



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsvetenskap

# Hyaluronsyra i ledbrosk och ledvätska i en frisk led samt vid osteoartrit hos häst

*Karolina Mörk Englund*  
*Uppsala*  
*2018*



*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2018:95*



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsvetenskap

## **Hyaluronsyra i ledbrosk och ledvätska i en frisk led samt vid osteoartrit hos häst**

Hyaluronic acid in articular cartilage and synovial fluid in healthy joints and in osteoarthritis joint in horses.

**Karolina Mörk Englund**

**Handledare:** Eva Skiöldebrand, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

**Examinator:** Maria Löfgren, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2018

**Omslagsbild:** Karolina Mörk Englund

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2018: 95  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap, SLU

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

**Nyckelord:** häst, hyaluronsyra, osteoartrit, ledinflammation,

**Key words:** horse, hyaluronic acid, osteoarthritis, joint disease



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>SAMMANFATTNING</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>2</b>
<b>INLEDNING</b> .....	<b>3</b>
<b>MATERIAL OCH METODER</b> .....	<b>4</b>
<b>LITTERATURÖVERSIKT</b> .....	<b>4</b>
<b>Synovialledens anatomi och fysiologi</b> .....	<b>4</b>
<b>Ledvätska och ledkapsel</b> .....	<b>5</b>
<b>Specialiserade strukturer i en led</b> .....	<b>6</b>
<b>Hyalint ledbrosk</b> .....	<b>7</b>
Extra Cellulärt Matrix (ECM).....	8
COMP (Thrombospondin 5).....	8
Aggrekan.....	9
<b>Subkondralt ben</b> .....	<b>10</b>
<b>Osteoartrit</b> .....	<b>10</b>
Inflammationsmediatorer.....	10
Inflammationens påverkan på ledbroskets extracellulära matrix molekyler.....	11
<b>Hyaluronsyra</b> .....	<b>13</b>
Hyaluronsyra i en frisk led.....	13
Hyaluronsyra vid osteoartrit.....	14
Hyaluronsyrans antiinflammatoriska roll.....	14
Hyaluronsyrans molekylvikt och dess effekt i leden.....	15
Högmolekylärvikt hyaluronsyra (HMWHA).....	15
Lågmolekylärvikt hyaluronsyra (LMWHA).....	15
Behandling med hyaluronsyra vid osteoartrit hos häst.....	16
<b>DISKUSSION</b> .....	<b>17</b>
<b>REFERENSLISTA</b> .....	<b>19</b>



## **SAMMANFATTNING**

Hälta är idag den vanligaste orsaken till att hästägare uppsöker veterinär med sina hästar. Många av dessa hästar får diagnosen osteoartrit. Osteoartrit är en kronisk låg-gradig inflammatorisk sjukdom som leder till en obalans mellan uppbyggande och nerbrytande processer i leden. En av beståndsdelarna i det extracellulära matrixet är hyaluronsyra, som även förekommer naturligt i hög koncentration i ledvätskan hos hästen.

Uppsatsen utgår från frågeställningar gällande hyaluronsyrans betydelse i ledbrosk och ledvätska i en frisk led, samt i en osteoartrit led hos häst. Vidare görs försök att fastställa betydelsen av hyaluronsyrans molekylvikt vid inflammation i leden samt när den används som behandlingsterapi vid hälta.

Hyaluronsyra bildas av celler i ledkapseln och ledbrosket. För den normala ledens funktion spelar dessa celler en viktig biologisk roll. Ledbrosket och ledkapseln har visat sig vara beroende av hyaluronsyras närvaro, som tillsammans med proteinet lubricin smörjer ledbrosket och ledkapseln vid belastning. Hyaluronsyran verkar också stötdämpande för ledens alla strukturer vid belastning, och spelar även en viktig roll vid utbyte av näringsämnen och avfallsprodukter till och från leden.

När det uppstår en ledinflammation, osteoartrit, startar processen oftast i ledkapseln och resulterar så småningom till en progressiv nedbrytning av ledens strukturer. Makroskopiskt ses även broskskador, förtjockning med fibrösa villi av ledkapseln och en tunnflytande ledvätska. Det kan även bildas benpålagringar i olika delar av leden, som oftast är ett tecken på att skadan är irreversibel.

Högmolekylär hyaluronsyra (HMWHA) har en antiinflammatorisk effekt och kan även ha en viss hättlindrande effekt. Detta sker bland annat genom att inflammationsceller, mediatorer och cytokiner inhiberas och att uttryck och signalvägar för TLR-4 (toll-like receptor) motverkas och döljs. Vid en inflammation i ledvätskan och i brosket fragmenteras hyaluronsyran till mindre fragment och kan inducera en inflammation genom att binda till TLR-4.

## **SUMMARY**

Lameness is the most common reason why horse owners seek veterinary assistance. Many of these horses are diagnosed with osteoarthritis. In osteoarthritis, the balance between cartilage matrix synthesis and degradation is disturbed, resulting in a gradual destruction of articular cartilage.

The aim of this literature study, was to determine the importance of hyaluronic acid in synovial fluid and the articular cartilage. The importance of the hyaluronic acid's molecule weight and its impact on inflammation and analgesic effect was also studied.

Hyaluronic acid is an important component in the extracellular matrix. It naturally occurs in high concentrations within synovial fluid and articular cartilage. Hyaluronic acid is synthesized by cells within the joint-capsule and by the chondrocytes in articular cartilage.

Within the joint, the hyaluronic acid has several important biological functions. It lubricates the articular cartilage and the joint-capsule. It also has anti-inflammatory and analgesic effects and plays an important role in the metabolism of several nutrients and waste-products that are transported throughout the cartilage.

When a disease, such as osteoarthritis occurs, it leads to a progressive degradation of the articular cartilage. This in turn will thicken the joint-capsule and lead to an inflammatory response within the joint and the synovial fluid. In chronic disease, this may also lead to new bone formation within the joint. After some time with progressing inflammation, irreversible injuries occur. That is why inflammation needs to be controlled and stopped in time.

High molecular weight hyaluronan (HMWHA) also has an anti-inflammatory properties and might have analgesic effect. This is carried out by inhibiting inflammatory cells, mediators, and cytokines as well as preventing expression of TLR-4 (toll-like receptor) and their downstream signalling. When inflammation occurs in the synovial fluid and the articular cartilage, small fragments of hyaluronic acid can induce inflammation by binding TLR-4.

## INLEDNING

Osteoartrit är ett vanligt förekommande problem och orsakar hälta hos häst (Robinson & Sprayberry, 2009). Många gånger ger sjukdomen en långdragen och permanent hälta som gör att hästarnas karriär måste avslutas. Det finns många olika faktorer som kan initiera osteoartrit. Exempel på dessa är överbelastning, traumatiska skador, sepsis eller andra träningsrelaterade skador i form av mikrotrauman, som ger upphov till osmotisk och mekanisk stress. Detta leder till att det blir en inflammation i hästens led. Träningsrelaterade skador anses vara den vanligaste orsaken till osteoartrit hos häst (Ross & Dyson, 2003). Osteoartrit har många olika benämningar och synonymer, såsom artrit, artros och osteoartros, där likartade förändringar i en led kan ses. Idag benämns alla dessa typer av förändringar som osteoartrit.

Hästens led måste tåla kompression, sträckning, böjning, vridmoment och att två ledavdelningar dras ifrån varandra. För att klara av denna belastning behöver leden hjälp av omgivande strukturer det vill säga ligament, muskler och senor (Ross & Dyson, 2003). Andra viktiga komponenter, som bidrar till ledens hållfasthet, är broskets innehåll av olika typer av kollagen och proteoglykaner såsom aggregkan, hyaluronsyra m.fl.

Hyaluronsyra har god förmåga att binda och behålla vatten. Denna egenskap ger ledvätskan dess utpräglade viscoelastisitet och är grunden för synovialvätskans stötdämpande egenskaper (Barzacchiello *et al.*, 2007).

Osteoartrit innebär att sjukdomen kan involvera alla strukturer i leden. De patologiska fynd man kan finna är broskdegeneration, synovit, subkondral benskleros (förtätning av benet) och i vissa fall osteofyter (nybildningar av ben och brosk) (Kidd *et al.*, 2001). Även ödem i brosket är ett fynd som kan ses vid tidig osteoartrit (Heingård & Saxne, 2010). Tidiga tecken på osteoartrit är ackumulation av ledvätska (Robinson & Sprayberry, 2009). Inflammation verkar vara ett tydligt inslag i osteoartrit och den är troligen framkallad av en initial traumatisk skada, se ovan. De nedbrytande processerna aktiveras framförallt via inflammatoriska cytokiner så som IL-1, IL-18 och TNF-*alfa* (Trumble TN *et al.*, 2001). Vid osteoartrit bryts hyaluronsyra ner av hyaluronidaser till mindre fragment. Ledvätskan kan på grund av detta inte binda till lubricin och blir mer tunnflytande. De mindre fragmenten påverkar även den inflammatoriska signalen via toll-likareceptorer (TLR) (Litwiniuk *et al.*, 2016).

Dessa komponenter beskrivs i litteraturöversikten nedan och extra vikt kommer läggas vid hyaluronsyrans roll i led hos häst. Syftet med denna litteraturöversikt är att försöka besvara frågeställningar gällande hyaluronsyrans betydelse i ledbrosk och ledvätska i en frisk led, samt i en osteoartritled hos häst. Vidare görs försök att fastställa betydelsen av hyaluronsyrans molekylvikt vid inflammation i leden samt när den används som behandlingsterapi vid hälta.



## **MATERIAL OCH METODER**

Databaserna som använts i sökandet av artiklar inkluderar Pubmed, Web of knowledge och Google Scholar. Följande sökord har använts separat, eller i kombination: horse OR häst OR equine, osteoarthritis OR joint disease AND hyaluronic acid (HA), training OR exercise, arthritis OR osteoarthritis, hyaluronan AND chondrocytes AND molecular weight AND cartilage samt synovial fluid (SF) AND hyaluronic acid AND molecular weight OR synovitis AND kapsulit.

Även översiktsartiklar och vissa webbsidor, exempelvis Läkemedelsverkets hemsida, har använts för att få en övergripande bakgrundsinformation om ämnesområdet.

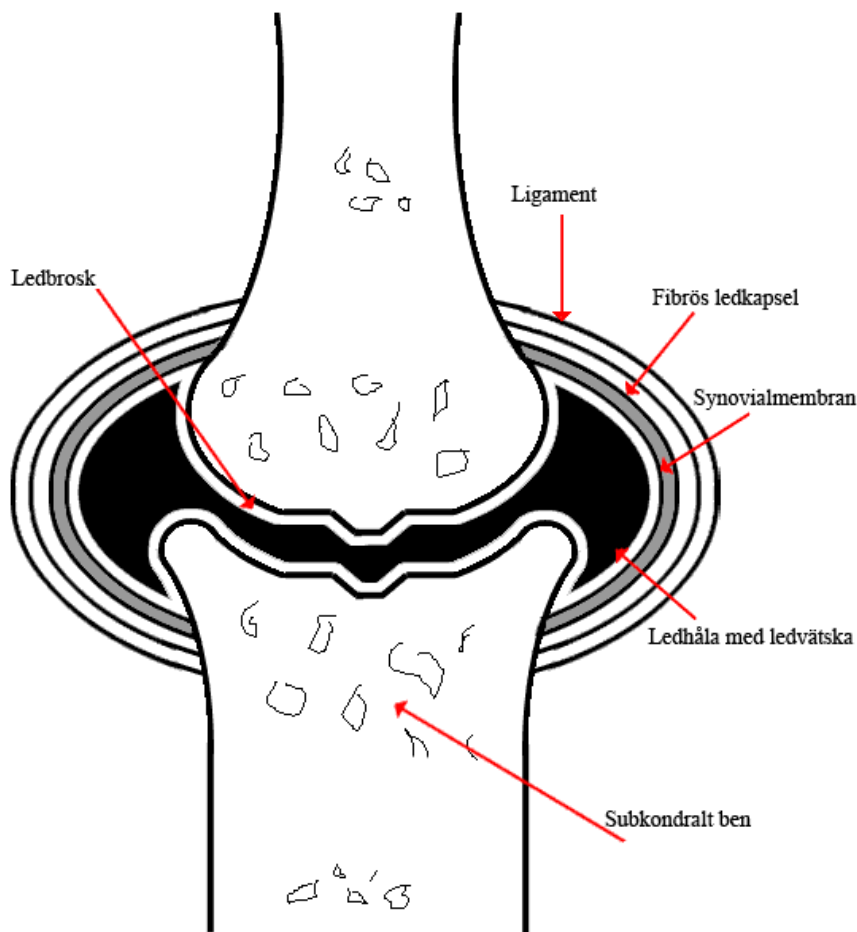
En artikel från tidningen Equilibris, en populärvetenskaplig tidskrift har använts. Övriga litterära källor är Diagnosis and Management of Lameness in the Horse och Current therapy in equine medicine och Veterinary Journals hemsida.

## **LITTERATURÖVERSIKT**

### ***Synovialledens anatomi och fysiologi***

För att förstå hyaluronsyrans roll är det viktigt att ha kunskap om och förstå synovialledens konstruktion och fysiologi. En led har två viktiga funktioner, att möjliggöra rörelse samt att ta emot och dämpa den belastning som kommer från rörelseapparaten. En frisk och normal ledfunktion medför att en rörelse sker smärtfritt och på ett energieffektivt sätt.

Alla synovialleder är uppbyggda av ett synovialmembran, som klär ledkapselns insida, ledbrosk och subkondralt ben. Utöver detta består olika leder av olika komponenter såsom ligament, korsband, menisker m.fl. Olika leder består av olika många ledavdelningar, som alla innehåller ledvätska. Dessa kan i olika utsträckning kommunicera med varandra, samt i vissa fall inte kommunicera överhuvudtaget (McIlwraith & Trotter, 1996).



Figur 1. Ledens uppbyggnad (Mörk Englund, 2012)

### **Ledvätska och ledkapsel**

Ett ultrafiltrat av blodplasman utgör ledvätskans komponenter. De flesta joner och molekyler finns redan i blodplasman, med undantag av hyaluronsyran som bildas av kondrocyter och synovicyter. Ledvätskan hjälper till med metabolismen i leden, minskar friktionen vid rörelse och verkar stötdämpande. (McIlwraith och Trotter, 1996). Ledkapseln är en vaskulär bindvävstruktur som i vissa leder även innehåller fettväv. Den linjeras av ett subsynovialmembran och ett synovialmembran, som i sin tur står i kontakt med ledvätskan (se figur 1).

Synovialmembranet är mellan en till tre cellager tjockt och täcker insidan av ledkapseln. Ledkapseln omsluter leden men täcker inte ledbrosket, som utgör ledytan över det subkondrala benet (McIlwraith & Trotter, 1996). Synovialmembranet har inte samma uppbyggnad i hela leden. På platser som varit predisponerade för olika typer av trauman har det ersatts av tät bindväv.

Subsynovialmembranet är linjerat med tre typer av synovicyter: typ A (makrofagtyp), typ B (fibroblastyp) och typ C, som är ett mellanting mellan typ A och typ B. Den vanligaste är typen är typ B-celler som syntetiserar makromolekyler i form av kollagen och hyaluronsyra.

Viskositeten beror till stor del på koncentrationen och graden av polymerisering av hyaluronsyra, dvs. sammanfogning till korta eller längre sockerkedjor (Ross & Dyson, 2003). Blodkärlens endotel förhindrar stora molekyler att lämna de synoviala kapillärerna. Den synoviala permeabiliteten för små molekyler begränsas av "tight junctions" mellan synovicyterna. Den påverkas även av sammansättningen av det extracellulära matrixet. Molekyler som är mindre än 10 kDa passerar via diffusion mellan ledvätskan och plasman. Vid inflammation i ledkapseln ökar led-blod barriären sin genomsläpplighet för större molekyler. (Mellwraith & Trotter, 1996)

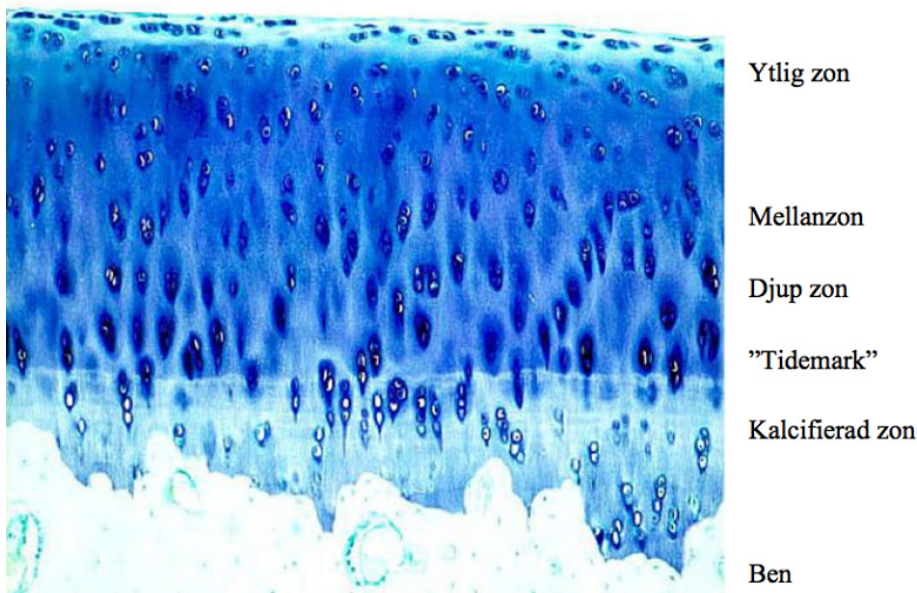
Lubricin är viktigt för reologin av ledvätskan. Det är ett hyaluronsyra-bindande protein som finns i ledvätska och i ledbroskets ytceller. Hyaluronsyra och proteinets interaktioner samverkar för ledens "boundary"-smörjning under tryckpåverkan (Mellwraith och Trotter, 1996).

### **Specialiserade strukturer i en led**

Bursor, senskidor och leder har generellt samma uppbyggnad. Alla är kapselstrukturer och innehåller ledvätska som producerats av de celler som linjerar insidan av kapseln. En led är en högt differentierad struktur. Den är sammansatt av olika typer av bindvävsstrukturer inkluderat ben, ledbrosk och periartikulär mjukvävnad. Alla dessa strukturer samverkar för en normal ledfunktion och genomgår en deformation och en metabolisk förändring när de påverkas av sjukdom i form av t. ex osteoartrit. Då uppstår degenerativa förändringar och en fortlöpande förlust av brosk (Ross & Dyson, 2003).

## Hyalint ledbrosk

Ledbrosket är avaskulärt och saknar lymfkärl och nerver. Det får sin näring via synovian. (Caron, 2011) Den friska ledytan är utformad av hyalint brosk, som är genomskinligt och glansigt och täcker det subkondrala benet. Hyalint brosk har ett högt vatteninnehåll och består av ett fint kollagent fibrillnätverk (McIlwraith & Trotter, 1996). Ledbrosk består av kondrocyter och rikligt med extra cellulär matrix (ECM) som tillverkas av kondrocyterna som innehåller vatten, kollagen (framförallt kollagen typ II), proteoglykaner och icke kollagena matrixproteiner (McIlwraith *et al.*, 2015). Kondrocyter upptar ca 5 % av det hyalina ledbrosket. Den primära funktionen hos kondrocyterna är att upprätthålla broskets extracellulära matrix. Den påverkar leden genom att vid behov producera eller bryta ner extracellulär matrix (Knudson, 2003). Kondrocyterna i brosket är uppdelade i fyra zoner med strukturella skillnader i matrixkompositionen:



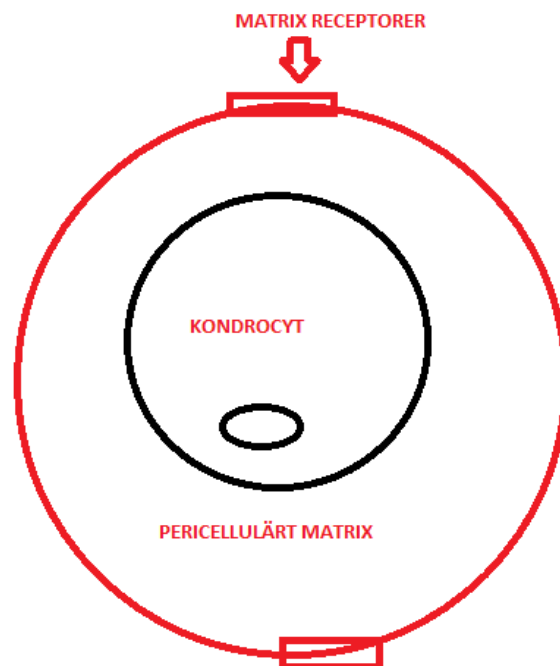
Figur 2. Ledbroskets lager (Skiöldebrand, 2012).

1. En ytlig zon i vilken cellerna är arrangerade parallellt med ledytan.
2. En mellanzon där cellerna är rundare och finns mer utspridda.
3. En djup zon där cellerna är arrangerade i kolumner.
4. "Tidemark"
5. En kalcifierad zon där cellerna är täckta med hydroxyapatitkristaller som innehåller både kalcium och fosfat.

De två senare zonerna separeras med en oregelbunden avgränsning som kallas "tidemark", det vill säga avgränsning mellan oförkalkat och förkalkat brosk (Figur 2). Kondrocyternas antal varierar både med djupet på brosket och med den makromolekylära kompositionen som omger kondrocyterna (Ross & Dyson, 2003). Vid normal mekanisk belastning hinner ledbrosket med att anpassa sig. En normal belastningen innebär alltså att det sker en näringsförsörjning till kondrocyterna och att syntes av matrixmolekyler äger rum.

### Extra Cellulärt Matrix (ECM)

ECM innehåller aggrekan och kollagen typ II fibriller. Kollagen är huvudproteinet i ledbroskets extracellulära matrix. Kollagen typ II bildar nätverk av fibriller och fibrer som ger ledbrösket och dess dragfasthet och elasticitet, samt förankrar aggrekan och andra proteiner i vävnaden. Till de mindre molekylerna i ledbröskets ECM räknas bland annat COMP (cartilage oligometric matrix protein), biglykan, decorin, kollagen VI, IX, X samt fibronectin (Ross & Dyson, 2003).



Figur 3. Schematisk bild över kondrocyten och omgivande matrix. På cellytan är matrixreceptorer länkade till cellernas inre. Metabolism och grad av differentiering, form och många andra egenskaper beror på kompositionen av matrix. förlaga (Knudson, 2003)

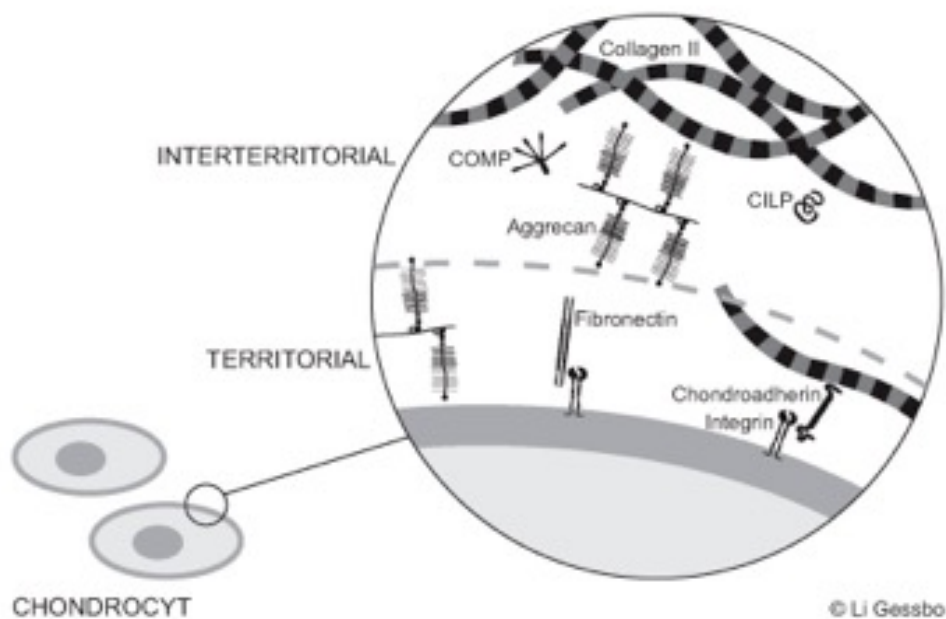
### COMP (Thrombospondin 5)

Cartilage oligometric matrix protein (COMP) är ett ickekollagent protein. Det är strukturellt uppbyggt med fem armar som kan integrera och binda till fem kollagenmolekyler samtidigt. Bäst bindningsförmåga har kollagen typ II och typ I. Tidigt i osteoartrit är produktionen av COMP hög samtidigt som produktionen av prokollagen är låg. Orsaken till detta är att COMP agerar som en katalysator för att bygga upp och utforma den kollagena fiberformationen. Skillnaden i ökning av COMP, i förhållande till kollagenproduktionen vid tidig osteoartrit, kan leda till en försämrad kollagenfiberstruktur och en försämrad läkningsprocess (Heingård, 2009).

### Aggrekan

Aggrekan, som är den huvudsakliga proteoglykanen i ledbrosk, innehåller glukosaminoglukanerna, kondroitinsulfat och keratansulfat. Båda bidrar till en ändring i det extracellulära matrixets densitet. Via sin stora negativa laddning attraherar aggrekan anjoner, vilket skapar en osmotisk effekt som i sin tur leder till att vatten hålls kvar i brosket. På grund av denna egenskap är aggrekan den molekyl som ger ledbrosk dess stötdämpande förmåga. Den utrustar också ledbrosket med dess vikt bärande egenskaper (Kiani *et al.*, 2002).

Aggrekan bildas intracellulärt, men skickas ut extracellulärt för att där binda till hyaluronsyra. Hyaluronsyra är i sin tur bundet till molekyler som fäster till cellytan. På så sätt kan det bildas stora molekyllära enheter som kan interagera med andra delar i matrix (Heinegård, 2009). Aggrekan är således viktig för att mediera interaktioner mellan kondrocyter mellan matrix och kondrocyter och genom sin förmåga att binda till hyaluronsyra (Kiani *et al.*, 2002).



Figur 4. "Matrix komponenter i artikulärt brosk "

### **Subkondralt ben**

Subkondrala benet har en viktig roll i ledens arbete genom att ta emot och omvandla mekaniska krafter. Det subkondrala benet länkas ihop med leden via den kalcifierade broskzonen.

Ben kan stå emot relativt höga belastningar på grund av sin höga sammansättning av mineraler. Ben består till 65 % av mineralen hydroxyapatit, 25 % vatten och resterande 10 % består av kollagen typ I, protoglykaner samt andra proteiner. Subkondralt ben är histologiskt och biokemiskt likt andra ben i kroppen, men tillväxtplattan är tunnare och har en annan lokalisering. Den finns parallellt med den longitudinella axeln på benet. Benet genomgår hela tiden en bennybildning med osteoklaster, som bryter ner benet och osteoblaster, som bygger upp det igen (Mellwraith & Trotter, 1996).

### **Osteoartrit**

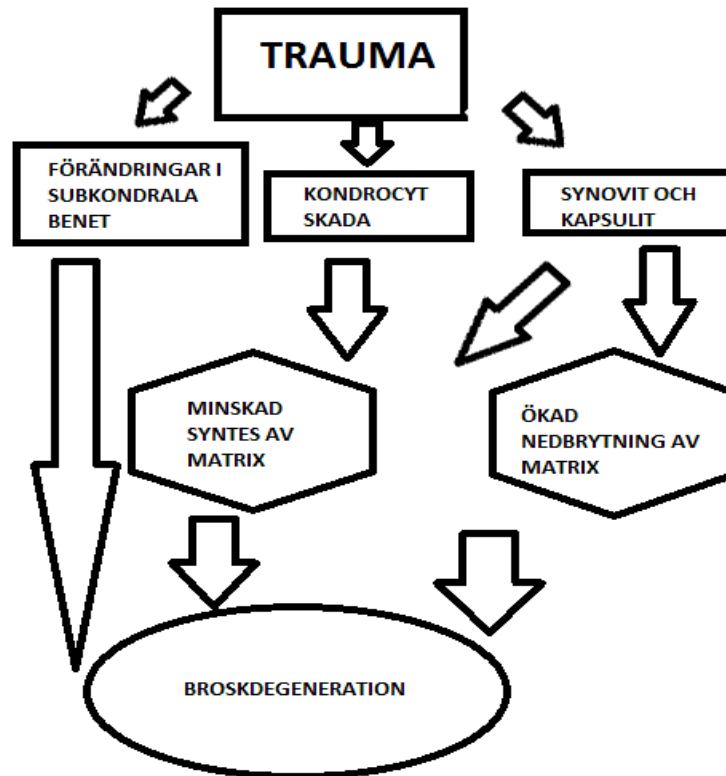
#### *Inflammationsmediatorer*

Vid en mekanisk belastning ökar kondrocyterna produktionen av inflammatoriska cytokiner och matrixdegenererade proteaser (MMP). Den katabola nedbrytningen i hästens led, vid osteoartrit aktiveras via ett flertal inflammatoriska cytokiner såsom IL-1, IL-18 och TNF-alfa där IL-1 beta är den viktigaste (Gally RH, 1986). Det är oftast en kapsulit eller synovit som föranleder enzymfrisättningen. Synovocyterna fagocyterar kollagena fibrer och delar av protoglykaner som gått sönder (Mellwraith & Trotter, 1996).

Vid inflammation frisätts nedbrytande enzymer som i sin tur orsakar broskdegeneration. Dessa enzymer bryter ner proteoglykaner (aggrekanaser), kollagen (kollagenaser) och matrix (matrixmetalloproteinaser (MMP)-1). Det finns olika typer av MMP som frisätts som proenzymer och aktiveras genom klyvning (Mellwraith & Trotter, 1996).

Inaktiva och aktiva enzymer kontrolleras via olika inhibitorer, som i sin tur regleras via TGF-beta transforming growth factor. De viktigaste inhibitorerna är TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) och PA (plasminogen activator inhibitor-1). Faktorer som kan stimulera en anabol verkan i ledens brosk är bland annat TGF-beta och IGF-1 (insuline growth factor).

I en skadad led kan en försämrad anabol effekt påvisas hos kondrocyterna. Att upprätthålla balansen mellan anabola och katabola reaktioner är viktigt för att undvika broskförlust och upprätthålla homeostasen i leden (Gally RH, 1998).



Figur 5. Hur trauma kan leda till broskdegeneration tecknad av Mörk Englund,(2012) efter förlaga (Kidd et al., 2001).

#### *Inflammationens påverkan på ledbroskets extracellulära matrix molekyler*

Inflammation är en tidig och persisterande händelse som sänker ledens motståndskraft mot mekanisk stress. Eftersom inflammationen verkar uppstå tidigt i osteoartrit är den troligen initierad av en traumatisk skada. Cytokiner och andra signalsubstanser, som produceras vid en inflammation, gör att den katabola processen ökar eller gör att cellerna i ledvävnaderna förändras. Detta leder till vidare förstörelse av ledens vävnader som därmed uppvisar sämre motståndskraft vid tryck. Det uppstår en ond cirkel vilket leder till att inflammationen påskyndar nedbrytningen av ledens strukturer (Heinegård & Saxne, 2010).

De tidigaste skadorna i ledbrosket karaktäriseras av proteoglykanförlust samt ändring av fibrillerna i kollagenet i den ytliga zonen. Vid vidare degeneration fortlöper nedbrytning av kollagenfibriller. När ledbrosket utsätts för trauma eller belastning påverkar detta kondrocyterna genom stress. Denna stress kan verka osmotisk eller mekanisk, vilket leder till en förändring i broskets metabolism (McIlwraith & Trotter, 1996). Cytokiner reglerar jämvikten i matrix genom att påverka broskcellernas tillverkning av matrixmolekyler, t.ex. hyaluronsyra och via nedbrytningen av brosk. På så sätt hålls anabola och katabola processer i jämvikt hos en frisk led (Ley och Ekman, 2008).

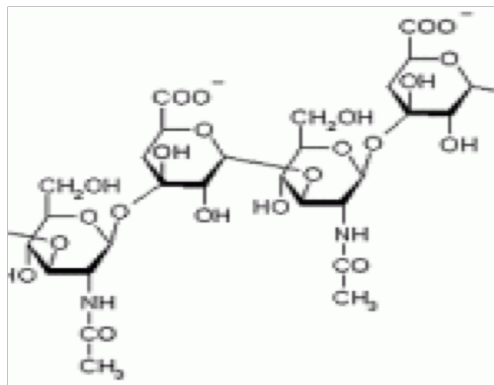


Inflammation, och dess mediatorer har direkt effekt på cellerna i synovialleden och på kondrocyterna i ledbrusket. Den får dem att producera katabola cytokiner såsom IL-1. Ökad nedbrytning via proteinerna leder både till förstörelse av ledbrusk och till en försämrad reparationsförmåga av ledbrusket. Fragment av nedbrutna broskmolekyler kan bidra till inflammation och kan leda till en reaktion av immunförsvaret. Matrixmolekylen COMP är ett exempel på en molekyl som kan inducera inflammation genom att stimulera och aktivera immunförsvaret via en komplementkaskad (Heinegård & Saxne, 2010).

Särskilt intressant enligt Heinegård och Saxne, är att inflammationen kan drivas av lösa fragment och molekyler från nedbrytningen av brosket, via det medfödda immunförsvarets respons till dessa. Inflammation kan förvärras via de fragment som bildas vid nedbrytning. Det kan vara aktiva fragment som kan aktivera eller påskynda inflammationen och öka produktion av kataboliska cytokiner samt aktivera ytterligare vävnadsnedbrytning (Heinegård & Saxne, 2010).

## Hyaluronsyra

Hyaluronsyra (HA) finns naturligt i både ledbrosk och ledvätska och syntetiseras av både kondrocyter och synovicyter (Balazs *et al.*, 1984). Hyaluronsyra tillhör familjen glukosaminoglykaner (GAGs) som är en huvudkomponenterna i det extracellulära matrixet (ECM) (Litwiniuk *et al.*, 2016). Hyaluronsyra är en polysackarid uppbyggd av en disackaridstruktur bestående av monosackariden, D-glukaronsyra och N-acetyl-D-glukosamin hopkedjade med glykosidbindningar i långa kedjor bestående av tio- till tolv tusen disackarider (Figur 6).



Figur 6. Hyaluronsyrans kemiska uppbyggnad

Hyaluronsyra i fysiologisk miljö där molekylen är positivt laddad, kallas hyaluronan. När molekylen är sammansatt med attraherade katjoner kallas den istället för hyaluronsyra (Balazs *et al.*, 1984). Hyaluronan binder till kondrocyter via CD44, som är en glykoproteinreceptor. Den sitter på cellytan och är transmembranös med många biologiska funktioner varav två av de viktigaste är att behålla strukturen hos det extracellulära matrixet och att reglera kondrocyttillverkningen. Utöver detta har den även egenskaper som reglerar celladhesion, tumörcellsmetastasering, endocytos och cellsignalering. CD44 är den huvudsakliga receptorn för matrixmolekylen hyaluronan som mediterar både cell-matrix kontakt och cell-cell kontakter (Knudson, 2003).

### Hyaluronsyra i en frisk led

Hyaluronsyra har en extraordinär förmåga att binda och behålla vatten. Denna egenskap, samt dess förmåga att få angränsande molekyler att överlappa varandra, gör att det formas ett nätverk i ledvätskan. Det är detta nätverk som ger ledvätskan dess utpräglade viscoelastisitet. Viskoelasticiteten utgör grunden för synovialvätskans stötdämpande egenskaper (Barzacchiello *et al.*, 2007). Ledbroskets smörjning och tjockleken hos ledvätskan beror på närvaro av hyaluronsyra och dess proteinbindning till lubricin (Knudson, 2003).

Hyaluronsyra är en viktig komponent i både ledvätska och ledbrosk (McIlwraith & Trotter, 1996). Den är identifierad i många fysiologiska och patologiska processer. De flesta av dessa processer är medierade via interaktionen mellan hyaluronsyra och CD44-receptorer. Hyaluronsyra är en också en viktig komponent i normal synovialvätska och är viktig för

synovialledens homeostas (Wang, 2006). En häst med normal ledfunktion har cirka 0,5 mg/ml hyaluronsyra i sin ledvätska. Endogen hyaluronsyra syntetiseras via synovicyterna i synovialmembranet och den hyaluronsyra som finns i ledbroskets matrix av kondrocyterna på plats (McIlwraith & Trotter, 1996). Normalt har hyaluronsyran i ledvätska en molekylvikt på 2 till 10 M Da (Antonacciet *et al.*, 2012).

Produktion av hyaluronsyra som syntetiseras i plasmamembranet, katalyseras av ett enzym, hyaluronansyntas och transporteras till ledvätskan via elongering. Den största delen av hyaluronsyran i brosket finns bunden till molekylen aggregan. Hyaluronsyran som produceras av synoviterna gör att ledvätskan viskös vilket ger leden en stötdämpande funktion vid rörelse (McIlwraith *et al.*, 2015). Hyaluronsyra är den enda glykosaminoglykanen som inte är sulfaterad och inte har ett kärnprotein. Hyaluronsyra kedjas ihop till längre molekyler med hjälp av UDP (uridin-difosfat). Hyaluronsyra i matrix utgör ett skikt av molekyler, ju mer koncentrerad den är i matrixet desto mer inhiberar den diffusionen (McIlwraith & Trotter, 1996). Hyaluronsyra tar sig från leden via lymfsystemet och tas till stor del omhand i levern och degraderas och elimineras där. Även lokalt i leden har det visat sig att ledvävnad tar hand om en del av degraderingen, men inte inne i ledhålan (McIlwraith & Trotter, 1996).

#### *Hyaluronsyra vid osteoartrit*

Vid osteoartrit minskar synovialvätskans viscoelastiska kapacitet, dvs hur tjock och trögflytande vätskan är pga av att molekylen bryts ned och fragmenteras. Barzacchiello *et al.*, (2007) visade att minskning av synovialvätska kan vara accelererande och resultera i vidare lednedbrytning och utveckling av kliniska tecken. Vid osteoartrit är både koncentrationen och molekylvikten hos den endogena hyaluronsyran minskad (Wang, 2006). Osteoartrit leder till att hyaluronsyran bryts ner av hyaluronidaser till mindre fragment, ledvätskan blir tunnflytande och kan inte binda sig till lubricin. Detta påverkar också den inflammatoriska signalen via TLR (toll-like receptor). (Litwiniuk *et al.*, 2016).

#### *Hyaluronsyrans antiinflammatoriska roll*

Högmolekylr hyaluronsyra har en antiinflammatorisk effekt, vilket har visats i flera *in vitro* studier. Bland annat har den visat sig hämma kemotaxis av granulocyter och makrofager och minska deras kapacitet att fagocytera. Även migrering av lymfocyter hämmas, vilket ger en minskning av skadliga kemiska ämnen i leden, som i sin tur leder till att inflammationen motverkas (Howard & McIlwraith, 1996).

Hyaluronsyra kan skydda sin egen existens genom att eliminera fria radikaler, exempelvis kväveoxid. En annan verkningsmekanism hos hyaluronsyra är att hämma produktionen av PGF-2. Denna mekanism kan minska uppkomsten av granulationsvävnad och fibros vid läkning av skada (Howard & McIlwraith, 1996).

### *Hyaluronsyrans molekylvikt och dess effekt i leden*

Hyaluronsyrans egenskaper påverkas av molekylvikten. Egenskaperna kan delas in i biokemiska, biofysiska och cellulära (Balazs, 2003). En hög molekylvikt verkar ge bättre viskositet och därmed bättre biofysiologiska egenskaper såsom ökad stötdämpande förmåga (Balazs, 2003). Hyaluronsyra med låg molekylvikt verkar däremot ge bättre cellulära egenskaper, såsom påverkan på kondrocyter och synovicyter. Små fragment av hyaluronsyra med låg molekylvikt kan också initiera inflammation (Litwiniuk *et al.*, 2016).

Många av egenskaperna är beroende av koncentrationen och molekylvikten hos hyaluronsyra. Det har visats i studier att hyaluronsyra även har andra viktiga uppgifter såsom kemotaktiska, proliferation och fagocyterande påverkan på diverse inflammatoriska celler. Den reglerar också oxidativ skada och inhiberar protoglykaner i brosk. Viskositeten är en funktion av koncentrationen och graden av polymerisering av hyaluronsyra. En minskning i viskositet är ofta, men inte alltid, noterbart vid osteoartrit (Tulamo, *et al.*, 1994).

Vid ett försök med behandling av såväl inflammerad led som frisk led studerades skillnaden mellan låg- och högmolekylär hyaluronsyra ur ett hältreducerande perspektiv. Resultatet blev att ett preparat med hög molekylvikt hade störst effekt på nervimpulser i leden. Sammanfattningsvis visade studien att molekylvikten var av betydelse (Balazs, 2003).

### *Högmolekylärvikt hyaluronsyra (HMWHA)*

Hyaluronsyra är i sin ursprungliga form en väldigt lång polymer av högmolekylär hyaluronsyra (Litwiniuk *et al.*, 2016). Den utgör en väsentlig del av ledvätskan och reglerar många patologiska och fysiologiska mekanismer (Tulamo, *et al.* 1994). Det är visat att HMWHA spelar en antiinflammatorisk roll. Den antiinflammatoriska potentialen av HMWHA är väldokumenterad när det gäller osteoartrit (Litwiniuk *et al.*, 2016). HMWHA har visat sig inhibera uttrycket av IL-1 $\beta$  i synoviocyterna hos kanin samt IL-1 beroende uttryck av MMP-1 och MMP-3 hos människa. HMWHA kan genom sin struktur dölja TLR-2 (toll-like receptor) och TLR-4 och därigenom motverka stimulering av dessa receptorer. Intra-artikulär injektion med HMWHA används därför vid behandling av osteoartrit (Litwiniuk *et al.*, 2016).

### *Lågmolekylärvikt hyaluronsyra (LMWHA)*

Vid inflammation kan HMWHA brytas ner och bilda små fragment, LMWHA. Endogena LMWHA räknas till DAMP (damage associated molecular patterns). När LMWHA bildas kan dessa kännas igen via TLR-2 och TLR-4 av dendritiska celler och makrofager. På så vis kan LMWHA inducera inflammation. Övrig forskning har visat att LMWHA ökar produktionen av flera cytokiner, MMP-12, Plasma activator inhibitor-1, IL-8 och IL-1 som leder till inflammation (Litwiniuk *et al.*, 2016).

### *Behandling med hyaluronsyra vid osteoartrit hos häst*

Hyaluronsyra används idag vid behandling av osteoartrit, både intra-artikulärt och intravenöst. Det finns även preparat som kan ges oralt till hästen. En ökad mängd endogen hyaluronsyra, producerad av synovicyter, har setts efter injektion med hyaluronsyra. Trots den korta halveringstiden vid påverkad led så hinner synovialmembranet reagera, hyaluronsyra verkar därmed antiinflammatoriskt och utövar sin effekt direkt på leukocyternas cellreceptorer (McIlwraith och Trotter,1996). Det har bevisats att håltgraden minskar med behandling av exogen intra-artikulär hyaluronsyra vid osteoartrit hos häst (Niemelä *et al.*,2016). I en frisk injicerad led är halveringstiden 96 timmar. Vid ledsjukdom minskas denna tid (McIlwraith & Trotter,1996). Systemiskt administrerad hyaluronsyra tycks lindra hälta hos hästar genom att den då interagerar med synovicyter. Detta minskar också frisläppningen och produktionen av inflammatoriska mediatorer (Kawack *et al.*, 1997).

## DISKUSSION

Denna litteraturstudie har för avsikt att redogöra hyaluronsyrans roll i led hos häst. Den besvarar frågeställningar gällande hyaluronsyrans betydelse i ledbrosk och ledvätska i en frisk led, samt i en osteoartrit led hos häst. Vidare görs försök att fastställa betydelsen av hyaluronsyrans molekylvikt vid inflammation i leden samt när den används som behandlingsterapi vid hälta.

Osteoartrit är en sjukdom med hög prevalens. Den leder till hälta och är den vanligaste orsaken till att hästen inte kan träna (McIlwraith & Trotter, 1996). Den har dessutom en noterbar ekonomisk effekt inom hästindustrin. Osteoartrit kännetecknas av förändringar i både celler och extracellulärt matrix. Förändringarna leder till uppmjukning, fibrillering och ulceration med förlust av ledbrosk och blottläggning av underliggande ben, samt benskleros, osteofyter och subkondrala cystor och mindre trögflytande ledvätska pga att hyaluronsyran bryts ner till mindre fragment (McIlwraith & Trotter, 1996). Ledbrosket är en unik vävnad vars egenskaper är ett resultat av interaktioner mellan många olika typer av komponenter. Att förstå strukturen och funktionen av det extracellulära matrixets molekyler, såsom hyaluronsyra och aggrecan, kan vara nyckeln till att lösa problemet med inflammation och osteoartrit.

Hyaluronsyra fungerar som kärna i det extracellulära matrixets proteoglykanaggregat, som ger brosket dess förmåga att stå emot belastning. Smörjning av ledbrosket är beroende av närvaro av hyaluronsyra och dess proteinbindning till lubricin. Hyaluronsyra är viktig för att mediera både cell-matrix kontakt och cell-cell kontakter (Knudson, 2003). Antonacci *et al.* (2016) bekräftar att hyaluronsyra är en del i de biofysikaliska mekanismer som minskar friktionen genom att vara en del i smörjningen av leden. Detta genom dess förmåga att bilda proteinet lubricin. Hyaluronsyran ger ledvätskan sin utpräglade viscoelastisitet. Det är formationen av denna struktur med hög viscoelastisitet som dominerar de stötdämpande egenskaperna i synovialvätskan (McIlwraith & Trotter, 1996).

Högmolekylär hyaluronsyra (HMWHA) har en antiinflammatorisk effekt och kan därmed till viss del vara hältreducerande hos häst. Denna effekt ses bland annat genom att inhibera inflammationsceller, mediatorer, cytokiner och att dölja uttryck av TLR-4 (toll-like receptor-4) för att motverka deras stimulering (Litwiniuk *et al.*, 2016). Vid ett försök med behandling av såväl inflammerad som frisk led studerades skillnaden mellan låg- och högmolekylär hyaluronsyra ur ett hältperspektiv (Balazs, 2003). Resultatet blev att ett preparat med hög molekylvikt hade störst effekt på nervimpulser i leden och därmed störst hältreducerande effekt. Sammanfattningsvis visade studien att molekylvikten var av betydelse för effekten på smärtimpulser hos både den friska och sjuka leden (Balazs, 2003).

I vissa fall kan hyaluronsyran inducera inflammation, detta gäller framför allt lågmolekylär hyaluronsyra (LMWHA). Denna känns igen via TLR-4 och kan inducera en inflammation via immunsystemet. Övrig forskning har visat att små fragment av hyaluronsyra ökar produktionen

av flera olika cytokiner och makrofager och kan via TLR inducera inflammation (Litwiniuk *et al.*,2016).

I en studie med inducerad osteoartrit hos häst visades en ökning av synovialvätskans koncentration vid injektion med hyaluronsyra (Frisbie, *et al.*,2008). Detta visade också Antonacci *et al* (2016) genom studier av ledvätskans och ledbroskets lubrication vid akut skada och injektion av hyaluronsyra, jämfört med friska kontroller hos racinghästar. Resultatet i studien indikerar också att ledvätskans förmåga att smörja leden förändrades ganska direkt efter ledskada. Vid en akut skada ses försämrade smörjning av leden vilket visade sig genom att hyaluronsyrakoncentrationen minskades. När man behandlade den akut skadade leden med högmolekylär hyaluronsyra återställdes och normaliserades lubricationen (Antonacci *et al.*, 2016).

Hyaluronsyra har en viss hältlindrande effekt när den injiceras i en led på både djur och människa. Detta var först visat genom användning i kliniska studier och konfirmerat genom studier på katt- och råttleder. I dessa studier har man också visat att hyaluronsyra, eller någon av dess derivat av hyalans, har en neurologiskt hältlindrande effekt (Balazs, 2003).

Enligt Niemelä *et al* (2016) har injektion med exogen, intra-artikulär hyaluronsyra visat sig ha en hältlindrande effekt och reducerar smärta hos både häst och människa med osteoartrit. Hyaluronsyra är indirekt hältreducerande genom att den ökar viskositeten av ledvätskan samt smörjer upp leden. Den har en effekt trots sin korta halveringstid (mindre än ett dygn) i leden. En ökad mängd endogen hyaluronsyra, producerad av synovicyter, har setts efter injektion med exogen hyaluronsyra (McIlwraith & Trotter,1996).

2016 gjordes en dubbelblindad placebostudie på hästar. En behandlad led jämfördes med en helt obehandlad led. Studien visade att hyaluronsyrabehandling hade en överlägsen effekt på minskning av hältgraden jämfört med icke behandlade leder. Denna studie konfirmerade även fördelen med högmolekylär hyaluronsyra (Niemelä *et al.*, 2016).

Sammanfattningsvis är hyaluronsyra en viktig del i den friska ledens brosk och ledvätska. Hyaluronsyra är en betydande byggsten i det extracellulära matrixet runt kondrocyterna samt i ledvätskan och hjälper till att upprätthålla ledens homeostas. Den hjälper till med smörjning av leden och dess motståndskraft samt stötdämpning vid normal ledfunktion, men också vid skada. Vid osteoartrit verkar hyaluronsyran i hästens led både antiinflammatoriskt och inflammatoriskt beroende på dess molekylvikt. Högmolekylär hyaluronsyra verkar antiinflammatorisk både endogent och exogent tillfört. Lågmolekylär hyaluronsyra kan till skillnad från högmolekylär hyaluronsyra inducera inflammation. Detta är en viktig kunskap för utformandet av framtida detektions- och behandlingsmetoder med tanke på osteoartrit och dess påtagliga effekter på djurvälstånd och ekonomi inom hästindustrin.

## REFERENSLISTA

- Antonacci, J.M., Schmidt, A.T., Serventi, L.A., Cai, M.Z., Shu, Y.Y.L., Schumacher, B.L., McIlwraith, C.W., Sah, R.L. (2012). Effects of equine joint injury on boundary lubrication of articular cartilage by synovial fluid: role of hyaluronan. *Arthritis Rheum*, 64, 2917-2926
- Balazs, E. A. (2003). Analgesic effect of elastoviscous hyaluronan solutions and the treatment of arthritic pain. *Cells Tissue Organs*, 174, 49-62.
- Balazs, E.A., Denlinger, J.L. The role of hyaluronic acid in arthritis and its therapeutic use. In: Peyron JG, Ed. Osteoarthritis in current clinical and fundamental problems. Paris; Ciba Geigy 1984; 165-74
- Caron, J. (2011). Chapter 61: Osteoarthritis I: Ross, M.W, Dyson, SJ (ed.) diagnosis and management of lameness in the horse, 2<sup>nd</sup> ed St Louis: W.B Saunders, ss 655-668
- Läkemedelsindustiföreningen Service AB. LIF (2017). Fass.Vet. Elanders Stockholm sid 649 -652
- Frisbie, D., Ghivizzani, S., Robbins, P.D., Evans, C.H., McIlwraith, C. (2002). Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Therapy*, 9, 12-20.
- Frisbie, D., Kawack, C.E., McIlwraith, C.W., Wery, N.M. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articular for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis.
- Gally, R.H., The use of hyaluronic acid in the racehorse. *PROC am assoc equine pract* 1998;32.657-61
- Heinegård, D. (2009). Proteoglycans and more – from molecules to biology. *International Journal of Experimental Pathology*, 90, 575-586.
- Heinegård, D., Saxne, T. (2011). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*, 7, doi:10.1038/nrrheum.2010.198.
- Howard, R.D. McIlwraith C.W. (1996) hyaluronan and its use in treatment of equine joint diseases. In: *joint disease in the horse* McIlwraith C.W. Trotter, G.W.W.B saunders company, Philadelphia USA pp 257-269
- Huang, K., Wu, L.D. (2008). Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J Int Med res*, 36, 1149- 1160.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J., Yang, B.B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res*, 1, 19-32
- Kidd, J.A., Fuller, C., Barr, A.R.S. (2001). Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education*, 13, 160-168.
- Kawack, C.E., Frisbie, D.D., Trotter, G.G., et al. (1997) Effects of intravenous administration of sodium hyaluronate on carpal joints in exercising horses after arthroscopic surgery and osteochondral fragment mentation. *AM J vet res* 58, 1132-1140
- Knudson, C.B. (2003). Hyaluronan and CD44: strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Research (Part C)*, 69, 174-196.



- Ley, C. Ekman, S. Ronéus, B. Eloranta, M.L. (2008). Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis. *Epub 2008 nov 29. Res vet sci , Jun;86(3):490–7.*
- Litwiniuk, M., Krejner, A., and Tomasz Grzela, T. (2016). Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds; 28(3):78–88.*
- Läkemedelsverket. (2010). Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - ny rekommendation. Tillgänglig: [http://www.lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrek-vet/Aseptisk%20artrit%20hos%20h%C3%A4s\\_rek\\_webb.pdf](http://www.lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrek-vet/Aseptisk%20artrit%20hos%20h%C3%A4s_rek_webb.pdf) 11.
- McIlwraith, C.W., Trotter, G.W. (1996). *Joint Disease in the Horse*. 1. uppl. Philadelphia. W.B. Saunders Company.
- 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., Frisbie, D.D., Kawcak, C. & van Weeren, R. (2015). *Joint Disease in the Horse*: Elsevier.
- 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
- Niemelä, M.T., Tulamo, R.M., Hielm Björkman A.K (2016). A randomized, double blinded, placebo-controlled clinical study on intra-articular hyaluronan treatment in equine lameness originating from metacarpophalangeal joint. *BMC Veterinary Research 12:60*
- Robinson, N.E., Sprayberry, K.A. (2009). *Current therapy in equine medicine*, 6. uppl. St. Louis. Saunders.
- Ross, M.W., Dyson, S.J. (2003). *Diagnoses and Management of Lameness in the Horse*. uppl. St. Louis. Saunders.
- Trumble, T.N., Trotter, G.W., Thom Oxford, J.R., et al. (2001). Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *AJVR, 62, 1467-1477.*
- Tulamo, R.M., Heiskanen, T., Salonen, M. (1994). Concentration and molecular weight distribution of hyaluronate in synovial fluid from clinically normal horses and horses with diseased joints. *AM J Vet Res, 55, 710-715.*
- Tulamo, R.M., Houttu, J., Tupamäki, A., Salonen, M. (1996). Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. *AJVR, 57, 932–937.*
- Wang, C.T., Lin, Y.T., Chiang, B.L., Lin, Y.H., Hou, S.M. (2006). High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage, 14(12), 1237-47.*
- Weaver, R.E., Sharif, M., Livingston, L.A. (2006). Microscopic change in macroscopically normal

equine cartilage from osteoarthritis joints. *Connective Tissue Research*, 47, 92-101.