



Sluttrapport «In vitro elektrofysiologiske studier av hestens tarmkanal»

Constanze Fintl, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU)

Ronny Lindberg, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU)

Geoff Pearson, University of Edinburgh

Mai, 2015

I Prosjektbeskrivelse

Dette samarbeidsprosjektet mellom Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), universitetet i Edinburgh i Skottland, samt Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), hadde som overordnet mål å øke vår forståelse for hestens tarmmotorikk gjennom *in vitro* elektrofysiologiske studier. Vi ønsket å kartlegge den normale elektriske aktiviteten i hestens tynntarm, men også å undersøke hvilken effekt inflammasjon kan ha på denne. Dette er et viktig ledd i å kunne formulere fremtidige behandlingsstrategier.

Prosjektet besto av to hoveddeler:

1. *In vitro* elektrofysiologiske studier hos hester med normal tarmfunksjon som karakteriserte tynntarmens elektriske mønster. Videre ble det undersøkt hvilke komponenter som bidro til å generere denne aktiviteten ved bruk av spesifikke kanalblokkere i muskelcellemembranen.
2. Resultatene fra den første delen av dette prosjektet ble deretter sammenlignet med tilsvarende målinger foretatt på tynntarmsegmenter med en simulert, aktiv inflammasjon. Prosjektets hypotese var at en slik tilstand vil resultere i et endret elektrisk mønster. I tillegg ble cellenettverkene til både det enteriske nervesystemet samt tarmens pacemakerceller sammenlignet mellom friske og sykdomsaffiserte hester ved bruk av immunohistokjemiske markører. Hypotesen var at en inflammasjonstilstand ville skade disse, noe som også kan bidra til funksjonelle forandringer. Det sistnevnte studiet var et samarbeidsprosjekt med Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU). Resultatene fra begge disse undersøkelsene ville dermed komplimentere og styrke hverandre.

Det er viktig innledningsvis å formidle at ingen eksperimenter i dette prosjektet ble utført på levende dyr, og at ingen hester ble avlivet som en del av disse studiene. Det ble kun brukt vevsprøver som var tatt fra hester som hadde blitt avlivet av andre årsaker, og da kun etter samtykke fra eier.

Delmål 1: In vitro elektrofysiologiske studier hos hester med normal tarmfunksjon

Mage- og tarmlidelser (kolikk) er dessverre et vanlig problem hos hest. Til tross for dette har vi ennå begrenset kunnskap om de underliggende årsaker, noe som er overraskende med tanke på de velferdsmessige og økonomiske konsekvenser kolikk ofte har. I den senere tid har heldigvis flere studier identifisert risikofaktorer for forskjellige typer kolikk, noe som er viktig for å forhindre at nye eller gjentakende episoder oppstår. Likevel vet vi fremdeles lite om hestens normale tarmfunksjon, og spesielt om de mekanismer som genererer og opprettholder

normal tarmmotorikk. Hva som skjer med disse i en sykdomsprosess, vet vi enda mindre om. Men, selv om vi ennå vet lite om dette hos hest, pågår det heldigvis mye komparativ forskning som har bidratt til en økt forståelse for disse prosessene. Dette har tydeliggjort at en normal, fungerende tarmkanal krever et uhyre komplekst samspill mellom glatt muskulatur, nerver og kjemiske faktorer så vel som de gastrointestinale pacemaker cellene, interstitial cells of Cajal (ICC). Det var nettopp dette samspillet vi ønsket å utforske videre med utgangspunkt i ICC og den rolle de spiller i disse prosessene.

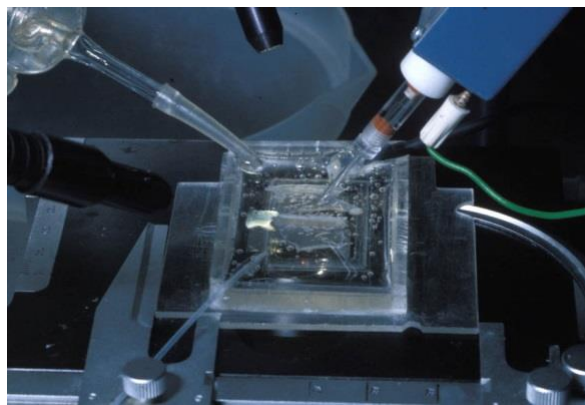
Interstitial cells of Cajal (ICC)

Interstitial cells of Cajal (ICC) har i de siste årene blitt tilegnet flere egenskaper som alle omfatter regulering av tarmmotorikken. Flere av disse er omdiskuterte, men det er i alle fall bred enighet om at ICC genererer pacemaker aktivitet i tarmkanalen. Dette gjør de ved å produsere kontinuerlige, rytmiske svingninger i membranpotensialet, såkalte "slow waves", som er avgjørende for å kunne produsere synkron og organisert tarmmotilitet. Disse slow waves blir overført til tarmens glatte muskelceller via intercellulære porter. Hvis denne påfølgende depolariseringen av muskelcellen overskrider cellens terskelverdi, vil dette resultere i åpning av L-type kalsiumkanaler, og dermed et aksjonspotensial og en muskelkontraksjon. Lokale enteriske nerveimpulser vil påvirke dette gjennom frigjøring av transmittersubstanser som øker eller minsker muligheten for at aksjonspotensialet blir nådd, hovedsakelig gjennom åpning og lukking av cellens kaliumkanaler. Frekvensen på svingningene vil dermed avgjøre den potensielle frekvensen av muskelkontraksjoner i tarmen. Det er med andre ord en kompleks interaksjon av flere elementer som resulterer i kontraksjon av tarmen, men det er pacemakercellene som er den underliggende drivkraften. Uten deres aktivitet, opphører tarmens organiserte bevegelsesmønster. Det var nettopp derfor vi ønsket å ta utgangspunkt i ICC og deres rolle i å generere normal tarmmotilitet hos hest.

In vitro elektrofysiologiske studier

Denne type studier fordrer spesialutstyr så vel som faglig kompetanse innen fagfeltet. Vi hadde i forkant av prosjektet opprettet et nytt laboratorium ved NMBU hvor nødvendig utstyr var overført fra universitetet i Edinburgh (Figur 1). Prosjektet var derfor også en fantastisk mulighet for oss til å etablere denne type forskning hos hest, ikke minst fordi behovet for basalforskning er stort.

Figur 1: Elektrofysiologisk laboratorium ved Hesteklinikken, NMBU (venstre). Intracellulære målinger av hestens tynntarm utført i et Sylgard kammer med en kontinuerlig infusjon av oksygenert Krebs' løsning (høyre).



Fordi denne type forskning er teknisk svært utfordrende, var det viktig å involvere samarbeidspartnere som hadde god kunnskap om dette fagområdet. Vi var derfor heldige at Geoff Pearson ved universitetet i Edinburgh hadde mulighet til å delta i prosjektet. Han har lang erfaring med denne type studier, og var derfor en viktig støttespiller gjennom hele prosjektet.

I den første delen av studiet ble den normale elektriske aktiviteten i hestens tynntarm (ileum) undersøkt. I forkant av dette var det viktig å gjennomføre preliminare eksperimenter for å være sikker på at alt laboratorieutstyr og oppsett fungerte som det skulle. I løpet av kort tid var alle komponenter testet og utstyr kalibrert, og det var deretter mulig å gå i gang med det første studiet. I korte trekk innebar studiene at et tynntarmssegment fra hester med normal tarmfunksjon ble tatt ut umiddelbart etter at de var avlivet. Deretter ble segmentet lagt i en modifisert Krebs' løsning som hadde blitt tilført oksygen. På denne måten ble prøvematerialet oppbevart under optimale forhold for å kunne bevare det så lenge som mulig. Vevet ble deretter preparert og ekvilibrert før intracellulære målinger av den elektriske aktiviteten i muskelcellene ble utført. Målingene registrerte cellenes slow wave form, frekvens og amplitude i tillegg til cellenes membranpotensial. Alle målinger ble registrert og deretter lagret for videre analyse.

For å definitivt bekrefte opphavet til den elektriske slow wave aktiviteten, var det nødvendig å utføre noen videre eksperimenter. Innledningsvis tilsatte vi derfor tetrodotoxin til vevsbadet hvor eksperimentene ble utført. Dette er en natrium kanal blokker som vil blokkere elektriske nerveimpulser, men vil ikke påvirke slow wave aktiviteten. Da slow wave aktiviteten fortsatte, bekreftet det dermed at den målte aktiviteten ikke utgikk fra intrinsiske enteriske, eller ekstrinsiske autonome nerver. Deretter ble det tilført en L-type kalsium kanal blokker (nifedipine). Som forventet forhindret den aksjonspotensiale hos muskelcellene (og dermed en muskelkontraksjon), men ikke slow wave aktiviteten. Dette støttet igjen opp om at de observerte elektriske mønstrene var slow waves generert av ICC da aktiviteten til disse cellene påvirkes i liten grad av denne type kalsium kanal blokkere. Eksperimentet bekreftet også at muskulaturen i hestens tynntarm er avhengig av kalsium innfluks gjennom L-type kalsium kanaler for å kunne generere et aksjonspotensiale, og dermed også en muskel kontraksjon.

Delmål 2: Inflammasjon og andre faktorer som påvirker normal tarmfunksjon

In vitro elektrofysiologiske studier

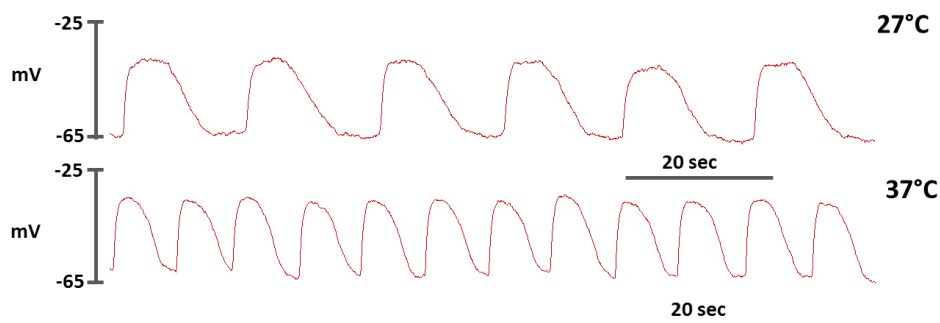
Etter den innledende studien ble forskjellige faktorer som kan påvirke den grunnleggende slow wave aktiviteten evaluert, inkludert en simulert inflammasjonstilstand. Hypotesen vi ønsket å teste var at hester med en slik tilstand har et endret slow wave mønster i affiserte tarmsegmenter, noe som kan bidra til de kliniske symptomer. Bakgrunnen for dette var humanstudier som har dokumentert en tydelige reduksjon i cellenettverkene til ICC i en rekke sykdommer inkludert ulcerativ kolitt, Hirschsprung's disease og megacolon for å nevne noen. Vår forskningsgruppe i Edinburgh har også dokumentert (og publisert) en markant reduksjon av ICC i forbindelse med kolikk og kolikkrelaterte sykdomsprosesser hos hest, så vel som forandringer i slow wave mønsteret hos hester med equine dysautonomia («grass sickness»). Denne studien ønsket derfor å gå videre ved å undersøke hvordan en inflammasjonstilstand i tarmen kan påvirke den elektriske aktiviteten, og dermed også motiliteten i tarmen.

Det var opprinnelig planlagt å bruke vevsprøver fra klinisk affiserte hester, og da fra hester med kroniske lidelser slik som inflammatory bowel disease (IBD). Dessverre ble tilgangen på

prøvemateriale mindre enn antatt, så en alternativ *in vitro* modell ble etablert. Metodikken i dette prosjektet var i utgangspunktet likt som i delmål 1, men i tillegg tilsatte vi forskjellige preparater, eller forandret temperaturen i vevsbadet. Mer spesifikt evaluerte denne studien effekten av prostaglandin E₂, så vel som flunixin og indomethacin. Disse ble valg ut da økt produksjon av prostaglandiner i forbindelse med en inflammasjonstilstand i tarmen er en sentral faktor i kolikkrelaterte sykdomsprosesser hos hest. Likeledes er behandling av slike tilstander ved bruk av NSAIDs, slik som flunixin, svært vanlig. Det har i den senere tid blitt et økt fokus på hvordan denne type farmakologiske preparater kan ha en negativ effekt på hestens mage- og tarmfunksjon, noe som vi også ønsket å utforske videre i denne studien. Disse stoffene ble derfor tilført vevet samtidig som de intracellulære målinger ble utført. Men før vi kunne gjennomføre disse, utførte vi titreringsstudier på preparatene for å komme frem til en arbeidskonsentrasjon vi ønsket å teste. Dette var en tidkrevende, men nødvendig del av studiene. Forandringer slik som frekvens, form og amplitude på slow wave kompleksene, samt forskjeller i membranpotensiale ble notert. Igjen var det et spesifikt område av tynntarmen (ileum) som ble undersøkt, slik at man også kunne sammenligne resultatene med det utført i de innledende studier. Dette viste at både prostaglandin E₂ samt flunixin signifikant påvirket den elektriske slow wave aktiviteten, mens effekten av indomethacin var noe mer tvetydig. Prostaglandin E₂ økte den basale slow wave frekvensen, mens flunixin hadde en motsatte effekt. Begge disse forandringene kan være av betydning hvis denne effekten vi observerte i laboratoriet er overførbart til hva som skjer i den levende hesten. Studiet har dermed gitt grunnlag for en viktig problemstilling som burde utforskes videre.

En ting som også ble åpenbart i forbindelse med disse studiene, var hvor følsom den elektriske aktiviteten var for temperaturforandringer. Vi var derfor nøye med at de farmakologiske eksperimentene ble utført ved 37.0-37.5°C i badet hvor vevet var plassert. Etter disse studiene var utført, ønsket vi derfor å kartlegge effekten temperatursvingninger kan ha på slow wave aktiviteten, da dette kan ha praktisk relevans med tanke på kolikkoperasjoner. I slike situasjoner vil tarmpartier ofte bli nedkjølt fordi bukhulen er åpen, og fordi det problemet hesten måtte ha kun kan korrigeres ved at tarmen midlertidig løftes ut av bukhulen. Hvis tarmpartiene blir liggende utenfor bukhulen over en lengre periode, kan nedkjølingen være betydelig. I denne studien dokumenterte vi interessant nok at nedkjøling ikke bare dramatisk reduserte slow wave frekvensen (Figur 2), men også at hvor lengre tarmpartiet var nedkjølt, jo lengre tid tok det før den opprinnelige elektriske aktiviteten var gjenopprettet.

Figur 2: Illustrasjon som viser effekt av temperaturforandringer på slow wave frekvensen. Frekvensen er halvert ved 27°C grader sammenlignet med det ved 37°C, noe som også betyr en potensielt halvering av frekvensen til muskel kontraksjonene.



Fordi slow wave aktiviteten styrer muskelkontraksjoner, kan dette bety at det også kan ta lengre tid før tarmene begynner å fungere som de skal etter en operasjon. Det er potensielt en svært viktig observasjon, da nettopp post-operativ ileus er en av de viktigste årsakene til at hester blir avlivet etter en kolikkoperasjon. Rent praktisk betyr disse resultatene at under kolikkoperasjoner burde man passe på at tarmene er utenfor bukhulen kortest mulig, og at man passer på at varmetapet i denne perioden er så lite som mulig ved bruk av tilført oppvarmet væske og tildekking av eksponerte tarmpartier med sterile duker.

Avslutningsvis ønsket vi å undersøke i hvilken grad tarmkanalens nettverk av både ICC og nerveceller kunne bli skadet ved kroniske inflammasjonstilstander. Dette er viktig for å bedre kunne forstå sykdomsprosessen, samt å kunne formidle mer nyansert prognostisk informasjon til eiere av slike pasienter. Vi undersøkte derfor vevsprøver fra hester som hadde en kronisk, inflammatorisk tarmsykdom («inflammatory bowel disease,» IBD). Slike sykdomsprosesser gir seg klinisk utslag i blant annet nedsatt næringsopptak, vekttap og smerter. Det er antatt at også unormal tarmmotilitet er en del av problemstillingen. Målet med denne studien var å undersøke om det fantes forandringer i cellenettverkene til både ICC så vel som i det enteriske nervesystem (ENS), som kunne støtte opp om teorien at unormal motilitet er en del av sykdomsbildet.

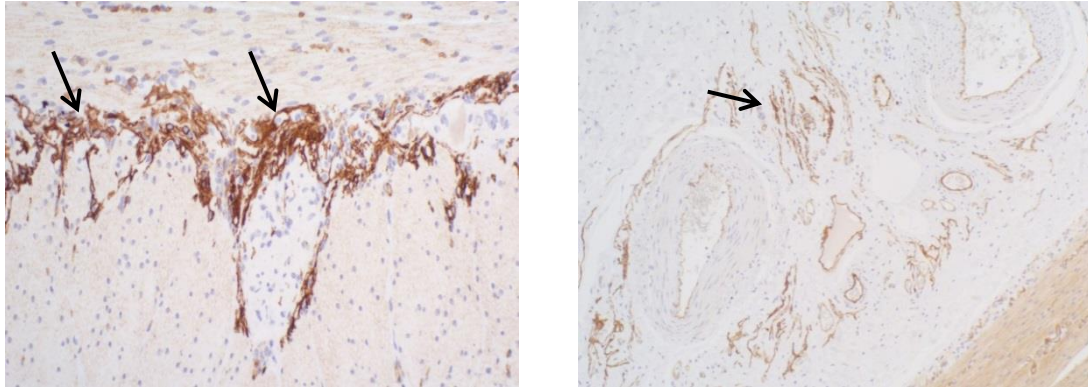
I denne studien ble vevsprøver fra forskjellige områder i tarmkanalen tatt ut ved obduksjon av unge varmbloodstravere med en klinisk diagnose på IBD. Fordi dette var arkivmateriale var det ikke lenger mulig å utføre elektrofysiologiske eksperimenter. Det ble derfor kun utført immunohistokjemiske studier på disse vevsprøvene. I tillegg ble det innsamlet tilsvarende vevsprøver fra unge varmbloodshester som hadde blitt avlivet av andre årsaker, som regel haltheter. Det var et bevisst valg å prøve å få de to gruppene så like som mulig, ikke bare når det gjaldt rase, men også alder. Dette fordi det gjør sammenligning lettere, men også fordi unge varmbloodstravere er overrepresentert når det gjelder å utvikle IBD. Det var naturligvis også viktig at hestene med en klinisk diagnose på IBD fikk dette endelig bekreftet histopatologisk. Professor Ronny Lindberg ved SLU var en viktig støttespiller i denne delen av prosjektet med sin kompetanse og lange erfaring innen diagnostikk av nettopp dette sykdomskomplekset.

Selve teknikken for den immunohistokjemiske studien var i hovedsak rutinemessig, men som alltid når man etablerer nye protokoller krever det preliminare studier for å finne den optimale konsentrasjonen for de utvalgte markører. I denne studien var det nødvendig med forskjellige markører som både identifiserte ICC så vel som ENS. En av disse, anoctamin 1 (ANO1), er en markør for ICC som ikke tidligere har vært brukt i undersøkelser hos hest. Denne farger en kalsium-aktivert klor kanal og viste seg å være en svært god markør for disse cellenettverkene (Figur 3). I tillegg er denne klor kanalen funksjonelt viktig for ICC, noe som gir et interessant perspektiv. Den andre markøren som er typisk er brukt for ICC, CD117, binder en reseptor på celleoverflaten. Selv om denne reseptoren kan forsvinne inn i cellen ved en inflammasjonstilstand, er det likevel noe usikkerhet om det nødvendigvis også betyr at selve cellene er permanent ødelagte, og dermed også funksjonen. Ved å kunne bruke begge disse markørene kan man få et mer nyansert bilde av integriteten til cellenettverkene så vel som en indikasjon på funksjonen.

Når det gjaldt markører for ENS, ble det utvalgt to markører, anti-protein gene product (PGP 9.5) og anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP). Den førstnevnte markøren var en god markør på selve nervecellene, mens GFAP farget glial celler. Begge markørene har blitt brukt

tidligere, og gir et godt sammenligningsgrunnlag for tettheten av nerve og glial celler mellom friske og sykdomsaffiserte hester. I tillegg ble samtlige snitt kontrollfarget med H&E.

Figur 3: Snitt fra tynntarm hvor det i figuren til venstre er brukt ANO1 til å farge ICC cellenettverk (piler). I bildet til høyre er nevroner i submucosa (pil) farget med en annen markør (PGP9.5).



Et spesielt digitalt analyse program (Image-Pro Plus[®]) brukes ved analyse av tettheten til den immunologiske reaktiviteten av disse cellenettverkene. Selv om de endelige resultatene ennå ikke foreligger i sin helhet, kan vi allerede nå si at studiet har dokumentert forandringer i cellenettverkene til både ICC og ENS hos sykdomsaffiserte hester sammenlignet med kontrollmateriale tatt fra friske hester. Disse funnene kan dermed også bidra til å øke forståelsen for de patologiske prosessene, og likeledes det sykdomsbildet vi typisk ser hos disse hestene.

II Samarbeidspartnere

Prosjektet har vært et samarbeid mellom Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), universitetet i Edinburgh i Skottland, samt Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU). Våre samarbeidspartnere i Edinburgh, Geoff Pearson og Neil Hudson har begge bidratt med kompetanse når det gjelder elektrofysiologi. I tillegg har de vært viktige støttespillere når det gjelder å diskutere funn, samt å presentere disse i publikasjoner og annen videreformidling. I tillegg har vi fått god hjelp av en statistiker, Ian Handel, som også jobber ved universitetet i Edinburgh. Han har bidratt til analyse av begge elektrofysiologistudiene, samt vil også se på de endelige data fra den avsluttende immunohistologiske studien. Ronny Lindberg ved SLU har vært en viktig støttespiller i den sistnevnte studien både med diagnostikk og kunnskap om IBD affiserte hester. Det var også hans arkivmateriale av sykdomsaffiserte hester som ble brukt i denne studien. Charles Press ved NMBU har også vært sentral i dette arbeidet, både med utførelse, så vel som analyse av bearbeidet materiale. Samtlige samarbeidspartnere i prosjektet har deltatt med imponerende entusiasme. Prosjektet har derfor blitt fullført kun noen måneder på overtid, men innenfor de økonomiske rammer som var gitt, og uten unødig ressursbruk.

III Resultatformidling

Formidling av noen resultater har allerede begynt med presentasjoner både nasjonalt og internasjonalt. Dette har inkludert to elektrofysiologiske studier hvor den ene beskrev effekten

av temperaturforandringer på slow wave aktiviteten, og den andre på en tilsvarende effekt av prostaglandin E₂ og NSAIDs. Spesielt den førstnevnte studien har fått mye oppmerksomhet, kanskje fordi den har umiddelbar klinisk relevans. Resultatene har blitt videreformidlet ved to store hestekongresser i USA av to anerkjente hesteveterinærer som personlig tok kontakt med prosjektansvarlig for å få tillatelse til å videreformidle resultatene. I tillegg har denne studien blitt publisert i Equine Veterinary Journal som er et av de viktigste internasjonale fagtidsskriftene for hesteveterinærer.

Det er forventet at videre formidling vil skje også etter ferdigstilling av prosjektet. Dette gjelder i første rekke det andre elektrofysiologiske studiet som er nå klart for submittering. I tillegg er det forventet at studiet som har sett på immunohistologiske forandringer hos hester med IBD vil bli ferdigstilt og submittert for publikasjon i løpet av høsten. Informasjon om prosjektet i sin helhet har også tidligere blitt publisert i Norsk Veterinærtidsskrift. Formidling av resultatene er dermed utført ikke bare som planlagt, men også i overkant av dette, noe vi er fornøyd med. Det er også viktig å poengtere at det også allerede nå er planlagt fremtidige prosjekter sammen med gamle og nye internasjonale samarbeidspartnere.

IV Oppsummering

I sammendrag har studiene møtt målsettingen ved å bidra til og bedre forstå hvordan normal tarmmotorikk hos hest er generert, samt hvilke faktorer som kan påvirke denne. Dette kan med tid bidra til å utvikle en logisk og fokusert behandlingsstrategi for hester med kolikk. Studiet har også vært viktig fordi det har muliggjort utvikling av laboratorieteknikker som vil være sentrale også i fremtidige studier. Fordi det er begrenset basalforskning innen dette fagområdet, har dette prosjektet også vært svært viktig. Parallelt med dette har naturligvis også kompetansen og kunnskapen til samtlige involverte parter økt, noe som er essensielt for å kunne føre dette forskningsfeltet videre.