



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för Biomedicin och
Veterinär folkhälsovetenskap

Unika matrixfragment i ledvätska och serum hos halta hästar. Vad har det för klinisk betydelse?

Maria Andersson

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:70*

Unika matrixfragment i ledvätska och serum hos halta hästar. Vad har det för klinisk betydelse?

Unique matrix fragments in synovial fluid and serum in lame horses. What is their clinical relevance?

Maria Andersson

Handledare: *Eva Skiöldebrand, institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap*

Biträdande handledare: *Stina Ekman, institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap*

Biträdande handledare: *Maria Löfgren, institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap*

Examinator: *Karin Vargmar, institutionen för Biomedicin och Veterinär folkhälsovetenskap*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:70

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: COMP1, osteoartrit, biomarkör, hälta, häst

Key words: COMP1, osteoarthritis, biomarker, lameness, horse

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Sjukdomar och skador i leder är den vanligaste orsaken till hälta hos hästar. Dagens diagnostik är begränsad i det tidiga stadiet av osteoartrit vilket leder till att kroniska förändringar hinner etablera sig innan sjukdomen kan påvisas och adekvat behandling sätts in. Det finns många olika biomarkörer som indikerar osteoartrit men ingen biomarkör som kan användas vid diagnostisering av tidig osteoartrit, varken hos människa eller hos andra djurslag. COMP1, en neoepitop till COMP som bildas under pågående inflammation i ledens brosk, har nyligen studerats som potentiell biomarkör för tidig osteoartrit och har visat lovande resultat. Syftet med denna studie var att undersöka om det fanns ett samband mellan förhöjda koncentrationer av COMP1 i ledvätska och i serum hos halta hästar och grad och duration av hälta. Förhoppningen var att resultatet skulle kunna användas för att ta fram bättre och snabbare diagnostik.

Studien utfördes på Sveriges lantbruksuniversitet vid institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap. 14 halta hästar som kom till Universitetsdjursjukhusets hästklinik för hältutredning fick genomgå en objektiv rörelsebedömning innan och efter ledanestesi för att gradera hälta och lokalisera den eventuella led som orsakade hästen smärta. I samband med ledanestesi insamlades synovia från leden innan lokalanestesi injicerades. Blodprov togs från jugularvenen. Proverna analyserades sedan med en inhibitions-ELISA med avseende på COMP1. Synoviaprover har även analyserats med avseende på leukocyter och totalprotein.

Vid akut hälta (≤ 4 veckor) påvisades en statistiskt signifikant förhöjd koncentrationen av COMP1 i synovia från halta leder jämfört med synovia från leder där anestesin inte släckte ut hälta. Tyvärr var durationen av hälta osäker hos en av de inkluderade hästarna vilket innebär att resultatet inte är helt tillförlitligt. Om den osäkra hästen exkluderas föreligger fortfarande en skillnad mellan grupperna, om än inte längre statistiskt signifikant.

Koncentrationen av COMP1 i serum jämfördes mellan hästar med halta leder och halta hästar där anestesin inte släckte ut hälta. Ingen statistiskt signifikant skillnad påvisades. Serumkoncentrationen korrelerade inte heller med koncentrationen av COMP1 i synovia. Inget tydligt samband mellan uppmätta koncentrationer av COMP1 och hältgrad kunde påvisas.

En måttlig korrelation mellan koncentrationen av COMP1 och antal leukocyter ur samma led påvisades, detta gällde oavsett om hästen var halt från den provtagna leden eller inte. De uppmätta leukocytvärdena var inom normalvariation i samtliga leder, förutom en lindrig stegring i en led. Samtliga värden ligger inom vad som anses normalt vid osteoartrit. Ingen korrelation kunde påvisas mellan koncentrationen av COMP1 och totalprotein ur samma led.

För att få en bättre uppfattning om huruvida COMP1 är en bra indikator på akut ledinflammation i samband med tidig osteoartrit bör studien utökas med fler halta hästar samt en frisk kontrollgrupp.

SUMMARY

Diseases and injuries of the joint is the most common cause of lameness in the horse. Available diagnostics are limited in the early stages of osteoarthritis which leads to manifestations of chronic changes before the disease is noticed and medical treatment initiated. There are many different biomarkers that indicate osteoarthritis but no biomarkers can detect early stages, neither in man nor animal. COMP1, a neoepitope to COMP which forms during ongoing inflammation in the articular cartilage, has recently been studied as a potential biomarker for early osteoarthritis and the result is promising. The aim of this study was to examine if there was a correlation between increased concentrations of COMP1 in synovial fluid and in serum in lame horses and degree and duration of the lameness. The prospect was that the result could be used to develop better and earlier diagnostics.

The study took place at the Swedish University of Agricultural Science at the Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health. 14 lame horses that came to the horse clinic at the University Animal Hospital were examined with an objective lameness evaluation before and after joint anesthetics to grade the lameness and localize the potential joint causing pain to the horse. Synovial fluid was collected from joints in connection with joint anesthetics before injection of the drug. Serum was collected from the jugular vein. Samples were analyzed with an inhibition-ELISA for COMP1. Samples of synovial fluid were also analyzed for leukocytes and total protein.

In horses with acute lameness (≤ 4 weeks) there was a statistically significant increase in the concentrations of COMP1 in synovial fluid from lame joints compared to synovial fluid from lame horses where local anesthetics did not reduce the lameness. Unfortunately, the duration of lameness was uncertain in one of the included horses which mean that the result is not entirely reliable. Even if the uncertain horse is excluded from the study there is still a difference, although no longer statistically significant.

The concentration of COMP1 in serum was compared between lame horses with lame joints and lame horses with joints that did not respond to the local anesthetics. No statistically significant difference was found. The concentration of COMP1 in serum did not correlate to the concentration measured in synovia. No statistically significant correlation between measured concentrations of COMP1 and degree of lameness could be detected.

A moderate correlation was detected between the concentration of COMP1 and leukocytes in synovial fluid from the same joint without regard to whether the horse was lame from the aspired joint or not. The measured numbers of leukocytes were all within normal variation except for a small increase in one joint. This result would be considered normal in osteoarthritis. No correlation could be detected between the concentration of COMP1 and total protein from the same joint.

More horses should be included in the study to get a better understanding on whether COMP1 is a good indicator of acute joint inflammation in regards of early osteoarthritis. It should also be compared to a healthy control group.

Innehåll

Sammanfattning	4
Summary	5
Inledning.....	1
Litteraturstudie	2
Synoviala ledens uppbyggnad	2
Ledbrosk.....	2
Subkondralt ben.....	3
Ledkapsel	3
Osteoartrit.....	4
Biomarkörer	5
Extracellulära matrixmolekyler.....	6
COMP.....	6
Objektiva mätmetoder vid hälta	8
Material och metoder	9
Provhantering	9
Analys.....	9
Statistisk analys	9
Resultat.....	10
Diskussion	15
Konklusion	17
Litteraturförteckning	18

INLEDNING

Hälta till följd av skador och sjukdomar i leder är den vanligaste orsaken till nedsatt prestation hos hästar. Studier visar att upp till 60 % av hältor är relaterad till osteoartrit (OA) (McIlwraith, 2016). Den kliniska bilden vid OA är vanligtvis en långsamt progressiv hälta som även kan vara bilateral. Det kan förekomma ledsmärta, minskat rörelseomfång, ökad ledfyllnad och inflammation, dock utan systemiska effekter (Kidd et al, 2001).

Diagnosticering av OA baseras främst på den kliniska bilden tillsammans med radiologiska förändringar (Mobasher & Henrotin, 2015). Dagens diagnostik är tyvärr ganska ospecifik, och det är svårt att avgöra om en skada är akut, kronisk eller under avläkning. I ett tidigt skede av OA förekommer inflammation i leden, men det har inte nödvändigtvis utvecklats radiologiska förändringar (Kidd et al, 2001) vilket ytterligare begränsar de diagnostiska möjligheterna.

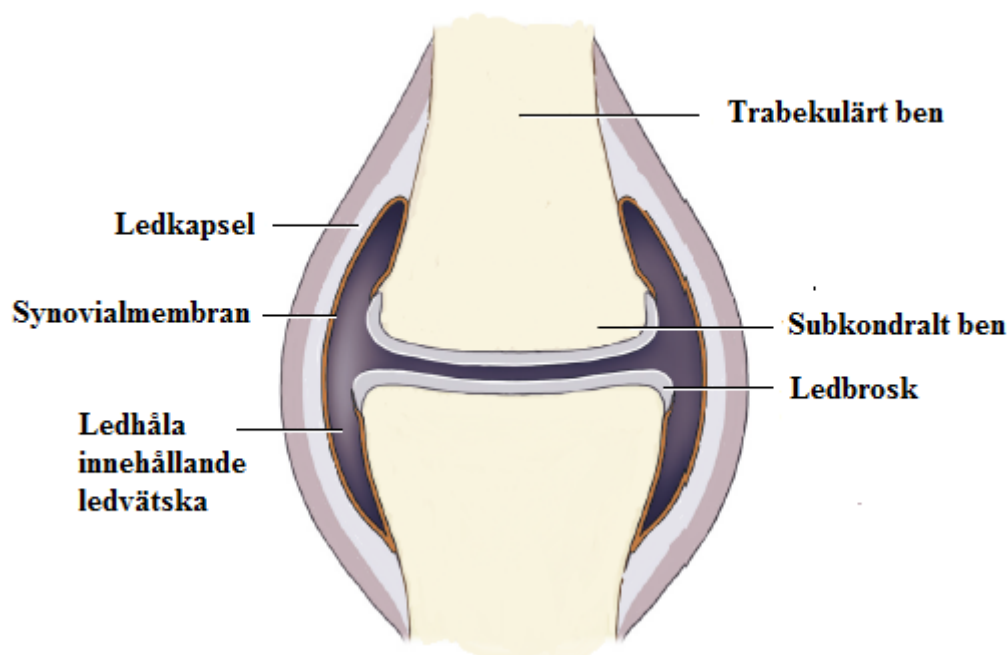
Det förkommer forskning för att hitta ny, bättre diagnostik för påvisande av OA. Nyligen har ett extracellulärt matrixfragment kallat COMP1 identifierats som potentiell biomarkör för sjukdomen (Skiöldebrand et al, 2017). COMP1 är en neoepitop från COMP som endast bildas vid inflammation. Detta kan utgöra en mer specifik möjlighet att påvisa OA i ett tidigt skede då inflammation är en förutsättning för dess uppkomst.

Syftet med arbetet är att ta reda på om det finns något samband mellan höga halter av matrixfragmentet COMP1 i ledvätska och serum hos halta hästar och grad och duration av hältan. Målet är att öka kunskapen kring de sjukdomsmekanismer som styr uppkomsten och bibehållandet av inflammationen i leden. Förhoppningen är att resultatet i slutändan ska leda fram till snabbare och bättre diagnostik där sjukdom kan diagnosticeras i ett tidigt skede.

LITTERATURSTUDIE

Synoviala ledens uppbyggnad

En led är en sammankoppling mellan två eller flera ben och tillåter rörelse mellan dem. Leden måste vara tålig för att stå emot krafter som genereras under rörelse samtidigt som de måste tillåta så friktionsfri rörelse som möjligt. Leden har ytterligare som funktion att dämpa de krafter som uppstår då hästen sätter ned sin hov i marken (van Weeren, 2016). I en synovialled skiljs benen åt via en vätskefylld ledhåla. Ledhålan avgränsas av ledkapseln som består av ett inre lager kallat synovialmembran, och ett yttre fibröst lager. De involverade benändarna kallas subkondralt ben (Caron, 2011) och bekläds av ett lager av ledbrosk som främst är av hyalin typ. Ledbrosket följer konturen på det underliggande benet, men är inte jämntjockt hela vägen utan kurvaturen accentueras genom att ledbrosket är tjockare i mitten på konvexa ytor medan det är tjockare i periferin på konkava ytor (Dyce et al, 2010). Utöver dessa strukturer finns vanligtvis yttre periartikulära vävnader bestående av ligament, muskler och senor som stabiliserar leden. Ibland förekommer även menisker och intraartikulära ligament, exempelvis korsbanden i femorotibialleden (van Weeren, 2016). Schematisk bild av en synovialled åskådliggörs i figur 1.



Figur 1. Schematisk bild av en synovialled. Modifierad från van Weeren, 2016.

Ledbrosk

Hos vuxna individer är ledbrosket avaskulärt och saknar lymfkärl och nerver. Brosket får sin näring via synovian i leden. Brosk saknar nerver och information om ledens position erhålls via det subkondralt benet och periartikulära mjukdelar (Caron, 2011). Brosket består av fyra zoner;

- Superficial zon – cellerna är elongerade och orienterade parallellt till ledytan. Rikligt med kollagen, lågt innehåll av proteoglykaner och mycket vatten.

- Mittzon – cellerna är rundade och är slumpmässigt orienterade. Mindre kollagen och vatten, mer proteoglykaner.
- Djup zon – runda celler arrangerade i kolumner orienterade vinkelrät mot ytan. Högst andel proteoglykaner, men minst innehåll av vatten.
- Kalcifierad zon – cellerna är kalcifierade. Skiljs från de icke mineraliserade lagren genom ett tunt lager av ökad mineralisering kallat tidemark (Caron 2011; van Weeren 2014).

Kondrocyter ansvarar för både syntes och degradering av ledbroskets ECM. Tillväxtfaktorer och nedbrytande enzymer, främst matrix metalloproteinaser (MMPs) och aggreganser, reglerar omsättningen av beståndsdelarna i ECM (Skiöldebrand, 2004; van Weeren, 2014). Brosk är en dynamisk vävnad och genomgår ständig remodelering via uppbyggande och nedbrytande processer (van Weeren, 2014). Många olika faktorer påverkar brosket inklusive ålder, belastning och inflammation vilket medför att det ständigt måste anpassas till dess funktionella behov (Skiöldebrand, 2004).

Broskets funktion är viktig för transmission och för att dämpa de krafter som uppstår vid rörelse. Detta ställer krav på vävnaden både beträffande elasticitet och styrka och åstadkoms genom att ledbroskets ECM är uppbyggt av kollagen och proteoglykaner (van Weeren, 2014). Ledbrosket är till synes slätt och glansigt och hos unga individer vitt med en blå eller rosa ton medan det hos äldre individer får en mer gulaktig ton vilket indikerar förlust av elasticitet (Dyce et al, 2010).

Subkondralt ben

Det subkondrala benet stödjer det överliggande brosket och dessa är sammankopplade genom broskets kalcifierade zon. Det subkondrala benet består av ett lager med kompakt ben direkt under brosket medan benet blir mer trabekulärt längre bort från ledhålan. Det kompakta benet ger ett starkt stöd medan det trabekulära benet ger viss elasticitet. Subkondralt ben är en viktig komponent för att dämpa de krafter som uppstår vid rörelse. Det är aningen flexibelt och kan ge efter något i sin konformation. Det är betydligt mindre flexibelt än ledbrosk, men tio gånger mer flexibelt än benvävnad i de långa rörbenen. Ben reagerar på belastning genom att anpassa sin morfologi efter de krafter som verkar på det, höga krafter medför att benet blir tjockare (van Weeren, 2016). Subkondralt ben är i motsats till ledbrosket rikligt vaskulariserat med hög metabolism. Den rikliga vaskulariseringen medger snabb respons till både fysiologiska och patologiska stimuli. Benet är även innerverat och möjliggör känsel vilket kan bidra till smärta vid ledsjukdom (van Weeren, 2016; de Grauw, 2011).

Ledkapsel

Ledkapseln består av två lager. Det yttre lagret består av fibrös vävnad och är ofta i nära kontakt med periartikulära vävnader så som kollateralligament och dess främsta uppgift är att ge stöd åt leden. Dessutom har den rikligt med proprioceptorer som ger information om ledens position. Det inre lagret kallas för synovialmembran och består i sin tur av två lager. Det yttre av dessa lager består av lucker bindväv och är rikligt vaskulariserat och innerverat. Det inre lagret, som därmed har direktkontakt med ledhålan, består av ett tunt lager synovicyter lokaliserade i en bädd av kollagenfibriller och andra matrixproteiner. Detta lager

saknar basalmembran, och eftersom det yttre lagret är rikligt vaskulariserat sker passage av plasmakomponenter från blod till synovia. Allt utom större molekyler kan röra sig fritt mellan blodbanan och synovian, och vice versa (Sutton et al, 2009; van Weeren, 2016). Synovia är vanligtvis klar och ofärgad till lätt gulaktigt i utseende med hög viskositet. Vätskan består främst av plasmafiltrat och liknar blodets plasma förutom att det innehåller färre proteiner. Synovia brukar därför beskrivas som ett ultrafiltrat av plasma (Steel, 2008).

Det finns två huvudtyper av synovicyter: typ A och typ B, samt dendritiska celler. Typ A liknar makrofager och dess främsta uppgift är att fagocytera. Typ B är fibroblastliknande och ansvarar för produktion och sekretion av proteiner och andra molekyler, så som kollagen, hyaluronsyra och fibronectin, till synovian och bestämmer därmed till viss del dess viskositet. Alla celltyperna kan dock producera cytokiner, tillväxtfaktorer och inflammationsmediatorer vilket gör dem viktiga för ledens hemostas (Sutton et al, 2009; Caron, 2011; van Weeren, 2016).

Osteoartrit

Osteoartrit (OA) är en låg-gradigt inflammatorisk ledsjukdom med progressiv förlust av ledens funktion. Den kan betraktas som en grupp sjukdomar med gemensamt slutresultat: progressiv nedbrytning av ledbrosk tillsammans med förändringar i ben och mjukdelar hos leden. Förändringar som sker inkluderar alla komponenter av leden såsom ledbrosk, subkondralt ben, synovialmembran, den fibrösa ledkapseln och eventuella intra-artikulära ligament. Inflammationsprocessen kan starta i endera av dessa strukturer (McIlwraith, 2016). Inflammationsmediatorer frisätts från den primärt skadade vävnaden vilket startar en process i resten av leden (Goodrich & Nixon, 2004). Vid OA är balansen mellan uppbyggande och nedbrytande processer rubbad vilket leder till ökad eller minskad syntes alternativt nedbrytning av ledens brosk (Skiöldebrand, 2004).

Etiologin och patogenesen är inte helt klarlagd. Etiologin är multifaktoriell, men mekanisk påverkan är central i alla faktorer och följden är beroende på om vävnaden är framgångsrik eller misslyckas vid reparationsprocessen (van Weeren & de Grauw, 2010). Utveckling av OA sker till följd av antingen onormal belastning på normal led, eller normal belastning på onormal led (Goldring & Goldring, 2007). Om ledbrosket är defekt får det onormala biomekaniska egenskaper och därmed försämrade förmåga att motstå normal belastning. I det andra fallet utsätts normalt brosk för hög, repetitiv belastning vilket leder till skada på brosket. Gemensamt är att följden blir skador på ledbrosket med frisättning av proteolytiska enzymer så som MMPs och aggrecanaser som följd (Caron, 2011). Dessa bryter ned proteoglykanaggregat, vilket gör att den gel som bildas av proteoglykaner och vatten förloras, och kollagenfibrerna tappar sin tredimensionella struktur till följd av att gelen inte separerar fibrerna. Brosket drar in mer vatten vilket leder till att vävnaden sväller och blir mjukare (Zachary & McGavin, 2012). Detta leder till morfologisk skada på ledbrosket med ytliga fibriller, frakturer och ulcerationer som efter hand går djupare ner i broskets zoner tills de slutligen når den djupa zonen. Resultatet är förlust av, och erosioner i brosket (McIlwraith, 2016).

Synovit har visat sig ha en kritisk roll i utvecklandet av OA och kan även driva inflammationen vidare (Berenbaum, 2012). Synovicyter är en källa till ett stort antal inflammatoriska mediatorer och nedbrytande enzymer vilka bidrar till destruktion av ledbrusket. Dessa mediatorer inkluderar MMPs, aggreganser, prostaglandiner, cytokiner, IL-1 och möjligen TNF α (Caron, 2011; McIlwraith, 2016). När ledbrusk degraderas kommer broskfragment att frisättas i leden och komma i kontakt med ledkapseln. Dessa broskfragment kommer agera som främmande kroppar vilket leder till att synovicyterna börjar producera inflammatoriska mediatorer, vilka hittas i synovian. Mediatorerna aktiverar kondrocyter i broskets superficiala zon (Berenbaum, 2012). Kondrocyterna producerar MMPs vilket leder till ökad degeneration av ledbrusket genom att bidra till obalans mellan uppbyggande och nedbrytande processer i brosket (Goldring & Goldring, 2007). Synoviten kan även vara primär orsak till OA och akut synovit kan vara den första förändring som sker i leden (Sutton et al, 2009; Berenbaum, 2012). Initialt svarar ledkapseln på inflammationen genom att bli mer vaskulär och tjockare. Inflammationen främjar angiogenesen som i sin tur potentierar inflammationen genom att transportera in fler inflammatoriska celler och näring (Krasnokutsky et al, 2008). Själva synovian får en förändrad sammansättning. Hyaluronsyra bryts ned och därmed sjunker viskositeten. Ibland förekommer en lindrigt ökad mängd vita blodkroppar och totalprotein pga. läckage från skadade kärl, vilket kan ge viss grumling. Mängden ökar ofta vid akut OA vilket resulterar i en galla (Zachary & McGavin, 2012; Caron, 2011; Steel, 2008). Vid kronisk inflammation blir ledkapseln hypertrofisk i form av villihypertrofi samt fibrotiserad. Stödjevävnad runt leden skadas. Försök till reparation leder till granulationsvävnad och fibros, vilket resulterar i smärta och nedsatt rörlighet i leden (Kidd et al, 2001).

En annan primär orsak till OA är skleros av det subkondrala benet till följd av hög, repetitiv belastning där vävnaden försökt adaptera sig till ökad belastning. Belastningen leder till att bentrabeklerna expanderar och det bildas fler lager vilka fyller ut det intertrabekulära mellanrummet och det bildas skleros. Skleros medför att det subkondrala benet blir stelare och dess förmåga att dämpa krafter reduceras. Detta leder i sin tur till ökad belastning på ledbrusket som därmed tar skada (Caron, 2011; Kidd et al, 2001). Ledbrusket påverkas även genom att cytokiner frigörs från de mikrofrakturer som uppstår i det subkondrala benet vid hög, repetitiv belastning (McIlwraith, 2016).

Osteofyter är vanligt vid OA och kan vara ett försök att stabilisera leden genom att öka kontaktytan. Osteofyter består av ben täckt av hyalin och fibröst brosk och förekommer vanligen runt ledens utkanter. De kan bildas snabbt efter att instabilitet i leden uppstått, vanligare är dock att det tar veckor eller månader innan de kan upptäckas på röntgen (Kidd et al, 2001).

Biomarkörer

Biomarkers Definitions Working Group definierar en biomarkör som något som mäts objektivt och utvärderas som en indikator av normala biologiska processer, patologiska processer eller farmakologisk respons vid läkemedelsbehandling (Mobasheri & Henrotin, 2015). Biomarkörer kan delas in som torra och våta. Torra biomarkörer inkluderar klinisk undersökning och radiologi. Våta biomarkörer kan mätas i blod, urin och synovia, samt i

vävnadsprover (Frisbie et al, 2015). Dessa markörer är oftast molekyler som förekommer normalt i vävnaden som ett resultat av den metabolism som pågår. Vid sjukdom sker förändringar i balansen mellan uppbyggande och nedbrytande processer. Som ett resultat av detta kan koncentrationen av biomarkören förändras, vilket kan mätas i ledvätska, blod och urin (McIlwraith, 2005). Vid ledsjukdom såsom OA kan biomarkörer frisättas i synovia om dess ursprung är ledbrusk, menisker, ligament eller synovialmembran. Om det subkondrala benet är involverat brukar molekyler från den osseösa vävnaden släppas ut i blodbanan (McIlwraith, 2005).

Den optimala biomarkören vid OA påvisar leddskada tidigare än konventionella metoder, ger information om sjukdomsstadium och grad av skada, samt ger en fingervisning om prognos och orsak till skadan (McIlwraith, 2005). Det finns många olika biomarkörer som indikerar OA, COMP är en av dessa. Dock finns det i dagsläget ingen biomarkör som enskilt kan diagnosticera tidig OA, varken hos människa eller hos andra djurslag (Frisbie et al, 2015).

Extracellulära matrixmolekyler

Ledbrusk består av kondrocyter, extracellulärt matrix (ECM) och vatten. ECM består främst av kollagen och proteoglykaner och produceras av broskets kondrocyter (Caron, 2011; van Weeren, 2014). Kollagenet består främst av kollagen typ II molekyler vilka formar ett tredimensionellt nätverk vilket fäster till det subkondrala benet och ger brosket dess styrka. Mellan kollagenfibrillerna finns proteoglykaner vilka fäster till kollagenet antingen direkt eller via hyaluronsyramolekyler. Den viktigaste av proteoglykanerna är aggrecan, ett kärnprotein med sidokedjor av sulfaterade glukosaminoglykaner. Sulfatgrupperna ger sidokedjorna negativ laddning vilket gör dem hydrofila. Detta medför att vatten dras in i vävnaden och det bildas en gel av proteoglykaner och vatten. Gelen expanderar nätverket av kollagen, vilket leder till ett inre tryck och därmed elasticitet hos ledbrusket (van Weeren, 2014; Poole, 2005).

COMP

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) är ett icke-kollagenöst extracellulärt matrixprotein tillhörande trombospondinfamiljen. Den är uppbyggd som en pentamer med fem globulära domäner som är sammankopplade till en central domän (Misumi et al, 2001). Initialt ansågs COMP vara broskspecifikt, men senare forskning visar att COMP finns i stora mängder i ledbrusk, tillväxtplatta, synovium, senor och ligament (Rock et al, 2010). Dess funktion är inte helt klarlagd. Den kan verka som ett cell-bindande protein genom att binda glukosaminoglykaner och verkar ha en strukturell funktion genom att mediera infästning av kondrocyter till matrix (Poole, 2004; Misumi et al, 2001). COMP har en viktig egenskap genom att varje subenhet kan binda kollagen typ I, II och IX och främjar därmed uppbyggnaden av matrix (Arai et al, 2005; van Weeren, 2016). Enligt Caron (2010) har COMP som uppgift att reglera celltillväxten i brosket. Mutationer i genen som kodar för COMP ger upphov till utvecklingsrubbingar i brosk och skelett (Skiöldebrand, 2004). COMP förmodas även assistera vid interaktioner i ECM genom att binda aggrecaner (Sutton et al, 2009).

COMP i synovia och serum har undersökts som potentiell markör för OA både hos människa och hos häst. Hos människa visades förhöjda koncentrationer i både synovia och serum vid tidig OA, vilka sedan gradvis sjönk över tid men kvarstod förhöjda under flera år. Detta antogs bero på både ökad nedbrytning av matrix och ökad produktion av COMP som ett resultat av försök till reparation (Lohmander et al, 1994). Hos häst har COMP i synovia och serum har visats vara en känslig biomarkör för OA. Studier visade att koncentrationen av COMP i synovia och serum var lägre hos hästar med aseptisk och septisk artrit än hos friska hästar (Misumi et al, 2001; 2002). Det var även lägre hos hästar med spatt i haserna (Taylor et al, 2006). I en studie av Skiöldebrand et al (2001) undersöktes halten COMP i både synovia och serum vid lesioner på det tredje carpalbenet i carpalleden hos varmblodiga travare och svenska varmblodiga ridhästar. Resultatet visade att travarna med måttliga förändringar i ledbrusket hade lägre koncentration av COMP i både synovia och serum jämfört med travare med normala leder, medan ingen skillnad kunde ses i synovia mellan ridhästarna med måttliga förändringar i ledbrusket och deras normala motsvarighet. Däremot visade ridhästarna med måttliga förändringar i ledbrusket ökad koncentration av COMP i serum jämfört med ridhästar med normala leder. Detta resultat indikerar en skillnad i frisättning av COMP beroende på hästens aktivitetsnivå.

Andra studier på häst har visat signifikant ökade halter av COMP i synovia och i serum vid OA (Arai et al, 2005; Skiöldebrand et al, 2005; Yamanokuchi et al, 2009). I två av dessa studier har andra typer av metoder används för att analysera proverna. Tidigare studier hade använts sig av inhibitions-ELISA med monoklonala eller polyklonala antikroppar mot COMP hos andra djurslag än häst (humana och bovina). I Arai et als studie (2005) användes en inhibitions-ELISA med monoklonala antikroppar mot ekvint COMP. Dessa antikroppar hade högre affinitet för degraderat COMP och därmed kunde små fragment påvisas som inte kunde identifieras av den humana sorten. I Yamanokuchi et als studie (2009) användes en sandwich-ELISA med monoklonala antikroppar vilket har en högre specificitet för COMP. Skiöldebrand et al (2005) använde dock den gamla metoden med polyklonala antikroppar mot bovint COMP. Det som skilde den studien från tidigare studier var att det endast användes akut halta hästar med hälteduration <4 veckor.

Även graden av hälta har visats korrelera med koncentrationen av COMP i synovia där högre hältgrad korrelerade med högre koncentration av COMP (Bertuglia et al, 2016). Denna studie genomfördes på akut halta hästar, och COMP analyserades med en sandwich ELISA med monoklonala antikroppar mot ekvint COMP.

Den största anledningen till de olika resultaten vid studier av COMP anses bero på vilket stadium OA befinner sig och dess omfattning (Arai et al, 2005; Skiöldebrand et al, 2005, Taylor et al, 2006; Yamanokuchi et al, 2009). Vid akuta hältor har koncentrationen av COMP i synovia och/eller serum varit förhöjd jämfört med en kontrollgrupp (Arai et al, 2005; Skiöldebrand et al, 2005; Yamanokuchi et al, 2009; Bertuglia et al, 2016). Vid kroniska hältor har koncentrationen av COMP i synovia och/eller serum varit lägre (Skiöldebrand et al, 2001; Misumi et al, 2002; Taylor et al, 2006).

COMP1

Vid inflammation frisätts inflammatoriska mediatorer såsom pro-inflammatoriska cytokiner. Närvaro av dessa cytokiner leder till fragmentering av extracellulära matrixmolekyler, inklusive COMP, och klyvningen av aminosyrasekvensen bildar neoepitoper. COMP1 är en peptid som bildas vid fragmentering av COMP (figur 2). Det unika med COMP1 är att den endast bildas under pågående inflammation i ledbrusket. Vid akuta hältor med symptom pågående mindre än fyra veckor har signifikant förhöjda koncentrationer av COMP1 uppmätts i affekterade leder jämfört med friska leder. Leder med kronisk hälta hade däremot signifikant lägre koncentration av COMP1 jämfört med leder med akut hälta (Skiöldebrand et al, 2017).



Figur 2. Schematisk bild över en COMP-molekyl. Vid en degradering bildas 5 identiska armar. Vid en inflammation spjälkas armen vidare till mindre fragment. Ett av dessa fragment benämns COMP1 i detta arbete.

Ett centralt problem vid diagnostik av OA är avsaknaden av metoder för att identifiera och kartlägga de tidiga händelser som leder till avancerad nedbrytning av broskvävnaden och därför finns det heller inga möjligheter att behandla sjukdomen. I explantodlingar av hästbrosk har COMP och fragment av molekylen som enbart genereras av de nedbrytande enzym som aktiveras av inflammation identifierats med masspektrometri. Aminosyrasekvenser som bildar den nya terminalen (neoepitopen) har identifierats och sedan har polyklonala antikroppar mot neoepitopen (COMP1) framställt. Med antikropparna har en enzymkopplad immunoabsorberande assay (ELISA) utvecklats som kan detektera fragmentet i serum och ledvätska hos häst (Skiöldebrand et al, 2017).

Objektiva mätmetoder vid hälta

Traditionellt används subjektiv bedömning vid hältutredningar där den enskilda veterinären gör en egen bedömning baserat på kunskap och klinisk erfarenhet. Hur veterinärer bedömer hältor varierar mellan individer och är delvis beroende av hur mycket klinisk erfarenhet veterinären har. Det har visats att veterinärer, även erfarna, kan vara oense om vilket ben hästen är halt på, hur allvarlig hältan är och hur mycket den förbättras efter anestesi eller behandling (Keegan et al, 1998; Fuller et al, 2006). Många lindriga hältor eller assymmetrier kan vara svåra att upptäcka för det mänskliga ögat (Pfau et al, 2016).

Ett alternativ till subjektiva metoder är att använda objektiv rörelseanalys. Objektiva metoder är fria från bias och oftast kan små subtila assymmetrier upptäckas. Det finns olika typer av objektiva metoder som fungerar på lite olika sätt (Keegan, 2007). Qualisys är ett system där ljusreflekterande markörer fästs på hästens huvud, manke och kors. Hästen får sedan trava och

markörernas vertikala rörelse filmas av höghastighetskameror (Rhodin, 2016). Om hästen avlastar ett ben kommer markörernas vertikala rörelse att förändras och assymmetrier kan mätas och kvantifieras (Pfau et al, 2016). Systemet visualiserar sedan assymmetrierna.

MATERIAL OCH METODER

Studien var godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd 2013-05-30, diarienummer C62/13. Deltagande i studien var frivillig och skriftligt medgivande att delta i studien finns från samtliga hästägare. Prover samlades från 14 hästar som inkom till Universitetsdjursjukhusets hästklinik för hältutredning. Urvalskriterier var halta hästar med misstanke om ledproblematik som orsak. Djurägarna fick dessutom svara på frågor om historik och sjukdomsduration. Initialt fick hästarna genomgå en objektiv rörelseanalys med hjälp av Qualisys, detta för att få ett objektivt mått på vilket ben hästen var halt på. Behandlande veterinär gjorde även en subjektiv rörelsebedömning vid samma tillfälle. Därefter lades en eller flera ledanestesier för att lokalisera hältan. Efter varje ledanestesi användes Qualisys för att utvärdera effekt.

Provhantering

Ledvätskeprover har insamlats i samband med ledanestesi innan lokalbedövning bestående av mepivakain (Carbocain®, AstraZeneca) injicerats. Inför provtagning från en led har området för insticket klippts och steriltvättats. Veterinären har under ingreppet använt sterila handskar, sterila sprutor och kanyler samt använt ny förpackning anestesimedel. 0,5 ml synovia överfördes till EDTA-rör för analys av leukocyter om mer än 1 ml anspråkerats. Resterande mängd fördes över i sterilt serumrör. Serumprover är tagna från jugularvenen. Proverna förvarades i kylskåp till dess att omhändertagande kunde ske senare under dagen. Proverna centrifugerades i 10 minuter i 450 G i 4°C. Supernatant och serum mättes upp och fördes över i sterila endorfrör innan de förvarades i frys i -80°C fram till analysstillfället.

Analys

Serum och synovia analyserades med egen designad inhibitions enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) med avseende på COMP-1 fragmentet på Sahlgrenska Universitetssjukhuset (Skiöldebrand et al, 2017). Även leukocyter och totalprotein har analyserats från synoviaprov i de fall tillräcklig mängd har aspirerats. De senare analyserna genomfördes på klinisk kemiska laboratoriet på Sveriges lantbruksuniversitet.

Statistisk analys

Koncentrationen av COMP 1 i ledvätska och serum samt totalprotein och leukocyter presenteras som medelvärde \pm standardavvikelse. Pearsons korrelationsanalyser genomfördes mellan olika resultat samt oparade T-test. Signifikansnivån sattes till $p < 0,05$. För statistiska beräkningar användes programmet Minitab17.

RESULTAT

14 hästar deltog i studien och totalt har 23 synoviaprov och 10 serumprov tagits. Hästarna var främst ridhästar av halvblodstyp, det förekom även två islandshästar, en pura raza española (PRE) och två ponnyer. Samtliga hästar användes till hobbyridning, några på lite högre nivå upp till medelsvår klass. En häst användes som voltagehäst på elitnivå. Åtta av hästarna var valacker och sex var ston. Ålder varierade mellan 6-19 år. Åskådliggörs i tabell 1.

Tabell 1. Numrering, ras, ålder och kön på hästar som ingick i studien

KC nummer	Ras	Ålder (år)	Kön
KC60	Svenskt halvblod	7	Valack
KC61	Danskt halvblod	12	Sto
KC62	Svenskt halvblod	9	Valack
KC63	Tyskt halvblod	10	Valack
KC64	Holländskt halvblod	6	Sto
KC65	Islandshäst	17	Sto
KC66	PRE	10	Sto
KC67	Svenskt halvblod	14	Valack
KC68	Korsningshäst	19	Valack
KC69	Welshponny	9	Valack
KC70	Connemara	19	Valack
KC71	Svenskt halvblod	8	Sto
KC72	Islandshäst	8	Sto
KC73	Tyskt halvblod	7	Valack

Samtliga hästar som deltog i studien var ohalta i skritt och hade varierande grad av hälta i trav på rakt spår och vid longering i båda varv. Longering genomfördes i samtliga fall på underlag av grus på 10-12 m stor volt. Några longerades även på asfalt. Den tid som hästarna visat symtom på hälta varierade från 11 dagar till fyra månader, median var 2-4 veckor (tabell 2). Hälta bedömdes både genom veterinärens subjektiva bedömning och objektivt av Qualisys, både initialt och efter ledanestesi. Totalt har sex veterinärer deltagit i bedömningarna. Veterinärernas bedömning överensstämde med Qualisys i samtliga fall. Hältans gradering bestämdes subjektivt av den enskilde veterinär som utredde hältan. Inget gränsvärde sattes i Qualisys för hur asymmetrisk en viss grad av hälta var.

Hos sex hästar lokaliserades hältan med ledanestesi och hältan bedömdes härröra från leden om den släckte ut med minst 80 %. Dessa leder kallas härefter för halta leder. De leder som inte omfattas av definitionen för halta leder benämns härefter som ohalta leder. KC62 har ej inkluderats bland de halta lederna då ledanestesi endast var positiv på böjprovsreaktionen och inte påverkade initialhältan. Hästar med hälteduration ≤ 4 veckor klassades som akut halta medan duration >4 veckor klassades som kroniskt halta. Dessa tidsintervall valdes utifrån en nyligen publicerad studie (Skiöldebrand et al, 2017).

Tabell 2. Grad av initialhätta, duration av hätta, provtagen led och anestesiresultat

KCnr	Grad av initialhätta			Hält-duration	Provtagen led	Anestesiresultat (%)
	Rakt	Vänster varv	Höger varv			
60	Markering HF	1° HF	markering HF	1 månad.	HF kotled	0%
61	Markering VF	0,5° VF, 1,5° VB	markering VF, 1° VB	2-4 veckor.	VF kotled VB TC	100% 0%
62	Ohalt	Ohalt	svag VB	2-4 veckor.	VB TC VB TMT	100% böjprov, 0% initialhätta
63	0,5° HB	2° HB	1° HB	2-4 veckor	HB höftled	0%
64	0,5° HF	1° HF	markering VF	11 dagar, har förvärrats	HF kotled	100%
65	Markering i trav, 1-1,5° HB i pass.	0,5-2° HF, 0,5° HB	0,5° HF markering HB	4 månader HB. Osäkert HF.	HF carpus (r.c + i.c)	80%
66	Markering VF	Ohalt	0,5° VF	2 månader	VF carpus (i.c)	0%
67	1° VF	1° VF	2° VF	10 veckor	VF kotled	0%
68	1,5° VB	2° VB	1° VB	Över 1 månad	VB TC VB TMT	0% 100%
69	Markering HF	Ohalt	0,5° HF	3 veckor	HF hovled HF kotled	50 % Resterande 50 %
70	0,5° HB	0,5° HB	2° HB	1 månad.	HB kotled	50-75%
71	Markering VF	Ohalt	Markering VF	2-4 veckor	VF carpus (r.c + i.c)	100%
72	0,5° VF	0,5° VF	1,5° VF	Ägare vet ej	VF kotled VF carpus (r.c + i.c)	0% 0%
73	1,5° HF	1° HF	0,5° HF	21 dagar	HF carpus (r.c + i.c)	0%

TC – tibiotalarsalled. TMT – tibiometatarsalled. r.c – radiocarpalled. i.c – intercarpalled. HF – Höger framben. VF – vänster framben. HB – höger bakben. VB – vänster bakben

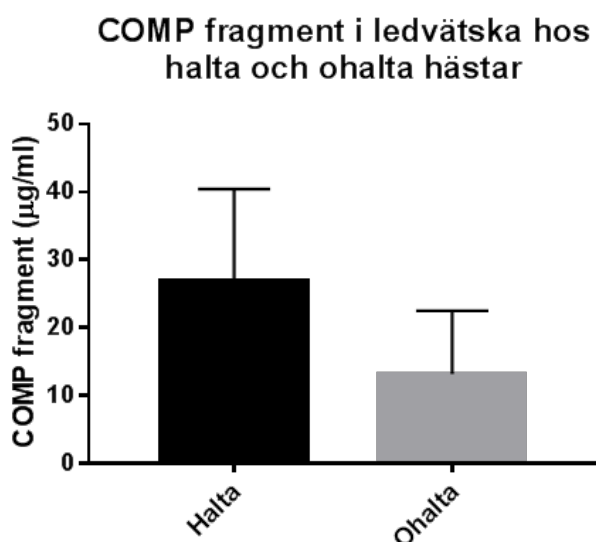
Koncentrationen av COMP1 i synovia från provtagna leder och i serum samt antal leukocyter och totalprotein i synovia redovisas i tabell 3.

Tabell 3. Koncentrationen av COMP1 fragmentet, antal leukocyter och totalprotein i ledvätska och serum för de ingående hästarna

KCnr	Provtagen led	COMP1 i synovia (µg/mL)	COMP1 i serum (µg/mL)	Leukocyter i synovia (10x6/L)	Totalprotein i synovia (g/L)
60	HF kotled	7,68	7,47	Mättes ej	10,31
61	VF kotled	14,96	5,36	100	12,56
	VB TC	16,44		80	16,50
62	VB TC	7,66	Inget serum	Mättes ej	10,54
	VB TMT	0,72		Mättes ej	< 8
63	HB höftled	10,56	6,67	160	14,89
64	HF kotled	21,48	9,19	180	10,61
65	HF r.c	29,40	7,69	Mättes ej	10,50
	HF i.c	51,78		Mättes ej	< 8
66	VF i.c	23,62	Inget serum	130	21,62
67	VF kotled	26,48	6,40	170	8,97
68	VB TC	13,62	8,81	90	8,42
	VB TMT	2,50		Mättes ej	Mättes ej
69	HF hovled	8,16	6,44	80	< 8
	HF kotled	14,70		90	< 8
70	HB kotled	28,68	Inget serum	620	15,18
71	VF r.c	15,64	Inget serum	Mättes ej	9,60
	VF i.c	30,28		150	9,57
72	VF kotled	34,84	6,31	170	14,60
	VF r.c	10,20		50	10,76
	VF i.c	21,86		90	15,76
73	HF r.c	27,82	5,15	270	17,77
	HF i.c	21,46		80	20,89

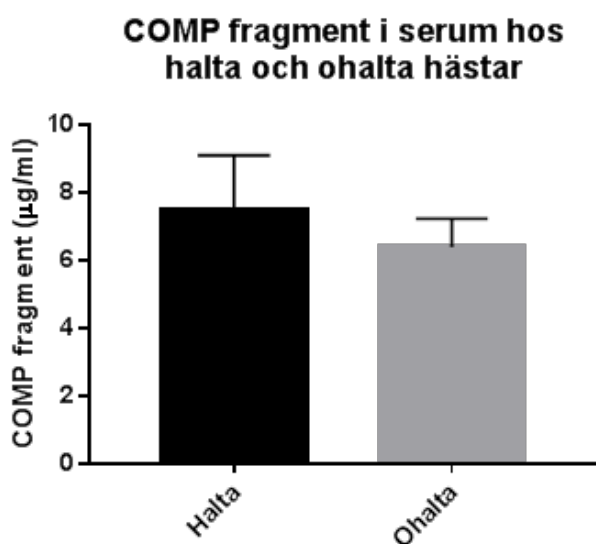
TC – tibiotalarsalled. TMT – tibiometatarsalled. r.c – radiocarpalled. i.c – intercarpalled . HF – Höger framben. VF – vänster framben. HB – höger bakben. VB – vänster bakben

Medelvärdet av koncentrationen av COMP1 i synovia i halta leder låg på $22,59 \pm 14,79$ µg/mL medan det för de ohalta lederna låg på $17,32 \pm 9,87$ µg/mL. Ingen statistisk signifikant skillnad kunde påvisas mellan dessa grupper. Däremot förelåg en signifikant ökad koncentration av COMP1 i synovia i halta leder hos hästar med akut insatt hälta (visat symtom ≤ 4 veckor) med ett medelvärde på $26,85 \pm 5,5$ µg/mL jämfört med ohalta leder under samma tidsintervall ($13,19 \pm 6,35$ µg/mL, $p=0,055$) (figur 3). Denna skillnad var endast signifikant då KC65 inkluderades bland de akuta hältorna. KC65 är en 19 år gammal islandshäst som ådrog sig en sårskada på sitt högra bakben och var därefter halt i fyra månader innan hältundersökning. Vid hältundersökning upptäcktes att hästen även var halt på sitt högra framben, vilket var det ben som provtogs. Ägaren hade inte uppmärksammat hältan HF och därigenom är det oklart hur länge den har pågått. Om KC65 uteslöts pekar resultatet fortfarande på en trend där koncentrationen av COMP1 i de halta lederna var högre än i de ohalta lederna, men ingen statistiskt signifikant skillnad kunde påvisas.



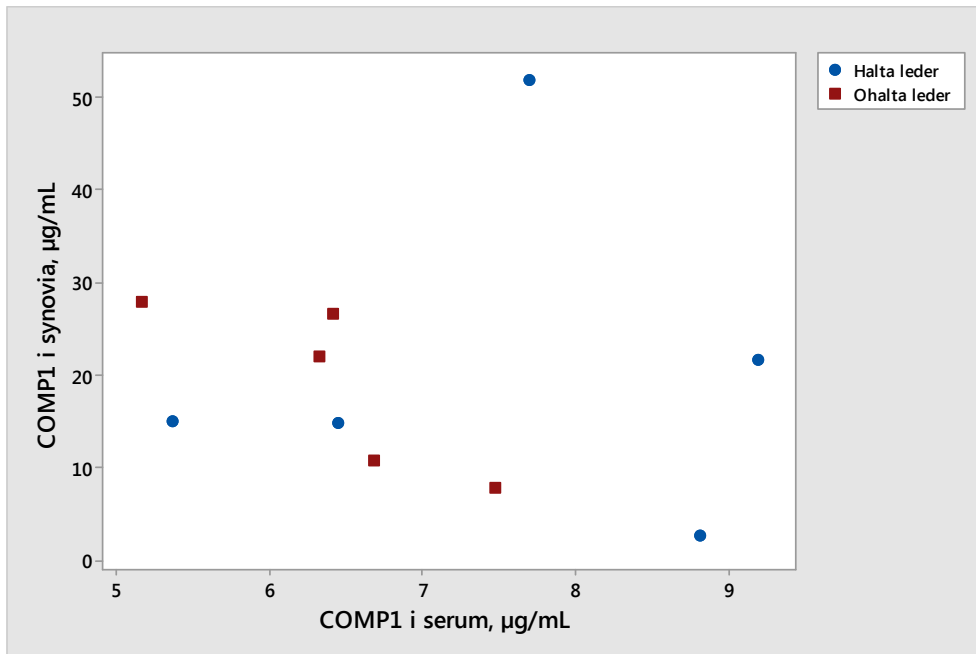
Figur 3. Koncentrationen av COMP1 fragment i ledvätska (medelvärde och SD) från halta och ohalta leder med akut uppkommen hälta ≤ 4 veckor, KC65 inkluderad. Enbart en led från varje häst ingår i grafen. n halta leder=5, n ohalta leder=7.

Hos de hästar där hältan lokaliserats till en specifik led var koncentrationen av COMP1 i serum $7,50 \pm 1,61$ $\mu\text{g/mL}$ medelvärdet \pm SD, vilket var högre än hos de hästar som var negativa på ledanestesi ($6,40 \pm 0,84$; $p=0,224$). Koncentrationen av COMP1 i serum åskådliggörs i figur 4. Serum erhöles endast från tio hästar på grund av några ägares ovilja till att deras hästar skulle lämna blodprov.



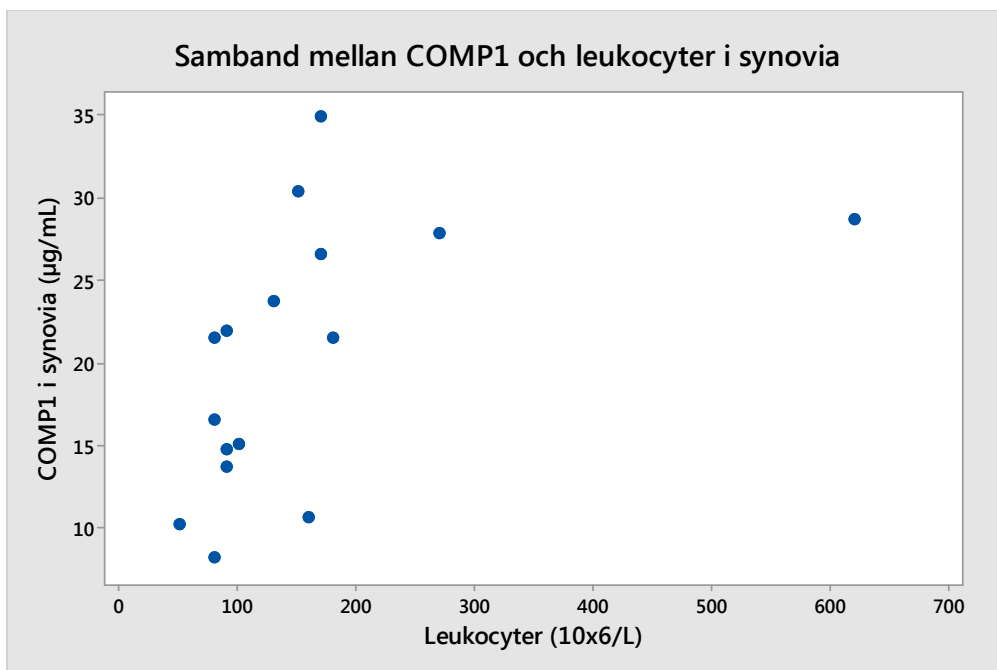
Figur 4. Uppmätta koncentrationer av COMP1 i serum hos hästar med halta leder och hästar med ohalta leder. Inkluderar både akuta och kroniska hältor. Ingen statistiskt signifikant skillnad föreligger mellan grupperna. n halta leder =5, n ohalta leder =5.

Det fanns det ingen korrelation mellan koncentrationen av COMP1 värdena i synovia och COMP1 i serum när hela gruppen undersöktes, ingen korrelation kunde heller påvisas hos hästar med positiv ledanestesi. Se figur 5.



Figur 5. Koncentrationen av COMP1 i ledvätska och serum för halta leder respektive ohalta leder ($r=-0,508$; $p=0,199$). $n=5$ i vardera grupp.

Ett samband påvisades mellan koncentrationen av COMP1 och antal leukocyter i synovia från samma led. Detta gällde oavsett om samtliga leder jämfördes eller om halta leder och ohalta leder jämfördes separat. Detta resultat visade på en måttlig korrelation och var statistiskt signifikant ($r=0,499$, $p=0,049$), se figur 6.



Figur 6. Samband mellan COMP1 och leukocyter i synovia visar på korrelation ($r=0,499$, $p=0,049$). $n=16$.

Samband mellan hältgrad på rakt spår och COMP1 i både serum och synovia undersöktes hos de hästar där hältan kunde lokaliseras till en specifik led. Ingen korrelation till hältgrad kunde påvisas, varken till synovia eller till serum. Ingen korrelation kunde heller påvisas mellan hältgraden hos övriga deltagande hästar och COMP1 i serum. Ingen korrelation mellan COMP1 och totalprotein kunde påvisas.

DISKUSSION

Syftet med studien var att undersöka om det fanns ett samband mellan höga halter av COMP1 i synovia och serum och smärta från hästar med klinisk hälta. Enligt litteraturen har leder med akuta skador högre koncentration av COMP1 än friska leder och leder med kroniska besvär (Skiöldebrand et al, 2017). Resultatet från denna studie visade att koncentrationen av COMP1 var statistiskt signifikant förhöjd i ledvätska från hästar med akut hälta (≤ 4 veckor) och där ledanestesi släckte hältan 80-100%. Dessa resultat överensstämmer med tidigare publicerat material där en statistiskt signifikant förhöjd koncentration av COMP1-fragmentet påvisades i ledvätska från akut halta hästar med sjukdomsduration <4 veckor jämfört med leder som hade kronisk eller strukturell OA (Skiöldebrand et al 2017). Våra resultat var dock beroende av om KC65 inkluderas. Det är osäkert hur länge denna häst varit halt på sitt högra framben då ägaren inte uppmärksammat hältan innan undersökning och provtagning. Det är tänkbart att det rör sig om en akut överbelastning av carpus då denna led har det högst uppmätta värdet av alla provtagna leder. Detta är givetvis spekulationer, men teorin får stöd av litteraturen (Skiöldebrand et al, 2017) där höga koncentrationer av COMP1 påvisades hos hästar med akut OA. KC65 inkluderades därför. Det kan dock inte uteslutas att det rör sig om en äldre skada. Utan KC65 förelåg fortfarande en tendens till skillnad mellan halta och ohalta leder, men den var inte längre statistiskt signifikant. Vid vidare studier bör fler hästar inkluderas för att få ett säkrare resultat.

Hältgrad, det vill säga hur halt hästen är, korrelerade inte till koncentrationen av COMP1 varken i synovia eller i serum. Detta kan bero på att det i ett tidigt skede i inflammationsprocessen skett kemiska förändringar fast hästen inte visat några symtom. Det är rimligt att misstänka att kraftigare inflammation ger en ökad frisättning av COMP1 i och med att en större skada på ledbrosket erhålls och därmed högre uppmätta koncentrationer i både synovia och serum. Det är även rimligt att kraftigare inflammation orsakar kraftigare smärta och därmed kraftigare hälta hos hästen. Detta resonemang kunde inte bekräftas med denna studie. Det är dock viktigt att komma ihåg att materialet som har studerats enbart består av få hästar och att utöka antalet hästar krävs för att dra några riktiga slutsatser. Dessutom var det sex olika veterinärer som bedömde hältgraden subjektivt hos de olika hästarna vilket kan innebära en viss bias.

Förvånande nog korrelerade inte koncentrationen av COMP1 i synovia med serumkoncentrationen av COMP1. Detta är lite motsägelsefullt då serumnivåerna ska avspegla ledernas produktion av COMP1 som sedan frisätts i cirkulationen, och de borde

därmed följas åt. Att mäta COMP1 i serum är en mindre exakt metod eftersom blodets innehåll påverkas av processer i hela kroppen, och det är därför svårt att veta säkert om ett avvikande värde beror på en inflammation i en viss led. Det kan givetvis ge en indikation på artrit, speciellt i kombination med smärta, värme, svullnad och nedsatt funktion från leden, det vill säga inflammationens kardinalsymtom. Att däremot mäta COMP i synovia borde vara en mer direkt metod för att utvärdera en misstänkt led då provet tas direkt från det aktuella området och det blir mindre risk för påverkan från resten av kroppen. Provtagning från en led innebär dock alltid en viss risk för sekundära problem i följd av septisk artrit. Detta undviks i möjligaste mån genom att ta provet med steril teknik. Enligt en retrospektiv studie gjord av Bohlin et al (abstrakt 2014) var risken minimal (1/1000) att utveckla septisk artrit om ledinjektion gjorts på ett adekvat sätt. Risken går dock inte att bortse från. Därför vore det mer praktiskt om samma information kan fås med ett blodprov. Resultatet i denna studie kan inte visa att hästar med ledskada har högre koncentrationer av COMP1 i serum än hästar med friska leder. Men inte heller här kan några säkra slutsatser dras av dess betydelse i kliniska sammanhang med tanke på ett litet provmaterial. Dessutom är det viktigt att komma ihåg att de hästar som var negativa på lagda ledanestesi trots allt var halta även om deras hältor inte kunde lokaliseras. Det är möjligt att de har en pågående artrit någon annanstans i kroppen eller en senskada som påverkar koncentrationen av COMP1 i cirkulationen. Därför vore en jämförelse med en kontrollgrupp med helt ohalta individer intressant.

Ett måttligt samband mellan COMP1 och antal leukocyter i synovia kunde påvisas i denna studie. Den var statistiskt signifikant trots det lilla provmaterialet som ingick i studien. Leukocyter i synovia avspeglar den pågående inflammationen och antalet stiger vid kraftigare inflammation. Vid osteoartit är leukocyttallet vanligen inom normalvariation eller lindrigt förhöjt beroende på hur pass aktiv synoviten är (Steel, 2008). Normal synovia hos häst innehåller lågt antal leukocyter, genomsnittligen $200 \times 10^6/L$ med övre gräns för vad som anses normalt $<500 \times 10^6/L$ (Falkenö, et al, 2016). Endast ett synoviaprov hade värden över vad som anses normalt. Detta prov kom från en led där hältan endast svarat 50-75% på ledanestesi. Vad detta samband har för betydelse är osäkert men en intressant observation.

Vid samtliga anestesi av carpus bedövades både radiocarpalled och intercarpalled vid samma tillfälle och lästes av samtidigt. Det är därför svårt att uttala sig om båda ledavdelningarna orsakar hästen smärta eller om endast en ledavdelning är påverkad. Prover har dock tagits från respektive ledavdelning och analyserats separat. I samtliga fall har de olika ledavdelningarna olika värden. En förklaring till detta kan vara att de olika ledavdelningarna har olika grad av inflammation. Radiocarpalleden och intercarpalleden kommunicerar inte direkt med varandra, men vissa molekyler exempelvis mepivacain kan diffundera från en ledavdelning till den andra (Gough et al, 2002).

Qualisys är ett bra hjälpmedel vid bedömning av hälsa då det kan fånga upp även små avvikelser. Dock ligger svårigheten med Qualisys i att systemet är så känsligt. Studier har visat att även friska hästar ofta är lite asymmetriska och dessa asymmetrier kan vara svåra att särskilja från en lindrig, smärtorsakad hälsa (abstrakt Rhodin et al, 2015). Genom att bedöva en misstänkt led och sedan genomföra en ny mätning kan förbättring observeras. Men om hästen är asymmetrisk i grunden kan det vara omöjligt att få den helt symmetrisk och därmed

svårt att uppskatta hur anestesi har tagit. Dessutom kan hästen ha fler problem än en enda led i det halta benet varvid hästen inte blir ohalt även om en affekterad led bedövas.

Möjliga felkällor är dels kopplade till att studien var för liten med för få ingående hästar, provtagning och analys av prover, samt till huruvida de inkluderade hästarnas ägare säkert kan avgöra hur länge hästarna har varit halta. Det sistnämnda beror på hur pass uppmärksamma ägaren är, hur mycket symptom hästen visar och om hästen är halt på fler ben än ett. I denna studie vet vi att åtminstone två av tidsintervallen är osäkra, möjligen fler. Vid insamling av blodprov bildades fibrinkoagel i samtliga provrör utom ett vilket medförde svårighet att avskilja serum. Vilken betydelse det har för slutresultatet är osäkert, men ett förslag är att prova använda plasma istället om fler försök görs i framtiden.

KONKLUSION

Denna studie visade att koncentrationen av COMP1 i synovia var högre i leder som orsakar smärta hos hästar med akut halta jämfört med leder som inte orsakade någon smärta hos hästar med akut halta. Skillnaden mellan grupperna var statistiskt signifikant endast om ett resultat från en led där sjukdomsdurationen var osäker inkluderades, om detta värde exkluderades var skillnaden inte längre signifikant. Koncentrationen av COMP1 i serum korrelerade inte till koncentrationen i synovia, och det förelåg ingen skillnad i koncentration av COMP1 i serum mellan hästar med halta leder och halta hästar med ohalta leder. Inget tydligt samband mellan uppmätta koncentrationer av COMP1 och håltgrad kunde påvisas. För att få en bättre uppfattning om huruvida COMP1 är en bra indikator på akut leddsmärta i samband med tidig OA bör fler hästar inkluderas i studien, samt jämföras mot en frisk kontrollgrupp.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Arai, K., Misumi, K., Carter, S. D., Shinbara, S., Fujiki, M. and Sakamoto, H. (2005). Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. *Equine Veterinary Journal*, 37(1), 31-6.
- Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*, 21(1), 16-21.
- Bohlin, A., Kristoffersen, M. and Toft., N. (2014). Infectious Arthritis Following Intra-Articular Injection in Horses Not Receiving Prophylactic Antibiotics: A Retrospective Cohort Study of 2833 Medical Records. *American Association of Equine Practitioners*, vol. 60, ss 255-256.
- Caron, J. P. (2011). Chapter 61: Osteoarthritis. I: Ross, M.W, Dyson, S.J (ed.) *Diagnosis and management of lameness in the horse*, 2nd ed. St. Louis: W.B. Saunders, ss 655-668.
- de Grauw, J. (2011). Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Veterinary Quarterly*, 31:2, 77-86.
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. 4. ed. China: Saunders.
- Falkenö, U., Hillström, A., Jones, B., Lilliehöök, I., Strage, E., Ström Holst, B. and Tvedten, H. (2016). Kompendium i klinisk kemi. Uppsala, ss 179-181.
- Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W. and de Grauw, J.C. (2016). Synovial fluid and serum biomarkers. I: I: McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C. and van Weeren, R. (ed.) *Joint disease in the horse*, 2nd ed. St. Louis: Elsevier, ss 179-191.
- Fuller, C. J., Bladon, B. M., Driver, A. J. & Barr, A. R. 2006. The intra- and inter-assessor reliability of measurement of functional outcome by lameness scoring in horses. *Veterinary Journal*, 171(2), pp 281-6.
- Goldring, M.B. and Goldring, S.R. (2007). Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3), 626-34.
- Goodrich, L. R. and Nixon, A. J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Veterinary Journal*, 171(1), 51-69.
- Gough, M. R., G. Mayhew and G. A. Munroe (2002). Diffusion of mepivacaine between adjacent synovial structures in the horse. Part 1: forelimb foot and carpus. *Equine Veterinary Journal* 34(1) 80-84.
- Keegan, K. G. (2007) Evidence-based lameness detection and quantification. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 23(2), 403-23.
- Kidd, J. A., Fuller, C. and Barr, A. R. S. (2001), Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education*, 13: 160–168.
- Krasnokutsky, S, Attur, M, Palmer, G, Samuels, J & Abramson, SB (2008), Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 16 Suppl 3, pp. 1-3
- Lohmander, L. S., Saxne, T. and Heinegard, D. K. (1994). Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53(1), 8-13.
- McIlwraith, C. W. (2005). Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Veterinary Journal*, 37(5), 473-82.

- McIlwraith, C.W. (2016). Traumatic arthritis and posttraumatic osteoarthritis in the horse. I: McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C. and van Weeren, R. (ed.) *Joint disease in the horse*, 2nd ed. St. Louis: Elsevier, ss 33-48.
- Misumi, K., Vilim, V., Clegg, P. D., Thompson, C. C. and Carter, S. D. (2001) Measurement of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in normal and diseased equine synovial fluids, *Osteoarthritis Cartilage*, 9(2), 119-27.
- Misumi, K., Vilim, V., Hatazoe, T., Murata, T., Fujiki, M., Oka, T., Sakamoto, H. and Carter, S. D. (2002). Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis. *Equine Veterinary Journal*, 34(6), 602-8.
- Mobasher, A. and Henrotin, Y. (2015). Biomarkers of (osteo)arthritis. *Biomarkers*, 20(8), 513-8.
- Pfau, T., Fiske-Jackson, A. and Rhodin, M. (2016), Quantitative assessment of gait parameters in horses: Useful for aiding clinical decision making?. *Equine Veterinary Education*, 28: 209–215.
- Poole, (2004). Cartilage in health and disease. I: Koopman, William J. Moreland, Larry W., (ed.) *Arthritis and allied conditions: A textbook of rheumatology*, 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, ss 223-270.
- Rhodin, M., Egenvall, A., Andersen, P.H. and Pfau, T. (2015), Head and Pelvic Movement Asymmetries at Trot in Riding Horses Perceived as Sound by Their Owner. *Equine Veterinary Journal*, 47: 10–11.
- Rhodin, M. (2016). Personligt meddelande. Uppsala, 2016-09-13.
- Rock, M. J., Holden, P., Horton, W. A. and Cohn, D. H. (2010). Cartilage oligomeric matrix protein promotes cell attachment via two independent mechanisms involving CD47 and alphaVbeta3 integrin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 338(1-2), 215-24.
- Sköldebrand, E., Lorenzo, P., Zunino, L., Rucklidge, G. J., Sandgren, B., Carlsten, J. and Ekman, S. (2001). Concentration of collagen, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid from equine middle carpal joints. *Equine Veterinary Journal*, 33(4), 394-402.
- Skiöldebrand, E. (2004) *Studies of articular cartilage macromolecules in the equine middle carpal joint, in joint pathology and training*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Skiöldebrand, E., Heinegård, D., Eloranta, M.L., Nilsson, G., Dudhia, J., Sandgren, B. and Ekman, S. (2005). Enhanced concentration of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in osteochondral fractures from racing Thoroughbreds. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(1), pp. 156-163.
- Sköldebrand, E., Ekman, S., MattssonHultén, L., Svala, E., Björkman, K., Lindahl, A., Lundqvist, A., Önerfjord, P., Sihlbom, C. and Rüetschi, U. (2017). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neo-epitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: A new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine Veterinary Journal*. doi: 10.1111/evj.12666
- Steel, C. M. (2008). Equine synovial fluid analysis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 24(2) 437-454, viii.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R. and Mobasher, A. (2009). The contribution of the synovium, synovial derived

- inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Veterinary Journal*, 179(1), 10-24.
- Taylor, S.E., Weaver, M.P., Pitsillides, A.A., Wheeler, B.T., Wheeler-Jones, C.P., Shaw, D.J. and Smith, R.K. (2006). Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. *Equine Veterinary Journal*, 38(6), 502-7.
- van Weeren, P.R. and de Grauw, J.C. (2010). Pain in osteoarthritis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 26(3), 619-42.
- van Weeren, P.R. (2014). Joint physiology: responses to exercise and training. I: Hinchcliff, K.W., Kaneps, A.J. and Geor, R.J. (ed.) *Equine sports medicine and surgery*, 2nd ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, ss 213-222.
- van Weeren, P.R. (2016). General principles of joint pathobiology. I: McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C. and van Weeren, R. (ed.) *Joint disease in the horse*, 2nd ed. St. Louis: Elsevier, ss 1-24.
- Yamanokuchi, K., Tagami, M., Nishimatsu, E., Shimizu, Y., Hirose, Y., Komatsu, K. and Misumi, K. (2009). Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. *Equine Veterinary Journal*, 41(1), 41-6.