

Slutrapport projekt nr H094729: Immunologisk reaktivitet i tarmslemhinnan hos friska hästar och hos hästar med kroniska inflammatoriska tarmsjukdomar.

Ronny Lindberg

Bakgrund

Kronisk idiopatisk inflammatorisk tarmsjukdom (Inflammatory Bowel Disease; IBD) är ett välkänt kliniskt problem hos vuxna hästar i varierande ålder. Symtombilden domineras av avmagring, diarré, kolik och hypoproteinemi i olika kombinationer.

Den immunologiska aktiviteten i tarmens immunsystem (gut-associated lymphoid tissue; GALT) är endast helt litet studerad hos hästar, och kunskapen baseras därför mest på studier på människa och försöksdjur. I frisk tarmslemhinna ska såväl ospecifik ("innate") som antigenspecifik (adaptiv) immunitet vara tolerant mot normalt förekommande dietära molekyler och mikroflora i tarmen, vilket bibehåller tarmens slemhinneskyddande barriär. Regulatoriska T-celler som uttrycker FoxP3 protein är en viktig mekanism för detta. Ett dysreglerat immunsvaret kan däremot leda till störd slemhinnebarriär med inflammationsdrivande cytokinaktivitet som följd. Vid IBD hos människa anses interaktion mellan molekyler i luminal mikroflora och Toll-liknande receptorer (TLR) i celler kunna vara en viktig faktor för denna utveckling. Produktion av Th (T-hjälparceller)17-associerat interleukin (IL17) har under senare år visats ha betydande effekt för uppkomsten av ett proinflammatoriskt immunsvaret vid human IBD.

För meningsfulla studier av cytokiner och andra immunologiskt aktiva cellrelaterade molekyler i vävnaden krävs kvantifiering av deras specifika mRNA-uttryck med qPCR-teknik. För att få relevanta resultat vid qPCR-studier krävs att mRNA-uttrycket relateras till i vävnaden förekommande och stabilt uttryckta referensgener (normalisering). Basala studier för utväljande av referensgener har inte utförts på hästtarm.

Vid IBD hos hästar ses tre distinkta typer av inflammation: eosinofil, granulomatös och lymfoplasmacytär. En immunohistologisk studie av eosinofil form visade att lymfocytinfiltrat i inflammationen är dominerad av CD3+ T-celler, men mer utförliga studier är inte rapporterade. Rektumbiopsi är ett etablerat hjälpmedel för diagnostik av IBD på hästar men har inte tidigare använts för immunologiska studier.

Detta projekt har syftat till att nå förbättrad kunskap om immunopatologin vid IBD hos häst, med användning av realtid kvantitativ PCR (qPCR), histologi och immunohistologi. Studierna redovisas i 4 arbeten, varav två publicerade (nr 1 och 2), ett under tryckning (nr 3) och ett under utarbetande, i ofullständig manuskriptform (nr 4). Forskningen ska ingå i en doktorsavhandling av Karin M Olofsson som anställts i projektet.

Material och metoder

Undersökningsmaterial

Hästmaterialet bestod av vuxna hästar i varierande åldrar. Antalet hästar varierade mellan studierna. Det inkluderar olika tarmsegment från slaktade hästar (n=5-8) utan intern sjukdom, rektumbiopsier från friska hästar (n=5-10) och kliniska fall med misstänkt IBD (n=10), samt

arkiverat tunntarms-material från hästar (n=10) med obduktionsdiagnos av IBD. Rektumbiopsier från misstänkta IBD-fall på hästsjukhus (UDS och Regiondjursjukhuset Strömsholm) uttogs vid klinisk utredning. Vävnader för qPCR placerades direkt i RNAlater och förvarades sedan i -80°C. Blodprover (arbete 1) för qPCR togs i PAXgene™ tuber och förvarades i -80°C. Vävnadsmaterial fixerat i formalin användes för histologi och immunohistologi.

qPCR (arbeten nr 1-3)

Olika referensgenkombinationer för normalisering av mRNA data utvärderades med qBase^{PLUS} i olika typer av undersökningsmaterial (tarmvävnad respektive ex vivo analys av blodleukocyter i perifert blod) och lämpligaste kombinationer utvaldes. Blodleukocyter undersöktes efter in vitro stimulering med CpG-ODN 2216, PMA och ionomycin samt efter intravenös infusion av endotoxin (LPS). mRNA-uttrycket undersöktes för komponenterna i LPS-receptorkomplexet (TLR4, CD14 och MD-2) i blodleukocyter och normal tarm, samt för IL-17A och därmed associerat IL-23 och IL-12p35 i tarmvävnad. Primersekvenser och PCRassays för referensgener och andra gener optimerades och undersökningarna adapterades för användning på tarmvävnad. Optimering av metoder för utvinning av RNA av god kvalitet från både små rektumbiopsier och postmortalt tarmmaterial utfördes.

Histologi (arbeten nr 1-4)

Paraffinsnitt (4 µm) från tarmmaterialet framställdes enligt gängse rutiner, färgades med hematoxylin-eosin och i arbetena 1-3 även med alcian blue-PAS för mucosubstanser, och undersöktes histologiskt för fastställande av normalitet respektive sjukdomsdiagnos.

Immunohistologi (arbeten nr 3 och 4)

Paraffinsnitt framställdes som ovan. I arbete 3 (rektumbiopsier) applicerades monoklonala antikroppar mot CD3 och Foxp3 för att bestämma andelen regulatoriska (Foxp3+) T-lymfocyter i tarmslemhinnan. Undersökningarna utfördes med Vectastain ABC Elite respektive Envision+ teknik. I arbete 4 (obduktionsmaterial) användes mono – eller polyklonala antikroppar mot CD3, CD20, Foxp3, MHCII samt mot immunoglobuliner i plasmaceller. För påvisande av immunoreaktivitet användes i båda studierna Vectastain ABC Elite och Envision+ tekniker, och utvärdering gjordes ljusmikroskopiskt med hjälp av digital bildanalys (NIS Elements, Nikon). Ett nödvändigt utvecklingsarbete för att optimera och kvalitetssäkra metoderna utfördes.

Resultat

Arbete 1.

Som referensgener vid påvisande av mRNA genuttryck utvärderades GAPDH, HPRT och SDHA. Kombinationen HPRT/SDHA visades lämpligast för stimulerade leukocyter och blodleukocyter efter endotoxininfusion medan HPRT/GAPDH var mest lämplig för tarmmaterialet. Genuttryck för TLR4 och MD-2 ökade efter in vitro stimulering med CpG-ODN 2216 och efter endotoxininfusion, men minskade med PMA/ionomycin. Ökningen av mRNA uttryck för hela LPS-receptorkomplexet efter endotoxingiva visar att en mätbar aktivering av detta åstadkommes. Uttryck av CD14 förblev oförändrat. I den normala tarmen påvisades ett stabilt lågt uttryck av TLR4, MD-2 och CD14.

Arbete 2.

Här analyserades referensgenkombinationer och genuttryck för cytokinerna IL-17A, IL-12p40 och IL23p19 i sju olika segment av tarmen och i rektumbiopsier. Varje qPCR analys var först validerad på perifera blodleukocyter stimulerade för att uttrycka dessa cytokiner. Sju olika möjliga referensgener utvärderades. Dessas inbördes stabilitet skiljde sig mellan tarmsegment. I rektumbiopsier uttrycktes GAPDH och RPL32 mest stabilt, medan i övrigt tarmmaterial en optimal kombination av fyra gener (RPL32, GAPDH, HPRT och SDHA) kunde fastställas. I alla tarmsegment påvisades basal expression av IL-17A, IL-12p40 och IL23p19. Denna basala studie lägger en grund för vidare qPCR studier i tarmen, användbar för undersökningar av diverse tarmsjukdomar hos hästar.

Arbete 3.

Rektumbiopsier med inflammatoriska slemhinneförändringar från hästar med klinisk sannolikhetsdiagnos av IBD (n=10) undersöktes och jämfördes med biopsier från friska hästar (n=10). Den inflammatoriska reaktionen i biopsierna skiljde sig mellan olika fall. Fem visade kronisk proctit med infiltration av lymfocyter och plasmaceller (chronic simple proctitis; CSP) och fem hade även härdar av neutrofiler, ibland med migration ut i tarmepitel. Dessa förändringar motsvarar chronic simple active proctitis (CASP). I enlighet med de tidigare resultaten användes GAPDH och RPL32 som referensgener. Uttryck av IL-17 mRNA var högre hos hästar med CASP än hos dem med CSP och hos friska hästar. Då IL-17 visats inducera neutrofil inflammation i andra studier kan neutrofilin misstänkas vara en effekt av denna cytokinaktivitet. Hästar med CASP visade också högre genexpression av TLR4 än friska hästar. Uttryck av IL-12p40 var lägre vid CSP än såväl vid CASP som hos friska hästar. En tendens till men icke statistiskt signifikant ökning av regulatoriska (Foxp3+) CD3+Tceller sågs vid CASP. Det fanns däremot en tydlig positiv korrelation mellan andelen Foxp3-positiva CD3+ T-celler i cellinfiltrat och mRNA uttryck av IL-17A och IL-23p19.

Arbete 4.

Denna immunohistologiska studie av tunntarmen hos friska hästar (n=5) och hos hästar med eosinofil (n=5) respektive granulomatös (n=5) form av IBD är ännu inte färdigställd och fullständiga resultat kan därför inte redovisas. Preliminära data visar tydlig ökning av MHCII-positiva histiocyter i slemhinnan vid granulomatös typ (GE) medan ökningen vid eosinofil typ (EE) jämfört med friska hästar är mer variabel. De friska hästarna visar konsekvent lågt antal CD3+ T-celler, CD20+ B-celler och regulatoriska Foxp3+ T-celler. Variationen i cellbilden hos friska hästar är således liten. Vid IBD varierar andelen Foxp3+ regulatoriska T-celler mera och är i vissa fall hög, liknande bilden i rektumbiopsierna.

Diskussion

Studierna i detta projekt har varit av basal kunskapsuppbyggande karaktär där mycket av metodutveckling för studier av immunologin i tarmen hos hästar varit nödvändig. Vi har koncentrerat qPCR-studier till påvisande av Toll-liknande receptor 4 (TLR4) och Th-17 relaterade cytokiner, som proinflammatoriskt IL17, vid ekvin IBD. Dessa studier är de första i sitt slag på hästar, medan IL-17 aktivitet är känt betydelsefull för inflammationsutvecklingen vid human IBD. Med etablering av adekvata referensgener för qPCRstudier finns nu

förutsättningar för vidare studier av cytokiner och andra inflammatoriska mediatorer vid såväl IBD som vid andra tarminflammationer hos häst.

Det har också visats möjligt att etablera rektumbiopsi som ett verktyg för immunologiska studier både på immunohistologisk och mRNA-nivå. Detta öppnar stora möjligheter eftersom relevanta studier då kan göras på kliniska fall utan något besvär för hästen. Man är således inte begränsad till användning av obduktionsmaterial, något som vi upplevt minska under senare år, möjligen beroende på tidig diagnostik och därmed bättre förutsättningar för anti-inflammatorisk behandling.

Kronisk proktit med lymfocyt- och plasmacellsinfiltrat eller kronisk aktiv proktit med samtidiga härdar av neutrofiler påvisades i rektumbiopsierna i denna studie. Dessa är de vanligaste formerna av inflammation i rektum vid IBD hos häst trots att inflammationen i högre områden av tarmen kan vara av eosinofil eller granulomatös typ.

En anledning till att vi studerat påvisande av TLR4 hos häst är att hästen är LPS-känslig och endotoxin produceras vid olika tillstånd, såväl i tarmen som i andra organsystem. En annan faktor är att TLR som en komponent i det ospecifika immunsvaret visats interagera med molekylära strukturer ("PAMP") i tarmfloran och därmed kan inducera proinflammatorisk aktivitet som ett viktigt tidigt stadium i patogenesen vid human IBD. Det är fullt möjligt att samma mekanismer kan uppträda vid IBD hos hästar.

Resultatet att andelen regulatoriska T-celler i inflammerade i rektumbiopsier vid IBD hos häst inte minskar, liksom att deras antal är positivt korrelerat till Th17-associerad cytokinaktivitet, var för oss överraskande. Vi hade förväntat oss motsatsen eftersom regulatoriska T-celler i normalfall dämpar immunsvaret. Varför de här inte kan nedreglera detta, något som ses även vid human IBD, är oklart men vid human IBD har olika möjligheter framförts.

Publikationer, konferenser, seminarier

Publikationer*

C Fossum, B Hjertner, KM Olofsson*, R Lindberg, P Ahooghalandari, MM Camargo, J Bröjer, A Edner, K Nostell, 2012: Expression of tlr4, md2 and cd14 in equine blood leukocytes during endotoxin infusion and in intestinal tissues from healthy horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 150:141-148.

B Hjertner, KM Olofsson, R Lindberg, L Fuxler, C Fossum, 2013: Expression of reference genes and T helper 17 associated cytokine genes in the equine intestinal tract. *The Veterinary Journal* 197: 817-823.

KM Olofsson, B Hjertner, C Fossum, C McL Press, R Lindberg, 2015: Expression of Th17-associated cytokines and Toll-like receptor 4 and their correlations to Foxp3 positive cells in rectal biopsies of horses with clinical signs of inflammatory bowel disease. *The Veterinary Journal*, in press

KM Olofsson, C McL Press, C Fossum, R Lindberg: An immunohistological study of inflammatory cell infiltrates in the small intestine of horses with chronic inflammatory bowel disease. (Manuscript in preparation).

*Karin M Olofsson är doktorand i projektet.

Konferenser

K Olofsson, B Hjertner, L Fuxler, R Lindberg, C Fossum, 2012: Evaluation of reference genes for qPCR analyses of gene expression in equine intestinal tissue. Abstract no. 0070, *Proceedings, 4th European Veterinary Immunology Workshop. Edinburgh, Scotland, 2-4 September, 2012*. Poster presentation.

K Olofsson, C McL Press, R Lindberg, 2012: Characterization of the immune cell infiltrate in the intestine of horses with inflammatory bowel disease. Abstract, *Proceedings, 30th Meeting of the ESVP, Annual Meeting of the ECVP, and 24th Annual Meeting of the SSVF, Léon, Spain, 5-8 September, 2012*, and *Journal of Comparative Pathology*, 148: 58, 2013. Oral communication.

KM Olofsson, R Lindberg, B Hjertner, L Fuxler, C Fossum, 2013: Gene expression of Th17-related cytokines and TLR4 in rectal biopsies of horses with inflammatory bowel disease. Abstract, *Proceedings, 10th International Veterinary Immunology Symposium, Milano, Italy, August 28 – September 1, 2013*. Oral communication.

KM Olofsson, 2013: Immunologisk reaktivitet i tarmslemhinnan hos hästar med kronisk inflammatorisk tarmsjukdom. *Veterinärkongressen, Uppsala, 8 november 2013*. Oral kommunikation.

Presentationer av forskningsprojektet på seminarier och övrig informationsverksamhet

KM Olofsson: Startseminarium, SLU (oktober 2010), Journal Club, Norges Veterinaerhögskole (oktober 2011), Seminarium på Forskarskolan Translational and Comparative Medicine SLU (november 2011), Seminarium, avd för immunologi BVF, SLU/UU (november 2012), Halvtidsseminarium SLU (januari 2013), Hästforskarträff (Hippocampus), SLU (april 2013).

R Lindberg, KM Olofsson: Information till hästveterinärer, Regiondjursjukhuset Strömsholm (oktober 2010).

R Lindberg: Seminarium, avd för immunologi BVF, SLU/UU (november 2013).