns försvarsmekanismer mot infektioner, Föreläsning, SLU, Uppsala, 02.01.30.
- Nikolakopoulos, E. & Watson, E.D. 1999. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid, but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology* 52, 413-423
- Peterson, F.B., McFeely, R.A. & David, J.S.E. 1969. Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare. *Proc. 15th Ann. Conv. Am Assoc. Eq. Pract.* 279-282
- Platt, H., Atherston, J.G. & Orskov, I. 1977. Klebsiella and enterobacter organisms isolated from horses. *J. Hyg. Camb.* 77, 401-408
- Pycock, J.F. & Allen, W.E. 1990. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Vet. J.* 22, 422-425
- Ricketts, S.W. & Mackintosh, M.E. 1987. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35, 343-351
- Ricketts, S.W. & Alonso, S. 1991. The effect on age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet J* 23, 189-192
- Traub-Dargatz, J.L., Salman, M.D. & Voss, J.L. 1991. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners *J. Am. Vet. Res.* 198, 1745-1747
- Troedsson, M.H.T. & Liu, I.K.M. 1991. Uterine clearance of non-antigenic

- markers (Cr51) in response to bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infection. *J Reprod Fertil Suppl* 44:283-288
- Troedsson, M.H.T. & Liu, I.K.M. 1992. Measurement of total volume and protein concentration of intrauterine secretion after intrauterine inoculation of bacteria in mares that were either resistant or susceptible to chronic uterine infection. *Am J Vet Res* 53, 1641-1644
- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M. & Thurmond M, 1993. Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretions following intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible versus resistant to chronic uterine infection *Biol Reprod* 49, 502-506
- Troedsson, M.H.T., Steiger, B.N., Ibrahim, N.M., King, V.L., Foster, D.N. & Crabo, B.G. 1995. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. *Biol Reprod* 52 (Suppl. 1), 507
- Troedsson, M.H.T. 1997 Uterine response to semen deposition in the mare. *Proc. Soc. Theriogenol. Ann Mtg, San Antonio*, 130-135
- Tunón, A-M., Rodríguez-Martínez, H., Hultén, C., Nummijärvi, A. & Magnusson, U. 1998. Concentrations of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares *Theriogenology*, 50, 821-831
- Tunón, A-M. 1999. The endometrium of the gynecologically healthy mare during oestrus, *Veterinaria* 43, SLU
- Tunón, A-M., Katila, T., Magnusson, U., Nummijärvi, A. & Rodríguez-Martínez, H. 2000. T-cell distribution in two different segments of the equine endometrium 6 and 48 h after insemination. *Theriogenology* 54, 835-841
- Waites, G.T. & Bell, S.C. 1982. Glycogen-induced intrauterine leucocytosis and its effect in mouse blastocyst implantation in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* Nov;66(2):563-569
- Watson, E.D. 1987. Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis – a review. *Equine Vet. J.* 20, 397-400
- Watson, E.D. 2000. Post-breeding endometritis in the mare *Animal Reprod Sci* 60-61, 221-232
- Widders, P.R., Stokes, C.R., David, J.S.E., Bourne, F.J. 1984. Quantitation of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare. *Res Vet Sci* 37, 324-330

- Williamson, P., Dunning, A., O'Connor, J., Penhale, J. 1983.
Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis. *Theriogenology* 19, 441-448
- Wingfield Digby, N.J. & Ricketts, S.W. 1982. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. *J. Reprod.Fert. Suppl.* 32, 181-185