

Sigurbjörg Þorsteinsdóttir og Vilhjálmur Svansson, 2000. *Freyr* 96(13-14):33-36.

Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Sumarexem í hestum

Sumarexem er ofnæmi í hrossum gegn próteini sem berst við bit mýflugna af ættkvíslinni *Culicoides* sem kallast "midges" á enskri tungu og eru 1-3 mm á stærð. Ofnæmið er vandamál í íslenskum hestum á erlendri grund en þessi ættkvísl mýflugna lifir ekki á Íslandi, bitmýið hér er af ættkvíslinni *Simulium* sem kallast "blackflies" á ensku, 2-5 mm á stærð (2. mynd). Öll hrossakyn geta fengið ofnæmið en það er algengara í íslenskum hestum en um 20-30% þeirra fá sumarexem en einungis 3-7% af flestum öðrum kynjum. Íslenskir hestar sem fluttir eru út virðast líka vera næmari en þeir sem alast upp með flugunni erlendis (Broström og Larson 1987, Halldórsdóttir og Larsen 1991). Sýnt var fram á með faraldsfræðilegri rannsókn að tíðni sumarexems í útfluttum hestum gat verið allt að 50% ef þeir voru á svæðum þar sem mikið var um flugu og ekkert var gert til að verja þá (Sigríður Björnsdóttir dýralæknir, munnleg heimild).

Sjúkdómsmynd

Sumarexemið er í flestum tilvikum ofnæmi af gerð I (Type I hypersensitivity) en því fylgir framleiðsla á þeim flokki mótefna sem heitir IgE, einnig oft kölluð ofnæmismótefni, losun á histamíni og öðrum bólgubáttum (Romagnani 1990, Marti o.fl. 1999). Útbrot í húð vegna sumarexems sjást oftast á makka, sterti og í sumum tilfellum á baki og höfði, þá sérstaklega eyrum. Útbrotin geta náð yfir á lend og síður, en eru sjaldnar á kvið eða innanvert á lærum. Fyrstu einkenni eru roði og bólumyndun í húð. Í kjölfari þessara breytinga sjást eiginlegar exembreytingar með seytingu á gulleitum vökva og skorpumyndun. Þessu fylgir mikill kláði þannig að hesturinn nuddar af sér allt fax og tagl og rífur sig jafnvel til blóðs. Djúp sár geta myndast og bakteríusýkingar í þeim. Í langvinnum tilfellum þykknar húð. Sumarexem er verst þegar heitt og rakt er í veðri í langan tíma, en í þannig veðurfari þrífst flugan best. Hestar með sumarexem gróa yfirleitt sára sinna fullkomlega yfir veturinn en næsta sumar fá þeir útbrot á ný og þá oft verri en árið áður, sé ekkert gert til að verja þá fyrir flugunni (Knud Nilsen 1984).

Rannsóknaráttak á sumarexemi

Auk þess sem sumarexem getur valdið hestunum mikilli þjáningu þá hefur það einnig neikvæð áhrif á íslenskan hrossaútflutning. Því var ákveðið að gert skyldi rannsóknaráttak á þessum sjúkdómi og landbúnaðarráðherra, Guðni Ágústsson, skipaði nefnd síðasta vor til að gera rannsóknaráætlun. Rannsóknaráætlunin miðar að því að reyna að þróa bóluefni gegn sumarexemi. Skipuð var verkefnisstjórn og er formaður hennar Ágúst Sigurðsson hrossaræktarráðunautur. Rannsóknirnar fara fram á Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum undir stjórn Sigurbjargar Þorsteinsdóttur og við Háskólann í Bern í Sviss undir stjórn Eliane Marti. Verkefnið er til þriggja ára og er styrkt af Framleiðnisjóði Landbúnaðarins og Rannsóknarráði Íslands.

Ónæmissvörun - ofnæmissvörun

Ónæmiskerfið er varnarkerfi líkamans og er svipað að uppbyggingu í öllum spendýrum. Líffæri ónæmiskerfisins eru beinmergur, hóstarkirtill (týmus), milta, eitlar og eitilflákar. Hvítfrumurnar (hvítu blóðkornin) eru verkfrumur ónæmiskerfisins. Þær skiptast gróft í mergfrumur sem sjá um ósérvirkt ónæmissvar s.s. át, hreinsistörf og sýningu á ónæmisvökum og í eitilfrumur sem sjá um sérvirkt ónæmissvar. Eitilfrumurnar skiptast síðan í T-eitilfrumur og B-eitilfrumur. T-eitilfrumurnar sjá um dráp á veirusýktum frumum og stjórnun, en B-eitilfrumur framleiða mótefni. Hvítfrumurnar skipta með sér verkum og nota boðefni sem þær seyta og bregðast við til að vinna mjög náið saman. Þær eru á verði út um allan líkamann, viðbúnað innrásam sýkla eða annarra framandi sameinda. Ónæmiskerfið greinir ókunnugar sameindir frá eigin sameindum. Framandi sameindir eru ónæmisvakar sem ræsa kerfið til varnar. Ónæmiskerfið hefur minni, þannig að þegar kerfið hittir sama ónæmisvaka aftur verður ónæmissvarið bæði mun sterkara og fljótare. Ónæmisminnið er undirstaða bólusetninga. Stundum fer eitthvað úrskaiðis og ónæmissvarið verður ekki vörn heldur ofnæmi eða sjálfsofnæmissjúkdómur.

Ónæmisvaki - ofnæmisvaki (3. mynd)

Mýflugan bitur hestinn og sýgur blóð en spýtir um leið inn ókunnum próteinsameindum eða ónæmisvökum sem verða að lokum ofnæmisvakar í þeim hestum sem fá sumarexem. Flugupróteinin eru étin (tekin upp) af hvítfrumum sem nefnast sýnifrumur. Sýnifrumurnar melta próteinið og sýna það T-hjálpareitilfrumum (Th). Eftir því hver innrásaraðilinn er og hvernig sýnifruman meðhöndlar hann þá beinir hún T-frumunni ýmist inn á braut Th1 eða Th2 með viðeigandi boðefnum. Önnur hvor brautin verður þar með ráðandi í ónæmissvarinu. Th1 brautin sér mest um varnir gegn innanfrumu sýklum t.d. veirum og innanfrumu bakteríum. Th2 brautin sér um vörn gegn utanfrumu sýklum t.d. utanfrumu

bakteríum og sníkjudýrum (Mosman og Sad 1996). Af einhverjum ástæðum, sem ekki eru vel ljósar, þá leiðir ónæmissvar á Th2 braut stundum til ofnæmis hjá sumum einstaklingum með framleiðslu á þeim flokki mótefna sem kallast IgE. Í þessum einstaklingum verður ónæmisvakinn, flugupróteinið, að ofnæmisvaka. Eftir fyrstu kynni þessara einstaklinga af flugunni eru hvítfrumur sem nefnast mastfrumur húðaðar með IgE mótefnum sem eru sérvirk fyrir ofnæmisvakann úr flugunum. Í endurteknu, öflugu ónæmissvari tengist fluguofnæmisvakinn sérvirku IgE mótefnunum og þá ræsast mastfrumurnar og seyta histamíni og fleiri bólgumiðlum sem valda ofnæmiseinkennum.

DNA bólusetning (4. mynd)

Þegar bólusett er gegn sjúkdómum þá er bóluefnið vanalega útbúið úr sýklinum (dauðum eða veikluðum) sem veldur sjúkdómnum eða úr einhverjum próteinum sýkilsins. Í bóluefnunum eru oftast svokallaðir ónæmisglæðar en það eru efni sem örva ósérvirka ónæmiskerfið til dáða. Fyrir all mörgum árum komust menn að því að nota má erfðaeefni eða DNA til bólusetninga. Við DNA bólusetningu er sprautað með geni sem skráir fyrir einhverju tilteknu próteini eða ónæmisvaka. Þegar DNA bóluefni eru framleidd þarf að byrja á að einangra genið sem skráir fyrir því próteini sem vekja á ónæmisvar gegn. Geninu er síðan komið fyrir á tjáningarferju en það er tvíþátta hringlaga DNA-bútur sem hægt er að fjölga í bakteríunni *E.coli*. Bakterían með tjáningarferjunni er ræktuð upp í stórum stíl og ferjan endurmyndar sig um leið og DNA bakteríunnar. Síðan er tjáningarferjan einangruð og hreinsuð úr bakteríunni og þá er DNA bóluefnið tilbúið til notkunar. DNA sameindir eru settar saman úr byggingareiningum sem nefnast kirni (nucleotide). Kirnin eru af fjórum gerðum, adenosín (A), cytosín (C), guanosín (G) og thymidín (T). Á ferjunni er sterkt stýrisvæði sem eykur tjáningu gensins og í ferju DNA eru líka svokallaðar ónæmisörvandi kinnisraðir (immunostimulatory sequences), sem eru sérstakar stuttar CpG raðir úr bakteríu DNA. CpG raðirnar virka eins og ónæmisglæðir. Ekki er alveg ljóst hvað gerist þegar DNA er sprautað í skepnuna en ferjan er líklega tekin upp í sýnifrumur, genið er umritað og tjáð sem prótein eða ónæmisvaki (Tighe o.fl. 1998)

Hægt er að beina ónæmissvari á Th1 braut - (5. mynd)

CpG stefin gera það að verkum að DNA bólusetning beinir ónæmissvarinu fremur á Th1 braut en Th2 braut, þannig að mögulegt er að nota DNA bóluefni til að beina ónæmissvari á Th1 braut. Þessi eiginleiki DNA bóluefna gerir menn vongóða um að nú sé hægt að þróa bóluefni gegn ofnæmi af gerð I. Tilraunir í nagdýrum hafa sýnt að bæði er hægt að vernda gegn ofnæmi og lækna ofnæmi með DNA bólusetningu eða með því að snúa ráðandi Th2

svari yfir í ráðandi Th1 svar (Spiegelberg o.fl. 1998). Um allan heim eru DNA bólufni í þróun ekki síst gegn innanfrumu sýklum þar sem vörn eftir Th1 braut er nauðsynleg og gegn ofnæmi af gerð I sem er orsakað af ónæmissvari á braut Th2. Ýmsir erfiðleikar virðast þó í veginum, því þó mjög góður árangur hafi náðst í músum reynist ekki eins auðvelt að endurtaka tilraunirnar í stærri dýrum. Veikari ónæmissvörun fæst yfirleitt við DNA bólusetningu en með prótein bólufnum. Einnig er misjafnt hvaða tjáningarferjur og hvernig CpG raðir hæfa hverri tegund. En allt eru þetta erfiðleikar sem trúlega verður sigrast á, þróaðar verða tjáningarferjur og CpG raðir sem hæfa hverri tegund. Ef ónæmissvar er ekki nægilega kröftugt eftir DNA bólusetningu er sá möguleiki fyrir hendi að beina því á Th1 braut með DNA bólusetningu og endurbólusetja síðan með samsvarandi próteini til að efla svarið. Annar möguleiki er að bólusetja með blöndu af próteini og CpG röðum sem ónæmisglæði til að beina ónæmissvari á Th1 braut (Babiuk o.fl. 2000).

Bólufni gegn sumarexemi í hestum

Markmið verkefnisins er að skilgreina ofnæmisvakana í mýflugunum og gen þeirra, skilgreina betur eðli þeirra ónæmissvara sem stuðla að sumarexeminu og þróa aðferðir til bólusetninga gegn því. Skipta má verkefninu gróft í þrjá áfanga:

1) Klónun og raðgreining gena fyrir ofnæmisvökunum og framleiðsla og raðgreining próteina: Þetta er gríðarlega erfið vinna og tímafrek. Til þess að þetta markmið náist þarf að fara fram forvinna til að framleiða prófefni sem notuð eru við einangrunina því rannsóknir á ónæmiskerfi hrossa eru komnar skemur en í músum og mönnum og því mun færri prófefni til fyrir hesta. Einnig er líklegt að ofnæmisvakarnir séu fleiri en einn. Verið er að vinna að þessum áfanga í Bern og á Keldum.

2) Skilgreina eðli þeirra ónæmissvara sem stuðla að sumarexeminu: Til þess að geta þróað bólufni sem á að beina ónæmissvarinu inn á Th1 braut verður að vera hægt að mæla hvort hestarnir eru að svara með Th1 eða Th2 svari. Mælingar á ónæmisboðefnum í hestum eru skammt á veg komnar, en þó er búið að klóna genin fyrir öll helstu boðefnin. Setja á upp líkan í hestum þar sem hestar eru sprautaðir annars vegar með albumin próteini úr mönnum (HSA) þannig að þeir mynda ofnæmi gegn því. Hins vegar eru þeir sprautaðir með HSA geninu á tjáningarferju. Ónæmissvörun hestanna verður síðan borin saman, bæði hvað varðar myndun HSA sérvirkra mótefnaflokka (IgG(T), IgGa, IgGb IgGc og IgE) og boðefna þegar hvítfrumur þeirra eru örvaðar í rækt með HSA próteininu. Einnig mun reynt að snúa Th2 svari í HSA ofnæmishestum í Th1 svar og athugað hvort hægt er að laga ofnæmið með því. Þessi vinna er hafin á Keldum.

3) Þróa aðferðir til bólusetninga gegn ofnæminu. Finna þarf hentugar

tjáningarferjur fyrir hesta og bestu leið til að sprauta í þá bóluefninu. HSA líkanið verður notað til að þróa DNA bóluefni. Þegar genin fyrir ofnæmisvakann úr mýflugum hafa verið einangruð, verða þau sett á þá tjáningarferju sem best hefur reynst og hestar bólusettir með henni. Ef ekki dugir að bólusetja með genunum þá verða ofnæmispróteinin úr flugunni líka framleidd og notuð í endurbólusetningar með Th1 ónæmisglæðum. Fylgst verður með ónæmissvari hestanna, hvort það er á Th1 eða Th2 braut. Ef tekst að finna samsetningu af bóluefni og bólusetningaraðferð sem beinir ónæmissvari hesta gegn ofnæmisvökum *Culicoides* mýflugunnar inn á Th1 braut þá er kominn grundvöllur til að bólusetja hesta. Þessir hestar yrðu síðan fluttir ásamt óbólusettum samanburðarhópi til útlanda, á svæði þar sem mikið er af flugu og athugað hvort þeir eru í raun og veru varðir gegn flugunni.

Rannsóknir í músum hafa sýnt að auk þess að verja mýs gegn ofnæmi má líka lækna þær af ofnæmi með DNA bóluefni. Ekki er víst að sú verði raunin með hestana. Enda þótt sumarexemið sé ofnæmi af gerð I í byrjun þá gæti það breyst yfir í ofnæmi af gerð IV þegar það verður viðvarandi (kronískt), en ofnæmi af gerð IV eru viðbrögð á Th1 braut. Ef þetta er raunin, þá er lækning á exeminu ekki raunhæf með þessari aðferð, aðeins verður þá hægt að nota bólusetninguna sem forvörn. Áætlað er að rannsaka meingerð sumarexemsins í samvinnu við Einar Jörundsson dýralækni og húðmeinafræðing á Keldum. HSA líkanið verður notað til að koma upp aðferðafræðinni og síðan verða fengin vefjasýni úr hestum með sumarexem og athugað nákvæmlega hvaða boðefni eru framleidd í exemútbrotum á mismunandi stigum sjúkdómsins, en því hefur ekki verið lýst áður.

Það er von þeirra sem að þessari rannsókn standa að hægt verði að þróa bóluefni sem ver hesta gegn sumarexemi. Ef þetta tekst, mun það ekki einungis verða ómetanlegt í baráttunni við þennan sjúkdóm heldur einnig undirstaða fyrir aðrar DNA bólusetningar í hestum. En hætta er á að æ fleiri smitsjúkdómar, sem nauðsynlegt reynist að bólusetja gegn, eigi eftir að berast í íslenska hesta. Í sambandi við sumarexemsverkefnið verða þróuð og sett upp á Keldum flest undirstöðu ónæmispróf fyrir hesta en þau eru grundvöllur frekari rannsókna á ónæmiskerfi hrossa og viðbrögðum þeirra við smitsjúkdómum.

Sigurbjörg Þorsteinsdóttir og Vilhjálmur Svansson

Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði að Keldum

Heimildir

Babiuk, L.A. Babiuk, S.L., Loehr, B.I., van Drunnen Littel van den Hurk, S. (2000) Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76, 1-23.

Broström, H. and Larsson, ., (1987) Allergic dermatitis (sweet itch) of Icelandic horses in Sweden: An epidemiological study. *Equine Vet. J.* 19, 229-236.

Halldórsdóttir, S. and Larsen, H.J., (1991) An epidemiological study of summer eczema in Icelandic horses in Norway. *Equine Vet. J.* 23, 296-299.

Marti, E., Urwyler, A., Neuenschwander, M., Eicher, R., Meier, D., de Weck, A.L., Gerber, H., Lazary, S., and Dahinden, C.A. (1999) Sulfidoleukotriene generation from peripheral blood leukocytes of horses affected with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 307-320.

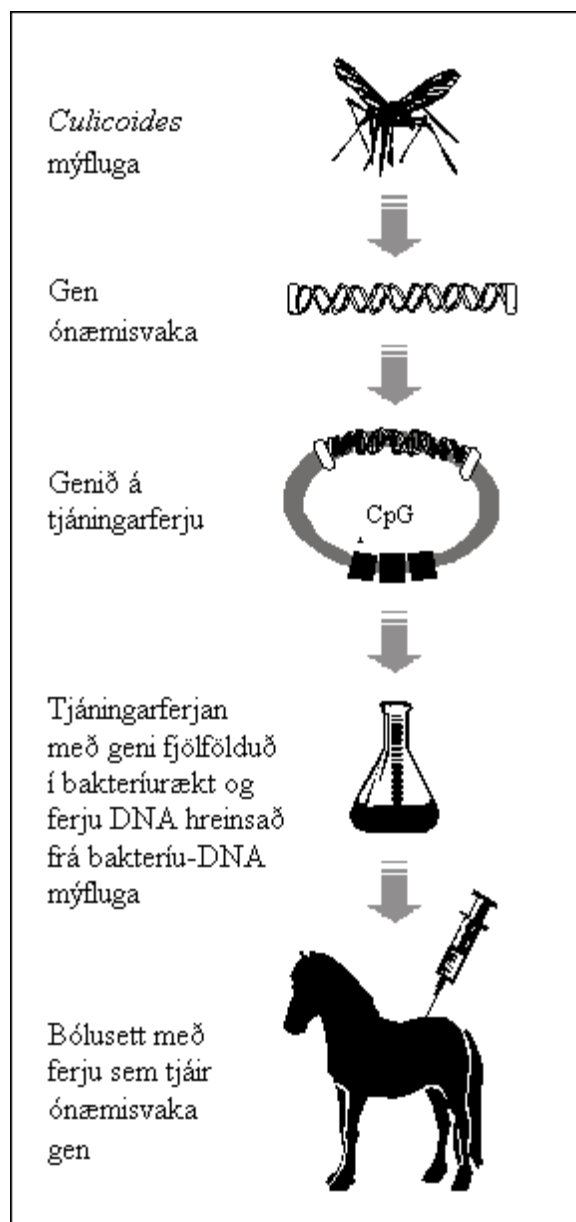
Mosmann, T.R., and Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17, 138-146.

Nilsen K. *Kompendium i intern medicin, A/S Carl Fr. Mortensen København.* 2, 332-333.

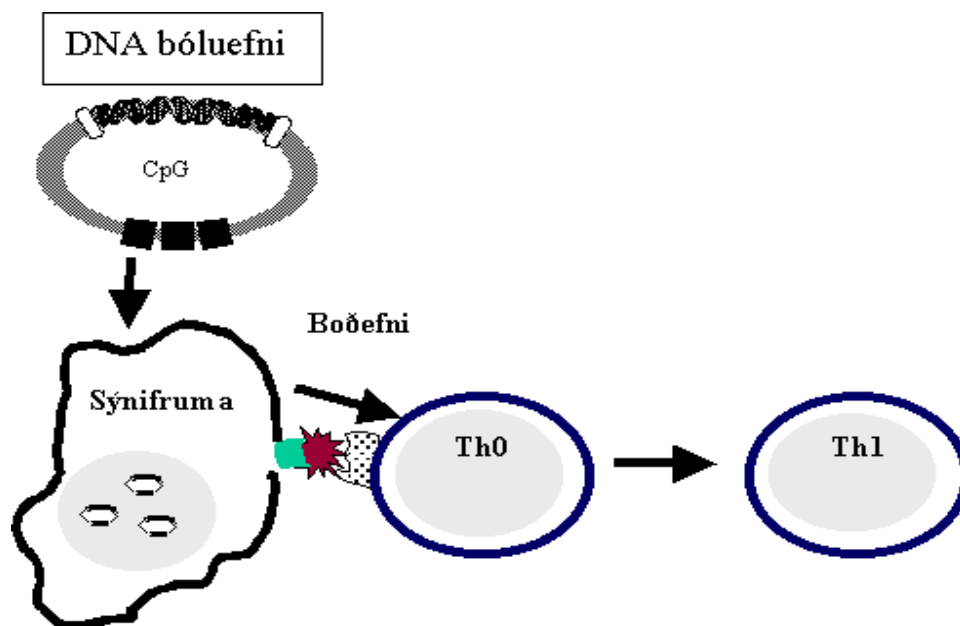
Romagnani, S. (1990) Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol. Today.* 11, 316-321.

Spiegelberg, H.L., Tighe, H., Roman, M., Broide, D., Raz E. (1998) Inhibition of IgE formation and allergic inflammation by allergen gene immunization and by CpG motif immunostimulatory oligodeoxynucleotides. *Allergy* 53:93-97.

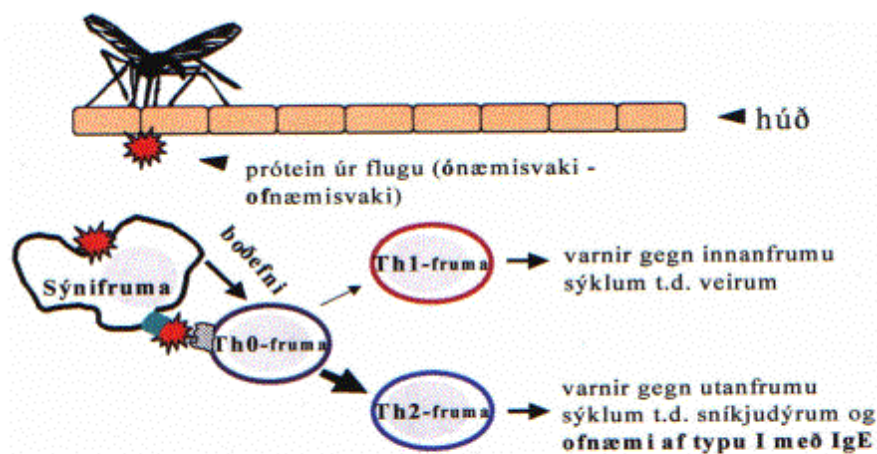
Tighe, H., Corr, M., Roman, M., and Raz, E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. (1998) *Immunol. Today* 19, 89-97.



Framleiðsla á DNA bóluefni



Beina má ónæmissvari á Th1 braut með DNA bóluæfni



Mynd 2. Prótein úr flugu verður að ofnæmisvaka og ónæmissvarið beinist inn á Th2 braut með framleiðslu á IgE ofnæmismótefnum.