

Bilaga 1

Biomarkörer för inflammation och bindvävens hälsotillstånd i leden hos hästar under intensiv träning (tävlingshästar).

Stina Ekman, professor, Inst. för Patologi, SLU, Box 7028, 750 07 Uppsala
Maija-Leena Eloranta, docent, Inst. för Immunologi, SLU, BMC, Uppsala
Kjell Hultenby, docent, Inst för Patologi, KI., Huddinge.

Bakgrund

Ett övergripande mål är att genom ökad kunskap om patofysiologin vid leddskada hitta tidiga markörer för inflammation och för de katabola processerna i leden (vid tidig skada), långt innan morfologiska förändringar och kliniska symtom uppträder.

Vid leddskada uppträder alltid en inflammation i någon fas av processen. Denna kan vara sekundär till en destruktiv skada (osteoarthros) eller primär och som resultat ge en destruktion (osteoarthritis) (Radin, 1995). När kliniska symtom med hälta, radiologiska förändringar med subkondral benscleros/osteofyter och patologiska förändringar med broskerosioner och subkondral nekros, scleros/osteofyter visar sig är det oftast omöjligt att avgöra vad som orsakade skadan.

För att bättre förstå vad som orsakar kroniska leddskador hos våra tävlings- och ridhästar måste vi förstå vad som startar och upprätthåller den inflammatoriska processen. Om vi tidigt kan fånga upp en begynnande inflammation med hjälp av inflammationsmarkörer skulle vi kunna korrelera denna med tänkbara uppkomstmekanismer för osteoarthros/osteoarthritis (OA). Eftersom brosket har dålig förmåga att läka är det också viktigt att upptäcka en begynnande inflammation innan skada uppstår. Om vi får fram markörer för tidig inflammation kan dessa relateras till och utnyttjas för tidig behandling, anpassning av träningsdosen, uppföljning av olika behandlingar och konvalescensprogram.

Generellt kan olika stimuli påverka leden till uppbyggnad eller nedbrytning av sina vävnadskomponenter. Dessa olika stimuli påverkar broskcellerna i ledbrosket, synoviocyterna i ledkapseln och bencellerna i det subkondrala benet, så att balansen mellan uppbyggande och nedbrytande processer i brosk och benmatrix rubbas. Resultat kan bli att brosket bryts ned (broskerosioner) och benet byggs upp (benscleros). Detta är fallet i flera leddestruktiva sjukdomar såsom OA. Exempel på mekanisk stimuli som påverkar vävnaden i leden är frekvent fysiologiskt tryck, trauma och ofysiologiskt upprepat tryck. Dessa olika stimuli kan i sin tur på ett ej klarlagt sätt aktivera produktionen av katabola cytokiner (interleukin-1, 6 (IL-1, IL-6), tumornekrosfaktor- α (TNF- α) och "high mobility group box chromosomal protein-1" (HMGB-1), tillväxtfaktorer och adhesionsmolekyler (t.ex integriner) som leder till fysiologiska eller patologiska cellreaktioner. Cellerna kan t.ex börja proliferera och producera andra cytokiner och inflammationsmediatorer, öka sin syntes av extracellulärt matrix och brosknedbrytande enzymer (olika MMP:s). Cellerna kan migrera eller differentiera till en annan typ av bindvävscell, och slutligen kan även en celldöd ske. De ovan beskrivna stimuli interagerar och vid OA förekommer en blandning av dessa.

Principiellt startar en inflammation när ett stimuli aktiverar en cell att producera eller frisätta en kaskad av inflammationsmediatorer såsom histamin, serotonin, bradykinin,

prostaglandiner, leukotriener, PAF (platelet activating factor), komplementfaktorer, cytokiner, och proteolytiska faktorer.

Tillväxtfaktorer och cytokiner har påvisats i ledvätska från OA – leder. Cytokiner är lösliga peptider som produceras av synoviocyter, endothel celler och chondrocyter och påverkar andra cellers aktivitet. Denna påverkan kan ske endokrint och parakrint, men även autokrint. Cytokiner kan vara både anabola och katabola. Flera av de anabola cytokinerna går dock under benämningen tillväxtfaktorer såsom transforming growth factor beta (TGF β) och insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Vid OA förekommer både katabola cytokiner som IL-1, IL-6 och TNF-alfa, samt anabola tillväxtfaktorer som TGF- β och IGF-1. En nyupptäckt proinflammatorisk mediator (HMGB-1) har påvisats vid experimentell arthrit hos råttor. HMGB-1 förekommer normalt i cellernas kärna, men ses i cytoplasma och extracellulärt vid arthrit. Cellerna aktiveras via IL-1 och TNF- α att utsöndra HMGB-1, som i sin tur stimulerar syntesen av dessa 2 cytokiner.

En primär inflammation i ledkapseln kan starta en kaskad av processer till följd av frisättning av inflammationsmediatorer, metalloproteinaser, fria radikaler, kväveoxid (NO) och prostaglandiner. Alla dessa påverkar kondrocyterna och/eller broskmatrixkomponenterna.

När en primär metabolisk imbalans uppstår i ledbrösket till följd av ett trauma mot kondrocyten påbörjas också en kaskad av processer av både anabol och katabol karaktär. Nedbrytningen sker främst till följd av frisättning av olika proteinaser och prostaglandin E från kondrocyten, vilket ger en matrix degeneration med olika nedbrytningsprodukter. Dessa "wear particles" kan i sin tur starta en serie av cell-medierade reaktioner, såsom aktivering av synoviocyter, lymfocyter och monocyter i ledkapseln. Därefter uppstår en akut inflammation med flera proinflammatoriska cytokiner som IL-1, IL-6, TNF-alfa. Nedbrytningsprodukterna kan också reta till en ökad cell-syntes av prostaglandin E2 och matrix metalloproteinaser (MMP:s). Inflammationskaskaden är nu igång.

Intressanta resultat avseende ledinflammation och kopplingen till den mekaniska stressen som ledbrösket utsätts för har redovisats (Fermor et al., 2001). *In vitro* undersökningar med dynamisk kompression av ledbrösk från gris visar att denna koppling kan härledas till en ökning av leukotriener via en ökning av kväveoxid (NO). En ökad produktion av andra inflammatoriska mediatorer vid dynamisk kompression, såsom prostaglandiner (E-gruppen), har också diskuterats, som en del i patogenesen vid OA.

Vid **OA hos häst** anses en inflammation av synovialmembranet (synovit) och/eller ledkapseln (kapsulit) nästan alltid förekomma primärt eller i anslutning till ledskadan (McIlwraith, 1996). Det är därför ytterst viktigt att kartlägga den inflammatoriska processen hos häst. OA hos tävlingshästen är inte åldersrelaterad, varierar mycket i orsak, utseende och kliniskt förlopp när det gäller olika leder. Ett försök till uppdelning av 3 olika typer av OA hos häst har gjorts, där typ 1 angivits förekomma tillsammans med synovit och kapsulit i leder såsom karpus, kotled, hasled och kron- och hovled, typ 2 ses oftast sekundärt till en klart identifierad skada såsom intra-artikulära frakturer, traumatisk skada av ledbrösk eller ligament i leden, osteokondritis dissecans, subkondrala bensador, subkondrala bencystor, septisk arthrit och fragmentering av distala patella. Typ 3, anses vara kliniskt oväsentliga icke-progressiva ledbröskerosioner, vilka kan ses i flera olika leder. Oavsett hur man definierar OA hos häst bör man komma ihåg att en inflammation i leden, primär eller sekundär, alltid uppstår i någon grad och form. Vid en traumatisk arthrit hos häst anses den mekaniska delen med ett ökat frekvent trauma spela en stor roll tillsammans med den tidiga inflammationen (synoviten/kapsuliten) där interleukin-1 (IL-1) föreslås ha en initial roll (Platt – Bayliss, 1994; Pelletier – Martel-Pelletier, 1989). Aktivitet av IL-1 i serum och ledvätska från hästar med OA påvisades för 10 år sedan av Alwan och medarbetare (1991). Koncentrationerna av IL-1 i ledvätska var lika hög vid OA i kotled och karpalled hos häst som vid OA i knäled hos

människa. Vid den tidiga inflammationen i leden anses IL-1 degradera proteoglykaner via NO, men hos häst stämmer inte detta, då endast en IL-1 styrd inhibering av proteoglykan syntesen är reglerad via NO, men inte degraderingen (Bird et al., 1997).

In vitro försök på kondrocyter från häst ledbrosk har visat att IL-1- och TNF- α behandling av cellerna ger en ökad expression av MMP:s, men inte TIMP, vilket resulterar i en brosknedbrytning (Richrdson – Dodge, 2000). *In vitro* studier har dessutom visat att den anabola effekten som TGF- β framkallar, med en ökning av proteoglykansyntesen i ekvint ledbrosk, oavsett hästens ålder, tyvärr nedregleras av IL-1 (Iqbal et al., 2000). HMGB-1 är aldrig tidigare undersökt hos häst.

Material och metoder

Material från tävlingshästar som genomgått diagnostisk artroskopi efter hältutredning har använts. Detta material består av ledvätska, serum, ledkapsel och ibland ostekondrala fragment. Materialet är insamlat från Solvallakliniken (docent Gunnar Nilsson) och Mälarkliniken (docent Bengt Roneus).

Material från friska hästar har också insamlats från obduktioner vid inst för BVF, SLU. Det analyserade materialet utgörs av vävnad från kotleder och karpalleder från varmblodiga travare, Svenskt halvblod och fullblod. Sammanlagt 72 leder från halta hästar och 10 friska hästar har ingått i två av studierna (Ley et al., 2007, 2009).

Bioassayer har använts för att påvisa biologiskt aktivt cytokin: bioassayn för IL-6 baseras på en murin cell linje B9 som är beroende av IL-6 för sin överlevnad och för mätning av TNF- α utnyttjar man den cytotoxiska effekten av detta cytokin på en murin fibroblastcellinje L929. Genom dessa olika tekniker får man ett kvantitativt mått på förekomsten av biologiskt aktivt IL-6 och TNF- α i ledvätska. En bioassay för IL-1, som bygger på att cytokinet stimulerar proliferation av en murin T-lymfocyt cell linje D10(N4)M har också testats, men den gav tyvärr ospecifika resultat.

Även studier av vävnaden i leden innefattande undersökning av olika cytokiner (IL-6, HMGB-1) i ledkapsel och ledbrosk med immunohistokemi har gjorts, både på ljusmikroskopisk nivå och ultrastrukturellt. Detta görs för att identifiera de cytokinproducerande cellerna i leden.

I de senare studierna har vi arbetat med *in vitro* metoder, innefattande cellodlingar. Dessa är utarbetade vid Sahlgrenska sjukhuset i Göteborg under ledning av professor Anders Lindahl, och har nu under Cecilia Leys ledning även satts upp vid institutionen för BVF, SLU, i Uppsala. Broskceller från friska leder har samlats in. Cellerna odlas från två olika lokaliseringar, utsatta för olika belastning *in vivo*, i mellersta karpalledden. Cellsystemet bygger på pelletsformationer, vilket ger en kondroidvävnad. Dessa cellkulturer kan stimuleras med olika inflammationscytokiner, och i systemet kan vi på ett kontrollerat sätt se vad som händer med vävnaden.

Efter stimulering med IL-1, IL-6 och HMGB-1 undersöks sedan vävnaden på genexpression av flera olika strukturproteiner (aggrekan, versikan, kollagen typ I och II, COMP), cytokiner (IL-1, IL-6 och HMGB-1), enzymer (MMP-9, MMP-13, ADAMTS-5), kondrogen markör (Sox9) och deras vävnadsinhibitorer (TIMP-1). Vävnaden studeras också avseende cellmorfologi (ljusmikroskopiskt, ultrastrukturellt) samt vad gäller protein-uttryck (COMP), cytokinförekomst (IL-6, HMGB-1), med hjälp av immunohistokemi.

Dessa undersökningar kommer att presenteras i manuskriptform i Cecilia Leys avhandling (disputation 23 april 2009)

Resultat

In vivo studierna visade följande: I leder med osteokondrala fragment (chip-fragment) i hästens mellersta karpalled var aktiviteten av cytokinet interleukin-6 (IL-6) i ledvätskan avsevärt ökad, jämfört med kontroller och leder med OA utan fragmentering. Däremot sågs inga öknings av tumör nekros faktor (TNF)-alfa vid OA med eller utan fragmentering i leden.

Vidare konstaterades att broskceller i chip-fragmenten producerade IL-6, och i vissa fall förekom även produktion av IL-6 i synovial membranet.

I de osteokondrala fragmenten, samt i ledkapseln från dessa leder påvisades ett utträde från cellerna av det DNA-bindande proteinet high mobility group box protein-1 (HMGB-1), känd för att utanför cellen stimulera till inflammation.

In vitro studierna visade följande: Vid stimulering av broskceller från friska karpalleder med IL-6 och HMGB-1 påvisades en tendens till ökad broskbildning, men med ålders och individvariation. Däremot visade det inflammatoriska och osteoartrit-associerade cytokinet interleukin-1 (IL-1) en nedreglering av gener involverade i broskets uppbyggnad (Sox9, aggrecan, COMP, kollagen typ II) och uppreglering gener för brosknedbrytande ämnen (MMP-13, ADAMTS-5).

Vid jämförelse av cytokinernas effekt på celler som samlats från pre- (hög belastning) och icke predisponerade (låg belastning) broskskadeområden sågs ett likartat svar. Men i pellet-pluggarna från de två yngre individerna (1 – 2 år gamla) sågs en skillnad i det basala genuttrycket av strukturproteiner mellan pre- och icke predisponerade broskskadeområden. Cellerna från dorsal radial facet (mer belastad *in vivo*) visade ett genuttryck med högre expression av versikan och kollagen typ I, vilket är mer fibröst i sin karaktär, än cellerna från det mindre belastade området (palmar kondyl). I den palmara kondylen uttryckte cellerna mer kondroid karaktär med strukturproteinerna; aggrecan och kollagen typII.

Diskussion

In vivo studier för att bättre förstå patofysiologin vid OA hos hårt tränande och tävlande unga hästar är svåra att renodla. Tävlingshästarna har ofta tränats olika och behandlats med flera olika preparat, vilket alltid försvårar bedömningen av resultaten.

I våra *in vivo* studier har vi sett tendenser som klart visar att den inflammatoriska processen varierar vid olika typer av ledpatologi. De osteokondrala fragmenten, som ofta opereras bort, förefaller vara en källa för cytokinaktivitet och därmed en del i upprätthållandet av inflammationen.

För att renodla de olika cytokinernas inverkan på broskcellerna har vi valt att börja arbeta med *in vitro* system. Detta ger en tydligare bild av vad de olika cytokinerna har för roll i processen. Vi har visat att IL-1beta stimulerar brosk cellerna till inflammation och katabol metabolism, men att IL-6 och HMGB-1 förefaller ha en kondrogen inverkan. Upptäckten av HMGB-1 i både ledkapsel och fragment i equine OA är mycket intressant och antydande till att en translocering av proteinet verkligen sker i kondrocyterna, bör följas upp med fortsatta *in vivo* och *in vitro* försök.

Målet med underökningarna är att hitta biomarkörer för tidig leddskada och inflammation hos tävlingshästen. Specifika fragment av broskprotein eller cytokiner som kan analyseras i ledvätska eller serum skulle kunna användas vid diagnostik och utvärdering av behandlingsregimer.

Publikationer

“Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology”. Ley, C., Ekman, S., Elmen, A., Nilsson, G., Eloranta, M.-L.

J. Vet. Med A, 54:346, 2007.

“Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis”. C. Ley, S. Ekman, B. Ronéus, M.-L. Eloranta Res Vet Science 2009 Jun;86(3):490-7.

“Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 and -6 on cartilage matrix metabolism in three dimensional equine chondrocyte cultures”

Cecilia Ley, Emilia Svala, Anna Nilton, Anders Lindahl, Maija-Leena Eloranta, Stina Ekman, and Eva Skiöldebrand *Manuscript insänt till Osteoarthritis & Cartilage*

Inviterad till **Dorothy Russell Havemeyer Foundation Symposium on Equine**

Musculoskeletal Biomarkers at The Home Ranch, Steamboat Springs, September 28 -

October 2, 2009, där resultat presenterades av Stina Ekman och Eva Skiöldebrand. Abstract:

Ekman: “Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 and -6 on cartilage matrix metabolism in three dimensional equine chondrocyte cultures” och Skiöldebrand:

“GDF5 in equine articular cartilage - an interleukin (IL)-6 activated pathway in osteochondral fractures in athletic horses”. Mötet arrangerades av professor Wayne McIlwraith, USA.

Övrig resultatförmedling till näringen

Posters (2 bilagda), vid Hippocampus, SLU, Uppsala 2004 och vid Svenska bindvävsmötet, Lund 2007,

”Oral presentations” at NSVP (Nordic Society of Veterinary Pathology) inkluderade abstract i kongressboken, Köpenhamn, 2004 och Helsingfors, 2007

Posters vid NSVP Island, 2008

Equilibris nr. 2-2008; ”Leden och ledbrösket – komplicerade och känsliga strukturer.” Ley, c., Skiöldebrand, E., Ekman, S.

Referenser

Alwan WH., Carter SD., Dixon, JB. et.al.: ”Interleukin-1-like activity by equine synovial fluids and sera of horses with arthritis.” Res Vet Sci. 51:72-77, 1991.

Armstrong, S, Lees, P.: ”Effects of carprofen (R and S enantiomers and racemate) on the production of IL-1, IL-6 and TNFalpha by equine chondrocytes and synoviocytes.” J. Vet Pharmacol. Therap. 25:145-153, 2002.

Bird, JL., Wells, T., Platt, D., Bayliss, MT.: ”IL-1 beta induces the degradation of equine articular cartilage by a mechanism that is not mediated by nitric oxide.” Biochem Biophys Res Commun. 238;81-5, 1997.

Brama, PAJ., TeKopple, JM., Beekman, B., van Weeren, PR., Barneveld, A.: ”Matrix metalloproteinase (MMP) activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis and osteochondrosis.” Ann Rhem Dis. 57;697-699, 1998.

Fermor, B., Haribabu, B., Weinberg, B., Pisetsky, DS., Guilak, F.: ”Mechanical stress and nitric oxide influence leukotriene production in cartilage.” Biochem Biophys Res Com. 285:806-810, 2001.

Iqbal, J., Dudhia, J., Bird, JL., Bayliss, MT.: ”Age-related effects of TGF-beta on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage.” Biochem Biophys Res Commun. 274;467-71, 2000.

Kokkola, R, Sundberg, E., Ulfgren, A-K., Palmblad, K., Li, J., Wang, H., Ulloa, L., Yang, H., Yan, X-J., Furie, R., Chiorazzi, N., Tracey, KJ., Andersson, U., Erlandsson Harris, H. “High Mobility Group Box Chromosomal protein 1 – A novel Proinflammatory Mediator in Synovitis.” Arthritis & Rheumatism, 46;2598-2603, 2002.

May, SA, Hooke, RA, Lees, P.: ”Identity of the E-series prostaglandin produced by equine chondrocytes and synovial cells in response to a variety of stimuli.” Res Vet Sci. 46;54-57, 1989.

McIlwraith, CW.: ”General pathophysiology of the joint and response to injury” Chapter 3, page 40-70, *In Joint diseases in the horse*, McIlwraith – Trotter (eds), 1996.

Pelletier, JP., Martel-Pelletier, J.: ”Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID.” J Rheumatol Suppl. 18;19-27, 1989.

Radin, EL.: Osteoarthritis – the orthopedic surgeon's perspective. *Acta Orthop Scand* (Suppl 266), 66:6-9, 1995.

Richardson, DW., Dodge, GR.: "Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alfa on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondocytes." *Am J Vet Res.* 61:624-30, 2000.

Skiöldebrand, E., Lorenzo P., Zunino, L., Rucklidge, G.J., Sandgren, B., Carlsten, J. and Ekman S.(2001) Concentration of collagen, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid from equine middle carpal joints. *Equine Vet. J.* **33**, 394-402 .

Uhlhorn H., Eksell P., Sandgren B. and Carlsten J. (2000) Sclerosis of the Third Carpal Bone. A prospective Study of its significance in a group of young Standardbred trotters.

Acta Vet. Scand. **41**, 51-61.