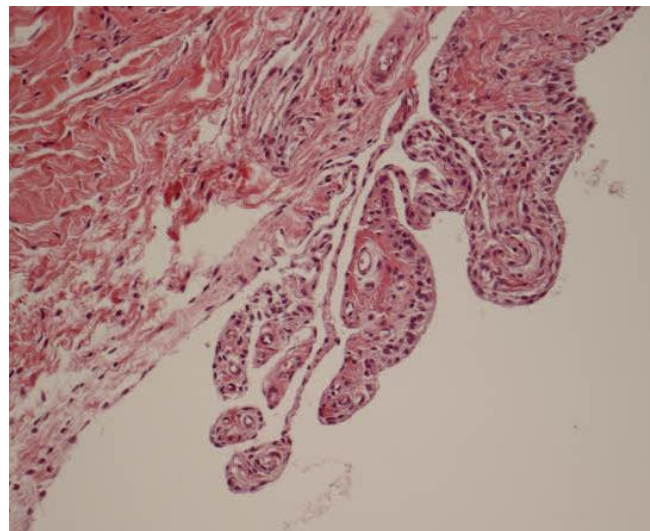


En pilotstudie: förekomst av inflammatoriska celler i synovialmembranet vid osteoartrit hos katt

**Presence of inflammatory cells in the synovial
membrane in cats with osteoarthritis: a pilot study**



Sofia Tengstrand

*Uppsala
2020*

En pilotstudie: förekomst av inflammatoriska celler i synovialmembranet vid osteoartrit hos katt

Presence of inflammatory cells in the synovial membrane in cats with osteoarthritis: a pilot study

Sofia Tengstrand

Handledare: Cecilia Ley, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Biträdande handledare: Karin Vargmar, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Examinator: Caroline Fossum, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

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

Omslagsillustration: fotografi taget av Sofia Tengstrand

Nyckelord: osteoartrit, katt, synovialmembran, synovit, mastceller, makrofager, B-celler, T-celler

Key words: osteoarthritis, feline, synovial membrane, synovitis, mast cells, macrophages, B-cells, T-cells

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

SAMMANFATTNING

Osteoartrit (OA) är en kronisk progressiv ledsjukdom som drabbar synovialleder. En viktig del i sjukdomsförloppet är degradering av ledbrusket, men förändringar ses i alla delar av leden inkluderande subkondralt ben och ledkapsel. Sjukdomen har tidigare ansetts vara en icke-inflammatorisk sjukdom men idag finns evidens för att inflammation är en del av patogenesen. En källa till de pro-inflammatoriska cytokiner som stimulerar nedbrytningen av ledbrusk är celler i synovialmembranet och samband mellan synovit och ledbruskdegeneration kan ses hos både människa och katt.

Prevalensen av OA hos katt är hög och botande behandling saknas. Kunskapen kring den inflammatoriska reaktionen vid OA-relaterad synovit hos katt är idag begränsad. Ökad kunskap inom detta område skulle bidra till ökad förståelse för sjukdomsförloppet och på sikt kunna bidra till att förebygga OA och utveckla nya behandlingsstrategier. Syftet med detta examensarbete var att undersöka förekomst av inflammatoriska celler och deras vävnadsdistribution och infiltrationsmönster i ledkapselpreparat med synovit och utan synovit.

För detektion av makrofager, B- och T-celler utfördes immunohistokemi och för mastceller Giemsa-färgning. En generell bedömning gjordes av vart i vävnaden och i vilket mönster respektive celltyp låg. Korrelation mellan summerad synovitpoäng och grad av ledbruskskada undersöktes. I studien inkluderades 17 individer och totalt undersöktes 18 leder, varav åtta var från talokruralleder (alla med synovit) och tio från armbågsleder (fem med synovit och fem utan synovit) och en jämförelse mellan inflammationsreaktionen i armbågsled och talokruralled utfördes.

Summerad synovitpoäng och grad av ledbruskskada visade en stark korrelation, vilket talar för att synovit har en roll i patogenesen av OA hos katt. Mastceller, makrofager, B- och T-celler kunde hittas hos individer med synovit. Mastceller, makrofager och T-celler förekom också i ledkapselpreparat utan synovit. Mastceller förekom i huvudsak som enskilt liggande celler, eller i grupper om två eller tre och vävnadsdistributionen var subintimal. Makrofager förekom framförallt som enskilt liggande celler och var hos katter med synovit mer jämnt utspridda i vävnaden, jämfört med katter utan synovit där de framförallt förekom i lining. T-celler förekom dominerande i mindre grupper och låg oftast perivaskulärt, men förekom även interstiellt och i lining. B-celler sågs hos minst andel av individerna och samtliga utan synovit hade inget eller minimalt infiltrat av dessa celler. B-cellerna låg huvudsakligen perivaskulärt eller interstitiellt och förekom som enskilt liggande celler eller som mindre del av cellerna i större lymfocytära aggregat. Inga eosinofiler men enstaka neutrofiler påvisades. Dessa celler bedömdes därför ha en underordnad betydelse i den inflammatoriska reaktionen vid OA hos katt. I förhållande till B-celler var T-celler mer förekommande, vilket talar för att det lymfocytära svaret är T-cellsberoende. De undersökta cellernas exakta roll i patogenesen av OA hos katt vore värdefullt att undersöka i framtida studier.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a chronic, progressive joint disease that affects synovial joints. Degeneration of the articular cartilage is an important part of the pathogenesis of the disease, but pathologic changes are seen in all parts of the joint, including the subchondral bone and joint capsule. OA was previously considered a non-inflammatory disease but several studies have shown that inflammation is involved in the development of the disease. The synovial membrane is a source of pro-inflammatory cytokines that can stimulate the degradation of the articular cartilage, and a correlation between synovitis and degeneration of articular cartilage has been described in both human and feline OA.

The prevalence of OA in the feline population is high and there is no cure for the disease. Little is known about the inflammatory reaction in OA-related synovitis in cats, and increased knowledge of the inflammatory process in the synovial membrane may contribute to a better understanding of the disease process, which could aid in disease prevention and finding new treatment strategies. The aim of this master thesis was to investigate presence of inflammatory cells, their tissue distribution and pattern of infiltration in synovial membrane biopsies from feline elbow and talocrural joint.

Macrophages, B- and T-cells were detected by immunohistochemistry and mast cells with Giemsa-stain. An overall assessment of the tissue distribution and pattern of infiltration of each type of immune cell was made. Correlation between synovitis score and grade of cartilage lesions was evaluated. 17 cats were included in the study and a total of 18 joints were assessed. Eight of these were talocrural joints (all with synovitis) and ten were elbow joints (five with synovitis and five without synovitis).

Synovitis score and grade of articular cartilage lesions showed a strong positive correlation, which indicates that synovitis is involved in the pathogenesis of feline OA. Mast cells, macrophages, B- and T-cells were present in cats with synovitis. Mast cells, macrophages and T-cells, but none or only minimal infiltrate of B-cells, were found in cats without synovitis. Mast cells were found in the subintimal region, either as isolated cells or in small groups of two to three cells. The majority of the macrophages were found as isolated cells and evenly distributed in the tissue in cats with synovitis, compared to cats without synovitis where they were found primarily in the lining. T-cells were predominantly found in small groups perivascularly, but were also seen interstitially and in the lining layer. B-cells were uncommon and individuals without synovitis had no or minimal infiltrates. The majority of the B-cells were expressed as isolated cells or as a small part of cells in larger lymphocytic aggregates. The tissue distribution was perivascular or interstitial. No eosinophils and only occasional neutrophils were found in some specimens, which indicated an inferior significance in the inflammatory reaction in feline OA. Compared to B-cells, T-cells were more common which indicates that the lymphocytic response in feline OA is T-cell dependent. The exact role of these investigated cells in the pathogenesis of feline OA would be valuable to investigate in further studies.

INNEHÅLL

Introduktion.....	1
Hypotes.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Ledens uppbyggnad.....	2
Klassificering av leder.....	2
Ledbroskets uppbyggnad och funktion.....	2
Subkondralt ben.....	3
Synovialmembranets uppbyggnad och funktion.....	3
Ledvätska.....	4
OA.....	4
Kroppens immunförsvar.....	5
OA och inflammation.....	6
OA-relaterad synovit.....	8
Metoder för detektion av celltyper i histologiska vävnadspreparat.....	10
Immunohistokemi.....	10
Material och metoder.....	12
Urval av material.....	12
Makroskopisk undersökning och histologisk bedömning av broskskador och synovit.....	12
Färgning av vävnadsmaterial.....	13
Bedömning av förekomst av inflammatoriska celler.....	13
Statistik.....	14
Resultat.....	14
Korrelation mellan allvarlighetsgrad av brosklesioner och synovit.....	15
Vävnadsdistribution och mönster av undersökta inflammatoriska celler.....	17
Förekomst och vävnadsdistribution av mastceller.....	17
Förekomst och vävnadsdistribution av makrofager.....	17
Förekomst och vävnadsdistribution av lymfocyter.....	18
Detaljerade resultat för individer.....	18
Jämförelse mellan grupper.....	20
Lymfocytära aggregat och grad av broskskada.....	20
Korrelation makrofager och synovit samt allvarlighetsgrad av broskskada.....	21
Övriga histologiska iakttagelser.....	22
Diskussion.....	23
Konklusion.....	28
Populärvetenskaplig sammanfattning.....	28
Referenser.....	32
Bilagor.....	1
Bilaga 1.....	1
Bilaga 2.....	2
Bilaga 3.....	3

FÖRKORTNINGAR

- ADAMTS = a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
- AL = Alexandra Leijon
- AN = Albin Norman
- BCR = B-cellsreceptor
- BCS = body condition score
- CD = cluster of differentiation
- CL = Cecilia Ley
- DAMP = damage associated molecular patterns
- ECM = extracellulärt matrix
- HE = hematoxylin och eosin
- Iba1 = joniserat kalciumbindande adaptorprotein 1
- IFN = interferon
- Ig = immunoglobulin
- IL = interleukin
- ILC = medfödd lymfoid cell
- KV = Karin Vargmar
- MAPK = mitogen-activated protein kinase
- MHC = major histocompatibility complex
- MMP = matrix metalloproteinase
- NF- κ B = nuclear factor κ -B
- NK-celler = natural killer celler
- NO = kväveoxid
- OA = osteoartrit
- PAMP = pathogen associated molecular patterns
- PRR = pattern recognition receptors
- ST = Sofia Tengstrand
- TCR = T-cellsreceptor
- TGF = transforming growth factor
- TNF = tumör nekros faktor
- TLR = toll-likareceptorer
- VA = Vidar Andersson
- VEGF = vascular endothelial growth factor

INTRODUKTION

Osteoartrit (OA) är en kronisk, progressiv sjukdom som drabbar synovialleder och ger förändringar i alla ingående delar av leden. Sjukdomen anses ha multifaktoriell etiologi och vilka mekanismer som initierar sjukdomsförloppet är fortfarande oklara (Clarke & Bennett, 2006; Woods, 2016). Sjukdomen har visats ha hög prevalens i kattpopulationen (Clarke *et al.*, 2005; Godfrey, 2005; Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011), och botande behandling saknas. Hos katt är det vanligt att en uppenbar, initierande orsak inte hittas och sjukdomen klassas därför ofta som primär eller idiopatisk (Bennett *et al.*, 2012). Ett tydligt samband mellan stigande ålder och OA har visats i flera studier (Clarke *et al.*, 2005; Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011; Bennett *et al.*, 2012).

En viktig del i patogenesen av OA är nedbrytningen av ledbrosk. Tidigare ansågs OA vara en icke-inflammatorisk sjukdom men det finns idag evidens för att inflammatoriska reaktioner är en del av sjukdomsprocessen. Pro-inflammatoriska cytokiner har visats ha en viktig roll då de stimulerar produktionen av enzymer som degraderar ledbrosket (Tateiwa *et al.*, 2019). Synovialmembranet (ledhinnan) har visats vara en källa till dessa pro-inflammatoriska cytokiner och enzymerna som bryter ned ledbrosket (Benito *et al.*, 2005; Bondeson *et al.*, 2006) och samband mellan inflammation i ledhinnan (synovit) och broskdegeneration har visats hos människa (Ayril *et al.*, 2005; Felson *et al.*, 2016) och katt (Freire *et al.*, 2014). Hos människa har inflammatoriska infiltrat bestående av lymfocyter, plasmaceller, makrofager och mastceller setts i synovialmembranet vid OA (Engberg Damsgaard *et al.*, 1999; Oehler *et al.*, 2002; Smith, 2011). Kunskapen om den inflammatoriska reaktionen och förekomst av inflammatoriska celler i ledhinnan vid OA hos katt är fortfarande mycket begränsad. Lymfoplasmacytära infiltrat i ledhinnan finns rapporterat (Freire *et al.*, 2014; Leijon *et al.*, 2017), men i övrigt är kunskapen om den immunologiska reaktionen i ledhinnan liten.

Enligt författarens vetenskap har ingen tidigare studie som fokuserar på den inflammatoriska reaktionen i ledhinnan, avseende infiltration av inflammatoriska celler utöver förekomst av lymfocyter och plasmaceller publicerats för OA hos katt. Syftet med detta examensarbete var därför att undersöka förekomst och vävnadsdistribution av olika inflammatoriska cellpopulationer i ledhinnan hos katt och förändringar i densamma vid OA-relaterad synovit. Detta för att öka kännedomen om den inflammatoriska reaktionen i ledhinnan och upptäcka eventuella mönster i den immunreaktion som väcks vid OA hos katt. Detta kan vara betydelsefullt för att förstå patogenesen av sjukdomen och i längden vara värdefullt för att förebygga OA och initiera lämpliga behandlingsstrategier. I studien undersöktes förekomst och vävnadsdistribution av inflammatoriska celler i ledkapselpreparat från två olika ledregioner, vilka båda drabbas av OA hos katt; armbågsleder och talokruralleder. Förekomst och distribution av mastceller undersöktes i Giemsa-färgade preparat och förekomst och distribution av makrofager, B- och T-celler med hjälp av immunohistokemi

Hypotes

Celltyper (mastceller, makrofager, B- och T-celler) som beskrivits vid OA-relaterad synovit hos människa förekommer även hos katt vid OA-relaterad synovit. En skillnad kan ses i förekomst, infiltrationsmönster och vävnadsdistribution i synovialmembranet av de undersökta celltyperna mellan katter med och utan synovit. Inflammationen i synovialmembranet är relaterat till graden av broskskada.

LITTERATURÖVERSIKT

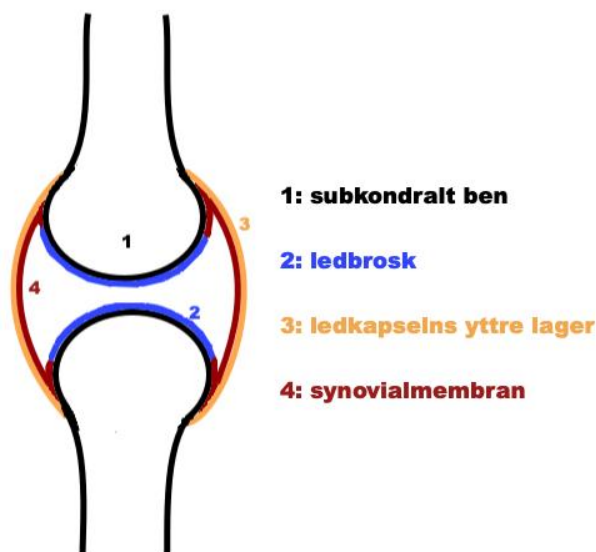
Ledens uppbyggnad

Klassificering av leder

I kroppen bildas leder där två eller flera ben möts. Vissa leders uppgift är att stabilt förena benen medan andra tillåter större rörlighet. Detta ger en stor variation i ledernas utseende och uppbyggnad, beroende på deras syfte. Leder delas in i tre huvudsakliga kategorier; fibrösa leder, broskleder och synovialleder (Dyce *et al.*, 2010).

Fibrösa leder förekommer framförallt mellan skallbenen. I fibrösa leder förenas benen med tät bindväv och lederna har generellt väldigt liten rörlighet. Broskleder är den grupp av leder där benen förenas med brosk och delas upp i underkategorierna synkondroser och symfyser. Synkondroser är oftast temporära leder, såsom mellan epifys och metafys hos unga individer, vilka försvinner när benet växt klart och brosket ossifierats. Symfyser återfinns bland annat mellan bäckenbenen och i ryggkotpelarens intervertebraldisker (Dyce *et al.*, 2010).

I synovialleder möts benändarna i en ledhåla som omsluts av en ledkapsel. Ledhålan är fylld med ledvätska. Benändarna är i dessa leder täckta av hyalint ledbrosk. Synovialledens utformning tillåter mycket rörelse i leden jämfört med de andra två kategorierna av leder och är den vanligaste typen av leder i extremiteterna. Vissa leder stabiliseras av ligament och andra kan innehålla menisker, så som femorotibialleden. Ledbrosket är en viktig komponent i synovialleder och gör att leden klarar av det tryck som kroppsvikten utövar på densamma (Dyce *et al.*, 2010). En schematisk bild av synovialledens uppbyggnad kan ses i figur 1.



Figur 1. Schematisk bild av uppbyggnaden av en synovialled, baserad på texten i Linden *et al.*, 2016.

Ledbroskets uppbyggnad och funktion

Mikroskopiskt delas ledbrosket in i fyra lager (zoner) beroende på kondrocyternas storlek och orientering i vävnaden. Zonerna kallas ytliga zonen, övergångszonen, djupa zonen och mineraliserade zonen. Broskceller (kondrocyter) är den enda celltypen i ledbrosk och utgör ca 5 % av vävnaden. Övriga 95 % utgörs av extracellulärt matrix (ECM), vilket bildas av kondrocyterna och består till största del av proteoglykaner, kollagen och vatten. Proteoglykanerna utgörs främst av aggrecan, ett glykosylerat protein innehållande sulfatgrupper.

Aggrekanmolekyler bildar tillsammans med hyaluronsyra stora aggregat med negativa laddningar. Vatten, som utgör 70-80 % av broskmatrix, dras in i aggregaten av de negativa laddningarna. Kollagenfibrerna ger ledbrösk dess dragfasthet och består framförallt av typ II kollagen, men även typ V, VI, IX, X och XI förekommer. Då ledbrösk pressas ihop förflyttas vattnet i matrix vilket gör att näringsämnen kan transporteras till kondrocyterna. Kondrocyterna måste kontinuerligt bilda nya matrixkomponenter för att ersätta de som degraderas. Äldrade kondrocyter utsöndrar mindre matrix med mindre aggrekankomplex. Detta, tillsammans med korsbindning av kollagen, gör att brosket får sämre dragfasthet och elasticitet med stigande ålder (Linden *et al.*, 2016). Kondrocyter syntetiserar och degraderar matrixkomponenter som svar på förändringar i mikromiljön, exempelvis förändringar i tillväxtfaktorer, cytokiner och biomekaniska krafter (Wei & Bai, 2016).

Ledbrösk har dålig förmåga att regenerera vid skada då det inte innehåller några blodkärl. Kondrocyter i moget brosk har begränsad förmåga att öka syntesen av matrixkomponenter och visar liten mitotisk aktivitet. Reparation av ytliga skador och skador som når ner till subkondralt ben skiljer sig åt. Djupare skador orsakar en blödning i subkondralt ben och medför att primitiva mesenkymala celler når lesionen. Dessa celler kan utveckla kondrocytegenskaper och lesionen kan fyllas med fibröst brosk. Ytliga skador orsakar ingen blödning och därför sker ingen spontan reparation. Närliggande kondrocyter kan proliferera och bilda små kluster och producera nytt matrix, men de migrerar inte in i lesionen (Cancedda *et al.*, 2003; Linden *et al.*, 2016).

Subkondralt ben

Under ledbrösket ligger en tunn platta av subkondralt ben som ledbrösket fäster vid. Denna platta består av ett mineraliserat benlager som separerar ledbrösket från benmärgen. Exakt vad som definieras ingår i den subkondrala benplattan skiljer sig åt, då zonen med kalcifierat brosk ibland inkluderas i den subkondrala benplattan och ibland inte (Madry *et al.*, 2010). Subkondralt ben innehåller nerver och blodkärl och har bland annat som funktion att vara en källa till näring för kondrocyterna (Scanzello & Goldring, 2012). Den subkondrala benplattan, som är mer formbar än kortikalt ben, har även som funktion att överföra och fördela trycket som läggs på belastat ledbrösk till underliggande ben (Madry *et al.*, 2010; Linden *et al.*, 2016).

Synovialmembranets uppbyggnad och funktion

Alla synovialleder omges av en ledkapsel som byggs upp av en yttre, fibrös kapsel och ett inre synovialmembran, vilket täcker ytan in mot ledhålan. Den fibrösa kapseln sammanfogas med benets periost på varje sida av leden och begränsar ledens rörelseomfång. Ledkapseln kan även vara förstärkt med fokala förtjockningar, ligament eller senor som fäster in till ledkapseln. Den fibrösa delen av ledkapseln är välvaskulariserad och innerverad (Linden *et al.*, 2016).

Synovialmembranet täcker all inre yta av synoviallederna förutom ledbrösket. Synovialmembranet är slätt men i vissa delar kan ett litet antal mindre villi förekomma normalt. Förtjockade veck av synovialmembranet, innehållande fettvävnad, kan fylla upp triangulära rum som bildas då runda benändar inte fyller ut hela ledhålan (så kallade fettkuddar) (Linden *et al.*, 2016). Synovialmembranet består av två lager. Innerst mot ledhålan finns en tunn, cellulär intima (även kallat lining) som är cirka en till tre celler djup. Lagret vilar inte på något basalmembran då de ingående cellerna är av mesenkymalt ursprung. Under denna ligger en relativt acellulär subintima bestående av kollagen bindväv innehållande blodkärl, lymfkärl, fettvävnad, nerver, fibroblaster och ett litet antal antigenpresenterande celler. Den luckra bindväven i subintiman smälter samman med den kompakta bindväven i den fibrösa ledkapseln (Smith, 2011; Linden *et al.*, 2016).

Cellerna som bygger upp synovialmembranet kallas synoviocyter och delas upp i två olika typer baserat på deras morfologi, funktion och uttryck av cellytemarkörer. Typ A synoviocyter är makrofagiska och härstammar från benmärg. Dessa celler har en fagocyterande och antigenpresenterande funktion. I normala synovialmembran utgör de en mindre del av cellerna men ökar kraftigt vid inflammatorisk artrit. Typ B synoviocyter härstammar från fibroblaster. De syntetiserar hyaluronan och ECM-komponenter såsom kollagen. De kan även producera flera olika enzymer, till exempel matrix metalloproteinaser (MMP), som kan degradera brosk och ben och de uttrycker ett flertal adhesionsmolekyler, vilka kan ha betydelse för cellulär trafik över synovialmembranet. Båda celltyperna har förmåga att producera cytokiner som interleukin (IL)-1, IL-6 och tumör nekros faktor (TNF)- α (Smith, 2011; Linden *et al.*, 2016).

Synovialmembranets huvudsakliga funktioner är att producera komponenter till ledvätskan, kontrollera ledvätskan volym och komposition och genom detta även reglera nutrition till kondrocyterna. Det har också som viktig funktion att bidra till att ge ledbrosket en friktionsfri rörelseyta i leden (Smith, 2011; Scanzello & Goldring, 2012). Mindre partiklar kan röra sig både in och ut ur ledvätskan då synovialmembranet är fritt permeabelt för dessa (Linden *et al.*, 2016). Detta gör att mindre molekyler som cytokiner och tillväxtfaktorer kan diffundera över synovialmembranet, medan de större, smörjande molekyler som lubricin och hyaluronan hålls kvar i ledvätskan (Scanzello & Goldring, 2012).

Ledvätska

Ledvätskan är en klar, färglös till svagt gul vätska och innehåller hyaluronan som bidrar till vätskans höga viskositet. Hyaluronan tros fungera som ett smörjningsmedel för synovialmembranet, medan själva ledytan smörjs av lubricin. Mängden ledvätska i synovialleder är normalt sett liten men volymen kan öka kraftigt vid skada och inflammation. Normalt innehåller ledvätskan endast ett litet antal mononukleära celler och enstaka synoviocyter. Förutom att ledvätskan smörjer leden är den också den främsta källan till näring till kondrocyterna (Linden *et al.*, 2016).

OA

OA är en progressiv sjukdom som drabbar synovialleder. Sjukdomen är ett komplext tillstånd och har ofta en multifaktoriell etiologi. Sjukdomen karaktäriseras av ledbroskdegeneration, osteofytbildning, remodelering av subkondralt ben och synovit. Sjukdomen är irreversibel och botande behandling saknas (Clarke & Bennett, 2006; Woods, 2016). På humansidan har man börjat se på OA som ett heterogent syndrom med olika kliniska fenotyper som leder till en slutlig, gemensam klinisk manifestation. Dessa olika kliniska fenotyper baseras på vilken vävnad i leden som är värst drabbad. Indelning av sjukdomen baserat på olika etiologier har också föreslagits, till exempel genetisk, östrogen-beroende eller åldersrelaterad. Metabol OA har också diskuterats som en fenotyp av OA, då övervikt både leder till ökad belastning på lederna men även förändrar nivån av adipokiner (cytokiner som utsöndras från fettvävnad) vilket kan ha en effekt på utvecklingen av OA (Castaneda *et al.*, 2014).

Hundar utvecklar ofta sjukdomen sekundärt till funktionell, strukturell eller traumatisk ledabnormalitet (Woods, 2016). Hos katter är det vanligt att man inte kan hitta någon uppenbar, initierande orsak till OA och sjukdomen klassas därför ofta som primär eller idiopatisk OA (Clarke & Bennett, 2006; Bennett *et al.*, 2012). Kända orsaker till OA hos katt är bland annat trauma, höftledsdysplasi, mukopolysackaridos, medial patellaluxation, akromegali, Scottish Fold osteokondrodysplasi och andra artropatier (Clarke & Bennett, 2006; Bennett *et al.*, 2012; Perry, 2014).

I ett flertal studier där radiologiska tecken på OA har undersökts har prevalensen av sjukdomen hos katt varierat mellan 16,5-91 % (Clarke *et al.*, 2005; Godfrey, 2005; Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011). De vanligast drabbade lederna är bogled, armbågsled, höftled, knäled och tarsalled (Godfrey, 2005; Clarke & Bennett, 2006; Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011). Sjukdomen drabbar vanligen leder bilateralt (Godfrey, 2005; Clarke & Bennett, 2006; Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011). Flertalet studier har visat ett tydligt samband mellan OA och stigande ålder (Clarke *et al.*, 2005; Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011; Bennett *et al.*, 2012), medan kroppsvikt, body condition score (BCS) eller kön inte är korrelerat med förekomst av OA hos katt (Clarke *et al.*, 2005; Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011). Andra studier har dock visat att katter med OA hade signifikant högre kroppsvikt och BCS jämfört med friska katter (Ryan *et al.*, 2013; Stadig *et al.*, 2019) så det kan eventuellt finnas ett samband.

Symtom som kan ses hos katter med OA är att de hoppar sällan och lägre, stelhet, minskad pälsvård, minskad aktivitet, ökad vila samt att de kan bli mindre sociala och interagerar mindre med ägare eller andra djur (Slingerland *et al.*, 2011; Perry, 2014). Hälta är inte ett typiskt symtom för OA hos katt utan ses enbart hos ett mindre antal individer (Clarke *et al.*, 2005; Clarke & Bennett, 2006; Slingerland *et al.*, 2011).

Kroppens immunförsvar

Kroppens immunförsvar kan delas in i det medfödda (ospecifika) immunförsvaret och det adaptiva (specifika) immunförsvaret. Det medfödda immunförsvaret är kroppens första försvar mot patogener som ska kunna reagera snabbt och vara på konstant stand-by. Det adaptiva immunförsvaret aktiveras och är effektivt först efter några dagar till veckor. Det adaptiva immunförsvaret kan ses som ett mer komplext och sofistikerat system och har till skillnad från det medfödda systemet ett minne. Detta medför att om kroppen stöter på samma patogen igen är försvaret mycket mer effektivt (Tizard, 2013).

En viktig skillnad mellan medfödda och adaptiva immunförsvaret är mekanismerna och receptorerna som används för igenkännande av antigen. Varje lymfocyt, som ingår i det adaptiva immunförsvaret, har en unik receptor som genereras slumpartat. Detta medför att det finns en oerhört stor repertoar av olika receptorer som kan binda till oerhört många olika molekyler. När en lymfocyt stöter på ett antigen som just dess receptor har affinitet för sker en klonal expansion av just den typen av lymfocyt (Medzhitov & Janeway, 2000). Det medfödda immunförsvaret aktiveras istället via ett mer begränsat antal receptorer som kan binda till molekyler som vanligen uttrycks på många olika mikrober. Dessa receptorer kallas för pattern recognition receptors (PRRs). Dessa receptorer uttrycks bland annat på så kallade sentinelceller (även kallat vaktpostceller) som har som primär funktion att känna igen och reagera på invaderande mikrober. PRRs aktiveras av exogena molekyler, så kallade pathogen associated molecular patterns (PAMPs) men också av endogena molekyler som utsöndras från skadade eller döda celler, så kallade damage associated molecular patterns (DAMPs) (Medzhitov & Janeway, 2000; Tizard, 2013). Toll-likareceptorer (TLRs) är en familj av receptorer som tillhör PRRs. TLRs uttrycks på cellytan eller intracellulärt på många olika celltyper, bland annat sentinelceller som makrofager, mastceller och dendritiska celler (Tizard, 2013).

I detta examensarbete undersöktes förekomst av mastceller, makrofager, B- och T-celler och därför ges en kort sammanfattning av dessa celltyper och deras funktion nedan.

Makrofager ingår i det medfödda immunförsvaret och är en celltyp med många olika funktioner. Den verkar som sentinelcell och detekterar antigen via PRRs, utsöndrar många olika kemokiner

och cytokiner som stimulerar till infiltration av andra inflammatoriska celler i vävnaden och fagocyterar både patogener och celldebris. Makrofager kan delas in i två olika typer; M1- och M2-makrofager. Så kallade M1-makrofager kan producera kväveoxid (NO), har en viktig roll i försvar mot mikrober och producerar pro-inflammatoriska cytokiner, vilka driver på den inflammatoriska reaktionen. M2-makrofager kan inte producera NO och har en motsatt effekt mot M1-makrofager, då de producerar anti-inflammatoriska cytokiner och minskar den inflammatoriska reaktionen. M2-makrofager främjar istället angiogenes, reparation och remodelering av skadad vävnad. Detta gör att M1-makrofager typiskt förekommer tidigt i inflammationsförloppet för att stimulera inflammation och M2-makrofager har en roll i senare stadier då läkning är viktig (Tizard, 2013).

Även mastceller ingår i det medfödda immunförsvaret. Mastceller fungerar likt makrofager som sentinelcell och aktiveras bland annat via PRRs. Mastcellers granula innehåller en komplex blandning av inflammatoriska mediatorer (till exempel histamin), enzymer och cytokiner som vid utsöndring leder till en akut inflammatorisk reaktion. Mastceller har även en viktig roll vid typ 1 överkänslighetsreaktioner (Tizard, 2013).

B- och T-celler ingår i det adaptiva immunförsvaret. B-celler är ansvariga för det antikropps-medierade försvaret i adaptiva immunsystemet, då de producerar antikroppar efter att de stött på antigen. B-celler kan, efter aktivering, differentiera till plasmaceller som producerar stora mängder antikroppar. T-celler utgör det cell-medierade försvaret i adaptiv immunitet. Det finns flera subpopulationer av T-celler med olika funktioner; T-hjälparceller, cytotoxiska T-celler och regulatoriska T-celler. T-hjälparceller uttrycker cellytemolekylen cluster of differentiation (CD) 4. CD4 är en receptor för major histocompatibility complex (MHC) klass II-molekyler, vilka uttrycks på antigen-presenterande celler. T-hjälparceller delas upp i ytterligare grupper, nämligen Th1, Th2 och Th17, beroende på vilka cytokiner de utsöndrar. Th1 producerar interferon (IFN)- γ och IL-2, vilket bland annat främjar makrofag-aktivering och natural killer (NK)-cellers cytotoxicitet. Th2 utsöndrar bland annat IL-4, vilket bland annat stimulerar antikroppsproduktion. Th17 utsöndrar framförallt IL-17 och har som funktion att främja inflammation och stimulera B-celler. Cytotoxiska T-celler uttrycker CD8 som är en receptor för MHC klass I-molekyler. Cytotoxiska T-celler dödar celler som uttrycker främmande antigen. Regulatoriska T-celler uttrycker CD4 och CD25 (en del av receptorn för IL-2) och har en viktig roll i att reglera immunförsvaret (Tizard, 2013).

För att kunna detektera de olika immuncellerna som undersökts i detta arbete har bland annat detektion av CD-proteiner använts. För att detektera B-celler har CD79, som utgör det signalöverförande komplexet i B-cellsreceptorn (BCR), använts som cellmarkör. För att detektera T-celler har CD3, som är det signalöverförande komplexet i T-cellsreceptorn (TCR) använts som cellmarkör. När det gäller makrofager har joniserat kalciumbindande adaptorprotein 1 (Iba1) använts. Iba1 är involverad i omformningen av cytoskelettet vid cellförflyttning och fagocytos (Oshawa *et al.*, 2000).

OA och inflammation

Mycket av den forskning som har gjorts kring patogenesen vid OA härrör från studier på människa eller musmodeller för sjukdomen. Följande fakta som redovisas under denna och nästa rubrik är alltså konstaterade på människa eller mus, om inte annat anges. Då forskning om patogenesen av OA hos katt är mycket begränsad anses ändå denna fakta vara relevant att redovisa för förståelse av sjukdomen. Det baseras på antagandet att även snarlika mekanismer gäller mellan olika species. Naturligtvis är det dock ett antagande som behöver bekräftas med mer forskning kring sjukdomen hos katt.

OA anses ha en multifaktoriell etiologi och exakt vilka mekanismer som rubbar homeostasen i ledbrösket är ännu inte känd. Tidigare ansågs OA vara en icke-inflammatorisk artropati men det finns idag evidens för att inflammation är viktig för progression av sjukdomen. Pro-inflammatoriska cytokiner inhiberar kondrocyternas syntes av kollagen och proteoglykaner och främjar produktion av MMPs och aggrecanaser, vilka degraderar ECM-komponenter såsom kollagen och aggrecan. Dessa två enzymfamiljer produceras av kondrocyter i ledbrösk och fibroblaster och makrofager i synovialmembranet. Nedbrytningen börjar med en fibrillering av det ytliga lagret, följt av fissurer som involverar djupare lager i ledbrösket. ECM fragmenteras och slutligen fås en förlust av samtliga brosklager och subkondralt ben blottas. Nedbrytningen av ECM anses vara den viktigaste processen i degraderingen av ledbrösk (Tateiwa *et al.*, 2019) och när kollagennätverket börjar degraderas verkar ett icke-reversibelt stadie uppnås (Loeser *et al.*, 2012). Via mikrofissurer, kärlkanaler och diffusion kan även subkondralt ben exponeras för cytokiner och tillväxtfaktorer producerade av kondrocyter vilket påverkar benremodellering (Wei & Bai, 2016).

Produktion av MMPs stimuleras av inflammatoriska cytokiner och tillväxtfaktorer, till exempel TNF- α , IL-1 β och IL-17 och transforming growth factor (TGF)- β (Tateiwa *et al.*, 2019). MMPs delas in i olika typer baserat på deras substratspecificitet. MMP13 har en viktig roll i nedbrytning av ledbrösk då den framförallt bryter ned kollagen typ II som är vanligt förekommande i ECM (Wei & Bai, 2016; Tateiwa *et al.*, 2019). A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) är en enzymfamilj som tillhör aggrecanaser. Särskilt ADAMTS4 och ADAMTS5 är viktiga för nedbrytningen av aggrecan. Både IL-1 β och TNF- α stimulerar produktion av ADAMTS4 av kondrocyter. ADAMTS5 verkar däremot produceras konstant i leder och produktionen påverkas inte av cytokiner. ADAMTS5 har därför troligtvis en roll i vanlig matrix-omsättning medan ADAMTS4 induceras vid inflammation (Tortorella *et al.*, 2001).

Det är visat att degradering av ECM-komponenter kan stimulera till inflammation. Exempelvis kan fibronectinfragment stimulera kondrocyter att producera cytokinerna IL-1 β , IL-6, IL-8 och TNF- α (Pulai *et al.*, 2005). Detta tyder på att degradering av brosket kan inducera en inflammatorisk miljö genom att stimulera kondrocyterna att utsöndra pro-inflammatoriska cytokiner. Aktivering och stimulering av kondrocyter vid OA sker primärt via transkriptionsfaktorerna nuclear factor κ -B (NF- κ B) och mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Loeser *et al.*, 2012). TLR-aktivering i synovialmembranet är en viktig stimulus för NF- κ B-aktivering och efterföljande produktion av de ovan nämnda cytokinerna samt kemokiner som i sin tur rekryterar och aktiverar makrofager, granulocyter och lymfocyter till vävnaden (Scanzello & Goldring, 2012). IL-1 β och TNF- α inducerar även NF- κ B (Miagkov *et al.*, 1998), så cytokinerna både produceras efter aktivering av transkriptionsfaktorn samt stimulerar den. NF- κ B uttrycks hos patienter med OA och uttrycket har visats vara högst vid tidiga stadier av OA (Benito *et al.*, 2005; Ostojic *et al.*, 2017). Inhibering av NF- κ B har visats leda till minskad produktion av cytokiner (Miagkov *et al.*, 1998; Pulai *et al.*, 2005; Loeser *et al.*, 2012). Även produktionen av flera olika MMPs är beroende av aktivering av NF- κ B (Scanzello & Goldring, 2012).

Just IL-1 β och TNF- α är två cytokiner som fått mycket uppmärksamhet i OA-forskning. IL-1 β och TNF- α produceras i leder av kondrocyter, osteoblaster, synoviocyter och inflammatoriska celler. Då de två cytokinerna aktiverar samma grupp av intracellulära signalvägar har de liknande effekter, det vill säga ökar inflammatoriska reaktioner i leden samt driver på nedbrytning av ledbrösk genom inhibering av syntes av kollagen typ II och aggrecan och stimulering av MMPs och ADAMTS4 (Wojdasiewicz *et al.*, 2014). Hämmning av både IL-1 β och TNF- α leder till hämning av produktionen av MMPs och ADAMTS4, vilket tyder på att

båda dessa cytokiner bidrar till att driva på degraderingen av ECM vid OA (Bondeson *et al.*, 2006). Dock har medicinsk behandling med försök att blockera effekterna av IL-1 β hos människor enbart lett till minimal minskning av symtom (Cohen *et al.*, 2011), vilket visar att patogenesen vid OA är väldigt komplex och involverar många olika faktorer.

Andra cytokiner som föreslagits ha en roll i patogenesen av OA är IL-6, IL-15, IL-17 och IL-18. IL-6 är en cytokin som produceras av kondrocyter, osteoblaster, typ B synoviocyter, makrofager och adipocyter, ofta efter stimulering av IL-1 β och TNF- α . IL-6 har synergistiska effekter på ledbrusk med IL-1 β och TNF- α , det vill säga minskad produktion av matrixkomponenter och ökad produktion av MMPs (Bondeson *et al.*, 2006; Wojdasiewicz *et al.*, 2014). Dock visade en studie på möss att mus-hanar som saknade IL-6 utvecklade allvarligare brosklesioner jämfört med möss som uttryckte IL-6 (de Hooge *et al.*, 2005). Detta visar på att cytokinen har en komplex roll i patogenesen. Involveringen av IL-15 i patogenesen av OA inkluderar stimulering av differentiering och proliferation av T-celler. IL-17 och IL-18 inhiberar syntes av ECM-komponenter och stimulerar produktion av MMPs. IL-17 stimulerar även utsöndring av vascular endothelial growth factor (VEGF) vilket leder till angiogenes i synovialmembran. Noterbart är att många inflammatoriska cytokiner stimulerar produktion och utsöndring av andra inflammatoriska cytokiner vilket gör att inflammationen driver på sig själv på ett autokrint sätt (Wojdasiewicz *et al.*, 2014). Även komplementkaskaden kan ha en roll i patogenesen vid OA, men exakt hur är oklart (Scanzello & Goldring, 2012; Wei & Bai, 2016).

Avseende katt visade Gruen *et al.* (2017) att katter med högre grad av radiologiska tecken på OA hade högre serumkoncentrationer av IL-4 och IL-8, jämfört med friska katter. Man såg även att katter med högre grad av ortopedisk smärta hade högre serumkoncentrationer av IL-8, IL-2 och TNF- α . IL-8 ökade dock med högre ålder och fyndet bör därför tolkas med försiktighet då ålder är en vanlig riskfaktor för att utveckla OA. Det bör också noteras att normala referensvärden för cytokiner hos katt inte är fastställda, vilket gör resultaten svårtolkade, då det inte går att säga om de förhöjda cytokinnivåerna hos dessa katter var högre än normalt.

Då de underliggande mekanismerna som initierar OA hos katt är okända undersökte Gao *et al.* (2013) i en studie om katter med OA uppvisade annorlunda genuttryck jämfört med åldersmatchade, friska kontroller. Av de undersökta generna var gener involverade i immunförsvarsreaktioner och oxidativ fosforylering nedreglerade medan anti-apoptotiska gener var uppreglerade hos katter med OA. Generellt var genuttrycket mer homogent hos katter utan OA medan de med OA visade större variation i genuttryck. När det gällde immunförsvaret var det framförallt gener involverade i antigenpresentation via MHC-molekyler och T-cellsreceptor-signaler som var påverkad hos katter med OA. Uttrycket av gener som kodar för CD3, CD4 och CD8, som alla är viktiga för T-cellers funktion i immunförsvaret, var nedreglerad hos de sjuka katterna. Detta resultat tolkades som att katter som drabbats av OA kan ha en sämre funktion i det T-cellsmedierade immunförsvaret.

OA-relaterad synovit

Inflammationen och det inflammatoriska cellinfiltratet i synovialmembranet vid OA är ofta lindrigt (Oehler *et al.*, 2002; Rollin *et al.*, 2008). Inflammation i synovialmembranet, synovit, har dock visats ha en potentiell roll i progression av sjukdomen. Bland annat visade en prospektiv studie att synovit var kopplat till smärta vid OA i knäleden, associerad med mer allvarlig kondropati vid studiens start och mer allvarlig progression av broskskador (Ayril *et al.*, 2005). En annan studie visade att synovit var en riskfaktor för att utveckla OA i knäleden (Felson *et al.*, 2016).

Vid OA-relaterad synovit hos människa infiltrerar lymfocyter, plasmaceller och makrofager synovialmembranet. Lymfocyterna ligger ofta perivaskulärt och kan ibland bilda folliculära aggregat. Lining-lagret förtjockas vid OA, bland annat på grund av en ökning av typ A synoviocyter (Oehler *et al.*, 2002; Smith, 2011; Linden *et al.*, 2016) och histologiska tecken på aktivering av celler i lining-lagret, i form av hypertrofi och hyperplasi av cellerna, kan också ses vid OA (Oehler *et al.*, 2002). Infiltration av mononukleära celler, angiogenes och uttryck av proinflammatoriska cytokiner och nukleära transkriptionsfaktorer har visats vara högre vid tidiga stadier av OA jämfört med senare, vilket tyder på att inflammationen i synovialmembranet är kraftigast tidigt i sjukdomen (Benito *et al.*, 2005; Ostojic *et al.*, 2017). Andra tecken på synovit är stromalt ödem och proliferation av blodkärl (Smith, 2011).

Vid en experimentell inducering av OA hos möss sågs under de två första veckorna aktivering av synoviala makrofager, infiltration av ett lågt antal inflammatoriska celler, ökat uttryck av tillväxtfaktorer i synovialmembranet och fibros. Detta tyder på att inflammatorisk aktivering av celler i synovialmembranet kan vara en bidragande faktor för progressionen av OA (Blom *et al.*, 2004).

Mycket tyder på att makrofager i synovialmembranet är betydelsefulla i patogenesen av OA. En studie visade att frånvaro av makrofager hade stor effekt på nivån av MMPs, särskilt MMP-2, MMP-3 och MMP-9 (Blom *et al.*, 2007). Samma studie visade även att möss med lägre antal makrofager i synovialmembranet hade mindre tendens att utveckla allvarligare brosklesioner vid spontant uppkommen OA jämfört med kontrollmöss. Det är dock oklart om det är det ökade antalet makrofager som resulterar i svårare broskskador, eller om de infiltrerar vävnaden på grund av ökad förekomst av broskskador och det broskdebris som bildas (Blom *et al.*, 2007). Makrofager tros även spela en viktig roll i bildandet av osteofyter, tillsammans med TGF- β . En experimentell modell för att inducera osteofytbildning är att injicera TGF- β intraartikulärt, då det leder till osteofytbildning liknande den vid OA. I en studie utplånade man synoviala makrofager och när TGF- β sedan injicerades för att inducera osteofytbildning visades denna vara kraftigt reducerad hos leder utan makrofager, vilket tyder på att de har en roll i bildandet av osteofyter (van Lent *et al.*, 2004). Makrofager i lining och sublining är aktiverade vid tidig OA. Utplåning av makrofager i lining innan experimentell inducering av OA leder till minskad fibros, minskad hyperplasi av lining och minskad infiltration av inflammatoriska celler, vilket tolkats som att makrofager spelar en viktig roll i tidiga stadier av sjukdomen (Blom *et al.*, 2004). I cellkulturer bestående av celler från synovialmembran från patienter med OA togs makrofager bort via magnetisk cellsortering. Detta ledde till minskning i produktion av TNF- α , IL-1 β , IL-8, MMP1 och MMP3, jämfört med cellkulturer med makrofager, vilket tyder på att makrofagerna har en viktig regulatorisk roll vid produktion av MMPs och proinflammatoriska cytokiner (Bondeson *et al.*, 2006).

T-celler är den huvudsakliga lymfocyten i inflammatoriska infiltrat i synovialmembranet vid OA och anses inte förekomma i normala synovialmembran (Haynes *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002). Infiltrerande lymfocyter uppvisar en aktiverad fenotyp då de uttrycker aktiveringsmärkaren CD69 (Rollin *et al.*, 2008). Både CD4-positiva och CD8-positiva T-celler förekommer i synovialmembran vid OA, dock är andelen CD4-positiva celler större. Cellerna är framförallt lokaliserade i sublining och djupare i synovialmembranet och ligger ofta perivaskulärt (Haynes *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002). Både Th1- och Th2-celler förekommer men andelen Th1-celler är större (Ishii *et al.*, 2002). T-celler i ledvätska har visat en cytokinprofil som tyder på Th1-fenotyp (Haynes *et al.*, 2002).

Mastceller förekommer i normala synovialmembran hos människor, men antalet ökar vid OA. Mastcellerna är lokaliserade i sublining, ofta perivaskulärt (Dean *et al.*, 1993; Engberg

Damsgaard *et al.*,1999). Tecken på att mastceller degranulerat har även setts vid OA, vilket tyder på att de är aktiva och därmed kan bidra till patogenesen vid OA (Dean *et al.*, 1993).

Andra inflammatoriska celler, såsom neutrofiler och multinukleära jätteceller har också rapporterats förekomma i synovialmembran, och då i samband med förekomst av ben och brosk-debris i leden (Oehler *et al.*, 2002).

Fyra olika histologiska mönster av synoviopatier har beskrivits vid OA; hyperplastisk, inflammatorisk, fibrotisk och detritus-rik. Hyperplastisk typ karaktäriseras av enbart synovial hyperplasi, inflammatorisk typ karaktäriseras av måttliga lymfocytära infiltrat och synovial hyperplasi, fibrotisk typ karaktäriseras av framförallt kapsulär fibros, och detritus-rik typ karaktäriseras av förekomst av ben- och broskdebris. Den hyperplastiska formen sågs nästan enbart hos patienter i tidiga sjukdomsstadier, medan den fibrotiska och detritus-rika typen enbart sågs i senare stadier av sjukdomen. Den inflammatoriska typen sågs både vid tidiga och senare stadier av OA (Oehler *et al.*, 2002).

Histologiska förändringar som setts i synovialmembran hos katter med OA är lindrig synovit i form av synovial hyperplasi och mild inflammation. En signifikant korrelation mellan synovit och ökad allvarlighetsgrad av broskskador har också visats (Freire *et al.*, 2014; Leijon *et al.*, 2017). I studien av Freire *et al.* (2014) hade de synovialmembran med högst synovit-score lymfoplasmacytära nodulära infiltrat perivaskulärt.

Metoder för detektion av celltyper i histologiska vävnadspreparat

Immunohistokemi

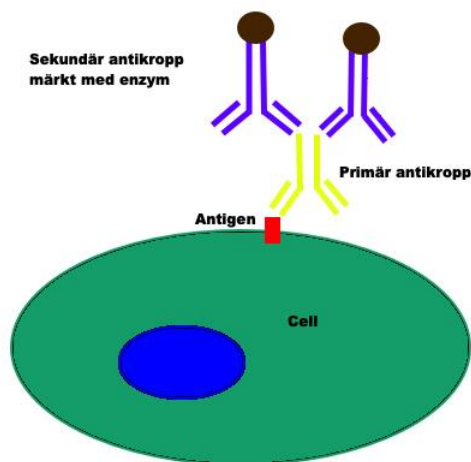
Immunohistokemi är en färgningsteknik som möjliggör identifiering av specifika cellpopulationer i formalinfixerad och paraffinbäddad vävnad. Tekniken baseras på användandet av antikroppar riktade mot specifika antigen som enbart uttrycks i eller på den celltyp man vill färga in. En stor fördel med immunohistokemi är att man i samband med utförandet även kan färga in vävnaden med kärnfärgning, såsom hematoxylin, för samtidig bedömning av vävnads-morfologi (Jackson & Blythe, 2008).

Antikroppar, även kallade immunoglobuliner (Ig), bildas av B-celler som aktiverats. Antikroppar är formade som ett Y och byggs upp av två lätta och två tunga kedjor. “Armarna” på antikroppen kallas Fab-region (fragment, antigen-binding) och ytterst finns en variabel domän som bildar en urholkning dit antigen kan binda. Formen på urholkningen och aminosyrasekvensen i detta område varierar mellan olika antikroppar och ger dem dess specificitet. De variabla domänerna är bilateralt identiska, varje antikropp har därmed två likadana antigenbindande delar. “Svansen” på antikroppen kallas Fc-region (fragment, crystallizable). Det finns fem olika klasser av immunoglobuliner, IgG, IgM, IgA, IgE och IgD, som skiljer sig åt genom vilka tunga kedjor som antikroppen består av och de olika klasserna har något olika funktion inom immunförsvaret (Tizard 2013). IgG är den vanligaste klassen av immunoglobuliner som används inom immunohistokemi. Både polyklonala antikroppar, som alla är riktade mot samma antigen men med lite olika specificitet, och monoklonala antikroppar som alla har samma specificitet kan användas till immunohistokemi (Jackson & Blythe, 2008).

Immunohistokemi är en teknik som består av flera steg som något förenklat kan beskrivas som följande. Då vävnadsmaterial samlas in för histologisk undersökning krävs fixering av vävnaden för att bevara cellmorfologi och arkitektur, vilket oftast sker genom att vävnaden fixeras i formalin. För att underlätta snittning av vävnaden bäddas biopsierna ofta in i paraffin efter formalinfixeringen. Biopsierna snittas sedan tunt och läggs på ett glas. Inför all histologisk

färgning behöver paraffinet smältas bort och vävnaden rehydreras. Vid fixering med formalin bildas bindningar till protein i vävnaden vilket gör att antigen kan maskeras. Antikropparna kan då inte binda in och man får ingen infärgning av celler som egentligen uttrycker antigenet. Antikroppar är riktade mot. För att avmaskera antigen görs en så kallad "antigen retrieval". Några av de lösningar som är mest använda idag för "antigen retrieval" är citratbuffert med pH 6,0 och EDTA med pH 8,0. Utöver mikrovågsugn kan tryckkokare, ångning eller vattenbad användas för uppvärmning av preparaten. Enzymdigestion kan också användas för "antigen retrieval", men är idag i princip ersatt av värmeinducerade tekniker (Jackson & Blythe, 2008).

Efter "antigen retrieval" inkuberas vävnadspreparaten med antikroppar riktade mot ett antigen som uttrycks av enbart de celler man vill färga in. Denna antikropp kallas primär antikropp. Antikropparna är märkta med ett enzym, vanligen pepparrotsperoxidase (eng. horseradish peroxidase (HRP)). När ett kromogen, som är ett förstadium till ett färgämne, tillsätts omvandlar enzymet kromogenet till ett färgämne som är synligt i ljusmikroskop. Det finns flera olika kromogener som ger olika färg men 3,3'-Diaminobensidin-tetrahydroklorid (DAB), som ger en brun färg, är den vanligaste. Vid direkt teknik är enzymet konjugerat till den primära antikroppen. Vid indirekt teknik är det en sekundär antikropp, som är riktad mot den primära antikroppens Fc-del, som är enzymmärkt (schematisk bild kan ses i figur 2). Denna metod har högre sensitivitet då flera antikroppar kan reagera på den primära och binda in, vilket ger en signalamplifiering då det är fler antikroppar som färgas in (Jackson & Blythe, 2008). Flera tekniker finns beskrivna men detaljer kring dessa tas ej upp i detta arbete.



Figur 2. En schematisk bild av indirekt teknik vid immunohistokemi. Baserat på texten i Jackson & Blythe, 2008.

Vid varje immunohistokemisk färgning bör kontroller användas för att validera resultatet. Genom att färga en vävnad där den eftersökta cellen garanterat förekommer kontrolleras färgningsprotokollet och antikropparnas specificitet. Varje vävnadspreparat som färgas in bör även ha en negativ kontroll. Antigen appliceras ingen primär antikropp på dessa preparat eller så används en antikropp riktad mot ett helt annat, irrelevant protein (Jackson & Blythe, 2008).

MATERIAL OCH METODER

Urval av material

I denna studie ingick leder från 17 katter som donerats till SLU för forskning och undervisning. Totalt inkluderades 18 leder i projektet. Ledbiopsier från 14 av katterna utgjorde del av ett större material som samlats in under 2014 till ett tidigare projekt om OA hos katt. Detta material var graderat avseende synovit av en patolog (CL) och en resident i veterinär patologi (AL). För att säkerställa att ledkapselmaterialet som undersöktes i examensarbetet skulle inkludera både leder med synovit och leder utan synovit valdes preparaten till denna studie ut av handledarna. Målet med urvalet var att ge ett representativt material för att kunna undersöka synovitreaktionen i två olika leder och att materialet skulle utgöras av ett ungefärligt lika antal leder med synovit respektive avsaknad av synovit. För att komplettera andelen individer med friska leder samlades material från hasleder in från tre katter under september 2019. Inklusionskriterier för dessa tre katter var att de skulle vara över 1,5 års ålder, inte varit avlivade mer än 24 timmar innan provtagning, inte ha en känd sjukdomshistorik som kan ha påverkat leden samt uppvisa ett makroskopiskt normalt utseende på synovialmembranet. Eftersom alla de leder som kompletterats för studien histologiskt uppvisade låggradig synovit kom det slutliga materialet att utgöras av fem armbågsleder med synovit, fem armbågsleder utan synovit och åtta talokruralleder med synovit.

Makroskopisk undersökning och histologisk bedömning av broskskador och synovit

Samtliga ingående leder undersöktes makroskopiskt inom ett dygn efter avlivning av en patolog (CL). Som hjälp för att bedöma grad av brosklesioner applicerades svart bläck (India Ink, Lefranc & Bourgeois, Le Mans Cedex, France) spädd 1:5 i 0,9 % NaCl-lösning på ledbroskytan på de 14 leder som provtagits i den tidigare OA-studien och på två av de kompletterande lederna. Efter att India Ink-lösningen försiktigt torkats av fixerades lederna i 10 % buffrad formalinlösning. Efter ca. 48 timmars fixering togs biopsier av ledkapseln och resterande ledvävnad lades i myrsyra (20 % v/v, Kristensens lösning, Solveco AB, Rosersberg) för urkalkning av benvävnad. Efter urkalkning skars ledbrosk och underliggande subkondralt ben ut för histologisk bedömning. Histologisk preparering skedde enligt rutinprotokoll.

För den mikroskopiska bedömningen användes preparat från ledkapsel och ledbrosk med underliggande subkondralt ben färgade med hematoxylin och eosin (HE). Ledbroskpreparat färgades även med toulidinblått. Histologiska förändringar i ledbrosk, subkondralt ben och synovialmembran bedömdes var för sig och graderades av två patologer (CL, AL). För gradering av lesioner i ledbrosket användes en modifierad version av OARSIs (Osteoarthritis Research Society International) histopatologiska graderingssystem för human OA (Bilaga 1) (Pritzker *et al.*, 2006). Gradering av ledbroskskador gjordes för varje humerus (två lokaliseringar bedömda), ulna (två lokaliseringar bedömda) och radius respektive tibia, fibula och talus. Lesioner med grad 0-1 klassades som ingen OA, mellan grad 1,5-2,5 klassades som milda, 3-4,5 måttliga och lesioner ≥ 5 som kraftiga. Det kompletterande materialet graderades på liknande sätt av två patologer (CL och KV). Därefter räknades ett medelvärde av broskskadorna ut för varje led. Synovit bedömdes enligt ett modifierat publicerat protokoll av Krenn *et al.* (2006) (Bilaga 2), där sammantagen poäng för tre olika bedömningsområden resulterade i en summerad synovitpoäng. Individer med en summa mellan 0-1 klassades som ingen synovit, 2-4 låggradig synovit och 5-9 höggradig synovit.

Färgning av vävnadsmaterial

För detektion av inflammatoriska celler utfördes immunohistokemi med antikroppar riktade mot CD79 (B-celler), CD3 (T-celler) och Iba1 (makrofager) av samtliga ledkapselpreparat. För fullständiga protokoll se bilaga 3. Då Iba1-antikroppen aldrig använts på labbet innan utfördes först ett försök där ett lämpligt färgningsprotokoll och en lämplig spädning på den primära antikroppen testades. Testprotokollet utformades i samråd med biomedicinska analytiker på BVF (VA och AN) och baserades på protokoll enligt Pierezan *et al.* (2014). Giemsa-färgning för detektion av mastceller utfördes av BVFs personal (AN). All immunohistokemi utfördes av författaren (ST). Vid samtliga immunohistokemiska färgningar användes lymfknuta som positiv kontroll och vid färgning av mastceller användes en mastcellstumör som positiv kontroll.

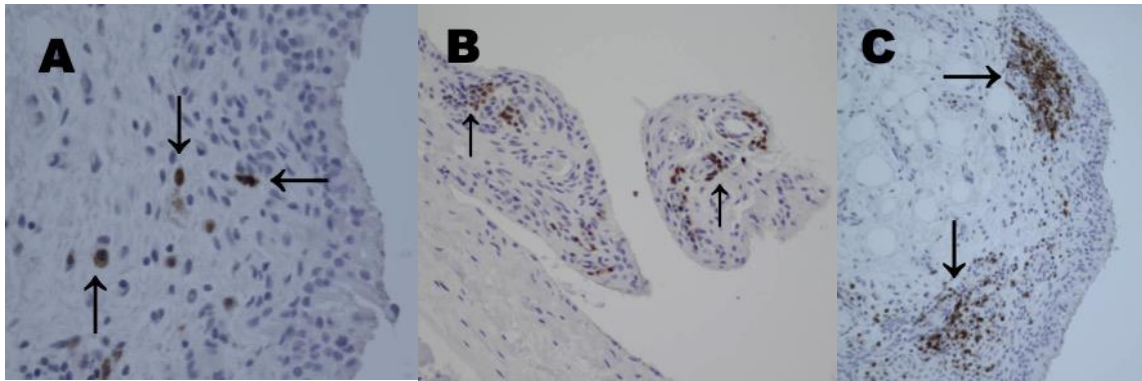
Bedömning av förekomst av inflammatoriska celler

Preparaten kodades för blindning för avläsaren (ST). Alla preparat bedömdes i sin helhet avseende vävnadsdistribution, och mer specifikt om de inflammatoriska cellerna förekom perivaskulärt, interstitiellt eller i lining. En bedömning gjordes även av i vilket mönster majoriteten av cellerna förekom i vävnaden, enligt kriterier i tabell 1.

Tabell 1. Kriterier för de olika mönstren

Mönster	Kriterium
0	Inget infiltrat
1	Minimalt infiltrat, <10 celler totalt
2	Cellerna ligger enskilt, eller 2 eller 3 tillsammans. >10 celler totalt
3	Mindre grupper med cirka 5-10 celler
4	Större aggregat med tydligt mer än 10 celler

Exempel på de olika mönstren visas i figur 3. Kriterier för att en cell skulle bedömas som immunohistokemiskt positiv var tydlig infärgning samt att infärgningen skulle gå att koppla till en cellkärna. Preparaten bedömdes på 200x och/eller 400x förstoring och en subjektiv bedömning gjordes av i vilken del av vävnaden majoriteten av cellerna låg och i vilket mönster enligt ovan. Då de ledkapselpreparat med mönster 1 hade så få positiva celler gjordes ingen bedömning av vävnadsdistribution hos dessa. Om inte enbart ett dominerande mönster kunde bestämmas och i en del av vävnaden noterades alla de mönster och delar av vävnaden som bedömdes som vanligast förekommande. Förekomst av mönster 4 noterades alltid, även om det inte var det dominerande mönstret, då det ansågs vara den allvarligaste förekomsten av inflammatoriska celler. För Iba1-positiva celler gjordes även en bedömning av antal positiva celler i lining genom att i tre områden räkna 50 celler och andelen positivt infärgade av dessa. Ett medelvärde av de tre värdena räknades sedan ut. Områden där antalet celler räknades valdes ut subjektivt efter var det var rikligast infiltrat av positivt infärgade celler i preparatet.



Figur 3. I bild A visas exempel på vad som bedömts som mönster 2, i bild B visas exempel på mönster 3 och i bild C visas exempel på mönster 4. Positivt infärgade celler är bruna (pilar).

Förekomst av neutrofiler, eosinofiler, ”foamy” makrofager och multinukleära jätteceller bedömdes gemensamt av ST och CL i HE-färgade preparat. För dessa cellpopulationer gjordes ingen specifik bedömning av lokalisation i vävnaden eller i vilket mönster, utan enbart förekomst noterades.

Statistik

För statistisk analys användes statistikprogrammet Minitab 18 (Minitab, Ltd. Coventry, Storbritannien) och två online-beräknare för statistiska analyser (<http://vassarstats.net> och <https://astatsa.com>). Spearmans rangkorrelation användes för att beräkna korrelation mellan summerad synovitpoäng och medelvärde av grad av brosklesion och korrelation mellan medelvärde av andel makrofager i lining och medelvärde av grad av brosklesion. För bedömning av styrkan på korrelationen användes följande skala: 0-0,19 mycket svag korrelation, 0,20-0,39 svag korrelation, 0,40-0,59 måttlig korrelation, 0,60-0,79 stark korrelation och 0,80-1 mycket stark korrelation (Swinscow, 1997).

Mann-Whitney U-test användes för att jämföra medelvärdet av antal makrofager i lining mellan olika grupper. Samband mellan lymfocyttaggregat och grad av broskskada (mild vs. måttlig-kraftig) testades med Fishers exakta test. Vid denna analys med Fishers exakta test delades katterna upp i två grupper avseende brosklesionerna. De med ett medelvärde under 2,5 ingick i gruppen med lindriga förändringar och de med ett medelvärde på eller över 2,5 ingick i gruppen med måttliga-kraftiga förändringar. Fishers exakta test användes även för att analysera skillnader i mönster och vävnadsdistribution mellan gruppen med synovit och utan synovit samt mellan armbågsled och talokruralled.

Signifikansnivån som användes för samtliga analyser var 0,05.

RESULTAT

I studien ingick ledkapselbiopsier från 17 katter. Åldersspannet på katterna var mellan 1 och 18 år (medelålder 9,6 år). Tio katter var hankastrater och sju var honkastrater. Detaljer kring individer (ålder, kön, led och huvuddiagnos vid obduktion) redovisas i tabell 2.

Tabell 2. Demografisk data för individer som ingick i studien

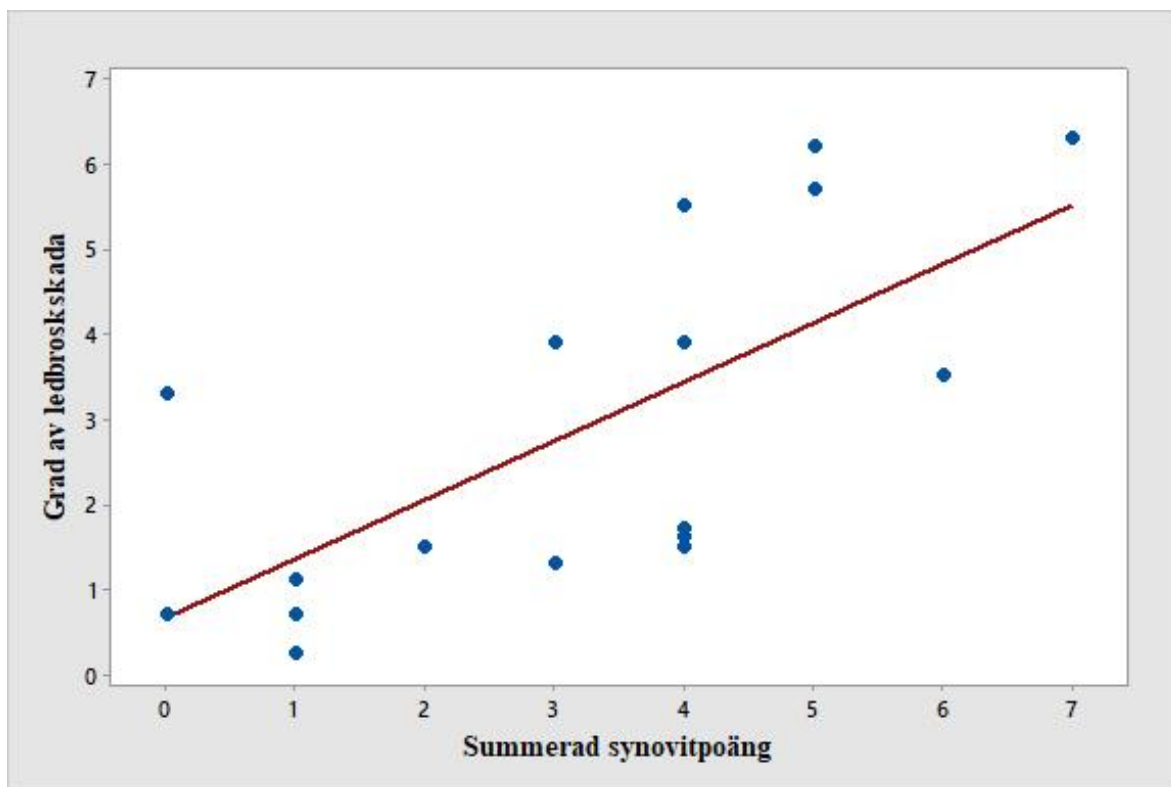
Individnr.	Ålder (år)	Kön*	Led	Huvuddiagnos vid obduktion
3	1	Hane	Armbågsled	Non-purulent meningoencephalomyelit
9	18	Hona	Talokruralled	Trauma med blödning i hjärna och ryggmärg
10	3	Hona	Armbågsled	Non-purulent meningoencephalomyelit
11	12	Hane	Armbågsled Talokruralled	Diskdegeneration T11-12, spondylos L7-S1
14	8	Hane	Armbågsled	Astrocytom
17	6	Hane	Armbågsled	Kronisk nefrit med uremi
18	16	Hane	Armbågsled	FIP
19	9	Hane	Armbågsled	Misstänkt lymfom i tarm, lymfknotor
20	16	Hona	Armbågsled	Ej obducerad
21	7	Hona	Armbågsled	Akut tubulär nekros med uremi
22	13	Hane	Talokruralled	Misstänkt trauma
23	3	Hona	Armbågsled	FIP
26	11	Hane	Talokruralled	Meningiom (lymfom i thymus)
31	10	Hona	Talokruralled	Kronisk nefrit med uremi
ST1	9	Hane	Talokruralled	Kronisk aktiv nekrotiserande rhinit samt sinusit
ST2	13	Hane	Talokruralled	Carcinom i multipla organ
ST3	9	Hona	Talokruralled	Akut blödning och myelomalaci ryggmärg L4-L5, med axonal degeneration

*samtliga individer var kastrerade

Korrelation mellan allvarlighetsgrad av brosklesioner och synovit

Antalet ledkapselbiopsier med synovit från armbågsleden var fem stycken och från talokruralleden åtta stycken. Antalet biopsier utan synovit var fem stycken och samtliga kom från armbågsleden. Fördelningen mellan höggradig, låggradig respektive ingen synovit och medelvärde av grad av brosklesion i motsvarande led visas i tabell 3. Fördelningen mellan grupperna var fem individer med höggradig synovit, åtta med låggradig synovit och fem utan synovit. Nio katter ansågs ha mildare grad av brosklesioner och nio måttlig-kraftig grad av brosklesioner. Alla katter uppvisade histologiska förändringar av ledbrosket.

Summerad synovitpoäng och medelvärde av grad av broskskada visade en stark positiv korrelation (ρ 0,715) med p-värde 0,001, vilket visas i figur 4.



Figur 4. Graf över medelvärde av grad av ledbroskskada och summerad synovitpoäng, med en regressionslinje som visar den starka, positiva korrelationen. Prickarna symboliserar de olika individerna.

Tabell 3. Summerad synovitpoäng och medelvärde av grad av brosklesion

Led	Individ	Summerad synovitpoäng	Grad av brosklesion (medelvärde)
Armbågsled	11	6	3,5
	18	5	6,2
	20	4	1,6
	19	4	3,9
	14	3	3,9
	3	1	0,25
	10	1	0,7
	23	1	1,1
	17	0	3,3
	21	0	0,7
Talokruralled	22	7	6,3
	26	6	3,2
	11	5	5,7
	ST2	4	1,7
	ST3	4	1,5
	9	4	5,5
	31	3	1,3
	ST1	2	1,5

Höggradiga synoviter är fetmarkerade och låggradiga understrukna. Övriga har ingen synovit.

Vävnadsdistribution och mönster av undersökta inflammatoriska celler

Katt nummer 17 fick uteslutas ur denna del av studien då ledkapselpreparaten bedömdes innehålla för lite lining för att kunna utvärderas. Vid immunohistokemi färgades ledkapselpreparaten från individ nummer 26 in för blekt för att kunna bedömas för alla celltyper utom Iba1-positiva celler och uteslöts därför från bedömning av de övriga celltyperna. Ledkapselpreparat från ytterligare två individer (nummer ST3 och 20) blev för blekt infärgade vid immunohistokemi med CD79 för att kunna bedömas och uteslöts därför vid bedömning av den celltypen.

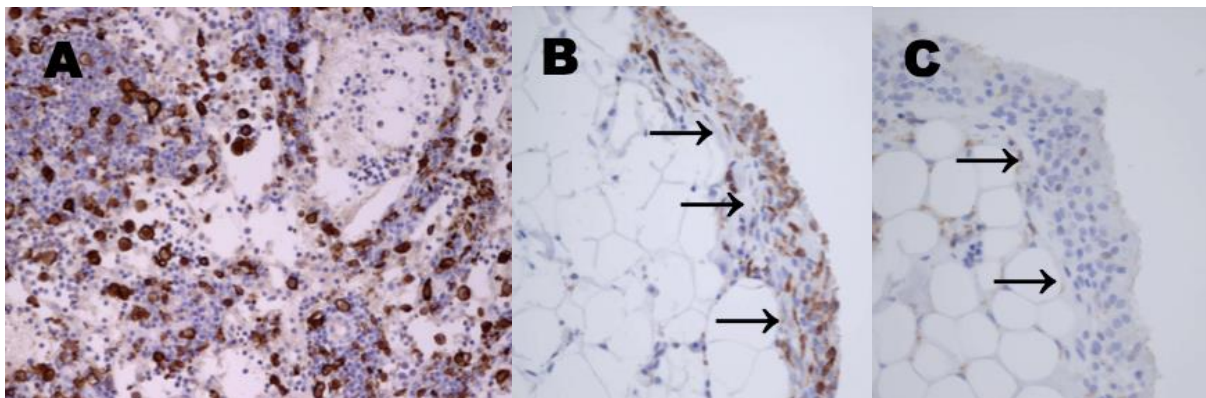
Förekomst och vävnadsdistribution av mastceller

Mastceller förekom i samtliga undersökta preparat. De bedömdes alltid förekomma i huvudsakligen mönster 2, och låg alltid interstitiellt eller perivaskulärt. Inga mastceller kunde ses i lining. Detaljer kring varje individ redovisas i tabell 4 och 5.

Vid den histologiska genomgången gjordes en subjektiv bedömning av om infiltratet av mastceller var lindrigare eller rikligare. Tre av fyra individer utan synovit bedömdes ha lindrigare infiltrat men även tre av 16 individer med synovit ansågs ha lindrigare infiltrat.

Förekomst och vävnadsdistribution av makrofager

Antikroppen som användes för att färga in makrofager hade aldrig tidigare använts på laboratoriet och behövde därför utvärderas. En tydlig positiv infärgning, huvudsakligen cytoplasmatisk, av makrofagliga celler i lymfknutan erhöles vid immunohistokemisk färgning (figur 5 A) och antikroppen bedömdes därför fungera bra med det protokoll som användes. Positiva celler kunde även hittas i samtliga ledkapselpreparat med en ställvis väldigt kraftig andel positiva celler i lining. Dock förekom det områden med väldigt få positiva celler, trots tydlig hyperplasi, vilket visas i figur 5 B och 5 C. Infärgning av celler med annorlunda morfologi i perifera nerver som inkluderats i biopsierna kunde också ses.



Figur 5. I bild A ses positivt infärgade celler (bruna celler) i lymfknuta. Bild B visar ett ledkapselpreparat med hyperplasi av lining och många Iba1-positiva celler, markerat med pilar, och bild C visar ett ledkapselpreparat med synovit och låg förekomst av positiva celler i lining, markerat med pilar.

Makrofager förekom också i samtliga undersökta preparat. Majoriteten av cellerna bedömdes ligga enskilt och utspridda i alla undersökta delar av vävnaden, men ställvis väldigt kraftiga infiltrat kunde ses i lining i flera preparat. En tendens till att makrofagerna framförallt låg i lining hos de katter utan synovit kunde också ses. Detaljer kring varje individ redovisas i tabell 4 och 6.

Förekomst och vävnadsdistribution av lymfocyter

CD3-positiva celler (T-celler) fanns i samtliga ledkapselpreparat. Infiltraten bedömdes vara minimala hos två individer utan synovit. T-cellerna bedömdes huvudsakligen ligga i mindre grupper hos katter med synovit, men varierade mer i mönster hos de utan synovit. Cellerna bedömdes oftast ligga perivaskulärt hos både katter med synovit och utan synovit. Hos vissa katter med synovit bedömdes de även ha dominerande förekomst interstitiellt och i lining. Hos katter utan synovit var den dominerande vävnadsdistributionen dock aldrig i lining. Detaljer kring varje individ redovisas i tabell 4 och 7.

CD79-positiva celler (B-celler) förekom hos minst andel individer (10 av 14). Tre av de fyra individerna utan infiltrat uppvisade ej synovit och den fjärde individen låggradig synovit. Fyra individer hade även minimalt infiltrat av B-celler, varav tre tillhörde gruppen med synovit och en gruppen utan synovit. Bland de katter med rikligare infiltrat var mönstret blandat mellan mönster 2 och 4. B-cellernas vävnadsdistribution var aldrig dominerande i lining utan framförallt interstitiellt eller perivaskulärt. Flertalet av de celler som färgade in positivt hade ett utseende liknande plasmaceller i form av måttlig mängd cytoplasma och ojämnt fördelat heterokromatin i kärnan. Binukleära plasmaceller förekom också i två preparat, men var totalt enbart cirka sex celler. Detaljer kring varje individ redovisas i tabell 4 och 8.

Detaljerade resultat för individer

I tabell 4 redovisas resultat för vilket mönster som ansetts dominera vid celluttryck för varje celltyp. Hos tre katter angavs två olika mönster för T-celler (n=2) och B-celler (n=1) och då har det mönster motsvarande större ansamling av celler angetts. Exempelvis om T-celler förekommit både enskilt (2) och i mindre grupper (3) i lika stor utsträckning har 3 redovisats i tabellen. Motiveringen till detta är att större ansamlingar av celler antas ge större inflammatorisk påverkan. Detta är även i linje med hur graderingen av synovit gjorts enligt den modifierade skalan av Krenn *et al.* (2006) där förekomst av större aggregat av lymfocyter gett högre poäng jämfört med enstaka.

Tabell 4. Huvudsakligt distributionsmönster i vävnaden

Grupp	Individnr.	Dominerande mönster			
		Mastceller	Makrofager	T-celler	B-celler
Armbågsleder med synovit	11	2	2	3	1
	14	2	2	3	2
	18	2	2	3	1
	20	2	2	3	.*
	19	2	2	3	0
Talokruralleder med synovit	9	2	2	3	4
	11	2	2	3	2
	22	2	2	4	2
	26	-	2	-	-
	31	2	2	3	4
	ST1	2	2	2	1
	ST2	2	2	3	2
Armbågsleder utan synovit	ST3	2	2	3	-
	3	2	2	2	1
	10	2	2	1	0
	21	2	2	3	0
	23	2	2	1	0

*celltypen ej har kunnat bedömas hos individen

I tabell 5, 6, 7 och 8 redovisas resultat för var i vävnaden majoriteten av cellerna från de olika celltyperna låg. Ibland kunde ingen uppenbar dominerande vävnadsdistribution ses och då har alla de områden där flest antal celler funnits angetts. De individer med minimalt infiltrat (mönster 1) har ej inkluderats då antalet celler i vävnaden varit för få för att kunna dra några slutsatser om vävnadsdistributionen. Detta, tillsammans med att vissa färgningar av ledkapsel-preparaten misslyckades, gör att totalantalet bedömda individer varierar mellan de olika tabellerna.

Tabell 5. *Sammanställning av mastcellers dominerande vävnadsdistribution*

Grupp	Antal bedömda individer/totalantal	Antal individer med dominerande förekomst		
		Lining	Interstitiellt	Perivaskulärt
Armbågsled med synovit	5 av 5	0	5	5
Talokruralled med synovit	7 av 8	0	7	7
Ej synovit	4 av 4	0	4	4

Tabell 6. *Sammanställning av makrofagers dominerande vävnadsdistribution*

Grupp	Antal bedömda individer/totalantal	Antal individer med dominerande förekomst		
		Lining	Interstitiellt	Perivaskulärt
Armbågsled med synovit	5 av 5	4	4	4
Talokruralled med synovit	8 av 8	6	4	5
Ej synovit	4 av 4	4	2	1

Tabell 7. *Sammanställning av T-cellers dominerande vävnadsdistribution*

Grupp	Antal bedömda individer/totalantal	Antal individer med dominerande förekomst		
		Lining	Interstitiellt	Perivaskulärt
Armbågsled med synovit	5 av 5	2	1	5
Talokruralled med synovit	7 av 8	2	3	6
Ej synovit	2 av 4	0	1	2

Tabell 8. *Sammanställning av B-cellers dominerande vävnadsdistribution*

Grupp	Antal bedömda individer/totalantal	Antal individer med dominerande förekomst		
		Lining	Interstitiellt	Perivaskulärt
Armbågsled med synovit	2 av 4	0	1	1
Talokruralled med synovit	5 av 8	0	4	2
Ej synovit	3 av 4	0	0	0

Jämförelse mellan grupper

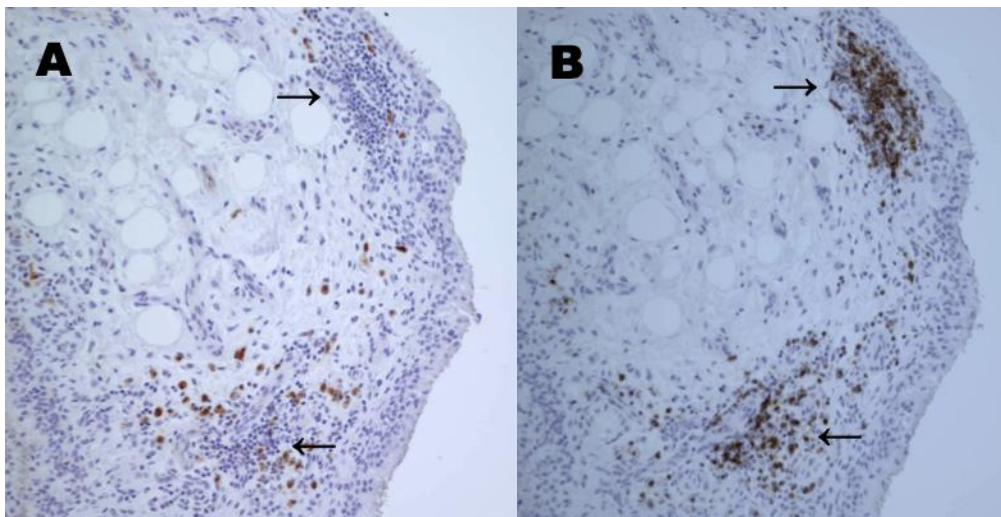
Jämförelse mellan katter med synovit och katter utan synovit avseende mönster och vävnadsdistribution visade enbart ett signifikant resultat, nämligen T-cellers mönster i vävnaden som visade ett beroende med förekomst av synovit eller ej (tvåsidigt p-värde 0,039). Övriga resultat var ej signifikanta (p-värden mellan 0,16-1). Mastceller och makrofager uppvisade ingen skillnad mellan de olika individerna avseende mönster och vävnadsdistribution, respektive enbart mönster, och kunde därför inte jämföras mellan grupperna.

Vid jämförelse mellan armbågsleder och talokruralleder erhöles inget signifikant resultat som kunde visa att mönster eller vävnadsdistribution av celler skulle vara beroende av vilken led. Slutsatsen blev därför att det inte förelåg någon skillnad mellan lederna gällande de parametrarna. Fördelningen av hög respektive låggradig synovit var jämn mellan armbågsleder och talokruralleder.

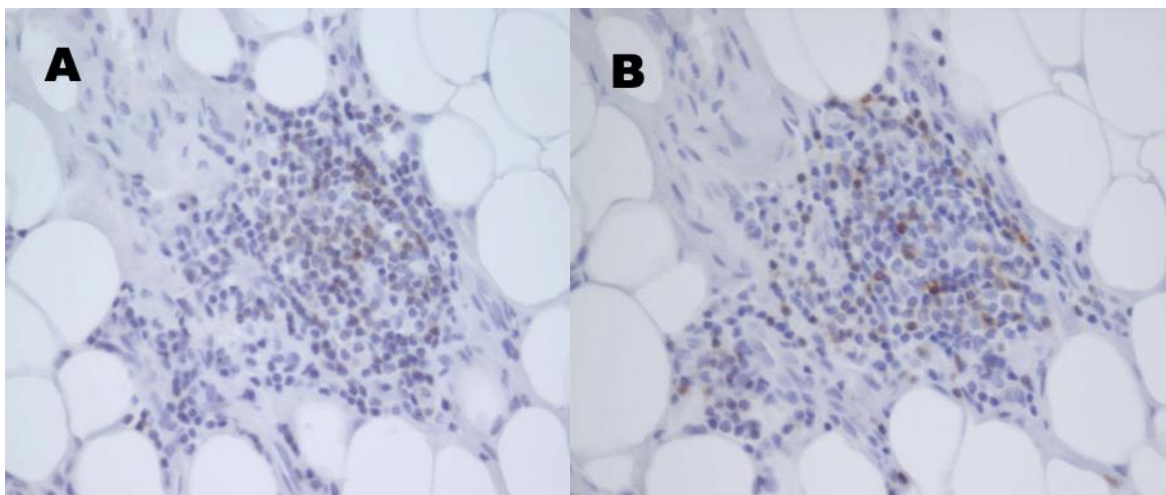
Lymfocytära aggregat och grad av broskskada

Förekomst av större lymfocytära aggregat (mönster 4) noterades för samtliga ledkapselpreparat, även om det inte var det dominerande mönstret. Av ledkapselpreparat med synovit bedömdes sju av tolv (cirka 58 %) innehålla minst ett lymfocytärt aggregat. Tre av dessa var höggradiga synoviter. Inget av de fyra ledkapselpreparaten utan synovit hade lymfocytära aggregat. I flera lymfocytära aggregat bedömdes andelen T-celler vara fler än B-celler, exempel visas i figur 6. I vissa aggregat fanns även flera lymfocytlika celler som varken uttryckte CD79 eller CD3, vilket visas i figur 7.

Då förekomst av större follikulära aggregat gav högst poäng avseende inflammatoriska celler vid bedömning av synovitpoäng, och antogs ge en stor inflammatorisk påverkan, testades det om förekomst av större lymfocytära aggregat visade ett samband med måttlig-kraftig grad av broskskada. Inget samband kunde påvisas (p-värde 0,6).



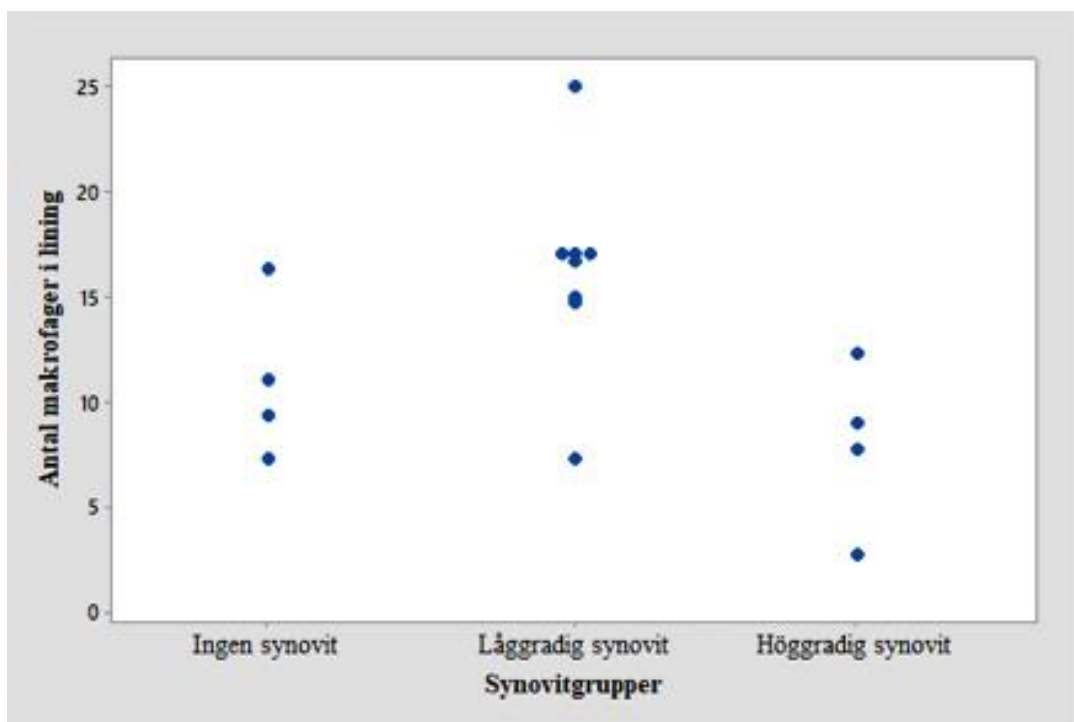
Figur 6. I bild A ses två större lymfocytära aggregat utmärkta med pilar, med infärgning av celltemarkören CD79 (B-celler). I bild B visas motsvarande aggregat men här med infärgning för celltemarkören CD3 (T-celler), som utgör majoriteten av cellerna i aggregaten.



Figur 7. I bild A visas ett aggregat med infärgning för B-celler. I bild B visas samma aggregat men med infärgning för T-celler. Flera av de lymfocytiska cellerna har inte blivit positivt infärgade för någon av de två olika cellytemarkörerna.

Korrelation makrofager och synovit samt allvarlighetsgrad av broskskada

Medelvärdet av antalet makrofager i lining varierade mellan 2,7 och 30,3 per 50 celler. Ingen signifikant skillnad mellan gruppen med synovit och den utan kunde påvisas (p-värde 0,33). Dock sågs en signifikant skillnad mellan hög- och låggradiga synoviter (p-värde 0,03) där antalet var högre hos individer med låggradig synovit. En jämförelse av värden mellan grupperna visas i figur 8. Det förelåg ingen signifikant korrelation mellan antalet makrofager och grad av ledbroskskada (p-värde 0,258). Antalet positiva celler för varje individ redovisas i tabell 9.



Figur 8. Fördelning av medelvärden av antal makrofager per 50 celler för grupperna ingen synovit, låggradig synovit och höggradig synovit.

Tabell 9. *Medelvärde av antalet makrofager av 50 lining-celler*

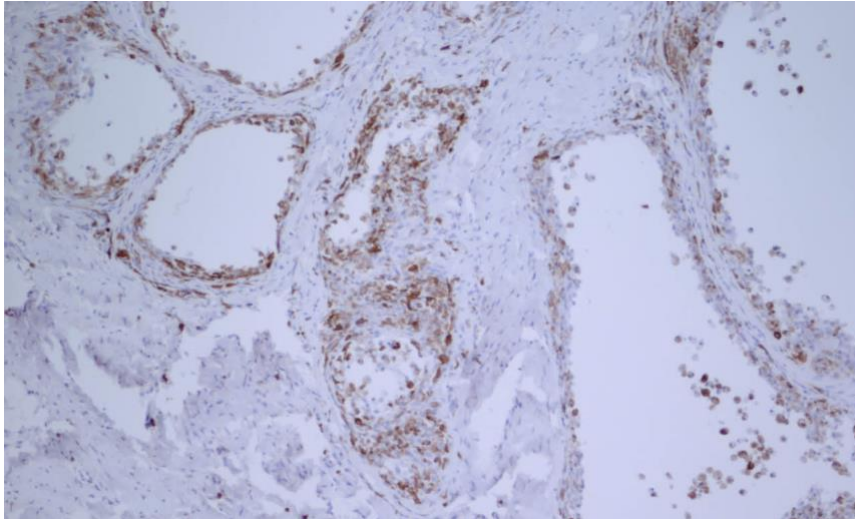
Grupp	Individ	Andel positiva celler av 50 lining-celler
Höggradig synovit	11	2,7
	11	12,3
	18	7,7
	22	9
	26	-*
Låggradig synovit	9	7,3
	14	14,7
	19	15
	20	25
	31	17
	ST1	17
	ST2	16,7
	ST3	17
Ej synovit	3	16,3
	10	11
	21	9,3
	23	7,3

**Andelen Iba1-positiva celler kunde ej räknas hos individ 26 då kärnfärgningen var för svag i ledkapselpreparatet.*

Övriga histologiska iakttagelser

Sparsamt med neutrofillika celler förekom i elva ledkapselpreparat. Tio av dessa uppvisade synovit. Inga eosinofiler sågs hos någon individ. Multinukleära celler påvisades i två ledkapselpreparat, båda med synovit.

Ledkapselpreparaten från individ 26 och hasleden från individ 11 uppvisade en något annorlunda histologisk bild. I ledkapselpreparaten kunde flera cystlika förändringar ses där kaviteterna utlinjerades av rikligt med makrofager med skummigt utseende, ”foamy” makrofager. Makrofagerna kunde också ligga löst i dessa kaviteter. Ett av dessa preparat innehöll även multinukleära jätteceller. Det histologiska utseendet visas i figur 9. ”Foamy” makrofager kunde även hittas i ytterligare två ledkapselpreparat, båda med synovit.



Figur 9. Foto av histologiskt preparat från ledkapsel från katt nr 11. Bilden visar multipla cystiska kaviteter. Dessa utlinjeras av rikligt med Iba1-positiva celler, som även ligger löst i kaviteterna.

DISKUSSION

Syftet med detta arbete var att undersöka förekomsten av inflammatoriska celler och deras vävnadsdistribution vid OA-relaterad synovit. Förhoppningen var att få en ökad förståelse för den inflammatoriska reaktionen i synovialmembranet då kunskapen kring denna är väldigt begränsad hos katt.

Ett av de mest intressanta fynden i denna studie var att summerad synovitpoäng och grad av broskskada visade en stark positiv korrelation. Materialet är litet i denna studie och bör tolkas med försiktighet, men resultatet är i linje med tidigare studier av Freire *et al.* (2014) och Leijon *et al.* (2017) som också sett att synovitgrad och allvarlighetsgrad av brosklesioner i leden är associerade med varandra. Att detta samband kan påvisas tyder på att den inflammatoriska reaktionen i synovialmembranet kan ha en roll vid patogenesen vid OA hos katt, och att det är motiverat att undersöka om cellerna i synovialmembranet hos katt kan ha en bidragande effekt på degraderingen av ECM som visats på andra djurslag.

Tidigare studier inom detta område på katt har konstaterat att det förekommer mild inflammation och att lymfoplasmacytära infiltrat kan ses perivaskulärt i armbågsleder respektive knäleder (Freire *et al.*, 2014; Leijon *et al.*, 2017). Denna studie visar på förekomst av samtliga undersökta celltyper, det vill säga mastceller, makrofager, T-celler och B-celler, hos katter med synovit. Mastceller, makrofager och T-celler förekom hos alla katter, även de utan synovit, vilket talar för att dessa populationer förekommer normalt i synovialmembranet.

Mastceller låg alltid interstitiellt eller perivaskulärt och förekom oftast som enskilda celler eller i grupper om två eller tre i vävnaden. Ingen skillnad kunde ses mellan vare sig katter med eller utan synovit eller hög- eller lågradig synovit avseende mönster eller vävnadsdistribution. Så avseende de parametrar som undersöktes gick det inte att avgöra om det fanns någon skillnad mellan de olika grupperna. Mastcellerna förekom hos alla individer utan synovit. Hos människa har man konstaterat att mastceller förekommer i normala synovialmembran (Dean *et al.*, 1993), vilket talar för att celltypen har en funktion även i icke-inflammerade synovialmembran. Då mastceller verkar som sentinelcell kan det vara en förklaring till att de förekommer hos individer utan synovit. Vid den histologiska genomgången gjordes en subjektiv bedömning av vilka ledkapselpreparat som hade lindrigare respektive rikligare infiltrat av mastceller och där majoriteten av katterna utan synovit bedömdes ha lindrigare infiltrat. Denna uppskattning är

enbart subjektiv och bör därför tolkas med försiktighet, men skulle kunna tyda på en ökning av antalet mastceller vid synovit. Musmodeller av OA har visat att möss som saknar mastceller hade lägre förlust av ledbrosk, osteofytbildning och lägre grad av synovit. Samma studie visade även att hämning av den proteolytiska effekten hos tryptas, ett enzym som utsöndras av mastceller vid degranulation, också reducerade utvecklingen av ledbroskdegeneration, osteofytbildning och synovit. Dessutom kunde tryptas stimulera synoviala fibroblaster att producera IL-1 β , MMP3 och ADAMTS4 *in vitro* (Wang *et al.*, 2019). Det finns således bevis för att mastceller har en roll inom patogenesen vid OA. En mer exakt kvantifiering av mastceller i synovialmembran hos katt och en undersökning av om de är aktiva är önskvärt i framtida studier.

I studien användes en antikropp (anti-Iba1) för att detektera makrofager. Iba1 har tidigare visats uttryckas av celler i monocyt/makrofag-cellinjen hos hund och katt (Pierezan *et al.*, 2014) och vid försök i denna studie visades en tydlig, specifik infärgning av makrofagliga celler i lymfknuta och antikroppen ansågs därför fungera bra. I ledkapselpreparaten sågs även infärgning i nerver. En förklaring till detta skulle kunna vara att neuroglia i perifera nerver uttrycker Iba1, då Iba1 har visats uttryckas av mikroglia i centrala nervsystemet (Ito *et al.*, 1998). Detta var enbart en iakttagelse och ingick inte i syftet med studien och undersöktes därför inte vidare.

Iba1-positiva makrofager förekom i alla ledkapselpreparat och visade samma huvudsakliga cellmönster hos samtliga individer. Iba1-positiva celler var generellt utspridda i alla undersökta delar av vävnaden men infiltratet var ställvis väldigt rikligt i lining. Ingen signifikant skillnad i vävnadsdistribution kunde ses mellan katter med eller utan synovit, vilket kan bero på att det testade materialet var litet. Tendensen att makrofager framförallt förekom i lining hos katter utan synovit, men var mer jämnt utspridda i alla delar av vävnaden hos katter med synovit, kan tolkas som att det sker en infiltration av makrofager subintimalt och att antalet då borde öka vid OA-relaterad synovit. En spekulering är att dessa celler infiltrerar vävnaden för att möta det ökade behovet av fagocytos av matrixfragment eller celldebris, vilket även Oehler *et al.* (2002) spekulerar kring i sin artikel. Hos människor med reumatoid artrit (RA), en annan kronisk artrit, har det visats att antalet makrofager i sublining korrelerar med klinisk förbättring och att ett minskat antal kan användas som biomarkör för effektiv medicinsk behandling (Haringman *et al.*, 2005). Detta tyder på att makrofager i sublining bidrar till sjukdomsutvecklingen av RA och det är möjligt att ett liknande fenomen kan ses vid OA. Infärgning av makrofager med Iba1 skiljer inte på M1- eller M2-makrofager så denna studie ger ingen kunskap om vilken huvudsaklig typ det är som infiltrerar vävnaden. I framtida studier hade det varit intressant att undersöka om det är framförallt M1- eller M2-makrofager som förekom i vävnaden då dessa har olika funktion och påverkar den immunologiska reaktionen på olika sätt. Genom att få bättre uppfattning om vilken typ som är vanligast skulle det även ge en bättre uppfattning om vilken roll makrofager har vid OA-relaterad synovit.

Andelen Iba1-positiva celler var ställvis kraftig i lining och det är på människa konstaterat att andelen typ A synoviocyter (makrofagliga) ökar i lining-lagret vid OA-relaterad synovit (Oehler *et al.*, 2002). Enligt författarens kunskap har Iba1 inte använts för att påvisa typ A synoviocyter, men det är rimligt att tänka att även dessa celler skulle uttrycka Iba1. I vissa ledkapselpreparat kunde dock få antal positiva celler ses, trots att de hade tydlig hyperplasi av lining. En möjlig förklaring till den ställvis höga infiltrationen i lining är om uttrycket av Iba1 förändras beroende på om makrofagen är aktiverad eller ej. Då uttrycket har visats öka i aktiverade mikroglia (Ito *et al.*, 1998) och Iba1 är involverad i fagocytos och cellförflyttning (Oshawa *et al.*, 2000) kan man spekulera i att de celler som färgats in enbart är aktiverade celler. Den ställvis kraftiga infärgningen skulle då motsvara mer inflammatoriskt aktiva områden,

exempelvis där det finns ett behov av fagocytos. För att få bättre klarhet i vilka celler som färgas in och om antalet typ A synoviocyter faktiskt är högre i lining hos katter med synovit hade det varit bra att göra en jämförelse med en annan antikropp riktad mot en annan makrofagmarkör, exempelvis CD68. En jämförelse av vilka celler som färgas in hade då kunnat göras och detta rekommenderas till framtida studier. En signifikant skillnad i antal makrofager kunde ses mellan katter med hög- och låggradig synovit, där de i gruppen med låggradig synovit oftast hade högre antal i lining. En tänkbar förklaring till detta skulle kunna vara att andelen makrofager minskar vid mer höggradiga synoviter och att liningen istället blir rikligare infiltrerad av typ B synoviocyter. Hyperplasi av denna typ av cell har visats förekomma vid end-stage OA (Izquierdo *et al.*, 2011). Materialet är dock litet så resultatet bör tolkas med försiktighet. En av individerna med höggradig synovit uppvisade även det lägsta värdet för medelvärde av antal makrofager i lining (katt nr 11), och det är möjligt att en extrem individ påverkat resultatet. Om samma resultat skulle erhållas även på ett större, undersökt material kan det vara intressant att undersöka hur antalet makrofager förändras i liningen över tid.

Hos katter med synovit påvisades T-celler oftast i mindre grupper och perivaskulärt, även om vissa ledkapselpreparat bedömdes uppvisa dominerande förekomst interstitiellt eller i lining också. Ett intressant fynd avseende T-cellerna är att de även förekom hos samtliga individer utan synovit. Infiltraten var förvisso minimala i två av dessa men det är ändå ett observandum. Inflammationen är ofta mild vid OA-relaterad synovit och en förklaring till varför dessa celler infiltrerat vävnaden kan vara att inflammationen antingen är så låggradig att den inte klassas som synovit eller att sjukdomen är i en så tidig fas att det inte skett någon kraftigare infiltration av T-celler än. Samtliga av de katter utan synovit som kunde utvärderas i studien hade mycket lindrigare grader av brosklesioner jämfört med katter med synovit, vilket tyder på att de fortfarande är tidigt i sjukdomsförloppet. Att inflammationen i synovialmembranet ännu inte blivit tillräckligt kraftig för att klassas som synovit kan då vara en rimlig förklaring till närvaron av T-celler även hos dessa katter.

B-celler var den celltyp som fanns i minst andel av ledkapselpreparaten. Tre av fyra katter från gruppen utan synovit uppvisade inga infiltrat och den fjärde katten enbart minimalt infiltrat. Detta tyder på att B-celler inte förekommer, eller förekommer i väldigt låg grad, hos katter utan synovit. Även hos katter med synovit var B-cellsförekomsten sparsam och flera uppvisade minimalt eller inget infiltrat. Mönstret var mer blandat för B-celler än övriga celler och ingen tydlig slutsats om vilket som var vanligast kunde dras. Vävnadsdistributionen var framförallt interstitiell och perivaskulär. Ett fåtal binukleära plasmaceller kunde ses i två ledkapselpreparat. Binukleära och multinukleära plasmaceller har även hittats i synovialmembranet hos människor med reumatoid artrit (Perry *et al.*, 1997), men på grund av den låga förekomsten i denna studie lades ingen större vikt vid detta fynd.

Den lymfocytära reaktionen verkar vara T-cellsberoende hos katter med OA-relaterad synovit. Detta baseras på att T-celler förekom i flera preparat och oftast i större grupper jämfört med B-celler och att flera av de lymfocytära aggregaten utgjordes av en majoritet av T-celler. En naturlig följdfråga är då vilken funktion dessa T-celler har? Det gjordes ingen ytterligare immunologisk fenotypning av cellerna i detta arbete, så följande resonemang bygger enbart på spekulationer. På humansidan har man visat att andelen CD4-positiva T-celler och Th1-celler är större i synovialmembranet vid OA (Haynes *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002). Med tanke på att B-celler och plasmaceller förekom i preparat som undersöktes i detta examensarbete kan en del av T-cellerna vara Th2-celler som stimulerar till antikropsproduktion. Dock borde inte dessa utgöra majoriteten av cellerna, med tanke på den lägre förekomsten av B-celler. Om fördelningen av de olika subtyperna av T-celler hos katter liknar den hos människa skulle den större andelen av dessa celler utgöras av T-hjälparceller och sannolikt vara Th1-celler. Th1 producerar

bland annat TNF- α och främjar aktivering av makrofager (Tizard, 2013). Båda dessa har konstaterats ha viktiga roller i patogenesen av OA hos andra djurslag. Dock genererar Th1-celler immunitet mot intracellulära mikroorganismer som virus, och OA antas vara en icke-infektiös ledsjukdom. Th17, som är en annan typ av T-hjälparcell, stimulerar B-celler, rekryterar granulocyter och makrofager och är viktiga i immunförsvaret mot extracellulära bakterier (Tizard, 2013). Precis som med Th1-celler har de vissa funktioner, som att rekrytera makrofager, som visats viktiga vid OA hos andra djurslag. Samtidigt rekryterar de granulocyter, som enligt resultaten i denna studie är väldigt få i antal i vävnaden, vilket inte tyder på att just den subtypen skulle vara vanligt förekommande. T-cellerna i vävnaden skulle också kunna vara CD8-positiva cytotoxiska T-celler. Dessa kräver hjälp av Th1 för att kunna aktiveras till fullo och dödar abnormalt celler, som cancerceller, virusinfekterade eller skadade celler (Tizard, 2013). Förvisso förekommer skadade celler vid OA, men då sjukdomen inte tros orsakas av virus känns det inte så troligt att majoriteten av T-cellerna i vävnaden skulle vara cytotoxiska. Lymfocyterna låg ofta i vävnadens djupare delar och lokaliseringen var sällan dominerande i lining. Hade lymfocyterna typiskt dominerat i lining hade man kunnat tänka sig att de verkar mer direkt som effektorceller mot de skador som uppstår vid OA. När de ligger djupare ned i synovialmembranet och då längre ifrån de direkta skadorna, kan det snarare vara så att de framförallt bidrar till att skapa en viss inflammatorisk miljö via utsöndring av vissa cytokiner, än att ha en direkt effekt på de cellskador och matrixfragment som skapas vid nedbrytningen av ledbrusket.

I vissa av de lymfocytära aggregaten noterades det att flera lymfocytlika celler inte uttryckte varken CD3 eller CD79. Det finns lymfocytära celler som inte uttrycker någon av dessa cellmarkörer, så kallade medfödda lymfocytära celler (innate lymphoid cells, ILC), där bland annat NK-celler ingår. Det finns flera olika subtyper av ILCs med många olika funktioner (Artis & Spits, 2015) och det går inte att säga om de negativa celler som setts i de lymfocytära aggregaten faktiskt utgörs av någon av dessa subtyper. En annan möjlighet är att cellerna tidigare uttryckt någon av dessa cellmarkörer men att något vid tidigare hantering av biopsierna förstört dem, eller att spädningsvätskan på den primära antikroppen var för låg för att tydligt färga in dem. För att svara på det hade det behövts ytterligare undersökningar.

I denna studie undersöktes även om det fanns ett samband mellan förekomst av större lymfocytära aggregat (mönster 4) och grad av broskskada, men inget samband kunde påvisas. Då synovitgrad var kopplat till grad av brosklesioner kändes det troligt att större aggregat av lymfocyter, som ingår i bedömningen av synovitgrad, också borde vara kopplat till allvarigare förändringar i leden. Dessa två fynd i relation till varandra väcker funderingen om det är framförallt andra immunologiska celler än just lymfocyter som kan driva på progressionen av skador eller infiltrerar vävnaden som respons på skada? Exempelvis makrofager har visats ha en viktig roll i produktion av MMPs och aggreganser hos människa (Tateiwa *et al.*, 2019) och det är möjligt att det är huvudsakligen dessa celler som driver på nedbrytningen av ledbrusket. Bristen på koppling skulle emellertid kunna bero på att materialet i studien var för litet för att kunna visa något tydligt samband.

Enstaka neutrofillika celler påvisades i flera ledkapselpreparat. Den morfologiska bedömningen av neutrofiler utfördes på HE-färgade preparat och byggde på att en segmenterad cellkärna kunde identifieras. Cellmorfologin var ställvis svår att säkerställa som typisk neutrofil och det kan inte uteslutas att enstaka neutrofila celler kan ha missats eller att fynd misstolkats. Det går i alla fall att säkert säga att ingen kraftig infiltration av neutrofiler kunde ses hos någon individ vilket talar för att neutrofiler är av mer underordnad betydelse för den inflammatoriska reaktionen i synovialmembranet vid OA hos katt. Eosinofiler kunde inte hittas hos någon

individ, vilket var väntat då OA inte är allergiskt eller parasitärts orsakad, och bedömdes inte vara en del av den inflammatoriska reaktionen vid OA hos katt.

Multinukleära celler hittades i två ledkapselpreparat. Denna typ av celler bildas genom fusion av makrofager och kan ses vid kronisk inflammation. Hos människa förekommer multinukleära celler vid OA, särskilt hos individer med synovit (Prieto-Potin *et al.*, 2015). Hos katt är det ej tidigare rapporterat att multinukleära celler ses vid OA. Däremot rapporterade Freire *et al.* (2014) specifikt att de inte påvisade några multinukleära celler hos katter med OA-relaterad synovit. Båda katterna med förekomst av multinukleära celler uppvisade höggradig synovit, men det är svårt att säga något om de multinukleära cellernas exakta funktion och när de bildats baserat på materialet i den här studien.

Fyra ledkapselpreparat hade förekomst av "foamy" makrofager och två av dessa uppvisade vävnad med ett annorlunda histologiskt utseende i form av cystlika kaviteter, än vad som var typiskt för vävnaden i övriga preparat. "Foamy" makrofager bildas genom en obalans i inflöde och utflöde av lågdensitets-lipoprotein (LDL) (Russell *et al.*, 2009). De två individer med cystlika kaviteter klassades båda som överviktiga avseende total kroppsfettprocent och BCS (data insamlad till tidigare studie). Hos människa diskuterar man om OA associerat med metabolt syndrom är en särskild fenotyp, då övervikt är en viktig riskfaktor för att utveckla sjukdomen. Utöver att den ökade vikten leder till högre belastning på leder, tror man att fettvävnad utövar en pro-inflammatorisk effekt, bland annat i form av adipokiner som leptin. Hos människor har man sett samband mellan OA i händer och metabolt syndrom, där man kan utesluta att det är enbart den mekaniska belastningen som bidrar till ökad sjukdomsrisk. Man har även visat att adipokiner och fria fettsyror har en proinflammatorisk effekt vid OA (Courties *et al.*, 2019). Två av katterna med förekomst av "foamy" makrofager hade emellertid normalt eller lågt BCS. Dessa uppvisade dock inga cyst-lika kaviteter. Det är möjligt att de två individerna med ett annorlunda histologiskt utseende skulle kunna motsvara en särskild OA-fenotyp hos katt kopplad till övervikt. Som nämns i litteraturoversikten är resultaten avseende koppling mellan BCS och OA tvetydig, då vissa studier visat en korrelation (Ryan *et al.*, 2013; Stadig *et al.*, 2019) och andra inte (Lascelles *et al.*, 2010; Slingerland *et al.*, 2011). På ett så litet material som ingick i denna studie är det svårt att säga om detta fynd faktiskt är relevant, men det hade varit intressant att undersöka hur vanligt detta utseende är och om det är relaterat till övervikt/fetma.

Antalet katter i gruppen utan synovit blev tyvärr färre än planerat i studien, vilket troligtvis bidragit till att flera resultat inte blev signifikanta vid jämförelse mellan katter med och utan synovit. Det enda signifikanta resultatet var T-cellers mönster som visade sig vara beroende av om katterna hade synovit eller ej. Vissa andra tendenser till skillnader mellan grupperna kunde ses i materialet, som diskuterats tidigare i arbetet, och det hade varit intressant att se om dessa skillnader är signifikanta på ett större material. Två olika leder inkluderades i studien för att se om det förelåg någon skillnad mellan större och mindre ledavdelningar. Resultat i studien kunde inte visa att vare sig mönster eller vävnadsdistribution av celler var beroende av faktorn vilken led, och slutsatsen drogs därför att det inte var någon skillnad mellan de olika lederna.

Slutligen, några begränsningar med studien som bör nämnas är bland annat att två undersökta leder (en talokruralled och en armbågsled) kom från samma individ och detta kan ha bidragit till bias och därmed påverkat resultaten i studien. Ledkapselpreparaten från samma individ inkluderades av misstag. Då studien redan innehöll få antal individer hade det varit bättre att alla leder kom från unika individer för att öka möjligheten att få en säkrare uppfattning om mönster hos kattpopulationen i stort.

Vissa ledkapselpreparat fick uteslutas då de blev för blekt infärgade, både immunohistokemiskt och vid kärnfärgning med Mayers hematoxylin. Orsaken till detta är oklar då övriga ledkapselpreparat som färgades samtidigt som dessa blev lyckade, samt att den positiva kontroll som inkluderades vid alla laborationer hade infärgning av celler. Protokollet, material och maskiner som användes vid laborationerna har alltså fungerat. Troligtvis har de behandlats annorlunda vid den tidigare hanteringen av biopsierna som gjort att färgningen inte fungerar lika bra. Exempelvis kan de ha legat längre i myrsyra vid urkalkning vilket skulle kunna ha påverkat infärgningen.

Konklusion

Resultat i denna studie visar att synovitgrad och grad av brosklesioner är korrelerat vilket tyder på att synovit har en roll i patogenesen av OA. Mastceller och makrofager bedömdes subjektivt öka i antal hos katter med synovit vilket talar för att de kan ha en aktiv roll i den inflammatoriska reaktionen. En mer objektiv kvantifiering av cellerna är önskvärt i framtida studier. I förhållande till B-celler var T-celler den dominerande celltypen, vilket talar för att det lymfocytära svaret är T-cellsberoende. Inga eosinofiler och endast sparsamt med neutrofiler kunde ses och det talar för att dessa celltyper är av underordnad betydelse i det inflammatoriska förloppet. Denna pilotstudie visar att mastceller, makrofager, T-celler och B-celler förekommer vid OA-relaterad synovit men deras exakta funktion behöver utredas i vidare studier.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Osteoartrit (OA), synonym artros, är en progressiv sjukdom som drabbar kroppens synovialleder. Synovialleder är leder som omges av en ledkapsel och har en vätskefylld ledhåla, exempelvis knäleden. Denna ledkapsel är på insidan klädd med en ledhinna, även kallad synovialmembran, som bland annat har som funktion att producera komponenter till ledvätskan så att leden smörjs och minskar friktion vid rörelse.

OA är en vanlig sjukdom i kattpopulationen och det saknas i dagsläget botande behandling. Sjukdomen är komplex och kan orsakas av flera olika faktorer, bland annat kan sjukdomen uppstå till följd av onormalt utvecklade leder (såsom exempelvis höftledsdysplasi) och ses rasspecifikt hos katter med felutveckling av brosk. Hos katter är det dock vanligt att man inte kan hitta någon uppenbar, initierande orsak till sjukdomen. Många studier har visat ett tydligt samband mellan OA och stigande ålder. Övervikt, som är en riskfaktor hos människa, har däremot visat motstridiga resultat då vissa studier anger att det inte finns något samband medan andra studier hittat ett samband.

En viktig del i utvecklingen av OA är nedbrytningen av ledbrosk. I ledbrosket finns broskceller och dessa omges av rikligt med så kallad grundsubstans. Vid OA ruggas ytan av ledbrosket upp och den grundsubstans som broskcellerna ligger i börjar brytas ned och lossna från ytan. Förändringarna sträcker sig djupare ned genom ledbrosket då sjukdomen förvärras och når slutligen underliggande ben så att det exponeras. Det finns olika typer av enzymer som kan bryta ned grundsubstansen. Produktion av dessa enzymer stimuleras av signalsubstanser som är verksamma inom immunförsvaret, så kallade cytokiner. Dessa signalsubstanser kan i leden produceras av broskceller, men även celler i synovialmembranet och inflammatoriska celler som migrerat till vävnaden.

Kroppens immunförsvaret byggs upp av flertalet olika celler med olika funktion och det är olika typer av celler som aktiveras beroende på vad de ska skydda kroppen från. En inflammatorisk reaktion kan därmed se väldigt olika ut vid olika sjukdomstillstånd. Man har hos människor kunnat visa att inflammation i synovialmembranet, synovit, är kopplat till förvärring av OA.

Hos katt vet man väldigt lite om vilka olika typer av inflammatoriska celler som finns i synovialmembranet hos individer som lider av OA. Syftet med det här arbetet var därför att undersöka förekomsten av fyra olika typer av inflammatoriska celler i synovialmembran från katter med och utan synovit. Genom att få en bättre förståelse för vilken typ av inflammatorisk reaktion som uppstår i synovialmembranet vid OA kan man få en bättre förståelse för hur sjukdomen utvecklas, vilket i längden kan bidra till att upptäcka sjukdomen tidigare och hitta nya behandlingsmöjligheter.

I studien undersöktes ledkapselvävnad från 17 katter, insamlad i samband med obduktion. Vävnaden undersöktes i mikroskop. För att kunna synliggöra de olika undersökta celltyperna användes en färgningsteknik kallad immunohistokemi. Man använder sig då av en teknik där färgämnet är kopplat till antikroppar som binder in till olika molekyler som enbart uttrycks på den cell man vill färga in. Efter färgningen studerades ledkapslarna i mikroskop och det noterades i vilket mönster cellerna var utspridda i i vävnaden och vart i synovialmembranet majoriteten av cellerna låg. Ledbrosket och ledkapslarna graderades efter vilken grad av skada man kunde se respektive hur kraftig synoviten, det vill säga den inflammatoriska reaktionen, var.

Ett av resultaten i studien var att man kunde se en stark korrelation mellan grad av skada på ledbrosket och synovitgrad. En värre inflammation i ledkapseln var alltså kopplat till värre grad av skada på ledbrosket. Detta är i linje med resultat i två tidigare studier på katt och visar att den inflammatoriska reaktionen i synovialmembranet är kopplad till skadan på ledbrosket vid OA.

Samtliga av de undersökta celltyperna kunde hittas i synovialmembran från individer med synovit, och tre av dem även hos individer utan synovit. De undersökta celltyperna i studien var mastceller, makrofager, B- och T-celler. Mastceller och makrofager kan något förenklat sägas ingå i kroppens första, mer ospecifika immunförsvar som startar direkt när ett främmande ämne upptäcks i kroppen. B- och T-celler ingår i ett mer specifikt immunförsvar, riktat mot ett speciellt främmande ämne, och är effektivt först efter några dagar. Både mastceller och makrofager fanns hos alla undersökta individer, även de utan synovit. En subjektiv bedömning av antalet mastceller gjordes som visade tendenser på att de ökar vid synovit och därmed skulle kunna ha en roll i sjukdomsutvecklingen av OA. Ett medelvärde av antalet makrofager i det ytligaste lagret av synovialmembranet räknades ut, men ingen skillnad i antalet celler kunde ses mellan katter med eller utan synovit. Makrofagerna var dock mer utspridda i vävnaden hos katter med synovit vilket kan tolkas som att de infiltrerar vävnaden vid inflammation. Även T-celler hittades hos alla individer, även de utan synovit. T-celler har inte samma övervakande roll i vävnaden som mastceller och makrofager kan tänkas ha och att de förekommer hos individer utan synovit kan bero på att de mycket tidigt i sjukdomsprocessen infiltrerar vävnaden och hjälper till att reglera den fortsatta inflammatoriska reaktionen. B-celler var den mest ovanliga celltypen och fanns huvudsakligen hos de katter med synovit.

Flera resultat i studien tyder på att det är mer T-celler än B-celler som infiltrerar vävnaden vid synovit. Det finns flera olika subtyper av T-celler och dessa har olika funktion och kan styra immunförsvaret på olika sätt, beroende på vad de utsöndrar för ämnen. Baserat på resultaten i denna studie går det enbart att spekulera kring vilka typer av T-celler som förekommer i synovialmembranet, men det hade varit intressant att undersöka vidare i andra studier vilka typer av T-celler som förekommer.

Sammanfattningsvis kan man konstatera att denna studie visade att synovitgrad är kopplat till grad av broskskada vid OA, att mastceller och makrofager verkar vara högre i antal vid OA-

relaterad synovit jämfört med vid icke-synovit och att av B- och T-celler var T-celler den vanligaste. Dessa resultat bidrar med kunskap kring vilka celler som förekommer i synovialmembranet vid OA och därmed vilka som kan vara värda att undersöka vidare för att få en uppfattning om hur de olika cellerna kan påverka nedbrytningen av ledbrösket i leder med OA.

TACK

Ett stort tack till alla snälla och hjälpsamma personer som varit involverade i mitt examensarbete för allt ert stöd och tiden ni lagt ner. Ett extra stort tack till mina engagerade handledare för alla idéer och all er hjälp!

- **Cecilia Ley**, handledare, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
- **Karin Vargmar**, biträdande handledare, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
- **Caroline Fossum**, examiner, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
- **Peder Eriksson**, Obduktionstekniker, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
- **Vidar Andersson**, Biomedicinsk Analytiker på histologilaboratoriet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
- **Albin Norman**, Biomedicinsk Analytiker på histologilaboratoriet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Slutligen, ett stort tack till **Veterinärmedicinska fakultetens stipendiesamfund**, **Michael Forsgrens Stiftelse** och **Föreningen Jamaren** för era bidrag som möjliggjorde denna studie!

REFERENSER

- Artis, D. & Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517:293-301.
DOI:<https://doi.org/10.1038/nature14189>
- Ayral, X., Pickering, E., Woodworth, T., Mackillop, N. & Dougados, M. (2005). Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis - results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13:361-367.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.01.005>
- Benito, M., Veale, D., FitzGerald, O., van den Berg, W. & Bresnihan, B. (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64:1263-1267.
doi:10.1136/ard.2004.025270
- Bennett, D., Zainal Ariffin, S. & Johnston, P. (2012). Osteoarthritis in the cat 1. How common is it and how easy to recognise?. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14:65-75. DOI:
10.1177/1098612X11432828
- Blom, A., van Lent, P., Holthuysen, A., van der Kraan, P., Roth, J., van Rooijen, N. & van den Berg, W. (2004). Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12:627-635.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.03.003>
- Blom, A., van Lent, P., Libregts, S., Holthuysen, A., van der Kraan, P., van Rooijen, N. & van den Berg, W. (2007). Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis & Rheumatology*, 56:147-157. <https://doi.org/10.1002/art.22337>
- Bondeson, J., Wainwright, S., Lauder, S. Amos, N. & Hughes, C. (2006). The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8. doi: 10.1186/ar2099
- Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P. & Quarto, R. (2003). Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*, 22:81-91. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(03\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(03)00012-X)
- Castaneda, S., Roman-Blas, J., Largo, R. & Herrero-Beaumont, G. (2014). Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology*, 53:1-3.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket247>
- Clarke, S. P. & Bennett, D. (2006). Feline osteoarthritis: a prospective study of 28 cases. *Journal of Small Animal Practice*, 47:439-445. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00143.x>
- Clarke, S. P., Mellor, D., Clements, D. N., Gemmill, T., Farrell, M., Carmichael, S. & Bennett, D. (2005). Prevalence of radiographic signs of degenerative joint disease in a hospital population of cats. *The Veterinary Record*, 157:793-799.
- Cohen, S., Proudman, S., Kivitz, A., Burch, F., Donohue, J., Burstein, D., Sun, Y., Banfield, C., Vincent, M., Ni, L. & Zack, D. (2011). A randomized, double-blind study of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R1) in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Research & Therapy*, 13. doi: 10.1186/ar3430
- Courties, A., Berenbaum, F. & Sellam, J. (2019). The phenotypic approach to osteoarthritis: a look at metabolic syndrome-associated osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 86:725-730.
<https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.12.005>
- de Hooge, A., van de Loo, F., Bennink, M., Arntz, O., de Hooge, P. & van den Berg, W. (2005). Male IL-6 gene knock out mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13:66-73. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.09.011>
- Dean, G., Hoyland, J., Denton, J., Donn, R. & Freemont, A. (1993). Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. *British Journal of Rheumatology*, 32:671-675.

- Dyce, K. M., Sack, W. O. & Wensing, C. J. G. (2010). *Textbook of Veterinary Anatomy*. 4. ed. Missouri: Saunders Elsevier.
- Engberg Damsgaard, T., Brandt Sørensen, F., Herlin, T. & Schiötz, P. (1999). Stereological quantification of mast cells in human synovium. *APMIS*, 107:311-317.
- Felson, D. T., Niu, J., Neogi, T., Goggins, J., Nevitt, M. C., Roemer, F., Torner, J., Lewis, C. E. & Guermazi, A. (2016). Synovitis and the risk of knee osteoarthritis: the MOST Study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24:458-464. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.09.013>
- Freire, M., Meuten, D. & Lascelles, D. (2014). Pathology of articular cartilage and synovial membrane from elbow joints with and without degenerative joint disease in domestic cats. *Veterinary Pathology*, 51:968-978. DOI: 10.1177/0300985813516648
- Gao, X., Lee, J., Malladi, S., Melendez, L., Lascelles, D. & Al-Murrani, S. (2013). Feline degenerative joint disease: a genomic and proteomic approach. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15:466-477. <https://doi.org/10.1177/1098612X12470652>
- Godfrey, D. R. (2005). Osteoarthritis in cats: a retrospective radiological study. *Journal of Small Animal Practice*, 46:425-429.
- Gruen, M., Messenger, K., Thomson, A., Griffith, E., Aldrich, L., Vaden, S. & Lascelles, D. (2017). Evaluation of serum cytokines in cats with and without degenerative joint disease and associated pain. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 183:49-59. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.12.007>
- Haringman, J., Gerlag, D., Zwinderman, A., Smeets, T., Kraan, M., Baeten, D., McInnes, I., Bresnihan, B & Tak, P. (2005). Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64:834-838. Doi:10.1136/ard.2004.029751
- Haynes, M., Hume, E. & Smith, J. (2002). Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids. *Clinical Immunology*, 105:315-325. <https://doi.org/10.1006/clim.2002.5283>
- Ishii, H., Tanaka, H., Katoh, K., Nakamura, H., Nagashima, M. & Yoshino, S. (2002). Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10:277-281. <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0509>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y. & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57:1-9. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00040-0)
- Izquierdo, E., Canete, J., Celis, R., Del Rey, M., Usategui, A., Marsal, S., Sanmartí, R., Criado, G. & Pablos, J. (2011). Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis – clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis & Rheumatism*, 63:2575-2583. DOI 10.1002/art.30433
- Jackson, P. & Blythe, D. (2008). Immunohistochemical Techniques. I: Bancroft, J. & Gamble, M. (ed.), *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6. ed. London: Churchill Livingstone imprint of Elsevier, 433-472
- Krenn, V., Morawietz, L., Burmester, G-R., Kinne, R., Mueller-Ladner, U. Muller, B. & Haupl, T. (2006). Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology*, 49:358-364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02508.x>
- Lascelles, D., Hansen, B., Roe, S., DePuy, V., Thomson, A., Pierce, C., Smith, E. & Rowinski, E. (2008). Evaluation of client-specific outcome measures and activity monitoring to measure pain relief in cats with osteoarthritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21:410-416. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb02983.x>
- Lascelles, D., Henry III, J., Brown, J., Robertson, I., Thomson Sumrell, A., Simpson, W., Wheeler, S., Hansen, B., Zamprogno, H., Freire, M. & Pease, A. (2010). Cross-sectional study of the

- prevalence of radiographic degenerative joint disease in domesticated cats. *Veterinary Surgery*, 39:535-544. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2010.00708.x>
- Leijon, A., Ley, C. J., Corin, A. & Ley, C. (2017). Cartilage lesions in feline stifle joints - associations with articular mineralizations and implications for osteoarthritis. *Research in Veterinary Science*, 114:186-193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.04.008>
- Linden, C. E., Dittmer, K. E. & Thompson K. G (2016). Bones and Joints. I: Maxie, G. (ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 6. ed. Missouri: Elsevier, 17-163.
- Loeser, R., Goldring, S., Scanzello, C. & Goldring, M. (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism*, 64:1697-1707. doi: 10.1002/art.34453
- Madry, H., van Dijk, N. & Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18:419-433. <https://doi.org/10.1007/s00167-010-1054-z>
- Miagkov, A., Kovalenko, D., Brown, C., Didsbury, J., Cogswell, J., Stimpson, S., Baldwin, A. & Makarov, S. (1998). NF- κ B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:13859-13864. doi:10.1073/pnas.95.23.13859
- Oehler, S., Neureiter, D., Meyer-Scholten, C. & Aigner, T. (2002). Subtyping of osteoarthritic synovioathy. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20:633-640.
- Oshawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y & Kohsaka, S. (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *Journal of Cell Science*, 113:3073-3084.
- Ostojic, M., Soljic, V., Vukojevic, K & Dapic, T. (2017). Immunohistochemical characterization of early and advanced knee osteoarthritis by NF- κ B and iNOS expression. *Journal of Orthopaedic Research*, 35:1990-1997. <https://doi.org/10.1002/jor.23504>
- Perry, K. (2014). The lame cat: the challenge of degenerative joint disease. *Companion Animal*, 19:582-590. <https://doi.org/10.12968/coan.2014.19.11.582>
- Perry, M. E., Mustafa, Y., Wood, S. K., Cawley, M., Dumonde, D. C. & Brown, K. A. (1997). Binucleated and multinucleated forms of plasma cells in synovia from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 17:169-174.
- Pierezan, F., Mansell, J., Ambrus., A. & Rodrigues Hoffman, A. (2014). Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology*, 151:347-351. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.003>
- Prieto-Potin, I., Largo, R., Roman-Blas, J., Herrero-Beaumont, G. & Walsh, D. (2015). Characterization of multinucleated giant cells in synovium and subchondral bone in knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 16. doi: 10.1186/s12891-015-0664-5
- Pritzker, K., Gay, S., Jimenez, S., Ostergaard, K., Pelletier, J., Revell, P., Salter, D., Path, F. & van den Berg, W. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14:13-29. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014>
- Pulai, J., Chen, H., Im, H., Kumar, S., Hanning, C., Hegde, P. & Loeser, R. (2005). NF- κ B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *Journal of Immunology.*, 174:5781-5788. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5781
- Rollin, R., Marco, F., Jover, J., Garcia-Asenjo, J., Rodriguez, L., López-Durán, L. & Fernández-Gutiérrez, B. (2008). Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatology International*, 28:757-764.

- Russell, D., Cardona, P., Kim, M., Allain, S. & Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology*, 10:943-948. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>
- Ryan, J., Lascelles, D., Benito, J., Hash, J., Smith, S., Bennett, D., Argyle, D. & Clements, D. (2013). Histological and molecular characterization of feline humeral condylar osteoarthritis. *BMC Veterinary Research*, 9. doi: 10.1186/1746-6148-9-110
- Scanzello, C. & Goldring, S. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*, 51:249-257. doi: 10.1016/j.bone.2012.02.012
- Slingerland, L. I., Hazewinkel, H. A. W., Meij, B. P., Picavet, Ph. & Voorhout, G. (2011). Cross-sectional study of the prevalence and clinical features of osteoarthritis in 100 cats. *The Veterinary Journal*, 187:304-309. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.014>
- Smith, M. (2011). The normal synovium. *The Open Rheumatology Journal*, 5:100-106. doi:10.2174/1874312901105010100
- Stadig, S., Lascelles, D., Nyman, G. & Bergh, A. (2019). Evaluation and comparison of pain questionnaires for clinical screening of osteoarthritis in cats. *Veterinary Record*, Published Online First: 16 October 2019. doi: 10.1136/vr.105115
- Swinscow, T. D. V. (1997). *Statistics at Square One*. 9. ed. London: BMJ Publishing Group. Tillgänglig: http://publish.uwo.ca/~gzou2/Stats_at_Square1.pdf [2019-11-26]
- Tateiwa, D., Yoshikawa, H. & Kaito, T. (2019). Cartilage and bone destruction in arthritis: pathogenesis and treatment strategy: a literature review. *Cells*, 8. doi:10.3390/cells8080818
- Tortorella, M., Malfait, A.-M., Deccico, C. & Arner, E. (2001). The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9:539-552. <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0427>
- van Lent, P., Blom, A., Van Der Kraan, P., Holthuysen, A., Vitters, E., Van Rooijen, N., Smeets, R., Nabbe, K. & Van Den Berg, W. (2004). Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor β -mediated osteophyte formation. *Arthritis & Rheumatology*, 50:103-111. <https://doi.org/10.1002/art.11422>
- Wang, Q., Lepus, C., Raghu, H., Reber, L., Tsai, M., Wong, H., von Kaeppler, E., Lingampalli, N., Bloom, M., Hu, N., Elliott, E., Oliviero, F., Punzi, L., Giori, N., Goodman, S., Chu, C., Sokolove, J., Fukuoka, Y., Schwartz, L., Galli, S. & Robinson, W. (2019). IgE-mediated mast cell activation promotes inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *eLife*, 8:e39905. DOI: 10.7554/eLife.39905
- Wei, Y. & Bai, L. (2016). Recent advances in the understanding of molecular mechanisms of cartilage degeneration, synovitis and subchondral bone changes in osteoarthritis. *Connective Tissue Research*, 57:245-261. <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1177036>
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, L. & Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2014/561459
- Woods, S. (2016). Osteoarthritis in brief. Part 1: aetiology, pathogenesis, pain and diagnosis. *Companion Animal*, 21:442-447. <https://doi.org/10.12968/coan.2016.21.8.442>

BILAGOR

Bilaga 1

*Graderingsprotokoll för ledbrosklesioner**

Lesionsgrad	Histologiska kriterier
0	Normal; inga förändringar
1	Lindrig fibrillering kan ses, men inga cellulära förändringar
1.5	Fibrillering av ytliga zonen och proliferering, hypertrofi och/eller förlust av kondrocyter i ytliga zonen
2	Fibrillering når genom hela ytliga zonen; cellulära lesioner som vid grad 1,5
2.5	Som grad 2, men med förlust av matrix i ytliga zonen
3	Som grad 2,5, men med vertikala eller sneda enkla fissurer och cellulära förändringar som sträcker sig in i mittenzonen
3.5	Som grad 3, men med vertikala eller sneda, förgrenade fissurer
4	Ytliga zonen fokalt eller multifokalt delaminerad; cellulära lesioner som ovan
4.5	Mittenzonen påverkad; cellulära lesioner som ovan
5	Total erosion av hyalint brosk till kalcifierat brosk eller subkondralt ben
5.5	Som grad 5, men med granulationsvävnad som sträcker sig nivån av den eroderade ytan
6	Benremodellering med uppenbara osteofyter; deformation av artikulär kontur
6.5	Som grad 6, men med granulationsvävnad som sträcker sig ovanför den eroderade ytan

*Pritzker *et al.*, 2006.

Bilaga 2

Graderingsprotokoll för histologisk utvärdering av synovit*

Hyperplasi av synovialmembranets lining

Ett lager av lining-celler	0 poäng
2-3 lager of lining-celler	1 poäng
4-5 lager av lining-celler	2 poäng
Lining-celler bildar >5 lager	3 poäng

Densitet av residenta celler

Normal cellularitet av synovial stroma	0 poäng
Cellularitet är lindrigt förhöjd i synovial stroma	1 poäng
Måttligt förhöjd cellularitet	2 poäng
Kraftigt förhöjd cellularitet	3 poäng

Närvaro av inflammatoriska infiltrat

Inga inflammatoriska infiltrat	0 poäng
Få lymfocyter och plasmaceller kan ses	1 poäng
Många lymfocyter och plasmaceller som kan bilda follikulära aggregat	2 poäng
Stora, follikulära aggregat av inflammatoriska celler	3 poäng

Summerad synovitpoäng

Ingen synovit	Summa 0-1
Låggradig synovit	Summa 2-4
Höggradig synovit	Summa 5-9

*Modifierad från Krenn *et al.*, 2006.

Bilaga 3

Protokoll för immunohistokemi med Iba1, CD79 och CD3

Tvätta med fosfatbuffrad saltlösning (PBS) vid infärgning av Iba1 och med Trisbuffrad saltlösning (TBS) vid infärgning av CD79 och CD3.

1. Inkubera i 60°C värmeskåp, 40 minuter
2. Rehydrering i HistoClear, 1x15 minuter i 37°C värmeskåp, 1x15 minuter i rumstemperatur. Absolut alkohol 2x5 minuter, 95 % alkohol 1x5 minuter, 70 % alkohol 1x5 minuter. Skölj i avjoniserat vatten 3 gånger.
3. Antigen retrieval i 92°C vattenbad i 20 minuter. Låt svalna ståendes i lösningen i rumstemperatur i 20 minuter.
4. Skölj i avjoniserat vatten tre gånger.
5. Blockera endogent peroxidas med 3 % väteperoxid i fem minuter i mörker. Skölj noga i avjoniserat vatten.
6. Tvätta glaset två gånger och märk in med fett-penna. Tvätta glaset ytterligare en gång.
7. Blockera ospecifik bindning med Goat Serum (Normal) (X0907, Dako Denmark) spädd 1:50 i fuktad låda med lock i 30 minuter i rumstemperatur.
8. Dränera glaset och inkubera med primär antikropp och negativ kontroll i fuktad låda med lock i 30 minuter i rumstemperatur.
9. Tvätta glaset tre gånger och inkubera med EnVision HRP anti rabbit/mouse (K5007, Dako) i fuktad låda med lock i 30 minuter i rumstemperatur.
10. Tvätta glaset tre gånger.
11. Framkallning med DAB+substrat (DAB+chromogen (X50) K5007, Dako och Substrate buffer, K5007, Dako) i 4 minuter för CD3 och CD79a och 5 minuter för anti-Iba1.
12. Skölj i rinnande kranvatten i 15 minuter
13. Färgning med Mayers hematoxylin i 1 minut.
14. Skölj i rinnande kranvatten i 15 minuter.
15. Dehydrering i 95 % alkohol, ca 2x15 sekunder, absolut alkohol i 2x2 minuter och sedan 1x5 minuter. Klarning med Xylen ca 2x15 sekunder och 2x2 minuter.
16. Montering

IBA1

- Antigen retrieval i Na-Citratbuffert pH 6.0
- Primär antikropp: anti-Iba1, katalognummer 019-19741, CAP4688, Wako Chemicals. Spädd 1:500 i PBS
- Negativ kontroll: Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase Absorbed), X0936, Dako Denmark. Spädd 1:15000 i PBS

CD79

- Antigen retrieval i Tris-EDTA pH 9.0
- Primär antikropp: CD79a, klon HM47/A9, katalognummer CM067C, Biocare Medical. Spädd 1:100 i TBS
- Negativ kontroll: Mouse IgG1, X0931, Dako Denmark. Spädd 1:250 i TBS

CD3

- Antigen retrieval i Tris-EDTA pH 9.0
- Primär antikropp: CD3, klon F7.2.38, M7254, Dako Denmark. Spädd 1:50 i TBS
- Negativ kontroll: Mouse IgG1, X0931, Dako Denmark. Spädd 1:37 i TBS