

Slutrapport för projekt H0847237

Projekttitel: Detektionsmetoder för tidiga osteoartrosförändringar i hasleden hos islandshästen med hjälp av tre-dimensionella morfometriska parametrar, bilddiagnostik och molekylära markörer.

Information

Projektets in-vitro del har fortskridit som planerat förutom en viss tidsfördröjning när det gäller den histopatologiska analysen av höger hasled. Som nämnts i tidigare insänd ansökan om förlängd dispositionstid, daterad 12-04-27, har utarbetandet av graderingssystemen för histopatologi och bilddiagnostik (datortomografi samt magnetisk resonanstomografi) visat sig vara svårare och framförallt mer tidskrävande än förväntat. I nuläget har all provtagning från benmaterialet slutförts och de utvalda preparaten ligger i urkalkningsbad i väntan på att kunna snittas för histologisk bedömning. I och med att det nu finns ett utarbetat graderingssystem för de histologiska preparaten så förväntas denna del av analysen ta betydligt kortare tid än vad som hittills har varit fallet. Detta innebär att resultatbearbetningen för hela projektet inte är slutförd. Detta kommer att ingå i den avhandling som Charles Ley, projektets doktorand kommer att försvara i maj-juni 2013.

Projektets in-vivo del med analys av det insamlade 3D video morfometri materialet pågår och beräknas vara avslutade under 2013. En doktorand (se nedan) arbetar med analyserna och de kommer att vara en del i hans doktorsavhandling. Avhandlingsarbetet har fördröjts delvis på grund av att man valt en ny inriktning när fynden om den genetiska bakgrunden till islandshästens passgång blivit kända.

Bakgrund

Benspatt (osteoartros/osteoartrit) är en vanlig sjukdom i haslederna hos islandshästen med påverkan på hästens hållbarhet. Tidigare studier har visat att hos islandshästar som är äldre än 8 år gamla så har 23-33% röntgenologiska förändringar typiska för benspatt (Björnsdottir S., 2000a; Axelsson et al., 1998; Eksell et al., 1998). Undersökning av hasleder hos hästar som slaktats av annan orsak än hälta har påvisat att sjukdomen initieras i tidig ålder (Björnsdottir et al., 2004). Tidsspannet mellan de tidiga förändringarna och den kliniska manifestationen av sjukdomen innebär en svårighet för hästägaren både med avseende på eventuell avel och utbildning till hållbar ridhäst eller tävlingshäst.

Vid diagnostik av benspatt används huvudsakligen konventionell röntgen, en teknik som saknar förutsättningar att kunna påvisa de tidiga förändringarna på grund av summationseffekter och att skelettförändringarna är för små för att kunna upptäckas. En annan viktig begränsning är att broskvävnad inte kan ses på röntgenbilder.

Inom human medicinen har man visat att magnetisk resonanstomografi (MRT) kan detektera de patologiska förändringar som är typiska för osteoartrit (OA) betydligt tidigare än konventionell röntgen (Raynauld et al., 2004; Wluka et al., 2002). Genom att använda moderna bilddiagnostiska metoder vilka kan ge båda snitt- och tredimensionella bilder finns en möjlighet att i större detalj undersöka hela ledens olika komponenter något som inte är möjligt vid en histopatologisk undersökning där man endast kan välja små områden av leden för diagnostik. Både MRT och datortomografi (DT) är tekniker med möjlighet att använda flertalet olika parametrar vid bildtagandet. Detta kommer att styra den information man får från olika vävnader särskilt inom MRT. Till detta kommer en ständig utveckling av nya sekvenser som kräver validering av vad de olika signalintensiteterna innebär. Trots att sekvenser är framtagna för en specifik vävnadstyp så måste ffa de eventuella avvikelser man ser konfirmeras med histopatologisk undersökning så att det man ser som en avvikande signal

är en verklig förändring och inte en artefakt. Brosken i hasledens centrodistala (CD) led är mycket tunna vilket gör att sekvenser med hög detaljupplösning måste användas vilket kan innebära långa undersökningstider.

Medium-hög ärftlighet tillsammans med sambandet mellan hasledsvinkel och radiologisk fynd indikerar att viss typ av hasledskonformation eller ledarkitektur resulterande i ledinstabilitet är den huvudsakliga etiologiska orsaken till benspatt (Björnsdottir 2002).

Projektets syfte är att öka förståelsen för sjukdomens patogenes genom att objektivt undersöka bakbenskonformationen och ledarkitekturen i två unika grupper av unga hästar med olika genetisk predisposition för sjukdomen samt att undersöka haslederna (in vitro) med låg- och högfälts MRT, DT och histopatologisk undersökning. Stor vikt har lagts vid att utarbeta graderingssystem för både histopatologi och MRT/DT för att de undersökta hästarna sedan ska, med så stor säkerhet som möjligt, kunna klassas som OA negativa respektive OA positiva.

Material och metoder

Studiematerialet består av haslederna från 38 islandshästar, 23 hingstar och 15 ston. Vid framavlandet av studiematerialet har syftet varit att hälften av hästarna har en hög predisponering för OA och den andra hälften en låg predisponering för OA. De är fördelade på två grupper, födda 2007 (24 hästar) och 2009 (14 hästar). Hästarna har undersökts in vivo på Island med 3D video morfometri vid 3, 15 och 27 månaders ålder. Blodprov togs vid 12 och 24 månaders ålder. Röntgen av haslederna gjordes vid 27 månaders ålder. Undersökningen gjordes med hjälp av mobil röntgenapparat kopplad till en digital detektor utrustning och inkluderade latero-medial, dorso-plantar, dorsolateral-plantaromedial och plantarolateral-dorsomedial projektion.

Vid 27-29 månaders ålder slaktades hästarna. Haslederna transporterades till Uppsala i färskt tillstånd och anlände inom 24-50 timmar varvid de bilddiagnostiska undersökningarna påbörjades. Detta inkluderade undersökning i låg (0,27T)- och hög (1,5T)Tesla magnet samt DT.

Direkt efter avslutad bilddiagnostisk preparerades lederna för vidare histologisk undersökning. Lederna sågades i skivor vilka undersöktes med DT. Co-registreringsteknik med användandet av både MRT, DT av hela leden och DT av ledskivorna nyttjades för lesionsmarkering och efterföljande provtagning för histologi. Detta för att ge en exakt korrelering mellan MRT/DT förändringarna och den histologiska bedömningen (bilddiagnostiskt guidad provtagningsteknik).

Histologiska prov togs även från områden som vid tidigare studier har beskrivits som vanliga områden för OA i CD hasleden hos häst (predestinerade provtagningsteknik).

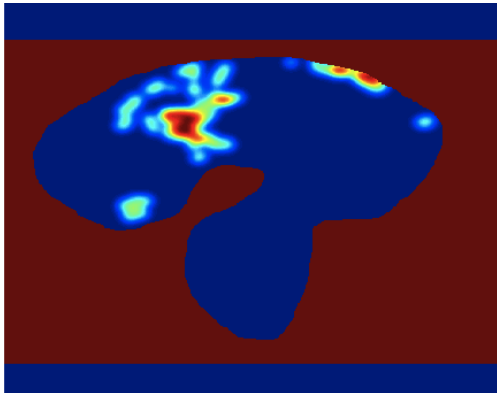
Vid jämförelse av dessa båda provtagningstekniker har höger ben från 24 hästar använts. MRT och DT bilderna analyserades med ett semi-kvantitativt graderingssystem modifierat från system använda för andra leder hos häst samt i humana studier.

Resultat

Histologiskt diagnosticerad OA sågs i 29 % av CD-lederna vid provtagning från förutbestämda områden och vid användning av bilddiagnostisk guidning för provtagning diagnosticerades OA i 62 % av lederna. Signifikant association sågs mellan histologisk OA och summerad gradering av följande MRT/DT förändringar, subkondrala osteofyter, förändringar i ledbroskets tjocklek, grad-2 defekter i broskets mineraliseringsfront samt grad-

2 periartikulära osteofyter. De första morfologiska förändringarna hos islandshästar med OA i CD-leden sker troligen i både den icke-mineraliserade broskdelen och i broskets mineraliseringsfront. Konklusionen är att MRT och DT kan detektera fokal tidig OA i CD-lederna hos häst. Bilddiagnostisk guidning vid histologisk provtagning rekommenderas.

De MRT/DT förändringar som graderats har överförts på en standardmall av tredje tarsalbenet för att skapa en topografisk karta av dess typ, grad och lokalisation för OA förändringar hos unga islandshästar. Arbetet är inte avslutat så endast ett exempel kan visas, se nedan. Resultaten ingår i artikel II i Charles Leys avhandling.



Diskussion

I litteraturen saknas det delvis en validering i form av exakt jämförelse mellan utseendet på MRT och DT och det histologiska utseendet. I projektet har arbetet med sekvensval och validering av dessa och de förändringar som ses varit ett omfattande arbete. För att kunna göra en matchning mellan olika bilddiagnostiska metoder och histologi krävs att man säkerställer att det histologiska preparatet kommer precis från det område där man ser en förändring med MRT/DT. För detta ändamål har en teknik för bilddiagnostiskt guidad histologisk provtagning arbetats fram. Genom att denna validering kan MRT/DT fynd som matchats mot histopatologiskt utseende markeras i hela ledens plan och olika topografiska kartor ställas samman.

Ovanstående topografiska karta av OA förändringar i CD-leden kommer att ge information som är värdefull i förståelsen av sjukdomens patogenes. Kännedom om det finns specifika regioner med specifika patologiska förändringar gör att man kan rikta olika bilddiagnostiska undersökningar mot dessa specifika områden. Det kan även bli möjligt att gradera signifikansen av olika radiologiska fynd. Det är i nuläget inte möjligt att veta om topografiskarta av OA förändringar kommer att korrelera till de morfometriska analyserna. Om man kan koppla detta till konformation och olika riskfaktorer finns en möjlighet till användbara kriterier för selektion av vilka hästar som bör användas i avel samt är lämpliga att utbilda till rid- och tävlingshästar.

I ursprungshypotesen antog vi att chondronekros är det första steget i processen som leder fram till utvecklad OA. Den histologiska undersökningen av bilddiagnostiskt guidade prover visar att hypotesen delvis bör revideras och att OA sannolikt börjar som förändringar i både den mineraliserade och den icke-mineraliserade broskdelen.

Av de specifika hypoteser som listas i projektplanen kan vi ännu inte kommentera resultaten från 3D video morfometrin. Övriga specifika hypoteser kommenteras nedan.

- De förändringar i brosket som ses vid bilddiagnostiska undersökningar korrelerar väl med histopatologi. Förändringar med bäst korrelation är förändring av broskets tjocklek och defekter i mineraliseringsfronten.
- MRT kommer att ha hög sensitivitet och specificitet för att detektera tidiga OA förändringar jämfört med konventionell röntgen och röntgenbilder tagna av 2 år gamla islandshästar underestimerar OA incidensen. Detta kommer att presenteras i artikel III i Charles Leys avhandling men redan utan detaljerad analys kan vi konstatera att så är fallet.
- MRT av hasleder från 2,5 år gamla islandshästar kommer att kunna identifiera histologiskt verifierad OA. Resultaten från artikel I i Charles Leys avhandling styrker hypotesen.
- Undersökning med hög-Tesla kommer att vara överlägsen låg-Tesla med avseende på att visa förändringar i ledbrosk, subkondralt ben och synovialmembran men sensitiviteten och specificiteten för detektion av om hästen har OA eller inte kommer att vara likvärdig. Detta kommer att presenteras i artikel III i Charles Leys avhandling men redan utan detaljerad analys är det sannolikt att hypotesen inte är sann. Låg-Tesla undersökningarna kommer sannolikt ha en sämre sensitivitet och specificitet.
- Kondronekros kommer att vara kopplad till subkondral scleros i den centro-distala leden dorsomedialt men inte dorsolateralt. Resultaten från artikel I i Charles Leys avhandling visar en låg förekomst av subkondral scleros och i artikel II kommer OA förändringarnas topografiska lokalisering att presenteras. Hypotesen kommer att ifrågasättas.

Referenser

- Axelsson, M., Eksell, P., Roneus, B., Brostrom, H., Haggstrom, J. & Carlsten, J. (1998). Relationship between hind limb lameness and radiographic signs of bone spavin in Icelandic horses in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 39(3), 349-57.
- Björnsdottir, S., A.M., Eksell P., Sigurðsson H. and Carlsten J. (2000a). Radiographic and clinical survey of degenerative joint disease in the distal tarsal joints in Icelandic horses. *Equine Veterinary Journal* 32(3), 5-11.
- Björnsdottir, S., Ekman, S., Eksell, P. & Lord, P. (2004). High detail radiography and histology of the centrodistal tarsal joint of young Icelandic horses. *Equine Veterinary Journal* 36(1), 268-272.
- Eksell, P., Axelsson, M., Brostrom, H., Roneus, B., Haggstrom, J. & Carlsten, J. (1998). Prevalence and risk factors of bone spavin in Icelandic horses in Sweden: a radiographic field study. *Acta Veterinaria Scandinavica* 39(3), 339-48.
- Raynauld, J.P., Martel-Pelletier, J., Berthiaume, M.J., Labonte, F., Beaudoin, G., de Guise, J.A., Bloch, D.A., Choquette, D., Haraoui, B., Altman, R.D., Hochberg, M.C., Meyer, J.M., Cline, G.A. & Pelletier, J.P. (2004). Quantitative magnetic resonance imaging evaluation of knee osteoarthritis progression over two years and correlation with clinical symptoms and radiologic changes. *Arthritis and Rheumatism* 50(2), 476-87.
- Wluka, A.E., Stuckey, S., Snaddon, J. & Cicuttini, F.M. (2002). The determinants of change in tibial cartilage volume in osteoarthritic knees. *Arthritis and Rheumatism* 46(8), 2065-2072.

Publikationer

Doktorandprojekt i Sverige

Student, Charles Ley

Handledargruppen består av Kerstin Hansson, Stina Ekman, Sigrídur Björnsdóttir, Leif Dahlberg, Björn Ekesten.

Titeln på avhandlingen är; Diagnostic Imaging of Early Distal Tarsal Osteoarthritis in Icelandic Horses.

Nedanstående publikationer är planerade att ingå i avhandlingen vilken kommer att försvaras i maj-juni 2013.

- I. Computed tomography and magnetic resonance imaging guided joint sampling for histology: a method to detect early distal tarsal osteoarthritis in young Icelandic horses.
Ley, C., Ekman, S., Dahlberg, L.D., Björnsdóttir, S., Hansson K.
Submission to Bone, november 2012.
- II. Topographic patterns of distal tarsal osteoarthritis in young Icelandic Horses.
Ley, C., Ekman, S., Strand, R., Björnsdóttir, S., Hansson K.
Planned journal; Equine Veterinary Journal.
- III. Comparison of MRI, CT and Radiography for detection of early distal tarsal osteoarthritis in young Icelandic horses.
Ley, C., Ekman, S., Björnsdóttir, S., Hansson K.
Planned journal; Veterinary Radiology and Ultrasound.

Presentationer gjorda av Charles Ley, doktorand

1. Imaging of distal tarsal osteoarthritis in young Icelandic Horses. PhD start up seminar. Dept Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences. September 2010.
2. Distal Tarsal Joint MRI – the cartilage. European Hallmarq user meeting, Chamonix, France, January 2011.
3. MRI for lameness diagnosis. Swedish Equine Veterinary Meeting. Stockholm, January 2011.
4. MRI of distal tarsal joint osteoarthritis. Australian college of veterinary scientists, science week. Gold Coast, Australia. June 2011.
5. Imaging of Equine Osteoarthritis with MRI. European Hallmarq user meeting, Chamonix, France, January 2012.
6. Imaging of distal tarsal osteoarthritis in Icelandic horses. Research day for the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, SLU. Uppsala, Sweden. February 2012.
7. Resolution in diagnostic imaging – Diagnostic Imaging guidance for microscopy. Swedish laboratory animals meeting (SVS Försöksdjurssektion). Stockholm, Sweden, May 2012.
8. Early distal tarsal osteoarthritis in Icelandic horses: CT/MRI lesion grading and mapping. 5th Nordic meeting on Quantitative Imaging of Cartilage. Malmö, Sweden, October 2012.

Doktorandprojekt på Island

Student, Thorvaldur Kristjansson

Handledare är bland andra Sigridur Björnsdóttir

En av artiklarna i avhandlingen har titeln;

Three dimensional morphometric parameters of the young Icelandic horse as indicators of cartilage degeneration in the distal tarsal joints.

Examensarbeten inom veterinärprogrammet, SLU.

1) Temperaturen, kadaverålderns och radiopulssekvensens betydelse för bildkvaliteten vid magnetresonanstomografi av tarsus hos häst. Carina Kubacki. 2009.

Resultaten visade ingen skillnad på bilderna vid de subjektiva bedömningarna men den relativa signalintensiteten ändrade sig för trabekulärt ben, vätska och kvoten mellan böjsena och ledbrosk för de objektiva mätningarna vilket är viktigt att veta vid framtagning av nya objektiva MRT-mätmetoder. Vid användning av objektiva mättekniker för utvärdering av MRT med hjälp av kadaverben är det viktigt att vara medveten om effekterna av tiden och temperaturen efter avlivning.

2) MRT av tarsallederna hos den unga islandshästen. Karl Zötterman. 2011.

Resultaten visar att MRT är ett användbart hjälpmedel vid bedömning av tidiga förändringar i distala tarsallederna hos unga individer men att ytterligare histopatologiska studier krävs för att befästa MRT fynd och därmed MRTs diagnostiska värde vid OA.

3) Spatt relaterat till tarsalledens vinkel. Sigurjon Einarsson. 2011.

Studien visade att vinkeln mellan tibia och metatarsalben III i frontalplanet (sett bakifrån) uppvisade 2° skillnad hos hästar med och utan spatt. Vid okulär bedömning av hästarnas bakbensställning föreföll valgus föreligga hos hästar med spattförändringar. Fynden talar för att fortsatta studier som klarlägger sambandet mellan benställning och spatt är nödvändiga.

Populärvetenskapliga artiklar

Ossös spatt. Del 1 – en förvirrande sjukdom. C. Ley, H. Treffenberg Pettersson. EquiLibris 2011:4, sid. 8-14.

Ossös spatt. Del 2 – spatt vad kan göras. C. Ley, H. Treffenberg Pettersson. EquiLibris 2012:1, sid. 16-21.