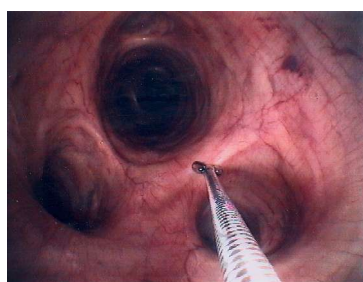


Slutrapport och ekonomisk redovisning av projekt:

Inflammationsmarkörer i bronkiella biopsier hos hästar med kronisk bronkiolit

Markers of inflammation within bronchial tissues in horses with recurrent airway inflammation



Bakgrund

Hästar i tempererat klimat drabbas ofta av RAO "recurrent airway obstruction" när de hålls inomhus. Sjukdomskomplexet kallades förr kronisk bronkit eller "chronic obstructive pulmonary disease" (COPD) och ofta talar man lite slarvigt om bronkithästar även idag. Idag vet vi att RAO har likheter med astma hos människor och i dammiga stallmiljöer överreagerar hästar med RAO (Bureau *et al* 2000, Lavoie *et al* 2001, Cordeau *et al* 2004). Vanligen är det äldre hästar som har RAO (>8 år (Bracher *et al* 1991)), yngre tävlingshästar kan också ha en mild ickeinfektiös luftvägsinflammation som kallas "inflammatory airway disease" (IAD). Hästar med IAD har inga symptom i vila men har överreaktiva luftvägar (Hare and Viel 1998, Couetil *et al* 2001) som vanligtvis endast märks genom nedsatt prestation. Överreaktiviteten har kopplats till ökad förekomst av inflammatoriska celler (mastceller, eosinofiler och neutrofiler) i BAL-vätska (bronkoalveolärt lavage). Det har också föreslagits att IAD hos unga hästar är ett förstadium till RAO (Hare and Viel 1998, Hoffman, Mazan and Ellenberg 1998), men uppföljande studier saknas. Det viktigaste verktyget för studier av inflammationsmarkörer vid luftvägsinflammationer har varit BAL. Dock ger BAL bara en ofullständig bild av den pågående inflammationsprocessen. Framsteg inom bioteknologin vid användandet av bronkialbiopsier för diagnostik av astma hos människor har gett nya kunskaper om mekanismer för inflammation i vävnad.

Målet med den här studien var att anpassa och utveckla molekylärbiologiska metoder för att testa vår samling av vävnadsprover och BAL-vätska från hästar med olika luftvägsbesvär. Eftersom man funnit likheter mellan RAO och astma hos människor ville vi jämföra bronkialbiopsianalyser med den traditionella BAL-tekniken.

Material och metoder

Vid projektets start hade vi samlat detaljerade kliniska data och prover från över 70 hästar med varierande grad av luftvägsinflammation. I detta material ingick hästar med RAO från Liege, Belgien som utsatts för experimentell exponering av allergen. Resterande hästar kom från olika stall i Sverige.

Bronkoalveolärt lavage

Lungsköljprover togs och analyserades enligt standardprotokoll, klinisk kemi, SLU och University of Liège.

Realtids-PCR

Isolering av total-RNA från BAL-celler eller biopsier utfördes med Trizol™, enligt tillverkarens instruktion, löstes i DMPC-H₂O och förvarades i -80°C fram till analys. Relativ kvantifiering av ekvint IL-4 och IL-5 mRNA uttryck utfördes genom "one step real time PCR" (RotorGene3000). Reaktionerna (25 µl) innehöll 0.5 mM av vardera dNTP, 2.5 mM MnOAc₂, 2.5 units av rTth polymeras, 40 ng total-RNA och relevant primer/prob-set. Reaktionen kördes enligt: 42°C, 5 min; 60°C, 20 min; följt av 45 cykler: 95°C, 5 s; 60 °C, 30 s. Alla prover kördes i triplikat och negativa kontroller inkluderades i varje körning.

Immunohistokemi

Biopsier fixerades i kylad aceton med proteasinhämmare (20mM iodoacetamide and 2mM phenyl methyl sulfonyl fluoride) i -20°C under 16-20 timmar. Efter fixering, bäddades biopsierna in i glycolmetacrylate (GMA) resin och förvarades i -20°C fram till snittning och immunofärgning. Två snitt från en biopsi täckande den morfologiska strukturen av intresse från varje häst snittades till 2µm tjocklek och placerades på poly-L-Lysine behandlade glas. Endogent peroxidase hämmades med 0.1% natriumazid och 0.3 % väteperoxid i 30 minuter. Efter 3x5 minuters-tvättar i TRIS-buffrad NaCl med 0.1% Triton-X-100 (TBST), blockerades icke-specifik antikroppsbindning med Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Missouri, US) med 10 % fetalt kalvserum och 1% bovint serumalbumin (BSA) i 30 minuter. Fortsatt blockering av icke-specifik antikroppsbindning utfördes med ytterligare en inkubering med grisserum i 30 minuter. Därefter tillsattes primära getantikroppar mot IL-6, IL-10 och TNF-α spädda i 0.05% TBST med 1% BSA och inkuberades över natt. Efter sköljning i TBST blockerades icke-specifik antikroppsbindning före primära antikroppar mot TNF-α, IL-6 och IL-10 tillsattes. Efter sköljning med TBST 3x5 minuter, tillsattes bioatinylerade grisantikropp IgG F(ab') (Dako Glostrup Denmark) följt av streptavidin-biotin horseradish peroxidase complex (Dako). Snitten brunfärgades sedan med diaminobenzidine (DAB) och motfärgades därefter med Mayer Haematoxylin. TBST användes som negativ kontroll.

Cytokinimmunoreaktivitet kvantifierades med en färgvideokamera (Sony DXC-950P - Sony, Tokyo, Japan) med 380 000 pixlars upplösning kopplad till en Leica Imaging Workstation med speciell PC-mjukvara (Leica Q500IW, Leica Cambridge UK).

Resultat

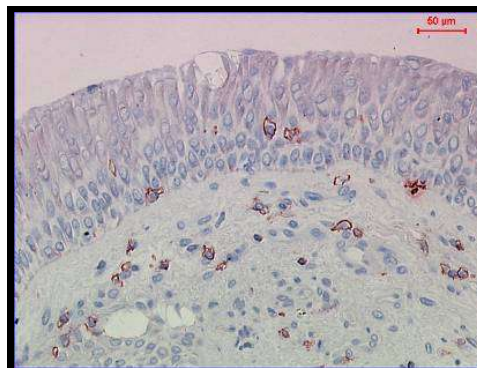
Realtids-PCR

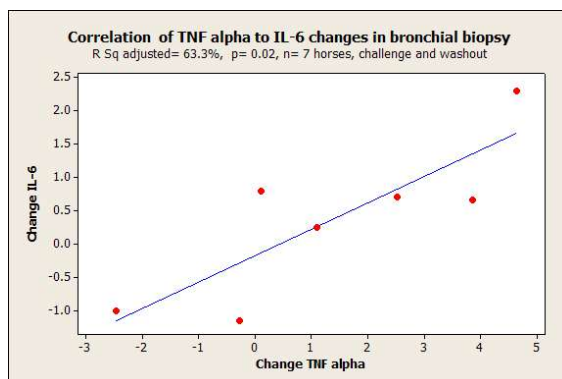
Vi har nu utvecklat metodologin för att analysera förekomsten av mRNA för ekvina cytokiner som styr luftvägsinflammation, upp- eller nedreglerande, i både BAL-prover och bronkialbiopsier. Cytokinerna inkluderade är: tumour necrosis factor alpha (TNF α), interleukin (IL) 4, 5, 6, 8, 10 och 17. metoden har använts för att analysera de insamlade proverna och vi har resultat från de belgiska hästarna (biopsier och BAL) och från en av våra grupper av svenska tävlingshästar and from BAL (se publikationslista ref 3).

Immunohistokemi biopsier

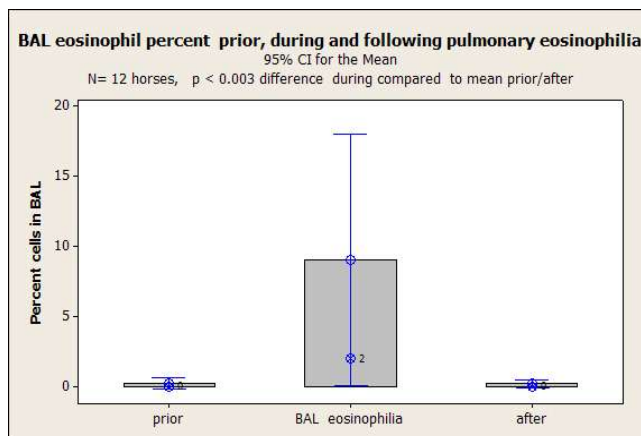
Den andra delen av projektet var att fokusera på immunohistokemi på bronkialbiopsier. Vi valde att först analysera de belgiska biopsi-proverna eftersom de representerar fall med väldokumenterade kliniska skillnader. Direktfärgning av TNF α , IL-6 och IL-10 fungerade väl med humanspecifika antikroppar (Figur 1). Dessa resultat är i sig värda att publicera men därtöver fann vi att halten TNF α och IL-6 följer varandra i biopsierna (Figur 2), vilket styrker vår hypotes att bronkialbiopsier kan användas för analys av inflammatoriska markörer vid luftvägsinflammation (se publikationslista ref 4).

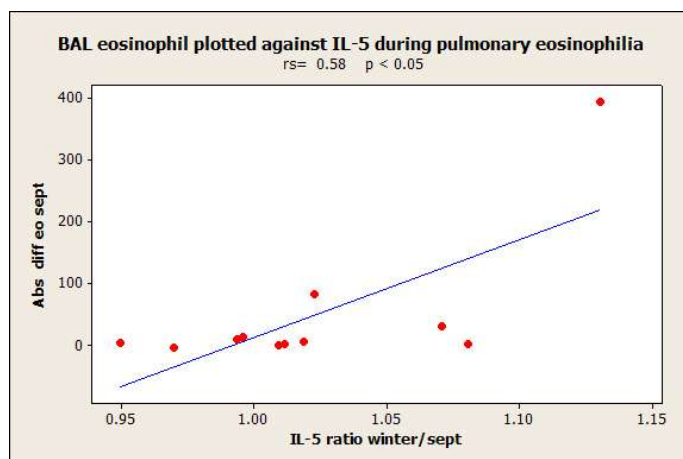
Figur 1: Immunohistokemi av bronkialepitel, Jamshid Pourazar, Lungkliniken, Umeå universitetssjukhus.



Figur 2: Korrelation mellan TNF α och IL-6 i bronkialbiopsier från hästar med RAO.*mRNA-detektion jämförd med BAL-cytologi:*

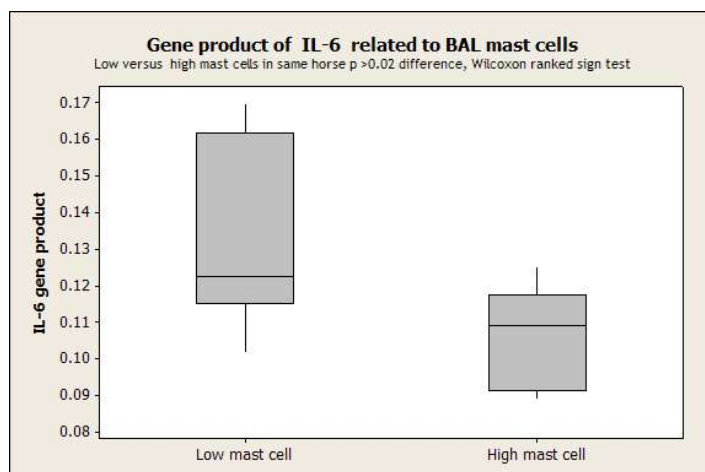
Hästar med höga halter av eosinofiler eller mastceller i BAL-prover analyserades med realtids-PCR för IL-4, IL-5, IL-6 och IL-10. I gruppen som hade höga eosinofilvärden som normalt skulle ha diagnostiserats som IAD gick cellhalterna ned utan behandling (Figur 3). Det här var ett oväntat resultat och tyder på att eosinofili som tidigare tolkats som ett tecken på allergi kan vara övertolkat. Cytokinerna IL-4 och IL-5 är kopplade till allergiska reaktioner men ingen kraftig ökning av genuttrycket kunde detekteras (Figur 4, se publikationslista ref 1).

Figur 3: Stapeldiagram över tillfällig pulmonär eosinofili hos en grupp (n=12) unga varmblodshästar.**Figur 4:** Korrelation mellan förändringar i pulmonär eosinofili och mRNA för IL-5 i BAL-prov hos en grupp (n=12) varmblodiga travhästar med tillfällig pulmonär eosinofili.



Resultat från den longitudinella studien visar ett tydligt samband mellan stallmiljö och ett förhöjt uttryck av genen för IL-6 som är en proinflammatorisk cytokin men varken upp- eller nedreglering av IL-10 som anses ha en immunhämmande effekt (se publikationslista ref 2). I den här gruppen fann vi också nedreglering av IL-6 trots att halterna av mastceller var höga (Figur 5). Detta står i direkt kontrast till tidigare accepterade teorier inom hästmedicinen men nya rön på humansidan visar liknande resultat som i vår studie (se publikationslista ref 5).

Figur 5: Halt av mRNA för IL-6 i relation till mastcellhalt i BAL-prov för en grupp varmblodshästar (n= 7).



Diskussion samt publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

Diskussion

Idag har vi analyserat förekomsten av $TNF\alpha$, IL-6 och IL-10 med hjälp av immunohistokemi och mRNA för samma cytokiner plus IL-8 och IL-17 i biopsier och BAL-vätska med realtids-PCR för 11 hästar. Dessutom har vi analyserat mRNA för IL-4 IL-5, IL-6 och IL-10 i BAL-prover från 12 unga tävlingshästar provtagna 3 gånger med 6 månaders mellanrum då de hållits i olika typer av stallmiljö.

Vi har nu utvecklat och utvärderat realtidsPCR-system för att analysera vävnadsprover från häst avseende mRNA för cytokinerna IL-4, 5, 6, 8, 10, 17 och TNF α . Med den här metodologin ges möjlighet till fördjupade studier av mekanismerna för utvecklingen av inflammatoriska sjukdomar hos häst. PCR-systemen för några av cytokinerna modifierades från redan publicerade arbeten. För flera av cytokinerna saknades dock publicerade metoder och dessa utarbetades helt på vårt laboratorium. Vi har färdiga data för fyra vetenskapliga artiklar varav två visar att om man bara förlitar sig på BAL-cytologi vid diagnos av IAD finns det risk för inkorrekt diagnos och prognos.

Förutom de ovan nämnda resultaten har vi också funnit att IL-6, IL-10 och TNF α kan identifieras med hjälp av immunohistokemi i vävnad från hästluftvägar. Metoden är utvecklad med antikroppar riktade mot humana cytokiner och hade tidigare inte testats på vävnad från häst. Det här ger oss ett verktyg till för att genom analys av bronkialbiopsier identifiera hästar med luftvägsinflammation.

Resultaten i den här rapporten bygger på av tidigare arbeten som också finansierats via ATG före sammanslagningen/omorganisationen till stiftelsen svensk hästforskning. Våra tidigare rapporter är därför inte lämnade elektroniskt då ATG inte hade ett sådant system. Vårt projekt har hamnat mitt i övergången och viss information stämmer inte överens med det nuvarande elektroniska formuläret som till exempel projektets längd. Det finansiella stödet från SHF (och tidigare ATG och Agria) har nämnts i alla konferensrapporter och publikationer.

När ansökan för det här projektet skrevs ingick Eva Wattring i vår grupp. Hon lämnade dock projektet tidigt och har inte bidragit till de ovan beskrivna studierna. Istället deltog forskare med annan expertis (realtime-PCR och immunohistokemi) vilka är inkluderade som medförfattare på respektive manuskript.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

Internationella konferenser

M. Riihimäki, L. Elfman, R. Walinder, I. Lilliehöök, J. Pringle. Influence of inhalable particle load in stable environments on horse and human airways. 3rd World Equine Airway Symposium, Ithaca New York July 2005

M. Riihimäki, I. Lilliehöök, J. Pringle. Transient pulmonary eosinophilia in horses with exercise intolerance: British Equine Veterinary Association: Annual Congress, Harrogate UK Sept 2005

Riihimäki M, Lilliehöök I, Pringle J. Clinical alterations in horses with bronchoalveolar eosinophilia. Oral presentation and Abstract American College of Veterinary Internal Medicine Annual Forum, Louisville KY, USA June 2006; J Vet Internal Med 2006;20;3, pp719

Svenska publikationer

EEF arbete Anna Eriksson. Cytologiska bedömningens påverkan på analysen av bronkoalveolärt lavage (BAL) samt förhållandet mellan andelen mastceller och

proinflammatoriska cytokinmediatorer i BAL hos häst. Examensarbete 2007:33 SLU ISSN 1652-8697

Internationella konferenser inskickat:

Mast cell increases in bronchoalveolar lavage from young race horses are associated with down regulation of gene product of IL-6 and IL-10 but not IL-5 or IL-4. J. Pringle M. Riihimäki, A. Eriksson, A Raine, I. Lilliehöök : Till BEVA 2007

Publikationer: under tryckning/inskickade

1. Clinical, clinical pathologic and bronchoalveolar cell gene expression of mRNA IL-4 and IL-5 in horses with bronchoalveolar lavage eosinophilia. M. Riihimäki, I. Lilliehöök, A. Raine, M. Berg, J. Pringle In second review, Journal of Veterinary Internal Medicine

Publikationer: manuskript

2. Markers of inflammation in relation to inhalable particle load in stable environment in human and horse airways. M. Riihimäki, L. Elfman, R. Walinder, I. Lilliehöök, A Raine and J. Pringle Department of Medical Sciences, Occupational and Environmental Medicine, Uppsala University Hospital, Uppsala, 751 85 Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Biomedicine and Veterinary Public Health, Section of Clinical Pathology, Box 7038, 750 07 Uppsala, Sweden.
3. Relationship of mRNA IL 6,8,10 and 17 in endobronchial biopsies versus bronchoalveolar lavage cells in horses with recurrent airway obstruction. M. Riihimäki, A Raine, T Art, P Lekeux , J. Pringle. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Biomedicine and Veterinary Public Health, Section of Clinical Pathology, Box 7038, 750 07 Uppsala, Sweden. Department of Large Animal Physiology, University of Liège, Sart Tilman, Liège Belgium
4. Parallelism of IL-6 and TNF α in endobronchial biopsies in horses with recurrent airway obstruction. M. Riihimäki, J. Pourazar, A Raine, T Art, P Lekeux , J. Pringle Department of Environmental Medicine, University hospital, Umeå University Umeå SE Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Biomedicine and Veterinary Public Health, Section of Clinical Pathology, Box 7038, 750 07 Uppsala, Sweden. Department of Large Animal Physiology, University of Liège, Sart Tilman, Liège Belgium
5. Mast cell increases in bronchoalveolar lavage from young horses are associated with down regulation of gene product of IL-6 and IL-10 but not IL-5 or IL-4. J. Pringle, M. Riihimäki, A. Eriksson, A Raine, I. Lilliehöök

Resultatförmedling till näringen

Undersökningar av stallmiljön och dess betydelse för uppkomst av luftvägssjukdomar hos häst och människa Miia Riihimäki, SLU och Lena Elfman, Akademiska sjukhuset Hippocampus dagar mars 2005 ■