

Nya metoder för diagnostisera och prognostisera osteoartrit hos häst.

Huvudsökande och författare: Eva Skiöldebrand

Bakgrund

Osteoartrit (OA) är en degenerativ ledsjukdom med en lågradig inflammation närvarande under delar av sjukdomsförloppet. Sjukdomen drabbar en stor del av hästpopulationen och är den vanligaste orsaken till hälta hos häst.

Ett centralt problem vid diagnostik av osteoartrit är avsaknaden av metoder för att identifiera och kartlägga de mekanismer som leder till den i processen centrala vävnadsdestruktionen. Det är idag inte möjligt att kartlägga de tidiga händelser som leder till avancerad vävnadsnedbrytning och som representerar de faser av leddestruerande processer där terapimöjligheter torde vara optimala. Projektet syftade till att utveckla specifika markörer (matrixfragment) som identifierar molekylära händelser i broskmatrix och kan detekteras i ledvätska och blod vid tidig OA hos häst. Målsättningen är att kunna upptäcka tidiga nedbrytande processer i leden och även kunna prognostisera förloppet.

Material och Metoder

Försöksmodell

För att undersöka det molekylära förloppet i inflammerat brosk sattes en *in-vitro* modell upp där man odlade broskpluggar i närvaro av ett pro-inflammatoriskt enzym (interleukin-1 β). Broskpluggar stansades ut från kotled från två unga hästar med ett makroskopiskt friskt ledbrosk avlivade på SLU. Broskpluggarna odlades under 24 dagar i odlingskammare (37° C, 7% CO₂) varav hälften stimulerades med IL-1 β (10 ng/ml) och hälften odlades i enbart medium och fungerade som kontroll. Var tredje dag tillsattes nytt odlingsmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) och det gamla mediet sparades. Broskpluggarna skördades var sjätte dag. Proverna förvarades i -80°C fram tills de analyserades.

Verifiering av inflammationsmodellen.

Vid tillsats av i det proinflammatoriska enzymet IL-1 β till odlingsmediet startas en inflammationskaskad med syntes av metallopeptidaser som har förmåga att bryta ner matrixmolekylerna i brosket. Matrix metallopeptidas -13 (MMP-13) är en av de viktigaste enzymerna närvarande vid OA som bryter ned både aggrecan och kollagen typ II, de två mest förekommande molekyler i brosk. För att säkerhetsställa att det finns en närvaro av MMP-13 i odlingsmediet analyserades odlingsmediet på förekomst av aktivt MMP-13 genom en kommersiell enzymkopplad immunoadsorberande analys (Fluorokine human E Active MMP-13 ELISA kit).

Immunoblotting

För att kontrollera att matrixproteinet COMP degraderas i broskpluggen och utsöndrats till mediet vid närvaro av IL-1 β analyserades proverna genom immunoblot (Western Blot). Cellodlingsmedium blandas med jodacetamin alt laemmibuffert innan de tillsätts på en polyakrylamidgel. En molekylviktsstege med räckvidden 250-4 kDa används som referens för

Slutrapport för projektet H0947014

molekylmassan. En buffert innehållande sodium dodecyl sulfat (SDS) tillsätts och därefter separeras proteinerna med avseende på molekylmassa genom vandring inom gelen i det elektriska fält som genereras av 200 volt under 1h. Därefter överförs de separerade proteinerna till ett polyvinylidendifluoridmembran med hjälp av elektrisk spänning (20 volt) i en transferbuffer. Membranet blockas med fettfri mjölk för att undvika ospecifik inbindning av antikropp innan en bovin polyklonal COMP antikropp tillsätts till membranet. Visualisering av antigen-antikroppskomplexet görs genom en sekundär antikropp länkad till ett enzym (pepparrotsoxid). Ett kemiluminiscent substrat-kit tillsätts innan elektronisk dokumentation.

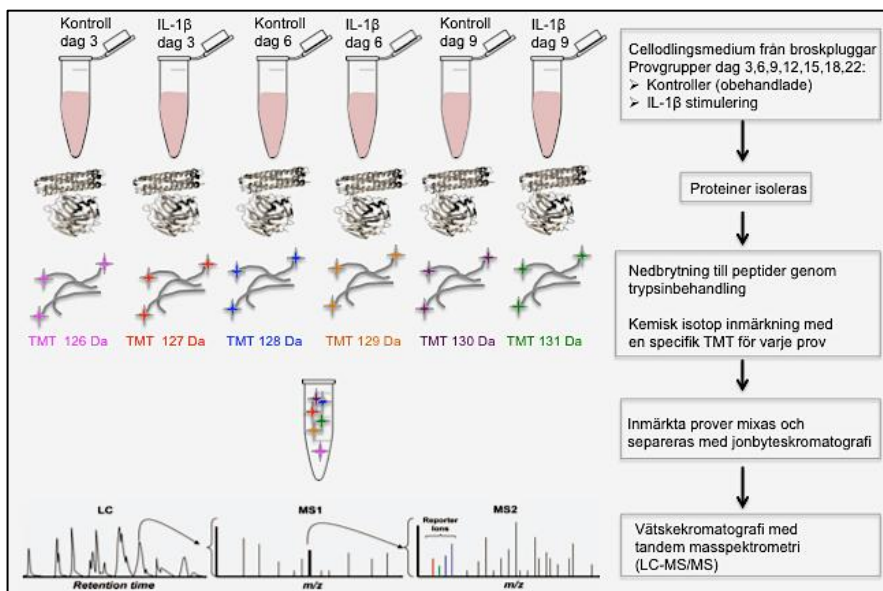
Förekomst av glykosaminoglykaner (GAG)

Cellodlingsmediumet analyseras i avseende på förekomsten av utsöndrad mängd glykosaminoglykaner från broskpluggen. I den biokemiska analysen används reagensen 1,9-dimetylmetylenblå (DMB) som binder till sulfaterade proetoglykaner (t.ex. dermatansulfat, keratansulfat, chondroitinsulfat) i cellodlingsmediumet. Denna inbindning resulterar i en förändring i absorptionsspektrumet som mäts spektrofotometriskt vid 515 nm. En standardkurva av chondroitinsulfat används för att kvantifiera koncentrationen av GAG. Mängden GAG i cellodlingsmediumet relateras till vikten av broskpluggarna.

Kvantitativ proteomik med inmärkning genom tandem mass tags (TMT)

För att kunna identifiera och kvantifiera de förändringarna i peptidmönstret som utsöndrats i odlingsmediet under den 25 dagar långa odlingstiden användes tandem mass tags tekniken. Metoden bygger på att kemiskt märka in (aminogruppbaserad isotopinmärkning) den N-terminala delen av peptiden som är genererat genom protein digestion med trypsin, från två olika prover (kontroll och interleukin-1 β stimulerad). De två inmärkta proverna mixas sedan och separeras med jonbyteskromatografi. Därefter sker analys och detektion genom vätskekromatografi med tandem masspektrometri (LC-MS/MS). Denna metod möjliggör en relativ kvantifiering av peptider (fragment) i varje prov. För att kunna bedöma kvantitativa resultat i prover från olika analystillfällen så används en mix av alikvoter från varje prov som referens (bild 1).

Bild 1. Schematisk bild över den kvantitativa proteomik analysen.



Slutrapport för projektet H0947014

Resultat

Koncentrationen av aktivt MMP-13 i odlingsmediet.

En hög koncentration av den aktiva formen av MMP-13 kunde detekteras i mediet efter IL-1 β stimulering under hela odlingstiden. Den högst uppmätta koncentrationen var 2300 ng/ml. I kontroll mediet kunde obetydliga mängder av enzymet detekteras (bild 2)

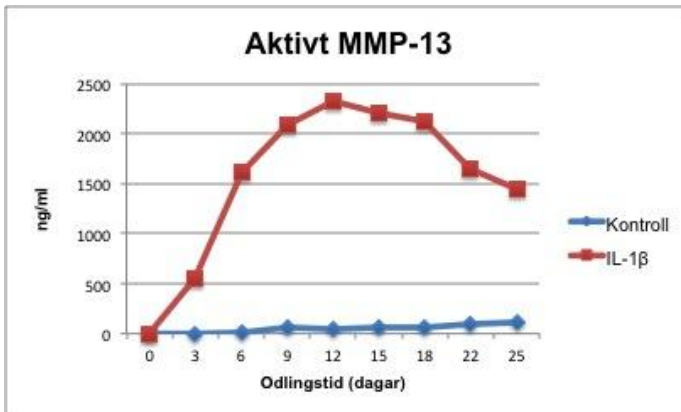


Bild 2. Koncentrationen av aktivt MMP-13 (ng/ml) i odlingsmediet från broskpluggar behandlade med IL-1 β samt från obehandlad kontroll grupp. n=2

Immunoblotting

IL-1 β stimulerade pluggar visar en nedbrytning av COMP molekylen i jämförelse med kontroll plugg. COMP är en pentamer och har en molekylvikt 500 kDa, vid degradation spjälkas molekylen och 400, 300 200 samt 100 kDa stora fragment uppstår. På blot ses detta som tydliga band vid molekylvikten 500, 400, 300 200 samt 100 k Da. Fragmenten identifieras vid dag 3 för att sedan kvarstå under hela stimuleringstiden (bild 3).

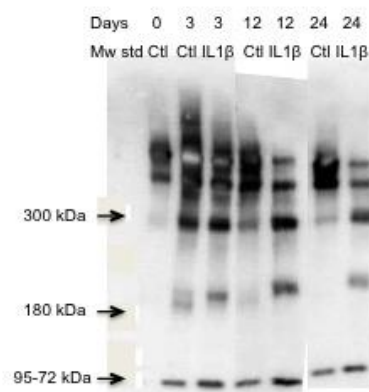


Bild 3. Identifiering av COMP fragment i odlingsmediet hos broskexplants odlad 0, 3, 12 och 24 dagar (C=kontroll explants, IL-1= IL-1 β stimulerade explants, MW= molvikts standard).

Slutrapport för projektet H0947014

Förekomst av glukosaminoglykaner

Resultaten visar att förekomsten av glukosaminoglykaner ökar kraftigt de första dygnet fram till dag 6 vid IL-1 stimulering samt i kontrollmediet (bild 4).

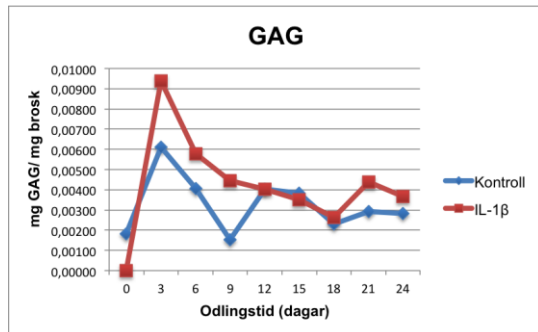
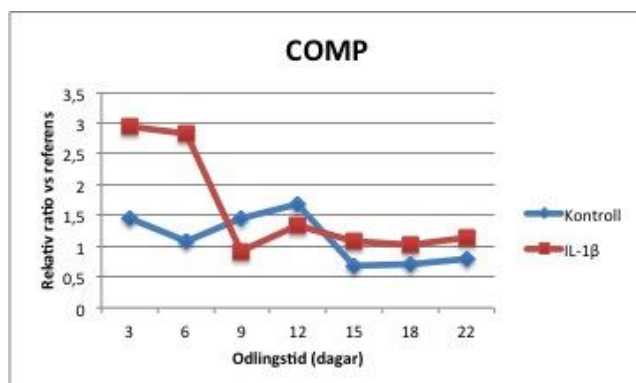


Bild 4. Totalmängden (mg) glukosaminoglykaner (GAG) i odlingsmediet i relation till totala broskvikten (mg) hos broskexplants stimulerade med IL-1 samt kontroll.

Kvantitativ proteomik med tandem mass tags (TMT)

Totalt 113 proteiner identifierades och kvantifierades i media från broskpluggar från ledbrosk. Resultaten av IL-1 β stimulering av broskpluggarna visade en utsöndring av proteiner i samband med inflammation, såsom matrixmetalloproteinaser (MMP) -1, -3 och -13, akutfasproteiner (serum amyloid A), komplementfaktorer (C1s, CB) och IL-6. De extracellulära matrix molekylerna; aggregan, brosk oligomert matrix protein (COMP), chondroadherin, fibronectin, fibromodulin, biglycan, decorin, lumikan, cartilage intermediat protein (CILP-1) -1, trombospondin-1, -4, proteoglykan 4 och kollagen typ II, VI, XI och XII bryts ned och frisläpps vid olika tidpunkter under odlingstiden.

De extracellulära matrixproteinerna utsöndrades vid distinkta tidpunkter där aggregan och COMP utsöndrades med högst koncentration vid dag 3 (bild 5). Kollagen typ II och biglycan, fibromodulin och kollagen typ VI utsöndras sent vid dag 18-22 (bild 6).



Slutrapport för projektet H0947014

Bild 5. Kvantitativ proteomik analys av COMP utsöndring i media vid inducerad inflammation. Relativ COMP ratio i jämförelse mot referensmixen i cellodlingsmedium från kontroll och interleukin (IL)-1 β behandlade broskpluggar under 3, 6, 9, 12, 15, 18 och 22 dagar.

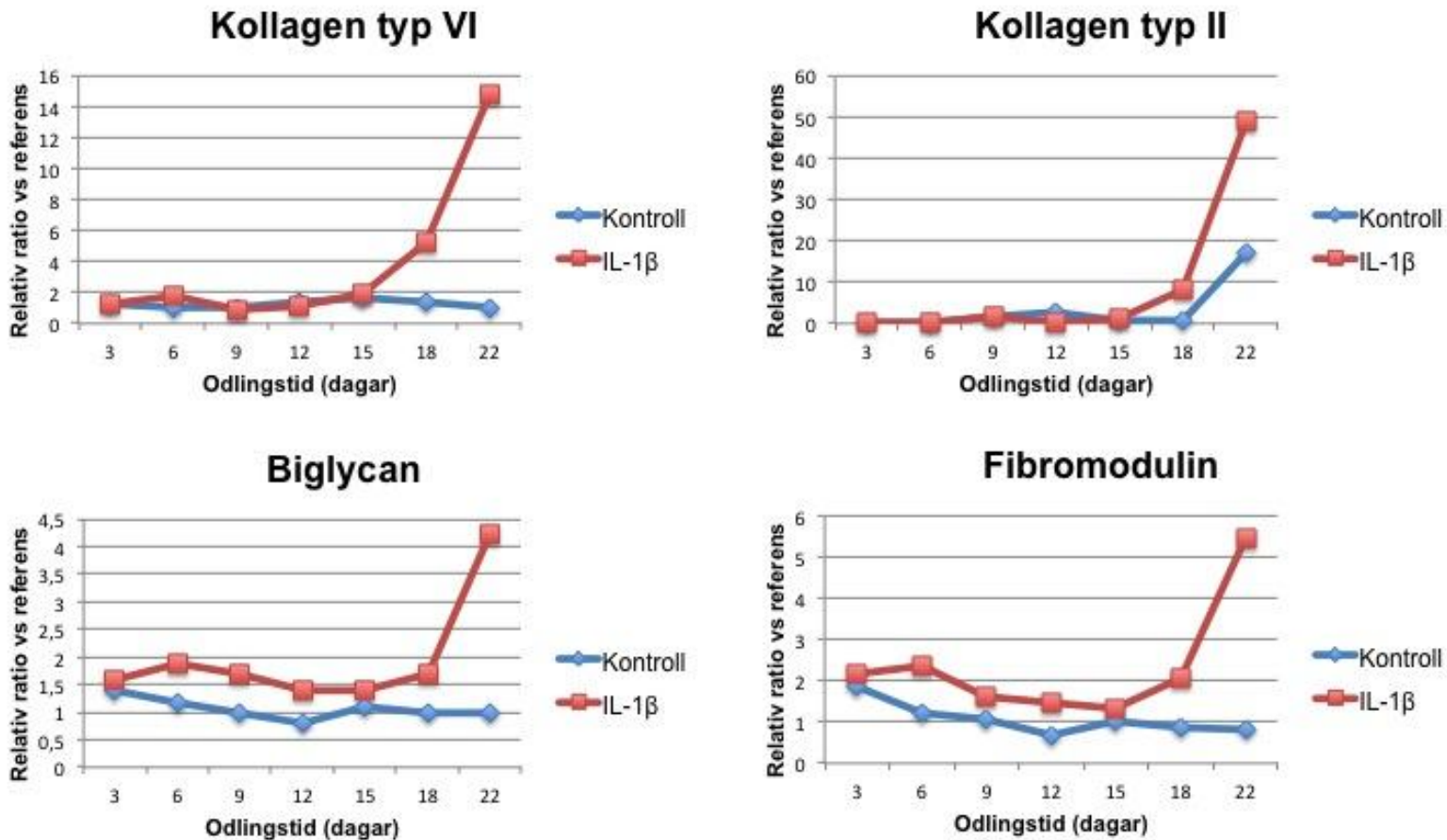


Bild 6. Kvantitativ proteomik analys av nedbrytning av det kollagena nätverket i extracellulära matrixet. Relativ ratio av kollagen typ -II, -VI, biglycan och fibromodulin i jämförelse mot referensmixen i cellodlingsmedium från kontroll och interleukin (IL)-1 β behandlade broskpluggar under 3, 6, 9, 12, 15, 18 och 22 dagar.

Identifiering av COMP fragment och klyvningställe med avseende på sin aminosyra sammansättning och storlek med masspektrometri (MS).

Ett flertal unika COMP fragment identifierades i odlingsmediet från broskpluggar som behandlats med IL-1 β . Dessa fragment fanns endast i låg förekomst i kontroll mediet.

Antikroppsframställning av polyklonala antikroppar riktade mot de specifika fragmentens klyvningställe.

Från företaget GenScript USA Inc beställdes en polyklonal antikropp mot ett utvalt COMP fragment. Antisera från kaninen testades därefter i en direkt ELISA med serum- och

Slutrapport för projektet H0947014

ledvätskeprov från häst. Resultatet visade en låg förekomst hos friska hästar och en hög förekomst hos hästar med OA.

Därefter testades antikroppens specificitet mot klyvningstället genom att en syntetisk peptid togs fram som bestod av tre ytterligare aminosyror före klyvningstället samt de efterföljande aminosyrorerna. Antikroppen reagerade inte mot detta fragment och vi kunde då konkludera att antikroppen inte reagerade på andra delar av COMP molekylen utan endast specifikt för klyvningstället.

Framställning ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) och validering av metoden.

Nu sker en fortsatt klinisk validering av fragmentets betydelse i ledvätska och serum hos häst med olika stadier av OA samt om den kan indikera en ökad brosknedbrytning hos travare i träning (bild 7).

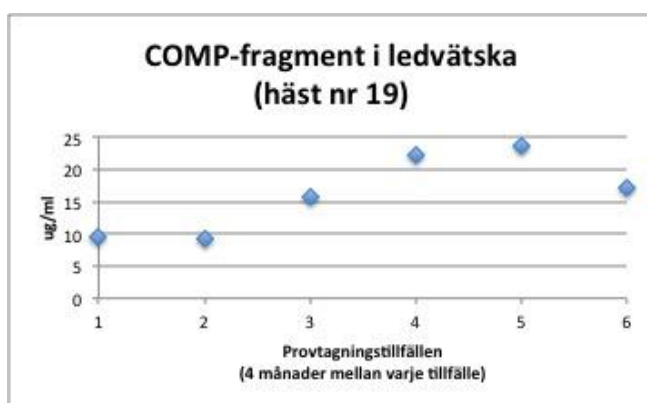


Bild 7. Koncentrationen av COMP fragment i ledvätska hos travare under en 20 månaders lång träningsperiod.

Diskussion

Våra kliniskt övergripande frågeställningar har varit:

Är det möjligt att tidigt, långt före hästen visar kliniska symtom, påvisa nedbrytande processer i leden och därmed kunna prognostisera sjukdomsförloppet?

Den tidiga inflammationen uppvisar en annorlunda profil avseende matrix degradering jämfört med vad vi ser i ett senare (kroniskt) skede, och fragmenteringen av specifika molekyler såsom COMP har gett möjlighet till utvecklandet av en ELISA för att mäta detta fragment in vivo. Identifieringen av klyvningstället i COMP molekylen genererat i inflammationmodellen ger oss enorma möjligheter att utreda COMP fragmentets betydelse för identifiering av tidig skada i brosk och hur väl detta avspeglar sig i vävnadsprov. Nu vill vi gå vidare med framställandet och utprovandet av ett diagnostiskt batteri som kan bestå av ett flertalet specifika neobrytningsmarkörer

Följande data har kommunicerats i publikationer, konferenser, seminarium och press under perioden 2010-01-01- 2013-09-15.

Emilia Svala anställdes som doktorand i projektet. Nedanstående manuskript och publikationer 1-2 skall ingå i hennes avhandling som planeras till våren 2014.

Publikationer:

1. *Dynamic changes, with respect to immune system and cartilage molecules, in equine articular cartilage treated with interleukin-1 β in vitro.*

Svala E, Löfgren M, Sihlbom C, Ruetschi U, Lindahl A, Ekman S, **Skiöldebrand E**
In manuscript

2. *Up-regulation of growth differentiation factor 5 in equine articular cartilage by interleukin 6 is mediated by inhibition of the WNT-signaling pathway.*

Accepted with minor revision in American Journal of Veterinary Research, September 2013
Svala E, Thorfve A, Ley C, Henriksson HB, Synnergren J, Lindahl A, Ekman S,
Skiöldebrand E.

3. *Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 β , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures.*

Connect Tissue Res. 2011;52(4):290-300.

Ley C, **Svala E**, Nilton A, Lindahl A, Eloranta ML, Ekman S, **Skiöldebrand E**.

Konferenser:

International Society for the study of the Lumbar Spine, 38th annual meeting

June 14-18, 2011 Gothenburg, Sweden

General Poster; Title: *Migrating prechondrocytic cells from stem cell niches supports growth and regeneration of the adult mammal intervertebral disc – a descriptive study in three species.* Henriksson HB, **Svala E**, **Skiöldebrand E**, Junevik K, Lindahl A, Brisby H

Special Poster Presentation; Title: *A novel In Vitro explant model for studies of cellular migration in intervertebral discs.*

Henriksson HB, **Svala E**, **Skiöldebrand E**, Junevik K, Lindahl A, Brisby H

The 6th Nordic Connective Tissue Meeting

September 22-23, 2011, Uppsala Sweden

Poster; Title: *The effects of interleukin (IL)-6 and -1 β on growth differentiation factor (GDF)-5 in equine articular cartilage.* **Svala E**, Ley C, Henriksson HB, Lindahl A, Ekman S,
Skiöldebrand E

Poster; Title: *Notch and EGFL-7 in equine cartilage*

Löfgren M, **Svala E**, Ley C, Lindahl A, Ekman S, **Skiöldebrand E**

Slutrapport för projektet H0947014

World conference on regenerative medicine

November 2-4, 2011, Leipzig, Germany

Abstract – chosen for oral presentation

Title: *Extracting stem cells and surrounding chaperon cells from the zone of ranvier out of non-decalcified rabbit knee.* Richter H, **Svala E, Skiöldebrand E**, Henriksson HB, Lindahl A

Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU)

June 17-20, 2013, Istanbul, Turkey

Abstract: Title: *Potential role of matrix metalloprotease activity involved in cellular migration in the mammal intervertebral disc region. A descriptive experimental study in three species* Papadimitriou N, **Svala E, Skiöldebrand E**, Junevik K, Henriksson HB

Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS-AP)

October 23-26, 2013, Shanghai, China

Poster presentation; Title: *Cellular migration observed in niche regions in cartilage of the intervertebral disc and in the knee joint in in vitro and in vivo models* Brisby H, Lindahl A, **Skiöldebrand E**, Tängemo C, Mattson J and Henriksson HB

Oral presentation; Title: *Indications of that metalloprotease activity is involved in cellular migration in the mammal intervertebral disc region. A descriptive experimental study* Papadimitriou N, Brisby H, **Svala E, Skiöldebrand E**, Junevik K, Henriksson HB

Seminarium

Halvtidsseminarium för doktorand (Emilia Svala) SLU, April 2012 med titeln:

”The effects of the proinflammatory cytokines interleukin-1 and -6 on equine cartilage metabolism *in vitro* and *in vivo*”

Utställning

”För livet” - är en utställning på Arlanda flygplats som handlar om hur forskningen och utvecklingen av nya behandlingar och metoder i Stockholm-Uppsala regionen som kan bidra till att komma tillrätta med global ohälsa och stigande kostnader i vården. Vi berättar om angelägna problem och vad som pågår för att finna lösningar. Vi berättar också om vår starka tradition och potentialen för att utveckla bättre diagnostik, nya medicintekniska produkter och läkemedel. Från och med den 9 september 2011 och tre år framåt pågår projektet FÖR LIVET. **Utställningsarrangör:** Stockholm-Uppsala Life Science **Medarrangörer:** LIF – de forskande läkemedelsföretagen, Naturvetarna, SwedenBIO, Swedish Medtech **Partners:** Abbott, AstraZeneca, GE Healthcare Life Sciences, Karolinska Institutet, Kungliga Tekniska högskolan, Landstinget i Uppsala Län, Pfizer, Q-Med, Recipharm, Stockholms läns landsting, Stockholms universitet, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala universitet.

Slutrapport för projektet H0947014

”Med hjälp av biomarkörer kan hästar slippa bli halta”

Inflammation i leder är den vanligaste anledningen till att tävlingshästar blir halta. Orsaken är oftast att en led överbelastas när hästen springer och en inflammation uppstår. Inflammationen innebär en gradvis nedbrytning av lederna och resulterar slutligen i kronisk halta. Vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) pågår forskning kring de tidiga sjukdomsmekanismerna.

I framtiden hoppas man kunna upptäcka skadan tidigt med hjälp av så kallade biomarkörer och därmed förhindra nedbrytningen av vävnaden i leden. Vid en leddkada förekommer substanser, biomarkörer, i ledvätskan som talar för att sjukliga processer pågår. Dessa hoppas man kunna påvisa långt innan de kliniska symtomen smärta och halta uppstår. I förlängningen kan biomarkörer användas för att mäta effekten av läkemedel och därmed förebygga att hästen blir halt.

Forskningens resultat kan även komma att ha betydelse för utvecklingen av diagnostik av människor, eftersom processerna är likartade.

Projektet är ett samarbete mellan SLU, Lunds Universitet och Göteborgs Universitet med flera anslag från Stiftelsen Hästforskning.

Populärvetenskaplig press

Tidningen ridsport, nummer 8, 2013-04-26 ”Blodprov kan ge snabb diagnos om leddskador”