



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# **Progesterons relation till immunförsvaret och betydelse för utvecklingen av pyometra hos tik**

*Sofie Henriksson*

---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:62

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Progesterons relation till immunförsvaret och betydelse för utvecklingen av pyometra hos tik**

Progesterone's immunosuppressant effects and role in the development of pyometra in the canine bitch

*Sofie Henriksson*

**Handledare:**

Elisabeth Persson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi  
Sara Wernersson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2013

**Omslagsbild:** -

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:62  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Progesteron, hund, löpningscykel, immunosuppression, pyometra

**Key words:** Progesterone, bitch, reproductive cycle, immunosuppression, pyometra



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturöversikt.....	3
Den friska livmoderns uppbyggnad .....	3
Löpcykel.....	4
Proöstrus.....	4
Östrus .....	5
Diöstrus .....	5
Anöstrus .....	6
Progesteron.....	6
Progesteronreceptorer.....	6
Progesterons påverkan på immunförsvaret .....	7
Pyometra.....	10
Patogenes.....	10
Diskussion .....	11
Litteraturförteckning .....	13



## **SAMMANFATTNING**

Progesteron har många fysiologiska effekter, vilka främst syftar till bevarad dräktighet. Tikens reproduktionscykel är unik genom att hon tidvis påverkas av långvarigt höga halter progesteron även om hon inte är dräktig. Det här arbetet fokuserar på hur progesteronets effekter kan orsaka problem hos den icke-dräktiga tiken genom att bidra till uppkomst av pyometra. Man har experimentellt kunnat inducera pyometra genom tillförsel av progesteron, vilket tyder på att effekten av progesteron är en viktig del i etiologin för tillståndet.

Progesteron har visats dämpa immunförsvaret genom att förhindra uppkomsten av ett Th1-svar och således även den cellmedierade immuniteten, samt orsaka en förskjutning mot ett Th2-svar. Progesteron har även visats sänka förmågan hos immunförsvarsceller att svara mot bakteriella agens. Man har inte kunnat påvisa förhöjda halter progesteron i plasma hos tikar med pyometra, men värt att notera är att en eventuell hormonell påverkan kan ha skett under en period innan symptom av sjukdomen har uppstått. Hormonbildningen vid sjukdomens utbrott återspeglar således kanske inte den vid sjukdomens uppkomst.

Eftersom progesteronreceptorer generellt sett uppregleras av östrogen och nedregleras av progesteron blir det intressant att förstå hur de uttrycks och stimuleras. Man har även visat att progesteronmetaboliter kan orsaka liknande effekt som progesteron i sig genom att stimulera samma receptor.

Ett högre uttryck av receptorer hos tikar drabbade av pyometra har inte kunnat påvisas. Detta, samt att det inte förekommer förhöjda plasmakoncentrationer av progesteron hos affekterade tikar, kan tyda på att progesteronnivåerna har en begränsad betydelse vid uppkomsten av sjukdomen eller på att det förekommer en ökad känslighet hos receptorerna hos predisponerade individer vilket leder till ett abnormt svar. Det första verkar dock inte troligt utan kan bero på svårigheten att följa patogenesen under de studier som utförts. Den senare hypotesen stöds av att lesioner identiska med de vid pyometra har inducerats experimentellt med hjälp av progesteron, det vill säga mottagliga receptorer antas ha förmedlat de hormonella signalerna.

Det är inte helt fastställt hur progesteron påverkar tiken under löpcykeln och vilken betydelse detta har för utvecklingen av pyometra. Därför behövs mer forskning för ökad förståelse av dessa fenomen och möjliggörande av förbättrad diagnostik respektive behandling.

## **SUMMARY**

Progesterone's primary role is maintenance of pregnancy. The canine reproductive cycle is unique due to the long period during diestrus when the bitch is under the influence of progesterone, whether pregnancy has occurred or not. The purpose of this review is to investigate how progesterone may cause inconvenience to the nonpregnant bitch by inducing pyometra. Due to the fact that exogenous progesterone experimentally has caused pyometra there is reason to believe that progesterone is associated with the occurrence of this condition.

Progesterone is proven to decrease the response from the immune system by preventing a Th1-response and thereby the cell mediated immunity, and also causing a shift towards a Th2-response. Progesterone has also been shown to lower the ability of peripheral mononuclear blood cells to respond to bacteria. Increased plasma levels of progesterone in bitches with pyometra have not been identified. Noteworthy is however the time aspect between progesterone's influence leading to pyometra and the appearance of symptoms and therefore testing. The hormonal picture may have changed dramatically during that time.

Since progesterone receptors are considered to be upregulated by estrogen and downregulated by progesterone, their expression and regulation are of interest. It has also been shown that progesterone metabolites can have similar stimulatory effects as progesterone on the progesterone receptor.

An increased expression of receptors in bitches with pyometra has not been reported. Together with the fact that the progesterone plasma concentrations in affected bitches are not higher than in unaffected bitches, it is indicated that progesterone either plays an insignificant role in the aetiology of pyometra or that an increased sensitivity of the receptors in predisposed individuals lead to an abnormal response to normal hormonal levels. The first is however very unlikely and probably due to difficulties to follow the pathogenesis during the performed studies. The latter is supported by the fact that lesions identical to those seen in cases of pyometra have been experimentally induced by progesterone.

How progesterone affects the bitch during her reproductive cycle and how it relates to the occurrence of pyometra has not been thoroughly studied. Therefore more research in the field is needed in order to enhance the understanding of the phenomena and allow improved diagnostics and treatment.



## INLEDNING

Hundens reproduktionscykel är unik i flera avseenden. Tikens löpcykel delas bland annat in i faser som är förhållandevis långa jämfört med motsvarigheter hos andra djurslag. Unikt för hunden är också att det hos tikar förekommer en pre-ovulatorisk luteinisering i slutet av proöstrusfasen, vilket medför en tidig progesteronproduktion. Progesteron fortsätter sedan att påverka tiken under resterande delar av löpcykeln; delar av östrus och framför allt diöstrus, innan hunden går in i anöstrus i väntan på en ny löpcykels början.

Pyometra är en mycket vanlig sjukdom hos hund som innebär en varig livmoderinflammation och drabbar oftast tikar under diöstrusfasen av löpcykeln. Under denna tid domineras det endokrina påslaget av progesteron samtidigt som mängden estradiol-17 $\beta$  är som lägst. Intressant är också att progesteron har en bevisad immunsupprimerande effekt.

Denna litteraturöversikt fokuserar på progesterons påverkan på livmoderns immunförsvar och utvecklingen av pyometra, samt om det finns ett samband däremellan.

## MATERIAL OCH METODER

Använda sökmotorer till den initiala litteratursökningen var: Web of science, Web of knowledge, CAB abstracts, Epsilon, Pubmed samt. Google Scholar. Sökorden som då användes var; Progesteron\*, Canine\*, Dog\*, Uter\*, Immun\*, Pyo\*.

Detta gav ett mycket stort urval artiklar vilket begränsades till dem med sökorden i titel. Relevanta artiklar valdes ut baserade på abstract för till synes intressanta titlar. Fördjupning och vidare litteraturstudier valdes med hjälp av referenslistor i tidigare nämnda artiklar.

## LITTERATURÖVERSIKT

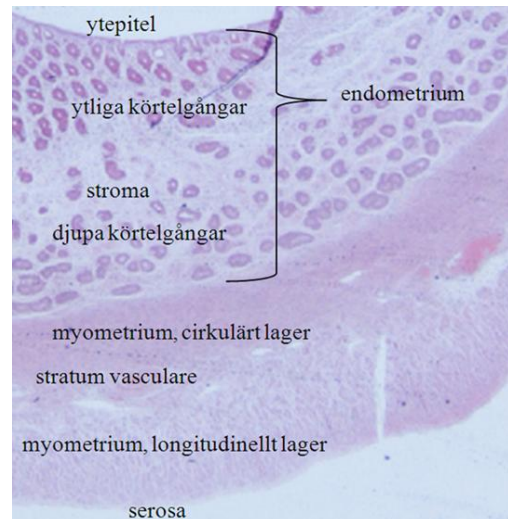
### Den friska livmoderns uppbyggnad

Livmoderns vägg delas in i flera olika lager med olika funktion. Ytterst finns ett lager bindväv, som i bäckenhålan kallas *adventitia*. I bukhålan ingår den i serosans bindväv som är täckt av ett lager mesotelceller som på livmodern specifikt kallas *perimetrium*. Innanför bindväven finns livmoderns tjockaste vävnadslager; *myometrium*. Det består av glatta muskelfibrer organiserade i ett yttre, longitudinellt lager, och ett inre, cirkulärt lager. Myometriet är kraftigt kärlförsörjt och mellan de båda muskellagren finns ett bindvävslager med större kärl, *stratum vasculare*.

Innanför myometriet, mot lumen, finns livmoderslemhinnan, *endometrium*. Den består av enkla tubulära körtlar som vindlar sig och skapar djupa och ytliga körtellager omgivna av ett bindvävslager, *stroma*. Endometriet ändrar sitt utseende och sin funktion under löpcykelns gång.

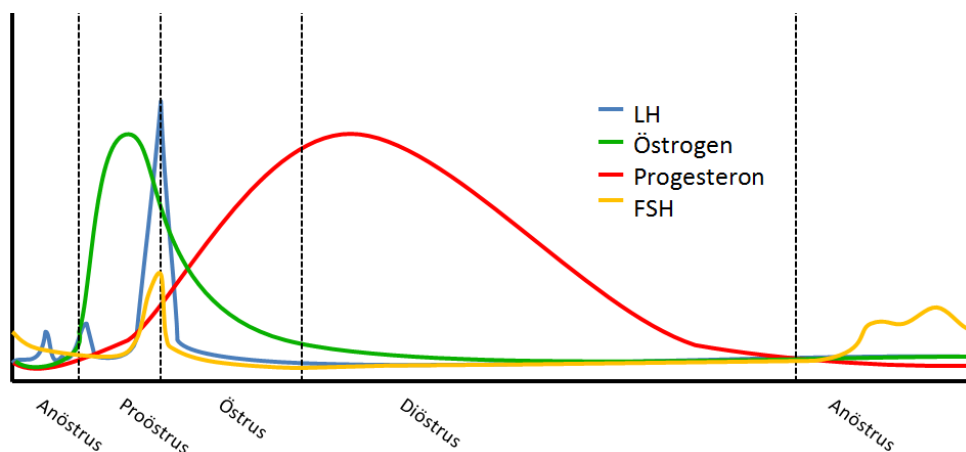
## Löpcykel

Tikar löper vanligen en till två gånger om året med 5–12 månaders intervall med ett genomsnitt på 6–7 månader mellan löpen. Dock varierar detta mycket både mellan individer och olika raser. Tikar har, med undantag för vissa raser, en icke säsongsbunden löpcykel. Den inleds av en follikulär fas som avslutas av en spontan ovulation följt av en luteal fas. Denna är något längre än en dräktighetsperiod, vilket i regel innebär mer än 64 dagar (Concannon, 2011). Efter detta följer en till synes reproduktivt inaktiv fas innan nästa löpcykel börjar.



Figur 1: Histologisk bild av livmoderns uppbyggnad. Bild: Johanna Appelgren

Baserat på beteende, progesteronnivåer och vaginalcytologiska förändringar delas hundens löpcykel in i fyra faser: proöstrus, östrus, diöstrus och anöstrus (Concannon, 2011). Det hormonella samspelet under hundens löpcykel illustreras översiktligt i figur 2.



Figur 2: Schematisk bild över hormonvariationerna under löpcykeln.

Fritt efter Feldman & Nelson (1996); Concannon (2011).

### Proöstrus

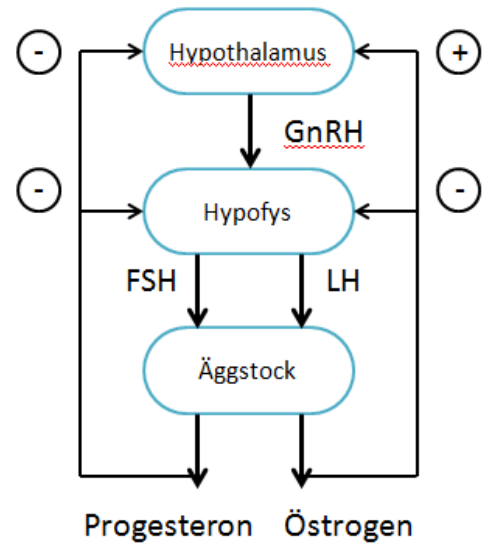
Proöstrus varar vanligen 5-20 dagar och anses börja när hunden uppvisar fysiska tecken på den östrogenisering som pågår i kroppen, såsom svullen vulva och blodblandade flytningar. Fasen avslutas när hunden uppvisar beteenden som tyder på östrus, så som tillåtande av parning.

Proöstrus induceras av att ökade halter gonadotropin releasing hormone (GnRH) utsöndras pulsmässigt från hypotalamus i slutet av anöstrus, och orsakar pulslignande utsöndring av luteiniserande hormon (LH) från hypofysen (Concannon, 2009). Detta orsakar att mognande folliklar i ovarierna utsöndrar höga mängder östrogen, estradiol-17 $\beta$ , under proöstrus (Feldman & Nelson, 1996). Effekterna av LH understöds av ökande halter

follikelstimulerande hormon (FSH) som också stimuleras av GnRH-pulserna. En schematisk bild av hormonregleringen ses i figur 3.

De ökande östrogennivåerna under proöstrus orsakar bland annat livmodertillväxt och förändringar i vaginans epitel. Den blodblandade flytningen som ofta ses härstammar från lyserade eller intakta erythrocyter som läcker ur kärlen i endometriet, bland annat på grund av ökad diapedes och genomsläpplighet associerad med slemhinnetillväxten.

Den hos tiken unika preovulatoriska luteineringen orsakas av en enzymatisk förändring av cellerna i follikelväggen hos de mognande folliklarna, vilken får dem att producera progesteron redan innan ägglossningen och bildandet av en gulkropp, *corpus luteum* (CL). (Concannon, 2011). Den tidiga progesteronhöjningen underlättar troligen för den kommande kraftiga ökningen av LH att framkalla ägglossning då en stimulerande faktor anses vara en sänkning i kvoten mellan östrogen och progesteron.



Figur 3: Schematisk bild över regleringen av hormonutsöndringen. Fritt efter Concannon (2009)

Proöstrus avslutas med en häftig plasmakoncentrationsökning av LH, en så kallad LH-surge, som kommer att orsaka ovulation, och sedan snabbt avtar.

### Östrus

Östrus anses vara den period då tiken accepterar parning, oftast under 5-9 dagars tid. Vid denna tidpunkt har flytningarna vanligen avtagit eller antagit en halmgul färg och vulvan mjuknar.

Till följd av den LH-topp som inträffar under proöstrus ovuleras oocyter 48-60 timmar senare. LH-toppen kommer vanligen efter att estradiol-17 $\beta$  har nått sitt maximum och kvoten mellan östrogen och progesteron är som högst. Kort därefter avtar koncentrationen av östrogen, medan progesteronhalterna i plasma ökar till följd av att theca interna- och granulosa-cellerna i follikelväggen omvandlas till en progesteronproducerande gulkropp (Graham & Clarke, 1997).

### Diöstrus

Med diöstrus menas den luteala, progesterondominerade fasen efter östrus. Denna anses pågå tills inga fysiologiska bevis på en fungerande gulkropp finns kvar och progesteronkoncentrationen i plasma återgått till basala nivåer.

Under diöstrus förekommer höga koncentrationer progesteron, producerat av CL, som når sitt maximum runt 20-35 dagar efter LH-peaken, och som sedan sakta avtar för att nå basala nivåer runt dag 55-90 (Concannon, 2011).

Under början av diöstrus förbereds tiken på dräktighet, vilket innebär en fortsatt tillväxt av livmoderslemhinnan så länge progesteronnivåerna är höga. När progesteronnivåerna sedan sjunker i samband med att gulkroppens förprogrammerade livslängd når sitt slut, börjar nedbrytningen av endometriet och CL innan tiken går in i anöstrus.

### **Anöstrus**

Anöstrus är en skenbart inaktiv fas under tikens löpcykel men i själva verket sker mycket av reparationsarbetet i livmodern för att förbereda tiken på nästa löp (Feldman & Nelson, 1996). Det anses att reparationen av livmodern tar ca 4,5 månader, vilket därför bedöms vara den kortaste möjliga tiden som hunden befinner sig i anöstrus. Dock är det rapporterat tidsintervaller på allt från en till åtta månader.

När nivåerna av progesteron sjunkit till sina basala värden är det FSH som dominerar perioden med höga plasmakoncentrationer och tidvis höga pulser (Concannon, 2011). Även LH utsöndras pulsmässigt under anöstrus men basalnivåerna är låga. Östrogennivåerna är stadigt låga fram till slutet av perioden då det förekommer en smärre höjning i plasmakoncentrationen. Detta ger en ökad känslighet av hypothalamus-hypofys-ovarium-axeln som sedan höjer frekvensen och storleken på de LH-pulser som utsöndras. Detta stimulerar tillväxt och början av nästa proöstrus.

### **Progesteron**

Vid en dräktighet uttrycker fostret i livmodern antingen som tikens immunsystem uppfattar som främmande. Detta kan jämföras med ett transplanterat organ och borde således aktivera ett immunsvär som skulle leda till att fostret stöts bort. Progesteron är en del av det system som nedreglerar immunsystemet i livmodern under dräktigheten för att motverka denna effekt.

Progesteron är ett steroidhormon som produceras av gulkroppen, och vars främsta uppgift är att skapa en gynnsam miljö i livmodern för fostret att växa till i. Detta sker genom att främja livmoderns tillväxt och inhibera myometriets kontraktioner som annars skulle innebära att fostret aborteras. Utsöndring av progesteron regleras framför allt av negativ feedback samt LH (Graham & Clarke, 1997).

### **Progesteronreceptorer**

Hormoner har ingen möjlighet att verka utan en receptor. Då olika studier har påvisat olika effekt av progesteron vid liknande koncentrationer tyder detta på att receptorerna kan skilja sig antingen i lokalisation, känslighet eller antal hos individen eller vid olika fysiologiska betingelser.

Progesteron binder in till en nukleär steroidreceptor bestående av två subenheter (Graham & Clarke, 1997). När en ligand binder in aktiveras komplexet och subenheterna bildar en dimer, som binder till specifika progestin-respons-elements (PREs) på målgenerna. Progesteronets effekt utövas därefter genom påverkat genuttryck.

Progesteronreceptorernas uttryck hos cellen påverkas av östrogen och progesteron (Graham & Clarke, 1997). Generellt sett uppreglerar östrogen receptorerna medan progesteron i de flesta celler nedreglerar uttrycket (Graham & Clarke, 1997; Tahir et al., 2012). Detta stöds av att antalet progesteronreceptorer i livmodern påvisats öka under proöstrus under inverkan av det östrogen som då produceras av folliklarna (Srisuwatanasagul et al., 2006). Således når progesteronreceptorerna ett maxantal under östrus då östrogenkoncentrationerna i plasma är som högst, för att sedan sjunka under diöstrus. Att östrogen uppreglerar progesteronreceptorerna innebär att en vävnad påverkad av östrogen blir känsligare för ett progesteronpåslag. Författarna menade att ett stort antal receptorer vid koncentrationsökningen av progesteron under slutet av proöstrus skulle möjliggöra ett mycket kraftigt svar på svagare koncentrationshöjningar. När progesteronkoncentrationerna sedan stigit fanns inte samma behov av ett stort antal receptorer och de nedreglerades.

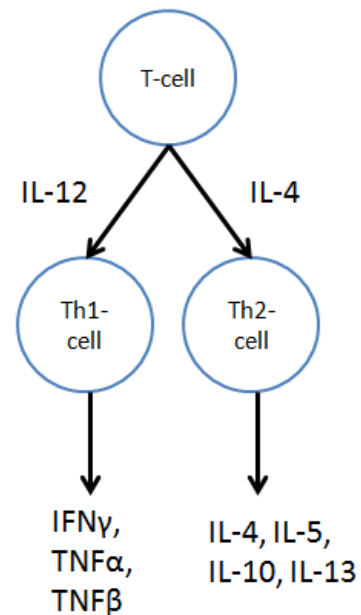
Man har experimentellt kunnat inducera cystisk endometriehyperplasi (CEH)/pyometra hos tikar genom höga doser progesteron (Teunissen, 1952), men inte kunnat påvisa förhöjda värden av hormonet i plasma hos naturligt affekterade tikar (Chaffaux & Thibier, 1978). Därför är en hypotes att ett ökat antal progesteronreceptorer, vilket skulle ge ett starkare svar på mängden progesteron i plasma, kan förklara fenomenet, det vill säga att progesteron kan ha betydelse för utvecklingen av pyometra utan höjda nivåer av själva hormonet.

Dhaliwal et al. (1999) undersökte detta med hypotesen att finna fler receptorer hos tikar som behandlades mot CEH/pyometra än hos friska kontrolldjur, samt eventuellt en skillnad mellan var i vävnaderna receptorer kunde återfinnas. Dock visade det sig att så inte var fallet. Istället tydde resultaten på ett lägre antal progesteronreceptorer i livmoderns körtelepitel hos de affekterade tikarna. Författarnas egna förklaringar till detta var dels tidsaspekten mellan första dagen av proöstrus och när provet togs, vilken varierade mycket, samt att det ytliga epitelet i livmodern hos tikarna som undersöktes var mycket destruerat till följd av sjukdomen, vilket gjorde det mycket svårt att få rättvisande prover. De resonerade också om möjligheten att distributionen och antalet receptorer inte har någon koppling till pyometra.

### ***Progesterons påverkan på immunförsvaret***

Progesteron har en vedertaget hämmande effekt på immunförsvaret som del av sin dräktighetsbevarande effekt. De flesta studier av progesterons immunförsvarpåverkan har främst rört T-celler, deras differentiering till T-hjälparceller och cytokin-produktion.

T-hjälparceller delas in i flera grupper där de vanligast nämnda är Th1- och Th2-celler (se Fig. 4). Th1-celler är viktiga för stimuleringen av det medfödda samt det förvärvade, cellmedierade svaret (Wan, 2010). Interleukin-12 (IL-12) anses vara en cytokin nödvändig för proliferation till Th1-celler (Miyaura & Itawa, 2002). De utövar sin effekt genom att utsöndra cytokiner som stimulerar det cellmedierade svaret att angripa framför allt intracellulära patogener med hjälp av fagocytos och celllys (Wan, 2010). Cytokiner som produceras av Th1-celler är bland annat interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) och TNF $\beta$ . IFN $\gamma$  är den cytokin som Th1-cellerna utsöndrar som är mest effektiv för att aktivera fagocyter (Sugiura et al 2004).



Figur 4: Schematisk bild över Th-cellers differentiering och cytokinprofil.

Fritt efter Miyaura & Iwata (2002) samt Tizard (2009).

Th2-celler anses särskilt viktiga för stimuleringen av det antikroppsmedierade immunsvaret då de aktiverar B-celler. De är därför viktiga framför allt i försvaret mot extracellulära patogener. Th2-cellerna producerar bland annat IL-4, IL-5, IL-10 och IL-13. IL-4 och IL-13 orsakar en switch i B-cellernas antikroppsproduktion från en produktion av IgM/D till IgE. IL-

5 ger rekrytering av eosinofila granulocyter. IL-10 ger switch till IgA samt inhiberar produktion av IL-12 hos antigenpresenterande celler (APC) så som makrofager och dendritiska celler. IL-10 inhiberar också uttrycket av MHC klass II på makrofager, monocyter och olika former av dendritiska celler. IL-4 anses också nödvändig för Th2-differentiering.

Det har visats att progesteron direkt inhiberar T-cellernas differentiering till Th1-celler samt främjar differentiering till IL-10-producerande Th2-celler (Miyaura & Iwata, 2002). Detta förklarar att en normal dräktighet involverar en förskjutning i immunsvaret mot ett Th2-svar. Ett sådant immunsvaret innebär att en APC aktiverar Th2-cellerna som i sin tur utsöndrar de cytokiner som aktiverar B-celler att differentiera och producera antikroppar mot upptäckt agens.

Sugiura et al. (2004) påvisade att progesteron kan inhibera både utsöndringen och produktionen av IFN $\gamma$ -protein. Miyaura & Iwata (2002) visade att progesteron även orsakade en sänkning av antalet IFN $\gamma$ -producerande celler genom dosberoende inhibering av T-cellernas differentiering. De undersökte förmågan hos thymocyter, som stannat i CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> stadiet av sin utveckling att differentiera till Th1- eller Th2-celler i närvaro och frånvaro av progesteron och olika cytokiner. Progesteron visades öka antalet IL-10-producerande celler både i när- och frånvaro av IL-12. Ökningen av IL-10-producerande celler var dock procentuellt sett större vid frånvaro av IL-12 i dessa försök. De IL-10-producerande cellerna som inducerades under progesteronpåverkan producerade också IL-4. Koncentrationerna av IL-4 bibehölls på högre nivåer under en längre period under påverkan av progesteron, medan IL-10 ökade till viss del under fem dagars tid och fortsatte sedan öka under

progesteronpåslaget. En kraftig ökning sågs efter åtta dagars tillsats av progesteron. Progesterons effekt på IL-4-produktionen försvann dock vid frånvaro av IL-12. Dessa effekter indikerar en indirekt stimulering av Th2-svar från progesteron och en direkt hämning av Th1. Dock fann man tecken på att vid höga koncentrationer IL-12 kunde inte progesteron förskjuta jämvikten helt från ett Th1-svar, men kunde ändå stimulera produktionen av IL-10-producerande celler.

IL-10 inhiberar, som nämnts ovan, APC från att producera IL-12 vilket innebär en förskjutning från ett Th1-svar. Dock var inga APC med i Miyaura och Iwatas försök (2002) vilket tyder på att inhiberingen av ett Th1-svar inte berodde på en produktion av IL-10. Detta bevisades genom att tillsats av anti-IL-10 inte gav förändrade resultat.

Sugiura et al. (2004) undersökte effekten av progesteron genom att studera svaret mot bakterien *E.coli* PYO-252 av mononukleära celler från perifert blod. Dessa testades under fem olika stadier av löpcykeln; dag 1-3 under proöstrus (PE), dag 1-3 under östrus (ES), dag 10 under diöstrus (D10), dag 30 under diöstrus (D30) samt dag 60-70 under anöstrus (AE). Cellernas svar på bakterien bestämdes genom att man inkuberade cellerna från de olika stadierna med *E.coli* under 72h vid 37°C efter tillsats av progesteron. Cellernas förmåga att svara mot bakterien beräknades baserat på deras förmåga att ta upp [<sup>3</sup>H]-thymidin och jämfördes med en optimal kontrollkultur som fastställts vid tidigare experiment. Cellerna tagna från D10, när progesteronnivåerna i tiken var höga och östrogennivåerna låga, visade ett märkbart reducerat svar mot bakterien. Man utförde även andra försök där svaret sänktes vid tillsats av progesteron. Även progesteronmetaboliten 5 $\alpha$ -DHP, med liknande affinitet för progesteronreceptorn, hämmade immunsvaret. Metaboliten 17-OHP samt progesteronprekursorn pregnenolon, vilka båda har låg affinitet för receptorn, resulterade däremot inte i någon suppression av immunsvaret vid tillsats. Detta tyder på att nyckelkomponenten i progesterons immunedreglerande verkan är stimulansen av receptorn, oavsett vilken metabolit som agerar substrat.

Även Holst et al., (2013) undersökte leukocyters svar på *E.coli* efter påverkan av bland annat progesteron genom att undersöka förmågan till en hastig frisättning av syreradikaler (oxidative burst) samt fagocytos hos leukocyter samlade från tikar under olika delar av den luteala fasen. De fann att varken antalet eller andelen leukocyter förändrades men att den fagocyterande förmågan var lägre under den senare delen av den luteala fasen. De fann även att andelen celler som aktiverades av *E.coli* med påföljande 'oxidative burst' var lägre bland celler från senare delar av löpcykeln.

Borel et. al., (1999) visade att progesteronreceptorer återfinns på lymfocyter i mjälten och perifert i blodbanan hos möss samt att dessa uppregleras i närvaro av progesteron. Detta kan tyckas mycket motsägelsefullt då sambandet är det motsatta hos de flesta andra celltyper. Man fann även att lymfocyter som behandlats med progesteron utsöndrade en immunologiskt blockerande faktor. Denna påvisades orsaka proliferationshämning av andra lymfocyter om de odlades i närvaro av progesteronbehandlade celler.

## **Pyometra**

Pyometra är en mycket vanlig sjukdom hos tikar. Det är en varig inflammation i uteruslembinnan som drabbar könsmogna tikar av alla åldrar men incidensen ökar med högre ålder (Egenvall et al., 2001; Smith, 2006). Pyometra förekommer både som sluten och öppen form beroende på om cervix är sluten under sjukdomen eller ej. Vid sluten cervix är det svårare att upptäcka sjukdomen då symptomen är mycket diffusa. Att den är sluten gör att det föreligger risk för uterusruptur och allvarlig sepsis vid långt gången, oupptäckt sjukdom. Denna form av pyometra kan därför ha dödlig utgång.

## **Patogenes**

Det finns många teorier om vad som orsakar pyometra. Gemensamt är att det sker en varansamling som mekaniskt töjer ut livmodern (Chaffaux & Thibier, 1978).

Pyometra sammankopplas ofta med CEH och många författare menar att CEH är ett förstadium till pyometra (Feldman & Nelson, 1996; Dow, 1959). CEH är en patologisk förändring i endometriet som innebär tillväxt av endometriekörtlar, både i antal och storlek, samt att de ofta omvandlas till cystor (Feldman & Nelson, 1996). CEH anses vara orsakad av ett för kraftigt svar på den hormonprofil som förekommer under östrus och diöstrus (De Bosschere et al., 2001). De höga koncentrationerna östrogen under proöstrus, följt av den långa perioden med höga plasmakoncentrationer progesteron, orsakar proliferation och tillväxt av endometriet och kan då ge upphov till de initiala patologiska förändringarna (Smith, 2006). Cystorna i sin tur, uppkommer till följd av att körtelgångarna utvidgas under diöstrus (Feldman & Nelson, 1996). En viktig skillnad mellan CEH och pyometra är att det förstnämnda inte involverar någon inflammation (De Bosschere et al. 2001).

Vissa författare menar att bakterier spelar en viktig roll vid uppkomsten av pyometra. Ofta påvisas bakterier i samband med sjukdomen, och den vanligaste patogenen som upptäcks är framför allt olika former av *E.coli* som antas komma från urinvägarna (De Bosschere et al., 2001). Andra författare anser dock att mikrobiella agens enbart är en sekundär faktor i sjukdomskomplexet.

Det har också hävdats att höga halter progesteron kan orsaka pyometra. Detta stöds av att man experimentellt lyckats inducera uterus-skador identiska med dem man ser vid pyometra genom långvarig behandling med höga halter progesteron (Teunissen, 1952). Dock kunde inte Chaffaux & Thibier (1978) påvisa några skillnader i plasmakoncentrationer av progesteron hos affekterade tikar jämfört med kontroller. Författarna diskuterade försöken utförda av Teunissen 1952 där hundarna behandlades med betydligt högre doser progesteron än naturligt förekommande i plasma. Normalt förhöjda plasmakoncentrationer skulle då kunna vara för låga för att åstadkomma samma effekt. En annan aspekt som är viktig att ha i åtanke är att pyometra är ett tillstånd som utvecklas successivt. När tillståndet yttrar sig kliniskt har således så lång tid gått att den hormonprofil som då förekommer troligen inte återspeglar den vid sjukdomens uppkomst.



Smith (2006) påpekar att progesteron även orsakar ökad mucusproduktion av körtelepitelet i livmodern. Detta kan påverka uppkomsten av pyometra då det medför en mer gynnsam miljö för bakterier att tillväxa i. Detta förstärks ytterligare genom progesterons dämpning av myometriets kontraktioner vilket gör att mucus inte pressas ur körtelgångarna.

## DISKUSSION

Progesteron har som tidigare nämnts flera effekter på livmoderns immunförsvar. Främst har man studerat progesterons effekter på proliferationen av T-celler och följer av det, samt immunförsvarscellers förmåga att svara mot bakteriella agens efter behandling med progesteron. Progesteron hämmar Th1-svaret och produktion av IFN $\gamma$  samt gynnar Th2-svaret och produktionen av IL-10. INF $\gamma$  och IL-10 har i stort sett motsatta effekter då IFN $\gamma$  aktiverar fagocyter medan IL-10 motverkar detta indirekt genom att motverka produktionen av IL-12 och således utvecklingen av ett Th1-svar. Detta stöds även av försökten utförda av Holst et al. (2013) som visade att celler från en fas under löpcykeln då de varit påverkade av progesteron under en längre tid hade sänkt fagocyterande förmåga. Fagocytos är en viktig del i kroppens försvar mot extracellulära agens så som bakterier. En minskad fagocyterande förmåga hos immunsvaret skulle då innebära att exempelvis bakterier har lättare att kolonisera, föröka sig samt orsaka sjukdom. Då pyometra ofta förekommer i samband med en bakteriell infektion är detta ett intressant fenomen.

Att effekten tycktes vara som störst i slutet på den luteala fasen är också intressant eftersom hunden skiljer sig i avslutandet av den luteala fasen jämfört med andra djur. Hos många djurslag sker exempelvis en frisättning av prostaglandiner som påskyndar tillbakabildandet av gulkroppen vilket i sin tur avslutar progesteronpåslaget betydligt tidigare än hos hund. Detta tyder på att en långvarig påverkan av progesteron på immunsvaret hos hund kan orsaka problem.

En aspekt som dock inte studerats är övriga T-cellsgruppers roll. Regulatoriska T-cellers funktion är mycket intressant då även de producerar IL-10 och således adderar till effekten ovan (Tizard, 2009). De producerar även transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), en cytokin som anses reglera tillväxt, differentiering och funktion hos lymfocyter, dendritiska celler och makrofager. Generellt sett anses TGF $\beta$  inhibera proliferation av T- och B-celler samt inducera dess apoptos. Det verkar således som en immunsupprimerande faktor. Det är möjligt att det är denna faktor som Borel et. al. (1999) uppmärksammade i sina försök. Under studien påvisades denna faktor utsöndras av apoptotiska T-celler och visades förstärka den inhiberande miljön. Om så är fallet innebär det att ett progesteronpåslag inte bara hämmar den redan existerande lymfocytpopulationen utan även förhindrar bildandet av nya celler. Det är tydligt att de regulatoriska T-cellernas funktion inte kan räknas bort när man undersöker immunförsvaret och att studier av hur progesteron påverkar dem vore av stort intresse.

Progesteron dämpar således immunförsvaret genom att bland annat sänka den fagocyterande förmågan, minskar livmoderkontraktionerna och ger ökad mucusproduktion vilket skapar en mycket gynnsam miljö för bakterier att tillväxa i under diöstrus när plasmakoncentrationerna

av progesteron är höga. Dessa effekter tycks utgöra optimala betingelser för uppkomst av pyometra men trots detta har inte högre halter progesteron kunnat påvisas hos drabbade tikar jämfört med kontroller. Att pyometra oftast uppkommer under diöstrus som är en period där progesteronkoncentrationen är hög efter en tid med högt östrogenpåslag, vilket förstärker progesteronets effekt, gör dock att man ogärna vill avskriva progesteron som en del i etiologin kring pyometra. Då pyometra är ett tillstånd som växer fram gradvis är det viktigt att tänka på att hormonbildningen vid uppkomsten kan ha förändrats mycket innan symptom kan ses. Det vore därför mycket intressant med en större studie som följer friska tikars progesteronnivåer under lång tid, för att sedan undersöka vilka av dem som drabbas av pyometra, snarare än tvärtom som de flesta studier är konstruerade idag. Således tyder resultaten ovan på att mätningarna utförda under studierna kan ha gett oriktiga resultat på grund av exempelvis skillnader i tid mellan uppkomst och mätningar, eller att andra aspekter än plasmakoncentrationen av hormonet spelar roll.

Detta riktar uppmärksamheten mot progesteronreceptorerna. En ökad känslighet för progesteron på grund av ett större antal uttryckta receptorer skulle kunna ersätta höga plasmakoncentrationer och ändå uppnå samma effekt. Kunkitti et al. (2010) påvisade dock lägre mängd progesteronreceptorer hos affekterade tikar än hos kontrollerna. Detta kan kännas mycket motsägelsefullt. En förklaring till detta skulle kunna vara en ökad sensitivitet i receptorerna hos predisponerade individer, på grund av ras eller hög ålder och således påverkan av höga halter progesteron i cykler under många år. Både progesteronnivåerna och progesteronreceptorer regleras generellt sett med negativ feedback av progesteronkoncentrationer i plasma. Ett starkt svar på låga halter progesteron, orsakat av känsliga receptorer, skulle då kunna nedreglera uttrycket av receptorer och hormon motsvarande effekterna av höga progesteronkoncentrationer.

Något som också talar för progesterons del i etiologin för pyometra är det faktum att Teunissen (1952) lyckats inducera skador liknande de vid pyometra vid behandling med progesteron under en längre tid. När försöken avbröts dämpades den uppkomna inflammationsreaktionen för att sedan återuppstå när progesterontillförseln återupptogs. Att progesteron inte påverkar uppkomsten och/eller utvecklingen av pyometra tycks med detta mycket otroligt.

Sammanfattningsvis tycks det finnas samband mellan progesterons effekter och uppkomsten av pyometra. Exakt hur dessa samband ser ut är dock ännu inte fullt utrett. Genom fortsatta studier inom området finns möjligheter för en vidare förståelse för dessa fenomen vilket skulle kunna förbättra diagnostik och behandling.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Borel, I. M., Freire, S. M., Rivera, E., Canellada, A., Binaghi, R. A., & Margni, R. A. (1999). Modulation of the immune response by progesterone-induced lymphocyte factors. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49(3), 244-250.
- Chaffaux, S., & Thibier, M. (1978). Peripheral plasma concentrations of progesterone in the bitch with pyometra. *Annales de Recherches Vétérinaires*. Vol. 9, 587-592.
- Concannon, P. W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(s2), 3-15.
- Concannon, P. W. (2011) Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124, 200-210
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., & Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology*, 55(7), 1509-1519.
- Dhaliwal, G. K., England, G. C. W., & Noakes, D. E. (1999). Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. *Veterinary Record*, 145(16), 455-457.
- Dow, J. (1959). The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Journal of Comparative Pathology*, 69, Sid 237-250
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B. N., Hedhammar, Å., Olson, P., Lagerstedt, A. S. (2001). Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15, 530-538.
- Feldman, E.C. & Nelson, R. W. (1996). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2 ed. St. Louis: Saunders Company. Kap 17, 21
- Graham, J. D., & Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine reviews*, 18(4), 502-519.
- Kunkitti, P., Srisuwatanasagul, S., & Chatdarong, K. (2011). Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor, and leukocyte infiltration in the cervix of cyclic bitches and those with pyometra. *Theriogenology*, 75(6), 979-987.
- Miyaura, H. & Iwata, M. (2002). Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *Journal of Immunology*, 168, Sid 1087-1094
- Smith, F. O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66(3), 610-612.
- Srisuwatanasagul, S., Srisuwatanasagul, K., & Sirividayapong, S. (2006). Progesterone receptors and proliferation in the bitch uterus during different stages of the oestrous cycle. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 36(3), 45.
- Ström Holst, B, Hagberg Gustavsson, M, Lilliehöök, I, Morrison, D, Johannisson, A. (2013), Leucocyte phagocytosis during the luteal phase in bitches, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 153, Issues 1-2, Sid 77-82
- Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R., Hatoya, S., Wijewardana, V., Kumagai, D., Tamada, H., Sawada, T., Ikehara, S., Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209, 619-627.

- Tahir, M. Z., Reynaud, K., Mawa, G., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S., & Saint-Dizier, M. (2012). Immunolocalization of progesterone receptors in the canine oviduct around ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s6), 35-39.
- Teunissen, G. H. B. (1952). The development of endometritis in the dog and the effect of oestradiol and progesterone on the uterus. *Acta endocrinologica*, 9(4), 407-420.
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary Immunology*. 9. uppl. S:t Louis, MO. Elsevier. Kap 17. Sid 216-217
- Wan, Y. Y. (2010). Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 130(2), 166-171.