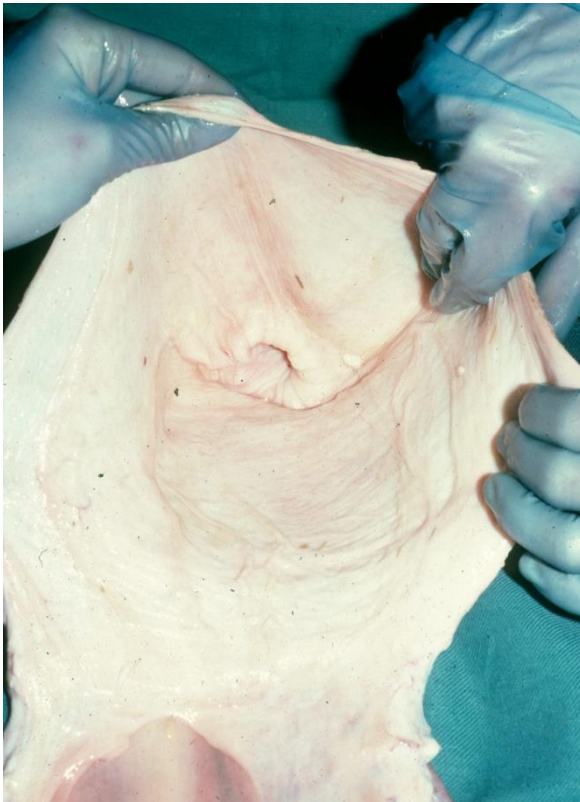




Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Hur skiljer sig ston åt i försvaret mot endometrit?

Cecilia Grahn



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 25

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2010



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Hur skiljer sig ston åt i försvaret mot endometrit?

Endometrial defense mechanisms – how do mares differ?

Cecilia Grahn

Handledare:

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

Examinator:

Désirée S. Jansson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: VM0068

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2010

Omslagsbild: Elisabeth Persson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, stovagina och -cervix

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010:25
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

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

Nyckelord: endometrit, sto, häst, infertilitet, uterus, inflammation

Key words: endometritis, equine, mare, horse, PMIE, RM, SM, infertility, uterus, inflammation

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	3
Livmodern	4
Definition av endometrit	5
Anatomiska skillnader och reproduktionshistoria, samt ålderns och hästhållningens påverkan	6
Varför uppkommer det en endometrit hos ston efter betäckning eller AI?	7
Skillnader i immunförsvaret	8
<i>Immunoglobuliner</i>	9
<i>Cytokiner och kemokiner</i>	10
<i>Opsonisering</i>	10
<i>Tappad funktion hos PMN samt en försämrad migratorisk förmåga</i>	10
Myometriekontraktioners och mucus roll i det hela	11
DISKUSSION	13
LITTERATURFÖRTECKNING	15

SAMMANFATTNING

Kvarstående betäckningsinducerad endometrit är ett stort problem inom hästnäringen och så även andra typer av endometrit. Detta är den främsta orsaken till infertilitet hos ston. Vissa ston är nämligen oförmögna att klara av den inflammatoriska reaktion som normalt följer av betäckning (för att eliminera sperma och patogener) eller så drabbas de lättare av kroniskt infektiös endometrit, oavsett betäckning. Det finns otaliga förslag till förklaringar till varför de inte kan hålla uterus fri från inflammation såsom defekta myometriekontraktioner, stoets reproduktionshistoria eller anatomiska aspekter (t.ex. pneumovagina, otillräckliga mekaniska barriärer eller en horisontell uterus). Den felande länken kan också vara immunologisk såsom störd kemotaxis, opsonisering, inflammatoriska cellers migration och/eller aktivering. Det verkar inte finnas ett enkelt svar på frågan om varför vissa ston drabbas av endometrit och andra inte. Vad som skiljer mottagliga och känsliga ston från ston med normal motståndskraft kan troligen förklaras utifrån en sammanvägning av många olika faktorer, där samspelet mellan olika skyddsmekanismer spelar en viktig roll. Stoets reproduktionssystem är en unik och komplex miljö där otaliga komponenter spelar in och måste samarbeta för att bibehålla en frisk uterus.

SUMMARY

Persistent mating-induced endometritis, as well as chronic infectious endometritis, are common causes of reduced fertility in mares, hence a great problem that can inflict major losses in the equine business. Susceptible mares are unable to eliminate the transient endometritis that follows breeding (which is a normal consequence that serves to eliminate pathogens and excess semen) or are predisposed to develop a chronic infectious endometritis. There are several ways of explaining this difference between resistant mares (RM) and susceptible mares (SM) since the fault could lay in the mare's anatomy, myometrial contractility or mechanical clearance, as well as in her reproductive history. Another approach is to look at her immune system and try to find the answer in processes like chemotaxis, opsonization, migration and activation of polymorphonuclear leukocytes. The most reasonable explanation to the problems with endometritis might be that a mixture of many of these factors interacts with each other. This is extra plausible since the reproductive tract is a unique and complex environment with many different components which must cooperate in order to secure a satisfactory uterine function.

INLEDNING

Endometrit har länge varit ett problem inom hästnäringen och många studier tyder på att det är det främsta skälet till infertilitet hos ston. Frågan är varför vissa ston drabbas och andra inte. Beror det på hästhållningen, t.ex. stallmiljö och träning? Är det en fråga om ålder och ett flertal genomgångna dräktigheter? Är det något fel i de drabbade stonas immunförsvar? Handlar det om anatomiska felaktigheter? Eller är det i själva verket en kombination av alla, eller en del, av dessa faktorer? Endometrit är en komplex historia och syftet med det här arbetet är att försöka utröna åtminstone en del skillnader mellan de ston som drabbas och de vars inflammatoriska reaktion i endometriet efter betäckning snabbt går över. Arbetets syfte är även att klargöra vissa skillnader mellan de ston som drabbas av kronisk infektiös endometrit och ston med normal motståndskraft.

MATERIAL OCH METODER

Denna litteraturstudie bygger framför allt på granskade vetenskapliga artiklar som hittats genom sökning i databaserna PubMed och Web of Knowledge. Sökningarna började med orden ”(horse OR equine OR mare OR pony) AND endometritis” vilket resulterade i tusentals artiklar som resultat. Ett femtiotal granskades och därefter valdes ytterligare arbeten från dessa artiklars referenslistor.

LITTERATURÖVERSIKT

En studie bland 1149 veterinärer i USA (Traub-Dargatz et al., 1991) pekade på att endometrit är det tredje mest förekommande medicinska problemet hos vuxna hästar efter kolik och virusorsakade luftvägsinfektioner. En undersökning som utfördes av British Horse Racing Board visade att man år 2005 misslyckades med 43% av betäckningarna på fullblodsston (Nash, 2009) och i en studie som gjordes av Zent & Troedsson 1998 (citad i: Troedsson, 1999) utvecklade runt 15% i en normalpopulation av fullblodsston persistent endometrit efter betäckning (PMIE). Det är därför mycket önskvärt att förstå bakomliggande orsaker till endometrit då denna orsak till infertilitet är så pass vanlig bland ston.

Fertiliteten efter betäckning eller artificiell insemination (AI) varierar starkt mellan ston, vid en tid då en lämplig uterusmiljö, fri från inflammation fyra till fem dagar efter ovulationen, fordras för att dräktigheten ska kunna etableras. Hos ston med normal motståndskraft, även kallade ”resistant mares” (RM) äger en snabbt övergående inflammatorisk reaktion i endometriet (24-36 timmar) rum, men hos drabbade ston, ”susceptible mares” (SM) tar en fortsatt inflammation vid, vilket påverkar fertiliteten då den inte är kompatibel med dräktighet (Watson, 2000).

Livmodern

Livmodern ska ha förmågan att vara en steril miljö men samtidigt kunna utföra ett utbyte av näringsämnen, immunologiska komponenter och transportera bort biprodukter och debris. Då dess design är anpassad för att både skydda och tillgodose fostrets näringsbehov har endometriet en hel del unika egenskaper såsom: ett enkelt cylindriskt epitel med både sekretoriska och cilierade celler i ytepitel och körtlar, samt intilliggande stromala komponenter inkluderande blodkärl och immunförsvarsceller. Endometriet klassificeras även som en del av det mucosala immunsystemet, trots att det inte har några mucosa-associerade lymfatiska analoger (såsom peyerska plack), detta på grund av den kontinuerliga antigenstimuleringen livmodernsmiljön kan utsättas för. Livmodern är dessutom exponerad för potentiellt påverkande hormoner, till exempel oskadliggörs infektioner lättare under östrus än under andra delar av brunstcykeln. Både östrogen och progesteron påverkar neutrofilers och lymfocytens funktion men även det faktum att dränaget är bättre genom en öppen cervix under östrus spelar stor roll. Cervix har en portfunktion då den ska släppa in spermier, därefter hålla kvar resultatet av befruktningen, hålla ute patogener och förorenande agens och sedan kunna dilateras i lagom tid för partus. Vagina och vulva har en likartad passagefunktion men med specialiserat epitel då det är en ”kontaminerad” miljö kaudalt om cervix.

Könsorganen har därför en rad skyddsmekanismer:

medfödda

- Den yttre konformationen
- Vaginalt epitel
- Cervix barriär
- Myometrietonus och kontraktion
- Sekretionsdränage
- Neutrofiler
- Makrofager
- Komplementfaktorer
- Cytokiner

adaptiva (specifika)

- Mucosans immunsystem som ingår i det humoral immunförsvaret
- Cellulär immunitet

Det adaptiva immunsvaret, både det humoral och cellulära, måste vara noggrant kontrollerat. Denna kontroll sker genom att justera och alternera cytokinuttrycket och dess effekt på regulatoriska T-lymfocyter som ”bestämmer” när, var och hur mycket det inflammatoriska svaret skall vara.

De T-lymfocyter som har CD8+ som co-receptor (cytotoxiska T-lymfocyter) är de mest förekommande lymfocyterna i endometriet, även om halternas förekomst varierar, t ex är de

som har CD4+ som co-receptor (ffa T-hjälparceller) vanligare i stoets uterushorn och de som har CD8+ vanligare i uteruskroppen.

Definition av endometrit

Watson (2000) gör iakttagelsen att det var brukligt till och med 90-talet att klassa ston som susceptible mares ("mottagliga och känsliga ston" på svenska; i detta arbete används den engelska förkortningen "SM") eller resistant mares ("ston med normal motståndskraft" på svenska; förkortningen "RM" används dock här) beroende på hur bra deras förmåga att eliminera inflammationen som följde på betäckning var, och/eller på deras "biopsipoäng". Det senare är ett avelsverktyg där cellinfiltration, körtelinnehåll och förekomsten av periglandulär fibros i endometriet mäts, rankas och slås ihop till en sammanfattande "poäng" där stoets möjlighet att slutföra dräktigheten klassas som hög, minskad eller låg. Watson föredrar dock indelningen av endometrit som även Troedsson (1999, 2001) använder, nämligen:

- Endometros (kronisk degenerativ endometrit)
- Sexuellt överförbara sjukdomar
- Persistent mating-induced endometritis (kvarstående betäckningsinducerad endometrit; här används den engelska förkortningen PMIE)
- Kronisk infektiös endometrit

Hurtgren (2006) intar en annorlunda hållning och förespråkar istället att kategorisera inflammation i endometriet som en kombination av ett eller flera av följande epitet:

- Akut
- Kronisk
- Aktiv
- Subklinisk
- Post-partum
- Bakteriologisk
- Svampinducerad
- Virusinducerad
- Betäckningsinducerad
- Persistent

Då syftet med detta arbete är att utröna hur olika stons egna försvar mot endometrit skiljer sig är det därför lämpligt, för lättfattlighetens skull, att använda uppdelningen SM och RM, framförallt för att de flesta studier har byggt sin frågeställning och lagt upp både studien och diskussionen utifrån en sådan uppdelning. För begränsningens skull fokuseras det främst på de olika scenarier som följer av den inflammatoriska reaktion som uppkommer efter betäckning eller AI; där vissa ston utvecklar en snabbt övergående endometrit – de så kallade RM – medan andra har svårigheter att hinna dämpa inflammationen i tid och där en persistent endometrit, inducerad av betäckning, uppkommer (PMIE). Dessa ston betecknas som SM.

Troedssons (1993b) definition på RM är att stoet är kapabelt att göra sig av med en endometrit inom loppet av 96 timmar på egen hand.

Anatomiska skillnader och reproduktionshistoria, samt ålderns och hästhållningens påverkan

Stons uterus består av en stor kropp (20 cm lång) och två skilda horn, som är ungefär 25 cm långa. De hänger från bukhålans dorsolaterala vägg i det breda ligamentet och är uppspända på så vis att hornens spetsar sitter lite närmare mot bukhålans vägg jämfört med livmoderns läge. I det levande stoet lyfter ofta tarmarna upp hornen mot bukhålans tak. Kroppen ligger delvis inuti bukhålan, delvis i bäckenhålan med den nedåtgående delen av tjocktarmen och rektum dorsalt samt urinblåsa och tunntarmar ventralt, som vid fyllnad kan trycka uterus åt sidan. När uterus är tom blir både horn och kropp platta.

Hos ett normalt sto fungerar de mekaniska barriärerna, såsom vulva, vestibulum, vagina och cervix, som skydd mot exempelvis fekala föroreningar. Med stigande ålder, muskelförtvining och många tidigare dräktigheter kan dock vulvan förlängas och vinklas dorsalt-kranialt. En redan ogynnsam konformation kan då förvärras, med en negativ påverkan på uterusmiljön som följd, då luft, kontaminerande agens och fekalier kan sugas in eller ha ett passivt inflöde in till vagina eller till och med till uterus. Även urin kan rinna ned i stons vagina om det är fel i vestibulums och vaginas muskler. Urinen och annan kontamination kan göra att cervix och uterus blir inflammerade, antingen på grund av direkt kontakt med organismer eller från en lokal inflammationsspridning. Det kan även finnas en genetisk disposition för detta, fullblod har t.ex. ofta tunna vulvaläppar, insjunket anus, en lågt placerad bäckenbotten och högt ansatt svans och då är risken för pneumovagina (aspiration av luft) förhöjd (Hemberg et al., 2005; Hurtgren, 2006).

Hemberg et al. (2005) menar att det utomlands är mycket vanligt att Caslick-operera (delar av dorsala vulvamynningen skärs bort, sys ihop och resultatet blir en sammanläkning mellan vulvaläpparna) fullblodsston. De gör en bedömning, baserat på personliga kontakter med utländska veterinärer, att 70-80% av alla fullblodsston utanför Sveriges gränser är opererade. Ett möjligt skäl till den höga andelen för just denna ras är att fullblodsston och -hingstar, som används i avelssammanhang, väljs i större utsträckning ut baserat på underlag från prestationer på banan och stamtavla, än andra raser där även fruktsamhet vägs in, enligt författarna.

LeBlanc et al. (1998) hade en hypotes om att en uterus belägen lågt i bukhålan, ventralt om pelvis, skulle ha svårare att tömma sig på vätska via cervix pga. gravitation vilket kunde vara en bidragande orsak till endometrit. De utförde därför en studie för att se om det var någon skillnad i uterus horisontella läge relativt cervix position mellan normala ston och ston med försenad uterustömning efter betäckning. Studien visade att det var en signifikant skillnad i uterus-cervix-vinkeln mellan de två grupperna av ston, men ingen skillnad mellan vänster och höger horn (även om det ena ofta låg längre ned). Författarna menar att detta kan vara ett skäl till att äldre ston oftare drabbas av endometrit än unga, då den förlust av strukturellt stöd och

sträckning av det breda ligamentet, som orsakar en ventro-kaudal lutning av uterus, kan vara en följd av många dräktigheter, ålder och avmagring.

Hurtgren (2006) påpekar att även unga ston (i synnerhet fullblod i tävlingskondition) kan vara predisponerade för endometrit. Unga (3-6 år) ston som hållits i tävlingskondition kan tappa en del fett i det perineala området och detta kan göra att rektum åker framåt/djupare in under svansroten och vulva hamnar ovanför pelvisöppningen i ett horisontellt läge, vilket försämrar dess slutförmåga. Den här ändrade perineala konformationen ger möjlighet till fekal kontamination. Hård träning kan även göra, pga. muskeltrötthet, att det perineala området slappnar av. Det kan också förekomma, framförallt i samband med motion och brunst då vulvaläpparna är slappa och ödematösa, aspiration av luft, fekalier och andra bakterier in i vagina och i extrema fall i uterus. Den negativa följden av pneumovagina kan vara att även fekalier och föroreningar följer med in och vaginit, cervicit och även endometrit kan därför orsakas av pneumovagina.

Varför uppkommer det en endometrit hos ston efter betäckning eller AI?

Man har tidigare trott att inflammationen vid endometrit främst beror på bakterier som kommit in i livmodern i samband med veterinärundersökning eller betäckning, då det är väl känt att det finns bakterier som kan orsaka endometrit i sperman och på hingstens könsorgan samt även opportunistiska bakterier i stoets egna genitala organ. Vissa forskningsresultat pekar på att de inflammationer som kan relateras till betäckning snarare induceras av sperman än av bakterier (Kotilainen et al., 1994; Katila, 1996). En studie som Kotilainen et al. (1994) gjorde gick ut på att studera livmoderns inflammatoriska respons på insemination av sperma. Resultatet stödde deras hypotes att sperma ofta är den främsta induktionen till inflammation då höga halter av polymorfonukleära celler (PMN), ffa neutrofiler, kunde uppmätas sex timmar efter inseminationen trots nästintill bakteriefri sperma och de kunde även se spermier inuti neutrofiler. De högsta halterna av neutrofiler hittades hos de ston som inseminerats av små volymer koncentrerad sperma, frusen eller färsk spelade ingen roll. Författarna föreslår två möjliga förklaringar till detta: antingen att det då blev en större kontaktyta mellan spermier och endometriet vilket triggar igång en större inflammationsprocess; eller på grund av att små inseminerade volymer gör att det mekaniska utflödet via vaginan blir mindre och det blir därmed ett högre antal inflammationsretande partiklar kvar som behöver rensas via lymfdränaget.

Både vid betäckning och vid AI deponeras sperma direkt i uterus och den snabbt övergående inflammationen i endometriet (som tillhör det mucosa-associerade immunsystemet och därmed är kapabel till lokal produktion av immunoglobuliner) som sker hos alla ston karaktäriseras av ett raskt inflöde av PMN in till uterus lumen (Troedsson et al., 2001). Syftet med detta inflöde är att rensa uterus från defekt, död och överflödigt sperma och andra kontaminerande agens. Det är dock nödvändigt för embryots överlevnad att inflammationen hinner lägga sig innan embryot vandrar ned till uterus lumen från äggledarna, vilket tar fem-sex dagar. Troedsson et al. (2001) drar slutsatsen att stoets immunförsvar därför måste vara kapabelt att släcka inflammationen inom fem dagar efter befruktningen, alltså innan

progesteronet som cirkulerar i blodet efter ovulation påverkar tonusen i cervix och myometriekontraktionerna. Hinner inflammationen inte lägga sig utvecklar stoet ett kvarstående tillstånd, s.k. persistent mating-induced endometrit (PMIE) där följderna kan bli infertilitet, vätskeansamling och ödem.

Faktum kvarstår: det är nödvändigt med en snabbt övergående inflammatorisk reaktion och ett inflöde av PMN till uterus lumen för att fagocytos av kontaminerande agens ska kunna ske; men det är den överdrivna och persisterande inflammationen som är av ondo och som skapar problem. Vad är det då som attraherar PMN? Svaret från Troedssons et al. (2001) är en tolkning av en undersökning gjord av Pycock & Allen, (1988): att uterus reagerar blixtnabbt på antigen genom frisläppning av PMN-kemotaktiska mediatorer vilket ger ett snabbt inflöde av PMN in till lumen. Komplementfaktorer, men även leukotrien B₄ (LBT₄), prostaglandin E (PGE) och prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) orsakar en kemoattraktion av PMN. Komplementkaskaden, som Troedsson et al. (1993b) i en studie påvisade, sker i stons uterus efter betäckning och ger upphov till en serie biologiska reaktioner, såsom ökad kärlpermeabilitet, kemotaxis, opsonisering för att underlätta fagocytos och lysering av agens, i syfte att bekämpa främmande agens i livmodern. Troedsson et al. (2001) drar slutsatsen att spermernas kemotaktiska roll, genom framför allt komplementaktivering, är nödvändig för att en snabbt övergående endometrit ska rensa uterus efter betäckning.

Sperma har dock en mer komplex roll än så: Troedsson et al. (2001) föreslår att den har en modulatorisk roll att sköta, detta efter kliniska observationer som antydde att ston, som inseminerats med sperma där seminalplasman tagits bort, utvecklar kraftigare och längre endometrit. De menar då att spermier och seminalplasma båda spelar aktiva, men motsatta, roller i styrningen av hur kraftig endometriten hos stoet blir efter betäckning: att spermierna trigger ett massivt PMN-inflöde som leder till fagocytos av överbliven sperma och bakterier samt frigör PGF_{2α} som orsakar myometriekontraktioner vilket ger en rensning av livmodern via cervix och lymfkärlen, medan seminalplasman har en motsatt, immunomodulerande roll.

Det kan här vara lämpligt att dra paralleller till hur innehållet i human sperma ser ut och vad den har för immunologiska egenskaper, då det finns mer forskning på det området. I en studie visade Denison et al. (1999) att human seminalplasma, som bl.a. innehåller PGE₂ och 19-hydroxy-PGE, stimulerar frisättningen av IL-8 från mucosan i kvinnans genitalia. På så vis kan neutrofiler, som invaderar cervikal mucosa och stroma, fagocytera spermier som inte är involverade i befruktningen. Det finns likväl även en motsatt effekt i human seminalplasma, nämligen att IL-10-frisättning stimuleras vilket kan tyckas motsägelsefullt då IL-10 är en inflammationsdämpande cytokin. Teorin som framförs är att IL-8 även är kemotaktisk för T-lymfocyter och en antigen-presentation för dem skulle vara förödande för spermernas möjlighet till en lyckad befruktning eftersom en kraftigare immunreaktion ökar risken för en total bortrensning av sperman, innan befruktning har ägt rum. Därför innehåller human seminalplasma prostaglandiner som kan inducera frisättning av både pro- och antiinflammatoriska cytokiner, som påverkar immunförsvaret, i den annars så ogästvänliga mucosan, så att miljön för spermier först förbättras för att sedan, i lagom takt, rensa bort överblivna spermier och andra kontaminerande agens.

Skillnader i immunförsvaret

När PMN strömmar in i uterus lumen är den önskade följden fagocytos av kontaminerande bakterier och sperma, samt frisättning av $\text{PGF}_2\alpha$ som orsakar myometriekontraktioner vilka ger en rensning av uterus via lymfkärl och cervix (Troedsson et al., 1993a). Om de höga halterna av $\text{PGF}_2\alpha$ består eller till och med ökar, kan en prematur luteolys eller förlust av embryot ske, då $\text{PGF}_2\alpha$ s funktion som bekant är att öka kontraktioner i myometriet.

Immunoglobuliner

Generellt sägs det att lokalt producerade antikroppar är viktigare vid ascenderande infektioner (såsom endometrit orsakad av sperma eller fekala föreoreningar) och att det systemiska immunförsvaret spelar en viktigare roll vid en hematogent förvärvad infektion. Läckage av serum in till lumen från ett inflammerat endometrium kan öka antikroppsinnehållet och antikroppar (främst IgG) hjälper även till med opsoniseringen. Lokalt producerad IgA, som finns där sperman deponeras (dvs. i uterus), kan interferera med bakterier på mucosans yta och hjälpa till med aktiveringen av komplementsystemet via den alternativa vägen.

I en preliminär studie (Asbury et al., 1980) kunde högre halter av IgA och IgG uppmätas i uterussekret hos SM (känsliga ston) jämfört med det sekret som undersöktes från RM (motståndskraftiga ston). Författarna ansåg dock att djurunderlaget var för litet för att kunna dra några slutsatser av studien. Troedsson et al. (1993b) genomförde en studie för att observera hur mängden IgA, IgG och komplementfaktor C3 varierade mellan en grupp av SM och en grupp av RM, efter en inokulation av *Streptococcus zooepidemicus*¹ i uterus vid östrus. De ville undersöka om och hur SMs immunförsvaret i uterus skiljde sig gentemot RMs. De första 24 timmarna var det ingen skillnad i halterna av IgG och C3 (som båda har opsoniserande egenskaper vilket ger receptoraktivering hos PMN) mellan de båda grupperna. PMN utövade en lokal konsumtion av de IgG och C3 som fungerat som opsonin, och gav därmed upphov till sjunkande halter de första 24 timmarna, vilket var väntat. Efter 36 timmar skiljde sig dock halterna för de båda grupperna: RMs halter av IgG och C3 började öka igen och lade sig på en nivå nära utgångsläget, medan SMs halter fortsatte att sjunka. Författarna drar slutsatsen att inflammationen hos RM lägger sig efter 24 timmar och att halterna därför återgår till de normala, men att SM inte lyckats med detta utan att en persistent inflammation uppkommer. Inga ändrade halter, eller skillnader, i IgA-nivåer mellan RM och SM kunde uppmätas under studien. Författarnas analys är därmed att det inte är immunoglobulinernas funktion som sviktar hos SM. Det antikroppsmedierade försvaret anses dock fortfarande vara en viktig komponent för en effektiv elimination av främmande agens i uterus (Troedsson, 1999).

¹ *Streptococcus zooepidemicus* är den vanligaste patogenen involverad i endometrit hos ston då den står för cirka 66% av alla bakterieorsakade endometriter. Den är en del av hästens naturliga mikroflora på huden och kan kontaminera uterus efter betäckning (Watson, 2000).

Cytokiner och kemokiner

Fumoso et al. (2007) visade i en studie hur de immunsystemsrelaterade substanserna IL-8, IL-10, PMN och MHC-II varierade under tre stycken efter varandra följande östralcykler (en där stona var opåverkade, en efter AI och en efter AI och immunmodulering) hos 16 ston som var uppdelade i grupperna SM och RM, åtta ston i vardera grupp.

I den första och andra cykeln var MHC-II, PMN och IL-8 väsentligt högre samtidigt som IL-10 var extremt mycket lägre hos SM. I cykel tre var skillnaderna mellan de båda grupperna mycket mindre. Författarna menar att detta bekräftar många nyckelkomponenter i skillnaden mellan SM och RM, bl.a. att de konstant höga nivåerna av IL-8 hos SM är en förklaring till det långdragna inflammatoriska svaret hos dessa ston, då IL-8 är en kemokin ansvarig för migration och aktivering av neutrofiler, monocyter, lymfocyter, basofiler och eosinofiler. Detta kan skapa en ond cirkel då dessa kan öka uttrycket av IL-8 och på så sätt underhålls inflammationen och drar ut på tiden. På samma vis hjälper de låga halterna av IL-10 (ett inhiberande cytokin) till att upprätthålla den här onda cirkeln då halterna är för låga för att hålla inflammationen i schack.

Opsonisering

En undersökning (Troedsson et al., 1993c) gick ut på att studera och jämföra hur fagocyterande och kemotaktiska egenskaper hos PMN hos ston fungerade i blodet versus i livmodern. Stona var indelade i grupperna RM och SM, och både rollen som PMN spelade samt uterusmiljöns påverkan studerades. Studien visade att SMs PMN var fullt funktionsdugliga, men bara om den rätta miljön gavs. Studien pekade faktiskt även på att SMs PMN till och med var bättre på både fagocytos och kemotaxis än de som studerades hos RM. Uterusvätskan som fanns hos SM var dock betydligt sämre på att opsonisera inokulerade *Streptococcus zooepidemicus*. Författarna tolkar detta resultat som att det är opsoniseringen som är den felande länken hos SM, inte dysfunktionella PMN då stonas PMN i blodet fungerade som de skulle. Det var först i uterusmiljön som deras fagocyterande egenskaper försämrades, i synnerhet som SMs uterusvätska faktiskt hade starkare kemotaktiska egenskaper än RMs. Detta kan dock delvis eller helt bero på en kraftigare inflammation och/eller PMNs egenskaper, och alltså inte endast pga. uterusvätskan. Summa summarum: enligt studien är dysfunktionella PMN hos SM ett resultat av att den opsonisering som uterussekretet ska orsaka är nedsatt, och PMN hos SM aktiveras mer än hos RM som ett svar på en kraftigare inflammation jämfört med den hos RM.

Tappad funktion hos PMN samt en försämrad migratorisk förmåga

Förmågan att kunna migrera till platsen där en inflammation äger rum (för att fagocytera och döda främmande agens) är självklart oundgänglig för att PMN ska kunna fungera korrekt. Liu et al., (1986) ställer sig tveksamma till att det är den opsoniserande förmågan som saknas hos SM, vilket Troedsson et al. (1993c) föreslog. De menar istället i sin studie (1986) att det delvis var i PMNs migratoriska förmåga felet låg, samt att de första PMN hos SM tappade sin fagocyterande funktion snabbt (12 timmar) och att den andra våg av PMN som flödade in då

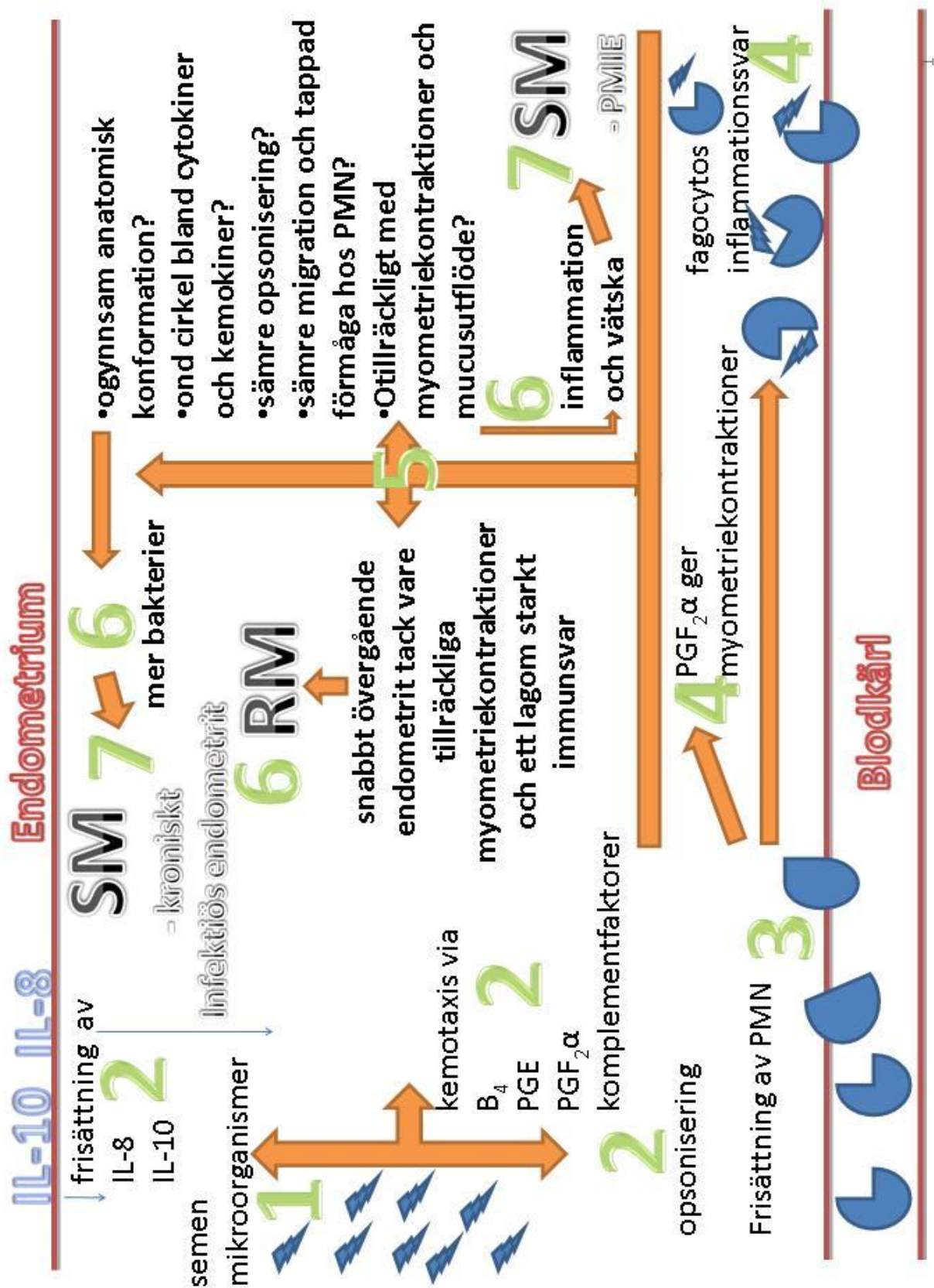
den första vågen inte räckte till, tappade sin funktion ännu snabbare (5 timmar). Detta står att jämföra med gruppen RM, som användes som referens, vars PMN höll en hög fagocyterande förmåga i 15 timmar. Därefter var de inokulerade *Streptococcus zooepidemicus* utrensade, så en andra våg av PMN behövdes inte och inflammationen minskade. Konklusionen blev att PMN rekryteras till uterus hos både SM och RM men att sämre migration och tappad fagocyterande förmåga utmärker de PMN som återfinns hos SM.

Myometriekontraktioners och mucus roll i det hela

Uterus viktiga förmåga att rengöra sig genom myometriekontraktioner som får mucus och intrauterin vätska att flyta ut via cervix poängteras av Causey (2006), som föreslår att den primära defekten hos SM inte är cellbiologisk eller biokemisk utan anatomisk. Exempel på de anatomiska komponenter som skulle kunna vara boven i dramat är, enligt honom:

- i endometriet skulle avsaknaden av ”longitudinella spår” kunna försvåra utflödet av mucus genom cervix
- i myometriet skulle en anatomisk skada/bristning kunna minska effekten av de viktiga myometriekontraktionerna som syftar till att driva ut vätska
- slapphet i det breda ligamentet
- uterus position
- cervix struktur

Troedsson et al., (1993a) visade i sin studie (där SM och RM inokulerades med *Streptococcus zooepidemicus* och därefter mättes myometriets kontraktioner) att myometriekontraktioner är en viktig del i uterus försvar mot patogener. I studien ökade myometriekontraktionerna hos båda grupperna ston, men med en markant högre frekvens, duration och intensitet hos RM. En liknande slutsats drog Nikolakopoulos & Watson (1999) i sin studie där de inhiberade myometriekontraktioner hos ston med hjälp av clenbuterol och på så vis ”framkallade” SM av RM. Enligt utsago var detta den första genomförda studien där en inokulation av *Streptococcus zooepidemicus* i normala ston, genom inhibering av myometriet, ledde till vätskeansamling i uterus 48 timmar senare. Då tre av fem ston med intrauterin vätskeansamling ändå lyckades eliminera de inokulerade bakterierna drog författarna slutsatsen att myometriekontraktioner är avgörande för bortforsling av vätska i uterus, men endast en bidragande faktor i bekämpandet av bakterier. På vilket sätt påverkar vätskan i livmodern? Den kan leda till inaktivering av komplementfaktorer och därmed försvåra PMNs fagocyterande aktivitet och även själva vätskevolymen kan hindra kontakten mellan bakterier och PMN. Även funktionen hos uterus mucociliära, longitudinella veck kan gå förlorad och därmed försämrats utflödet via cervix ännu mer. Dessutom fungerar det lymfatiska dränaget sämre (Causey, 2006).



Figur 1. Översiktsbild av hur sperma eller mikroorganismer oskadliggörs effektivt hos ston med normal motståndskraft men kan orsaka en kvarstående betäckningsinducerad eller kronisk infektiös endometrit hos känsligare och mottagligare ston.

DISKUSSION

Reproduktionssystemet kräver en unik miljö då det både ska kunna svara adekvat på patogener och överbliven sperma, samtidigt som det ska kunna tolerera den allogeniska sperman till viss grad och ett foster i elva månader. Det fantastiska faktum att en individ kan växa inuti en livmoder utan att moderns immunförsvar reagerar på den som ”icke-själv” och attackerar den, är synnerligen intressant och skall inte diskuteras vidare här, men onekligen bör uterus få en nominering för rollen den spelar i sammanhanget och det visar vilken otroligt speciell struktur vi har att göra med.

Vad är orsaken till varför vissa ston drabbas av endometrit och andra inte? Forskarna är relativt oense om vad som är den främsta boven i dramat: de har alla olika sätt att närma sig pudelns kärna. Frågan är om någon av dem har till fullo helt rätt eller fel? De allra flesta nämner i sina slutsatser att anatomin och förmågan att ha tillräckliga myometriekontraktioner är högst väsentlig för att undvika vätskeansamling och att oförmåga till dränering via cervix otvivelaktigt är negativt för stoets förmåga att göra sig kvitt en endometrit snabbt. Men detta mol allena orsakar inte en endometrit utan det är endast en delförklaring, då en otillräcklig dränering via cervix visserligen är avgörande för uppkomsten av en vätskeansamling och otillräcklig bortforsling av vätska i uterus, men endast en bidragande faktor i bekämpandet av bakterier. På vilket sätt och till vilken grad uterusvätskan hos SM påverkar bekämpandet av en överdriven endometrit är värt att diskuteras. Den kan leda till inaktivering av komplementfaktorer och därmed försvåra PMNs fagocytos och även själva vätskevolymen kan hindra kontakten mellan bakterier och PMN. Även funktionen hos uterus mucociliära, longitudinella veck kan gå förlorad och därmed försämras utflödet via cervix än mer. Dessutom fungerar det lymfatiska dränaget sämre. Det som är än mer avgörande att diskutera är hur vätskan påverkar andra, möjligtvis dysfunktionella, immunförsvars- och skyddsmekanismer hos SM, då ett genomgående mönster hos SM är mer uterusvätska, vilket ges varierande skäl och förklaringar. Några faktorer som presenteras som relevanta och som skulle behöva utredas ytterligare:

- Uterusvätskan: SMs uterusvätska medförde i studien av Troedsson et al. (1993c) mer kemotaxis men även sämre fagocytos och opsonisering hos PMN. Kan detta innebära att SM har både mer av och en annan sorts uterusvätska än RM och som negativt påverkar dess immunförsvars förmåga att eliminera en endometrit?
- PMN: Det skulle vara intressant med en studie som undersöker korrelationen mellan försämrad migration hos PMN, som Liu et al. 1986 menade var en felande faktor hos SM, och de andra faktorer som påverkas av en ökad mängd uterusvätska. Vad blir summan av ökad kemotaxis + försämrad fagocytos + inaktivering av komplementfaktorer + sämre utflöde via cervix + sämre lymfatiskt dränage? Påverkar detta PMNs migration och i så fall, till vilken grad?
- Anatomi: Det hade också varit värdefullt, pga. av det bias det innebär, med mer koppling mellan anatomiska felaktigheter (som kan leda till vätskeansamling och en ökad inflammatorisk reaktion) och alla de immunfaktorer som då påverkas, enligt

redovisning i de studier som använts till arbetet, istället för att ensidigt fokusera på en aspekt.

Det är rimligt att tro att hingstars sperma, likt human sperma, innehåller immunomodulerande ämnen som stimulerar frisättning av IL-8 och IL-10. Tillräcklig forskning är inte gjord på häst för att man ska kunna dra adekvata slutsatser och utföra nödvändiga åtgärder med grund i detta, men det är ett klart intressant resonemang att följa upp och forska mer i, då IL-8 ansvarar för migration och aktivering av PMN som i sin tur ökar uttrycket av IL-8 och en ond cirkel skapas med ett utdraget inflammationsförlopp. IL-10s funktion är också relevant att utreda då den anses vara inflammationshämmande.

Det har gjorts mycket mindre forskning på T-lymfocyt- och det cellmedierade immunförsvaret i stons reproduktionssystem än på det humoral men en personlig reflektion är att fokuset har ändrats: från immunoglobuliner till stons T-lymfocyt- och cellmedierade immunförsvaret under 2000-talet. Kanske just för att, som Katila (1996) konstaterade: ston drabbas inte av endometrit pga. immunoglobulinsbrist.

Sammanfattningsvis är en simpel slutsats av litteraturstudien att utvecklingen av endometrit hos ston har ett komplext förlopp (se Figur 1) och det är tvivelsutan inte endast en enstaka felande faktor om dess förlopp blir förlängt och för kraftigt. Uterus skyddsmekanismer mot främmande ting innebär komplexa interaktioner mellan olika element såsom hormonpåverkan, immunoglobuliner, PMN som ska migrera och aktiveras adekvat, kemotaxis, opsonisering, fagocytos och sist men inte minst mekaniska barriärer och utflöde.

Det kan dock finnas vissa felande länkar som är vanligare än andra och som då kan förklara den distinkta (som många författare menar inte är så distinkt) skillnad som finns mellan SM och RM. Förmågan att mekaniskt dränera bort uterusvätska är otvivelaktigt en viktig beståndsdel i stoets försvar mot endometrit och så även alla de faktorer som påverkar PMN att utföra sin funktion, men fortsatt forskning krävs för att kunna lösa gåtan varför vissa ston drabbas men inte andra.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Asbury, A.C., Halliwell, R.E.W., Foster, G.W., Longino, S.J.(1980). Immunoglobulins in uerine secretion of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology*, October, 14: 4.
- Causey, R.C. (2006). Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. *The Veterinary Journal*, 172: 405-421.
- Denison, F.C., Grant., V.E., Calder, A.A., Kelly, R.W (1999). Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release. *Molecular Human Reproduction*, vol.5 no.3: 220–226.
- Fumuso, E.A., Aguilar, J., Giguere, S., Rivulgo, M., Wade, J, Rogan, D. (2007). Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 118: 30-39.
- Hemberg, E., Lundeheim, N., Einarsson, S. (2005). Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares. *Journal of Veterinary Medicine*, 52: 474-477.
- Hurtgren, J.P. (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology*, 66: 560-566.
- Katila, T. (1996), Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*, 42: 197-204.
- Kotilainen, T, Huhtinen, M., Katila (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, 41:629-636.
- LeBlanc, M.M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C., Mauragis, D. (1998). Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance by scintigraphy. *Theriogenology*,50: 49-54.
- Liu, I.K., Cheung, A.T., Walsh, E.M., Ayin, S. (1986). The functional competence of uterine-derived polymorphonuclear neutrophils (PMN) from mares resistant and susceptible to chronic uterine infection: a sequential migration analysis. *Biology of Reproduction* December 1, 1986 vol. 35 no.5: 1168-1174
- Nash, D.M., Sheldon, I.M., Herath, S., Lane, E.A. (2009). Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Animal Reproduction Science*, Doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.11.008
- 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.
- Pycock, J.F., Allen, W.E. (1988) Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis *Veterinary Records* 123: 193-195

- Traub-Dargatz J.L., Salman M.D., Voss J.L. (1991). Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1991, May: 1745-7.
- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M., Ing, M., Pascoe, J., Thurmond M. (1993a). Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 307-313.
- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M., Thurmond, M. (1993b). Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. *Biology of Reproduction*, 49: 502-506.
- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M., Thurmond, M. (1993c). Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. *Biology of Reproduction*, 49: 507-514.
- Troedsson, M.H.T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 52: 461-471.
- Troedsson, M.H.T., Loset, K., Algami, A.M., Dahms, B., Crabo, B.G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, 68: 273-278.
- Watson, E.D. (2000). Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 221-232.
- Zent W.W. & Troedsson M.H.T. (1998). Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares: A field study. *Proc American Equine Practice*, 44: 64-65.