



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**

Institutionen för Biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Lokalisation av nerve growth factor (NGF) och interleukin-1 β (IL-1 β) i brosk och ledkapsel från normala och osteoartrit-afpekterade leder hos häst

Sofie Henriksson

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:36*

Lokalisation av nerve growth factor (NGF) och interleukin-1 β (IL-1 β) i brosk och ledkapsel från normala och osteoartrit-afpekterade leder hos häst

Localization of nerve growth factor (NGF) and interleukin-1 β (IL-1 β) in cartilage and synovial membranes from normal and osteoarthritic equine joints

Sofie Henriksson

Handledare: *Maria Löfgren, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Biträdande handledare: *Stina Ekman, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Biträdande handledare: *Cecilia Ley, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Biträdande handledare: *Emilia Svala, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Examinator: *Pia Haubro Andersen, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:36

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: Osteoartrit, Nerve growth factor, Interleukin 1-beta, häst, smärta, inflammation

Key words: Osteoarthritis, Nerve growth factor, Interleukin 1-beta, horse, pain, inflammation

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Osteoartrit (OA) och smärta i samband med detta sjukdomstillstånd är ett stort problem hos hästar och andra djurslag. OA karakteriseras av broskdegeneration, skleros av subkondralt ben, osteofytbildning, varierande grad av inflammation och periartikulär vävnadsfibros hos den drabbade individen.

Sjukdomsprocesserna som ger upphov till smärta vid OA är ej fullt klarlagda och det saknas idag fullgod behandling. Inflammation är en viktig del i processen och proinflammatoriska cytokiner så som interleukin (IL-)1 β anses ha en viktig roll i sjukdomsuppkomsten, bland annat på grund av sin stimulering av brosknedbrytande enzymer. IL-1 β reglerar också uttrycket av nerve growth factor (NGF) som visats ha en viktig roll i kroniska smärttillstånd vid OA.

Denna studie syftade till att, som i ett steg i kartläggningen av smärtmekanismer vid OA hos häst, undersöka och jämföra förekomsten av NGF och IL-1 β i normala och OA-afpekterade leder (OA-leder).

I studien användes ledbrosk och ledkapsel-preparat från 6 normala och 7 OA-leder som samlats in på slakteri och vid obduktion. Dessa studerades med hjälp av antikroppar riktade mot humant NGF och equint IL-1 β . Förekomsten av NGF och IL-1 β visualiserades med immunofluorescensmikroskopi och jämfördes mellan normala och OA-leder avseende antal celler och lokalisation i ledkapsel och ledbrosk. Jämförelsen skedde subjektivt och definierades som lindrig, måttlig eller kraftig.

Immunofluorescensuttrycket avseende IL-1 β var lindrigt i både ledkapselvävnad från normala och OA-leder och lokaliserat framför allt i nära association med kärl i den fibrösa delen av kapseln. Ingen skillnad i förekomst av IL-1 β kunde ses mellan normala och OA-leder. Ledbroskets kondrocyter visade ingen infärgning av IL-1 β i normala eller OA-leder. NGF förekom i ledkapseln i lindrig till måttlig grad i normala leder, framför allt associerat till synoviocyterna som linjerar villi i synovialmembranet. OA-leder visade en tydligt ökad immunofluorescens avseende NGF i ledkapseln jämfört med normala leder. I ledbrosket sågs en måttlig till kraftig förekomst av NGF i kondrocyternas cytoplasma, med likartad förekomst i normala och OA-leder..

SUMMARY

Osteoarthritis (OA), associated with pain and subsequent lameness, is a major problem in horses and one of the main reasons for failure to perform. OA is characterized by articular cartilage degeneration, subchondral bone sclerosis, osteophyte formation and varying degrees of inflammation and periarticular tissue fibrosis. The pathogenesis of OA-associated pain is not fully understood and there is currently no satisfactory treatment. Inflammation is a key part of the OA process and the proinflammatory cytokine interleukin (IL-) 1 β is considered of major importance and responsible for stimulation of catabolic enzymes causing cartilage degradation. IL-1 β also regulates the expression of nerve growth factor (NGF), which plays an important role in the pain related to chronic OA joints.

The aim of the study was to delineate and compare the presence of NGF and IL-1 β in the articular cartilage and synovial membrane from normal and OA affected equine joints.

The material consisted of articular cartilage and joint capsule tissues from six normal and seven OA joints collected at slaughter or at autopsy. Paraffin embedded tissues were studied using immunofluorescence in combination with antibodies against human NGF and equine IL-1 β . Presence of NGF and IL-1 β were examined and a comparison between normal and OA joints regarding amount of positive cells and the localization within the tissues was done. The immunofluorescence was subjectively classified as minor, moderate or marked.

The immunofluorescence of IL-1 β was minor in the joint capsule of both normal and OA joints. When present, it was found in the fibrous layer, often closely associated with blood vessels. There was no difference in the immunofluorescence of IL-1 β in the capsule of normal and OA joint. The chondrocytes of the articular cartilage did not show any staining of IL-1 β in normal or OA joints. Immunostaining for NGF in the joint capsule was minor to moderate in normal joints, primarily localized to the synovocytes outlining the villi in the synovial membrane. However, the capsule of the OA joints showed marked immunofluorescence suggesting clear presence of NGF, not seen in normal joints. Chondrocytes of the articular cartilage from both normal and OA joints showed moderate to marked cytoplasmic staining for NGF, without differences detected between amount of cells or location within the cartilage layers.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Synovial led.....	2
Synovialmembranet.....	2
Ledbrosk.....	3
Kollagen	3
Proteoglykaner	3
Metabolism och näringsförsörjning.....	4
Subkondralt ben.....	4
Osteoartrit (OA)	4
Etiologi	4
Inflammation	5
Strukturella förändringar	6
Ledbrosk.....	6
Subkondralt ben.....	6
Ledkapsel	6
Smärta.....	7
Nerve Growth Factor (NGF).....	7
MATERIAL OCH METODER.....	9
Tillvägagångssätt:.....	9
Protokoll:.....	10
Mikroskopering:.....	10
RESULTAT	11
Mikroskopisk undersökning	11
Ledbrosk.....	11
Ledkapsel	11
NGF.....	11
Ledbrosk:.....	11
Ledkapslar:	12
IL-1 β	13
Ledkapsel	13
DISKUSSION	16
REFERENSER.....	18

INLEDNING

Osteoartrit (OA) är ett vanligt förekommande sjukdomstillstånd hos både människor och djur. Hos hästar är det en av de vanligaste anledningarna till veterinärbesök och avlivning. Man vet än idag fortfarande inte alla mekanismer bakom hur OA uppstår. På grund av detta har man idag heller inte tillgång till fullt effektiva behandlingar av många fall. Genom att kartlägga de patologiska processer som spelar in i uppkomsten av OA och förståelse för hur smärtan uppstår, skapar man möjligheter att ta fram nya behandlingsmetoder för att kunna hjälpa fler individer.

Länge trodde man att OA enbart var en degenerativ sjukdom i leden men idag vet man att inflammation spelar en mycket stor roll i etiologin (Kraus *et al.*, 2015). Framför allt de proinflammatoriska cytokinerna interleukin-1beta (IL-1 β) och tumörnekrosfaktor alfa (TNF α) anses vara viktiga för uppkomsten av inflammation i leder (Kobayashi, 2005). Att dämpa inflammationen i leden är idag en mycket viktig del i behandlingen av OA men det är många gånger inte tillräckligt för att stoppa sjukdomsförloppet (Ishikawa *et al.*, 2015).

Man har på senare tid tittat allt mer på nerve growth factor (NGF) och dess involvering i kroniska smärttillstånd. NGF är ett neurotropt protein som är viktigt för neuronernas normala tillväxt. Det har även visat sig ha stark koppling till smärtan som uppkommer i samband med inflammation (Seidel *et al.*, 2010). Då det är visat att NGF spelar stor roll i uppkomsten av kroniska smärtor hoppas man genom vidare forskning kunna vidareutveckla effektiva läkemedel riktade mot denna mekanism och således hjälpa fler patienter (McKelvey *et al.*, 2013). Uttrycket av NGF är starkt sammankopplat med inflammationsmediatorer så som cytokiner (Seidel *et al.*, 2013).

Detta arbete syftade till att undersöka och jämföra förekomsten av NGF och IL-1 β i ledbrusk och ledkapsel i normala och OA-leder hos hästar och undersöka om förekomsten av NGF och IL-1 β i dessa vävnader var likartad och innefattade samma cell population.

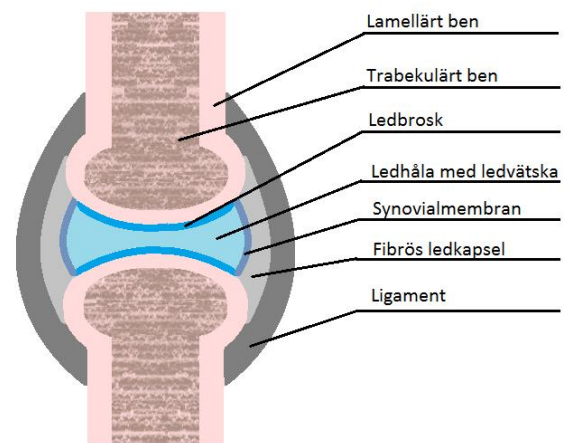
LITTERATURÖVERSIKT

Synovial led

Det finns olika typer av leder och dessa delas vanligen in i; synartroser, där leden har som funktion att enbart koppla samman två ben och inte tillåta rörelse, och diartroser eller synoviala leder som tillåter rörelse (Dyce *et al.*, 2010; McIlwraith, 2011)

En synovial led är uppbyggd av två mötande ben med ledytor täckta av ledbrosk, en omgivande ledkapsel som avgränsar ledhålan, ledvätska, i utrymmet däremellan och ligament som kan vara intra- eller extraartikulära. Ledkapseln är indelad i två lager; ett yttre fibröst lager som sitter ihop med periostet, perikondriet och därefter ben, samt ett inre synovialmembran som utlinjerar ledhålan (figur 1).

Den fibrösa delen av ledkapseln utgör, tillsammans med intraartikulära och kollaterala ligament, en del av ledens mekaniska stödapparat genom att förhindra rörelse utanför ledens avsedda rörelseomfång. Den består av tät, fibrös bindväv med en hög andel typ 1 kollagenfibrer. Bindväven är innerverad och kärlförsörd (McIlwraith, 2011). Leden stabiliseras även av sin anatomiska utformning med benvävnad, muskler och senor som dessutom kontrollerar ledens rörelse. I leden vinnas även ett intraartikulärt undertryck som har en stabiliserande effekt på leden.



Figur 1: Schematisk översiktlig bild över uppbyggnaden av en synovial led.

Infästningen av den fibrösa ledkapseln mot benet sker i en stegvis övergång till mineraliserat fibröst brosk och via periost till ben. Denna gradvisa övergång möjliggör kraftfördelning på en större yta och minskar risken för att fästet ska lossna vid hög belastning (McIlwraith, 2011). Även ledkapselns elasticitet är viktig för absorption av den dynamiska belastningen vid rörelse.

Synovialmembranet

Synovialmembranet i en led har en morfologi som varierar från en slät yta i vissa områden av ledkapsel till villusformationer i andra delar. Dessa villustrukturer finns redan i det nyfödda föletts leder, men prolifererar i samband med frekvent och/eller hög belastning (McIlwraith, 2011). Histologiskt består synovialmembranet av två lager modifierade mesenkymala celler: intima och subsynovialt lager (subintiman), där intiman ligger mot ledhålan och subintiman fäster in till den fibrösa ledkapseln (Iwanaga *et al.*, 2000).

Intiman består av synovicyter i 1-4 lager utan basalmembran (Iwanaga *et al.*, 2000; McIlwraith, 2011). Synovicyterna har klassificerats i tre typer: typ A celler som liknar makrofager med fagocyterande och antigenpresenterande funktion, typ B celler som liknar fibroblaster med sekretorisk funktion och typ C celler som är intermediära mellan dessa typer (Iwanaga *et al.*, 2000). Andelen av de olika celltyperna kan variera i hästens olika leder.

Subintiman består av lucker bindväv som sträcker sig hela vägen in i villis stroma och är rikligt kärlförsörd (Iwanaga *et al.*, 2000; McIlwraith, 2011). I subintiman består cellerna till största delen av fibroblaster. Hos hästar kan tre olika typer av synovialmembran identifieras, beroende på subintimans egenskaper: areolär bestående av lucker bindväv, adipos där fettväv dominerar eller fibrös med tät kollagen bindväv. Fyra olika villiformer har också identifierats baserat på morfologi och längd: klocklika, tunglika, lövlika och svärdlika (Izumisawa, 1996).

Synovialmembranets viktigaste funktioner är fagocytos samt upprätthållande av protein- och hyaluronanbalansen i ledvätskan (McIlwraith, 2011). På grund av avsaknaden av basalmembran och synovialmembranets permeabilitet kan små molekylen färdas fritt över membranet och innehållet i ledvätskan styrs således mer av denna permeabilitet än fenestrering av blodkärl (de Grauw, 2011; McIlwraith, 2011).

Leden har en i kroppen unik nervförsörjning på grund av att stora delar är de broskbeklädda ytorna saknar kärl och nerver. Ledens nervförsörjning består av grenar av perifera nerver som når ledkapseln, det subkondrala benet och andra omkringliggande vävnader. (McIlwraith, 2011).

Ledbrosk

Ledbrosk har som funktion att skapa friktionslös rörelse mellan de två involverade benen i leden, absorbera stötar och fördela mekaniskt tryck över ledytorna. Friskt ledbrosk hos vuxna individer är avaskulärt, aneuralt och uppbyggt av få kondrocyter utspridda i rikligt med extracellulärt hyalint matrix (ECM) (Nixon, 1991). Kondrocyterna producerar alla komponenter i sitt ECM inkluderande lubricin och hyaluronsyra som utövar en smörjande funktion i leden. Kondrocyterna ansvarar således för den metabola homeostasen i ledbrosket (McIlwraith, 2011). Hos en frisk, fullvuxen individ är dock aktiviteten hos kondrocyterna låg avseende matrixkomponent turnover, metabolism och mitotisk aktivitet (Goldring & Berenbaum, 2004; McIlwraith, 2011).

Ledbrosket hos hästar domineras av hyalin typ men även fibröst brosk förekommer i övergången mellan ledbrosk, ledkapsel, periostet och eventuella menisker. Ledbrosk delas hos vuxna hästar histologiskt in i fyra lager (Pritzker & Aigner, 2010);

1. Ytliga eller tangentiella lagret som befinner sig närmast ledytan innehåller platta eller ovala kondrocyter och tangentiellt organiserade kollagenfibrer.
2. Intermediära lagret uppbyggt av större enstaka kondrocyter eller dubbla organiserade i par, omgivna av oorganiserade kollagenfibrer, i flätligt mönster.
3. Radiella eller djupa lagret med kondrocyter arrangerade i vertikala rader eller kolumner med radiellt organiserade kollagenfibrer i ECM.
4. Kalcifierade brosklagret, närmast det subkondrala benet, består av mineraliserad broskvävnad med kondrocyter i varierande stadium av hypertrofi och degeneration.

Ledbroskets ECM är sammansatt av olika typer av kollagen, proteoglykaner, icke-kollagena proteiner, glykoproteiner och vatten.

Kollagen

Kollagen ger ledbrosket dess slitstyrka. Kollagen i ledbrosk består till 90-95% av kollagenfibrer typ II, vilka skapar fibriller och fibrer sammantvinnade i olika formationer genom ECM tillsammans med små mängder av andra typer av kollagen, typ IX, XI, V och VI (Nixon, 1991; de Grauw, 2011). I olika lager av brosket är fibrerna organiserade i olika mönster (Pritzker & Aigner, 2010). Detta är tydligast i broskets ytligare delar där de utövar sin slitstarka effekt i de tangentiellt organiserade fibrerna (Nixon, 1991). Djupare ner i brosket blir mönstret mer oorganiserat.

Kollagenfibrerna kan även arrangera sig som en kapsel runt så kallade kondroner - flera kondrocyter med omkringliggande proteoglykanrik matrix (Pritzker & Aigner, 2010; Poole *et al.*, 1988).

Förankringen mellan kollagenfibrer, kondrocyt och ECM sker med kollagen typ IV, fibronektin, och trombospodin (Heinegård, 2009; Nixon, 1991).

Proteoglykaner

Proteoglykanerna som tidigare kallades mucopolysackarider är den andra stora gruppen av makromolekyler som ingår i ECM (Heinegård, 2009; Nixon, 1991; McIlwraith, 2011). De fyller ut utrymmet mellan kollagenfibrillerna och ger brosket dess elasticitet. Proteoglykaner är monomerer

som utgörs av en proteinkärna med glukosaminoglykaner (GAGs) som sidokedjor. De flesta formar stora aggregat av icke-kovalent bundna infästningar till hyaluronsyra med bindningen stabiliserad av ett länkprotein. Dessa kallas aggregerande proteoglykaner eller aggregkaner. GAG sidokedjorna delas in i tre större grupper; chondroitin-6-sulfat, chondroitin-4-sulfat som framförallt förekommer i omoget brosk och keratansulfat. GAGs består av upprepade enheter disackarider vars viktiga egenskaper är att de repellerar varandra och attraherar vatten. På så vis får brosket sin stuns och permeabilitet. När brosket komprimeras trycks proteoglykanaggregaten ihop och vatten trycks ut ur brosket. När trycket minskar kan proteoglykanerna åter attrahera vatten och återfå sin ursprungliga form.

Metabolism och näringsförsörjning

Då ledbrosket är avaskulärt, saknar både lymf- och blodkärl, sker det främsta näringsutbytet via diffusion av ledvätska (McIlwraith, 2011; Nixon, 1991). Hos omoget brosk är de djupare lagren av tillväxtbrosk penetrerade av kärl från det subkondrala benet och perikondrium men det mogna brosket, med ett djupt lager av mineraliserat brosk skiljs från det trabekulära subkondrala benet av en subkondral "endplate" som försvårar kärlpenetration. Kondrocyter i djupare lagren använder sig därför till störst del av anaerob glykolys. Cellerna djupare ner i lagren har fler mitokondrier och högre metabolisk aktivitet än cellerna närmast ledytan. Under fysiologiska förhållanden kan brosk komprimeras till 40 % av sin ursprungliga tjocklek för att vid minskat tryck återta sin normala form. Detta ger en pumpande effekt som transporterar näringsämnen in och slaggprodukter ut ur brosket.

Subkondralt ben

Det subkondrala benet som består av en subkondral platta samt epifysalt trabekulärt ben är viktig anatomiskt och ger fysiskt stöd till det överliggande ledbrosket samt har en stötdämpande effekt (Loeser *et al.*, 2012). Den subkondrala plattan består av kompakt, lamellärt ben som varierar i tjocklek beroende på led och belastning. Vid ökad belastning i leden sker remodellering och både subkondrala plattan och det underliggande epifysära trabekulära benet kan förtjockas (benskleros).

Osteoartrit (OA)

OA definieras av olika författare på olika sätt. McIlwraith (1996): En sjukdom i synoviala leder som karaktäriseras av broskdegeneration, skleros av subkondralt ben, osteofytbildning och varierande grad av inflammation och periartikulär vävnadsfibros. En annan definition är obalans mellan nedbrytning och regenerativa processer av subkondralt ben och brosk i leden (Kidd *et al.*, 2001). Idag vet man att ingen av dessa definitioner helt täcker in hela processen men att båda tillsammans troligen kommer nära sanningen. Tidigare trodde man också att den inflammation som ses i samband med OA var en följd av degenerationen men idag anses den ha en betydligt större roll i patogenesen av sjukdomen (Goldring *et al.* 2011). Osteoarthritis Research Society International (OARSI) (Kraus *et al.*, 2015) publicerade följande förslag på definition för OA:

"Osteoarthritis is a disorder involving movable joints characterized by cell stress and extracellular matrix degradation initiated by micro- and macro-injury that activates maladaptive repair responses including pro-inflammatory pathways of innate immunity. The disease manifests first as a molecular derangement (abnormal joint tissue metabolism) followed by anatomic, and/or physiologic derangements (characterized by cartilage degradation, bone remodeling, osteophyte formation, joint inflammation and loss of normal joint function), that can culminate in illness."

Etiologi

Ovan nämnda skador uppkommer i leden när den utsätts för mekanisk belastning utöver vad den fysiologiskt är anpassad för att klara. Detta kan inträffa vid ett akut, kraftigt trauma, när en stor kraft belastar leden vid ett isolerat tillfälle (Bolam *et al.*, 2005), eller vid upprepade mikrotrauma under längre tid följt av otillräcklig reparation mellan de frekventa belastningarna (Goldring *et al.*, 2011).

Traumatisk artrit delas in enligt följande (Kidd *et al.*, 2001; McIlwraith, 2011);

- I. Synovit, inflammation i synovialmembranet, eller kapsulit, inflammation i den fibrösa ledkapseln, utan morfologiska skador på ledbrosk eller destruktion av ledens stödjevävnad.
- II. Skada på ledbrosket eller total ruptur av större stödjevävnad kring leden som uppkommer vid vrickning eller intraartikulära frakturer.
- III. Post traumatisk OA definieras som ett slutstadium för processer som successivt leder till nedbrytning av ledbrosket med synovit/kapsulit och mikrofrakturer och skleros i subkondrala benet samt i vissa fall ligament och menisk degeneration.

Grupp I och II kan potentiellt leda till utveckling av OA om ledens reparationsmekanismer inte är tillräckliga och en fortsatt mekanisk överbelastning sker.

Inflammation

Inflammation är kroppens naturliga försvar mot skada. Syftet är att skydda individen och att skapa en miljö som på bästa möjliga sätt tillåter läkning (Ackerman, 2012).

Akut inflammation kan initieras av endo- eller exogena faktorer som skadar vaskulär vävnad (Ackerman, 2012). Som svar på detta aktiveras celler att producera och frisätta ämnen som startar den akuta inflammationen. Det sker en ökad blodgenomströmning i området med vasodilatation som orsakar ett långsammare blodflöde och en ökad kärlpermeabilitet som tillsammans möjliggör för vätska och celler att tränga ur kärlen ut i vävnaden. Detta styrs och regleras av ett komplext system lösliga faktorer så som vasoaktiva aminer, arakidonsyrametaboliter (exempelvis prostaglandiner, leukotriener och lipoxiner), plasmaproteaser, cytokiner, kemokiner, reaktiva syreföreningar och kväveoxid.

Cytokiner är proteiner som verkar som signalmolekyler på så vis att de binder in till receptorer på sina respektive målceller och genom detta ändrar cellens beteende (Tizard, 2009). Cytokiner verkar i ett komplext system där en cell kan producera många varianter av cytokiner, flera typer av cytokiner kan ha samma effekt och de olika cytokinerna kan verka i synergi eller som antagonister till varandra.

Ledens uppbyggnad med ickevaskulariserat brosk skapar annorlunda förutsättningar för inflammation jämfört med andra vävnader. Inflammation av "vanlig" typ kan ske i synovialmembranet med infiltration av olika inflammatoriska celler och ökad vaskularisering (Loeser *et al.*, 2012; McIlwraith, 1996).

Hos kondrocyterna leder hög, ofysiologisk mekanisk belastning och inflammation till störning mellan anabolism och katabolism (Goldring, 2011; Sanchez-Adams *et al.*, 2014). Studier har visat att proinflammatoriska cytokiner har en bidragande roll i nedbrytningen av ledbrosk i OA leder (Kobayashi, 2005). De cytokiner som anses ha störst roll i inflammationsförloppet vid OA är interleukin-1 β (IL-1 β) och tumörnekrosfaktor- α (TNF α). Normal, dynamisk belastning hämmar den proinflammatoriska och katabola effekten av IL-1 medan ofysiologisk belastning på leden aktiverar dessa nedbrytande processer (Sanchez-Adams *et al.*, 2014). OA-kondrocyter producerar, som svar på IL-1 β och TNF α , en mängd matrixnedbrytande enzymer så som matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-3, MMP-8, MMP-13, MMP-14 och aggreginaserna ADAMTS-4 och -5 (Kapoor *et al.*, 2011). IL-1 β och TNF α har visats uppreglera uttrycket för MMP-13 även kallad kollagenas-3 som, bryter ner kollagen typ II fibrer, och hämmar kondrocyternas produktion av proteoglykaner samt kollagen typ II fibrer (Goldring *et al.*, 2011; Knäuper *et al.*, 1995; Reboul *et al.*, 1996). MMPs förekommer även i friskt ledbrosk i balans med deras hämmande motpart Tissue Inhibitors of MMPs (TIMP) (Iannone & Lapadula, 2003). I OA förskjuts denna balans till ett överskott på MMPs och broskskador uppstår.

MMP-13 inducerar även produktion av andra inflammationsmediatorer så som prostaglandin E2 (PGE2), kväveoxid (NO) och ett flertal interleukiner med matrixnedbrytande enzymer (Goldring & Berenbaum, 2004).

Strukturella förändringar

Ledbrosk

Under utvecklingen av OA aktiveras de normalt inaktiva kondrocyterna och genomgår en fenotypisk förändring som resulterar i nedbrytning av ECM, cellproliferation och formation av kondrocytkluster, ökad broskkalcifiering, fibrillering av ledbroskets yta och ökad vaskularisering från det subkondrala benet (Goldring, 2012). Mekaniskt slitage och frisättning av dessa nedbrytande enzymer, framför allt aggregaser och MMPs, orsakar en nedbrytning och således minskning av mängden proteoglykaner i brosket (Kidd *et al.*, 2001). Detta ger brosket en nedsatt elasticitet och vid belastning på leden utsätts därför kollagennätverket för stark påfrestning vilket leder till fragmentering av kollagenfibrerna (McIlwraith, 1996). De biprodukter som bildas i samband med detta främjar ytterligare katabolism, hypertrofiering och apoptos (Kobayashi *et al.*, 2005; Goldring & Berenbaum 2004).

Den störning som blir i kollagennätverket blottar negativt laddade matrixkomponenter som attraherar vatten och gör att brosket sväller (Kidd *et al.*, 2001). Brosket får en trasig och fibrillerad yta vilket ger nedsatt slittålighet och nedbrytningen accelererar i hastighet. Det orsakar djupa sprickor i ECM. Sprickorna uppkommer framför allt vertikalt på grund av fibrernas riktning djupare i brosket och kan leda till blottning av det kalcifierade brosklagret. Det kan även hända att små bitar brosk lossnar och hamnar i synovian vilket triggar inflammationen ytterligare. När kollagennätverket i brosket har brutits ned kan det inte repareras till sitt ursprungliga skick (Goldring, 2012).

Kondrocyter har också receptorer för extracellulära matrixkomponenter vilka svarar på mekaniskt stimuli och är katabola aktivatörer (Goldring, 2012). Dessa inkluderar integriner, receptorer för fibronectin och typ II kollagenfragment som stimulerar uttryck av proteinaser, inflammatoriska cytokiner och kemokiner. Dessa verkar således som en självamplifierande mekanism när nedbrytning av matrix påbörjats. Makroskopiskt och histologiskt resulterar detta i en fibrillering av broskytan med förlust av kondrocyter (Kidd *et al.*, 2001).

Subkondralt ben

Som en anpassning till den ökade belastningen av benet uppträder benskleros i subkondrala benet genom att trabeklerna expanderar via appositionell bentillväxt (Kidd *et al.*, 2001). Det ger minskat utrymme mellan trabeklerna och således ett tätare ben, vilket kan visualiseras på röntgen.

Benremodellering och benskleros kan också uppkomma i samband med OA på grund av repetitivt hög belastning som orsakar mikrofrakturer (Loeser *et al.*, 2012). Dessa ger upphov till lokal remodellering och skleros. Mikrofrakturer kan även uppkomma vid allvarliga ledbroskskador på grund av en fokalt ökad belastning på det subkondrala benet (McIlwraith, 2011).

Osteofytära pålagringar är vanligt men har också påvisats i leder utan större brosk eller ledskador (McIlwraith, 1996). Osteofyter är beniga utväxter som uppkommer vid ledens kant (Kaneko *et al.*, 2012). De utgår ifrån periostet och synovialmembranet där mesenkymala stamceller stimuleras av mekaniska faktorer och cytokiner att genomgå kondrogenes. Kondrocyterna ersätts sedan successivt av osteoblaster och osteofyten övergår i ben via mekanismer mycket lika de i endokondral ossifikation. Dessa kan uppkomma tidigt efter ledinstabilitet men anses oftast ta längre tid innan de blir synliga radiologiskt (Kidd *et al.*, 2001). De anses vara ett försök att stabilisera leden genom att öka kontaktytan. Entesiofyter kallas de benpålagringar som bildas på samma sätt i mjukvävnad så som ledkapslar och ligamentfästen.

Ledkapsel

Inflammation i ledkapseln, i så väl synovialmembranet som i den fibrösa delen kan leda till fibrotisering av densamma (Loeser *et al.*, 2012). Detta i sin tur kan ge nedsatt rörelseomfång och minskad chockabsorptionsförmåga (Kidd *et al.*, 2001). Detta tillsammans med smärta och inflammationsmediatorer ger stor risk för uppkomst av OA. Kraftig skada på den fibrösa kapseln med

total eller partiell ruptur av bindväven kan även leda till instabilitet i leden med ökad risk för felbelastning som följd.

De förändringar som ses i synovialmembranet i samband med OA är ödem, hyperemi, blödningar, förtjockning med hypertrofi och hyperplasi av villi (McIlwraith, 2011; Scanzello & Goldring, 2012; Benito *et al.*, 2005; Kidd *et al.*, 2001). Mikroskopiskt ses icke specifik inflammationsreaktion med kärlstas, blödning, ödem, fibros, villusformation och ibland granulation.

Smärta

Smärta har en komplex patofysiologi och man har visat att centrala mekanismer spelar stor roll vid smärta från en OA-led. Individer med OA reagerar starkare på smärtsamma stimulus än friska individer (Perrot, 2015). Med stor sannolikhet har perifera och centrala smärtmekanismer en funktion i olika stadier av OA, där perifera mekanismer har en större betydelse i tidigt stadium och centrala i kroniskt stadium. Interaktioner mellan det perifera och det centrala systemet tyder på en formbarhet av det nociceptiva systemet vid OA-smärta. Man har inte kunnat påvisa att graden av leddskada påverkar graden av smärta utan snarare spelar skadans lokalisering roll för smärtupplevelsen. I en studie på människor med knäledsartros fanns man att synovit och ödem i benmärgen orsakar kraftigare smärta än osteofyter, bencystor, meniskförändringar och ligamentskador (Torres *et al.*, 2006). En viktig komponent vid smärta i samband med OA är mekanisk smärta (Perrot, 2015). I en frisk led är det intraartikulära trycket mellan 2-10mmHg. I en inflammerad led kan trycket uppgå till 20mmHg. Är brosket dessutom skadat kan det innebära ett enormt lokalt ökat tryck på det subkondrala benet.

Med immunofärgning har man lyckats kartlägga ledens nervförsörjning (Mapp, 1995). Leden innerveras av ett tätt nätverk av myeliniserade och icke myeliniserade fibrer som går till ledkapsel, ligament, eventuella menisker, periostet och subkondralt ben. Synovialmembranet har framför allt ickemyeliniserade nervfibrer medan ledbrosket inte har någon innervering alls.

Leden har fyra typer av sensoriska organ; typ I och II receptorer som är korpuskulära (Paccini, Golgi och Ruffini) som finns i ledkapseln, ligament och meniskerna men inte i synovialmembranet (Mapp, 1995; Perrot, 2015). Dessa är mekanoreceptorer som registrerar tryck och dragkrafter och förmedlar dessa via myeliniserade fibrer. Typ III receptorer som består av tunna myeliniserade fibrer förekommer på ligamentytter och fungerar som mekanoreceptorer med hög retningströskel och som till viss del även registrerar temperatur. Typ IV receptorer, polymodaler, som registrerar mekaniska, temperaturmässiga och kemiska stimuli exempelvis vid inflammation, består av fria nervändar av ickemyeliniserade C-fibrer. Typ III och IV anses involverade vid smärtprocesser förekommande i leder. I leden uttrycker c-fibrerna, även kallade peptiderga fibrer, receptorn tropomyosinreceptor kinas A (TrkA) som är receptor för Nerve Growth Factor (NGF) (Perrot, 2015).

Nerve Growth Factor (NGF)

NGF är ett neurotroph protein som har viktig funktion för utveckling och differentiering av neuron (Falcini *et al.*, 1996). NGF bildas som ett proneurotrophin som klyvs till sin aktiva form av endoproteaser i transGolginätverket (Eibl *et al.*, 2012). Man har påvisat proNGF i flera vävnader men har ännu inte kunnat påvisa dess funktion. Vidare i detta arbete avses dess aktiva form vid nämnandet av NGF. I det perifera nervsystemet är NGF involverat i moduleringen av nervändornas funktion genom att påverka deras utveckling, överlevnad och produktion och frisättning av neurotransmittorer. Mediatorerna för c-fibrer är substans P (SP), calcitoninrelaterad peptid (CGRP) och neuropeptid Y (NPY). Uttrycket av SP och CGRP kan uppregleras av NGF. Hos vuxna individer har NGF visats reglera neuronal regeneration vid skada och smärtsensibilitet. Perifera nociceptorer uttrycker TrkA som är den främsta receptorn för NGF till vilken det binder in med hög affinitet (Wehrman *et al.*, 2006). NGF binder även in med låg affinitet till p75. TrkA kan på grund av sin stora affinitet för NGF anses vara den viktigaste receptorn för smärtmodulering. NGF uppreglerar själv uttrycket av TrkA i råttjärnor vilket stödjer att uppreglering av NGF kan resultera i ökad smärtsensation, allodyni och hyperestesi (Seidel *et al.*, 2013). Omvänt kan proinflammatoriska neurotransmittorer inducera

överuttryck av NGF vilket kan resultera i en kronisk självunderhållande smärtmekanism. NGF kan även direkt inducera inflammation genom kemotaxis för leukocyter och ökad kärlpermeabilitet (Gee *et al.*, 1983; . NGF orsakar även mekanisk och termisk hyperestesi vid systemisk administration. Intraartikulära ledinjektioner med NGF gav ett kraftigare smärtsvar hos OA-möss än friska kontroller (Ashraf *et al.*, 2015; Sagar *et al.*, 2015).

NGF uttrycks av friska humana kondrocyter men uppregleras proportionerligt med broskskada hos OA-kondrocyter (Iannone *et al.*, 2002; Pecchi *et al.*, 2014). Samma fenomen påvisades hos synovicyter (Wu *et al.*, 2000; Grimsholm *et al.*, 2007. De fann dock att uttrycket av NGF var lägre hos OA-kondrocyter jämfört med kontrollerna. Även Manni *et al.* (2003) gjorde samma upptäckt gällande synovicyterna där de fann att produktion och frisättning av NGF hos OA-synovicyter ökade efter att de utsatts för IL-1 β och TNF α . OA-synovicyter producerade en större mängd NGF redan innan stimulering med inflammatoriska cytokiner. TNF α kunde stimulera produktionen men krävde mycket höga koncentrationer för att orsaka frisättning av NGF. I en annan studie fann man att humana kondrocyter ökade dos- och tidsberoende sitt uttryck av NGF vid stimulering med IL-1 β och mekanisk stress (Pecchi *et al.*, 2014). Falcini (1996) fann även att mängden cirkulerande NGF i blodet var starkt korrelerat till sjukdomsgrad hos barn med kronisk artrit.

MATERIAL OCH METODER

Materialet bestod av ledkapslar och ledbrosk från metakarpal (MC3)- och metatarsalleder (MTT) tidigare insamlat från slakteri eller vid obduktion. Godkänd etisk ansökan för insamlande av material finns, Uppsala Djurförsöksetiska Nämnd diarienummer C62/13. Totalt 13 hästar ingick i studien, varav sex klassades ha normala leder makroskopiskt och sju hade makroskopiska ledförändringar (OA) se tabell 1.

Hästar med normala leder

- N1; 2 år sto varmblodig travare
- N2; 4 år sto varmblodig travare
- N3; 4 år sto varmblodig travare
- N4; 6 år sto svenskt halvblod
- N5; 7 år sto nordsvensk travare
- N6; 8 år valack svenskt halvblod

Hästar med OA-leder:

- OA1; 12 år valack finsk häst
- OA2; 11 år valack varmblodig travare
- OA3; 8 år valack lusitano
- OA4; 11 år valack svenskt halvblod
- OA5; 6 år sto ardenner
- OA6; 23 år valack svenskt halvblod
- OA7; 15 år sto svenskt halvblod

Tabell 1: *Undersökt material och fynd från hästar med OA-leder*

Individ	Samlat material	Observerade förändringar
OA1	Ledbrosk MC3 Ledkapsel kotled	Ytliga wearlines, Broskerosioner med ödem bilateralt om rullkam
OA2	Ledbrosk MC3 Ledkapsel kotled	Wearlines, Ödematösa områden med lindrig broskerosion bilateralt. Tydliga broskerosioner på den motstående ledytans kraniala gräns (P1)
OA3	Ledbrosk MC3 Ledkapsel kotled	Ytliga wearlines, Broskerosioner med ödem strax bilateralt om rullkam.
OA4	Ledbrosk MC3 Ledkapsel kotled	Wearlines, Broskerosioner med ödem bilateralt om rullkam
OA5	Ledbrosk MTT Ledkapsel kotled	Wearlines, Broskerosioner med ödem bilateralt om rullkam
OA6	Ledbrosk MC3 Ledkapsel kotled	Djupa wearlines, broskerosioner med ödem bilateralt om rullkam
OA7	Ledbrosk MC3 Ledkapsel kotled	Wearlines, Multipla broskerosioner med ödem bilateralt om rullkam

Tillvägagångssätt:

Materialet fixerades i buffrad 10% formalin, bäddades i paraffin och snittades med en tjocklek av ca 3-4µm.

För påvisande av NGF användes den primära polyklonala antikroppen NGF (H-20) riktad mot humant NGF, Santa Cruz sc-548, i koncentration 2 µg/ml. Negativ isotyp-kontroll var Neg Control rabbit IgG, Dako X0903, i samma koncentration. Den sekundära antikroppen utgjordes av Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz SC-2004, 400 µg/ml, koncentration 1:150.

För påvisande av IL-1β användes den primära monoklonala antikroppen MAB33401 Clone #608714 Monoclonal Mouse IgG1, riktad mot Equine IL-1β i koncentration 5 µg/ml och 25 µg/ml. Negativ isotyp kontroll var Mouse IgG1, Dako X0931 med samma koncentrationer. Den sekundära antikropp som användes var Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz SC-2031, 400 µg/ml, spädd 1:150.

För att utvärdera protokollet och koncentrationer av antikropp riktade mot NGF testades det först på material med en perifer nerv från häst vilken förväntades ha en hög koncentration av NGF. Detta gav tydlig infärgning av nervvävnaden med den primära antikroppen men ingen infärgning med den neagtiva isotypen. Detta protokoll testades även på ledkapsel och brosk från en häst med tydliga makroskopiska förändringar då arbetshypotesen var att denna uttrycker NGF i hög grad. Resultatet var klart positivt med en negativ isotyp, varefter samtliga prover kördes enligt nedanstående protokoll.

För att bedöma koncentrationer och utvärdera protokollet för antikroppen riktad mot IL-1 β användes brosk och ledkapsel från en av OA-lederna med kraftiga morfologiska förändringar. Då den lägre koncentrationen 5 $\mu\text{g/ml}$ inte gav någon infärgning testades en högre koncentration, 25 $\mu\text{g/ml}$. Resultatet blev en infärgning av celler i ledkapseln men ingen infärgning av kondrocyterna i ledbrosket. IL-1 β utvärderades därför endast i ledkapslar enligt följande protokoll.

Protokoll:

Dag 1: Avparaffinering av preparaten genomfördes i lösningen X-tra solv och därefter i etanol i fyra steg i allt svagare koncentration, från 99 % till 70 %. Därefter tvättades preparaten med buffrad fosfatlösning (PBS). Till broskpreparaten adderades därefter hyaluronidas 8000 enheter/ml (Sigma H3506) i PBS i 60 minuter vid 37°C i fuktkammare. Därefter tillsattes 0,05 enheter/ml chondroitinas ABC (Sigma C2905) i PBS och inkuberades 60 minuter vid 37°C i fuktkammare. Preparaten sköljdes därefter med PBS.

Inaktivering av endogent peroxid gjordes genom inkubering med 3 % hydrogenperoxid i mörker. Därefter sköljdes preparaten med PBS och blockerades med 3 % bovint serumalbumin (BSA) i PBS. Primär antikropp och negativ kontroll späddes i 3 % BSA och tillsattes till preparaten som sedan inkuberades över natten i fuktighetskammare i 4°C.

Dag 2: Preparaten sköljdes med PBS innan de blockerades med 3 % BSA. Sekundär antikropp adderades till samtliga preparat, utspädd i 3 % BSA och inkuberades därefter under 1h i fuktkammare vid rumstemperatur innan de sköljdes med 0,05 % TWEEN20 i PBS. Därefter inkuberades proverna med TSA kit (TSA-Direkt Cy3 kit, NEL704A, Perkin elmer) i koncentration 1:150 i 10 min i mörker. Efter detta hanterades proverna fortsatt i mörker. Preparaten sköljdes med 0,05 % TWEEN20 i PBS och därefter med PBS innan de inkuberades i diamidino-2-fenylindol-lösning (DAPI-lösning) under 3 min i rumstemperatur och sköljdes därefter med PBS.

Preparaten monterades med hjälp av monteringsmediet Prolong gold antifade (Invitrogen) och förvarades sedan mörkt vid 4 °C fram till fluorescensmikroskopering.

Mikroskopering:

Preparaten studerades med Nikon Eclipse E600 fluorescens microscope med hjälp av programmet NIS Elements Basic Research software version 3.22.11 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Bilder togs vid förstoring 1x10, 1x20 och 1x40.

Även hematoxylin-eosin (HE) färgade snitt från preparaten studerades och fotograferades vid samma förstoring som vid fluorescensmikroskoperingen för att undersöka vilken typ av celler som uppvisade positiv inmärkning.

För att jämföra cell-förekomst av IL-1 β mellan ledkapslar från normala och OA-leder valdes 5 synfält ut vid förstoringen x20 som uppvisade mycket fluorescens. I dessa synfält räknades antalet fluorescerande punkter och resultaten jämfördes mellan ledkapslar från normala och OA-leder.

Inmärkningen av NGF och IL-1 β graderades som sparsam, måttlig eller kraftig. Inmärkningen bedömdes som kraftig om majoriteten av cellerna var infärgade. Inmärkningen bedömdes som lindrig om endast ett fåtal av cellerna var infärgade och måttlig infärgning bedömdes i de fall infärgningen var en grad mellan dessa.

RESULTAT

Mikroskopisk undersökning

Ledbrosk

Vid undersökning av de HE-färgade snitten från de friska lederna sågs brosk av hyalin typ. Kondrocyterna närmast ledytan hade en platt eller oval form. Djupare ned i brosket fanns större, rundare celler som förekom som enskilda eller i par. I vissa preparat syntes även delar av det djupa lagret med vertikala kolumner av kondrocyter.

Vid HE undersökning av preparat från OA-leder sågs lindrig fibrillering av brosket i ledytan, sparsam förekomst av kluster med kondrocyter i grupper och ett ökat antal kondrocyter. Graden av dessa förändringar varierade mellan preparaten.

Ledkapsel

Synovialmembranen i preparaten från de normala lederna hade en varierande morfologi med både slät struktur och villusformationer. Närmast ledhålan fanns synovicyter, oftast endast i ett lager men på vissa områden flera lager. Det gick ej i HE färgningen att skilja mellan de tre olika typerna av synovicyter. Subintiman bestod av lucker bindväv i såväl villusformationer som den mer släta kapseln. I subintiman fanns gott om små blodkärl och fibroblaster.

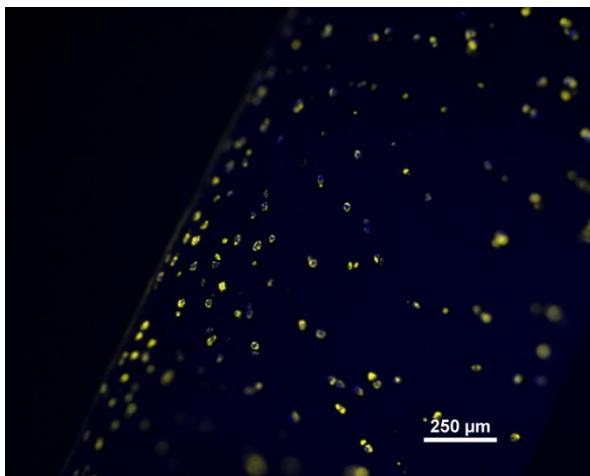
I preparaten från OA-leder sågs i ledkapselns subintima, ett ökat antal blodkärl, villusformationerna hade ett svullet bredare utseende, enstaka lymfocyter ses och intimans yta har ett vågigare utseende. Även i ledkapseln varierar förändringarna mellan preparaten.

NGF

Samtliga preparat visade specifik infärgning och samtliga negativa kontroller var negativa. Ledbrosket från en av de normala lederna lossnade från glaset under förberedelsen, varför ingen evaluering av detta brosk kunde göras, därför är enbart fem normala leder inkluderades i studien av ledbrosk.

Ledbrosk:

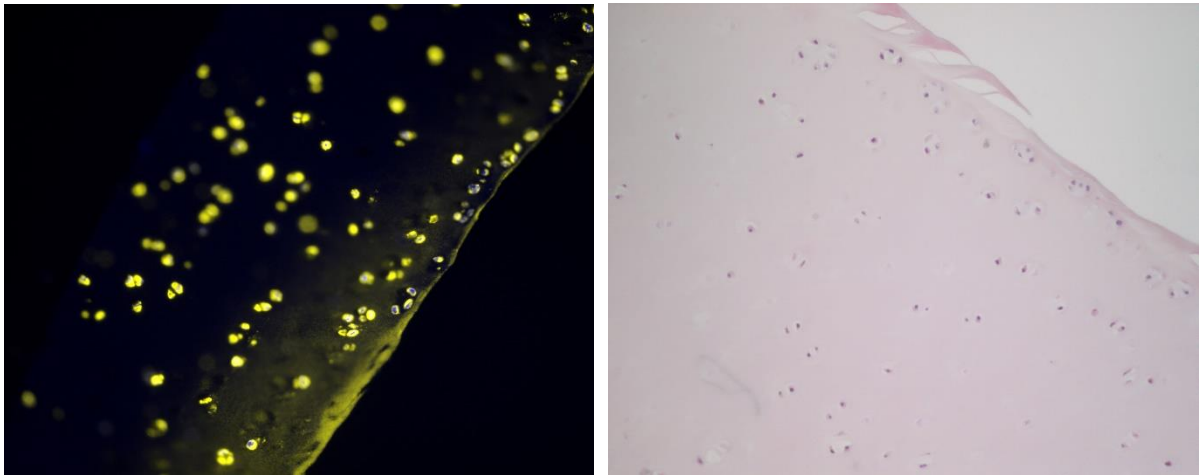
De normala lederna visade kraftig immunofärgning av NGF i brosket. Av fem leder hade fyra en kraftig infärgning i nästan samtliga kondrocyter genom alla ledbroskets lager (Fig 2a+b). Infärgningen tycks vara lokaliserad till cytoplasman då cellkärnan ofta är klart synlig i en blå nyans och infärgningen har en yttre gräns som överensstämmer med cellens utseende vilket verifieras vid HE färgning av preparatet.



Figur 2a: Representativ immunofluorescensinfärgning av normalt ledbrosk. Gul infärgning (NGF), Blå kärninfärgning (DAPI) 20x förstoring. Figur 2b: HE färgat normal ledbrosk från samma led som fig. 2a, 20x förstoring.

En häst hade kraftig infärgning av samtliga kondrocyter ned till ungefär halva ledbröskets djup, därefter mycket knapp infärgning. Vid HE undersökning av detta preparat hade brosket och kondrocyterna ett normalt utseende och skilde sig inte från de andra individerna.

Ledbrusk från OA-lederna visade kraftig infärgning av NGF i samtliga preparat (Fig 3a+b). Samtliga leder uttryckte kraftig infärgning i samtliga kondrocyter genom hela preparatets djup. Subjektivt, okulärt tycktes ledbrösket från OA-lederna ha kraftigare fluorescens än brosket i de normala lederna. Samtliga ledbrusk uppvisade också en generell infärgning av den mest perifera ledytan som inte var kopplad till celler utan till ECM i kanten av ledytan.

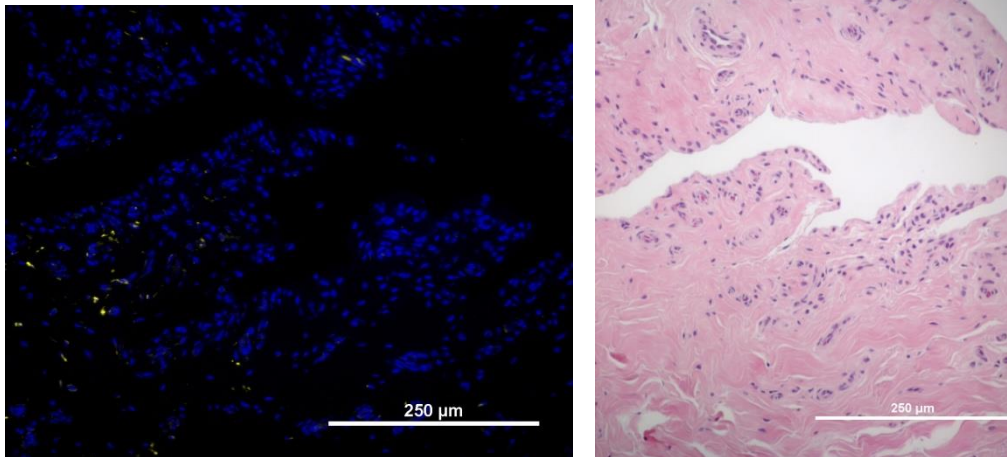


Figur 3a: : Representativ immunofluorescensinfärgning av ledbrusk från en OA-led. Gul infärgning (NGF), Blå kärninfärgning (DAPI) 20x förstoring. Figur 3b: HE färgat OA ledbrusk från samma led som fig. 3a, 20x förstoring.

Ledkapslar:

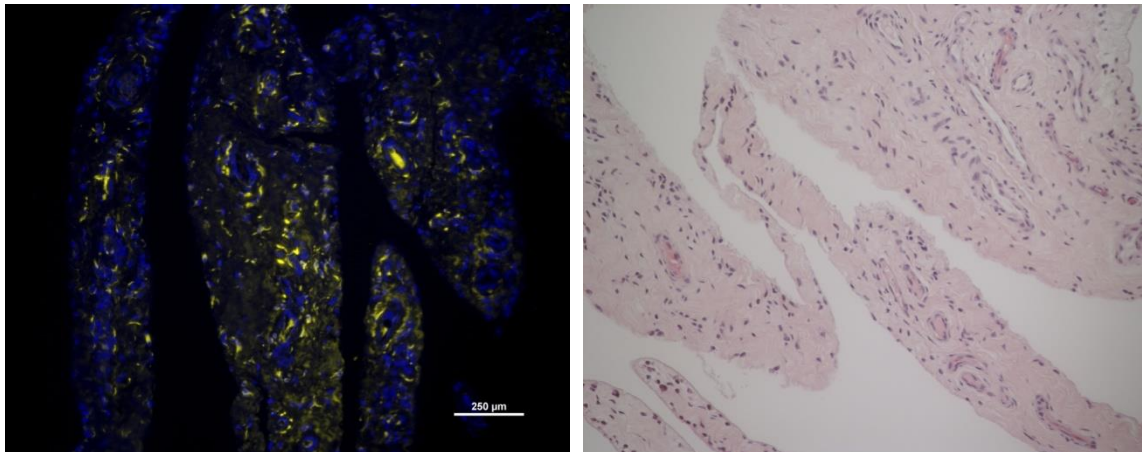
Immunofärgning med antikroppar riktade mot NGF var i både OA- och normala leder främst lokaliserad till synovicyterna i synovialmembranets villi. Det gick ej att bedöma vilken typ av synovicyter som var associerade med fluorescensen då ingen infärgning för att differentiera mellan de olika typerna av celler gjordes. Förekomsten av NGF hos synovicyterna var till skillnad från kondrocyterna ej lika specifikt lokaliserat till cellernas cytoplasma/cellmembran utan mer diffust utbredd i anslutning till cellerna.

I de normala lederna påvisades en lindrig till lokalt måttlig förekomst av immunofluorescens avseende NGF i ledkapseln. NGF i de normala lederna förekom framför allt i anslutning till de omgivande kärlen och generellt lokaliserat centralt i subintiman av villi (Fig 4a+b). Det förekom dock enstaka områden i en av lederna där NGF även påvisades perifert i synovicyterna som utlinjerade villi. En av de normala lederna visade ett avvikande utseende jämfört med övriga, med områden av måttlig till kraftig immunofluorescens liknande de som sågs i OA-leder.



Figur 4a: : Representativ immunofluorescensinfärgning av normal ledkapsel. Gul infärgning (NGF), Blå kärninfärgning (DAPI) 20x förstoring Figur 3b: HE färgad normal ledkapsel från samma led som fig. 4a, 20x förstoring.

OA lederna hade måttlig till kraftig infärgning avseende NGF med en mer diffust utbredd fluorescens jämfört med de normala lederna (Fig 5a+b). Intensiteten avseende infärgningen i ledkapslar varierade stort mellan olika leder och även inom samma led. Även i OA-lederna var förekomsten av NGF många gånger lokaliserad till vävnad runt kärlen. I OA-leder var dock förekomsten av kärl större, i hela ledkapseln inkluderande subintiman i villi, varför den totala infärgningen blev kraftigare. Vid jämförelse av preparaten med HE färgning gick det ej att bestämma vilken typ av celler som uppvisade fluorescens. Det gick heller inte att bedöma om fluorescensen främst var lokaliserad till cytoplasman eller extracellulärt på grund av infärgningens diffusa utlinjering.



Figur 5a: : Representativ immunofluorescensinfärgning av ledkapsel från OA led. Gul infärgning (NGF), Blå kärninfärgning (DAPI) 20x förstoring Figur 5b: HE färgad ledkapsel från samma OA led som fig. 5a, 20x förstoring.

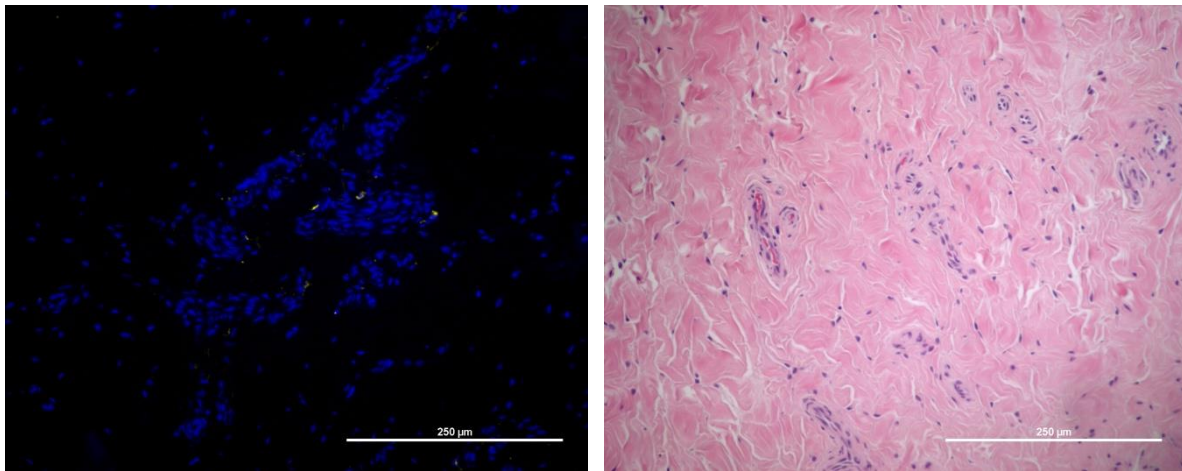
IL-1 β

Försöket utfördes med två olika koncentrationer för antikroppen, först 5 μ g/ml och sedan med 25 μ g/ml. Vid den lägre koncentrationen sågs ingen detektion av IL-1 β i varken ledbrosk eller ledkapsel i led med kraftiga OA-förändringar. Vid den högre koncentrationen kunde IL-1 β påvisas i ledkapsel men ej i ledbrosket från OA-leder.

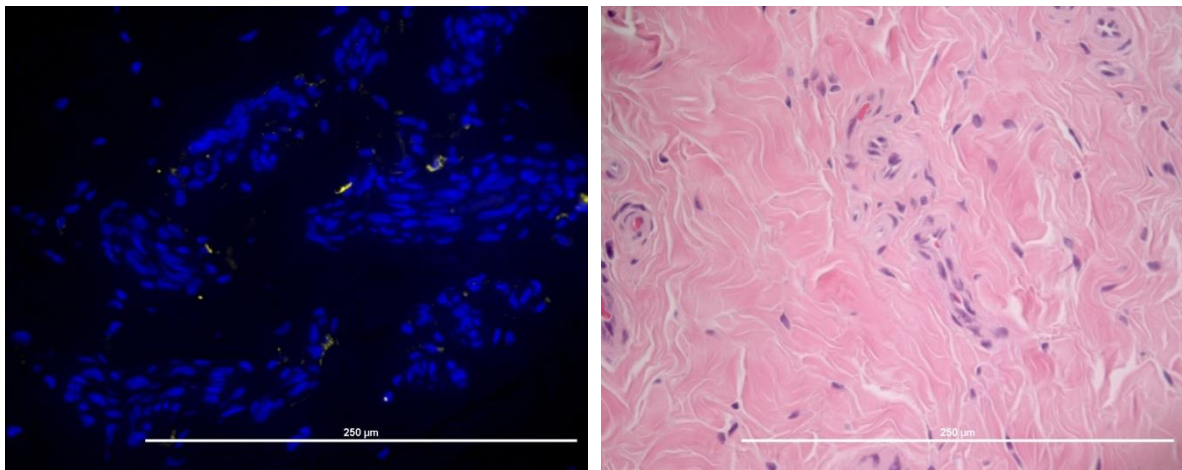
Ledkapsel

I de normala lederna förekom lindrig infärgning avseende antikropp riktad mot equint IL-1 β (Fig 6a+b). Denna fluorescens återfanns framför allt djupare i det fibrösa lagret av ledkapseln men även på enstaka områden ute i villi, då förekommande framför allt i subintiman men i enstaka fall även i

synovocyterna. Förekomsten av IL-1 β var alltid lokaliserad perivaskulärt till ett eller flera kärl. På grund av att fluorescensens yttre begränsning var oskarp var det ej möjligt att se om den endast var lokaliserad till cytoplasman eller om den även förekom extracellulärt. Med den HE färgning som gjordes för att studera preparaten kunde ej vilken typ av celler som uppvisade fluorescens bestämmas.

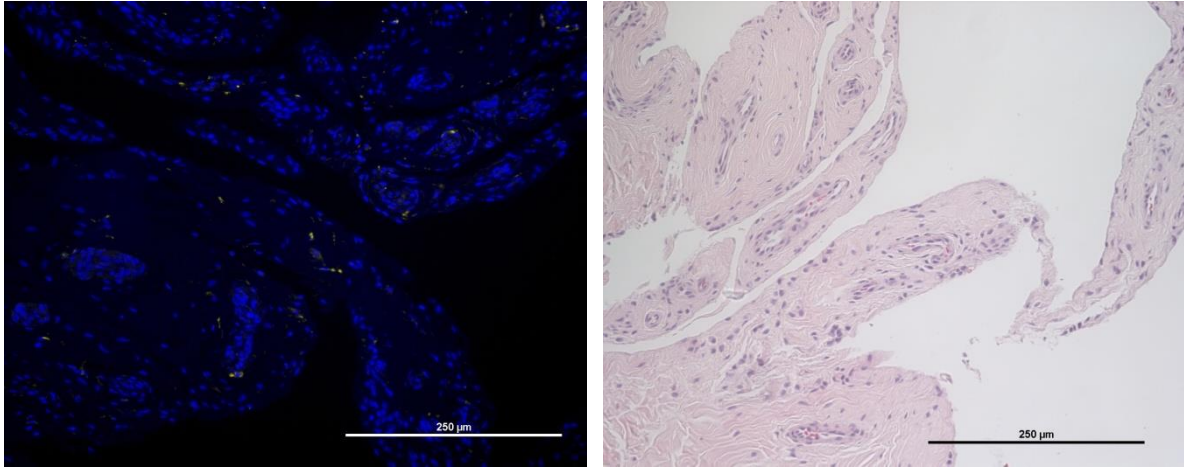


Figur 6a: Representativ immunofluorescensfärgning av normal ledkapsel. Gul infärgning (IL-1 β), Blå kärnfärgning (DAPI) 20x förstoring Figur 6b: HE färgad normal ledkapsel från samma led som fig. 6a, 20x förstoring.



Figur 7a: : Representativ Immunofluorescensfärgning av normal ledkapsel. Gul infärgning (IL-1 β), Blå kärnfärgning (DAPI) 40x förstoring Figur 7b: HE färgad normal ledkapsel från samma led som fig. 7a, 40x förstoring.

I ledkapsel från OA leder var immunofluorescensen avseende IL-1 β också sparsam och det fanns ingen skillnad i förekomst mellan normala och OA-leder. IL-1 β hade samma lokalisation, i det fibrösa lagret av kapseln i närheten av kärl även i OA leder (Fig 7a+b). Vid jämförelsen av förekomst av fluorescens mellan preparat från friska och OA-leder sågs endast en mycket liten skillnad. Genomsnittsförekomsten av fluorescerande punkter i en frisk led var 27,2 medan det i OA-leder var 29,2. På grund av metodens oexakthet och den mycket låga skillnaden bedömdes denna skillnad inte som signifikant. Dock var intensiteten i fluorescensen, subjektivt, lägre i OA-leder jämfört med de normala även om antalet positiva celler var nästan detsamma.



Figur 8a: Representativ Immunofluorescensinfärgning av ledkapsel från OA led. Gul infärgning (IL-1 β), Blå kärninfärgning (DAPI) 20x förstoring Figur 7b: HE färgad ledkapsel från samma OA-led som fig. 7a, 20x förstoring.

DISKUSSION

Förhoppningarna inför detta arbete vara att det skulle vara en skillnad i förekomst av såväl NGF och IL-1 β i både ledbrusk och ledkapsel mellan de normala och OA-lederna. Resultatet visade dock en tydlig infärgning av NGF i princip i alla kondrocyter oavsett ledstatus. Detta validerades dock inte med objektiva metoder då exempelvis intensiteten av fluorescensen inte mättes och jämfördes mellan preparaten. Det är således möjligt att en skillnad i grad av fluorescens kan förekomma mellan normala och OA-kondrocyter. Graden av intensitet är dock inte av intresse då detta kan skilja sig åt vid exempelvis en liten variation i snitt-tjocklek. Det intressanta är om cellerna uppvisar förekomst av NGF eller inte.

En annan aspekt är att alla de OA-leder som studerats har haft makroskopiska, strukturella förändringar i leden så som wearlines och broskerosioner. Det är möjligt att uttrycket av NGF förändras under sjukdomsförloppet och det vore därför också intressant att undersöka leder från hästar med tidiga biokemiska OA-förändringar, före kollaps av det kollagena nätverket, avseende NGF eftersom det skulle kunna visa om NGF finns i annan koncentration i kondrocyterna tidigt i OA processen.

Den antikropp som användes i denna studie särskiljer inte mellan proNGF och den aktiva formen av NGF. Det är således möjligt att alla kondrocyter innehåller proNGF och att först i samband med inflammationen aktiveras det till sin aktiva form. Detta skulle kunna förklara att infärgningen av kondrocyterna innefattade samtliga celler i både det normala och OA-ledbrusket. Att undersöka preparaten med en antikropp som särskiljer mellan den aktiva och pro-formen hade därför kunnat ge mer information huruvida en skillnad föreligger.

Vid jämförelse av NGF i ledkapsel mellan normala och OA-leder sågs en markant skillnad. Det fanns viss förekomst av NGF även i de normala lederna men den var främst lokaliserat perivaskulärt och mycket sparsam. Ledkapslarna från OA-leder hade måttlig till riklig förekomst både i synovicyterna men även i subintiman. Vid jämförelse av preparaten med HE färgning gick det ej att bestämma vilken typ av celler det var som uppvisade fluorescens. Tänkbara celler är fibroblaster och makrofager men det är även möjligt att det är små neuron som färgas in. För att bedöma detta vore det intressant att färga in preparaten med specialfärg för att skilja på dessa celltyper. Det gick heller inte att bedöma om fluorescensen främst var lokaliserad till cytoplasman eller extracellulärt på grund av infärgningens diffusa utlinjering.

Eftersom synovicyter producerar ledvätskan i leden är det dessutom möjligt att innehållet i denna speglar synovicyternas fenotyp och att ett ledvätskeprov avseende NGF koncentration således skulle kunna vara av diagnostiskt värde. Eftersom NGF även fanns i kondrocyterna spelar dessa cellers produktion troligen också roll i koncentrationen av NGF i ledvätska. En ökning av mängden NGF i synovialmembranet på grund av OA borde ändå resultera i en signifikant ökning i ledvätskan. En sådan studie har bland annat gjorts på hundar (Isola *et al.*, 2011) där man fann att NGF var signifikant högre i ledvätska från hundar med kroniska ledsmärtor och hälsa jämfört med normala hundar. Det finns därför anledning att misstänka att så skulle vara fallet även hos hästar. Om halterna NGF i ledvätskan skulle motsvara graden av smärta kopplat till vävnadsskada i leden skulle detta kunna ha ett mycket högt diagnostiskt värde.

Eftersom NGF uppvisar både proinflammatoriska och angiogena effekter vore det mycket oväntat om det förekom i hög grad hos normala kondrocyter i sin aktiva form. Precis så som visats i tidigare studier uppvisar celler i synovialmembranet från OA-leder ett ökat uttryck av NGF jämfört med celler från normala leder även i denna studie (Iannone *et al.*, 2002; Manni *et al.*, 2003). Detta stämmer väl överens med vad som tidigare visats, att proinflammatoriska cytokiner (IL-1 β) som utsöndras vid synovit uppreglerar uttrycket av NGF (Seidel *et al.*, 2010; Pecchi *et al.*, 2014). Det är också av intresse att NGF har visats ha proinflammatoriska egenskaper vilket skulle kunna tala för att ett ökat uttryck av NGF även orsakar, eller bidrar till, inflammationen snarare än att inflammationen orsakar en

stimulering av NGF (Seidel *et al.*, 2010). Troligen är det en kombination av båda dessa scenarier, men det ökar ytterligare intresset för möjligheten att kunna behandla OA-leder med antiNGF, för att hindra smärtreaktionen men även för att kunna häva inflammationstillståndet.

Försök med behandling av OA med antiNGF har gjorts på humansidan (McKelvey *et al.*, 2013; Bannwarth & Kostine, 2014) där man påvisat långvarig smärtlindring hos OA patienter efter behandling med antiNGF. Dock har de studier som än så länge gjorts med antiNGF inte haft enbart positiva resultat och på grund av flera fall av allvarliga biverkningar i form av förvärrad ledsjukdom med påföljande bennekros avbröts dessa studier 2010. Författarna ansåg dock att detta berodde på samtidig användning av NSAID-preparat. Man har sedan dess återupptagit dem under mer kontrollerade former för att undvika allvarligare biverkningar. Patienter utan annan möjlighet till smärtlindring har valts ut, regelbundna undersökningar utförs, även med bildiagnostik för att tidigt upptäcka eventuella tecken på biverkningar och tydlig information om att smärtan inte kan behandlas med NSAID-preparat samtidigt har getts. En annan förklaring till uppkomsten av biverkning skulle kunna vara att den funktion som smärta har vid sjukdomstillstånd i att hindra individen från att utföra moment och rörelser som orsakar mer skada har försvunnit. Leden kan således belastas mer än den klarar av och OA förvärras även om individen inte upplever en ökad smärta. Detta stämmer även väl överens med de fynd Ishikawa *et al.* (2015) gjorde. De fann att råttor med OA fick långvarig smärtlindring efter behandling med antiNGF men att ingen synbar förbättring av ledens sjukdomstillstånd förelåg.

Då det är mycket vanligt att hästar avlivas eller tas ur träning på grund av OA-relaterad hälta finns det stor anledning att vidare studera NGFs roll i OA för att utreda möjligheten till en smärtmarkör i tidigt skede, men också för möjlighet till att utveckla ett läkemedel som på annat sätt kan hindra NGFs roll i utvecklingen av kronisk smärta. Dock är det helt nödvändigt att även behandla orsaken till uppkomsten av OA och inte bara smärtan för att inte orsaka mer skada i en trasig men smärtfri led.

Gällande IL-1 β var resultatet av denna studie förvånande. Flera författare har tidigare påvisat ökning av IL-1 β i samband med OA i både ledbrosk och ledkapsel (Towle *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2006; Kapoor *et al.*, 2011). Att då IL-1 β inte kunde påvisas alls i ledbrosk med tydliga strukturella broskskador var förvånande. En möjlig orsak till detta skulle kunna vara att det protokoll som följdes inte var optimalt vad gäller antikroppens koncentration och visualisering. Då försök endast gjordes med två olika koncentrationer av antikropp men med samma förfarande finns anledning att pröva ett annat protokoll innan man med säkerhet kan utesluta förekomst av IL-1 β i vävnaden. Det kan också vara så att epitoperna i ledbrosket som antikropparna fäster till har skadats före och/eller i samband med fixering. Antikroppen som användes anges vara riktad mot equin IL-1 β , varför den borde fästa till denna cytokin om den uttrycks i vävnaden. En möjlighet att testa om fixeringen varit felaktig är att använda fryst material för snittning, men också att med hjälp av andra molekylärbiologiska metoder (proteomik, elektrofores) kontrollera att cytokinen finns i vävnaden.

Benito *et al.* (2005) visade att det fanns en skillnad i uttryck av IL-1 β i synoviocyter från humana OA-leder som karakteriserats vara i en tidig eller sen OA där antalet IL-1 β producerande celler var betydligt högre i tidig OA. De hästar som hunnit utveckla makroskopiska förändringar har passerat stadiet för tidig OA varför man kan tänka att mängden IL-1 β har nedreglerats även i ledbrosket. Om de OA-leder som inkluderades i studien hade en inflammation som pågått en längre tid skulle det kunna vara en förklaring till varför det inte fanns någon skillnad i infärgningen av IL-1 β i ledkapseln mellan normala och OA-leder. Det vore därför intressant att undersöka leder från akut halta hästar med tidig OA, med endast biokemiska förändringar utan strukturella skador med kollaps av kollagena nätverket och jämföra dessa med förekomsten av IL-1 β i ledbrosk från normala leder.

Sammanfattningsvis påvisades en skillnad i infärgningen avseende NGF i ledkapsel mellan normala och OA-leder, där fler synoviocyter var infärgade i OA-lederna. Förekomsten av NGF-positiva celler skulle kunna vara av diagnostiskt värde, för påvisande av smärtmarkör i ledvätskan, vad gäller kronisk smärta vid OA.

REFERENSER

- Ackerman, R. M. (2012) Inflammation and Healing. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. Missouri: Elsevier Mosby
- Ashraf, S., Mapp, P. I., Burston, J., Bennett, A. J., Chapman, V. & Walsh, D. A. (2014) Augmented pain behavioural responses to intra-articular injection of nerve growth factor in two animal models of osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(9), 1710-1718.
- Bannwarth, B. & Kostine, M. (2014) Targeting Nerve Growth Factor (NGF) for Pain Management: What Does the Future Hold for NGF Antagonists? *Drugs*, 74(6), 619-626.
- Benito, M. J., Veale, D. J., Fitzgerald, O., van den Berg, W. B. & Bresnihan, B. (2005) Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(9), 1263-1267.
- Bolam, C. J., Hurtig, M. B., Cruz, A. & McEwen, B. J. E. (2006) Characterization of experimentally induced post-traumatic osteoarthritis in the medial femorotibial joint of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 67(3), 433-447.
- de Grauw, J. C. (2011) Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Veterinary Quarterly*, 31(2), 77-86.
- Dyce, K. M., Wolfgang O. Sack, and C. J. G. Wensing. (2010) *Textbook of Veterinary Anatomy* 4th ed. Philadelphia: Saunders.
- Eibl, J. K., Strasser, B. C. & Ross, G. M. (2012) Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor. *Neurochemistry International*, 61(8)
- Falcini, F., Cerinic, M. M., Lombardi, A., Generini, S., Pignone, A., Tirassa, P., Ermini, M., Lepore, L., Partsch, G. & Aloe, L. (1996) Increased circulating nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 55(10), 745-748.
- Gee, A. P., Boyle, M. D. P., Munger, K. L., Lawman, M. J. P. & Young, M. (1983) Nerve growth factor – stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis invitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80(23), 7215-7218.
- Goldring, M. B. (2012) Articular cartilage degradation in osteoarthritis. *HSS journal: the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*, 8(1), 7-9.
- Goldring, M. B. & Berenbaum, F. (2004) The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators - Prostaglandins and nitric oxide. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (427), S37-S46.
- Goldring, M. B., Otero, M., Plumb, D. A., Dragomir, C., Favero, M., El Hachem, K., Hashimoto, K., Roach, H. I., Olivotto, E., Borzi, R. M. & Marcu, K. B. (2011) Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: Signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European Cells & Materials*, 21, 202-220.
- Grimsholm, O., Guo, Y., Ny, T. & Forsgren, S. (2008) Expression patterns of neurotrophins and neurotrophin receptors in articular chondrocytes and inflammatory infiltrates in knee joint arthritis. *Cells Tissues Organs*, 188(3), 299-309.
- Heinegard, D. (2009) Proteoglycans and more - from molecules to biology. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(6), 575-586.
- Iannone, F., De Bari, C., Dell'Accio, F., Covelli, M., Patella, V., Lo Bianco, G. & Lapadula, G. (2002) Increased expression of nerve growth factor (NGF) and high affinity NGF receptor (p140 TrkA) in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology*, 41(12), 1413-1418.
- Iannone, F. & Lapadula, G. (2003) The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clinical and Experimental Research*, 15(5), 364-372.

- Ishikawa, G., Koya, Y., Tanaka, H. & Nagakura, Y. (2015) Long-term analgesic effect of a single dose of anti-NGF antibody on pain during motion without notable suppression of joint edema and lesion in a rat model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(6), 925-932.
- Isola, M., Ferrari, V., Miolo, A., Stabile, F., Bernardini, D., Carnier, P. & Busetto, R. (2011) Nerve growth factor concentrations in the synovial fluid from healthy dogs and dogs with secondary osteoarthritis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 24(4), 279-284.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H. & Nozawa-Inoue, K. (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Archives of Histology and Cytology*, 63(1), 17-31.
- Izumisawa, Y., Yamaguchi, M., Bertone, A. L., Tangkawattana, P., Mast, J., Yamashita, K. & Kotani, T. (1996) Equine synovial villi: Distinctive structural organization of vasculature and novel nerve endings. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(12), 1193-1204.
- Kaneko, H., Ishijima, M., Futami, I., Tomikawa-Ichikawa, N., Kosaki, K., Sadatsuki, R., Yamada, Y., Kurosawa, H., Kaneko, K. & Arikawa-Hirasawa, E. (2013) Synovial perlecan is required for osteophyte formation in knee osteoarthritis. *Matrix Biology*, 32(3-4), 178-187.
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P. & Fahmi, H. (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), 33-42.
- Kidd, J. A., Fuller, C. & Barr, A. R. S. (2001) Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education*, 13(3), 160-168.
- Knäuper, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G. & Murphy, G. (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1544-1550.
- Kobayashi, M., Squires, G. R., Mousa, A., Tanzer, M., Zukor, D. J., Antoniou, J., Feige, U. & Poole, A. R. (2005) Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, 52(1), 128-135.
- Kraus, V. B., Blanco, F. J., Englund, M., Karsdal, M. A. & Lohmander, L. S. (2015) Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(8), 1233-1241.
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. (2012) Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism*, 64(6), 1697-1707.
- Manni, L., Lundeberg, T., Fiorito, S., Bonini, S., Vigneti, E. & Aloe, L. (2003) Nerve growth factor release by human synovial fibroblasts prior to and following exposure to tumor necrosis factor- α , interleukin-1 beta and cholecystokinin-8: The possible role of NGF in the inflammatory response. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 21(5), 617-624.
- Mapp, P. I. (1995) Innervation of the synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 54(5), 398-403.
- McIlwraith, C. W. (2011). Principles of musculoskeletal disease. I: Stashak, T. S. and Adams, R. *Adams' Lameness in Horses 6th ed.* New York: John Wiley & Sons, Incorporated.
- McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D. & Kawcak, C. E. (2012) The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & Joint Research*, 1(11), 297-309.
- McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., Kawcak, C. E., Fuller, C. J., Hurtig, M. & Cruz, A. (2010) The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, S93-S105.
- McKelvey, L., Shorten, G. D. & O'Keefe, G. W. (2013) Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. *Journal of Neurochemistry*, 124(3), 276-289.
- Nixon, A. J. (1991) Articular cartilage surface structure and function. *Equine Veterinary Education*, 3(2), 72-75.

- Pecchi, E., Priam, S., Gosset, M., Pigenet, A., Sudre, L., Laiguillon, M. C., Berenbaum, F. & Houard, X. (2014) Induction of Nerve Growth Factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in OA pain. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, S23-S23.
- Perrot, S. (2015) Osteoarthritis pain. *Best Practice & Research in Clinical Rheumatology*, 29(1), 90-97.
- Poole, C. A., Flint, M. H. & Beaumont, B. W. (1988) Chondrons extracted from canine tibial cartilage – preliminary report on their isolation and structure. *Journal of Orthopaedic Research*, 6(3), 408-419.
- Reboul, P., Pelletier, J. P., Tardif, G., Cloutier, J. M., & Martel-Pelletier, J. (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 97(9), 2011–2019.
- Sagar, D. R., Nwosu, L., Walsh, D. A. & Chapman, V. (2015) Dissecting the contribution of knee joint NGF to spinal nociceptive sensitization in a model of OA pain in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(6), 906-913.
- Sanchez-Adams, J., Leddy, H. A., McNulty, A. L., O'Connor, C. J. & Guilak, F. (2014) The Mechanobiology of Articular Cartilage: Bearing the Burden of Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports*, 16(10).
- Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. (2012) The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*, 51(2), 249-257.
- Seidel, M. F., Herguijuela, M., Forkert, R. & Otten, U. (2010) Nerve Growth Factor in Rheumatic Diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 40(2), 109-126.
- Seidel, M. F., Wise, B. L. & Lane, N. E. (2013) Nerve growth factor: an update on the science and therapy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(9), 1223-1228.
- Torres, L., Dunlop, D. D., Peterfy, C., Guermazi, A., Prasad, P., Hayes, K. W., Song, J., Cahue, S., Chang, A., Marshall, M. & Sharma, L. (2006) The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(10), 1033-1040.
- Tizard, Ian R. (2009) *Veterinary immunology, an introduction*. 8th ed, Saunders Elsevier, St Luis, Missouri.
- Towle, C. A., Hung, H. H., Bonassar, L. J., Treadwell, B. V. & Mangham, D. C. (1997) Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 5(5), 293-300.
- Weaver, R. E., Sharif, M., Livingston, L. A., Andrews, K. L. & Fuller, C. J. (2006) Microscopic change in macroscopically normal equine cartilage from osteoarthritic joints. *Connective Tissue Research*, 47(2), 92-101.
- Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H. & Garcia, K. C. (2007) Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron*, 53(1), 25-38.
- Wu, Z., Nagata, K. & Iijima, T. (2000) Immunohistochemical study of NGF and its receptors in the synovial membrane of the ankle joint of adjuvant-induced arthritic rats. *Histochemistry and Cell Biology*, 114(6), 453-459.