

Proteiner i osteochondrose – nøkkelen til hvordan sykdomsprosessen styres og nedarves

Kristin Olstad

Formalia:

- Opprinnelig prosjektperiode var fra 01.01.2013-31.12.2014.
- I 2012 ble forskergruppen tildelt en 3-årig stipendiatstilling finansiert av NMBU.
- Det ble ansatt stipendiat med oppstart 07.10.2013. Pga. deltidsstilling, pliktarbeid og 14 dager sykemelding var sluttdato for stipendiaten 04.12.2016. Avhandling ble levert til vurdering 24.11.2016, godkjent 24.02.2017 for offentlig forsvar, som finner sted 28.02.2017.
- For at stipendiaten skulle være med på planlegging og gjennomføring ble det søkt om og innvilget utsettelse av sluttdato fra 31.12.2014 til 31.12.2015.

1. Bakgrunn

Bakgrunnen for prosjektet var at de strukturelle/morfologiske forandringene i osteochondrose er, gjennom tidligere forskning, godt beskrevet men man vet lite om hvilke funksjonelle proteiner som styrer disse forandringene, og som derfor kan være involvert i den arvelige predisposisjonen for sykdommen. Osteochondrose oppstår som en konsekvens av svikt i blodtilførselen til vekstbrusk og påfølgende iskemisk chondronekrose, eller et «infarkt» i vekstbrusken. Svikten har vært forbundet med inkorporasjon av blodkarene i forbeiningsfronten underveis i vekstperioden. Vaskulær svikt er per i dag vist å være mekanismen for sykdommen på tre forskjellige måter: gjennom studier av predileksjonssteder på hest i aldersvinduet for når lesjonene oppstår, komparative studier til andre arter/gris, og eksperimentelle studier der man ved å kutte blodtilførselen kirurgisk viste at dette ledet til både osteochondrose (forsinket forbeining) og oppsprekking/osteochondrosis dissecans (OCD); løse biter i ledd (vist på gris, hest, geit m.fl.).

Prosjektets hovedmål var:

Hvilke proteiner kan være involvert i osteochondrose, i lys av at det nå er vist at sykdommen oppstår via svikt i blodtilførselen og iskemisk chondronekrose?

Følgende delspørsmål skulle besvares:

- a. Hvilke proteiner har vært foreslått involvert i osteochondrose i den eksisterende litteraturen, der osteochondrose er beskrevet som dyschondroplasi?
- b. Hvilke funksjoner er kjent for disse proteinene, er noen av dem relatert til blodtilførsel, og kan proteinene derfor også være relevante for osteochondrose via iskemi?
- c. Hvilke proteiner har vært forbundet med osteochondrose i andre vev, og kan derfor være forbundet med iskemi i vekstbrusk, altså osteochondrose?
- d. Er kandidatproteinene til stede i vev med osteochondroselesjoner?
- e. Blir kandidatproteinene aktivt produsert i vev med osteochondroselesjoner?
- f. Kan kandidatproteinene knyttes opp imot et spesifikt stadium av sykdomsprosessen, for derigjennom å svare på om det har en primær, aktiv rolle eller representerer en sekundær konsekvens av sykdomsprosessen?

2. Material og metoder

Materialet i prosjektet har bestått av følgende:

a. **Litteratur**, hovedsakelig fra biblioteket ved NMBU Veterinærhøgskolen, men også fra anerkjente kilder på internett. Vi ønsker særlig å trekke frem følgende:

b. Et **konferanse-abstract** forfattet av Eli Grindflek, som forteller nøyaktig hvilken region på kromosom 13 som er forbundet med den arvelige predisposisjonen for osteochondrose hos gris: https://asas.org/docs/default-source/wcgalp-proceedings-oral/373_paper_9899_manuscript_1064_0.pdf?sfvrsn=2

c. I tillegg ble det i søk etter navn og funksjoner for genene i den relevante regionen benyttet **elektroniske kilder** som NCBI Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/), GeneCards, OMIM, The Human Protein Atlas, Ensembl og PubMed.

NB! Det er svært viktig å være klar over følgende:

-Prosjektet hadde på ingen måte til hensikt å undersøke om den arvelige predisposisjonen for osteochondrose var den samme på hest som på gris, eller vice versa.

-Grise-studien ble kun brukt for å finne helt nye kandidat-proteiner som kunne være del av en kaskadereaksjon, feedback loop eller funksjons-familie med plausibel rolle i osteochondrose.

-Dette fordi: hvis man hadde holdt seg utelukkende til den eksisterende litteraturen på hest så ville man vært begrenset til de proteiner som har vært diskutert der. Slike studier har ofte blitt gjennomført på feil alder, på feil sted og i feil stadium av utviklingsprosessen for å kunne være valid årsak til osteochondrose. Hvis man hadde begrenset seg til den eksisterende litteraturen ville det altså vært en reell risiko for at proteiner som genuint er involvert i osteochondrose ikke ville blitt fanget opp. Resultatene av prosjektet bekrefter dette.

I tillegg til litteraturen har det blitt benyttet fysisk materiale, som følger:

d. Blokker med **eksperimentelle osteochondrose-lesjoner** fra hest: i 2009 ble det gjennomført et prosjekt der man under artroskopisk visualisering kuttet blodtilførselen til et lite område av vekstbrusken i distale femur hos fjordingføll og viste at dette førte til iskemisk chondronekrose, osteochondrose, OCD og subchondrale beincyster. Fra prosjektet var det tilgjengelig blokker med lesjoner av kjent varighet etter operasjon som følger: 1, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42 og 49 dager. Blokker fra samtlige føll ble undersøkt for noen proteiner, men hovedfokus var på føllene undersøkt fra 1-21 dager etter operasjon fordi man var interessert i dokumenterbart tidlige lesjoner, ikke uspesifikke sekundær-forandringer, og også fordi fra 21 dager ble lesjonene synlige med billeddiagnostikk og kan da følges med billeddiagnostikk, dvs. protein-tester har liten verdi i forhold til å være årsak til sykdommen (selv om de på disse stadiene fortsatt kan ha en verdi i forhold til «staging», behandlingsvalg og prognostisering, men det var ikke fokus for dette prosjektet).

e. Blokker med **spontane osteochondrose-lesjoner** funnet i hester som kom inn for rutinemessig post mortem undersøkelse ved NMBU; lesjonene var karakterisert som tidlige på grunnlag av sammenligning med gris, spontane og eksperimentelt induerte lesjoner.

f. Det ble også samlet inn nytt materiale til artikkel I i doktorgraden fordi denne innebar elektronmikroskopi og teknikken er fullstendig avhengig av rask fiksering (ideelt sett innen 30 minutter) og spesialiserte fikseringsvæsker (paraformaldehyd og glutaraldehyd).

g. Samling av materiale til frysesnitt ble diskutert og noen få prøver ble samlet til pilotstudier, men det ble ikke samlet store mengder frossent materiale grunnet vanskeligheter med lagring, tilgang til frysesnitting osv.

Metodene i prosjektet har bestått av:

h. Prosjektet startet med grundig og omfattende **litteratursøk**. Dette gjaldt både proteiner allerede foreslått involvert i osteochondrose hos hest, ihht. prosjektplanen, men også etter hvert proteinene fra den aktuelle regionen på kromosom 13 forbundet med osteochondrose hos gris. Dette var en stor jobb og det ble lett på kryss og tvers: hvilke proteiner satt i denne regionen på grisekromosomet, hvor satt de samme proteinene på hestegenomet, hadde disse regionene vært forbundet med arv på hest osv. Derneft ble det gjort litteratursøk også for valg av proteiner til artikkel: har noen av disse proteinene vært forbundet med: blodkar/iskemi, (vekst-)brusk, og/eller endochondral forbeining/beinvev hos noen som helst dyreart eller mennesker. Søket dannet grunnlag for en liste i prioritert rekkefølge etter hvilke proteiner som hadde roller i flest av de forannevnte kategoriene; listen inneholdt opprinnelig 12 proteiner (se Resultat, nedenfor).

i. Det ble også gjennomført litteratursøk for den immunhistokjemiske metoden: finnes det antistoffer for farging mot dette proteinet, er det homologt til proteinet i hest (> 90-95 % homologt), er det kryss-reaktivt til andre proteiner hos hest osv. Det ble også søkt etter kontroller og metoder for evaluering, og da resultatene av fargingen var klare ble det også gjennomført ny litteratursøk i forhold til de forskjellige proteinenes funksjoner.

j. Derneft fulgte omfattende og svært ressurskrevende (tid, penger, personale) prosess med utvikling av faktiske protokoller for **immunfarging**: ved oppstart hadde vi KUN protokoller for 3 proteiner allerede tilgjengelig: VEGF, EGFL7 og kollagen type I, hvorav to av disse ble utviklet i tidligere egne prosjekter: kollagen type I i artikkel I i doktorgraden og EGFL7 i Maria Löfgrens doktorgrad fra 2016, dvs. to protokoller som var helt nye for farging av hestevev. En protokoll for HIF-1a som fungerte i vev fra mus lot seg ikke overføre til hestevev ıla. prosjektperioden. Videre ble det testet ut protokoller for de 8 mest spennende proteinene fra griseegenomet, inkludert omfattende leting etter antistoff, utprøving av riktig forbehandling med enzymer, konsentrasjon/styrke på antistoffet og inkubasjonstid, positive og negative kontroller osv. Av de 8 proteinene lyktes man i å oppnå pålitelig farging av god kvalitet for 3 proteiner; fargingen for et fjerde lyktes i noen, men ikke alle prøver og fremstod derfor som upålitelig og ble ikke undersøkt videre. Samtlige av de 3 proteinene har aldri noensinne tidligere vært forsøkt farget for i vekstbrusk fra hest (eller andre arter).

k. Derneft fulgte **evaluering av snittene** og utvikling av en metode for systematisk gjennomgang og rangering av fargingen i forskjellige deler av prøvene, og sammenskriving av observasjonene i en artikkel. Den ene artikkelen i doktorgraden handlet om at man gikk videre med et spesifikt av proteinene; kollagen type I, i et større antall prøver fra hestefoster og føll.

l. Det ble forsøkt å **isolere RNA** for å undersøke om proteinene faktisk ble aktivt produsert i vevet med lesjoner av kjent varighet. Dette var vanskelig fra formalin-fikserte parafin-blokker; det krevdes ca. 1 gram brusk for å isolere RNA av akseptabel kvalitet. Problemet ble da at det ikke lenger var mulig å isolere RNA fra spesifikke steder i prøven slik som den tidlige lesjonen eller responsen på den: alt måtte males opp og analyseres som ett hele, og dette har vi allerede gjort i osteochondrose-lesjoner på hest (Johannessen *et al.*, 2007). Vi

lyktes altså med å isolere RNA fra formalin-fiksert vev, men ikke på en måte som gjorde det mulig å svare på delmålet/aimet.

m. Men: vi fant at i de eksperimentelle lesjonene med kuttet blodtilførsel og iskemi så døde etter hvert chondrocyttene som var iskemiske, og det gikk an å lese av hvor lang tid etter at cellen mistet blodtilførselen proteinet sluttet å være synlig i prøven. I praksis gikk det derfor an å inferere hvor nylig proteinet måtte ha vært produsert, basert på hvor fort det ble borte når cellen var død og det ikke lenger ble aktivt produsert og det dreide seg om veldig kort tid: de fleste proteinene slukket ved 4 dager etter iskemi. Prosjektet har derfor både klart å isolere RNA, men ikke på en sånn måte at man kunne si om det ble aktivt produsert på spesifikke steder i tidlige lesjoner, og også: allikevel klare å si noe om dette gjennom å si hvor fort proteinet forsvant fra disse stedene når cellene var døde og det ikke lenger ble produsert.

3. Resultat

Prosjektet har resultert i en doktorgrad, og alle funn er sammenfattet der. Kort oppsummert kan man si at:

Fra tidligere arbeid har det blitt klart at det kun er én eller et fåtall karkanaler som svikter og gir iskemisk chondronekrose i osteochondrose; samtidig med at de nabo-liggende karkanalene forblir intakte. Siden denne oppdagelsen har vi derfor hatt stort fokus på å finne forskjeller mellom nabokanaler, ettersom disse potensielt kan forklare hvorfor én kanal svikter, mens nabokanalen forblir intakte. Dette var også hovedmål for doktorgraden.

-I artikkel I i doktorgraden ble karkanaler i vekstbrusken hos føll undersøkt med transmisjonselektronmikroskopi. Det ble gjort to viktige funn: det ble funnet forskjellige typer diskontinuiteter i endothelet i noen, men ikke samtlige karkanaler, og: et mindretall karkanaler var omgitt av kollagen type II, som er den vanligste typen kollagen i vekstbruskmatris, mens flertallet var omgitt av kollagen type I, som er den vanligste typen kollagen i beinvevsmatris. Dette siste funnet var helt nytt og har aldri vært rapportert i noen art før. Begge disse forskjellene i endothel og kollagen falt inn under hovedmålet for graden.

-I artikkel II ble det jobbet videre spesifikt med forskjellen i kollagen I og kollagen II: i artikkel I var det kun mulig å se på brusken i et lite område fra noen få føll (dette pga. teknikken elektronmikroskopi, som har svært høy forstørrelse men derfor kun er egnet til å se på små områder, snarere enn for screening av store mengder vev fra mange dyr). Forskjellen mellom om kanaler var omgitt av kollagen I eller II ble bekreftet i prøver fra et predileksjonssted for osteochondrose i et større antall dyr. Resultatene indikerte også at kollagenet ble produsert av mesenchymalcellene inne i karkanalene; det kan derfor være at det er noe galt med programmeringen av disse cellene som er utgjør den arvelige predisposisjonen for osteochondrose.

-I artikkel III gikk man enda lenger med å se på forskjellen mellom kollagen I og kollagen II rundt karkanalene, og skrev også om de øvrige proteinene som ble funnet fra litteratursøk, og fra grisegenomet kromosom 13, da med særlig fokus på proteiner som har med blodtilførsel/iskemi, vekstbrusk og endochondral forbeining/beinvev å gjøre, inkludert proteiner som har med matrisproduksjon/produksjon av kollagen I, II og fiber-dannelse å gjøre. I artikkel III ble det immunfarget for disse proteinene i vev med eksperimentelle osteochondrose-lesjoner (blodtilførselen var kuttet kirurgisk), dvs. lesjoner med kjent varighet der man altså kunne garantere at det man så på var tidlige forandringer, ikke sekundære konsekvenser.

Ett av de viktigste resultatene fra prosjektet som ett hele er proteinene som ble funnet og researchet ifm. doktorgradens artikkel III. Disse ble sammenfattet i en tabell (Table 2, nedenfor) der de ble ordnet i prioritert rekkefølge etter om de forekom i mange eller få av kategoriene for om de hadde kjente funksjoner i blodkar/iskemi, brusk eller beinvev. Tabellen viser også at fargingen lyktes for TRPC1, ZBTB38, CHST2, VEGF, EGFL7 og kollagen type I.

Table 2. Shortlist of Proteins in Order of Decreasing Interest According to Functions.

Interest Order	Protein	Linked to Function or Disease in					Immuno-histochemical Staining Success
		Blood vessels	Cartilage	Collagen type I	Growth	Bone	
1	TRPC1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	PCOLCE2	No	Yes	Yes	Yes	No	No
3	PLOD2	No	Yes	Yes	No	Yes	No
4	PFN2	No	Yes	No	Yes	Yes	No
5	ZBTB38	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
6	CHST2	Yes	Yes	No	No	No	Yes
7	AGTR1	Yes	No	No	No	Yes	No
8	WWTR1	Yes	No	No	No	Yes	No
9	HIF1 α	Yes ⁴³	Yes ⁴³	?	Yes ⁴³	?	No
10	VEGF	Yes ⁵⁵	Yes ⁵⁵	?	Yes ¹	Yes ¹	Yes
11	EGFL7	Yes ²²	Yes ²²	?	?	?	Yes
12	Collagen type I	Yes ¹⁷	Yes ¹⁷	N/a	Yes ²³	Yes ²³	Yes

Det finnes tilnærmet uendelig med interessant litteratur for hvert av disse proteinene som det er umulig å gjengi i denne rapporten. Kort oppsummert kan man si om proteinene det lyktes å farge for:

-TRPC1: Dette proteinet er en kalsium-kanal; det er i superfamilie med et protein som heter TRPV4 som har vært forbundet med multiplert skjelett-dysplasi; en tilstand som ligner på osteochondrose, hos mennesker.

-ZBTB38: Dette proteinet er en transkripsjonsfaktor som har vært forbundet med dvergvekst, og derfor nødvendigvis må ha en funksjon i vekstbrusk, hos mennesker.

-CHST2: Dette proteinet er et enzym som er involvert i modifisering av ekstra-cellulær matriks, inkludert i vekstbrusk.

-VEGF: Dette proteinet reguleres av oksygen/iskemi og er et signal for innvekst av nye blodkar.

-EGFL7: Dette proteinet er også relatert til blodkar og ble tidligere funnet inne i karkanaler hos føll.

-Kollagen type I: Dette proteinet er en del av den ekstracellulære matriksen hovedsakelig i beinvev, men i løpet av prosjektet har vi for første gang funnet det rundt karkanalene i vekstbrusk hos hest. En stipendiat som jobber parallelt med gris har også funnet proteinet der.

I artikkelen ble det gjort observasjoner som indikerte at:

-Når chondrocytter dør av iskemi slutter de å lage CHST2; hvilket betyr at de ikke lenger vedlikeholder den ekstra-cellulære matriksen. Matriksen blir svakere og dette predisponerer

for videre progresjon inkludert oppsprekking gjennom lesjonen, dvs. osteochondrosis dissecans/løse biter i ledd.

-ZBTB38 beskytter mot celledød ved apoptose, men når cellene døde ved iskemi sluttet de også å lage ZBTB38 og dette kan ha tillatt flere celler å dø gjennom apoptose.

-Karkanaler ved siden av de som var eksperimentelt skåret over overlevde og responderte på den iskemiske chondronekrosen ved å proliferere mot det iskemiske området. I og rundt disse karkanalene var det økt farging for TRPC1, VEGF og EGFL7, noe som stemmer bra med foreslåtte funksjoner for disse proteinene i angiogenese: TRPC1 bryter sannsynligvis ned matriks og tillater derved blodkarene å proliferere igjennom vekstbrusken mot lesjonen, og VEGF er et signal til blodkarene om at de skal proliferere, og EGFL7 er forbundet med dannelse av blodkar.

Det var svært mange spennende proteiner i den aktuelle regionen på grisens kromosom 13, og vi skulle gjerne ha lyktes med å farge for samtlige, men det vil kreve mer tid og penger enn det som var tilgjengelig i prosjektet/doktorgraden. Vi kommer til å jobbe videre med dem, inkludert på gris, og da har vi notert oss at:

Proteinene i tabellen er der fordi de hadde funksjoner relatert til blodkar, vekstbrusk og beinvev. Underveis i litteratursøken ble det imidlertid også klart at: flere av proteinene hadde funksjoner forbundet med kollagensyntese: PLOD2/lysyl hydroxylase er et enzym som virker tidlig i kollagensyntesen, mens ceruloplasmin og COMMD2 som også befant seg i den aktuelle regionen på grisens kromosom 13 er involvert i kobbermetabolisme. Kobber er en nødvendig kofaktor for enzymet lysyl oxidase som virker senere i kollagensyntesen enn lysyl hydroxylase, og som har vært forbundet med svekket matriks og brusklesjoner hos føll i tidligere studier – skjønt dette gjelder føll som er noe eldre, og lesjonene har mer generalisert distribusjon i kroppen, enn det som er typisk for osteochondrose.

Til sist: flere av proteinene hadde mer enn én funksjon, og det var svært spennende å oppdage at noen av disse involverte sansing og respons på biomekaniske krefter. For eksempel: TRPC1 er i familie med flere proteiner med funksjoner som sansing av strekk, trykk eller vridning. Kollagen type I produseres både på grunn av programmering, men også i respons på biomekaniske krefter, formodentlig for å tilpasse/styrke vevet slik at det tåler kreftene. Det har alltid vært klart at biomekaniske krefter er en svært viktig faktor i om osteochondroselesjoner sprekker opp og blir til osteochondrosis dissecans/løse biter; det har imidlertid ikke vært undersøkt om biomekaniske krefter også kan gi vaskulær svikt til å begynne med; det at flere av proteinene har funksjoner i sansing og respons på biomekaniske krefter kan potensielt forklare en sammenheng mellom slike krefter og vaskulær svikt.

Igjen: det har kommet frem svært mange spennende og relevante proteiner som allerede har kjente funksjoner og assosiasjoner til sykdommer som nødvendigvis må være forbundet med skjelettvekst, slik som human skjelettdysplasi og dvergvekst. Det er nødvendig å jobbe videre med proteinene før det blir klart om de har en rolle i osteochondrose og nøyaktig hva den rollen er, men ila. prosjektet har vi lyktes med å gå opp ruten for en metodikk som er egnet til å svare på dette: immunhistokjemisk farging for proteinet i vev med lesjoner som enten er eksperimentelt induserte eller på annen måte tidsbestemte eller bekreftet tidlig i forløpet, snarere enn sekundær respons. Det er allerede mulig å selektere mot osteochondrose hos gris basert på den identifiserte regionen på kromosom 13, og det vil bli mulig å gjøre en gentest også på hest i fremtiden. Da vil metoden etablert i dette prosjektet kunne svare konkret på om genene spiller en rolle i å forårsake eller i å reparere lesjonene, og om det derfor bør selekteres mot eller for et spesifikt gen.

4. Diskusjon

Samtlige resultater i prosjektet er utførlig diskutert i artiklene og doktorgradsavhandlingen, men kort kan det sies at:

I utgangspunktet visste vi at i osteochondrose er det kun én eller et fåtall blodkar som svikter, mens blodkarene i nabokanalene forblir intakte. Målet for doktorgraden var derfor å lete etter forskjeller mellom naboliggende karkanaler.

I doktorgraden ble det funnet flere slike forskjeller, inkludert forskjellige typer diskontinuiteter i endothelet i noen, men ikke alle karkanaler, varierende antall mesenchymalceller inne i karkanalene og forskjellig type kollagen i matriksen rundt karkanalene: kollagen type I rundt flertallet kanaler og kollagen type II rundt mindretallet.

Som resultat av prosjektet har det derfor utviklet seg en helt ny arbeidshypotese for hvorfor det kun er én eller et fåtall karkanaler som svikter i osteochondrose, nemlig at de oppdagede forskjellene gjør at noen karkanaler er mer sårbare overfor svikt enn andre.

Den mest nærliggende forskjellen er å tenke at det kan være at karkanaler som er omgitt av kollagen type II er dårligere beskyttet og derfor mer tilbøyelige til å svikte enn karkanaler omgitt av kollagen type I. Det kan også være at karkanaler omgitt av kollagen type I er lettere å inkorporere i beinvev uten problemer enn de som er omgitt av kollagen type II, blant annet fordi kollagen type I er den vanligste typen i beinvevsmatriks og vevet rundt kanalene jo skal omdannes til beinvev under forbeiningsprosessen.

Videre fra dette: det fremstår som at det er mesenchymalcellene inne i karkanalene som er ansvarlige for om det produseres kollagen type I eller II. Det kan derfor være disse cellene som er feil programmert og gir den arvelige predisposisjonen for osteochondrose.

Og: det kan være at programmeringsfeilen ligger i ett av de undersøkte proteinene, for eksempel de som er involvert i kollagensyntese eller fiberproduksjon, enten som en del av programmert kollagenproduksjon, eller fordi cellen ikke er i stand til å sanse og respondere passende på biomekaniske krefter.

Som ovenfor: det kanskje viktigste resultatet av prosjektet har vært at man har etablert en metodikk for å ta proteiner fra genomet, vise om de finnes i tidlige osteochondrose-lesjoner og også si noe om hva de gjør der; om de er årsak til eller konsekvens av sykdommen, inkludert om de jobber for å reparere lesjoner og derfor er ønskelige. Når en gen-test for osteochondrose etter hvert blir tilgjengelig vil denne metodikken kunne svare konkret på om man bør selektere mot eller for de aktuelle genene, basert på hva de gjør i vevet.

5. Publikasjoner

Doktoravhandlingens tittel:

Differences between cartilage canals with relevance for osteochondrosis in horses

I doktorgraden inngikk det tre artikler:

I: Discontinuities in the endothelium of epiphyseal cartilage canals and relevance to joint disease in foals, Hellings, I.R., Ekman, S., Hultenby, K., Dolvik, N.I., Olstad, K., 2016. *J. Anat.* (2016) 228, 162-175.

Rapportert på Sepsis I prosjektet SHF H1147117/HESTEFORSK 218962 fordi finansiert der.

II: Cartilage canals in the distal intermediate ridge of the tibia of fetuses and foals are surrounded by different types of collagen relevant to osteochondrosis, Hellings, I.R., Dolvik, N.I., Ekman, S., Olstad, K.

Status: submittert til Journal of Anatomy, 14. November 2016, akseptert med major revisions 22.12.2016. I ferd med å revidere denne.

Vil bli rapportert på Protein-prosjektet fordi finansiert her.

III: Proteins involved in early pathogenesis and heritability of articular osteochondrosis in horses, Hellings, I.R., Østevik, L., Löfgren, M., Ekman, S., Dolvik, N.I., Olstad, K.

Submittert til Veterinary Pathology 01.07.2016. Manuskriptet var da på ca 7 000 ord. Veterinary Pathology har ikke noen formell ordgrense, men tilbakemelding på manuskriptet datert 27.09.2016 sier at det allikevel er for langt, og at det kan revideres og re-submitteres i kortere form. De fleste tidsskrift har en ordgrense på enten 3 000 (*Equine Veterinary Journal*) eller 4 000 ord (*The Veterinary Journal*), ergo er mengden tekst i manuskriptet dimensjonert for to artikler snarere enn én. I tillegg til dette deler den seg faglig greit i to deler: det er tre proteiner som er hentet fra litteratursøk: VEGF, EGFL7 og kollagen type I, og tre som er hentet fra grisegenomet: TRPC1, ZBTB38 og CHST2. Ettersom førsteforfatter for tiden er tilbake i full klinisk jobb og også forbereder seg til disputas har andreforfatter, diplomat i patologi Liv Østevik, gått i gang med jobben med å dele opp det opprinnelige manuskriptet i to separate artikler. Disse vil bli sendt inn ila. 2017.

Regelverket ved NMBU er slik at man kan bruke artikler der man er første- eller andreforfatter i doktorgrader. To stipendiater kan også bruke én og samme artikkel i sin doktorgrad hvis de er hhv. Første- og andreforfatter på artikkelen. Liv Østevik driver for tiden med en doktorgrad på genetiske aspekter av osteochondrose hos hest; det er både aktuelt at de reviderte artiklene vil inngå i hennes doktorgrad (artikkelen om proteiner fra grisegenomet er særlig relevant), og at hun vil skrive flere artikler om de allerede immunfargede, svært sjeldne og kostbare snittene som ble farget i Protein-prosjektet. Østevik hadde oppstart ca. oktober 2015 og skal med tre-årig PhD forsvare i 2018, men har mye pliktarbeid så det er i øyeblikket noe usikkert når selve forsvaret blir.

Det kommer derfor definitivt to publikasjoner til når det opprinnelige manuskriptet er delt, samt muligens flere publikasjoner som kan komme til å inngå i Liv Østevik sin PhD, og disse vil da bli rapportert på Protein-prosjektet fordi de ble finansiert her.

6. Slutsatser (gällande nytta med råd til näringen)

Det viktigste resultatet av prosjektet er at man har etablert en metode for å si hva proteiner hentet fra genomet faktisk gjør i tidlige osteochondrose-lesjoner; om de er årsak til eller konsekvens av lesjonene, og om de bidrar til reparasjon. Grunnen til at dette er viktig er at det vil kunne hjelpe og forklare hvilke gener man bør selektere mot eller for, for å redusere forekomsten av arvelig predisponert osteochondrose når det en dag i nær fremtid blir mulig å gjennomføre gen-tester for sykdommen på hest.

Se også punkt 7, nedenfor: i mars 2017 vil det bli gitt to muntlig presentasjoner til veterinærer under messen Equitana i Essen, Tyskland, som også sammenfattes i en abstract-bok fra messen og således er tilgjengelig for andre. Den ene presentasjonen handler om hvor vidt man kan endre hold av unghesten for å forebygge utviklingen av osteochondrose. Informasjonen i presentasjonen er basert på tidligere litteratursøk men også de nyeste resultatene av proteinprosjektet, og kan oppsummeres som følger:

I forhold til hold av unghesten for å redusere utviklingen av osteochondrose er det hva man gjør med unghesten fra den fødes til den er ca 1.5 år gammel som teller. I denne perioden er det hovedsakelig to ting man kan påvirke: hvordan man fører unghesten, og hold: hvor den bor (inne/ute)/om den mosjoneres.

Fôring:

-Føllet skal ikke overføres med energi eller protein fordi da blir vekstbrusken tjukk og mer susceptibel for iskemi; det skal heller ikke kompensatorisk overføres for å ta igjen evt. perioder med redusert vekst/sykdom, da kan samme ting skje.

-I tillegg til mengde er det viktig at føllet får balansert kost, både med henblikk på makro-næringsstoffene energi, protein og karbohydrater, men kanskje særlig mikro-næringsstoffer slik som vitaminer og mineraler. Fra før var det kjent at unghester må få riktig balansert kalsium og fosfor for normal utvikling av beinvev, samt at kobbermangel hos den drektige hoppa kan gi osteochondrale lesjoner både hos føllet og unghesten (men ikke hoppa selv). Dette har vært forbundet med enzymet lysyl oxidase i kollagensyntese. **På grunn av det nåværende prosjektet kan man også foreslå at dette gjelder for vitamin C, som er en ko-faktor for enzymet lysyl hydroxylase/PLOD2, som sitter på regionen av grisegenomet som er forbundet med arv av osteochondrose.** Hester har imidlertid mye av det enzymet som genererer vitamin C fra karbohydrater, så så lenge de får nok karbohydrater, for eksempel fra grønt gress, er det usannsynlig at hester vil lide av vitamin C-mangel.

Hold/bosted/mosjon:

-Det har vært vist at føll som blir mosjonert får osteochondroselesjoner på steder i ledd involvert i bevegelse, sammenlignet med en kontrollgruppe. Det hjelper imidlertid ikke å stenge føllet inne på boks: denne gruppen fikk like mange og mer alvorlige lesjoner på vekt bærende steder. Det er derfor nødvendig med en gylden middelvei, og i land der klimaet tillater dette er det anbefalt at føllet går ute på beite til det er 1 år gammelt.

-Hva gjelder beitet har studier vist at:

- det er bedre med jevn tilgang hver dag enn ujevn tilgang noen dager i uka
- det er også bedre å være ute døgnet rundt enn ute om dagen, inne om natta
- det er bedre med en gruppe på maksimalt 3 avlshopper med føll, enn flere enn 3 hopper med føll
- det er best med en beitestørrelse på opp til 1 hektar før føllet er 2 uker gammelt og opp til 6 hektar før føllet er 2 måneder gammelt
- det er bedre med relativt flatt og jevnt underlag enn med ujevn og steinete grunn.

-Hvis man oppdager fylte ledd, får mistanke om eller bekreftet at føllet har tidlige osteochondroselesjoner har det vært antydning at man kan forhindre progresjon til osteochondrosis dissecans/løse biter eller oppmuntre spontan avheling gjennom å begrense mosjon ved å sette hoppe og føll i en sykepaddock på ca. 10-17 m i 60-90 dager med jevnlig oppfølging av leddene. Det har vært antydning at man bør redusere føringen i denne perioden, men dette må veies opp imot at det er best å føre for jevn, snarere enn ujevn vekst/at det skal kompenseres med perioder med føring for rask vekst, samt at føllet til en hver tid bør få balansert kost som diskutert ovenfor.

En del av disse anbefalingene var kjent før det nåværende prosjektet, men: i prosjektet har det blitt klart at kollagen kan være en viktig faktor i osteochondrose. **Fordi kollagen produseres både på grunn av programmering og som respons/adapsjon til biomekaniske krefter er det nå mulig å forstå anbefalingen om en gylden middelvei bedre: et føll som står helt i ro vil kanskje ikke få den biomekaniske stimulansen til å produsere kollagenet, mens et føll som får mye mosjon vil kanskje ikke rekke å produsere nok kollagen raskt nok til å oppnå nødvendig adapsjon/beskyttelse.** Litt biomekanisk stimulans er nødvendig for at kroppen skal produsere det den trenger; det er mest et spørsmål om å finne ut hvordan man oppnår dette i praksis.

7. Resultatförmedling till näringen

Følgende har vært presentert til næringen/brukergrupper allerede:

2013: Notat om pågående forskning på leddsykdommer på hest på NMBU

Veterinærhøgskolen til brukergruppen norske veterinærer/alle som kan lese norsk, forfattet av Sigrid Lykkjen, Kristin Olstad og Cathrine Fjordbakk.

2015: Abstract i proceedings og muntlig presentasjon på 45 minutter til norske veterinærer og dyrepleiere ved Kristin Olstad på Veterinære fagdager i Trondheim, 10. juni 2015

2015: Abstracts i proceedings og muntlige presentasjoner på 60 og 75 minutter til brukergrupper som bestod av de største produsentene av mineraltilsetninger og hestefôr i USA, hhv. Zinpro og Cargill, Las Vegas, USA i desember 2015.

2016: Muntlig presentasjon 20 minutter ved møte i gruppen Research in OsteoChondritis Dissecans of the Knee (ROCK), som er den største forskergruppen på human osteochondrose, i San Diego, USA, januar 2016. Kombinert med abstract og muntlig presentasjon ved konferansen Pediatric Reseach in Sports Medicine (PRISM), 5 minutter, samme sted.

Kommer i 2017:

-Pressemelding ifm. doktorgradsdisputas Hellings; disputasen er også offentlig og vil bli annonsert. Vi har også brukt å følge opp disputaser med populærvitenskapelig sammenfatning av funnene i Trav- og galoppnytt, evt. også Travronden.

-24. mars: abstracts og muntlige presentasjoner på 20 og 15 minutter til hesteveterinærer ved den store messen Equitana, Essen, Tyskland. En presentasjon om patogenesen for osteochondrose, og en presentasjon om hvor vidt man kan endre hold av unghesten for å forebygge utvikling av osteochondrose. Foredragene går på engelsk men blir simultanoversatt til tysk.

Det planlegges ytterligere kommunikasjon av resultatene til næringen, det har bare vært fokus på vitenskapelige artikler og doktorgrad først både pga. tidsfrister og fordi vitenskapelige tidsskrift ofte ikke godtar publikasjon av manuskripter der resultatene har vært mye omtalt i andre forum først; det er derfor best å ta den vitenskapelige publiseringen først og den populær-vitenskapelige når artiklene er trygt publisert.