



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# Immunmedierad reumatisk sjukdom och steroidresponsiv meningit-arterit – en identifiering och jämförelse av två autoimmuna sjukdomar

*Ananai Gac Monreal*



---

Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjursgenetik,  
441

Uppsala 2014

Examensarbete, 15 hp  
– Kandidatarbete (Litteraturstudie)

Agronomprogrammet–Husdjur

---



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för husdjursgenetik

## **Immunmedierad reumatisk sjukdom och steroidresponsiv meningit-arterit – en identifiering och jämförelse av två autoimmuna sjukdomar**

Immune-mediated rheumatic disease and steroid-responsive meningitis-arteritis – an identification and comparison of two autoimmune diseases

*Ananai Gac Monreal*

**Handledare:**

Göran Andersson, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

**Examinator:**

Erling Strandberg, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Kandidatarbete i husdjursvetenskap

**Kurskod:** EX0553

**Program:** Agronomprogrammet–Husdjur

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Omslagsbild:** Jenny Svénnås-Gillner

**Serienamn, delnr:** Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjursgenetik, 441

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

**Nyckelord:** Systemisk lupus erythematosus, SLE, immun medierad reumatisk sjukdom, IMRD, steroidresponsiv meningit-arterit, SRMA, autoimmun, sjukdom, MHC klass 2, hund

**Key words:** Systemic lupus erythematosus, SLE, immune-mediated rheumatic disease, IMRD, steroid-responsive meningitis-arteritis, SRMA, autoimmune, disease, MHC class 2, dog

## Abstract

The development of autoimmune diseases depends on both environmental risk factors as well as genetic risk factors. In autoimmune diseases an adaptive immune response has developed against the body's own antigens. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease in humans and both immune-mediated rheumatic disease (IMRD) and steroid-responsive meningitis–arteritis (SRMA) are examples of SLE-related diseases occurring in dogs. The purpose of the study was to compare the two SLE-related diseases with each other and to examine their pathogenesis and etiology. Dogs with IMRD have been seen to have anti-nuclear antibody positivity which cannot be seen in SRMA dogs. Dogs with SRMA however, have been shown to have histological changes, primarily neuro-histological, an elevation of immunoglobulins, acute phase proteins, different mRNA expression and integrin expression. Other associations with SRMA are dominance of B-cells and a shift towards a Th2-dependent immune response. Several genes have been associated with IMRD and SRMA, MHC class 2 has been shown to be a risk factor for dogs with IMRD and a risk haplotype has been found.

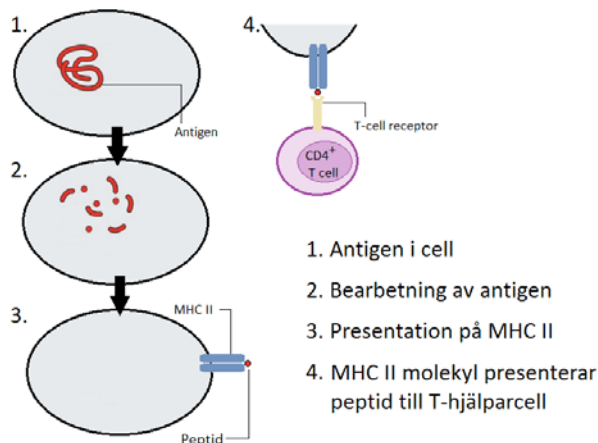
## Sammanfattning

Utvecklingen av autoimmuna sjukdomar beror på både miljömässiga och genetiska riskfaktorer och dessa sjukdomar uppstår när ett adaptivt immunsvaret bildas mot kroppsegna antigener. Systemisk lupus erythematosus (SLE) är en autoimmun sjukdom, den är en komplex kronisk inflammatorisk sjukdom med spontan uppkomst hos människa. Både immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) och steroidresponsiv meningit-arterit (SRMA) är exempel på SLE-relaterade sjukdomar hos hund. Syftet med studien var att jämföra de två SLE-relaterade sjukdomarna IMRD och SRMA, samt undersöka deras patogenes och etiologi. Hundar med IMRD har antinukleära antikroppar vilket inte ses hos hundar med SRMA. Hos hundar med SRMA ses histologiska förändringar, främst neuro-immunologiska, en förhöjning av immunoglobuliner, akutfasproteiner, olika mRNA- och integrin-uttryck. Även en dominans av B-celler och en förskjutning mot ett Th2 immunsvaret kan ses för SRMA. Flera gener har funnits vara associerade med IMRD och SRMA, MHC klass 2 har visats vara en riskfaktor för hundar med IMRD och en riskhaplotype har anträffats.

## Inledning

Utvecklingen av autoimmuna sjukdomar beror på både miljömässiga och genetiska riskfaktorer (Abul, Lichtman & Pillai, 2012). Autoimmuna sjukdomar kan delas in i två grupper beroende på om de är organ-specifika eller systemiska. I organspecifika autoimmuna sjukdomar är immunförsvaret riktat mot autoantigener som endast uttrycks i specifika celler eller vävnader och i systemiska autoimmuna sjukdomar är det riktat mot autoantigener som uttrycks av de flesta celltyper i kroppen (Wilbe, 2013). Förmågan att urskilja kroppsegna celler och vävnader mot icke-kroppsegna är en essentiell grund för immunförsvaret (Jokinen, 2011). Under ett immunsvaret mot extracellulära patogener bearbetar professionella antigenpresenterande celler antigenerna och presenterar peptider på "major histocompatibility

complex” (MHC) klass 2 molekyler till T-cell-receptorer på T-hjälparcellerna CD4<sup>+</sup> (figur 1). Därefter börjar B-lymfocyter att producera antikroppar specifikt riktade mot de extracellulära patogenerna (Wilbe, 2013). Autoimmuna sjukdomar uppstår när ett adaptivt immunsvaret bildas mot kroppsegna antigener, de antikroppar som då bildats mot dessa antigener kallas för autoantikroppar (Abul, Lichtman & Pillai, 2012). Systemisk lupus erythematosus (SLE) är ett exempel på en systemisk autoimmun sjukdom och immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) och steroidresponsiv meningit-arterit (SRMA) är två SLE-relaterade sjukdomar (Wilbe, 2013).



Figur 1. Immunsvaret med MHC klass 2 (Wilbe, 2013).

I dagsläget finns det flera olika hundraser, vilka uppkommit genom selektion på specifika egenskaper och det är ofta relativt få individer som ligger till grund för raserna. Med tiden har mer detaljerade rasstandarder tagits fram, vilket gjort raserna till mer slutna populationer. Rasstandarder har tillsammans med det faktum att varje ras är uppbyggd av ett fåtal individer, resulterat i en förlust av genetisk variation och begränsad variation i allelfrekvens, vilket gör att många raser kan ses som specifika genetiskt isolerade grupper med hög fenotypisk homogenitet (Ostrander & Wayne, 2005; Shearin & Ostrander, 2010). Inom raser finns det långa haplotypblock och hög grad av kopplingsojämvikt (linkage disequilibrium, LD) medan det finns korta haplotypblock och låg grad av LD mellan raser, p.g.a. deras gemensamma ursprung (Karlsson & Lindblad-Toh, 2008). Den intensiva artificiella selektionen och fåtalet grundindivider har även lett till en ökning av ärftliga sjukdomar hos den renrasiga hunden (Shearin & Ostrander, 2010). Många av dessa sjukdomar finns även hos människan (Ostrander & Kruglyak, 2000) och har oftast liknande kliniska symptom (Karlsson & Lindblad-Toh, 2008). De genetiskt isolerade grupperna (raserna) gör hunden till en bra genetisk modell som kan användas för att få en förståelse för genetiska faktorer som ligger bakom diverse ärftliga sjukdomar (Wilbe, 2013).

Syftet med studien var att jämföra de två SLE-relaterade sjukdomarna immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) och steroidresponsiv meningit-arterit (SRMA), samt undersöka deras patogenes och etiologi.

## **Systemisk lupus erythematosus (SLE)**

Systemisk lupus erythematosus (SLE) är en autoimmun sjukdom (Jokinen, 2011). Den är en komplex kronisk inflammatorisk sjukdom med spontan uppkomst (Marshak-Rothstein, 2006). Hos människor klassas det som SLE om minst fyra av elva kriterier uppfylls. Dessa kriterier innefattar bland annat en onormal serumnivå av immunoglobulin G (IgG), närvaro av antinukleära antikroppar (ANA), olika typer av hudutslag och munsår, samt svullna eller ömma leder (American College of Rheumatology). En lista med liknande kriterier har prövats att tas fram även för hundar men utan framgång. Dessutom visar många hundar som är positiva för ANA oftast mer stelhet än påverkan på andra organ, vilket gör det svårt att diagnostisera hundar med SLE och sjukdomen kallas därför för SLE-relaterad sjukdom hos hundar (Hansson et al., 1996).

Både immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) och steroidresponsiv meningit-arterit (SRMA) är exempel på SLE-relaterade sjukdomar hos hund (Wilbe, 2013) och det finns spekulationer kring om de båda är delar av samma sjukdom eller olika sjukdomar (Jokinen, 2011; Wilbe, 2013). En jämförelse av genetiska variationer i hela genomet (s.k. genome-wide association study, GWA) utfördes på hundar med både IMRD och SRMA (Wilbe et al., 2010). Fem loci associerade med det SLE-relaterade sjukdomskomplexet kunde ses, varav tre uppnådde genome-wide signifikans efter korrigering. En stor region med multipla associerade SNP på hundkromosom (CFA) 32 sågs när hundar med SRMA och IMRD blev undersökta som en gemensam grupp (Wilbe et al., 2010).

## **Immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD)**

Symptom för IMRD dyker upp runt 2-6 års ålder och karakteriseras av stela leder, smärta i leder kring extremiteter och smärta i muskler i samband med att ha varit stillasittande (Wilbe, 2013). Förändringar i njurar och lever är sällsynta, feber och hudutslag är vanligare men är även de sällsynta symptom. För de flesta hundar krävs en livslång behandling med kortikosteroider (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009).

### ***Antinukleära antikroppar (ANA)***

Ett indirekt immunofluorescens test gjordes på Nova scotia duck tolling retriever och visade att de flesta hundar med sjukdomen har höga serumnivåer av antinukleära antikroppar (ANA) (Hansson-Hamlin & Lilliehöök, 2009; Wilbe, 2013). De benämns som ANA-positiva och kan i sin tur delas upp i antingen ANA<sup>H</sup> eller ANA<sup>S</sup> beroende på om deras serum genererar en homogen infärgning (ANA<sup>H</sup>) eller en spräcklig infärgning (ANA<sup>S</sup>) (Wilbe, 2013). Hansson-Hamlin och Lilliehöök (2009) fann att ANA<sup>H</sup> hundar även var reaktiva mot kromosomala regioner i mitotiska celler.

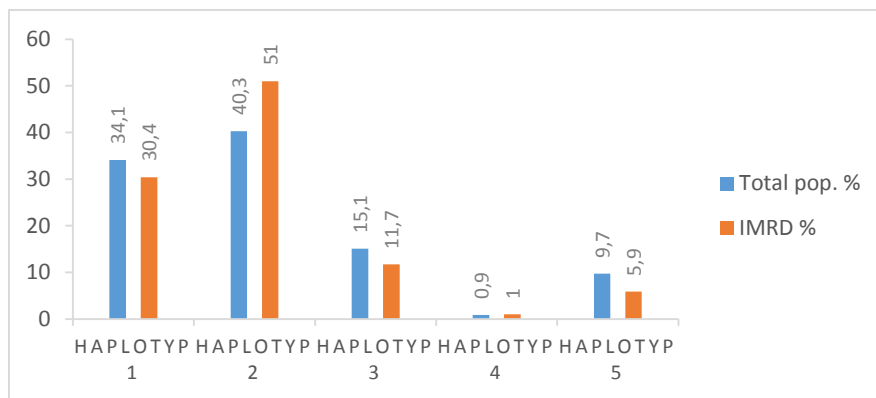
Av de ANA-positiva hundarna i samma studie var större delen ANA<sup>S</sup>, vilket överensstämmer med en tidigare studie där Nova scotia duck tolling retriever ingick (Hansson-Hamlin et al., 2006). I denna tidigare studie hade nästan uteslutande alla ANA<sup>S</sup>-hundar följande muskoskeletala kliniska symptom: smärta vid rörelse, smärta vid manipulering av leder,

styvhet samt periodvis hälta i flera av kroppens extremiteter (Hansson-Hamlin et al., 2006). De var även överrepresenterade bland ANA-positiva hundar med feber och bland hundar med förstörade lymfkörtlar. ANA<sup>H</sup>-hundar visade sig dominera inom följande symptomgrupper: anemi, polyuri/polydipsi och hudsjukdomar. Eftersom studien visade på två olika typer av ANA-reaktioner föreslår Hansson-Hamlin et al. (2006) att det indikerar antingen SLE eller SLE-relaterade sjukdomar. ANA<sup>H</sup> påvisar förmodligen SLE baserat på ANA-infärgning och kliniska symptom och ANA<sup>S</sup> indikerar SLE-relaterade sjukdomar av olika karaktär, då sjukdomen även hos människan har överlappande kliniska egenskaper (Hansson-Hamlin et al., 2006). Immundiffusion sågs vara strikt kopplat till ANA<sup>S</sup>, nästintill 70 % av serum med ANA<sup>S</sup> gav utslag. Ytterligare tester gjordes genom att jämföra olika immunodiffusionspositiva serum för identifiering och de fick fram att dessa serum totalt innefattade fyra olika undergrupper, varav enbart en kunde identifieras helt och den visade anti-RNP reaktivitet (Hansson-Hamlin et al., 2006).

### **MHC klass 2**

Genregionen i "Major histocompatibility complex" (MHC) klass 2 har blivit associerad med många autoimmuna sjukdomar hos hundar (Jokinen, 2011). Inblandningen av MHC klass 2 gener som genetiska riskfaktorer för utvecklingen av bland annat sjukdomen IMRD undersöktes av Wilbe et al. (2009). De utförde en sekvensbaserad genotypning av hundar av rasen Nova scotia duck tolling retriever med IMRD och SRMA samt av en frisk kontrollgrupp. MHC klass 2 regionen, även kallat dog leukocyte antigen (DLA) klass 2 regionen, inkluderar följande fyra loci; DLA-DRB1, -DRA, -DQA1 och DQB1, varje locus motsvarar vardera en funktionell gen. MHC klass 2 gener visar stark kopplingsjämvikt och är viktiga genetiska riskfaktorer i många autoimmuna sjukdomar hos både människor och djur (Wilbe et al., 2009).

I studien fann Wilbe et al. (2009) 13 olika alleler i fem olika MHC klass 2 haplotyper (figur 2), varav två av de vanligast förekommande (här benämnda haplotyp 1, 2) kunde ses hos 75 % av hundarna. Heterozygoti för dessa två haplotyper var de vanligast förekommande genotyperna. Däremot kunde en signifikant ökad homozygoti ses för haplotyp 2 inom gruppen med ANA-positiva hundar med IMRD jämfört med kontrollgruppen. Bland hundar med ANA<sup>S</sup> var nästan alla homozygota för haplotyp 2 (Wilbe et al., 2009). En signifikant skillnad i frekvens av haplotyp 2 kunde ses mellan IMRD och kontrollgruppen, där de med IMRD visade en högre frekvens. Wilbe et al. (2009) fann att den vanligaste haplotypen (haplotyp 2) var en riskhaplotyp för utvecklingen av IMRD. De fann en generell heterozygotifördel och studierna visade att homozygoti var ogynnsamt, särskilt för haplotyp 2.



Figur 2. Frekvens av MHC klass 2 haplotyper (Wilbe et al., 2009) (haplotyp 1; DRB1\*01502/DQA1\*00601/DQB1\*02301, haplotyp 2; DRB1\*00601 /DQA1\*005011 /DQB1\*0200, haplotyp 3; DRB1\*01501/DQA1\*00601/DQB1\*00301, haplotyp 4; DRB1\*00401/DQA1\*00201/DQB1\*01501, haplotyp 5; DRB1\*02301/DQA1\*00301/00501).

### Genome-wide association studie

En genome-wide association studie (GWA) utfördes på hundar av rasen Nova scotia duck tolling retriever som var drabbade av IMRD, studien avslöjade fyra starkt associerade regioner på CFA 3, 11, 24 och 32 (tabell 1) (Wilbe et al., 2010; Wilbe, 2013). Finnmapping visade att starkast genetisk association sågs för SNP på CFA 11, regionen innehåller följande tre gener; EPB41L4B, C9orf4 och PTPN3 (Wilbe, 2013). Den näst starkaste associationen fanns på CFA 24, regionen innehåller följande sex gener; AK128395, DNNTIP1, WFDC10B, WFDC13, WFDC1 och AY372174. Regionen som associerades med CFA 3 innehåller följande sju gener; HOMER2, AP3B2, AK126887, RPL23A, SCARNA15, FSD2 och WHDC1L1. Finnmappingen visade även en association på CFA 32 som innehåller följande sju gener; BANK1, DAPP1, DNAJB14, DDIT4L, MAP2K1IP1, EMCN och PPP3CA (Wilbe, 2013).

Tabell 1. Regioner som associerats med IMRD, med några av dess gener (Wilbe, 2013)

Kromosom	CFA 11	CFA 24	CFA 3	CFA 32
Gen	EPB41L4B	AK128395	HOMER2	BANK1
Gen	C9orf4	DNNTIP1	AP3B2	DAPP1
Gen	PTPN3	WFDC10B	AK126887	DNAJB14

### Steroidresponsiv meningit-arterit (SRMA)

Steroidresponsiv meningit-arterit är en immunmedierad sjukdom och har många olika namn varav polyartrit, juvenil polyartrit syndrom och nekrotiserande vaskulit är några av dem (Tipold & Schatzberg, 2010). Det finns två former av SRMA, en akut klinisk form och en kronisk form. Den akuta formen karakteriseras av bl.a. hyperestesi (överkänslighet) längs ryggraden, med svår nacksmärta, stel gångart och feber, även förändringar i ryggmärgsvätskan kan ses (Anfinsen et al., 2008; Tipold & Schatzberg, 2010; Wilbe, 2013). Den kroniska formen av sjukdomen kan ses efter återfall av den akuta formen, efter otillräcklig behandling, eller efter båda orsakerna i samband med varandra. Symptom för

SRMA börjar vanligtvis visa sig när hunden är runt 4-19 månader gammal, med ett spann mellan 4 månader upp till 7 år (Tipold & Schatzberg, 2010; Wilbe, 2013). Till skillnad från IMRD så är hundar med SRMA ANA-negativa, däremot används kortikosteroider som behandling även för hundar med SRMA och ger en god respons inom 1-2 dagar (Anfinsen et al., 2008; Wilbe, 2013).

### **Histologiska förändringar**

Tipold et al. (1995) genomförde en neuroimmunologisk studie på hundar med SRMA och jämförde resultatet från hundar med SRMA mot en frisk kontrollgrupp. Resultatet visade att de svårast drabbade hundarna hade en märkbar meningit, med invasion av både lymfocyter, makrofager och plasmaceller. Alla hjärnhinnor i centrala nervsystemets regioner var påverkade och mest märkbar var förändringen i området runt nacken. Även skador på många av hjärnhinneartärerna förekom, såsom hyalindegenerering, svullnader i endotelceller och markant svullnad av kärnan i artärernas muskellager och i vissa fall hade intima släppt från muscularis. Hos dessa hundar fann Tipold et al. (1995) även en inflammation i artärväggens yttersta lager (periarterit), med mestadels invasion av mononukleära celler i det yttersta lagret. För de övriga hundarna i det kroniska stadiet var infiltrationen av inflammationsceller mildare, däremot kunde en fibrös förtjockning och fokal mineralisering av de tunna hjärnhinnorna ses. Tipold et al. (1995) tolkade förekomsten av överdriven mängd ryggmärgsvätska i hjärnans ventrikler i två av fallen som en följd av hjärnhinnefibros, som hindrar flödet av ryggmärgsvätskan. De kunde även se en förtjockning av många artärväggar med betydande förträngning på grund av cellproliferation och fibros. Infiltrering av polymorfonukleära celler, makrofager och lymfocyter i artärväggar, samt nekros av muskellagret i artärväggar var sällsynta.

### **Immunoglobuliner**

Nästan alla hundar i studien utförd av Tipold et al. (1995) hade förhöjda IgG-värden i både ryggmärgsvätskan och serumtesterna, markant förhöjda IgA-värden i ryggmärgsvätskan och även höga IgA-värden i serumtesterna. Hälften av hundarna hade höga värden av IgM i ryggmärgsvätskan men däremot var IgM-värden i serum normala (tabell 2). De fann att lite mer än hälften av hundarna hade höga värden av IgG-komplex i serumet i jämförelse med den friska kontrollgruppen, däremot kunde inga IgG-komplex hittas i ryggmärgsvätskan varken hos sjuka eller friska hundar i studien (Tipold et al., 1995).

Tabell 2. Förändringar av immunoglobulinvärden hos hundar med SRMA (Tipold et al., 1995)

<b>Immunoglobuliner</b>	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>IgM</b>
<i>Ryggmärgsvätska</i>	Ökat	Ökat	Ökat
<i>Serum</i>	Ökat	Ökat	Normalt

### **Akutfasproteiner**

Akutfasproteiner är proteiner i blodet vilka kan användas för att uppskatta det medfödda immunförsvarets systemiska respons vid infektion, inflammation eller trauma. Proteinernas



serumkoncentrationer höjs med minst 25 % som svar på proinflammatoriska cytokiner som stimulerats under sjukdomsförloppet (Eckersall & Bell, 2010). Hos hundar är C-reaktivt protein (CRP) och serum amyloid A (SAA) betydande akutfasproteiner med starka reaktioner vid sjukdom, andra betydande akutfasproteiner hos hund men med lägre reaktion är haptoglobin (Hp) och surt  $\alpha_1$ -glykoprotein (AGP) (Eckersall & Bell, 2010).

Lowrie et al. (2009a) studerade akutfasproteiners roll i SRMA för att se om de kunde ge ytterligare information för att underlätta diagnosen av sjukdomen. De undersökte både ryggmärgsvätska och serum från nio hundar med SRMA och fann hos alla hundar en markant förhöjning av akutfasproteinerna C-reaktivt protein (CRP), serum amyloid-A (SAA) och haptoglobin (Hp). De fann även ett förhöjt värde av surt  $\alpha_1$ -glykoprotein (AGP) hos 6 av hundarna vilka hade mer akuta kroniska symptom. Haptoglobin och surt  $\alpha_1$ -glykoprotein kunde ej påträffas i ryggmärgsvätskan, de kunde endast påträffas i serumet. Förhöjningen av CRP uppgick till minst fem gånger högre än referensvärden och SAA uppgick till minst 60 gånger högre än referensvärden.

Efter steroid-behandling upptäckte Lowrie et al. (2009a) en signifikant skillnad i koncentrationen av C-reaktivt protein (CRP), serum amyloid-A (SAA) och surt  $\alpha_1$ -glykoprotein (AGP). Även koncentrationen av CRP och SAA i serumet från hundar med förmodat återfall studerades och även där sågs markanta förhöjningar jämfört med referensvärden. Hundar med SRMA hade högst CRP värden från både ryggmärgsvätskan och serum jämfört med friska hundar och hundar med andra neurologiska sjukdomar, denna iakttagelse överensstämmer även med andra studier (Bathen-Noethel et al, 2008; Lowrie et al., 2009b).

### ***Extracellulärt värmechockprotein 70 (hsp70)***

Även extracellulärt värmechockprotein 70 (heat shock protein, hsp70) har observerats i samband med SRMA (Moore et al., 2012). Då extracellulärt hsp70 har en potentiell proinflammatorisk effekt förväntade sig Moore et al. (2012) att detta protein var en komponent av den inflammatoriska reaktionen i SRMA. Försöket de utförde visade att serum från hundar med akut SRMA och även behandlad SRMA hade högre koncentration av extracellulärt hsp70 jämfört med serum från en frisk kontrollgrupp, där extracellulärt hsp70 endast kunde ses hos en hund och då i en låg koncentration.

### ***mRNA uttryck***

Schwartz et al. (2011) undersökte mRNA uttrycksmönster för cytokiner som är indikativa för immunsvaret av typ 1 eller typ 2 i perifera mononukleära blodceller (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) och vita blodkroppar i ryggmärgsvätskan hos hundar med akut SRMA. Värden från dessa hundar jämfördes med värden från hundar som var under behandling för SRMA och hundar drabbade av neoplasier och andra typer av cerebrospinala inflammatoriska sjukdomar. Resultat från tester på interleukin 2 (IL-2) mRNA uttryck visade att PBMC prover från hundar med akut SRMA hade lägst mRNA uttryck, följt av hundar under behandling. De fann att värden var mest homogena inom gruppen "SRMA med

symtom” och varierade kraftigt inom övriga grupper. Även gammainterferon (IFN- $\gamma$ ) mRNA uttrycket i PBMC var lägst hos hundar med akut SRMA, liksom IL-2 var värden mest homogena inom denna grupp.

Medelvärdet av IL-4 mRNA uttrycket i PBMC var högst i gruppen ”SRMA med symtom”, följt av ”SRMA utan symtom”. Hos hälften av hundarna med SRMA under behandling kunde inget uttryck ses och det kunde endast ses hos några få hundar med neoplasi och andra cerebrospinala inflammationer. Överlag skiljde sig inte medelvärden från PBMC-prover mycket åt mellan de olika grupperna, däremot kunde en större homogenitet synas från hundar med SRMA (Schwartz et al., 2011).

Förhållandet mellan IL-4:IL-2 användes som en indikator för förhållandet mellan T-hjälparceller av typ 2 och typ 1 (Th2:Th1), vilket var högst från PBMC-prover inom gruppen ”SRMA med symtom”. Th2:Th1 förhållandet i PBMC från hundar med akut SRMA skiljde sig inte signifikant från det i ryggmärgsvätskan. Uttryck från alla cytokiner kunde ses i ryggmärgsvätskan från hundar i gruppen ”SRMA med symtom”, däremot kunde inga ses i gruppen ”SRMA utan symtom” och det kunde endast ses i enstaka prov från hundar med neoplasi och andra cerebrospinala inflammationer (Schwartz et al., 2011).

Normaliserade värden för cytokin mRNA från ryggmärgsvätskan låg under de värden som kunde ses från perifera mononukleära blodceller och skillnaderna var statistiskt signifikanta för IL-4, IL-5 och IFN- $\gamma$ . Schwartz et al. (2011) drog slutsatsen att iakttagelser som markant förhöjning av neutrofila vita blodkroppar i blodet och ryggmärgsvätskan samt förhöjda IgA värden, är associerade med låga nivåer av IL-2 samt IFN- $\gamma$  och höga nivåer av IL-4 i det perifera blodet. Deras iakttagelser visade på en polariserad typ 2 immunreaktion med en markant produktion av IL-4 hos hundar med akut SRMA, detta överensstämmer med en tidigare observation (Schwartz et al., 2008a).

### **Lymfocyter**

Schwartz et al. (2008a) utförde en studie som visade de olika lymfocytmarkörerna (cluster of differentiation, CD) som förekom i ryggmärgsvätskan och perifera blodet hos hundar drabbade av SRMA. Resultaten jämfördes sedan med motsvarande värden från hundar med andra inflammatoriska sjukdomar och friska hundar. Medelvärdet av CD4+ lymfocyter var högst hos hundar inom gruppen ”SRMA med symtom” och medelvärdet för CD8 $\alpha$ + lymfocyter var lägst inom denna grupp, följt av gruppen ”SRMA utan symtom” vilken däremot inte hade liknande förhöjning av CD4+ lymfocyter. Högst värden för CD21+ (B-celler) och CD45RA+ lymfocyter kunde ses hos hundar drabbade av SRMA (Schwartz et al., 2008a).

Hundar med SRMA hade även högst CD4+:CD8 $\alpha$ + lymfocyt förhållande och lågt T-cell:B-cell förhållande (CD3+ lymfocyter benämns även T-celler och CD21+ lymfocyter benämns B-celler). Det låga T-cell:B-cell förhållandet konstaterade dominansen av B-celler hos hundar med SRMA. Medelvärdet för andelen B-celler av lymfocyterna i ryggmärgsvätskan var högst

för gruppen ”SRMA med symtom”, det var även den gruppen med lägst medelvärde för andel T-celler (Schwartz et al., 2008). Jämförelser av T-cell:B-cell förhållanden i ryggmärgsvätskan och perifert blod visade en ökning av andelen B-celler och dominans av dessa i ryggmärgsvätskan jämfört med perifert blod hos hundar med SRMA. Hos hundar från gruppen ”SRMA med symtom” var CD4+:CD8a+ lymfocyt förhållandet signifikant lägre i ryggmärgsvätskan jämfört med förhållandet i det perifera blodet (Schwartz et al. 2008a).

### ***Integrin uttryck***

Migration av neutrofiler till ryggmärgsvätskan är ett av de symtom som kännetecknar SRMA (Schwartz et al., 2008b) och integriner har en central roll i regleringen av denna migration (Georgakopoulos, Moss & Kanagasundaram, 2008). Schwartz et al. (2008b) hypotes var att integrinerna CD11a, CD11b, CD11c spelar en avgörande roll för möjliggörandet av migrationen. De utförde därför en studie för att visa uttryck av integrinerna CD11a, b och c på polymorfonukleära celler hos hundar med SRMA. Denna studie utfördes genom immunofenotypning av perifert blod och efterföljande flödescytometriska mätningar från hundar med SRMA och andra neurologiska sjukdomar samt friska hundar, vilka delades in i totalt 7 grupper. Även uttryck av integrin  $\beta_2$  (heterodimer uppbyggd av CD18 och CD11a, b, c) på polymorfonukleära celler undersöktes. Uttryck av de olika integrinerna på polymorfonukleära celler kontrollerades även i ryggmärgsvätskan.

Schwartz et al. (2008b) fann att medelvärdet för CD11a var högst från gruppen ”SRMA med symtom”, det var även signifikant högre jämfört med alla utom två andra grupper (ryggmärgstrauma och friska). Medelvärdet för CD11b från hundar med SRMA var signifikant lägre än värdet från friska hundar, som även var den grupp med högst medelvärde och minst variation. Den friska kontrollgruppen hade även högst medelvärde för CD11c, följt av ”SRMA med symtom” (Schwartz et al., 2008b).

Jämförelser mellan integrinernas uttryck i det perifera blodet och ryggmärgsvätskan visade en signifikant skillnad endast för CD11b, vilken då var högre i ryggmärgsvätskan. Graden av neutrofil leukocytos var positivt korrelerad med uttryck av integrin  $\beta_2$  på polymorfonukleära celler inom gruppen ”SRMA med symtom”, likaså var uttryck av CD11a, b, c i blodet positivt korrelerade med varandra. Korrelation kunde ej påvisas mellan integrin uttryck och IgA nivåer varken i prover från blodet eller ryggmärgsvätskan (Schwartz et al., 2008b).

I en annan del av studien inkuberade Schwartz et al. (2008b) granulocyter från en frisk hund med serum från hundar med SRMA och serum från hundar med epilepsi. Det visade sig att större delen av de serum från hundar med SRMA gav en kraftigare uppreglering av CD11a, samt lägre CD11b och CD11c uttryck jämfört med serum från epileptiska hundar.

### ***Genome-wide association studie***

En genome-wide association study (GWA) utfördes på hundar med SRMA och avslöjade två regioner med multipla associerade SNPs, varav en kunde ses på CFA 28 och den andra kunde ses på CFA 32, den senare uppnådde genome-wide signifikans efter korrigering (Wilbe et al.,

2010). En finmappning utfördes på hundar med SRMA och visade en region på CFA 32 vilken innehåller följande fyra gener; H2AFZ, DAPP1, MAP2K1IP1 och DNAJB14 (Wilbe, 2013).

## Diskussion

Identifiering av de gener som ger ökad risk att utveckla SLE-relaterade sjukdomar kan hjälpa till att klargöra etiologin till dessa sjukdomar (Jokinen, 2011) och kartläggning av de symptom som uppstår vid insjuknande är till stor hjälp vid fastställande av diagnos. Genom att identifiera de olika genetiska riskfaktorerna kan förekomsten av dessa sjukdomar reduceras inom populationer med hjälp av olika avelsstrategier. Men detta kan bli problematiskt då det kan resultera i en kraftig genförlust inom olika hundpopulationer (Wilbe et al., 2009).

MHC klass 2 har konstaterats vara en riskfaktor för hundar med immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD), oavsett ANA-infärgning, däremot kan den inte ses som en riskfaktor för hundar med steroidresponsiv meningit-arterit (SRMA). En ökad homozygoti kan ses speciellt hos IMRD hundar med ANA<sup>H</sup>. ANA-positiva hundar sågs ha ytterligare fyra riskfaktorer på CFA 3, 11, 24 och 32. CFA 11 var det loci som uppnådde starkast association (Wilbe, 2013) och innehåller genen för icke-receptor protein-tyrosin fosfatas typ 3 (PTPN3) som är involverad i T-cells aktivering (Wilbe et al., 2010). CFA 3 innehåller genen HOMER2 som har visats sig verka som en negativ regulator av T-cells aktivering (Wilbe et al., 2010). Hos hundar med riskhaplotyp 2 som även hade ANA<sup>S</sup> var PTPN3-genen på CFA 11 nedreglerad (Wilbe, 2013).

Riskhaplotyp 2 hos IMRD innehåller allelen DLA-DRB1\*00601 vilken har en epitop som är fem aminosyror lång (RARAA), denna är en del av det DNA-segment som kodar för den tredje hypervariabla regionen (HVR-3) (Wilbe et al., 2009). Bakgrunden till mekanismen för denna epitop är okänd men det tros påverka presentationen av antigener från artritogena patogener och selektionen av T-celler (Holoshitz, 2010). Hundar som är homozygota för riskhaplotypen (haplotyp 2) löper ökad risk att drabbas av IMRD. Risken var nästintill femdubblad för hundar med IMRD och sjudubblad för hundar som var ANA-positiva (Jokinen, 2011). Den ökade sjukdomsrisk vid homozygoti kan eventuellt förklaras av att det sker en konkurrens av bindningsplatser på MHC klass 2, däremot är inte enbart homozygoti på MHC klass 2 tillräckligt att på egen hand resultera i insjuknande i IMRD (Wilbe, 2013).

Flera associerade gener hos IMRD och SRMA har en korrelation till NF-AT vägen, Nuclear Factor of Activated T cells (NF-AT). Dessa proteiner utgör en familj av transkriptionsfaktorer som har en nyckelroll i regleringen av immunologisk tolerans och vid felaktig reglering av dessa kan autoimmuna sjukdomar utvecklas (Wilbe, 2013). Flertalet av de associerade generna spelar även en avgörande roll vid B-cells- och T-cellsaktivering och för professionella antigen-presenterande celler (Wilbe, 2013).

Hundar med SRMA har en högre del B-celler än T-celler med en förskjutning mot ett Th2 immunsvaret (Schwartz et al, 2008a) och en hög andel B-celler är positivt korrelerat med höga nivåer av IgA (Schwartz et al, 2011). Det är därför inte förvånande att markant förhöjda IgA nivåer ses hos hundar med SRMA vid jämförelser mot friska hundar. Hundar med SRMA visar även låga nivåer av IL-2 och IFN- $\gamma$  vilket styrker påståendet om att det finns ett polariserat Th2 immunsvaret för denna sjukdom (Schwartz et al., 2011). Vidare stöder förekomsten av den positiva korrelationen mellan T-hjälparceller och B-celler hos hundar med SRMA också påståendet (Schwartz et al., 2008a). Det är inte heller förvånande att en låg nivå av IL-10 sågs hos hundar med SRMA då denna cytokin undertrycker både Th1 och Th2 celler (Schwartz et al., 2011). Hundar med SRMA visar på ett starkare CD11a uttryck vid jämförelser med andra sjukdomar medan uttryck av CD11b och c inte skiljer sig åt, detta kan förklaras av att symtom hos hundar med SRMA uppkommer i perioder (Schwartz et al., 2008b).

### **Slutsats**

Då MHC klass 2 endast är associerat med IMRD tyder det på att SRMA och IMRD är två olika sjukdomar. Även det faktum att båda sjukdomarna endast har ett gemensamt genetiskt risklocus på CFA 32 tyder på att de är två olika sjukdomar, därutöver har IMRD flera specifika riskloci som inte delas med SRMA. Dessutom är de flesta hundar med IMRD även ANA-positiva vilket inte hundar med SRMA är (Wilbe, 2013).

## Litteraturförteckning

- Abul, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. (2012). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 4. Uppl. Philadelphia: Saunders.
- American College of Rheumatology. 1982 SLE Classification.  
<http://www.rheumatology.org/ACR/practice/clinical/classification/SLE/sle.asp> [2014-03-30].
- Anfinsen, K.P., Berendt, M., Liste, F.J., Haagenen, T.R., Indrebo, A., Lingaas, F., Stigen, O. & Alban, L. (2008). A retrospective epidemiological study of clinical signs and familial predisposition associated with aseptic meningitis in the Norwegian population of Nova Scotia duck tolling retrievers born 1994–2003. *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 72 (4), ss. 350-355.
- Bathen-Noethen, A., Carlson, R., Menzel, D., Mischke, R. & Tipold, A. (2008). Concentration of Acute-Phase Proteins in Dogs with Steroid-Responsive Meningitis-Arteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 22 (5), ss. 1149-1156.
- Eckersall, P.D. & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, vol. 185, ss. 23-27.
- Georgakopoulos, T., Moss, S.T. & Kanagasundaram, V. (2008). Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. *Molecular Immunology*, vol. 45, ss. 3671-3681.
- Hansson-Hamlin, H. & Lilliehöök, I. (2009). A possible systemic rheumatic disorder in the Nova Scotia duck tolling retriever. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 51 (16)
- Hansson-Hamlin, H., Lilliehook, I. & Trowald-Wigh, G. (2006). Subgroups of canine antinuclear antibodies in relation to laboratory and clinical findings in immune-mediated disease. *Veterinary Clinical Pathology*, vol 35 (4), ss.397-404.
- Holoshitz, J. (2010). The Rheumatoid Arthritis HLA-DRB1 Shared Epitope. *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 22 (3), ss. 293-298.
- Jokinen, P. (2011). *Identifying genetic risk factors in canine autoimmune disorders*. Diss. Helsinki: University of Helsinki.
- Karlsson, E.K. & Lindblad-Toh, K. (2008). Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. *Nature Reviews Genetics*, vol. 9, ss. 713-725.
- Lowrie, M., Penderis, J., Eckersall, P.D., McLaughlin, M., Mellor, D. & Anderson, T.J. (2009a). The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs. *The Veterinary Journal*, vol. 182, ss. 125-130.
- Lowrie, M., Penderis, J., McLaughlin, M., Eckersall, P.D. & Anderson, T.J. (2009b). Steroid Responsive Meningitis-Arteritis: A Prospective Study of Potential Disease Markers, Prednisolone Treatment and Long-Term outcome in 20 dogs (2006-2008). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 23 (4), ss. 862-870.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews*, vol. 6, ss. 823-835.

- Moore, S.A., Kim, M.Y., Maiolini, A. & Tipold, A. (2012). Extracellular hsp70 release in Canine Steroid Responsive Meningitis-Arteritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 145, ss. 129-133.
- Ostrander, E.A. & Kruglyak, L. (2000). Unleashing the Canine Genome. *Genome Research*, vol. 10, ss. 1271-1274.
- Ostrander, E.A. & Wayne, R.K. (2005). The canine genome. *Genome Research*, vol. 15, ss. 1706-1716.
- Schwartz, M., Moore, P.F. & Tipold, A. (2008a). Disproportionally strong increase of B cells in inflammatory cerebrospinal fluid of dogs with Steroid-responsive Meningitis-Arteritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 125, ss. 274-283.
- Schwartz, M., Carlson, R. & Tipold, A. (2008b). Selective CD11a upregulation on neutrophils in the acute stage of steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 126, ss. 248-255.
- Schwartz, M., Puff, C., Stein, V.M., Baumgärtner, W. & Tipold, A. (2011). Pathogenetic factors for excessive IgA production: Th2-dominated immune response in canine steroid-responsive meningitis arteritis. *The Veterinary Journal*, vol. 187, ss. 260-266.
- Shearin, A.L. & Ostrander, E.A. (2010). Leading the way: canine models of genomics and disease. *Disease Models and Mechanisms*, vol. 3 (1-2), ss. 27-34.
- Tipold, A. Vandeveld, M. & Zurbriggen, A. (1995). Neuroimmunological studies in steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs. *Research in Veterinary Science*, vol. 58 (2), ss. 103-108.
- Tipold, A. & Schatzberg, J. (2010). An update on steroid responsive meningitis-arteritis. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 51 (3), ss. 150-154.
- Wilbe, M., Jokinen, P., Hermanrud, C., Kennedy, L.J., Strandberg, E., Hansson-Hamlin, H., Lohi, H. & Andersson, G. (2009). MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex. *Immunogenetics*, vol. 61, ss. 557-564.
- Wilbe, M., Jokinen, P., Truvé, K., Seppala, E.H., Karlsson, E.K., Biagi, T., Hughes, A., Bannasch, D., Andersson, G., Hansson-Hamlin, H., Lohi, H. & Lindblad-Toh, K. (2010). Genome-wide association mapping identifies multiple loci for an SLE-related disease complex. *Nature Genetics*, vol. 42 (3), ss. 250-254.
- Wilbe, M. (2013). *Discovery of a Novel Pathway for an SLE-related Disease Complex in the Canine Breed Nova Scotia Duck Tolling Retriever*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.