

Projektets titel och projektnummer

Ökad hästvelfärd med hjälp av en anti-inflammatorisk biomarkör för glukokortikoider, projnr H-14-47-050.

Rapportens författare

Carina Ingvast Larsson

Bakgrund

Syfte och mål

Vid tävling och med tävling jämförd träning är det viktigt för djurskyddet att det finns giltiga karenstider för läkemedel som säkerställer att endast irrelevanta koncentrationer av substanser finns kvar i kroppen för att minska risken för skador. För hästens välbefinnande är det även viktigt att vid behandling av sjukdom och skada att de doseringar av läkemedel som används är effektiva och säkra dvs att risken för biverkningar hålls till ett minimum. Projektets långsiktiga mål är att erhålla ett verktyg för att kunna fastställa lämpliga karenstider för alla glukokortikoider samt att kunna optimera behandling med glukokortikoider.

Biomarkörer används allt mer för att diagnosticera sjukdomar och även för att utvärdera effekten av olika behandlingar. Glukokortikoider (tillhör gruppen kortikosteroider) uppreglerar både syntesen och frisättningen av annexin-1 vilket är ett protein som har anti-inflammatoriska och smärtlindrande egenskaper (Chen et al., 2013). För annexin-1 är flera signalvägar demonstrerade som ökad frisättning av anti-inflammatoriska cytokiner samt minskning av proinflammatoriska cytokiner (Baud et al., 1998; Ferlazzo et al., 2003; Chen et al., 2013). Det finns även publicerade studier som demonstrerar att om genen för annexin 1 slås ut (*knock out*) i djurmodeller med inducerad ledinflammation minskar glukokortikoideffekten med upp till 100 % (Yang et al., 2004, Patel et al., 2012).

Annexin-1 är således en viktig länk för glukokortikoiders terapeutiska effekter vilket gör annexin till en aktuell kandidat som biomarkör för glukokortikoider.

För många av de olika glukokortikoider (exempelvis dexametason, betametason, triamcinolon) som rutinmässigt används till häst är terapeutiska koncentrationer okända. En biomarkör i plasma för den terapeutiska effekten av glukokortikoiden dexametason innebär att det är möjligt att fastställa terapeutiska koncentrationer i plasma för samtliga glukokortikoider eftersom de utövar sin effekt med samma mekanismer och signalvägar. Kännedom om terapeutiska koncentrationen i plasma är en förutsättning för att på vetenskaplig grund kunna fastställa relevanta karenstider för glukokortikoider innan tävling och med tävling jämförd träning. Dessutom kan de nu i praxis använda doserna optimeras för att minska risken för biverkningar.

Karenstiden för glukokortikoider för tävling och med tävling jämförd träning måste garantera att hästen inte har terapeutiska koncentrationer av glukokortikoider i kroppen

eftersom dessa effektivt maskerar symtom från en ännu inte utläkt skada. Tävlas eller tränas hästen under tävlingslika förhållanden innan skadan är utläkt ökar risken för skador i rörelseapparaten. En biomarkör för terapeutisk effekt av glukokortikoider är således angeläget för djurvelfärden.

Teori

Adekvat läkemedelsbehandling av tävlingshästar är ett absolut krav ur djurskyddssynpunkt vilket leder till att det inom dopningskontrollen är en klar skillnad mellan kontroll av tillåtna läkemedel och kontroll av förbjudna substanser. I jakten på förbjudna substanser har dopningskontroll-laboratorierna idag så förfinade analysmetoder att irrelevanta koncentrationer av tillåtna läkemedel kan upptäckas under mycket lång tid efter det att hästen blivit behandlad (Barragry, 2006). Till och med hästar som inte stått under behandling kan ha påvisbara mängder läkemedel i urinen och testa positivt vid dopingprov. Detta beror på kontamination av miljön då hästarna stått uppstallade i boxar där andra hästar tidigare behandlats med läkemedlet (Norgren *et al.*, 2001, Wennerlund *et al.*, 2001). Tränarens och hästägares rädsla för att testa positivt i dopningskontrollen kan leda till underlåtenhet att behandla hästen med kontrollerade läkemedel och att istället använda alternativa behandlingsmetoder. Avsaknad av adekvat behandling är naturligtvis ett djurvelfärdproblem.

En väg till lösning på dilemmat är att det både inom Norden och inom övriga Europa finns rapporteringsnivåer s k *screening limits* i urin och plasma för tillåtna läkemedel som ska trygga att det inte är laboratoriernas analyskänslighet som avgör om ett dopingprov är positivt eller ej. Dessa *screening limits* har en vetenskaplig dokumentation till grund för att säkerställa att nivåerna av läkemedel inte utövar effekt på hästen (Toutain & Lassourd, 2002) vilket innebär att hästen inte kan bedömas att vara dopad. Detta har borgat för att veterinärer med låg risk kan använda många läkemedel till hästar om lämpliga karenstider för tävlan och skötselrutiner iakttas. I Skandinavien är karenstiden för tillåtna läkemedel innan tävling/träning fastställd av hästsportens organisationer för att säkerställa att läkemedlet inte längre utövar sin effekt samt även för att hästen ska beredas tillräcklig vila efter en behandling.

Inom hästsporten används i stor omfattning glukokortikoider för att behandla inflammation i bland annat leder, ledkapsel, senor, ligament och andra mjukdelar. Glukokortikoider har stor betydelse för adekvat behandling av dessa lidanden och därmed även för ett gott djurskydd. Lokal behandling med glukokortikoider är dock omdiskuterat och en ökad risk för skador, ibland fatala (exempelvis stressfrakturer kotben), i rörelseapparaten är påvisad. (Riggs, 2014; Whitton *et al.*, 2014). Den ökade skadefrekvensen antas bero på att behandling med glukokortikoider maskerar symtomen genom smärtlindring och hästarna kommer för tidigt tillbaka in i träning/tävling. Det är alltså angeläget för djurvelfärden att kunna fastställa irrelevanta koncentrationer dvs som inte påverkar hästen i blod och i urin och även fastställa en adekvat *screening limit* både i blod och urin. Karenstiden kan därefter bestämmas.

Annexin-1 som är ett antiinflammatoriskt endogent protein som frisläpps och produceras vid påverkan av glukokortikoider är således en utmärkt kandidat till biomarkör för glukokortikoiders terapeutiska effekt. Därför har vi i studien mätt koncentrationen av

annexin-1 i blod och kommer sedan att koppla dessa till plasmakoncentrationerna av dexametason för att fastställa terapeutiska koncentrationer.

Material och metoder

Plasma- och blodproverna som analyserades erhöles i ett tidigare projekt "Glukokortikoider till häst - säker användning ur ett dopnings- och behandlings-perspektiv" som finansierats av SHF (proj nr H1047221). Inga nya djurexperimentella studier behövde därför utföras. Sex hästar har vid fyra tillfällen fått en tre timmar lång intravenös infusion av dexametason efter en plasmakoncentrationshöjande startdos eller en infusion med koksalt. Varje omgång föregicks av en wash-out period på minst 1 vecka. Dos 1: placebo, dos 2: startdos 100 ng/kg, infusion 22,5 ng/kg/h, dos 3: startdos 1000 ng/kg, infusion 225 ng/kg/h samt dos 4: startdos 10 000 ng/kg, infusion 2250 ng/kg/h. Dexametasondoserna är uträknade med målsättningen att plasmakoncentrationen av dexametason skulle bli 0,06 ng/ml plasma, 0,6 ng/ml plasma och 6 ng/ml plasma. Efter en engångsdos av långtidsverkande dexametason (Vorenvet vet) doserat enligt tillverkarens rekommendation var medelvärdet 0,6 ng/ml för den maximala plasmakoncentrationen av dexametason (Ekstrand et al., 2015). 6 ng/ml representerar en uppskattad medelplasmakoncentration under ett dygn efter en engångsdos vattenlösligt dexametason givet i blodet. Doserna som är givna i försöket speglar alltså de doser som används kliniskt i Sverige. Tretton blodprover från varje häst har samlats under 48 timmar (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 9h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h). Blod har samlats i 10 mL plaströr och omedelbart transporterats i isvatten till -70° C. Blod samlades även i Na-heparinrör, förvarats i isvatten och centrifugerats inom 30 minuter (3000 g/20 min/+4° C). Plasman har sedan förvarats i -70° C. Plasman har sedan förvarats i -70° C. Allt arbete fram till -70 frysen har skett <4 grader. Det fanns totalt 312 prover; 13 prov från 6 hästar x fyra olika koncentrationer.

Plasmakoncentrationen av annexin-1

Häst-specifik ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) som finns kommersiellt tillgänglig (Horse Annexin A1, ANXA1 ELISA Kit, Cusabio®, China), avsågs att användas för analyserna i plasma.

Försök att validera Horse Annexin A1, ANXA1 ELISA Kit gav nedslående resultat. Det var till och med problem med att få en godtagbar standardkurva i av tillverkaren testmedium (Fig 1). Väldigt många prov hade dessutom negativ absorbans, inkl spikade plasmaprover. Det är ett tecken på att någonting fastnar på botten av brunnarna mellan antikropparna.

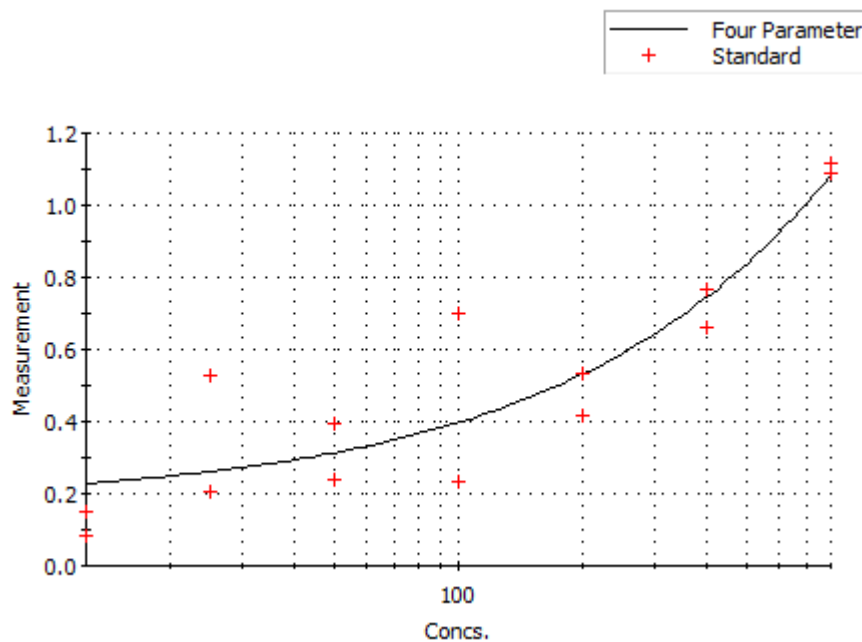


Fig 1. Standardkurva annexin A1 i medium från tillverkaren.

Vi valde att lämna ELISA-testet och fokuserade på att finna en metod med större precision, eftersom även standardkurva uppvisade stor variabilitet. Under senare år har metoder med stor precision utvecklats med hjälp av masspektrometri (MS) för att bestämma proteiner i biologisk material. Ett samarbete har därför inletts med Margareta Ramström Jonsson, PhD, Head of Facility, Docent i proteomik. Mass Spectrometry-based Proteomics, SciLifeLab, Institutionen för kemi – BMC, Analytisk kemi, Box 599, 751 23 Uppsala, för att utveckla en MS-metod för att kunna analysera och kvantifiera annexin A1 från hästblod.

Resultat

Annexin A1 i helblod med hjälp av masspektrometri - metodutveckling

Initialt gjordes försök att detektera annexin i både plasma och helblod med en standardplattform i proteogenomcis som tillhandahålls av SciLifeLab. De initiala resultatet visade inte på någon detektion av annexin i provmaterialet. Projektet fortsatt med att utveckla en riktad metod för kvantifiering av Annexin A1 i helblod från häst.

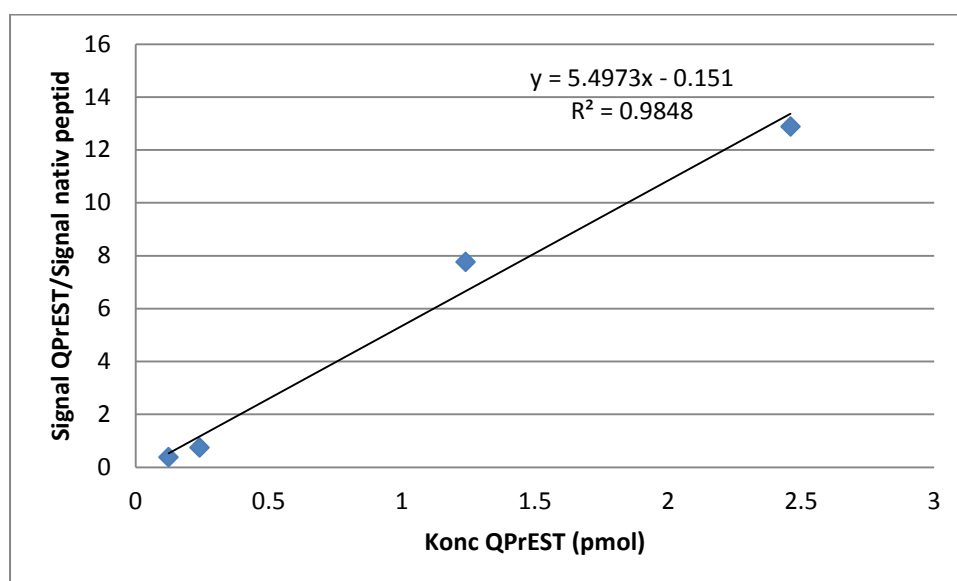
Generell beskrivning: För att bestämma koncentrationen av Annexin A1 utvecklades en masspektrometribaserad (MS-baserad) metod. Till proverna sattes en internstandard, ett ca 32 kDa stort protein i kategorin QPrEST. QPrEST är 25-35 kDa tunga proteiner som utgör homologer till humana proteinsekvenser. För att fungera som internstandarder vid MS-körningar är samtliga argininer och lysiner inmärkt med tyngre isotoper, ^{13}C och ^{15}N . Internstandarden sattes till helblodet i lämplig mängd och proteinerna i provet separerades på en SDS-PAGE gel. Då Annexin A1 och QPrESTen är av ungefär samma storlek kunde ett band motsvarande 30-40 kDa skäras ut och analyseras. Bandet digererades med trypsin enligt ett standardprotokoll.

Mer detaljerat: Analysen utfördes på helblod. 1,2 µL helblod spädades 10 ggr i ammoniumbikarbonatbuffert. Två µL internstandard, QPrEST, av koncentrationen 0,062 µM sattes till lösningen. Provet separerades med hjälp av SDS-PAGE. Då targetproteinet och internstandarderna har ungefär samma storlek kunde vi på detta sätt koncentrera proteiner i storleksordningen 30-40kDa. Ett band motsvarande 30-40 kDa skars ut. Bandet digererades med trypsin.

Fortsättning: Vid digerering av internstandarderna erhålls en tryptisk peptid som är analog med den från det nativa hästproteinet. Peptidsekvensen för denna är: GTDVNVFNTILTTR. En riktad MS-metod sattes upp på en QExactive Orbitrap MS för att samla in data för dubbelladdade joner av nativ peptid: 775,91 respektive tung peptid 780,91. En kvot baserad på arean av 6 MS-fragment från denna peptid beräknades och omräknades till absolut koncentration.

Metodutvärdering

Ett kontrollprov utvärderades vid varje analystillfälle. Kontrollprovet bereddes 5-9 gånger per hästkörning och analyserades i duplikat. Spridningen för mätvärdena var vid varje analystillfälle < 20%. Dock visade det sig att absolutvärdet för kontrollprovet varierade kraftigt mellan analystillfälle 1 (häst A) och 2 (häst B). Vi har observerat liknande tendenser för andra projekt där QPrestar har använts, och vi misstänker därför att QPrESTarna inte är stabila för långtidsförvaring i buffert utan urea. Vi rekommenderar därför att resultaten (se nedan) för häst A och B främst används för att studera skillnaderna inom varje häst (som beretts från samma standardspädning), men inte att titta på absolutvärden mellan hästarna. Relativa trender är dock relevanta. Ett alternativ kan vara att normera mätvärdena mot kontrollprovets medelvärde, ett annat att normera mot t.ex. Dag 1 för respektive häst. Tillsats av internstandarderna i olika mängd inom det aktuella koncentrationsområdet påvisade acceptabelt linjärt samband med regressionsanalys (Figur 2).



Figur 2. Respons vid tillsats av olika mängd internstandard inom det aktuella mätområdet

Resultat från två hästar

Blodprover från två (A och B) av sex hästar har hittills analyserats på sitt innehåll av annexin A1 efter den högsta dosen av dexametason (startdos 10 µg/kg, infusion 2,250 µg/kg/h under 3h). Se figur 3.

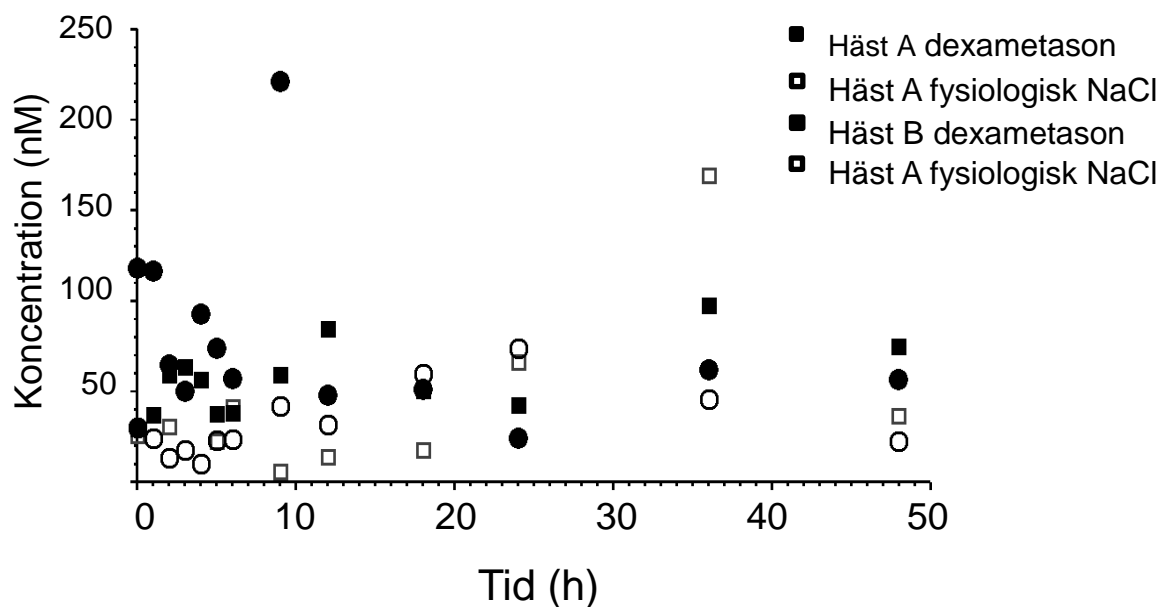


Fig 3. Koncentrationen av annexin A1 i helblod från 2 hästar behandlade med dexametason under 3 h (startdos 10 000 ng/kg, infusion 2250 ng/kg/h) respektive fysiologisk NaCl.

Resultaten från de 2 hästarna indikerar att exponering av dexametason ger en högre koncentration över tid av annexin. Med endast 2 hästar analyserade är det för tidigt att urskilja något bestämt mönster i frisättning och syntes av annexinet. Under våren kommer återstående prover från den högst exponerade omgången att analyseras.

Diskussion

Initialt var ambitionen att använda en kommersiell antikroppsbaserad metod (ELISA) för att kvantifiera annexinkoncentrationerna i provmaterialet. Då den analysmetoden inte var applicerbar med avseende på frågeställning och provmaterial inriktades projektet istället på en analysmetod baserad på MS-teknik. Eftersom vår samarbetspartners standard plattform inom proteogenomics inte indikerade detektion av annexin i vare sig plasma eller helblod fick

projektet inriktas på en riktad metod för annexin. SciLifeLab har därför validerat en helt ny analysmetod för annexin i helblod från häst. Utvecklingsarbetet har tagit tid dels beroende på metodens komplexitet och dels beroende på att SciLifeLab har en stor belastning från andra uppdrag som tar tid i anspråk från både personal och analysinstrumenten. Således fortgår arbetet fortfarande med att analysera provmaterialet och kommer så att göra även första halvåret av 2017.

Med de sparsamma data som hittills erhållits är det inte möjligt att genomföra farmakokinetiska-dynamiska (PK/PD) analyser. Efter det vi erhållit data från resterande 4 hästar kommer om möjligt PK/PD genomföras med hjälp av kommersiellt datorprogram. Genom att koppla dexametasons farmakokinetik (PK) med den ökningen av annexin-1 i plasma (PD) erhålls möjlighet att bestämma de plasmanivåer som krävs för terapeutiska nivåer. Terapeutiska koncentrationer tillsammans med de farmakokinetiska parametrarna ger grunden för en optimal dosering och relevanta karenstider.

Metoden kommer även att kunna utvecklas och ge ännu större precision i analysen. En möjlighet är att från helblod separera fram leukocytern, där annexinet till största delen finns (Peers et al., 1993, Goulding et al., 2015). Genom att endast analysera annexin A1 från leukocyterna minskar mängden övriga proteiner som kan störa analysen.

Visar det sig att annexin A1 är en lämplig biomarkör för den antiinflammatoriska effekten av dexametason har vi ett förnämligt verktyg. Genom att utföra enkla administrationsstudier med andra glukokortikoider kan vi då genom blodprov optimera behandling och bestämma karenstider utan att behöva genomföra avancerade experimentella studier med hjälp av inflammationsmodeller *in vivo*.

Publikationer

Inga resultat har hittills kunnat publicerats eftersom metodutvecklingen för att analysera annexin A1 i helblod har varit tidskrävande. Vår samarbetspartner SciLifeLab är dessutom hårt belastade med andra uppdrag varför det har tagit tid.

Resultaten kommer emellertid att publiceras i internationell vetenskaplig referee-granskade tidskrifter för att forskare och veterinärer utomlands ska kunna ta del av resultaten.

För att nå ut till och få kontakt med forskarkollegor kommer resultaten att presenteras vid internationell konferens där ämnen såsom dopning, djurvelfärd, biomarkörer tas upp.

Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)

Relevanta biomarkörer för glukokortikoiders terapeutiska effekter är av stor vikt i syfte att öka djurvelfärden för tävlingshästar genom att på vetenskaplig grund säkerställa adekvata karenstider. Annexin-1 kan vara en lämplig kandidat för den anti-inflammatoriska/analgetiska effekten av glukokortikoiden dexametason. Biomarkören kommer förhoppningsvis att kunna användas i antidopningsarbete för att fastställa en rimlig och säker karenstid, samt optimera dosering av dexametason i den kliniska användningen för att minska bieffekter. En relevant biomarkör för dexametason kan även användas för andra glukokortikoider

(triamcinolonacetonid, betametason, metylprednisolon) och på så sätt underlätta fastställandet av karenstider. Det är av yttersta vikt att glukokortikoider ska kunna användas inom hästsporten utan att äventyra djurvelfärden. Studier krävs för att kunna fastställa vilka nivåer av läkemedel i plasma/urin som inte utövar effekt på hästen och därmed ligga till grund för sporten att fastställa adekvat karenstid. Sporten måste veta att de *screening limits* som används garanterar att de koncentration av glukokortikoider under gränsen inte utövar farmakologiska effekter som påverkar hästens prestation eller kan utsätta hästen för ökad skaderisk. Detta är ett krav fram för allt med tanke på att våra sporthästar måste kunna erbjudas adekvat behandling vid sjukdom utan att säkerheten vid tävlingar äventyras. Dessutom måste veterinärer, tränare och ryttare vara trygga i att efter behandling av hästar med glukokortikoider är den karenstid som anvisas tilläcklig.

Resultatförmedling till näringen

Resultaten kommer att publiceras så att veterinärer verksamma i Sverige kan få tillgång till de nya rönen.

Via Hästsverige.se, SLU & Hippocampus hemsidor och via hemsidor för populärvetenskapliga postrar och föredrag vid seminarier och andra möten kommer resultaten att presenteras. Resultaten kommer även att presenteras inom olika hästforum. Våra ambitioner är också att spridning av resultaten via de övriga kanaler som anges i den information som givits ut angående forskningsbidrag från Stiftelsen för Svensk Hästforskning.

Referenser

Barragry, T. Doping and drug detection times in horses: New data for therapeutic agents. *Irish Veterinary Journal*, July 2006, Vol.59(7), pp.394-398

Baud L, Fouqueray B, Suberville S, Doublie S., 1998. Interleukin 10: a logical candidate for suppressing glomerular inflammation? *Exp Nephrol*. 1998 Jan-Feb;6(1):22-7

Chen L, Lv F, Pei L. 2013, Annexin 1: A glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. *Eur J Pain*. doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00373.x. [Epub ahead of print]

Ekstrand C, Bondesson U, Gabrielsson J, Hedeland M, Kallings P, Olsén L, Ingvast-Larsson C. Plasma concentration-dependent suppression of endogenous hydrocortisone in the horse after intramuscular administration of dexamethasone-21-isonicotinate. *J Vet Pharmacol Ther*. 2015 Jun;38(3):235-42.

Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol*. 2003 Oct;3(10-11):1363-9.

Goulding NJ, Godolphin JL, Sharland PR, Peers SH, Sampson M, Maddison PJ, Flower RJ. Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone. *Lancet*. 1990 Jun 16;335(8703):1416-8.

Norgren, A., Ingvast-Larsson, C., Kallings, P., Fredriksson, E. and Bondesson, B. Contamination and urinary excretion of flunixin after repeated administration in the horse. Proc. of 13th Int conference of Racing Analysts and Veterinarians, 2000, Cambridge, England. Eds: Williams R.B., Houghton E. & Wade J., R&W Public. 2001, 377-380.

Patel, HB, Kornerup, KN, Sampaio, ALF, Acquisto, FD, et al., The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1872–1880.

Peers SH, Smillie F, Elderfield AJ, Flower RJ. Glucocorticoid-and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leucocytes in vivo. *Br J Pharmacol*. 1993 Jan;108(1):66-72.

Riggs, C., M., 2014, Intra-articular corticosteroids under threat in Thoroughbred racehorse practice, *Vet J*. 1-2

Toutain, P. L. and Lassourd, V. (). Pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to assess irrelevant plasma or urine drug concentrations in postcompetition samples for drug control in the horse. *Equine Vet J*. 2002, 34(3): 242-249.

Wang ZM1, Zhu SG, Wu ZW, Lu Y, Fu HZ, Qian RQ. Kirenol upregulates nuclear annexin-1 which interacts with NF- κ B to attenuate synovial inflammation of collagen-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2011 Sep 1;137(1):774-82.

Wennerlund, I., Ingvast-Larsson, C., Kallings, P., Fredriksson, E. and Bondesson, U. Pharmacokinetics and urinary excretion of naproxen after repeated oral administration in the horse. Proc. of 13th Int conference of Racing Analysts and Veterinarians, 2000, Cambridge, England. Eds: Williams R.B., Houghton E. & Wade J., R&W Public. 2001, 195-200

Whitton RC, Jackson MA, Campbell AJ, Anderson GA, Parkin TD, Morton JM, Boden LA., 2014. Musculoskeletal injury rates in Thoroughbred racehorses following local corticosteroid injection. *Vet J*. 71-6.

Yang, Yuan H ; Aeberli, Daniel ; Dacumos, April ; Xue, Jin R ; Morand, Eric F. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 15 July 2009, Vol.183(2), pp.1435-45