



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## Interleukin-1s roll vid osteoartrit hos häst

*Angelica Johnzon*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012:38

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2012

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Interleukin-1s roll vid osteoartrit hos häst**

The role of Interleukin-1 in equine osteoarthritis

*Angelica Johnzon*

**Handledare:**

Eva Skiöldebrand, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:**

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2012

**Omslagsbild:** Angelica Johnzon

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012:38  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Osteoartrit, häst, interleukin-1, cytokiner, IRAP, ledbrusk

**Key words:** Osteoarthritis, horse, equine, interleukin-1, cytokines, IRAP, articular cartilage



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Abstract .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturoversikt.....	3
Synovialledens anatomi och fysiologi.....	3
Ledkapsel, ligament och senor .....	4
Ledvätska .....	4
Ledbrosk.....	4
Kondrocyterna.....	4
Broskets extracellulära matrix.....	5
Subkondralt ben.....	7
Osteoartrit.....	7
Interleukin-1 .....	8
Receptorer .....	9
Interleukin-1s roll vid osteoartrit.....	9
Matrix metalloproteinaser (MMPs) och tissue inhibitor of matrixmetalloproteinaser (TIMP).....	10
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAM-TS) .....	10
Förändrad matrixsyntes .....	11
Prostaglandin E <sub>2</sub> och kväveoxid (NO) .....	11
Behandlingsmetoder vid osteoartrit .....	12
IRAP.....	12
Genterapi .....	13
Diskussion .....	13
Referenser.....	16



## **SAMMANFATTNING**

Osteoartrit är en progressiv sjukdom med inslag av lågradig inflammation som leder till degeneration av ledens alla strukturer. Många hästar drabbas och sjukdomen är en vanlig orsak till hältor vilket leder till stora problem, exempelvis förlorad träningstid, sämre prestation och i värsta fall avlivning. Osteoartrit drabbar synovialleder, som är uppbyggda av följande strukturer: ledkapsel, ledvätska, ledbrosk, subkondralt ben samt omkringliggande senor och ligament. Ledbrosket består av kondrocyter och extracellulärt matrix. I normalt ledbrosk sker lika stor nedbrytning som nybildning av de ingående matrixkomponenterna. Nedbrytningen av matrixmolekyler regleras av enzymer, varav de två viktigaste är matrix metalloproteinaser (MMPs) och aggreganaser (ADAM-TS). Vanligaste orsaken till osteoartrit hos häst är upprepad belastning som sker till exempel när travhästen tränas i högt tempo. Nya och bättre behandlingsmetoder behövs och där har den proinflammatoriska cytokinen interleukin-1 (IL-1) fått en viktig roll. IL-1 har en betydande del i sjukdomsutvecklingen och cytokinen frisläpps av synovocyterna och kondrocyterna. IL-1 inducerar syntes av MMPs och ADAM-TS vilket leder till ökad nedbrytning av ledbroskets matrixmolekyler. IL-1 minskar dessutom syntesen av nytt matrix och ger ökad produktion av prostaglandiner och kväveoxid (NO). Deras effekt på sjukdomsutvecklingen är dock komplex eftersom effekten på matrixmolekylerna kan vara både anabol och katabol. På grund av IL-1s viktiga roll vid osteoartrit har behandlingsmetoder som hämmar IL-1 fått stort intresse, exempelvis IRAP (autologt konditionerat serum) och genterapi. Båda metoderna har genomförts experimentellt men mer forskning och kliniska studier på häst behövs innan effekten kan säkerställas.

## **ABSTRACT**

Osteoarthritis is a progressive disease with a low grade of inflammation present, which leads to degradation of all joint structures and is a common cause of lameness in horses and leads to less training, poor performance and worst case scenario, euthanization. Osteoarthritis occurs in synovial joints, a synovial joint is composed by a joint capsule, synovial fluid, articular cartilage, the subchondral bone and ligaments. In addition to chondrocytes the articular cartilage also consists of the extracellular matrix, with collagen, proteoglycans and noncollagenous proteins. A normal articular cartilage has a similar rate of degradation and synthesis of the extracellular matrix. Two groups of enzymes, matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases (ADAM-TS) is two of the key players of matrix degradation. Osteoarthritis in horses is most commonly caused by overloading the joint. New and better treatments need to be discovered and the proinflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1) is of great importance. IL-1 is released by synovocytes and chondrocytes and has an important role in disease progression. MMPs and ADAM-TS are increased by IL-1 which leads to enhanced matrix degradation and IL-1 may also reduce synthesis of new matrix. Prostaglandins and nitric oxide is also enhanced by IL-1, but their contribution to the course of disease is more complex and they exert both anabolic and catabolic effects. Because of IL-1s great part in osteoarthritis, new treatment methods to inhibit IL-1 has gained a lot of interest, for example IRAP and gene therapy. Both methods have been tested experimentally but more research and clinical trials is necessary to ensure a positive effect.



## INLEDNING

Osteoartrit är en progressiv ledsjukdom som framför allt karakteriseras av broskdegeneration med ett inslag av låggradig inflammation. Inflammation är en viktig del och cytokiner, i huvudsak interleukin-1 (IL-1), har betydelse för sjukdomsförloppet (Kidd et al., review, 2001). För att kunna utveckla framtida behandlingsmetoder krävs kunskap om vad IL-1 har för roll i inflammationen. Många hästar drabbas av hältor och det får stor betydelse för hästens prestation. Mer än hälften av alla hältor anses bero på skador i leden med osteoartrit som vanlig orsak (Kidd et al., review, 2001). Dessutom har en studie visat att vanligaste anledningen till att äldre hästar avlivs är ledproblem (Egenvall et al., 2006). På grund av osteoartritens stora påverkan på hästars hälsa och prestation är det relevant att hitta nya och bättre behandlingsmetoder och IL-1 har där fått en central roll (Frisbie et al., 2002, 2007).

## MATERIAL OCH METODER

Bokmaterial hittades efter sökning i bibliotekets katalog på HORSE or EQUINE or HÄST and JOINT or LED or OSTEOARTHRITIS. Sökningen på internet gjordes i Google Scholar. Där användes olika kombinationer av HORSE or EQUINE and OSTEOARTHRITIS. Dessutom gjordes en sökning med sökorden IL-1 or CYTOKINES and JOINT or OSTEOARTHRITS. Till den grundläggande delen gjordes sökningar med orden JOINT, ANATOMY, PHYSIOLOGY, CARTILAGE, CHONDROCTYES, PROTEOGLYCANS, CARTILAGE MATRIX. Även referenser från hittade artiklar användes.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Synovialledens anatomi och fysiologi

En synovialled består av en ledkapsel med en yttre fibrös del och ett synovialmembran som täcker ledkapselns insida, ligament och senor, ledbrosk, subkondralt ben och en ledspringa med ledvätska, se bild 1.

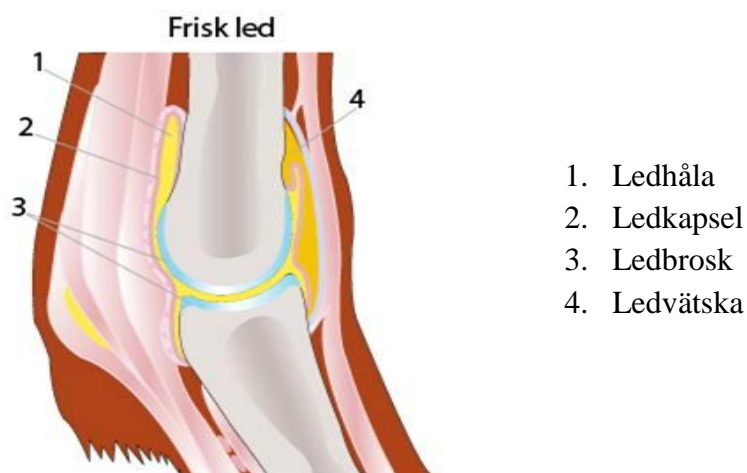


Bild 1. Ledens uppbyggnad (Li Gessbo).

### ***Ledkapsel, ligament och senor***

På utsidan har ledkapseln ett tjockt bindvävslager och på insidan ett synovialmembran. Den yttre delen av ledkapseln har ligament och senor som förstärkning. Synovialmembranet består av ett yttre lager som kallas lamina propria och ett inre lager med oregelbundet ordnade synovicyter. Lamina propria består av bindväv och i en del leder även fettvävnad. Lagret med synovicyter är mellan en och fyra cellager tjockt och membranet täcker inte bara insidan av ledkapseln utan också benytorna som inte utgör själva ledytan. Synovicyterna kan både verka som fagocyterande (typ A) och sekretoriska (typ B) celler. Deras sekretoriska funktion består av att tillverka olika komponenter i ledvätskan, exempelvis hyaluronsyra (McIlwraith och Trotter, 1996).

### ***Ledvätska***

Ledvätskan är ett ultrafiltrat av blodplasman så vätskan och små proteiner i ledvätskan kommer från blodet. Dessutom påverkar synovicyterna ledvätskans sammansättning, bland annat producerar de hyaluronsyra som är en viktig beståndsdel. Hyaluronsyran gör ledvätskan viskös och gör så att den fungerar stötdämpande vid belastning. En annan viktig funktion som ledvätskan har är att se till att ledbrosket försörjs med näring då brosket saknar blodkärl (McIlwraith och Trotter, 1996).

### ***Ledbrosk***

Synovialleder består av hyalint brosk som innehåller kondrocyter som bildar det extracellulära matrixet. De huvudsakliga komponenterna i matrixet är vatten, kollagen, proteoglykaner och icke-kollagena matrixproteiner.

### ***Kondrocyterna***

Kondrocyterna i ledbrosket kan indelas i fyra zoner, se bild 2. I zonen närmast ledspringan ligger cellerna parallellt med ledytan och är långsmala. Där finns högst koncentration av kollagena fibrer vilket ger högre draghållfasthet. Därefter finns en övergångszon med runda kondrocyter som ligger skiljda från varandra och den tredje zonen består av stora kondrocyter i lodräta rader och med högst koncentration proteoglykaner. Den sista zonen som avgränsar brosket och det subkondrala benet är en kalcifierad broskzon. Mellan de tre zonerna med hyalint brosk och den kalcifierade broskzonen finns en avgränsning som kallas tidemark (McIlwraith och Trotter, 1996).

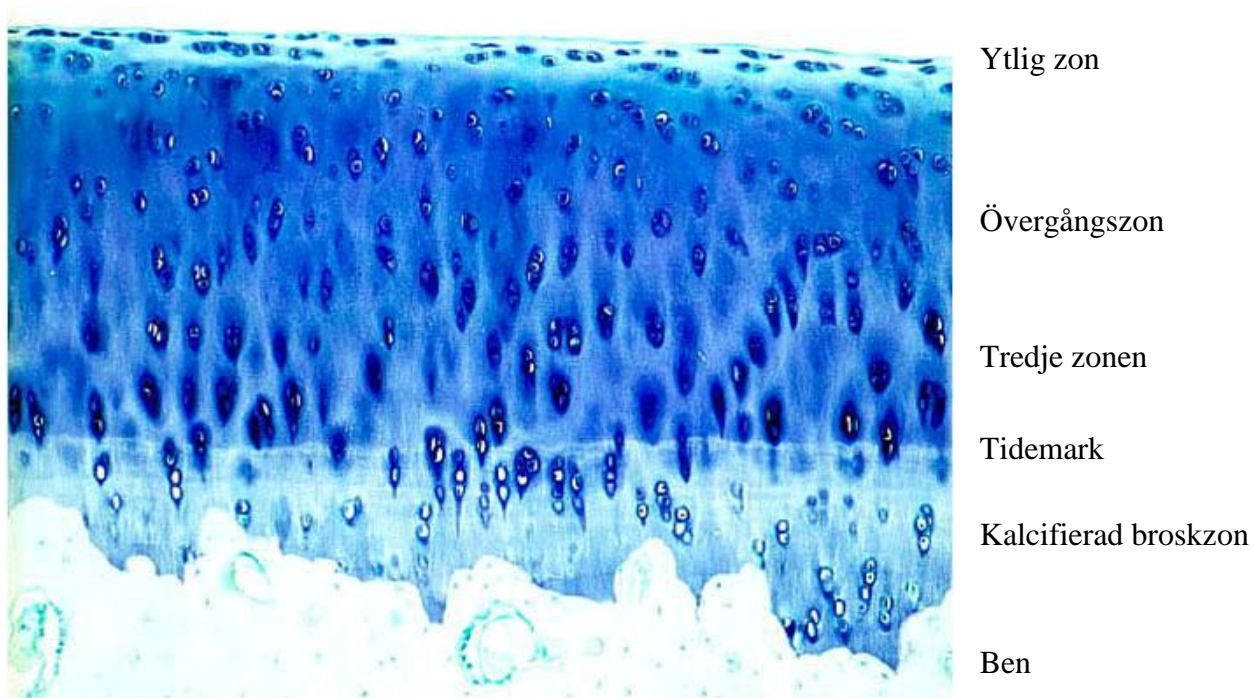


Bild 2. Ledbroskets zoner (Eva Skiöldebrand).

### Broskets extracellulära matrix

Ledbrosket består i huvudsak av kollagen typ II som bildar fibriller och ger brosket dess draghållfasthet, se bild 3. Det finns också bland annat kollagen typ XI, IX och VI. Kollagen typ XI och typ IX kan binda till typ II kollagen. Typ IX finns på ytan av fibrillerna och kan då interagera med andra matrixmolekyler (McIlwraith och Trotter, 1996). Proteoglykaner är en annan viktig beståndsdel i ledbrosket. De består av kedjor med glykosaminoglykaner (GAGs) som binder till ett protein. GAGs är negativt laddade och kedjorna repellerar varandra vilket gör att molekylen sträcker ut sig. Mellan kedjorna lägger sig vattenmolekyler som vid belastning pressas ut och vid avlastning dras tillbaka in i matrix, det ger brosket en stötdämpande förmåga (McIlwraith och Trotter, 1996).

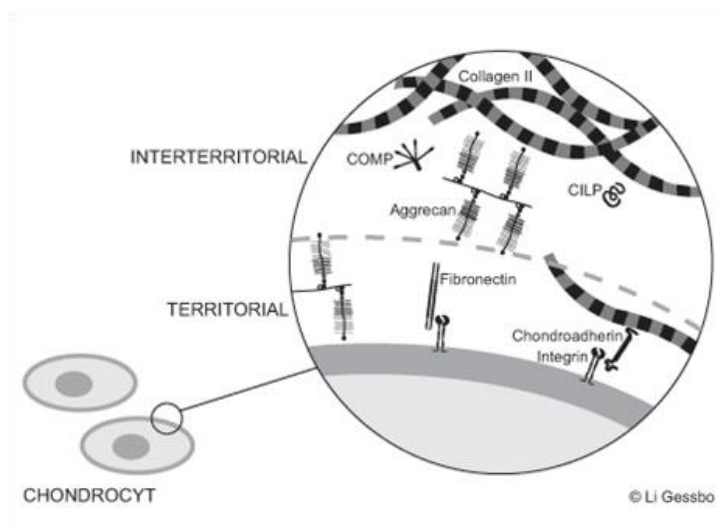
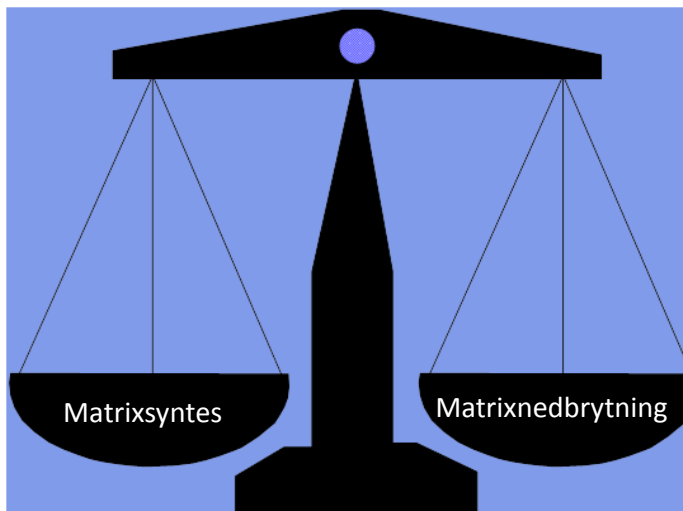


Bild 3. Komponenter i ledbroskets matrix (Li Gessbo).

Den viktigaste proteoglykanen i ledbrösket är aggrecan som innehåller två olika GAGs, kondroitinsulfat och keratansulfat. Aggrecan tillverkas i cellen och den färdiga molekylen utsöndras sedan ut ur kondrocyterna. Aggrecan förekommer i matrixet i form av aggregat av upp till 100 aggrecanmolekyler bundna till hyaluronsyra. Bindningen sker extracellulärt efter att den färdiga aggrecanmolekylen utsöndrats (McIlwraith och Trotter, 1996). Hyaluronsyra är ingen proteoglykan och tillverkas inte färdig i cellen utan av ett enzym som finns i cellmembranet och utsöndras direkt till matrixet (Roughley, review, 2006). Den största delen av hyaluronsyran finns bundet till aggrecan men den kan också binda till kondrocyterna och andra matrixmolekyler (McIlwraith och Trotter, 1996). SLRP är en grupp proteoglykaner och det står för Small Leukocine-rich Proteoglycan, exempel på SLRPs är decorin, biglycan, lumican och fibromodulin. SLRPs kan interagera med kollagen, till exempel sätta sig på ytan och hindra enzymer från att bryta ner fibrillerna. De kan även interagera med många andra typer av makromolekyler, exempelvis andra kollagentyper och olika tillväxtfaktorer (Roughley, review, 2006).

Förutom kollagen och proteoglykaner består ledbrösket av en liten andel andra proteiner som kallas ickekollagena proteiner, bland annat länkprotein. Länkprotein är det protein som binder samman aggrecan och hyaluronsyra och stabiliserar aggregatet (McIlwraith och Trotter, 1996). Cartilage oligomeric protein (COMP) är också ett ickekollagent protein, den har fem armar som är identiska och kan interagera med typ II kollagen, se bild 3. COMP stimulerar kollagenmolekylerna att bilda fibriller och gör att de bildas i högre hastighet (Thur et al., 2001).

I normalt brosk är det jämvikt mellan produktion och nedbrytning av ledbröskets matrix, se bild 4. Matrixkomponenterna produceras av kondrocyterna och bryts sedan ner av olika enzymer. Det finns en rad nedbrytande proteaser som kan produceras av kondrocyterna och synovicyterna. En av de enzymgrupper som står för nedbrytningen är matrix metalloproteinaser (MMPs). Det finns många olika MMPs och alla frisätts som proenzym som måste klyvas för att aktiveras. För att motverka effekten av MMPs finns hämmare, tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs (McIlwraith och Trotter, 1996). En annan viktig grupp enzymer är aggrecanaser, ADAM-TS4 och ADAM-TS5 som specifikt kan klyva aggrecan (Tortorella et al., 2001).



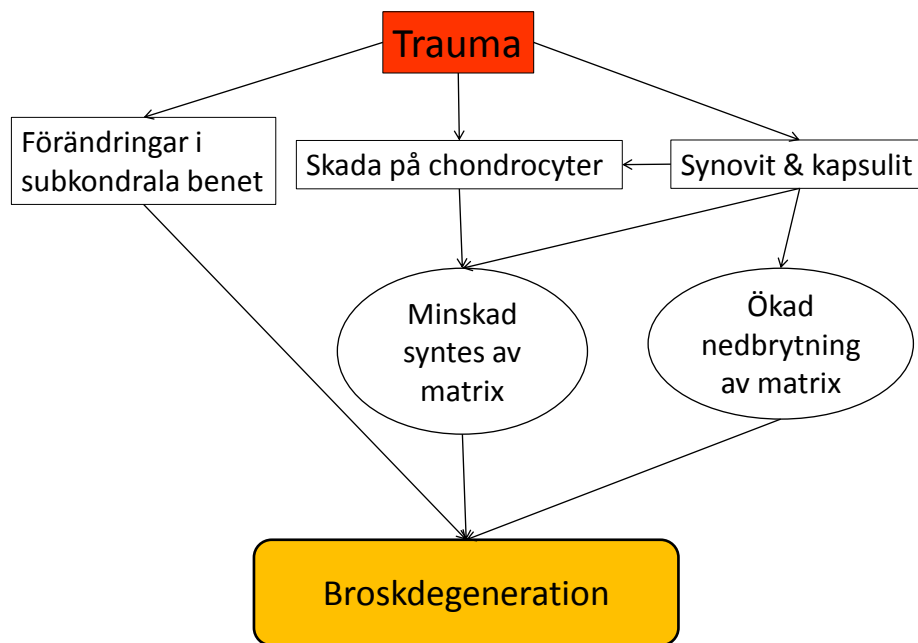
*Bild 4. Jämvikt i normalt brosk (Eva Skiöldebrand).*

### **Subkondralt ben**

Det subkondrala benet länkas samman med ledbrosket via den kalcifierade broskzonen. Benet ska ge stöd åt ledbrosket och fungera stöddämpande. Benet innehåller en hög koncentration av mineraler och kan därför ta emot relativt hög belastning. Benet består till 65 % av mineraler i form av hydroxyapatit som innehåller både kalcium och fosfat. 25 % av benets innehåll är vatten, övriga 10 % består till största delen av kollagen I och en mindre andel proteoglykaner och ickekollagena proteiner. Benet genomgår hela tiden en cykel av nedbrytning via osteoklaster och nybildning via osteoblaster och kan på så sätt anpassas till belastning (McIlwraith och Trotter, 1996).

### **Osteoartrit**

Det finns många olika namn för sjukdom i leden, exempelvis artros, artrit och osteoartros. Men eftersom sjukdomen involverar alla ledens strukturer och har ett inflammatoriskt inslag är den korrekta benämningen osteoartrit. Förändringar som är synliga vid osteoartrit är broskdegeneration, synovit, subkondral benskleros och ibland osteofyter. Orsakerna till osteoartrit kan vara många, exempelvis akut trauma eller bakteriell artrit. Men den allra vanligaste orsaken är upprepad felaktig belastning som leder till många små trauman. De kliniska fynden vid osteoartrit är hälta, smärta, svullnad och minskad rörlighet i leden (Kidd et al., review, 2001).



Figur 1. Hur trauma leder till broskdegeneration (efter Kidd et al., 2001)

Trauma kan leda till broskdegeneration på olika sätt, se figur 1. Vid upprepade små trauman som sker vid felaktig belastning, exempelvis när unga hästar tränas hårt eller hästar tränas i mycket högt tempo, kan hästen få subkondral benskleros. Leden försöker anpassa sig genom en förtätning av benet för att kunna stå emot den felaktiga belastningen. Dessutom kan hästen drabbas av mikrofrakturer i övergången mellan brosk och ben. Det gör att benets stötdämpande förmåga minskar och brosket utsätts för allt för hög belastning vilket kan leda till fibrillering och brosknedbrytning (Kidd et al., review, 2001). En synovit eller kapsulit induceras ofta vid felaktig belastning och leder till frisättning av cytokiner (bland annat IL-1) och andra inflammatoriska mediatorer som ger både nedbrytning och minskad syntes av kollagen och proteoglykaner (McIlwraith och Trotter, 1996). Förutom att synovicyterna frisläpper cytokiner så fagocyterar de kollagena fibrer och delar av nedbrutna proteoglykaner vilket ytterligare stimulerar dem till att frisläppa cytokiner och enzymer. På så sätt kan inflammationen stimulera ytterligare inflammation. Vid osteoartrit blir brosket gulaktigt, matt och fibrillerat vilket är ett uttryck för att brosket förlorar både proteoglykaner och kollagen (Kidd et al., review, 2001).

## Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) är en proinflammatorisk cytokin som kan produceras av många olika celler, bland annat av synovicyterna och kondrocyterna i leden. Det finns tre olika typer i IL-1 genfamiljen, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  och IL-1 receptorantagonist (IL-1Ra). Både IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$  tillverkas som prekursorer som måste klyvas för att bli aktiva, till skillnad från IL-1Ra som är aktiv direkt. IL-1 $\alpha$  finns till största delen kvar intracellulärt eller bundet till cellmembranet. IL-1 $\beta$  tillverkas i cellen, därefter klyvs den och transporteras ut vilket gör att effekten får längre räckvidd än med IL-1 $\alpha$ . Enzymet som ansvarar för klyvningen av IL-1 $\beta$  är ett

intracellulärt cysteinproteas som kallas ICE. IL-1Ra är en antagonist som förekommer naturligt och kan reglera effekten av IL-1 (Dinarello, 1996).

### Receptorer

Det finns två olika typer av receptorer för IL-1, typ I och typ II. Typ I receptorn är den receptorn som leder till signalering. IL-1 binder till typ I receptorn som då bildar en dimer med IL-1R accessory protein (IL-1R-AcP). Det sker en fosforyleringskaskad av proteinkinaser som leder till en amplifiering av signalen som påverkar olika transkriptionsfaktorer och därmed genuttrycket i cellen. När IL-1Ra binder till typ I receptorn sker ingen dimerisering och därmed ingen signalering. Om IL-1 binder till typ II receptorn sker inte heller någon signalering utan den reglerar effekten genom att hindra IL-1 från att binda till typ I receptorn. Dessutom finns det lösliga varianter av både typ I och typ II receptorerna som också kan reglera effekten av IL-1. De lösliga receptorerna binder upp IL-1 som då inte kan binda till den cellulära typ I receptorn och signalera, se Fig 2 (Dinarello, 1996).

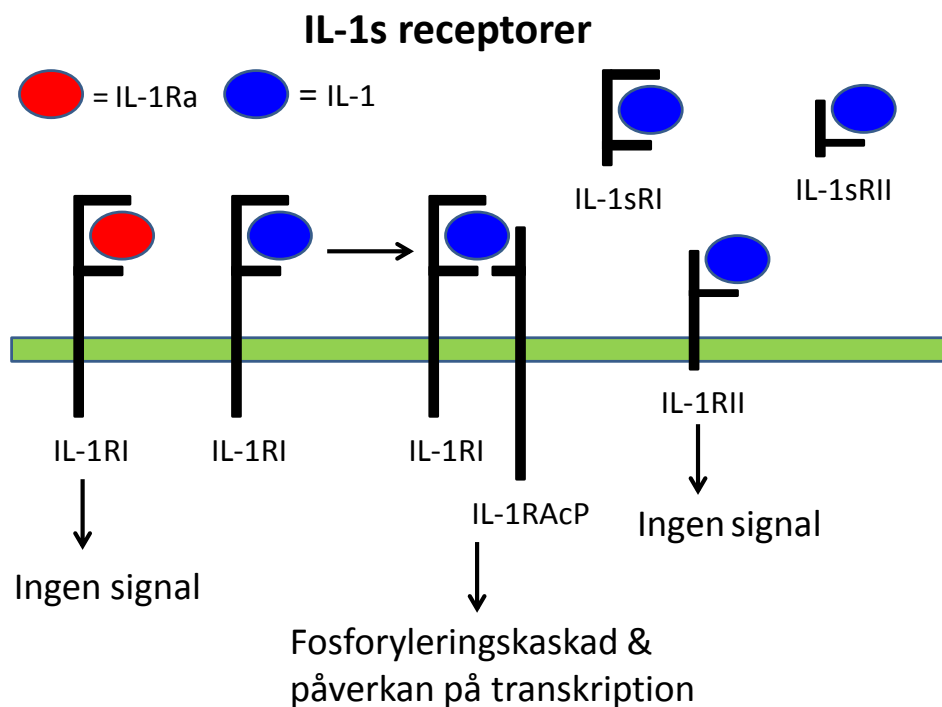


Fig.2. IL-1s receptorer och signalering (efter Dinarello, 1996).

### Interleukin-1s roll vid osteoartrit

Det finns många studier på hur IL-1 påverkar sjukdomsutvecklingen vid osteoartrit och den anses vara en mycket viktig proinflammatorisk cytokin som påverkar bland annat de matrix nedbrytande enzymerna MMPs och ADAM-TS (Kidd et al., review, 2001). Det finns en mängd andra proteaser som bryter ner brosket, men jag har valt att fokusera på MMPs och

ADAM-TS. IL-1 har detekterats i ledvätskan hos hästar med osteoartrit med hjälp av en human antikropp (Bertone et al., 2001).

#### *Matrix metalloproteinaser (MMPs) och tissue inhibitor of matrixmetalloproteinaser (TIMP)*

En studie av Tetlow (Tetlow et al., 2001) visade med immunohistokemi att MMPs fanns i de ytliga zonerna av ledbrusk hos humanpatienter med osteoartrit. Det jämfördes med prover av ledbrusk från patienter med normalt brosk och där kunde man inte detektera några MMPs. I studien kunde man se att infärgningen för MMPs var som tydligast i de ytliga områden av ledbrusk som hade minskad mängd matrix och ledbrusk var fibrillerat. Dessutom fanns IL-1 $\beta$  i de ytliga zonerna enligt samma mönster som MMPs. I prover från lindrigare fall av osteoartrit såg man mindre mängd IL-1 och i de friska ledbrusken detekterades inte IL-1 alls. I samma studie så aktiverades normala kondrocyter med IL-1 och därefter undersöktes produktionen av MMPs. Det visade sig att aktiverade celler frisläppte flera olika MMPs till skillnad från kontrollgruppen där cellerna endast tillverkade små mängder av MMP-2. (Tetlow et al., 2001).

Liknande resultat som studien ovan, (Tetlow et al., 2001), visade på humansidan har en annan studie, (Tung et al., 2002), visat på häst. Kondrocyter från hästar stimulerades med IL-1 och det gav en uppreglering av generna som kodar för MMPs och uppregleringen var dosberoende. Studien undersökte även aktiviteten av MMPs, som också ökade dosberoende efter stimulering med IL-1. IL-1 ökade genuttrycket av TIMP-1 som är en hämmare av MMPs, ett resultat som går emot andra studier (Tung et al., 2002). Bland annat en annan studie, (Richardson och Dodge, 2000), visade att IL-1 ökade genuttrycket av MMPs medan uttrycket av TIMP var relativt oförändrat. En studie, (Ley et al., 2011), visade att IL-1 $\beta$  ökade genuttrycket av MMPs och även aktiviteten. De visade också att IL-1 $\beta$  ökade uttrycket av TIMP, precis som Tung et al. (2002).

#### *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAM-TS)*

Det finns studier som visar att IL-1 inte bara har effekt på MMPs utan också på ADAM-TS, de specifika enzym som står för den huvudsakliga nedbrytningen av aggregan. Tortorella et al. (2001) visade att bovina broskcellkulturer som stimulerades med IL-1 hade ökad mängd aggreganfragment i mediet. Fragmenten var delade på de specifika platser där ADAM-TS4 och ADAM-TS5 klyver och inte där MMPs klyver. Att MMPs inte har det huvudsakliga ansvaret för klyvningen av aggregan visades dessutom genom att tillsätta en MMP-specifik hämmare, vilket inte ledde till en minskning i aggregannedbrytningen. Studien undersökte om IL-1 kunde inducera ett ökat genuttryck av ADAM-TS4 och ADAM-TS5 genom att studera mRNA nivåer. ADAM-TS4 kunde inte detekteras i kontrollgrupperna, men däremot efter stimulering med IL-1. ADAM-TS5 kunde detekteras redan i kontrollgrupperna och stimulering med IL-1 ökade inte nivåerna. Därefter kontrollerades nivåerna av färdigt protein, i kontrollgrupperna kunde inga nivåer av något av enzymen detekteras medan efter



stimulering med IL-1 såg man ökade nivåer av ADAM-TS4. Det här tyder på att ADAM-TS5 uttrycks hela tiden på en låg nivå (som inte går att detektera) medan ADAM-TS4 kan induceras av cytokiner (Tortorella et al., 2001).

Ytterligare resultat visade att efter tillsats med en ADAM-TS4 antikropp minskade nedbrytningen med 75 % och efter tillsats med ADAM-TS5 antikropp minskade nedbrytningen med 15 %. Det visar att de båda aggreganserna står för 90 % av all nedbrytning av aggregan efter stimulering med IL-1 (Tortorella et al., 2001). Andra studier visar att IL-1s inverkan på ADAM-TS skiljer sig mellan arter och celltyper. En studie, (Kamm et al., 2010), visade att genuttrycket av ADAM-TS5 var högre i synovialmembranet hos hästar med osteoartrit. Däremot ökade ADAM-TS4 i kondrocyterna men inte ADAM-TS5. Det kan tyda på att ADAM-TS4 har en större betydelse för brosknedbrytningen (Kamm et al., 2010). Ley et al. (2011) visade däremot att IL-1 $\beta$  ökade genuttrycket av ADAM-TS5 i ekvina kondrocyter.

#### *Förändrad matrixsyntes*

Enligt Neidel och Zeidler (1993) har IL-1 inte bara effekt på nedbrytningen av proteoglykaner utan också på syntesen. De visade i bovina kondrocyter att IL-1 hämmade syntesen av proteoglykaner dosberoende och det krävdes lägre koncentrationer av IL-1 för att hämma syntesen än det krävdes för att stimulera nedbrytningen. IL-1 var 50 gånger mer effektiv på att hämma syntesen än på att stimulera nedbrytningen av proteoglykaner. Effekten av IL-1 kunde stoppas genom att använda en specifik antikropp. Vid låga koncentrationer av antikroppen hämmades endast IL-1s effekt på nedbrytningen medan vid höga koncentrationer hämmades både IL-1s effekt på syntesen och nedbrytningen (Neidel och Zeidler, 1993). Richardson och Dodge (2000) visade att IL-1 minskade nivåerna av typ II kollagen mRNA och dessutom genuttrycket av aggregan och länkprotein i ekvina kondrocyter. Ett minskat genuttryck av de tre leder till minskad syntes av matrixkomponenter. Även en annan studie på ekvina kondrocyter av Ley (Ley et al., 2011) visade att IL-1 minskar genuttrycket av aggregan, kollagen typ I och kollagen typ II.

#### *Prostaglandin E<sub>2</sub> och kväveoxid (NO)*

Bildningen av prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) involverar bland annat två olika enzymer, fosfolipas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) och cyclooxygenas-2 (COX-2). Tung et al. (2002) visade att IL-1 ökade uttrycket av COX-2 vilket leder till mer PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> kan minska syntesen av matrixkomponenter och aktivera MMPs. Men PGE<sub>2</sub> har inte bara visat sig ha katabola effekter, i låga koncentrationer kan PGE<sub>2</sub> öka syntesen av proteoglykaner och kollagen II. PGE<sub>2</sub> kan också minska det ökade genuttrycket av MMPs som IL-1 inducerar. Den här komplexa rollen kan bero på PGEs många olika receptorer och signaleringsvägar (Amin et al., review, 2000).

Även kvävemonoxid (NO) har en komplex roll vid osteoartrit. Bildningen av NO sker via enzymer, ett av dessa enzym kan induceras av IL-1 och heter inducible nitric oxide synthases, iNOS. NO har många olika effekter, den kan hämma syntesen av matrix, aktivera MMPs och tillsammans med fria radikaler leda till att kondrocyterna går i apoptos. IL-1 kan också inducera iNOS i det subkondrala benet där en ökad mängd NO kan leda till benförlust. NO kan själv stimulera mer produktion av IL-1 vilket ger en negativ spiral (Abramson et al., 2001). Till skillnad från studien ovan så finns det en studie som visar att NO kan motverka effekten av IL-1 i ledbrusk hos häst. NO visade sig minska mängden aggregatfragment som bryts ner vilket tyder på att NO skulle reglera aggregaterna. NO motverkade den nedbrytande effekten av IL-1 på proteoglykaner vilket kan förklara varför det behövs mer IL-1 för att bryta ner proteoglykanerna än det behövs för att minska syntesen. För att IL-1 ska inducera nedbrytning måste den övervinna den antagonistiska effekten av NO, något som inte behövs för att hämma syntesen. NO kan alltså ha olika effekt på MMPs och aggregat, vilket gör bilden av proteoglykannedbrytningen än mer komplex (Bird et al., 2000).

## **Behandlingsmetoder vid osteoartrit**

### ***IRAP***

Autogt konditionerat serum (ACS) går under handelsnamnet IRAP och är en metod där man tar hästens eget blod och stimulerar de vita blodkropparna till att producera olika antiinflammatoriska cytokiner och injicerar det sedan intraartikulärt. Den största ökningen ser man i produktionen av IL-1 receptorantagonist, IL-1Ra, vilket gör att den anses ha störst betydelse för behandlingens resultat. En studie visade på signifikant minskning av graden hälsa, en ökning av IL-1Ra i ledvätskan och minskad hyperplasi av synovialmembranet efter behandling med ACS jämfört med placebo. Ingen signifikant minskning av GAGs eller PGE<sub>2</sub> i ledvätskan kunde ses efter behandling med ACS. Man såg inte heller en signifikant förbättring av ledbruskets morfologi eller mängden GAGs i brosket (Frisbie et al., 2007).

Frisbies studie, (Frisbie et al., 2007), är den enda experimentella studien på häst som genomförts vad det gäller IRAP och några kliniska studier på häst finns inte. Enligt Läkemedelsverket (2010) rekommenderas inte IRAP på grund av detta och det behövs ytterligare information om de ingående aktiva substanserna och dess farmakologiska effekter. Textor (review, 2011) påpekade att det finns många frågetecken kring IRAP, bland annat eftersom den inte endast innehåller IL-1Ra utan många olika komponenter. Man har nu börjat få upp ögonen för att IRAP även innehåller cytokiner som stimulerar inflammationen exempelvis IL-1 $\beta$  och tumörnekrosfaktor-alfa (TNF- $\alpha$ ). Det krävs mer studier och kliniska försök för att verkligen kunna svara på om IRAP fungerar och vilka komponenter som i så fall gör att det fungerar. Mycket forskning finns dock som stödjer en antagonist mot IL-1 som behandlingsmetod (Textor, review, 2011).

## **Genterapi**

Det finns en studie av Frisbie på häst, (Frisbie et al., 2002), som utvärderar genterapi med en IL-1 receptorantagonistgen som ska ge endogen produktion av IL-1Ra och hämma effekten av IL-1. De använde en adenovirusvektor för att överföra IL-1Ra och efter intraartikulär injektion sågs en dosberoende ökning i IL-1Ra koncentrationen. Produktionen IL-1Ra hade en maximal duration på 28 dagar. Hästarna som fått behandlingen hade minskad hälta och minskad ledutgjutning jämfört med kontrollgruppen. Efter behandling med IL-1Ra sågs mindre patologiska förändringar i leden både vid obduktion och histologiskt samt mindre vaskularisering i synovialmembranet, något som tyder på minskad inflammation. Däremot sågs en ökning av lymfocyter i synovialmembranet efter behandling (Frisbie et al., 2002).

Vid användning av genterapi måste vektorn kunna överföra genen i hög grad, men dessutom vara säker. Vektor får inte vara toxisk och inte trigga immunförsvaret i för stor utsträckning. Virus är ofta mer effektiva men involverar också högre risk. För att genterapi ska kunna bli klinisk verklighet krävs att man hittar en vektor som är både effektiv och säker (Nixon et al., review, 2007).

## **DISKUSSION**

Förekomst av den proinflammatoriska cytokinen IL-1 i ledvätskan hos hästar med osteoartrit har bekräftats i studier (Bertone et al., 2001). För att detektera IL-1 används en antikropp mot just IL-1. Bertones studie visade att IL-1 finns hos hästar med osteoartrit genom att använda en human antikropp mot IL-1. Men för att få helt tillförlitliga resultat måste en specifik antikropp mot ekvin IL-1 användas, något som Kamm, (Kamm et al., 2010), hade i en studie. Där kunde dock IL-1 inte detekteras i ledvätskan eftersom metoden med ekvina antikroppar inte är tillräckligt känslig i dagsläget mot de låga koncentrationer (1 ng/ml) som finns i ledvätskan. Däremot kunde Kamm visa på en signifikant uppreglering av genuttrycket av IL-1 i kondrocyterna från hästar med osteoartrit. Human IL-1 och ekvin IL-1 är inte homologa, de har alltså inte exakt samma struktur. Att använda en human antikropp kan då ge inbindning till fel molekyl eller inte till någon molekyl alls, vilket kan ge felaktiga resultat. För att detektera molekyler hos hästar är det att föredra om man har ekvina antikroppar eller utvärderar homologin mellan arter för att kunna använda andra antikroppar (Skiöldebrand, E., SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, pers. medd., 2012).

IL-1 har en viktig roll vid osteoartrit och påverkar sjukdomsutvecklingen i stor utsträckning. Studier har visat att IL-1 ökar genuttrycket och aktiviteten av MMPs (Richardson och Dodge, 2000; Tetlow et al., 2001; Tung et al., 2002; Ley et al., 2011). MMPs är en grupp enzymer som kan bryta ner många olika matrixkomponenter i brosket. Vid inflammation så bildas alltså mer MMPs vilket leder till en ökad nedbrytning av ledbroskets extracellulära matrix. Det finns också specifika enzymer som klyver aggregan, de kallas aggreganaser eller ADAM-TS. Eftersom aggregan är en mycket viktig komponent i matrixet som ger brosket dess

stötdämpande och sviktande förmåga (McIlwraith och Trotter, 1996) så får nedbrytningen stora negativa effekter på broskets funktion. IL-1 som bildas vid inflammation påverkar även dessa enzymer, dock skiljer det sig mellan arter och celltyper. Hos nötkreatur och häst har vissa studier visat att ADAM-TS4 induceras av IL-1 i kondrocyterna (Tortorella et al., 2001; Kamm et al., 2010). Hos hästar så ökar däremot uttrycket av ADAM-TS5 i synovicyterna vid inflammation (Kamm et al., 2010). Till skillnad från dessa resultat har en annan studie visat att genuttrycket av ADAM-TS5 ökar i ekvina kondrocyter (Ley et al., 2011). Både Tortorella et al. (2001) och Kamm et al. (2010) visade att ADAM-TS5 finns uttryckt i låga koncentrationer hela tiden i kondrocyterna, vilket skulle kunna tyda på att ADAM-TS5 har en roll i den naturliga matrixomsättningen medan ADAM-TS4 induceras av cytokiner vid inflammation. Vilket motsägs av Ley et al. (2011) som visar att ADAM-TS5 kan induceras av IL-1.

Varför dessa tre studier har kommit fram till olika resultat om vilken typ av ADAM-TS som induceras av IL-1 är svårt att utläsa. Alla tre har undersökt RNA nivåer i kondrocyter med hjälp utav realtids RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction). Variationen skulle till exempel kunna bero på vilken typ av primers som använts för att märka ut generna. Oavsett vilken typ av ADAM-TS som induceras av IL-1 så leder det till en ökad nedbrytning av aggregaten. Det finns även många andra proteaser som bidrar till nedbrytningen av matrix men jag har valt att fokusera på MMPs och ADAM-TS. IL-1 kan också påverka TIMP, TIMP hämmar MMPs och minskar nedbrytningen av ledbroskets matrix. Vissa studier har visat att IL-1 kan öka TIMP vilket i så fall skulle leda till minskad nedbrytning av brosket (Tung et al., 2002; Ley et al., 2011). Det finns dock andra studier som visar att IL-1 inte utövar någon effekt på TIMP (Richardson och Dodge, 2000). Både Tung et al. (2002) och Ley et al. (2011) har stimulerat kondrocyterna med ekvin IL-1 medan Richardson och Dodge (2000) har använt sig av human IL-1. Eftersom human och ekvin IL-1 inte är homologa så anser jag att studierna med ekvin IL-1 är betydligt mer tillförlitliga. Om IL-1 har effekt på TIMP så motverkar det IL-1s egen effekt på MMPs, vilket skulle kunna vara ett sätt för kroppen att reglera effekten av IL-1 och försöka motverka brosknedbrytningen.

Att IL-1 minskar syntesen av matrixkomponenter verkar vara en entydig effekt som många studier visat på. Efter stimulering med IL-1 minskar genuttrycket av olika matrixkomponenter, bland annat aggregaten och kollagen II (Neidel och Zeidler, 1993; Richardson och Dodge, 2000; Ley et al., 2011). Det finns också tydliga resultat som visar att IL-1 ökar produktionen av prostaglandin E<sub>2</sub> och kväveoxid (NO) (Abramson et al., 2001; Tung et al., 2002). Deras effekt på ledbrosket vid osteoartrit är däremot inte helt tydlig. Vissa studier visar på anabola effekter (Amin et al., review, 2000; Bird et al., 2000) och andra på katabola (Amin et al., review, 2000; Abramson et al., 2001). De anabola effekterna kan vara ett sätt för kroppen att reglera IL-1 och försöka minska broskdegenerationen. Både anabola och katabola effekter kan finnas och variationerna i studierna kan bero på att de uppträder i olika skeden av osteoartrit. Men mer forskning behövs för att klarlägga effekterna och

därefter kunna utveckla behandlingsmetoder som inriktar sig på prostaglandiner och kvävemonoxid.

Eftersom IL-1 har stor betydelse vid osteoartrit så är det förståeligt att IL-1 fått stor uppmärksamhet när man försöker utveckla nya behandlingsmetoder. Den i dagsläget mest aktuella metoden och som redan finns på marknaden är IRAP. Man tar hästens eget blod och stimulerar de vita blodkropparna till att producera mer cytokiner, bland annat IL-1Ra. I teorin är metoden lovande och experimentella studier har visat på ganska bra resultat (Frisbie et al., 2007). Däremot är det för tidigt att kunna säga om det verkligen är effektivt eller inte. Det finns i dagsläget inga kliniska studier vilket är anledningen till att behandlingen inte rekommenderas av läkemedelsverket (Läkemedelsverket, 2010). En annan aspekt som talar emot IRAP är att den innehåller många olika komponenter som inte är helt klarlagda, inte bara antiinflammatoriska cytokiner utan också proinflammatoriska, så som IL-1 (Textor, review, 2011). En annan behandlingsmetod som det forskas på är genterapi. Man injicerar en IL-1Ra gen med en virusvektor så cellerna själva producerar en IL-1 antagonist. Metoden får längre duration och mer riktad effekt mot IL-1 än IRAP (Frisbie et al., 2002). Däremot finns det risker med att använda virus, viruset kan aktivera immunförsvaret och vara toxiskt för cellerna (Nixon et al., review, 2007). Behandlingsmetoder mot IL-1 är lovande i teorin och jag tror att det kommer bli användbart i framtiden. Men i dagsläget krävs mer forskning för att utvärdera om de verkligen har klinisk effekt, behandlingsmetoder utan säkerställd effekt ska inte rekommenderas. Genterapi måste dessutom kunna utföras på ett säkert sätt utan risker för patienten. Båda metoderna behöver därför utvecklas för att bli kliniskt användbara.

Mina slutsatser är att IL-1 har en viktig roll vid inflammationen och sjukdomsförloppet vid osteoartrit. Den utövar i högsta grad en katabol effekt på ledbrösket, men trots att IL-1 är viktig så är den inte den enda molekylen utan många komponenter spelar in. Behandling mot IL-1 verkar dock vara något att hoppas på i framtiden, men det finns mycket forskning kvar att göra.

## REFERENSER

- Abramson, S.B., Attur, M., Amin, A.R., Clancy, R. (2001). Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* 3, 535-541.
- Amin, A.R., Dave, M., Attur, M., Abramson, S.B. (2000). COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Current Rheumatology Reports* 2, 447-453.
- Bertone, A.L., Palmer, J.L., Jones, J. (2001). Synovial Fluid Cytokines and Eicosanoids as Markers of Joint Disease in Horses. *Veterinary Surgery* 30, 528-538.
- Bird, J.L.E., May, S., Bayliss, M.T. (2000). Nitric oxide inhibits aggrecan degradation in explant cultures of equine articular cartilage. *Equine Veterinary Journal* 32, 133-139.
- Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *The Journal of the American Society of Hematology* 87, 2095-2147.
- Egenvall, A., Penell, J.C., Bonnett, B.N., Olson, P., Pringle, J. (2006). Mortality of Swedish horses with complete life insurance between 1997 and 2000: variations with sex, age, breed and diagnosis. *Veterinary Record* 158, 397-406.
- Frisbie, D., Ghivizzani, S., Robbins, P.D., Evans, C.H., McIlwraith, C. (2002). Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Therapy* 9, 12-20.
- Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M., Park, R.D., McIlwraith, C.W. (2007). Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research* 68, 290-296.
- Kamm, J.L., Nixon, a. J., Witte, T.H. (2010). Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. *Equine Veterinary Journal* 42, 693-699.
- Kidd, J.A., Fuller, C., Barr, A.R.S. (2001). Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education* 13, 160-168.
- Ley, C., Svala, E., Nilton, A., Lindahl, A., Eloranta, M.-L., Ekman, S., Skiöldebrand, E. (2011). Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. *Connective Tissue Research* 52, 290-300.
- Läkemedelsverket. (2010). Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - ny rekommendation. Tillgänglig: [http://www.lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrek-vet/Aseptisk%20artrit%20hos%20h%C3%A4s\\_rek\\_webb.pdf](http://www.lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrek-vet/Aseptisk%20artrit%20hos%20h%C3%A4s_rek_webb.pdf) 11.
- McIlwraith, C.W., Trotter, G.W. (1996). *Joint Disease in the Horse*. W.B. Saunders Company.
- Neidel, J., Zeidler, U. (1993). Independent effects of interleukin 1 on proteoglycan synthesis and proteoglycan breakdown of bovine articular cartilage in vitro. *Agents and Actions* 39, 82-90.
- Nixon, A.J., Goodrich, L.R., Scimeca, M.S., Witte, T.H., Schnabel, L.V., Watts, A.E., Robbins, P.D. (2007). Gene Therapy in Musculoskeletal Repair. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1117, 310-327.
- Richardson, D.W., Dodge, G.R. (2000). Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research*. 61, 624-630.
- Roughley, P.J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cells and Materials* 12, 92-101.
- Tetlow, L.C., Adlam, D.J., Woolley, D.E. (2001). Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: Associations with degenerative changes. *Arthritis & Rheumatism* 44, 585-594.

- Textor, J. (2011). Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27, 275-298.
- Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D.P., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., Paulsson, M., Maurer, P. (2001). Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 6083-6092.
- Tortorella, M.D., 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.
- Tung, J.T., Fenton, J.I., Arnold, C., Alexander, L., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Venta, P.J., Peters, T.L., Orth, M.W., Richardson, D.W., Caron, J.P. (2002). Recombinant equine interleukin-1 $\beta$  induces putative mediators of articular cartilage degradation in equine chondrocytes. *Canadian Journal of Veterinary Research* 66, 19-25.