

Mastcellsfunktionen vid pyometra hos hund

Sofia Wikström

**Handledare: Ragnvi Hagman
Inst. för kliniska vetenskaper, smådjur, SLU
Biträdande handledare: Gunnar Pejler
Inst. för anatomi, fysiologi och biokemi**

INNEHÅLL

Summary	3
Sammanfattning	4
Introduktion	5
Pyometra hos hund – bakgrund	5
Kliniska tecken	5
Diagnostik och behandling	5
Mastceller.....	6
Mastcellers funktion	6
Mastceller hos hund	7
Syfte	7
Material och metoder	7
Etisk prövning.....	7
Djur	7
Blodprovstagning och analyser.....	8
ELISA	8
Proteolytisk enzymaktivitet i plasma; S2288 assay	9
Makroskopisk och histopatologisk undersökning.....	9
Bakteriologisk undersökning	9
Statistiska beräkningar	9
Resultat	10
Histamin.....	10
Neurotensin	10
Endothelin.....	11
Proteolytisk enzymaktivitet i plasma	11
Hematologiska och biokemiska parametrar	14
Diskussion.....	14
Referenser	16

SUMMARY

Pyometra, chronic purulent metritis in metoestrus, is a common disease in intact bitches. About 25% of all bitches in Sweden have contracted the disease before ten years of age. Clinical signs of the disease are varied, and the course may be either slow or acute. The diagnosis is most commonly made by radiographical or ultrasonographical examination of the abdomen in combination with blood biochemical and hematological analyses. The safest and most efficient treatment of pyometra is surgical ovariohysterectomy.

There is room for improvement of both diagnostic tools and possible prognostic indicators for pyometra.

Mast cells are large leucocytes, with granule that contain inflammatory mediators. They are traditionally associated to allergic reactions, but also take part in slower immune-responses, e g against parasites and bacteria. There are several mast cell-related proteins that can be measured in blood.

In this study plasma levels of histamine, serine proteases, endotheline and neotensine were measured in 15 bitches with pyometra and 6 healthy control bitches. In two of the analyses performed (ELISA for histamine and proteolytic enzyme activity in plasma; S2288 assay) there were significant differences between the two groups . In two other analyses (ELISA for neotensin and ELISA for endothelin) there were no statistically significant differences observed in the plasma levels measured in the two groups.

The results of this pilot study indicate that mast cells are activated in pyometra in bitches, but further studies are needed to determine future possible clinical use.

SAMMANFATTNING

Pyometra, varbildande livmoderinflammation, är en vanlig sjukdom hos okastrerade tikar som drabbar nästan 25% av svenska tikar före tio års ålder. Kliniska tecken på sjukdom kan variera kraftigt och sjukdomsförloppet kan vara antingen smygande eller akut. Diagnosen ställs vanligtvis med hjälp av bilddiagnostik och biokemiska samt hematologiska blodanalyser. Behandlingen av pyometra är i första hand kirurgisk.

Diagnostiskt finns det utrymme för utveckling, både av mer specifika diagnostiska tester men även av möjliga prognostiska markörer för pyometra.

Mastceller är stora leukocyter med granula som innehåller inflammatoriska mediatorer. De associeras traditionellt framför allt till allergier, men spelar också roll i ett långsammare immunsvaret, t ex mot parasiter och bakterier. Flertalet proteiner relaterade till mastceller är mätbara i blod.

I denna studie mättes histamin-, serinproteas-, endothelin- och neurotensinnivåer i plasma hos 15 tikar med pyometra samt hos 6 friska kontrolltikar. Både för histamin (ELISA) och proteolytisk enzymaktivitet i plasma (S2288 assay), uppmättes signifikanta skillnader i nivåerna mellan de två grupperna. Beträffande nivåerna av neurotensin (ELISA) och endothelin (ELISA) var uppmätta skillnader inte signifikanta.

Resultaten av denna pilotstudie indikerar att mastceller aktiveras vid pyometra hos tik, men fortsatta studier behövs för att bedöma möjlig klinisk användbarhet.

INTRODUKTION

Pyometra hos hund – bakgrund

Pyometra, varbildande livmoderinflammation, är en vanlig sjukdom hos okastrerade tikar och det är den vanligaste anledningen till bukoperation på tik i Sverige (*Egenvall et al., 1999*). Dödligheten är ca 3-4 %, men utan behandling leder sjukdomen alltid till döden. Risken för att en tik ska drabbas av pyometra ökar med åldern och den vanligaste åldern för insjuknande är 6,5–8,5 år (*Egenvall et al., 2001*). I genomsnitt har uppemot 25 % av alla svenska tikar drabbats av pyometra vid tio års ålder. Risken för att utveckla pyometra är till viss del rasrelaterad och hos de mest drabbade raserna är motsvarande andel 50 % (*Egenvall et al., 2001*). Sjukdomen har en hormonell bakgrund där progesteron spelar en viktig roll. Tikar har en lång lutealfas (progesteronfas) i sin löpcykel (ca 70-100 dagar). Progesteron påverkar till stor del miljön i livmodern efter ovulation och gör den gynnsam för fosterutvecklingen, men om bakterier finns på plats gynnas också deras tillväxt av den fördelaktiga miljön. Vid odling av bakterier från livmödrar med pyometra är *Escherichia coli* (*E. coli*) den mest förekommande bakterien, men *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp* kan också förekomma, likaså blandade infektioner (*Fransson et al., 1997*).

Kliniska tecken

De kliniska tecknen på pyometra är många gånger relativt ospecifika och sjukdomsförloppet kan vara antingen smygande eller akut. Nedsatt allmäntillstånd, anorexi, kräkningar, diarré, polyuri och polydipsi är vanligt förekommande sjukdomssymptom. Hos en stor andel av tikarna med pyometra ses en purulent flytning från vulva. Flytningen kan vara intermittent eller konstant och mängden kan variera. Pyometra kan också leda till chock genom septikemi eller endotoxinemi. Det finns risk för att livmodern blir så pass varfylld och skör att den spricker, vilket leder till peritonit och sämre prognos. I vissa fall kan den förstörade livmodern kännas vid bukpalpation. (*Maretta et al., 1989*)

Diagnostik och behandling

Vid hematologisk undersökning kan man oftast se leukocytos med vänsterförskjutning, monocytos och tecken på toxiskt påverkade neutrofiler. Dock kan totalantalet vita blodkroppar och differentialräkningen variera kraftigt och även ligga inom normalintervallet hos vissa tikar. Leukopeni med degenerativ vänsterförskjutning kan förekomma. Anemi kan förekomma, likaså hyperglobulinemi och hyperfibrinogenemi. Hematologisk undersökning kan således inte fastställa diagnosen, men är en viktig del i diagnostiken.

Abdominell röntgen eller ultraljud kan användas, som komplement till hematologisk undersökning, för att avgöra om livmodern är förstörad och om den innehåller vätska. Diagnosen kan dock inte fastställas helt genom bilddiagnostik heller, eftersom att man inte kan se om den förstörade livmoderns innehåll är varigt eller inte.

Preliminär diagnos ställs genom den kliniska bilden och anamnes i kombination med hematologisk undersökning och bilddiagnostik, den slutgiltiga diagnosen fastställs vid ovariehysterektomi (bortoperation av livmoder och äggstockar, OHE).

Den säkraste och mest effektiva behandlingen är kirurgisk (OHE). I vissa fall kan medicinsk behandling övervägas. Medicinsk behandling är antibiotika, ofta i kombination med preparat som kontraherar livmodern och tömmer den på var. Risken för återfall vid nästa lutealfas är dock mycket stor vid medicinsk behandling och detta skall tas i åtanke innan behandlingen sätts in. (*Purswell, 1997*)

Mastceller

Mastceller är stora leukocyter med granula som innehåller inflammatoriska mediatorer. Dessa frisätts vid stimuli genom så kallad degranulering. Mastceller finns nära blodkärl i alla vävnader. De har sitt ursprung i benmärgen och cirkulerar i blodet endast som precursorceller. Celldifferentieringen sker ute i vävnaden, där mastcellerna sedan är relativt stationära. Mastceller associeras traditionellt framför allt till allergiska reaktioner, men spelar också en roll i försvaret mot bakterier och parasiter. Vid inflammation ökar antalet mastceller i vävnaden. (*Okayama et al., 2006*)

Mastcellers funktion

De inflammatoriska mediatorer som frisätts vid stimuli av mastcellen är både proteaser och andra mediatorer, som till exempel histamin, cytokiner, samt serglycin-proteoglykaner. De proteaser som är mastcellspecifika är tryptaser, chymaser och chymotrypsinogen A (*Pejler et al., 2007*). Hos hund finns ett chymotrypsinogen (*Caughey et al., 1990*) och ett tryptas (*Vanderslice et al., 1989*) dokumenterat. Det vanligaste stimuli för mastceller att släppa ut inflammationsmediatorerna är att antigen korsbinder till IgE-molekyler på mastcellens yta via Fc-receptorer. Detta ger ett snabbt frisläppande av granula och leder till en allergisk reaktion där histamin är en viktig faktor (*Duarte et al., 2007*).

Mastceller spelar också en roll i ett långsammare försvar. De möjliggör då en väg det adaptiva immunförsvaret kan gå, och medverkar till en fördröjd reaktion på den akuta inflammationen genom frisläppning av leukotriener och prostaglandiner. Leukotriener och prostaglandiner syntetiseras vid stimuli av mastcellen och verkar således senare än till exempel histamin som redan finns klart i granula vid frisättningen.

En av de två huvudsakliga proteintyper som utsöndras av mastceller vid degranulering är tryptaser, som är proteaser av typen serinproteaser. De utsöndrade tryptaserna bidrar till inflammation, matrixnedbrytning och vävnadsremodellering genom ett flertal mekanismer. Inflammation kan indirekt hämmas av tryptaser genom att de inaktiverar allergener och neuropeptider (*Caughey G.H. 2007*). Tryptaser är bland de mest specifika mastcellsprodukterna, och är mätbara i blod (*Caughey G.H. 2006*).

Neurotensin är en peptid som återfinns framför allt i centrala nervsystemet (CNS). Neurotensin kan också verka utanför CNS, t ex i mag-tarmkanalen, där det kan stimulera inflammatoriska reaktioner, bland annat genom mastcellsdegranulering. (St-Gelais F. et al., 2006)

Mastcellschymaser kan aktivera frisättningen av endothelin kraftigt (Hara M. et al., 2002). En förhöjning av endothelin i blodet kan alltså tyda på mastcellsdegranulering. Endothelin finns framför allt i endotelceller och har en blodtryckshöjande effekt genom att de stimulerar vasokonstriktion.

Mastceller hos hund

Hos hund har tre olika typer av mastceller påvisats, samma som hos människa. Skillnaden mellan de olika mastcellstyperna är framför allt sammansättningen av proteaser, chymaser och tryptaser. De kan skiljas åt histologiskt med hjälp av olika infärgningsmetoder (Kube et al., 2004). De organ hos hund där flest mastceller återfinns är lunga, hud och lever (Noviana et al., 2004). Mastceller av alla tre sorter finns i hundars livmodervävnad. Man kan inte se någon fördelning i livmodervävnadens olika lager i avseende på mastcellsantalet, vilket man kan i många andra organ, till exempel mage och tarm. (Kube et al., 2004)

Syfte

Syftet med denna studie var att undersöka om mastceller aktiveras och degranuleras vid pyometra genom att undersöka förekomsten av mastcellsenzymer och andra relaterade proteiner i plasma från tikar med pyometra och friska kontrolltikar. Om nivåerna av något mastcellsenzym är förhöjda vid pyometra skulle möjligen en analys därav kunna bidra till en för sjukdomen mer specifik diagnostik eller användas som prognostisk indikator.

MATERIAL OCH METODER

Etisk prövning

Innan studien påbörjades var ansökan om etiskt tillstånd godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd. Varje djurägare var informerad om studien och hade godkänt sitt djurs delaktighet skriftligt eller via telefonkontakt.

Djur

De hundar som ingick i studien var alla patienter vid Universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, vid provtagningstillfället. De tikar som hörde till kontrollgruppen inkom till djursjukhuset för OHE utan tecken på livmodersjukdom, så kallad normalkastration. Resterande tikar i studien inkom till djursjukhuset på grund sjukdomstillstånd som senare diagnosticerades som pyometra, och behandlades med OHE.

Två av de åtta hundar som ursprungligen ingick i kontrollgruppen fick uteslutas ur studien då en av dem hade en omfattande muskelskada och den andra var mycket stressad vid provtagningstillfället. Båda dessa omständigheter kan leda till mastcellsdegranulering (Bortolotto et al., 2007, Arck et al., 2006).

Efter den makroskopiska och histopatologiska undersökningen fick även två av 17 sjuka hundar med klinisk diagnos pyometra uteslutas ur studien. Deras livmödrar visade endas tecken på cystisk endometriehyperplasi och inga tecken på pyometra eller annan inflammation.

Antalet friska kontroller som slutligen ingick i studien var sex tikar och antalet sjuka (tikar med pyometra enligt PAD, patologanatomisk diagnos) var femton.

Blodprovstagning och blodanalyser

Blopprovstagning skedde i serum och EDTA-rör (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österrike) i samband med operationstillfället, vid isättandet av permanent venkateter i vena cephalica. Ett stort antal parametrar undersöktes, både biokemiska och hematologiska analyser, detta för att uppmärksamma eventuella sjukdomar och tillstånd som riskerade att ge ett missvisande resultat i studien. Dessa prover analyserades vid laboratoriet för klinisk kemi vid UDS, SLU. De parametrar som undersöktes var: Alaninaminotransferas (ALAT), alkaliskt fosfat (ALP), urea, kreatinin, albumin, gallsyror, hemoglobin, erytrocyt volymfraktion (EVF), totalantal leukocyter, partikelkoncentration (LPK) inklusive differentialräkning (stavkärninga granulocyter, segmentkärninga granulocyter, eosinofiler, basofiler, lymfocyter, monocyter) och förekomst av kärnförande erytrocyter (erytrocyt-kf).

De analyser som utfördes i studien var Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) för påvisande av histamin, endothelin och neurotensin samt en analys av enzymaktivitet med tillsatt kromogent substrat för påvisande av tryptas.

ELISA

ELISA är en metod där man utnyttjar antikroppars förmåga att binda till givna receptorer. Botten av en 96-hålsplatta täcks med antikroppar mot det ämne man vill påvisa, t ex mot histamin. Till dessa tillsätts sedan plasmaprover, och eventuellt histamin i plasman binder till antikropparna i brunnarna. Brunnarna tvättas upprepade gånger med en buffert innan ett enzymkonjugat tillsätts, detta tävlar med eventuellt fritt histamin om bindning till antikropparna innan plattan tvättas igen.

Reaktionen stoppas med en syra och sedan läses plattan av i en spektrofotometer. Prosvaren i de ELISA-kit som använts i denna studie fås i nanogram givet protein per milliliter.

De färdiga kit som använts är *Endothelin-1 (S-1171)* och *Neurotensin (S-1206)* (Bachem, Bubendorf, Schweiz) samt *Enzyme Immunoassay for Histamine (Life Science Format) Product No. EA 31* (Oxford Biomedical Research, Oxford, England). För vidare detaljer om utförande se tillverkarnas protokoll för respektive kit.

Proteolytisk enzymaktivitet i plasma; S2288 assay

Genom att tillsätta ett kromogent substrat (här S2288) till plasmaprover och sedan köra proverna upprepade gånger genom en spektrofotometer kan en eventuell närvaro av ett givet proteolytiskt enzym i plasman mätas. Ett kromogent substrat är syntetiskt och formgivet att efterlikna selektiviteten hos enzymets naturliga substrat. Reaktionen mellan det kromogena substratet och enzymet ger en färg på provet. Färgförändringen registreras av spektrofotometern vid upprepade mätningar som en linje med ökande lutning. Om inget enzym i plasman passar till det tillsatta substratet, och reaktionen således uteblir, ses en rät linje (ingen färgning av provet sker). För att bekräfta att det är just det enzym man letar efter som ger reaktionen körs två eller fler prover av varje plasmaprov, ett med substrat och plasma och andra där man även tillsatt en specifik enzymhämmare. I detta försök användes fyra olika hämmare.

Tillvägagångssättet var som följer: Till en 96-hålsplatta tillsattes 20 µl av substratet S2288 tillsammans med 100 µl PBS och 20 µl plasma per brunn. Som hämmare användes pefabloc, 50 mM, 5,6 µl/brunn samt trypsininhibitor, N-ethylmaleimide (NEM) och pepstatin 10 µl/brunn.

Makroskopisk och histopatologisk undersökning

Vävnad från livmoder och äggstockar lades i samband med operationen i formalin och analyserades sedan vid Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), enheten för patologi och viltsjukdomar. Där graderades de efter en skala 0-V där 0 motsvarade inga patologiska förändringar, I motsvarade Cystisk endometriehyperplasi (CEH), II motsvarade CEH med endometrit, III motsvarade endometrit utan cystor, IV motsvarade pyometra (innefattande CEH) och V motsvarade atrofisk pyometra. I denna studie användes prover från hundar där livmodern bedömts som 0 som friska kontroller och resterande prover kom från hundar med bedömningen IV (pyometra).

Bakteriologisk undersökning

Svabbprover från livmoderns insida togs med en Culturette® (Copan Innovation, Brescia, Italien) vid operationstillfället och skickades till SVA, avdelningen för bakteriologi, för bakteriologisk odling, artbestämning och antimikrobiell resistensbestämning.

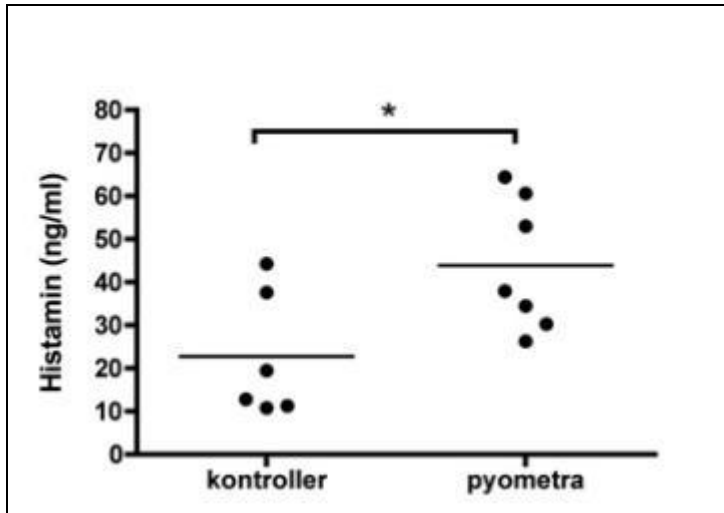
Statistiska beräkningar

De statistiska beräkningar som gjorts på resultaten i denna studie är oparade t-test, two-tailed. Signifikansen har bedömts enligt denna mall: p-värde <0,05 enstjärnig signifikans, p-värde <0,01 tvåstjärnig signifikans, p-värde <0,001 trestjärnig signifikans.

RESULTAT

Histamin

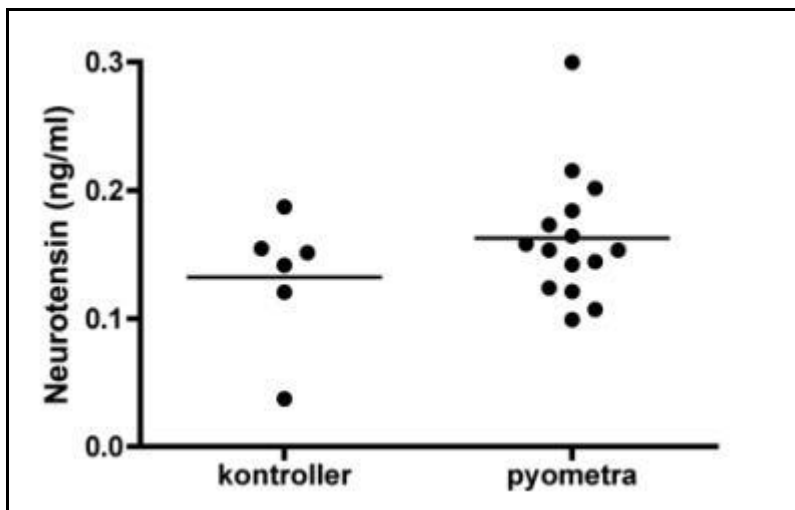
Försöket visade, med enstjärnig signifikans, att tikar med pyometra har en förhöjd nivå av histamin i blodet (Figur 1).



Figur 1. Histaminnivå i plasma (ng/ml). Skillnaden mellan grupperna (kontroll respektive pyometra) uppnådde enstjärning statistisk signifikans

Neurotensin

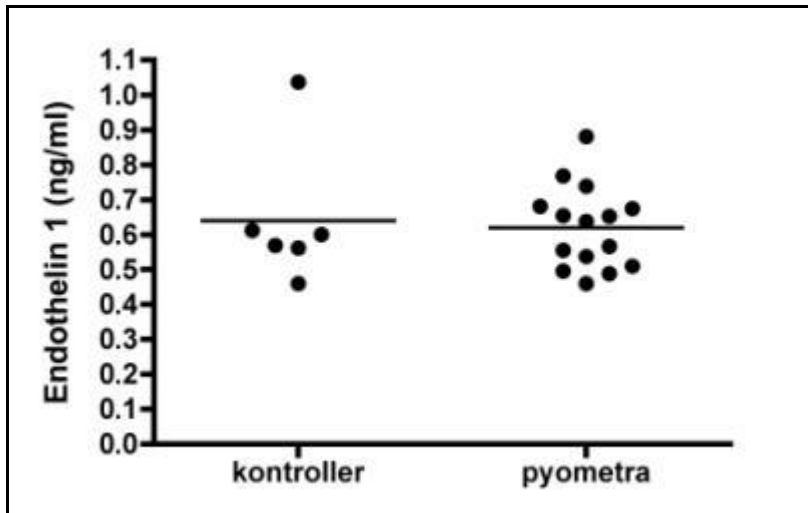
Försöket visade inga signifikanta skillnader i plasmanivåer av neurotensin hos tikar med pyometra respektive friska tikar (Figur 2).



Figur 2. Neurotensinnivå i plasma (ng/ml) hos friska kontrolltikar och tikar med pyometra. Ingen statistiskt signifikant skillnad observerades mellan grupperna

Endothelin

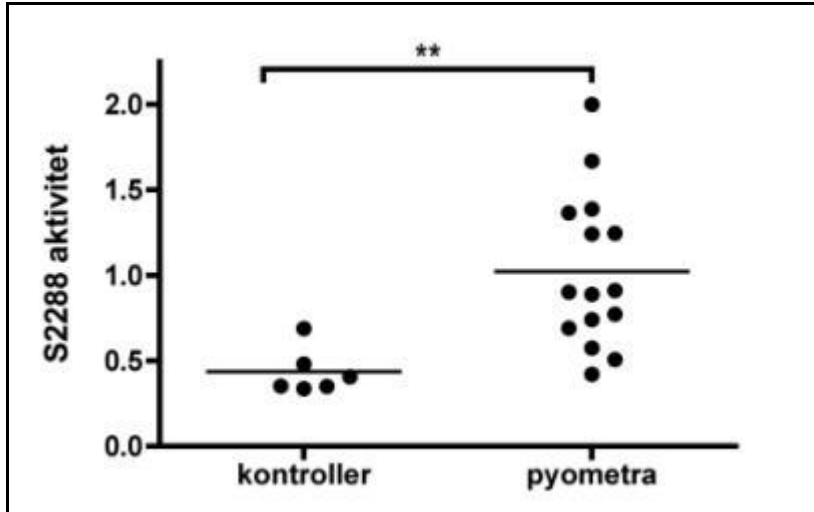
Försöket visade inga signifikanta skillnader i plasmanivåer av endothelin mellan tikan med pyometra och friska tikan (Figur 3).



Figur 3. Endothelinnivå i plasma (ng/ml) hos friska kontrolltikan och tikan med pyometra. Ingen statistiskt signifikant skillnad observerades mellan grupperna

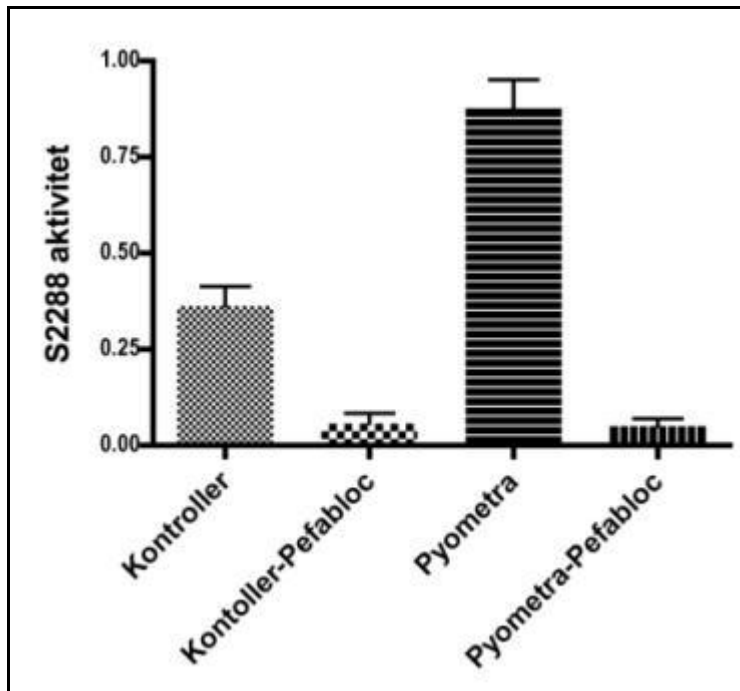
Proteolytisk enzymaktivitet i plasma

Försöket visade med tvåstjärnig signifikans en högre S2288-aktivitet hos tikan med pyometra än hos friska tikan (Figur 4).



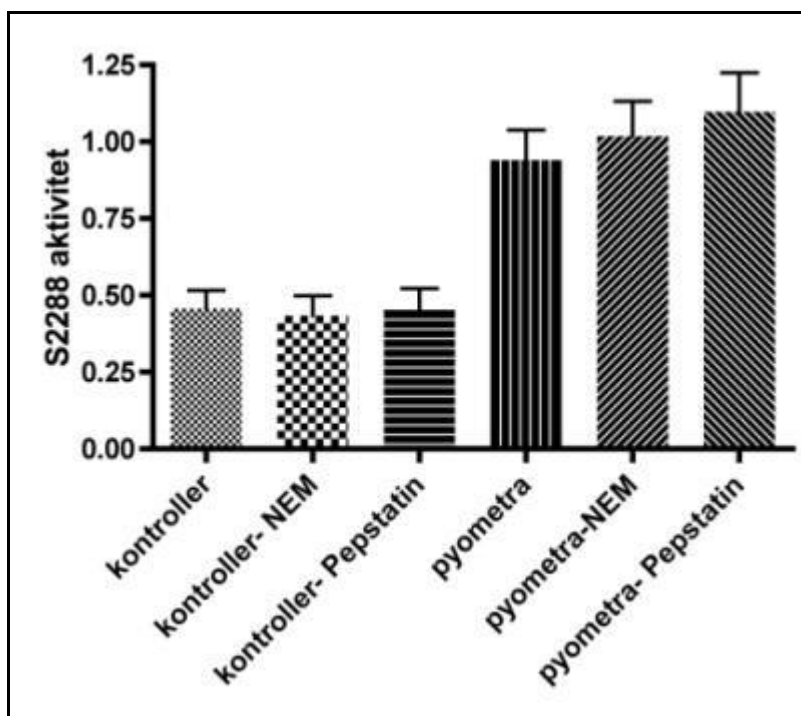
Figur 4. S-2288-aktivitet i plasma hos friska kontrolltikan och tikan med pyometra. Skillnad mellan grupperna har en tvåstjärnig statistisk signifikans

Vid tillsats av enzymhämmaren pefabloc sänktes enzymaktiviteten signifikant hos både kontroller och tikar med pyometra (Figur 5).



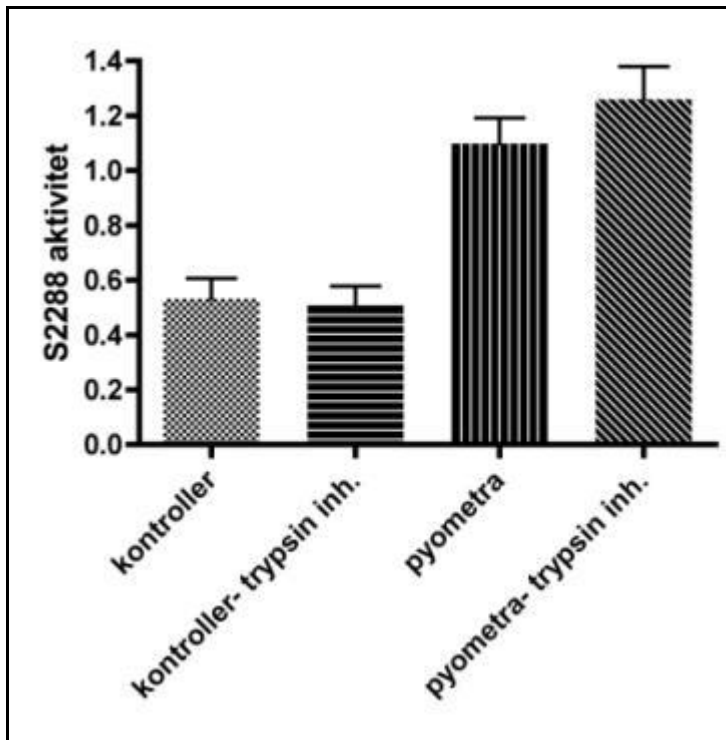
Figur 5. Aktivitetspåverkan (S-2288) hos friska kontrolltikar och tikar med pyometra vid närvaro av enzymhämmaren pefabloc

Vid tillsats av enzymhämmarna NEM och pepstatin sågs ingen signifikant skillnad i enzymaktiviteten (Figur 6).



Figur 6. Aktivitetspåverkan (S-2288) hos friska kontrolltikar och tikar med pyometra vid närvaro av enzymhämmarna NEM och pepstatin

Vid tillsats av enzymhämmaren trypsininhibitor sågs ingen signifikant skillnad i enzymaktivitet (Figur 7).



Figur 7. Aktivitetspåverkan (S-2288) hos friska kontrolltikar och tikar med pyometra vid närvaro av enzymhämmaren trypsininhibitor

Hematologiska och biokemiska parametrar

De hematologiska och biokemiska parametrarna som analyserades visade resultat som förväntas se vid pyometra. Statistiskt signifikanta skillnader sågs i följande parametrar: ALP högre hos tikar med pyometra än tikar i kontrollgruppen, LPK högre hos tikar med pyometra än tikar i kontrollgruppen, segmentkärninga granulocyter högre hos tikar med pyometra än tikar i kontrollgruppen och monocyter högre hos tikar med pyometra än tikar i kontrollgruppen (Tabell 1).

	Kontroller medel ±SD (max-min)	Antal kontroller	Pyometra medel ±SD (max-min)	Antal pyometra	p-värde (t-test)
ALAT	0,5±0,3 (0-0,9)	6	0,5±0,3 (0,3-1,3)	14	0,95
ALP	1,4±0,6 (0,8-2,3)	6	5,1±4,3 (0,8-18,2)	15	0,006**
Urea	5,2±1,3 (3,9-7,5)	6	7,4±14,0 (1,2-57,5)	15	0,551
Krea	76±14 (52-89)	6	106±177 (65-747)	15	0,529
ALB	29±2 (26-32)	6	34±40 (12-174)	14	0,657
gallsyror	3,1±1,4 (1,2-4,6)	6	4,6±5,4 (0,6-20,4)	15	0,336
Hb	140±20 (111-162)	5	120±30 (57-175)	15	0,136
EVF	0,4±0,1 (0,3-0,5)	5	0,3±0,1 (0,2-0,5)	15	0,158
LPK	8,1±2,1 (6,3-11)	5	19,6±15,6 (2,8-59,4)	15	0,014*
Stavk. Gran.	0,0±0,0 (0,0-0,0)	4	3,4±5,0 (0,0-13,7)	14	NA
Segmk. Gran	4,7±1,1 (3,7-6,3)	4	13,5±9,7 (11,3-35,6)	14	0,005**
Eosinofiler	0,4±0,4 (0,2-1,1)	5	0,6±0,7 (0,0-2,4)	15	NA
Basofiler	0,0±0,0 (0,0-0,0)	5	0,0±0,1 (0,0-0,2)	15	NA
Lymfocyter	2,2±0,8 (1,6-3,6)	5	1,4±0,9 (0,1-3,2)	15	NA
Monocyter	0,4±0,2 (0,3-0,8)	5	1,6±1,9 (0,2-7,7)	15	0,035*
Ery. Kf	0,0±0,0 (0,0-0,0)	4	0,1±0,3 (0,0-1,0)	13	NA

Tabell 1. resultat av blodprovparametrar analyserade hos friska kontrolltikar och tikar med pyometra i denna studie. *=statistisk signifikant skillnad mellan grupperna, enstjärnig. **=statistisk signifikant skillnad mellan grupperna, tvåstjärnig. NA= inte analyserat. ALAT= alanin aminotransferas; ALP= allaliskt fosfatas; krea= kreatinin; ALB= albumin; Hb= hemoglobin; EVF= erytrocyt volymfraktion; LPK= partikelkoncentration leukocyter; Ery.Kf= Kärnförande erytrocyter

DISKUSSION

Tikar med pyometra hade högre nivåer av mastcellstryptas i blodet jämfört med de friska kontrolltikarna. Skillnaden mellan grupperna var tvåstjärnigt statistiskt signifikant ($p < 0,01$). En förhöjd nivå histamin sågs i blodet hos tikarna med pyometra jämfört med de friska kontrollerna. Skillnaden mellan grupperna var enstjärnigt statistiskt signifikant ($p < 0,05$).

Resultaten av ovanstående två försök indikerar att mastceller aktiveras och degranulerar vid pyometra, och att det finns analyserbara parametrar för denna process. De två andra analyser som utfördes i studien (ELISA för neurotensin och ELISA för endothelin) gav däremot inga statistiskt signifikanta skillnader mellan tikar med pyometra och friska kontrolltikar.

Vid försöket av mastcellstryptas fanns en risk att substratet (S2288) skulle ha kunnat reagera med ett annat enzym än just tryptas. Denna risk uteslöts genom tillsatsen av olika enzymhämmare. Att reaktionen blev från markant nedsatt, till helt avstannad, vid tillsatsen av hämmaren pefabloc tyder på att det aktiva enzymet är ett trypsin-liket serinproteas. Denna slutsats stärks av att reaktionen var opåverkad av hämmarna NEM och pepstatin, som lämnar serinproteaser opåverkade. Ett fynd som tyder på att enzymet är just mastcellstryptas, och inget annat trypsin-liket serinproteas, är att det inte hämmades av trypsininhibitorn. Denna hämmar de flesta trypsin-lika serinproteaser utom just mastcellstryptas.

Detta är den första studien i författarens kännedom som undersöker nivåer av mastcellsenzym i blodet hos hund. De olika analysmetoderna är således inte tidigare beprövade på hund. Eventuellt kan det vara så att inte alla de analysmetoder som använts i denna studie är lämpade för undersökning av proteiner från hundar. Det kan också finnas en artvariation mellan hund och människa i avseende på hur stora höjningar av olika mediatorer som uppstår vid sjukdomstillstånd. I studien uppnåddes till exempel signifikanta skillnaderna mellan grupperna i de två försök som utförts på just mastcellsproteiner. Hos människa påverkas endothelin- och neurotensinnivåer i plasma vid mastcellsdegranulering, kanske ses inte denna korrelation hos hund. Som nämnts ovan saknas tidigare studier.

Signifikanta skillnader har uppnåtts i två försök (ELISA för histamin och S2288-assay för tryptas) vilket leder till slutsatsen att det är troligt att mastceller degranuleras vid pyometra, och att det finns möjliga mätbara parametrar för detta i blodet. Frågan kvarstår dock om mastceller har ett samband med pyometra, och i sådana fall om man kan utnyttja detta samband diagnostiskt eller prognostiskt. Denna studie kan ses som en pilotstudie för framtida forskning inom området.

Vidare studier inom området skulle kunna innefatta fler hundar för att få ett bättre statistiskt underlag, vilket bör ses som steg ett. Det skulle vara intressant att titta på skillnader inom gruppen pyometra också, om t ex ett väldigt högt tryptas indikerar en sämre prognos. Skillnaden i nivåer mellan hundar som har andra bakteriella infektioner skulle också vara intressant att jämföra med nivåerna hos hundar med pyometra. Kanske är mastcellsmediatorer inte ett diagnostiskt verktyg specifikt för pyometra, men kanske är det ett prognostiskt verktyg för andra sorters infektioner också, utöver pyometra. Det finns dock en möjlighet att en mastcellsparameter kan vara kliniskt användbart för hund i framtiden som diagnostiskt och/eller prognostiskt verktyg vid pyometra eller andra inflammatoriska sjukdomar.

REFERENSER

- Arck P.C., Slominski A., Theoharides T.C., Peters E. M. J., Paus R., 2006. Neuroimmunology of Stress: Skin Takes Center Stage. *J Invest Dermatol*, 126(8): 1697–1704
- Bortolotto S. K., Morrison W.A., Messina A., 2004. The role of mast cells and fibre type in ischaemia reperfusion injury of murine skeletal muscles. *J Inflamm (Lond)*, 1: 2
- Caugley, G. H., Raymond, W. W., and Vanderslice, P., 1990. Dog mast cell chymase: Molecular cloning and characterization. *Biochemistry* 29, 5166-5171
- Caughey G.H., 2007. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense, *Immunol Rev. Author manuscript* 217: 141–154
- Caughey G.H. 2006. Tryptase genetics and anaphylaxis, *MD. Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (6): 1411-1114
- Duarte J., Deshpande P., Guiyedi V., Mécheri S., Fesel C., Cazenave P-A., Mishra G. C., Kombila M. and Pied S. 2007. Total and functional parasite specific IgE responses in Plasmodium falciparum-infected patients exhibiting different clinical status, *Malar J* 6: 1
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, BN, Hedhammar, Å., Olson, P., Lagerstedt, AS., 2001. Breed Risk of Pyometra in Insured Dogs in Sweden. *J Vet Intern Med* 15:530-538.
- Fransson B., Lagerstedt AS., Hellmen E., Jonsson P., 1997. Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. *Zentralbl Veterinarmed A* 44(7):417-26
- Gurish M. F., Austen K. F., 2001. The Diverse Roles of Mast Cells, *J Exp Med* 2; 194
- Hara M., Ono K., Hwang M-W., Iwasaki A., Okada M., Nakatani K, Sasayama S., Matsumori A., 2002. Evidence for a Role of Mast Cells in the Evolution to Congestive Heart Failure. *J Exp Med* 195(3): 375–381
- Kube P., Audigé L., Küther K., Welle M. 1998. Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochem Cell Biol* 110:129-135
- Maretta, S. M., Matthiesen, D. T., Nichols, R. 1989. Pyometra and its complications. *Problems in veterinary medicine* 1, 50-62.
- Okayama Y., Kawakami T. 2006. Development, Migration, and Survival of Mast Cells, *Immunol Res* 34(2): 97–115
- Pejler G, Åsbrink M, Ringvall M, Wernersson S, 2007. Mast Cell Proteases, *Advances in Immunology* 95;167-255
- Purswell, B J., 1997. Diseases of the Uterus in Leib, M S, (Ed.). *Practical Small Animal Internal Medicine*. 418-426. Philadelphia, Pennsylvania.
- St-Gelais F., Jomphe C., Trudeau L-É. 2006. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: What is the evidence? *J Psychiatry Neurosci* 31(4): 229–245.
- Vanderslice, P., Craik, C.S., Nadel, J.A. and Caughey, G.H., 1989. Molecular cloning of dog mast cell tryptase and a related protease: Structural evidence of a unique mode of serine protease activation. *Biochemistry* 28, 4148-4155