



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Hur kan extracellulära matrix proteiner i ledbrosk fungera som biomarkörer vid osteoartrit hos häst

**How can extra cellular matrix proteins in hyaline cartilage work
as a biomarker for osteoarthritis in equines**

Daniel Svedare

*Uppsala
2019*

Hur kan extracellulära matrix proteiner i ledbrosk fungera som biomarkörer vid osteoartrit hos häst

How can extra cellular matrix proteins in hyaline cartilage work as a biomarker for osteoarthritis in equines

Daniel Svedare

Handledare: *Eva Skiöldebrand, Sveriges lantbruksuniversitet
SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap, enheten för patologi*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet,
institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

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

Nyckelord: Häst, osteoartrit, biomarker, ledbrosk, extracellulärt matrix

Key words: Horse, equine, osteoarthritis, biomarker, cartilage, extracellular matrix

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturöversikt.....	4
Ledens anatomi och fysiologi	4
<i>Kondrocyter</i>	4
<i>Kollagen</i>	4
<i>Proteoglykaner</i>	4
<i>Icke kollagena proteiner</i>	5
<i>Ledbrosk</i>	6
<i>Subkondralt ben</i>	7
<i>Ledvätska</i>	7
<i>Ledkapsel</i>	7
Osteoartrit.....	7
Gruppering av biomarkörer för osteoartrit	8
<i>In vivo</i> samt <i>in vitro</i> modeller på häst för att studera OA	9
ECM biomarkörer för osteoartrit	10
<i>Typ II kollagen</i>	10
<i>Aggrekan</i>	12
<i>COMP</i>	14
Diskussion.....	15
Konklusion	16
Litteraturförteckning	17
Bildförteckning	19

SAMMANFATTNING

Osteoartrit är en inflammatorisk progressiv sjukdom som oftast diagnostiseras i ett alldeles för sent stadie där den gått in i ett icke reversibelt kroniskt tillstånd. Sjukdomen ger upphov till hälta och kronisk smärta både på humansidan och djursidan och skapar stora ekonomiska förluster för samhället och djurägare. Idag arbetar forskare med att ta fram biomarkörer för att kunna detektera sjukdomen långt innan den hunnit utvecklas till sitt kroniska slutskede.

Hästen erbjuder en unik möjlighet som forskningsobjekt med en hög förekomst av spontant utvecklad osteoartrit som ger ett bra tillfälle att kunna validera potentiella biomarkörer.

Tidigare ansågs osteoartrit vara en sjukdom som endast påverkade ledbrösket, men idag är det vedertaget att det är en sjukdom som påverkar ledens alla strukturer. Även om den etiologiska bakgrunden till sjukdomen ej är helt fastställd idag så är det troligt att det rör sig om en samling sjukdomsförlopp som i sin tur leder till en liknande patogenes i sitt slutskede.

Forskare har använt hästmodeller för studera biomarkörers korrelation till osteoartrit. Modellerna kan delas in i försök där man inducerat en OA likande process alternativt studerat spontant uppkommen osteoartrit *in vivo* eller *in vitro*. Båda modelltyperna har sina för och nackdelar vad gäller kostnadseffektivitet samt förmåga att ge en verklig bild av sjukdomsförloppet.

Även om en stor variation finns mellan vilka biomarkörer som mest verkar avspegla sjukdomen hos häst och korrelera till uppkomst och utveckling, så verkar ett återkommande område vara att studera strukturella komponenter av det extracellulära matrixet i artikulärt brosk, då det är allmänt känt att ECM destrueras vid osteoartrit. Genom att förstå sig på den normala omsättningen av olika komponenter av det extracellulära matrixet i friska djur och jämföra det med den obalans som uppstår vid sjukdom så kan man få en bild av vart i sjukdomsförloppet man befinner sig, samt vilken behandlingseffekt olika potentiella läkemedel kan ha.

Att mäta ”turnover” av typ II kollagen, aggrecan samt COMP verkar kunna ge en bra indikation på om individen håller på att utveckla osteoartrit, men större studier behövs göras för att kunna validera dessa biomarkörers diagnostiska värde.

SUMMARY

Osteoarthritis is an inflammatory progressive disease, which mostly is diagnosed when destruction of joint tissue is irreversible. The disease results in lameness and severe pain both in humans and animals, with economic losses for both the society and animal owners. Researchers today are trying to develop biomarkers that are able to detect the disease in an early stage before it has developed into its chronic end stage

The horse offers a unique opportunity as a research animal studying osteoarthritis, with its high incidence of spontaneous development of osteoarthritis.

In the past, osteoarthritis was considered as a disease that only affected the joint cartilage, but today it's recognized that it's a disease that affects all structures of the joint. Even if the etiological background for the disease is currently partly unknown, it's presumable that it's a variety of diseases with a similar pathogenesis in its end stage.

Researchers have published numerous articles with horses as a research model for biomarkers correlated to osteoarthritis. The study models can be divided into trials of experimentally induced osteoarthritis or alternatively spontaneous occurring osteoarthritis *in vivo* or *in vitro*. Both study models have their pros and cons when dealing with cost efficiency and ability to reflect the disease course.

Even if there is a great variety about which biomarkers that seems to reflect the disease in the most prominent way and correlate to the origin and development, a reoccurring direction seems to be to study structural components of the extra cellular matrix in hyaline cartilage, due to osteoarthritis. To get the knowledge and understanding of normal cartilage turnover of ECM components, and compare this with the imbalance which occurs during pathologic circumstances, you can get a snapshot of where in the progression of the disease currently is, or evaluate treatment effect of potential pharmaceutical candidates against the disease.

To measure turnover of type II collagen, aggrecan or COMP with the help of biomarkers that reflects it, it seems that you can get a good indication about if the individual is in in an early stage of developing osteoarthritis. But bigger studies need to be done in this field to get an unquestionable validated proof of their diagnostic value.

INLEDNING

Osteoartrit är en inflammatorisk progressiv sjukdom som oftast diagnostiseras i ett sent stadi­e där sjukdomen progredierat till ett irreversibelt kroniskt tillstånd. När patologiska förändringar syns med hjälp av bild­diagnostik har sjukdomsförloppet gått väldigt långt. Den ger upphov till härlta och kronisk smärta både på humansidan samt djursidan, inte minst hos hästar (Lee *et al.*, 2013). Sjukdomen kostar miljarder för samhället på humansidan och leder även till en stor ekonomisk förlust för hästägare då hästar måste avsluta sin karriär i förtid och påverkar även hästars välfärd negativt (Skiöldebrand *et al.*, 2017).

Idag finns inga registrerade läkemedel för att behandla osteoartrit, s.k. disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD). Behandling av sjukdomen är främst symptomatisk med fokus på smärta (Bay-Jensen *et al.*, 2018).

Metoder för att detektera osteoartrit långt innan sjukdomen hunnit utvecklas till sitt kroniska slutskede behövs (Frisbie *et al.*, 2016), samt även metoder för att kunna mäta behandlingseffekt vid prövning av nya läkemedel mot osteoartrit, vilket idag är en kritisk begränsande faktor för att ta fram och registrera nya läkemedel (Lotz *et al.*, 2013).

Därför läggs stort fokus i forskningen på att utveckla och ta fram biomarkörer som kan hjälpa till med just detta. Mellan 1963-2014 så publicerades mer än 2100 artiklar om just forskning baserat på djurmodeller om osteoartrit, omkring 80 % av dessa hade skrivits de sista 10 åren (Mcoy, 2015). Hästen erbjuder en unik möjlighet som forskningsdjur med en hög förekomst av spontant utvecklad osteoartrit som ger en stor möjlighet att kunna validera potentiella biomarkörer, och där forskningen att utveckla nya biomarkörer förtöper parallellt mellan human och hästsidan (McIlwraith *et al.*, 2018).

Detta arbete syftar till att visa hur extracellulära matrix proteiner i led­brosk kan agera som biomarkörer samt hur väl de korrelerar till sjukdomen. För ökad förståelse i ämnet presenteras även grundläggande fakta kring sjukdomen osteoartrit samt de strukturer i leden som påverkas.

MATERIAL OCH METODER

- Litteratursökningen har skett via databasen pubmed, där sökord som: Horse, Equine, Osteoarthritis, Biomarker, Cartilage funnits med i sökkriterierna.
- Fokus har legat på att presentera forskning med häst som djurmodell, men då forskningsområdet utvecklas parallellt med humansidan har information kompletterats från humansidan.
- Viss information även hämtats från nyligen utgiven litteratur för att beskriva vissa generella begrepp.

LITTERATURÖVERSIKT

Ledens anatomi och fysiologi

Leder kan klassificeras på flera olika sätt, där en vanlig indelning sker efter ledens strukturella karaktär baserat på vad för vävnadstyp som befinner sig i gränsskiktet mellan de skelettdelar som utgör en led. Enligt denna klassificering så delas de in i fibrösa leder, broskleder och synovialleder (van Weeren, 2016).

När ordet led används i detta arbete utan vidare beskrivning så syftar det till att beskriva synoviala leder. Gemensamma strukturer som återfinns i alla synovialleder är följande:

Kondrocyter

Kondrocyten är den enda cellen som normalt sett finns i adult ledbrosk (van Weeren, 2016). Den är ansvarig för produktion och remodelering av allt extracellulärt matrix i ledbrosket via bl.a. produktion av enzymer som metalloproteaser och olika typer av kollagen, vilket gör att den spelar en viktig roll i att hålla ledens normala homeostas (Olson & Carlson, 2017).

Kollagen

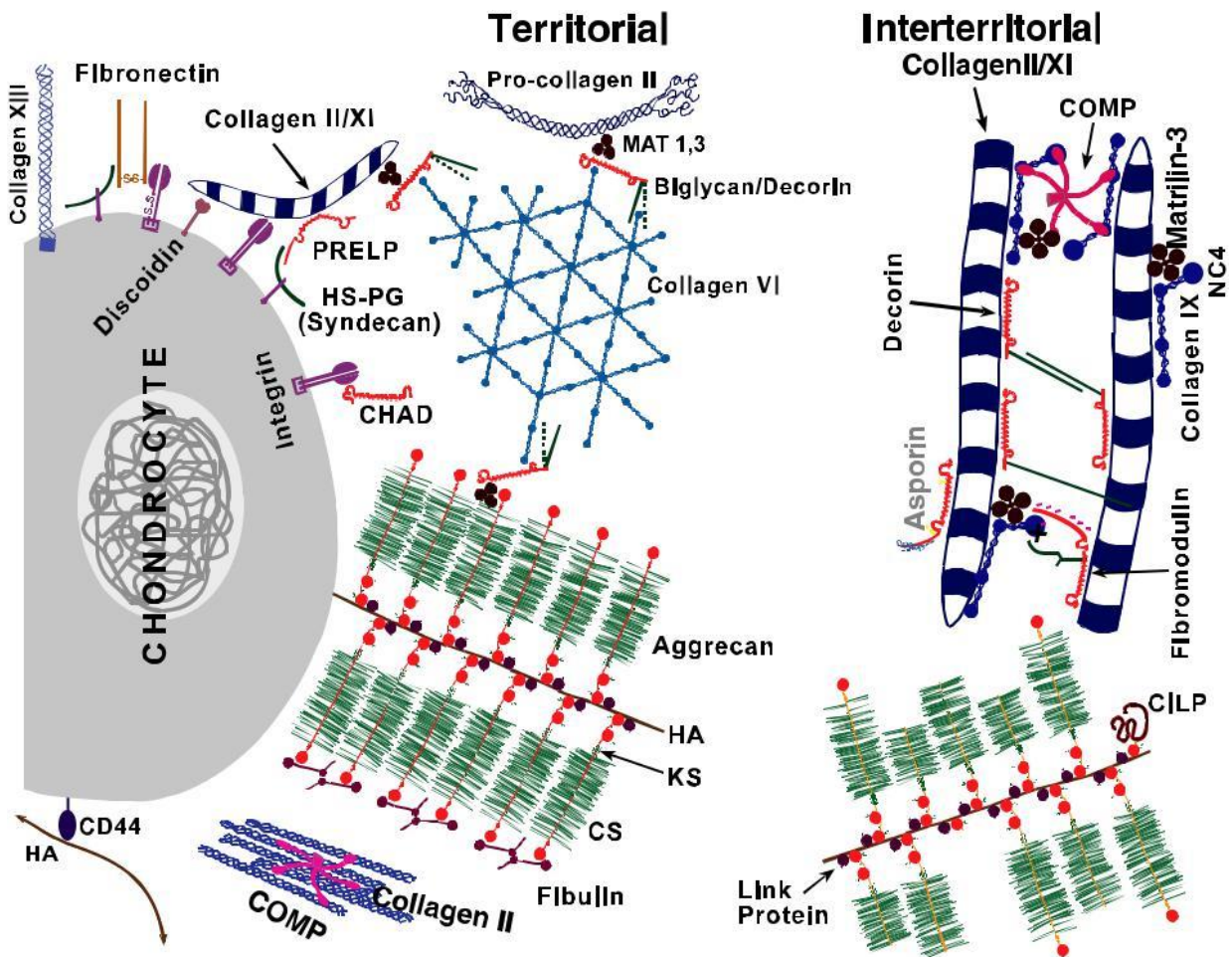
Ledbrosk består till största delen typ II kollagen som är en trippelhelix sammansatt av tre kollagenproteinkedjor. Dessa bildar kollagenfibriller som har en avgörande roll i att fungera som en armering av ledbrosket. Andra kollagentyper med liknande strukturell funktion i ledbrosk är kollagen typ IX och XI men de utgör en betydligt mindre del (van Weeren, 2016).

Proteoglykaner

Proteoglykaner är proteinkedjor sammankopplade med hundratals sidokedjor av glykosaminoglykaner, vanligtvis keratansulfat och kondroitinsulfat. Den vanligaste proteoglykanen i brosk är aggrecan. Den fäster normalt sett till andra komponenter i ECM samt till kondrocyten med hjälp av hyaluronan. Glykosaminoglykanerna är negativt laddade och därav hydrofila vilket för att de binder stora mängder vatten (van Weeren, 2016).

Icke kollagena proteiner

Förutom kollagen och proteoglykaner så innehåller ledbrösket även andra proteiner (Figur 1). En av dessa är cartilage oligomeric matrix protein (COMP) vilket tillhör gruppen trombospondiner (van Weeren, 2016). COMP finns primärt i broskvävnad, och har en roll i att via sina 5 subenheter binda kollagenstrådar och assistera dem i formationen av fibrillära helixstrukturer som ses i t.ex. kollagen typ II (Heinegård, 2009).



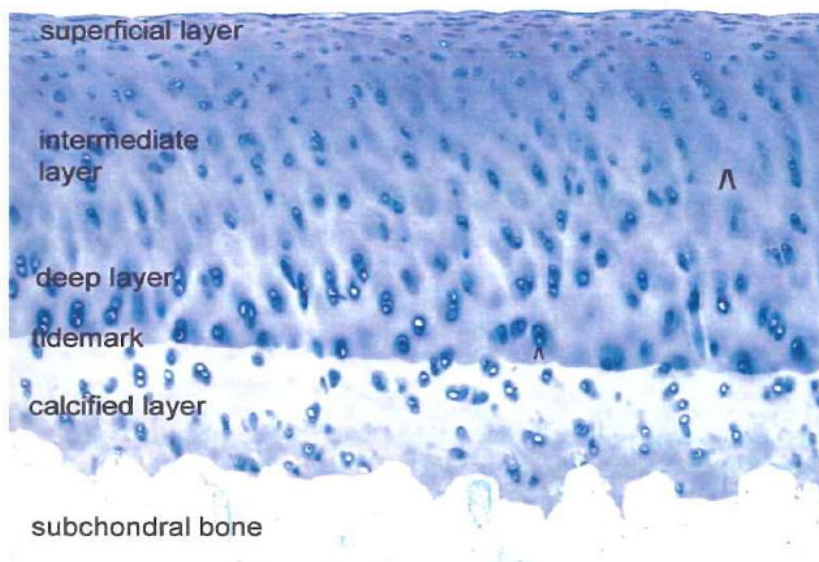
Figur 1: Schematisk bild över det extracellulära matrixet i ledbrösk. Källa: Heinegård, D. 2009.

Ledbrosk

Ledbrosk täcker den artikulära kontaktytan över de skelettdelar som utgör en led. En stor funktion hos ledbrosket är att skapa en glidyta med låg friktion samt ha en stötdämpande effekt vid rörelse. Många ledbrosk är både avaskulärt och saknar innervering (Olson & Carlson, 2017). Då blodkärl i ledbrosket saknas krävs ett alternativt sätt att transportera näring och metaboliter in och ut ur ledbrosket. Det sker främst genom tryckändringar i leden vid rörelse och fysisk aktivitet där ledbrosket likt en tvättsvamp i en hink med vatten pressar ut vätska vid kompression och vid relaxering dras ny vätska in, denna process kan beskrivas som assisterad diffusion av ledvätska (van Weeren, 2016). Broskets extracellulära matrix består av en mycket stor del vatten, ca 70-80 % (Olson & Carlson, 2017)

Ledbrosket delas histologiskt in i 4 zoner (figur 2)

- Ytliga zonen: Platta tätt packade kondrocyter, kollagen typ II fibriller ligger längs med ytan av brosket, låg mängd proteoglykaner, hög vattenhalt. Viktig uppgift för denna zon är att skydda ledytan mot mekanisk nötning (Olson & Carlson, 2017)
- Mellersta zonen: Runda mer utspridda kondrocyter, kollagen typ II fibriller ligger mindre tätt och mer oregelbundet, mer proteoglykaner än i ytliga zonen, lägre vattenhalt än i ytliga zonen (van Weeren, 2016)
- Djupa zonen: Kondrocyterna sitter i kolumner, låg mängd kollagen typ II, hög mängd proteoglykaner, lägst vattenhalt av zonerna (van Weeren 2016)
- Den kalkifierade zonen avgränsas från de ytligare lagren via en tunn linje kallad tidemark, och är en övergångszon mellan subkondralt ben och det överliggande brosket. Den har en funktion i att förankra det överliggande brosket i det subkondrala benet (Olson & Carlson, 2017).



Figur 2. De fyra histologiska zonerna i ledbrosk. Källa: Eva Skiöldebrand.

Subkondralt ben

Ledbrosket i en led fäster i den underliggande subkondrala benytan via en övergångszon av kalcifierat brosk. Den har en lägre möjlighet att kunna deformeras än ledbrosk men har ändå en viktig roll i att hjälpa till att verka stötdämpande vid rörelse. (van Weeren, 2016). Det subkondrala benet är både vaskulerat och innerverat. Denna innervering står för en stor del av smärtkänslan vid ledskada. Vid ökad belastning av denna vävnad kan den skleroteras genom att det bildas mer ben och förlorar då sin dämpande förmåga vilket kan leda till större belastning på det överliggande ledbrosket (Olson & Carlson, 2017).

Ledvätska

Ledvätska eller synovia har flera funktioner, den agerar dels för att minska friktionen mellan ledytorna, men även för att vara det medium som utbytet av näring och metaboliter transporteras i leden med (Olson & Carlson, 2017). Det är en högviskös vätska bestående främst av ett ultrafiltrat av plasma samt hylaluronan som bildas av synovicyterna. (van Weeren, 2016).

Ledkapsel

Ledkapseln består av två lager, den yttre fibrösa delen med främst en stabiliserande funktion, samt den inre som avgränsar hela det synoviala ledområdet. Det inre lagret delas i sin tur in i subintima samt intima. Intima är ett mycket tunt lager innerst mot leden med riklig vaskularisation som fungerar som en gränsszon för utbyte av näring och metaboliter. Intiman består även av typ A synovicyter med makrofagliknande funktioner samt typ B synovicyter med en excretorisk funktion, vilket bildar bl.a. hylaluronan till synovian (van Weeren, 2016).

Osteoartrit

Tidigare ansågs osteoartrit vara en sjukdom som primärt endast påverkade ledbrosket, men idag är det vedertaget att det är en sjukdom som påverkar ledens alla strukturer (Goldring, 2010). Även om den etiologiska bakgrunden till sjukdomen ej är helt fastställd idag så är det troligt att det rör sig om en samling sjukdomsförlopp som i sin tur leder till en liknande patogenes i sitt slutskede (Olson & Carlson, 2017).

Idag definieras inte sjukdomen som en primär degenerativ sjukdom, utan mer som en multifaktoriell lågradig kronisk inflammatorisk process (Robinson *et al.*, 2016). Man vet idag att sjukdomen påverkar strukturer som ledbrosk genom fibrillering och nedbrytning av det extracellulära matrixet, ger brosklesioner, förtjockning genom skleros av det subkondrala benet, bildandet av osteofyter, och påverkar även ledkapseln, vilket ger synovit och kapsulit, samt ger förtunnad ledvätska (Robinson *et al.*, 2016). I tidigt stadie av sjukdomen sker signalpåverkan från cytokiner, framförallt IL-1 β samt TNF- α vilket båda påverkar kondrocyters uppreglering av matrixnedbrytande enzymer. Enzymerna som uppregleras är MMPs (matrix metalloproteinaser) samt ADAMTS (disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) (Goldring *et al.*, 2011).

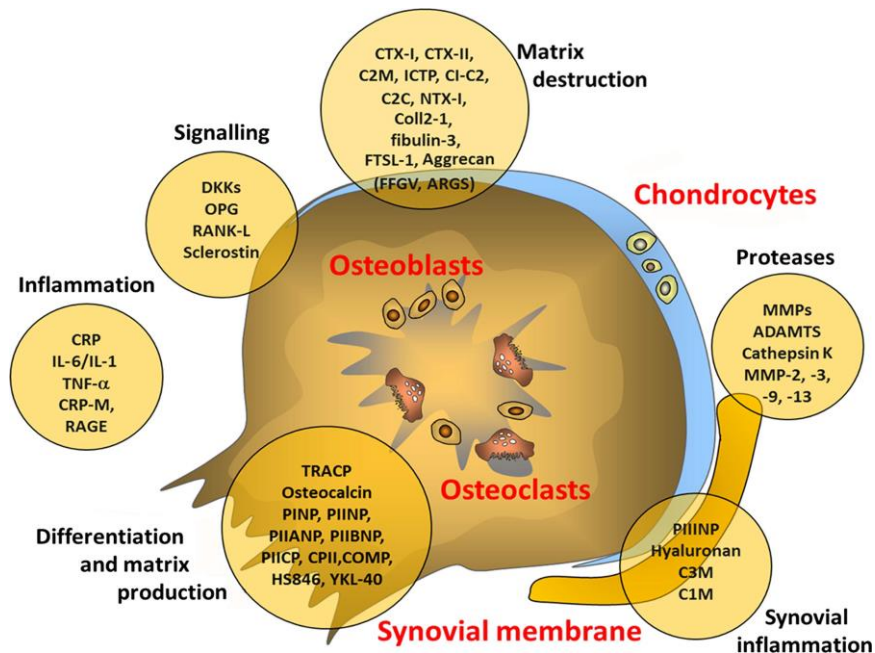
Idag kan riskfaktorerna för att utveckla osteoartrit delas in i två olika sjukdomsmekanismer, där den ena är onormal belastning av en frisk led, och den andra är normal belastning av en sjuk led (Goldring, 2010). Ett stort problem med sjukdomen är att kondrocyterna som upprätthåller en normal uppsättning av det extracellulära matrix komponenter, gör det i en låg hastighet, och har begränsad kapacitet i att regenerera och återställa ett skadat ledbrosk, vilket delvis förklarar det kroniska sjukdomsförloppet (Goldring, 2007). Behandling mot sjukdomen är idag begränsad till att i bästa fall vara symptomatisk med fokus på att dämpa smärta, men ingen behandling finns idag för att motverka eller stoppa sjukdomen (Goldring *et al.*, 2011)

Gruppering av biomarkörer för osteoartrit

Det finns flera definitioner för vad en biomarkör är, en nylig definition föreslår att en biomarkör kan definieras som en objektiv mätmetod som kan utvärdera och fungera som en indikator för normala biologiska processer, patologiska processer eller farmakologisk behandlingseffekt (McIlwraith *et al.*, 2018). Det är nödvändigt att förstå vad en biomarkör reflekterar. Många biomarkörer reflekterar patologiska processer där de kan visa på en tidigt pre-patologisk förändring eller en sen post-patologisk förändring och i och med detta ge oss information om helt olika saker (Bay-Jensen *et al.*, 2018).

Biomarkörer kan grupperas i ”dry biomarkers” som t.ex. Bilddiagnostik, eller ”wet biomarkers” som t.ex. genetiska eller biokemiska parametrar som kan mätas i exempelvis urin, blod, ledvätska eller vävnad (McIlwraith *et al.*, 2018).

I det här arbetet presenteras endast exempel på ”wet biomarkers” då de representerar den gruppen av biomarkörer som det här arbetets frågeställning svarar på (Figur 3).



Figur 3: Gruppering av olika biomarkörer för osteoartrit. Källa: Lotz, M. 2013.

***In vivo* samt *in vitro* modeller på häst för att studera OA**

Flera olika forskningmodeller på häst finns beskrivna i publikationer där man försökt hitta en korrelation mellan olika potentiella biomarkörer och osteoartrit. I det här stycket presenteras en sammanställning av några modeller. Modellerna i *in vivo* försök samt *in vitro* försök.

Flera studier har använt sig av en *in vitro* modell där ledbrosk extraherats post mortem från leder av hästar som ej visat tecken på osteoartrit (Löfgren *et al.*, 2018; Skiöldebrand *et al.*, 2017; Svala *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2013) för att kunna experimentellt inducera OA i det extraherade brosket och sedan mäta och utvärdera bl.a. olika biomarkörens förändring över tid.

En studie använde sig av en *in vivo* modell där de injicerade amphotericin b i carpaleden hos 8 hästar som ej visat tecken på osteoartrit för att inducera OA. En kontrollgrupp av 5 hästar injicerades i samma led med steril koksalt. Synoviaprover togs innan injektion samt veckovis efter injektionen under 9 veckors tid. Proverna analyserades för flera olika biomarkörer med hjälp av ELISA. (Tian-wen *et al.*, 2017)

En studie använde sig av en *in vivo* modell där totalt 24 unga travhästar följdes under en tidsperiod av 24 månader från och med att de kördes in. Alla 24 hästarna tränades av samma tränare. De hästar som fullföljde hela provtagningen (n:19) provtogs totalt vid 6 provtagningstillfällen där synovia togs från carpaleden. Proverna analyserades för flera olika biomarkörer med hjälp av ELISA (Skiöldebrand *et al.*, 2006).

En studie använde sig av en *in vivo* modell där 16 två år gamla hästar deltog, alla hästarna hade innan deltagande i studien kontrollerats för att inte visa tecken på OA. 8 av hästarna artroskopades bilateralt i mellersta carpallederna varav den ena leden utsattes för mekanisk ledbroskskada samt den andra endast exploratoriskt genomsöktes för OA förändringar. De resterande 8 hästarna var kontrollgrupp, de artroskopades bilateralt i mellersta carpallederna delvis för att exploratoriskt kollas för OA men även för att verka som kontrollgrupp. Hästarna delades sedan i 3 grupper, en kontrollgrupp som utsattes för motion, en OA inducerad grupp som ej motionerades samt en OA inducerad grupp som utsattes för motion. Studien pågick i 91 dagar där motionsgrupperna tränades 5 dagar i veckan. Blodprov samt synoviaprover från båda mellersta carpallederna togs varje vecka förutom den 7:e, 9:e samt 11:e veckan på samtliga hästar. Proverna analyserades för flera olika biomarkörer med hjälp av ELISA (Frisbie *et al.*, 2008)

En studie studerade använde sig av en *in vivo* modell där man ville se om cirkadisk rytm, ålder träning samt akut hälta visade någon korrelation till en neopeptid biomarkör av COMP. Neopeptiden mättes med hjälp av blodprover. Blodprover togs före och efter från 5 travhästar som utförde intervallträning för att se om det fanns något samband med träning. 5 hästar provtogs kontinuerligt över 24 timmar för att se om det fanns något samband med cirkadisk rytm. 32 akut halta hästar kontrollerades för att se om det fanns något samband med ålder. Oberoende prover från 41 kontrollhästar samt 71 akut halta hästar kontrollerades för om det fanns ett samband med akut hälta. Alla prover analyserades med hjälp av en specialanpassad inhibitions ELISA för hästserum för att kvantifiera koncentrationen av COMP neopeptiden (Ekman *et al.*, 2019)

ECM biomarkörer för osteoartrit

Även om många potentiella biomarkörer för OA studeras så verkar ett återkommande område vara att studera just strukturella komponenter av det extracellulära matrixet i artikulärt brosk. Tre av dessa är typ II kollagen, aggrecan samt COMP som alla finns i framförallt ledbrosk (Heinegård, 2009), samt att de påverkas negativt vid OA.

För att kunna använda sig av dessa tre matrix molekyler måste man identifiera deras roll vid normala samt patologiska förhållanden. Under normala förhållanden sker en jämn balanserad turnover genom katabola samt anabola processer, vilket genererar ECM prekursorer samt klyvningsprodukter som bildas genom klyvning av specifika enzymer. Under OA förhållanden så sker en obalans mellan dessa processer (Troeberg & Nagase, 2012), vilket kan mätas som biomarkörer.

I studiemodellerna som kortfattat beskrivits tidigare så har de olika biomarkörerna Typ II kollagen, aggrecan och COMP analyserats. Sammanfattningsvis så visade de följande resultat:

Typ II kollagen

Nedbrytningen av typ II kollagen likt nedbrytningen av aggrecan spelar en central roll vid OA (Troeberg & Nagase 2012). Biomarkörer som mäter omsättningen är ofta klyvningsprodukter av typ II kollagenmolekylen som t.ex. C2M, CTX-II, C2C eller MMP enzymer som bryter ner kollagen som t.ex. MMP-13 som ofta ses öka vid OA (Heinegård, 2009). Likt väl går det även att mäta mängden typ II kollagen direkt. En viktig punkt i nedbrytningen av typ II kollagen är att den har en extremt lång omsättningstid (van Weeren, 2017) vilket försvårar läkningen av brosk. När den väl börjar brytas ner ses skadan på brosket som praktiskt taget irreversibel (Troeberg & Nagase, 2012).

Tabell 1. Typ II kollagen som biomarkör, sammanställning av olika publikationers mätmetoder

Publikation	Biomarkörer	Modell	Provtyp	Analysmetod
Svala <i>et al.</i> , 2015	MMP-13, Typ II Kollagen, C2C	OA inducerat ledbrosk (IL-1 β) <i>in vitro</i>	Ledbrosk	”liquid chromatography-tandem mass spektrometry”
Tian.wen <i>et al.</i> , 2017	MMP-13, CTX-II	OA inducerade leder (amphotericin B) <i>in vivo</i>	Synovia	ELISA mot biomarkörer
Frisbie <i>et al.</i> , 2008	C2C	kirurgisk inducerad OA <i>in vivo</i>	Serum, Synovia	ELISA mot biomarkörer
Lee <i>et al.</i> , 2008	Typ II Kollagen	Kompressionsmodell <i>in vitro</i>	Ledbrosk	Bedömning av immunohistokemisk infärgning
Löfgren <i>et al.</i> , 2018	MMP-13, Typ II Kollagen	OA inducerat ledbrosk (IL-1 β) <i>in vitro</i>	Ledbrosk	upp/nedregleringen av genuttrycket m.h.a. ”microarray”
Skiöldebrand <i>et al.</i> , 2006	Typ II Kollagen	Observationsstudie, unga travhästar i träning	Synovia	ELISA mot biomarkör

Många studier visar tecken på att typ II kollagen bryts ner relativt sent vid OA, och nedbrytningen av andra ECM strukturer föregås (tabell 1). Vid OA inducerat ledbrosk *in vitro* (Svala *et al.*, 2015) så ökade inte nivåerna av C2C klyvningsprodukterna förrän vid dag 15 efter inducering med en pik framåt dag 25. Samtidigt visar en annan studie att nedregleringen av genuttrycket för typ II kollagen sker vid samma tidpunkt (Löfgren *et al.*, 2018). Samma sak sågs i ett *in Vivo* försök (Tian-wen, 2017) där CTX-II nivåerna inte ökade förrän 2 veckor in i experimentet. Det visar på att när man använder sig av biomarkörer som mäter omsättningen av typ II kollagen så ser man ofta förändringarna i senare skede av OA.

MMP-13 som enligt flera studier anses vara den primära kollagenasen vid OA (Troberg & Nagase, 2012), verkar däremot både öka i genuttryck samt kvantitativ mängd i ledbrosk i tidigt skede långt innan nedbrytning av kollagen börjat ske (Svala *et al.*, 2015; Löfgren *et al.*, 2018). MMP-13 nivåer i ett *in vivo* försök (Tian-wen, 2017) ökade ävndär inom några dagar efter inducering av OA. Detta kan tyda på att det finns andra faktorer än enzymsbildning som spelar in i när kollagen bryts ner, vilket enligt (Troberg & Nagase, 2012) kan bero på att aggregat skyddar nedbrytningen av kollagen och det är inte förrän det brutits ner som nedbrytningen av kollagen startar.

En tydlig korrelation mellan serumnivåer och synovia nivåer av typ II kollagen sågs även vid inducerad OA (Frisbie et al, 2008), vilket även i den studien steg långt efter andra biomarkörers stegring. Detta ger en indikation på att typ-II kollagen går att säkert mätas med blodprover och provtagningen blir enklare.

En kompressionsmodell visade att nedbrytningen av typ II kollagen ökade vid hård belastning av ledbrösket (Lee et al., 2008), främst i den ytliga ledbröskzonen, vilket ger en indikation på att överbelastning av ledbrösk skadar typ II kollagen, och att den ytliga zonen i ledbrösket är känsligt för ECM skador.

Ålder och kön verkar inte påverka mätresultat av typ II kollagen i synovia, medan långtidsträning succesivt verkar öka nivåerna (Skiöldebrand et al., 2006). Det gör att användbarheten ökar om man ej behöver ha ålder och kön i åtanke vid bedömning av mätresultat men samtidigt behöver ha i åtanke att träning kan påverka resultaten.

Aggrekan

Aggrekan bryts ner tidigt i utvecklingen av OA (Troeberg & Nagase, 2012), och flera olika biomarkörer används för att mäta dess påverkan (tabell 2). Man kan mäta aggrekanmolekylen direkt, olika klyvningsprodukter vid dess nedbrytning eller aktiviteten/nivåerna av specifika enzymer som bryter ner den som t.ex. ADAMTS-5.

Tabell 2. Aggrekan som biomarkör, sammanställning av olika publikationers mätmetoder

Publikation	Biomarkörer	Modell	Provtyp	Analysmetod
Frisbie et al., 2008	CS846	kirurgisk inducerad OA <i>in vivo</i>	Serum, Synovia	ELISA mot biomarkör
Lee et al., 2013	Aggrekan	Kompressionsmodell <i>in vitro</i>	Ledbrösk	Bedömning av immunohistokemisk infärgning
Skiöldebrand et al., 2006	Aggrekan	Observationsstudie, unga travhästar i träning	Synovia	ELISA mot biomarkör
Tian-wen et al., 2017	CS846, ADAMTS-5	OA inducerade leder (amphotericin B) <i>in vivo</i>	Synovia	ELISA mot biomarkör
Svala et al., 2015	Aggrekan	OA inducerat ledbrösk (IL-1 β) <i>in vitro</i>	Ledbrösk	”liquid chromatography - tandem masspektrometry”.
Löfgren et al., 2018	Aggrekan, ADAMTS-5	OA inducerat ledbrösk (IL-1 β) <i>in vitro</i>	Ledbrösk	upp/nedregleringen av genuttrycket m.h.a. ”microarray”

Alla studier förutom en (Skiöldebrand *et al.*, 2006) har använt sig av en kontrollgrupp att jämföra sina resultat emot, vilket visade skillnader mellan test och kontrollgrupp.

Vid kompressionsmodell av ledbrosk syntes störst påverkan av aggregan i det ytliga brosklagret (Lee *et al.*, 2013), vilket kan tyda på att biomarkörer som analyserar aggregan ger en indikation på yttlig ledbroskskada, vilket även beskrivits i andra studier (Milwraith *et al.*, 2018).

Vid IL-1 β inducerat ledbrosk *in vitro* (Löfgren *et al.*, 2018) sågs en tidig nedreglering av genuttrycket för aggregan, samt en uppreglering av ADAMTS enzymer som bryter ner aggregan vilket tyder på att aggregan påverkas tidigt vid OA.

Värt att nämna är att studien visade även att ADAMTS-5 som ofta beskrivs som den mest aktiva enzymen för nedrytning *in vitro* (Troeborg & Nagase, 2012) uppreglerades sent i experimentet vilket kan tyda på att andra ADAMTS kan spela stor roll i tidig nedbrytning av aggregan.

Vid kirurgisk inducerad OA (Frisbie *et al.*, 2008) så sågs en tydlig korrelation mellan serum och synovia nivåer av CS846 när de båda ökade efter inducering. Värt att nämna är att en ökning av CS846 nivåer sågs vid enbart träning (kontrollgrupp) men det var en stor skillnad i jämförelse med testgrupp. Allt detta tyder på att CS846 kan säkert mätas med blodprov vilket gör provtagningen mycket enklare med denna biomarkör, men att man måste ha i åtanke att värden kan påverkas något av träning.

Vid *in vivo* studie av OA (Tian-wen *et al.*, 2017) sågs en snabb ökning av både CS846 och ADAMTS-5 i synovia innan kliniska symptom på OA började, vilket även det ger en indikation på att aggregan påverkar tidigt i OA processen och biomarkörer som mäter dess omsättning kan detektera en tidig förändring.

Aggregan nivåerna i OA inducerat ledbrosk *in vitro* (Svala *et al.*, 2015) hade klart ökade nivåer vid dag 3 i studien för att sedan snabbt sjunka, i jämförelse med kontrollgruppen där nivåerna var oförändrade. Detta ger en bild av att aggregan nivåerna i synovia vid OA snabbt kommer att skilja sig mot normala värden. (Heinegård & Saxne, 2011) beskriver att aggregan verkar i tidigt skede av OA kunna kompensatoriskt nybildas vilket gör att nivåerna inte sjunker direkt, för att sedan stanna av alternativt inte vara tillräcklig i jämförelse med nedbrytningen.

Ålder verkar inte påverka mätresultatet av aggregan i synovia (Skiöldebrand *et al.*, 2006).

COMP

När studierna analyserat COMP så är det viktigt att urskilja vad de har tagit provet ifrån och vilken analysmetod de använt sig av för att få ett kvantitativt svar. Man kan mäta den nativa molekylen eller dess klyvningsprodukter vid nedbrytning (tabell 3).

Tabell 3. COMP som biomarkör, sammanställning av olika publikationers mätmetoder

Publikation	Biomarkörer	Modell	Provtyp	Analysmetod
Svala <i>et al.</i> , 2015	COMP	OA inducerat ledbrosk (IL-1 β) <i>in vitro</i>	Ledbrosk	Western blot mot COMP
Löfgren <i>et al.</i> , 2018	COMP	OA inducerat ledbrosk (IL-1 β) <i>in vitro</i>	Ledbrosk	upp/nedreglering en av genuttrycket m.h.a. ”microarray”
Tian-wen <i>et al.</i> , 2017	COMP	OA inducerade leder (amphotericin B) <i>in vivo</i>	Synovia	ELISA mot COMP
Skiöldebrand <i>et al.</i> , 2017	COMP neoepitop	Akut halta hästar <i>in vivo</i>	Synovia	Inhibitions ELISA mot COMP neoepitop
Skiöldebrand <i>et al.</i> , 2006	COMP	Observationsstudie, unga travhästar i träning	Synovia	ELISA mot COMP
Ekman <i>et al.</i> , 2019	COMP neoepitop	Flera olika	Serum	Inhibitions ELISA mot COMP neoepitop

Alla förutom en studie (Skiöldebrand *et al.*, 2006) har använt sig av en kontrollgrupp att jämföra sina resultat emot, vilket visade skillnader mellan kontrollgrupp och testgrupp.

Förutom ovannämnda analyser så har även immunohistokemiska analyser gjorts av ledbrosk med både specificitet mot hela COMP strukturer alternativt mot en specifik neoepitop (Skiöldebrand *et al.*, 2017; Ekman *et al.*, 2019).

Dessa visar intressant nog att deras framtagna polyklonala antikropp inte verkar detektera den specifika neoepitopen i icke OA påverkad vävnad, vilket tyder på att den endast bildas vid patologiska förhållanden (Ekman *et al.*, 2019), vilket gör den till en unik biomarkör som potentiellt kan skilja mellan sjuka och friska djur.

Skillnader i COMP nivåer (av den nativa molekylen) i ledvätska syntes tidigt i OA inducerade modeller jämfört med kontrollgrupper (Tian-wen *et al.*, 2017; Svala *et al.*, 2015), vilket tyder på att COMP påverkas i tidigt skede av OA, vilket visar på dess användbarhet i att detektera OA i tidigt skede (Heinegård & Saxne, 2011)

Skillnader i COMP nivåer i ledvätska syntes även under kontinuerlig träning av unga travhästar (Skiöldebrand *et al.*, 2006), där nivåerna sjönk succesivt under en period omkring 20 månader, vilket kan vara ett tecken på att långtidsträning leder till att nybildningen av COMP inte hänger med över en längre period, vilket ger en kunskap om att träning kan påverka COMP nivåer i synovia.

Ålder, cirkadiskt dygnsrytm eller kortidsträning verkar inte påverka serumnivåer av ovan nämnda COMP neo-epitop (Ekman *et al.*, 2019), vilket gör att användbarheten blir större då man inte behöver oroa sig för att dessa faktorer kan påverka analys med denna biomarkör.

DISKUSSION

När man gör en överblick av forskningen inom biomarkörer för OA hos häst så får man flera indikationer på att forskningen har en bit kvar att utvecklas. Några återkommande skillnader i forskningen är t.ex. att det är en stor variation i vilken metod man använder sig av för att inducera "OA liknande" symptom för att kunna studera sjukdomens progression med hjälp av biomarkörer.

Inducerade modeller har fördelen att de tar kortare tid att utveckla sjukdom och i och med detta gör försöken mer kostnadseffektiva (Mcoy, 2015), men samtidigt så måste man ta hänsyn till om den inducerade modellen studerar en verklig bild av sjukdomen. Att studera spontant uppkommen OA från verkliga fall representerar en mer verklig bild av sjukdomen men kräver fler studiefall för att få en styrka i sin studie (Mcoy, 2015). En annan mycket viktig punkt att poängtera vad gäller att studera spontant uppkommen OA är att dagens metoder för att diagnostisera sjukdomen gör detta i ett skede där sjukdomen redan gått så långt att skadan som uppkommit i leden är irreversibel och är i ett sent skede (Lotz *et al.*, 2013). En viktig del i biomarkörers framtida roll är att kunna studera OA i just ett tidigt skede där sjukdomen ej hunnit leda till en skada (Skiöldebrand *et al.*, 2017), vilket då kan leda till en större utmaning i att använda sig av en spontan OA modell för att studera sjukdomen, då du måste observera och provta hästar innan de med dagens metoder kan diagnosticeras med OA.

En annan utmaning ser ut att ligga i vilken typ av biomarkör som mest avspeglar sjukdomen och korrelerar till uppkomst och utveckling. Olika forskningsgrupper verkar med stor spridning söka efter olika biomarkörer som svarar på ovanstående. En beskrivning av "wet" biomarkers" vid OA ges av (Frisbie *et al.*, 2016), där de beskriver att OA progressiva nedbrytning av ledbrosk sker genom en obalans mellan nedbrytning samt kompensatorisk nybildning av ECM, och att mäta skillnader mellan dessa kan ge en mer klar bild om hälsostatus än att bara mäta en enda biomarkör. Kontentan av detta är att troligtvis kommer inte endast en biomarkör att ensamt stå för diagnostiken vid OA, utan snarare att en panel av biomarkörer tillsammans ger en bild om sjukdomen och var den befinner sig i utvecklingen vid provtagningstillfället.

ECM biomarkörer som typ II kollagen, aggrecan och COMP visar enligt tidigare beskrivna studier att de påverkas vid OA förhållanden. Att både aggrecan och COMP nivåer förändras tidigt långt innan kliniska symptom som hälsa bekräftar deras diagnostiska värde som biomarkörer. Att vid provtagning kunna undvika att ta ledprover för synovia och istället kunna förlita sig på ett blodprov för att analysera biomarkörerna gör både provtagningen bra mycket mer tillgänglig och betydligt enklare vid rutinkontroller, samt minskar risken för komplikationer som kan uppstå vid ledinjektioner.

Att en specifik COMP neoepitop endast verkar bildas under patologiska förhållanden och inte detekteras under normala "turnover" förhållanden ökar kvaliteten hos denna biomarkör som då kan skilja mellan friska och patologiska förhållanden. Med många andra ECM biomarkörer måste man ta hänsyn till att de har en viss normalvariation i mätvärde och kan delvis påverkas av andra faktorer än OA.

Baserat på presenterad forskning i detta arbete visar extracellulära matrixproteiner definitivt stor potential som biomarkörer för sjukdomen osteoartrit, med lite komplementär kunskap inom dessa biomarkörers aktivitet, samt mer tillgängliga användarvänliga analysmetoder kommer de säkerligen öka kunskapen om en sjukdom som det humana samt veterinärmedicinska området brottas med.

Konklusion

Sammanfattningsvis visar flera studier att det finns möjlighet att kunna använda biomarkörer för att få en klarare bild vad gäller etiologi samt patogenes vid osteoartrit. Även om forskningen till stora delar hittills varit mer explorativ så börjar lämpliga kandidater att tas fram, det här arbetet ger en kort sammanfattning av några biomarkörer inom området som har visat sig lovande på häst. Det som idag behövs för att kunna validera flera av dessa är mycket större studier. En bra summering ges av (McIlwraith *et al.*, 2018), där en stor samlad grupp forskare inom området beskriver några önskvärda punkter att gemensamt jobba efter. De skulle vilja etablera standardiserade metoder för provtagning av biomarkörer, ha standardiserade reproducerbara metoder för att mäta biomarkörerna, samt en stor väldokumenterad biobank med prover. Området går klart framåt, och inom en snar framtid så kan biomarkörer hjälpt både human och veterinärmedicinen att kunna behandla och förutse sjukdomens negativa progressiva förlopp.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bay-Jensen, A.C., Thudium, C., Gualilli, O., Mobasher, A. (2018). Biochemical marker discovery, testing and evaluation for facilitating OA drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 23: 349-358.
- Ekman, S., Lindahl, A., Rüetschi, U., Jansson, A., Björkman, K., Abrahamsson-Aurell, K., Björnsdóttir, S., Löfgren, M., Mattsson, L., Skiöldebrand, E. (2019). Effect of circadian rhythm, age, training, and acute lameness on serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neoepitope in horses. *Equine Veterinary Journal*. Doi: 10.1111/evj.13082. 2019-03-01
- Frisbie, D., Al-Sobayil, F., Billingham, R., Kawcak, C., McIlwraith, C. (2008). Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16: 1196-1204.
- Frisbie, D., McIlwraith, C., de Grauw, J. (2016). Synovial fluid and serum biomarkers 10: McIlwraith, C., Frisbie, D., Christopher, E., van Weeren, P. *Joint Disease in the Horse*. Second edition. St. Louis, Missouri. Elsevier Inc.
- Goldring, M., Otero, M., Plumb, D., Dragomir, C., Favero, M., El Hachem, K., Hashimoto, K., Roach, H., Olivetto, E., Borzi, RM., Marcu, K., (2011). Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon mmp-13 regulation on osteoarthritis. *European Cells and Materials*, 21: 202-220.
- Goldring, Mary & Steven. (2007). Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 626-634.
- Goldring, Mary & Steven. (2010), Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences, Skeletal Biology and Medicine*, 230-237.
- Heinegård, D. (2009). Proteoglycans and more – from molecules to biology. *International Journal of Experimental Pathology*, 90: 575-586.
- Heinegård, D., Saxne, T. (2011). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews, Rheumatology*, 7: 50-56.
- Lee, C., Kisiday, J., McIlwraith, C., Grodzinsky, A., Frisbie, D. (2013). Development of an *in vitro* model of injury-induced osteoarthritis in cartilage explants from adult horses through application of single-impact compressive overload. *American Journal of Veterinary Research*, 74: 40-47.
- Löfgren, M., Svala, E., Lindahl, A., Skiöldebrand, E., Ekman, S. (2018). Time dependent changes in gene expression induced *in vitro* by interleukin-1 β in equine articular cartilage. *Research in Veterinary Science*, 118: 466-476.
- Lotz, M., Pelletier, J., Christiansen, C., Brandi, M., Bruyère, O., Chapurlat, R., Collette, J., Cooper, C., Giacovelli, G., Kanis, J., Karsdal, M., Kraus, V., Lems, W., Meulenbelt, I.,

- Pelletier, J-P., Raynauld, J-P., Niesert, S., Rizzoli, R., Sandell, L., van Spil, W., Reginster, J. (2013). Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Annals of the Rheumatic Disease*, 72: 1756-1763.
- McIlwraith, C., Frisbie, D., Kawcak, C. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone and Joint Research*, 1: 297-309.
- McIlwraith, C., Kawcak, E., Frisbie, D., Little, C., Clegg, P., Peffers, M., Karsdal, M., Ekman, S., Laverty, S., Slayden, R., Sandell, L., Lohmander, L., Kraus, C. (2018). Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. *Journal of Orthopedic Research*, 36: 823-831.
- Mcoy, A., (2015). Animal models of osteoarthritis: Comparisons and key considerations. *Veterinary Pathology*, 52: 803-818.
- Olson, E. & Carlson, C. (2017). Bones, joints, tendons, and ligaments. 16: Zachary, F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Sixth edition. St. Louis, Missouri. Elsevier Inc.
- Robinson, W., Lepus, C., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T., Sokolove, J. (2016). Low grade inflammation as a key mediator if the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews, Rheumatology*, 12: 580-592.
- Skiöldebrand, E., Ekman, S., Mattsson, L., Hultén, E., Svala, E., Björkman, K., Lindahl, A., Önnelfjord, P., Sihlbom, C, Rüetschi, U. (2017). Cartilage oligomeric matrix protein neopeptide in the synovial fluid of horses with acute lameness: a new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine Veterinary Journal*, 49: 662-667.
- Skiöldebrand, E., Heingård, D., Olofsson, B., Rucklidge, G., Ronéus, N., Ekman, S. (2006). Altered homeostasis of extracellular matrix proteins in joints of standardbred trotters during long-term training programme. *Journal of Veterinary Medicine*, 53: 445-449.
- Svala, E., Löfgren, M., Sihlbom, C., Rüetschi, U., Lindahl, A., Ekman, S., Skiöldebrand, E. (2015). An inflammatory equine model demonstrates dynamic changes of immune response and cartilage matrix molecule degradation *in vitro*. *Connective Tissue Research*, 56: 315-325.
- Tian-wen, M., Yue, L., Guan-ying, W., Xin-ran, L., Ren-li, J., Xiao-Peng, S., Zhi-heng, Z., Hui, B., Xin, L., Li, G. (2017). Changes in synovial fluid biomarkers after experimental equine osteoarthritis. *Journal of Veterinary Research*, 61: 503-508.
- Troeberg, L., Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824: 133-145.
- van Weeren, P.R. (2016). General anatomy and physiology of joints. I: McIlwraith, C., Frisbie, D., Christopher, E., van Weeren, P. *Joint Disease in the Horse*. Second edition. St. Louis, Missouri. Elsevier Inc.

BILDFÖRTECKNING

Figur 1. Heinegård, D. (2009). Proteoglycans and more – from molecules to biology. *International Journal of Experimental Pathology*, 90: 575-586. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2803248/>. Används med skriftligt tillstånd av publikationsförlaget för artikeln.

Figur 2. Används med tillstånd av Eva Skiöldebrand

Figur 3. Lotz, M., Pelletier, J., Christiansen, C., Brandi, M., Bruyère, O., Chapurlat, R., Collette, J., Cooper, C., Giacobelli, G., Kanis, J., Karsdal, M., Kraus, V., Lems, W., Meulenbelt, I., Pelletier, J-P., Raynauld, J-P., Niesert, S., Rizzoli, R., Sandell, L., van Spil, W., Reginster, J. (2013). Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Annals of the Rheumatic Disease*, 72: 1756-1763. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897772>. Används enligt creative commons (CC BY-NC 3.0) licens.