



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Immunologin bakom svår ekvin astma

The immunology of severe equine asthma

Sara Andersson

*Uppsala
2019*

Immunologin bakom svår ekvin astma

The immunology of severe equine asthma

Sara Andersson

Handledare: *Caroline Fossum och Magnus Åbrink,
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap*

Examinator: *Maria Löfgren, Institutionen för biomedicin och
veterinär folkhälsvetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig institution: *Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap*

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Serienamn: *Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

Elektronisk publicering: *<http://stud.epsilon.slu.se>*

Nyckelord: *svår ekvin astma, RAO, mild eller måttlig ekvin astma, immunologi*

Key words: *severe equine asthma, RAO, mild or moderate equine asthma,
immunology*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Troliga etiologier.....	3
Patogenes	4
<i>T-celler</i>	4
<i>Neutrofiler</i>	4
<i>Mastceller och antikroppar</i>	5
<i>Makrofager</i>	6
<i>Övriga celler</i>	6
<i>Matrixmetalloproteinaser</i>	7
<i>Oxidant-antioxidantbalans</i>	7
<i>Fler förändringar och symptom</i>	8
Jämförelse med mild eller måttlig ekvin astma.....	9
Diskussion	9
Litteraturförteckning	12

SAMMANFATTNING

Svår ekvin astma (SEA) är en kronisk luftvägssjukdom och den vanligaste orsaken till kronisk hosta hos hästar i tempererat klimat. Oftast är hästarna som drabbas äldre än sju år och svårighetsgraden kan variera från träningsintolerans till allvarlig dyspné. Hästarna med SEA får ökad mängd mucus, luftvägsobstruktion och en hyperreaktivitet i luftvägarna. Detta ger kliniska symptom såsom ansträngd andning, hosta och träningsintolerans. Orsaken till SEA är exponering för främst organiskt damm vid installning, men det anses även finnas en genetisk bakgrund. Ett viktigt kännetecken för SEA är reversibiliteten, om allergenexponeringen upphör försvinner oftast de kliniska symptomen. Viss irreversibla förändringar kan ses efter långvarig eller upprepad allergenexponering.

SEA är en komplex sjukdom där många celler och mekanismer är inblandade och den exakta patogenesen är inte helt klarlagd. Neutrofiler är en av de viktigaste cellsorterna inblandade och i bronkoalveolär lavage-vätska används procenten neutrofiler för att ställa diagnos. Andra celler som är eller kan vara inblandade är T-hjälparceller, regulatoriska T-celler, makrofager, epitelceller i luftvägarna, mastceller, trombocyter och dessutom flertalet enzymer och antioxidanter. De förändringar som syns i luftvägarna vid SEA är mucusackumulering, obstruktion, bronkokonstriktion, bronkospasm, förtjockning av luftvägsväggen och glatt muskulaturhyperplasi samt infiltration av inflammatoriska celler.

Mild eller måttlig ekvin astma är en sjukdom som har likheter med SEA, men den ger en mildare inflammation och mildare symptom. De vanligaste symptomen för mild eller måttlig ekvin astma är hosta och försämrad prestation. Mild eller måttlig ekvin astma har liknande etiologi som SEA och överlappande cytologiska, kliniska och funktionella drag. Vid mild eller måttlig ekvin astma ses dock inte alltid en neutrophi i bronkoalveolär lavage-vätska utan det kan även förekomma en ökad mängd mastceller, eosinofiler eller en kombination av dessa. Den stora skillnaden mot SEA är att vid mild eller måttlig ekvin astma ses inte respiratorisk påverkan i vila.

Syftet med denna litteraturstudie är att sammanställa den litteratur som finns rörande SEA gällande troliga etiologier och immunologiska mekanismer samt jämföra med mild eller måttlig ekvin astma.

Slutsatsen är ett konstaterande att SEA är en komplex sjukdom där många motstridiga forskningsresultat finns, att tillräcklig power kan vara svårt att uppnå i forskning med hästar, att hästens roll i forskningen om human astma troligtvis kommer fortsätta och att det finns mycket kvar att forska på för framtida ökad förståelse.

SUMMARY

Severe equine asthma (SEA) is a chronic airway disease and the most common cause to chronic cough for horses in temperate climate. The horses that are affected are usually older than seven years and the severity of the symptoms can range from exercise intolerance to severe dyspnea. Horses with SEA develop increased amount of mucus, airway obstruction and hyperreactive airways. This leads to the clinic symptoms of strained breathing, cough and exercise intolerance. The cause of SEA is exposure to foremost organic dust when the horses are stabled, but a genetic aspect also exists. A vital characteristic of SEA is reversibility, the clinical symptoms usually disappear if the exposure to allergens cease. Some irreversible changes can be seen after long-lasting or frequent exposure.

SEA is a complex disease with many different cell types and mechanisms involved and the exact pathogenesis remain unclear. Neutrophils is one of the most important cell types involved and in bronchoalveolar lavage fluid the percent of neutrophils is used to diagnose SEA. Other cells that are or might be involved in the disease are T-helper cells, regulatory T-cells, macrophages, airway epithelium, mast cells, thrombocytes as well as several enzymes and antioxidants. The changes to the airway that occur are mucus accumulation, airway obstruction, bronchoconstriction, bronchospasm, thickening of the airway walls, smooth muscle hyperplasia and infiltration of inflammatory cells.

Mild or moderate equine asthma is a disease with resemblance to SEA, but the inflammation is milder as well as the clinical symptoms. The most common clinical symptoms of mild or moderate equine asthma is coughing and impaired performance. Mild or moderate equine asthma has a similar etiology as SEA and overlapping cytological, clinical and functional traits. In mild or moderate equine asthma a neutrophilia, eosinophilia, increased amount of mast cells or a combination of them can be seen in the bronchoalveolar lavage fluid. The major difference between SEA and mild or moderate equine asthma is that in mild or moderate equine asthma no respiratory impact exists in rest.

The aim of this literature study is to compile the literature regarding plausible etiologies and immunological mechanisms of SEA as well as compare these traits with mild or moderate equine asthma.

The conclusion is that SEA is a complex disease with several contradicting research results, that enough power can be difficult to achieve in research with horses, that the role of horses in research regarding humane asthma is continuing and that much more research remain before a increased understanding of SEA is in place.

INLEDNING

Svår ekvin astma (SEA) är i länder med tempererat klimat den vanligaste orsaken till kronisk hosta hos häst och sjukdomsfenotypen kan variera från träningsintolerans till allvarlig dyspné (Pirie, 2014). Oftast drabbas hästar äldre än sju år (Couetil *et al.*, 2016). SEA kännetecknas av ökad mängd mucus både vid återhämtning och försämring, luftvägsobstruktion samt en hyperreaktivitet i luftvägarna. De kliniska symptomen är ansträngd andning, hosta och träningsintolerans, även förändrat andningsmönster i varierande grad kan ses. Vid klinisk undersökning kan i vissa fall missljud i slutet av utandningen och i början av inandningen höras (Pirie, 2014). Hästarna kan även gå ner i vikt (Ivester *et al.*, 2014).

I allvarligare fall av SEA är anamnes och kliniska symptom bra hjälpmedel för att ställa diagnos. Andra diagnostiska metoder som kan användas är endoskopi, impulsoscillometri och lungsköljning där vätskan som fås kallas bronkoalveolär lavage-vätska (BALF) (Pirie, 2014). För SEA är gränsvärdet för neutrofil $\geq 25\%$ i BALF (Leclere *et al.*, 2011). Korrekt diagnostik kan dock vara svår då det finns stor risk att hästar med SEA i förbättring har samma symptom som hästar med mild eller måttlig ekvin astma (Wysocka & Kluciński, 2014).

De två termer som har varit mest använda och accepterade för inflammatoriska luftvägssjukdomar är ”recurrent airway obstruction” (RAO) och ”inflammatory airway disease” (IAD) (Bond *et al.*, 2018). Tidigare har även ”chronic obstructive pulmonary disease” (COPD) och ”heaves” använts (Lavoie, 2015). Många anser dock att termen ekvin astma, med indelning i mild, måttlig och svår, bör användas i framtiden (Lavoie, 2015; Bond *et al.*, 2018). Där svår ekvin astma motsvarar RAO och mild eller måttlig ekvin astma motsvarar IAD (Couetil *et al.*, 2016). På Sveriges lantbruksuniversitet används främst ekvin astma (Hillström, 2019). Därför kommer ekvin astma användas i detta arbete.

Syftet med denna litteraturstudie är att sammanställa den litteratur som finns gällande troliga etiologier och immunologiska mekanismer vid SEA samt jämföra med mild eller måttlig ekvin astma.

MATERIAL OCH METODER

För litteratursökningen användes sökorden (COPD OR RAO OR IAD OR heaves OR asthma) AND (equine OR horse*) i databaserna Web of Science, Scopus och PubMed. I PubMed användes horse OR horses istället för trunkering.

LITTERATURÖVERSIKT

Troliga etiologier

SEA är en kronisk luftvägssjukdom (Leclere *et al.*, 2011) som anses ha både genetisk och miljömässig bakgrund. Miljömässigt är exponering för organiskt damm centralt för insjuknandet i SEA, där installning gör att hästarna utsätts för damm innehållande bland annat bakteriella endotoxiner, proteaser, mikrobiella toxiner, kvalster, växtpartiklar och oorganiskt damm samt ibland även ammoniak. Alla delar bidrar troligtvis i olika utsträckning till insjuknandet. Det är sedan länge även känt att exponering för möjligt hö har ett samband med

SEA. Eftersom hästar med SEA har hyperreaktiva luftvägar kan även annat ge symptom; såsom partiklar, skadliga gaser och kall eller torr luft (Pirie, 2014). Varm och fuktig luft samt pollen kan också påverka lungfunktionen negativt (Michela Bullone *et al.*, 2016). Sjukdomen är till stor del reversibel och klinisk förbättring fås oftast genom byte till en miljö med låga dammhalter, men tecken på vissa irreversibla förändringar i lungorna efter längre eller upprepad dammexponering eller lågradig inflammation finns kvar även i en miljö med låga dammhalter (Pirie, 2014). Reversibiliteten är en viktig egenskap hos SEA och används ofta för att konfirmera diagnosen (Ivester *et al.*, 2014).

Patogenes

Patogenesen för SEA är en typ av hypersensitivitet som är komplex och inte helt förstådd (Pirie, 2014).

T-celler

Det som främst karakteriserar SEA är ett försenat svar med rekrytering av neutrofiler till luftvägarna och ökat antal CD4+ T-celler i BALF. Om SEA ger en T-hjälparcell 1- (Th1) eller T-hjälparcell 2-profil (Th2) finns det motstridiga uppgifter om. I en översiktsartikel visas att det finns studier som har visat på ökat uttryck av interleukin- (IL)4 och IL-5 och minskat uttryck av interferon (IFN) γ vilket indikerar ett Th2-svar. Andra studier har dock visat på ökat uttryck av IFN γ , men inte av IL-4 och IL-13. Det finns dessutom studier som visat på kombinerade svar som karakteriseras av ökat uttryck av IL-4, IL-13 och IFN γ och i några studier stämmer cytokinprofilen varken med Th1 eller Th2. Ingen forskning har ännu kunnat förklara varför olika studier fått så olika resultat, men två hypoteser som anses rimliga är antingen ett svar specifikt för hästens luftvägar som inte passar in i någon av de kända klasserna eller att varierande immunologiska mekanismer ger olika svar. Trots stor osäkerhet rörande T-cellernas mekanismer är det tydligt att de är viktiga i SEA (Pirie, 2014). Det finns forskare som menar att hästar med SEA producerar cytokiner för både Th1- och Th2-svar, men att det beror på stadiet i sjukdomen och när prover tas vilket resultat som fås (Uberti & Moran, 2018).

Regulatoriska T-celler (Treg) är delaktiga i att dämpa och reglera immunsvaret. Treg induceras av IL-10 och "transforming growth factor" (TGF) β som produceras av lokala dendritiska celler efter aktivering via "toll like receptor-2". Vid SEA ses efter antigenexponering en ökning av Treg i luftvägarna. Detta kan antingen bero på en aktiv rekrytering genom kemokintuttryck eller bildandet av inducerade Treg från naiva T-celler (Henríquez *et al.*, 2014).

Neutrofiler

Cirkulerande neutrofiler ökar i antal, (Leclere *et al.*, 2011) aktiveras och rekryteras snabbt till lumen i luftvägarna efter allergenexponering hos SEA-hästar. Det finns dock få bevis för att de skulle vara involverade i de strukturskador som sker i lungorna som är ett kännetecken för SEA (Pirie, 2014). T-celler bidrar till rekryteringen av neutrofiler till luftvägarna. Rekryteringen har även ansetts härstamma från ökad utsöndring av IL-8 från alveolarmakrofagerna, men nyare forskning indikerar att T-cellerna och epitelcellerna spelar en viktigare roll för neutrofilrekryteringen. En förklaring till varför just neutrofilerna rekryteras kan vara att hos

hästar med SEA ökar det organiska dammet uttrycket av IL-17 från T-cellerna i BALF som kan favorisera neutrofilrekryteringen, men inte hos friska hästar (Pirie, 2014). IL-17 som produceras av flera celler inducerar proinflammatoriska cytokiner och kemokiner. IL-17-ökningen påverkar "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells" (NF- κ B) och en nedreglering av generna för IL-4 i mediastinala lymfknutor vilket bevisar IL-17s roll i de kroniska stadierna av SEA (Uberti & Moran, 2018). Flera dagar innan det ökade genuttrycket av IL-17 sker dock en ökning av uttrycket av IL-8 hos epitelcellerna och BALF-cellerna. IL-4 har upptäckts inducera uttrycket av kemokiner för neutrofiler hos endotelcellerna i lungorna (Pirie, 2014). Andra forskare har visat att uttrycket av IL-1 β från alla BALF-celler eller alveolarmakrofager korrelerar med graden av neutrofilin (Leclere *et al.*, 2011). Friska hästar får också en rekrytering av neutrofiler till luftvägarna vid exponering för möjligt hö och damm, men de utvecklar inga kliniska symptom, försämrad lungfunktion eller förändrade blodgaser och neutrofilin är mycket lägre än den hos hästar med SEA (Ivester *et al.*, 2014). Dessutom försvinner neutrofilin hos friska hästar trots fortsatt exponering (Leclere *et al.*, 2011).

Neutrofila extracellulära fällor (NETs) är en typ av inducerad celldöd som är framträdande i BALF hos hästar med SEA (Tessier *et al.*, 2017). Andra reaktioner som aktiverade neutrofiler kan genomföra är exempelvis bildandet av reaktiva syreradikaler (ROS) och degranulering (Uberti & Moran, 2018). NETs kan ge lungskador och inducera celldöd hos epitel- och endotelceller. IL-8 kan inducera bildandet och frisättningen av NETs. ROS kan bidra till ökad inflammation, apoptos eller nekros och kan därmed vara delaktigt i proliferation av glatt muskulatur eller mucusackumulation. ROS kan också aktivera transkriptionsfaktorer vilket ger ökat uttryck av flera proinflammatoriska cytokiner. NETs anses vara beroende av ROS (Uberti & Moran, 2018). Neutrofilerna hos hästar med SEA är dessutom tyngre, har försenad apoptos, frisätter bland annat elastas, oxidmetaboliter och troligen matrixmetalloproteinaser (MMP)-9, har ökat uttryck av bland annat IL-1 β , IL-8, IL-17, tumörnekrosfaktor (TNF) α och ökad aktivitet av NF- κ B. Frisättning av IL-1 β och TNF α bibehåller troligen inflammationen genom autokrina- och parakrina effekter (Leclere *et al.*, 2011).

Mastceller och antikroppar

Cirkulerande immunkomplex bildas av immunförsvaret mot antigen. Hos människor är cirkulerande immunkomplex vanliga vid flera olika systemiska sjukdomar såsom autoimmuna sjukdomar, allergier och infektioner. Hos hästar ses efter allergenexponering cirkulerande immunkomplex både hos friska och sjuka individer, men hästar med SEA har högre koncentration av cirkulerande immunkomplex i blodet (Niedzwiedz *et al.*, 2014).

Mastcellerna och immunoglobulin E (IgE) har en oklar roll. Det finns studier som visar på ökad mängd IgE i blodet hos hästar med SEA jämfört med friska kontroller samt studier som inte har visat några signifikanta skillnader mellan grupperna. Hästar med SEA har inte en ökad mängd celler med IgE bundet till sig i lungvävnaden eller BALF, men ökat antal kymaspositiva mastceller i bronkialväggarna. Trots det visar hästarna inte upp ett snabbt svar på allergenexponering (Pirie, 2014). Det har däremot föreslagits att IgE, som ger en omedelbar hypersensitivitet, kan ha en roll i utvecklandet av SEA (Moran *et al.*, 2012). En annan studie visade på att ett tidigt svar med histaminfrisättning och bronkokonstriktion endast skedde hos friska hästar och att det kan indikera att ett tidigt svar minskar mängden antigen och verkar

skyddande (Leclere *et al.*, 2011). Signifikanta skillnader i IgE-koncentrationerna mot kvalster mellan hästar med SEA och friska kontroller hittades i en studie, med högre koncentrationer hos hästar med SEA (Niedzwiedz *et al.*, 2015). Dessa motstridiga resultat skulle dock kunna förklaras av den genetiska bakgrunden då det visats att IgE-koncentrationerna mot en specifik svamp var högre hos avkommorna till en av två SEA-påverkade hingstar (Pirie, 2014). En annan tänkbar orsak till de varierande resultaten är olika testmetoder i studierna (Niedzwiedz *et al.*, 2015).

Makrofager

Alveolarmakrofager är en annan celltyp vars roll i SEA inte är helt klarlagd. Det finns studier som visar att de är verksamma i patogenesen, men också studier som inte kan visa någon skillnad mellan hästar med SEA och friska kontroller (Pirie, 2014). En minskning av makrofagerna i BALF hos både SEA-hästar och friska hästar sågs efter lipopolysackarid (LPS)-exponering i en studie (Ivester *et al.*, 2014). Celldensiteten hos makrofagerna i BALF hos SEA-hästar var ökad jämfört med kontroller, vilket indikerar en aktivering av cellerna efter dammexponering. Båda gruppernas alveolarmakrofager hade liknande uppreglering av IL-1 β , TNF α , IL-8 och makrofaginflammatoriskt protein-2 enligt en studie medan en annan studie menar att uttrycket av dessa samt IL-17 är högre hos hästar med SEA (Leclere *et al.*, 2011). En studie där inte endast LPS ingick i allergenexponeringen visade att alveolarmakrofagerna fick en högre TNF α -produktion än när de endast exponerades för LPS. Partiklar som fagocyterats av alveolarmakrofagerna kan dock fortsatt ha en biologisk effekt genom att aktivera immunsystemets signalsystem (Ivester *et al.*, 2014).

Övriga celler

Eosinofiler som är centrala i allergiska sjukdomar har tidigare föreslagits vara vanligt förekommande i lungvävnaden hos hästar med SEA. En senare studie visade dock att eosinofiler sällan hittades i lungvävnaden hos hästar med SEA, men ofta hos friska hästar (Dubuc & Lavoie, 2014).

Även luftvägarnas epitelcellers roll har debatterats. De flesta studierna har inte visat någon skillnad i uttrycket av inflammatoriska cytokiner från epitelcellerna vid försämring eller återhämtning av SEA. Vissa studier har dock visat ett ökat uttryck av IL-8 vid sjukdomsförsämring eller en tidig, övergående ökning av kemokinligand-2 efter allergenexponering vid SEA (Pirie, 2014). En studie har visat på ett överuttryck av makrofaginflammatoriskt protein-2 hos hästar med SEA med symptom jämfört med kontroller. Dessutom sågs ett ökat IL-8-uttryck hos hästar med SEA efter 14 dagar vid försämring. En annan studie såg en ökning av NF- κ B som korrelerade med försämrad lungfunktion och ökat uttryck av intracellulär adhesionsmolekyl (ICAM)-1 i epitelcellerna. Genom uttryck av bland annat ICAM-1 kan epitelcellerna vara delaktiga i neutrofilernas migration (Leclere *et al.*, 2011).

En ökad mängd trombocyter har visats i BALF från hästar med SEA. Aktiva trombocyter frigör flera tillväxtfaktorer som inducerar hypertrofi och hyperplasi hos epitelet i luftvägarna samt proliferation av den glatta muskulaturen. Detta kan bidra till bronkokonstriktion. Dessutom agerar trombocyter som inflammatoriska celler genom flera processer; exempelvis kemotaxi,

frisättning av olika mediatorer, fagocytos och aktivering av mediatorer från andra celler. När trombocyter aktiveras ökar uttrycket av flera cellytemarkörer som spelar en avgörande roll i adhesion, aggregation, bildandet av leukocyt-trombocytansamlingar och leukocytrekrytering. I blodet ses dock en minskning av trombocytantalet hos hästar med SEA jämfört med friska hästar. Trombocyterna uppvisar däremot ökad medelvolym och proportion av stora celler. Dessa förändringar kan vara en kompensatorisk mekanism då tidiga resultat visar att större trombocyter innehåller mer sekretoriska granula och bildar mer tromboxan B₂ per cytoplasmavolym vilket gör dem mer reaktiva. En undersökning av uttrycket av cellytemarkörer visade att en markör ökade hos sjuka hästar, medan en annan, P-selektin, minskade hos de samma. En möjlig förklaring till detta skulle kunna vara att P-selektin frigörs helt från cellerna och verkar fritt i blodet, vilket har visats hos människa (Iwaszko-Simonik *et al.*, 2015).

Matrixmetalloproteinaser

För att vävnaden ska vara stabil krävs en balans mellan nedbrytning och nybildning av det extracellulära matrixet. För nedbrytning är MMP det viktigaste proteolytiska enzymet och MMP deltar även i reparationsmekanismer, cellmigration och inflammation. Vid inflammation reglerar MMP fysiologiska barriärer, cytokiner och bildar en kemokingradient som reglerar leukocytackumuleringen i den inflammerade vävnaden (Barton & Gehlen, 2016). Flera proteolytiska enzymer finns i luftvägarna, men de som anses mest intressanta är MMP där MMP-1, MMP-8, MMP-9 och MMP-13 är förhöjda i luftvägarna hos hästar i försämring. MMP härstammar troligen från neutrofiler, lymfocyter, epitelceller och/eller makrofager (Pirie, 2014). Naturliga inhibitorer mot MMP i vävnaden kallas för "tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMP) och de reglerar omsättningen av extracellulärt matrix, vävnadsremodelleringen och cellernas beteende. Både koncentrationen av TIMP-1 och TIMP-2 var ökad i alla stadier av SEA jämfört med kontroller (Barton & Gehlen, 2016).

Oxidant-antioxidantbalans

Produktionen av ROS ökar vid akut eller kronisk inflammation i en hastighet som gör att det endogena försvarssystemet inte har tillräcklig kapacitet att hantera det. Lokal oxidativ stress i lungorna induceras av bland annat inflammatoriska cytokiner. Den viktigaste delen i oxidantförsvaret är enzymtriaden, i vilken superoxiddismutas, glutationperoxidase och katalas ingår, som hindrar bildandet av ROS och reaktioner med ROS. En minskad aktivitet hos dessa antioxidantzymer har setts hos hästar med SEA i försämring, men motsatta resultat har även setts i studier. Glutation är en antioxidant och koncentrationen av både den, dess metabolit och glutationsredoxkvoten är oförändrad mellan kontroller och hästar med SEA i blodet. I BALF hos hästar i försämring är dock nivåerna ökade och en korrelation har setts med neutrofilantalet. Dessutom kan en högre koncentration av antioxidanten urinsyra ses efter träning hos hästar med SEA jämfört med friska kontroller. Antioxidanten askorbinsyra har lägre nivåer i blodet och BALF hos hästar med SEA. Mängden neutrofiler i BALF är dessutom korrelerade med askorbinsyranivåerna (Borowicz *et al.*, 2016). Glutationperoxidase och superoxiddismutas har också ökad aktivitet hos hästar med SEA jämfört med friska hästar (Niedzwiedz & Jaworski, 2014).

Fler förändringar och symptom

Studier har även gjorts på systematiska förändringar (Pirie, 2014). En ökad mängd funktionellt fibrinogen och leukocyter har setts i serum vid försämring av SEA jämfört med friska hästar. I samma studie sågs även hyperkoagulering då maximala styrkan som koagulationen hade var högre hos hästar både i försämring och återhämtning av SEA jämfört med friska hästar (Leclere *et al.*, 2015). När liknande markörer undersöktes i BALF sågs inga signifikanta skillnader, men en trend mot att hästar med SEA hade högre koncentrationer fibrinogen än friska kontroller. Dessutom sågs ett positivt samband mellan koncentrationen fibrinogen och procenten neutrofiler i BALF (Barton *et al.*, 2017). Fibrin bildas av fibrinogen och fibrin bidrar till fibros, inflammation, migration av inflammatoriska celler, adhesion och proliferation av fibroblaster som ger en kollagenproduktion. Fibrin kan reglera inflammationssvaret genom att binda till monocyter och aktivera transkriptionsfaktorer, bland annat NF- κ B, som ökar produktionen av proinflammatoriska cytokiner. Fibrin och dess derivat inhiberar även surfaktant vilket minskar ytspänningen i alveolerna och minskar gasutbytet (Barton & Gehlen, 2016).

Ökade koncentrationer av haptoglobin i serum har setts både vid försämring och återhämtning. Tidigt vid försämring av SEA har även ökade koncentrationer av serumamyloid A setts. En ökning av haptoglobin sågs även hos de friska kontrollhästar tidigt efter höexponering, men nivåerna återgick sedan till sin basnivå. Detta kan indikera att en del i SEA är ett defekt feedback-system för inflammation. Serumamyloid A har visats kunna gynna neutrofil i luftvägarna, aktivera neutrofiler och retroaktivt degraderas av neutrofilernas granula (Lavoie-Lamoureux *et al.*, 2012). En annan studie såg ökat uttryck av TNF α i serum och från basalleukocyterna samt ett överuttryck av proinflammatoriska cytokiner från leukocyterna i perifera blodet (Pirie, 2014). I BALF var mängden TNF α lägre hos hästar i försämring av SEA än hos friska hästar. Inga skillnader uppmättes för hästar i återhämtning. Studier som inte har visat några skillnader mellan sjuka hästar och friska hästar finns också. På grund av att studierna kan ha använt hästar med olika sjukdomsfenotyp, olika typer av prov och olika metodologi är det inte oväntat med varierande slutsatser gällande TNF α vid SEA (Montgomery *et al.*, 2018). Det finns också rapporter om att koncentrationerna av endotelin och tromboxan A2 i blodet ökar vid kliniska symptom (Leclere *et al.*, 2011).

Alla tidigare nämnda reaktioner ger en avsmalning av luftvägarna genom obstruktion med mucus, bronkospasm, förtjockning av luftvägsväggen, hyperplasi av glatt muskulatur och infiltration av inflammatoriska celler, främst lymfocyter, peribronkiolärt (Pirie, 2014). Infiltration har även setts bronkiolärt och med plasmaceller (Leclere *et al.*, 2011). I de stora luftvägarna förloras de cilierade cellerna och ersätts av odifferentierade celler och epitelet blir hyperplastiskt. Svällande emfysem kan även uppstå. Mucusackumulering är ett kännetecken för SEA och beror på ökad viskositet hos mucus, ökat antal mucusproducerande celler och ökat genuttryck för mucus. Till bronkokonstriktionen tros endotelin kunna bidra då ökade mängder har hittats i BALF hos hästar med SEA (Pirie, 2014). Muskeltonus i luftvägarna kontrolleras av det autonoma nervsystemet och vid SEA har flera förändringar i receptorer och mediatorer setts som kan förklara bronkospasmen. Det finns också resultat som indikerar att kolinerga antiinflammatoriska signalvägen kan modulera inflammation och remodelering vid SEA (Leclere *et al.*, 2011). Det är mucusackumuleringen, förtjockningen av luftvägsväggen och

bronkokonstriktionen i de perifera luftvägarna som ger andningssvårigheterna hos hästar med SEA (Ivester *et al.*, 2014). Mängden kollagen i lamina propria är ökad hos hästar med SEA jämfört med kontroller. Distributionen varierar däremot inte. Mängden elastiska fibrer i lamina propria är också ökad hos hästar med SEA (Setlakwe *et al.*, 2014). Den obstruktion som tidigare nämnts förknippas även med reversibelt högt tryck och ökad diameter i lungartärerna och onormal rörelse i septum mellan hjärtkamrarna. Hypertensionen ger funktionsförändringar i höger kammare. Vissa förändringar ses även vid återhämtning vilket indikerar persistent hypertrofi (Decloedt *et al.*, 2017).

Lesionerna hos hästar med SEA i försämring är allvarligare än för hästar i återhämtning och friska hästar. Neutrofilin i BALF förknippades med graden av inflammation i bronker och bronkioler samt med svårighetsgraden hos lesionerna, men vid över 20 % neutrofiler var lesionerna mildare vid försämring (Bullone *et al.*, 2018).

Jämförelse med mild eller måttlig ekvin astma

Mild eller måttlig ekvin astma är en inflammatorisk, icke-septisk sjukdom i hästens respirationssystem. Etiologin är liknande den för SEA (Mazan, 2018). Mild eller måttlig ekvin astma ger en mildare inflammation och ger endast begränsad påverkan på lungfunktionen (Couetil *et al.*, 2016). Trots det kan negativ påverkan på hästens prestation vid hård träning uppstå för att gasutbytet försämras (Ivester *et al.*, 2014). Mild eller måttlig ekvin astma kan till skillnad från SEA drabba hästar i alla åldrar. Mild eller måttlig ekvin astma har inga symptom på dyspné och ackumulation av mucus i luftvägarna är inte alltid närvarande. Huvudsakliga skillnaden/kriteriet mellan SEA och mild eller måttlig ekvin astma är förekomsten, eller frånvaron, av respiratorisk påverkan i vila. Vid SEA ses respiratorisk påverkan i vila. Hos hästar med sjukdomarna sågs en förtjockning av septum i trachea, där förtjockningen var kraftigare hos hästar med SEA än hos hästar med mild eller måttlig ekvin astma (Wysocka & Kluciński, 2014). De kliniska symptomen är ofta svårupptäckta. De vanligaste symptom som ägaren upptäcker är hosta och försämrad prestation (Mazan, 2018). Varken SEA eller mild eller måttlig ekvin astma har predilektion för kön eller ras (Wysocka & Kluciński, 2014) och de har överlappande kliniska, cytologiska och funktionella drag. Mild eller måttlig ekvin astma ger oftast en mild till måttlig neutrofilin i BALF, men fenotypen kan variera. Unga hästar uppvisar ofta ökat antal eosinofiler och mastceller i BALF, vilket indikerar hypersensitivitet. De olika fenotyperna har olika cytokinmönster (Ivester *et al.*, 2014). Hästar med mild eller måttlig ekvin astma har en ökad risk att drabbas av SEA, men de flesta hästar med mild eller måttlig ekvin astma blir friska (Couetil *et al.*, 2016). Diagnosen mild eller måttlig ekvin astma ställs med hjälp av samma metoder som för SEA, men de kliniska symptomen är ofta subtila och kan vara svåra att skilja från en primär infektion (Ivester *et al.*, 2014). För BALF går gränsen för diagnosen mild eller måttlig ekvin astma vid neutrofilin >5 %, eosinofili >0,5 %, mastcellstal 2 % eller kombinationer av dessa (Mazan, 2018). Vissa har satt eosinofilgränsen till >1 % (Dauvillier *et al.*, 2018; Ivester *et al.*, 2018).

DISKUSSION

Det första jag upplevde under arbetets gång var att trots flertalet studier och mycket forskning är kunskapen gällande exakta mekanismerna för SEA inte fullständig; och ännu mindre kunskap

finns om mild eller måttlig ekvin astma. Jag tycker detta visar på komplexiteten hos sjukdomarna. Trots den komplexa naturen anser jag att det i inledningen uppställda syftet har blivit uppfyllt.

Troliga etiologier för SEA är den exponering för damm som hästarna utsätts för vid installning. Där beståndsdelarna i dammet verkar tillsammans i olika utsträckning för insjuknandet. Ett miljöbyte ger ofta klinisk förbättring, men låggradig inflammation kan finnas kvar i en miljö med låga halter damm (Pirie, 2014). Sjukdomen orsakas av installningen, men genom att anpassa inhysningen av hästar för att minska dammexponeringen tror jag vi skulle kunna förhindra att hästar drabbas av SEA.

Delar i immunsvaret som är specifikt för häst och genetiska variationer är troliga anledningar till motstridiga resultat (Pirie, 2014), men även olika testmetoder kan orsaka varierande resultat (Niedzwiedz *et al.*, 2015). Av dessa tror jag att genetiken och de olika testmetoderna framförallt är orsak till de varierande resultaten gällande immunförsvarets mekanismer. Flera studier hade dessutom få antal hästar som ingick. Några exempel är: 9 hästar (Henríquez *et al.*, 2014), 14 hästar (Niedzwiedz *et al.*, 2014, 2015; Niedzwiedz & Jaworski, 2014), 12 hästar (Dubuc & Lavoie, 2014) och 11 hästar (Setlakwe *et al.*, 2014). Det låga antalet hästar ger dålig power för studierna vilket skulle kunna var en annan orsak till motstridiga resultat.

Mild eller måttlig ekvin astma har liknande etiologi som SEA (Mazan, 2018), men en mildare inflammation och mindre lungpåverkan (Couetil *et al.*, 2016). Främsta skillnaden jämfört med SEA är att ingen respiratorisk påverkan ses vid vila (Wysocka & Kluciński, 2014). SEA och mild eller måttlig ekvin astma har flera överlappande egenskaper (Ivester *et al.*, 2014). Den nyare terminologin ska dock inte tolkas som att det är en sjukdom med kontinuerliga, sammanhängande stadier (Couetil *et al.*, 2016). En ökad risk att utveckla SEA har setts hos hästar med mild eller måttlig ekvin astma, men de flesta hästar med mild eller måttlig ekvin astma verkar bli friska. Det är därför viktigt att inte använda astma som en generell term för båda sjukdomarna utan att skilja på den milda eller måttliga och den svåra (Barton & Gehlen, 2016).

Då SEA är naturligt förekommande, durationen är lång och hästar lever länge är SEA den djurmodell som mest liknar human astma. Hästens lungor liknar också människan i många anatomiska avseenden (Leclere *et al.*, 2011) och hästar är stora vilket lämpar sig för upprepade provtagningar (Bullone & Lavoie, 2015). Nackdelen med SEA som modell är att hästar ofta har en heterogen genetisk bakgrund vilket gör att tillräcklig hög power är svår att nå i studierna samt att hästars livslängd gör longitudinella studier svårare. Dessutom kan vissa arts specifika skillnader göra extrapolering till människa svår; exempelvis olika receptoruttryck, metabolism och immunrelaterade mediatorer (Leclere *et al.*, 2011). Ytterligare en nackdel är att hästar är dyra att inhysa. Eftersom human astma är en heterogen sjukdom är inte SEA en bra modell för alla typer av astma. De typer som SEA tros vara en bra modell för är icke allergisk astma, svår astma och astma som utvecklas sent (Bullone & Lavoie, 2015). Jag anser att detta är ett intressant samband att forska mer på i framtiden och jag tror att fortsatt forskning kan gynna både veterinärmedicinen och humanmedicinen.

En studie på multipel hypersensitivitet visade ett signifikant samband mellan SEA och insektsbettshypersensibilitet (Kehrli *et al.*, 2015). Detta är enligt mig en intressant aspekt att forska mer på. Jag tror att detta skulle kunna klargöra delar av mekanismerna i immunförsvaret och i förlängningen ge upphov till nya behandlingar. En annan möjlig fördel av ytterligare forskning som jag kan se är att med mer kunskap skulle sjukdom eventuellt kunna förhindras. En ökad förståelse för sambanden mellan SEA och andra hypersensitiviteter skulle förhoppningsvis kunna identifiera individer som riskerar sjukdom och genom förändringar i inhysning eller behandling förhindra sjukdom eller symptom.

Det gjordes en studie där resultatet visade att äldre hästar bland annat hade lägre nivåer av cirkulerande Tregs och B-celler och avtrubbad proliferation av naiva lymfocyter. Aktiverade mononukleära celler i blodet bildar dock större mängd TNF α och IFN γ hos äldre hästar jämfört med yngre. Detta indikerar ett byte från antiinflammatorisk till proinflammatorisk aktion med åldern. Andelen lymfocyter i BALF som producerar IFN γ ökar också med åldern. Oxidativa DNA-skador som är endogent orsakade är vanligare i mononukleära celler i perifera blodet hos äldre hästar, en ökning ses också hos hästar med SEA i återhämtning. Eftersom SEA ses hos vuxna och äldre hästar (Bullone & Lavoie, 2017) är det enligt mig intressant att utforska eventuella samband med immunförsvarets åldrande och SEA. Detta då jag tror att en ökad förståelse skulle kunna gynna både behandlingen av SEA och andra förändringar i immunförsvaret som ses hos äldre individer.

Sammanfattningsvis konstateras att SEA är en komplex sjukdom där mycket forskning med motstridiga resultat finns, att ett av problemen med hästar i forskning verkar vara att få tillräcklig power, att hästen även fortsättningsvis kan komma att spela en roll i forskningen om human astma och att det finns flera aspekter i SEA där mer forskning kan ge ökad förståelse för sjukdomen.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Barton, A. K. & Gehlen, H. (2016). Pulmonary Remodeling in Equine Asthma: What Do We Know about Mediators of Inflammation in the Horse? *Mediators of Inflammation*.
- Barton, A. K., Wirth, C., Bondzio, A., Einspamer, R. & Gehlen, H. (2017). Are pulmonary hemostasis and fibrinolysis out of balance in equine chronic pneumopathies? *Journal of Veterinary Science*, 18(3), ss 349–357.
- Bond, S., Leguillette, R., Richard, E. A., Couetil, L., Lavoie, J.-P., Martin, J. G. & Pirie, R. S. (2018). Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), ss 2088–2098.
- Borowicz, H., Kubiak, K., Nikolovski, G. & Niedzwiedz, A. (2016). Impact of Recurrent Airway Obstruction (rao) on Selected Antioxidants in Horses. *Macedonian Veterinary Review*, 39(1), ss 5–14.
- Bullone, M., Joubert, P., Gagne, A., Lavoie, J.-P. & Helie, P. (2018). Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Veterinary Journal*, 50(5), ss 609–615.
- Bullone, M. & Lavoie, J.-P. (2015). Asthma ”of horses and men”-How can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Molecular Immunology*, 66(1), ss 97–105.
- Bullone, M. & Lavoie, J.-P. (2017). The Contribution of Oxidative Stress and Inflamm-Aging in Human and Equine Asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).
- Couetil, L. L., Cardwell, J. M., Gerber, V., Lavoie, J.-P., Leguillette, R. & Richard, E. A. (2016). Inflammatory Airway Disease of Horses Revised Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), ss 503–515.
- Dauvillier, J., Ter Woort, F. & van Erck-Westergren, E. (2018). Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *Journal of veterinary internal medicine*.
- Decloedt, A., Borowicz, H., Slowikowska, M., Chiers, K., van Loon, G. & Niedzwiedz, A. (2017). Right ventricular function during acute exacerbation of severe equine asthma. *Equine Veterinary Journal*, 49(5), ss 603–608.
- Dubuc, J. & Lavoie, J.-P. (2014). Airway wall eosinophilia is not a feature of equine heaves. *Veterinary Journal*, 202(2), ss 387–389.
- Henríquez, C., Perez, B., Morales, N., Sarmiento, J., Carrasco, C., Morán, G. & Folch, H. (2014). Participation of T regulatory cells in equine recurrent airway obstruction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158(3–4), ss 128–134.
- Ivester, K. M., Couëttil, L. L. & Moore, G. E. (2018). An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5), ss 1754–1762.
- Ivester, K. M., Couëttil, L. L. & Zimmerman, N. J. (2014). Investigating the Link between Particulate Exposure and Airway Inflammation in the Horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(6), ss 1653–1665.
- Iwaszko-Simonik, A., Niedzwiedz, A., Graczyk, S., Slowikowska, M. & Pliszczak-Krol, A. (2015). Expression of surface platelet receptors (CD62P and CD41/61) in horses with recurrent airway obstruction (RAO). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164(1–2), ss 87–92.
- Kehrli, D., Jandova, V., Fey, K., Jahn, P. & Gerber, V. (2015). Multiple hypersensitivities including recurrent airway obstruction, insect bite hypersensitivity, and urticaria in 2 warmblood horse populations. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1), ss 320–326.

- Lavoie, J.-P. (2015). Is the time primed for equine asthma? *Equine Veterinary Education*, 27(5), ss 225–226.
- Lavoie-Lamoureux, A., Leclere, M., Lemos, K., Wagner, B. & Lavoie, J.-P. (2012). Markers of Systemic Inflammation in Horses with Heaves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), ss 1419–1426.
- Leclere, M., Bedard, C., Cortes-Dubly, M.-L. & Lavoie, J.-P. (2015). Blood hypercoagulability and systemic inflammation in horses with heaves. *Veterinary Journal*, 206(1), ss 105–107.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A. & Lavoie, J.-P. (2011). Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 16(7), ss 1027–1046.
- Mazan, M. R. (2018). Lower Airway Disease in the Athletic Horse. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 34(2), ss 443–460.
- Michela Bullone, Murcia, R. Y. & Lavoie, J. P. (2016). Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Veterinary Journal*, 48(4), ss 479–484.
- Montgomery, J. B., Husulak, M. L., Kosolofski, H., Dos Santos, S., Burgess, H. & Meachem, M. D. (2018). Tumor necrosis factor-alpha protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with severe equine asthma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 202, ss 70–73.
- Moran, G., Folch, H., Henriquez, C., Orloff, A. & Barria, M. (2012). Reaginic antibodies from horses with Recurrent Airway Obstruction produce mast cell stimulation. *Veterinary Research Communications*, 36(4), ss 251–258.
- Niedzwiedz, A. & Jaworski, Z. (2014). Oxidant-Antioxidant Status in the Blood of Horses with Symptomatic Recurrent Airway Obstruction (RAO). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(6), ss 1845–1852.
- Niedzwiedz, A., Jaworski, Z. & Kubiak, K. (2014). Circulating immune complexes and markers of systemic inflammation in RAO-affected horses. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(4), ss 697–702.
- Niedzwiedz, A., Jaworski, Z. & Kubiak, K. (2015). Serum concentrations of allergen-specific IgE in horses with equine recurrent airway obstruction and healthy controls assessed by ELISA. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(3), ss 391–396.
- Pirie, R. S. (2014). Recurrent airway obstruction: A review. *Equine Veterinary Journal*, 46(3), ss 276–288.
- Setlakwe, E. L., Lemos, K. R., Lavoie-Lamoureux, A., Duguay, J.-D. & Lavoie, J.-P. (2014). Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(3), ss 252–260.
- Tessier, L., Cote, O., Clark, M. E., Viel, L., Diaz-Mendez, A., Anders, S. & Bienzle, D. (2017). Impaired response of the bronchial epithelium to inflammation characterizes severe equine asthma. *Bmc Genomics*, 18.
- Uberti, B. & Moran, G. (2018). Role of neutrophils in equine asthma. *Animal Health Research Reviews*, 19(1), ss 65–73.
- Wysocka, B. & Kluciński, W. (2014). Usefulness of the assessment of discharge accumulation in the lower airways and tracheal septum thickening in the differential diagnosis of recurrent airway obstruction (RAO) and inflammatory airway disease (IAD) in the horse. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(2), ss 247–253.

Icke publicerat material

Anna Hillström, klinikveterinär, Sveriges lantbruksuniversitet, 2019-03-11