



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Förekomst av Interleukin-1 β i synovia hos halta hästar

Ulrika Jonsson

Uppsala

2012

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:20*

Förekomst av Interleukin-1 β i synovia hos halta hästar

Ulrika Jonsson

Handledare: Karin Roethlisberger Holm, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Biträdande handledare: Marie Rhodin, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examinator: Bernt Jones Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Kurskod: EX 0239 Nivå X, 30hp

Nyckelord: häst, leder, inflammation, cytokiner, interleukin-1 β

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2012:20

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
BAKGRUND	3
DEN SYNOVIALA LEDEN	3
Ledbrosk	4
Extracellulärt matrix	5
Ledkapsel	6
Ledvätska	7
CYTOKINER	8
Interleukin-1	8
LEDINFLAMMATION	9
FRÅN SYNOVIT TILL OSTEOARTROS	10
MATERIAL OCH METOD	12
Hästar	12
Provinsamling och analys	13
Lameness Locator	14
RESULTAT	15
Inkluderade	15
Exkluderade	19
Normalprov	20
Il-1 β	20
DISKUSSION	22
Provtagna hästar	22
Il-1 β analys	25
SLUTSATSER	26
TACK	26
REFERENSER	27

SAMMANFATTNING

Ledinflammation som orsak till hälta är vanligt hos hästar inom alla discipliner. Om inflammationen inte upptäcks i tid eller behandlas felaktigt resulterar den ofta i osteoartros och kronisk hälta. Patogenesen från en reversibel synovit till osteoartros är inte helt klarlagd. En rubbad homeostas i leden med olika endogent producerade mediatorer tros starta en ond cirkel som sedan är självunderhållande. Att finna en markör för att upptäcka tidiga förändringar är högtintressant. Den proinflammatoriska cytokinen Interleukin-1 har föreslagits vara den molekyl som initierar en kaskadreaktion av för leden skadliga processer.

Denna pilotstudie syftar till att i synovia hos halta hästar mäta koncentrationen Il-1 β med hjälp av en kommersiell Equine Il-1 β ELISA. Hälta har verifierats med Lameness Locator som är ett objektiva datorbaserat system för att utvärdera rörelseavvikelser hos häst.

Endast i 4 av 33 provtagna leder (normala och konstaterat hältorsakande) sågs mätbar Il-1 β koncentration i denna studie. Några slutsatser rörande förekomst vid olika patologiska tillstånd i leder eller tidpunkt i förhållande till skadetillfälle kan därför inte dras.

Ytterligare studier av hur Interleukin-1 påverkar patogenesen vid osteoartros och när dess effekt är som störst bör utföras i en större skala och på ett större och mer varierat hästmateriale.

SUMMARY

Joint inflammation as a cause of lameness is common in horses in all disciplines. If the inflammation is not observed in time or not treated appropriately, it often results in osteoarthritis and a chronic lameness. The pathogenesis from reversible synovitis to osteoarthritis is not completely established. A disrupted homeostasis in the joint with different endogenously produced mediators is assumed to start a vicious circle, which becomes self-perpetuating. To find a marker to detect early changes is of utmost interest. The proinflammatory cytokine interleukin-1 has been proposed to be the molecule initiating a cascade of harmful processes in the joint.

This pilot study aims at measuring the concentration of Il-1 β in synovia from lame horses with the aid of a commercial Equine Il-1 β ELISA. Lameness has been verified with the computer-based system Lameness Locator, which objectively evaluates asymmetrical movement in the horse.

Only in 4 of 33 synovial samples (from both normal and lame joints), detectable concentrations of Il-1 β were found. Therefore no conclusions regarding prevalence in different pathological conditions or point in time in relation to the injury can be drawn.

Further investigations are required to better understand how Interleukin-1 affects the pathogenesis to osteoarthritis and when it's effect is at largest. This should be done in a larger scale and on a larger and more diverse population of horses.

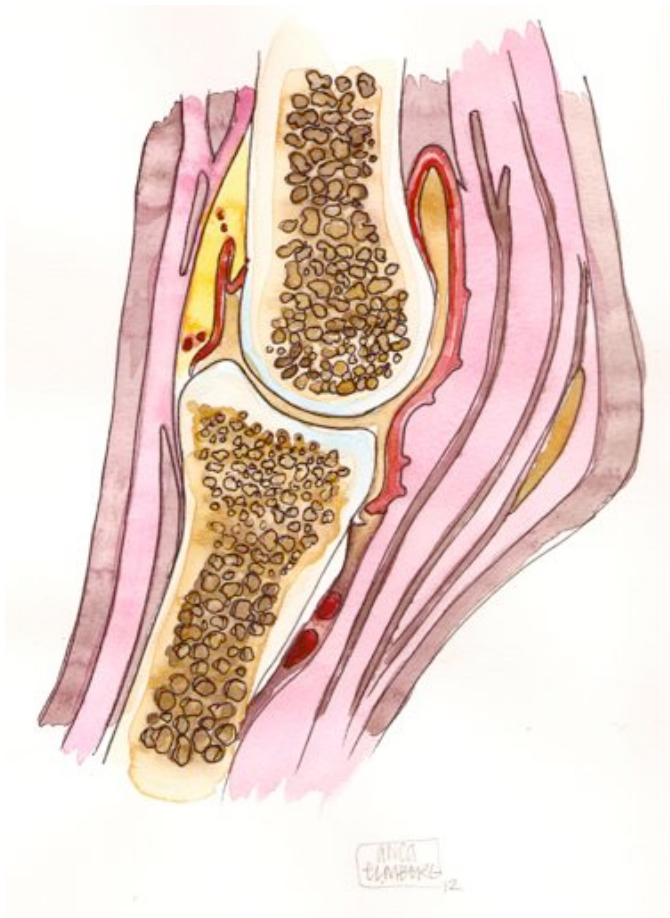
BAKGRUND

Hälta orsakad av ledinflammation är en vanlig orsak till veterinärbesök för hästar inom alla discipliner. Panoramats som ses varierar från reversibel akut synovit till fullskalig artrosutveckling och kronisk hälta. Utvecklingen till osteoartros är successiv men kan vara snabb och medieras av en rad inre faktorer i den sjuka leden. En molekyl som fått stor uppmärksamhet inom artrosforskning på humansidan, men som är förhållandevis lite kartlagd på häst, är Interleukin-1 β . Detta är en proinflammatorisk cytokin med potential att sätta igång en kaskadreaktion med för leden skadliga processer. Samtidigt verkar Il-1 β själv i för hög koncentration direkt negativt på ledbrösket. Det finns idag kommersiella behandlingsmetoder för att motverka dess effekt men antalet kliniska studier på häst är få. Syftet med denna pilotstudie är att fastställa koncentration av Il-1 β i ledvätska hos halta hästar.

DEN SYNOVIALA LEDEN

Ledens huvudsakliga beståndsdelar är ledbrösk, subkondralt ben och synovium. Dessa strukturer omges av stödjevädnad såsom ligament, muskulatur och senor (se figur 1).

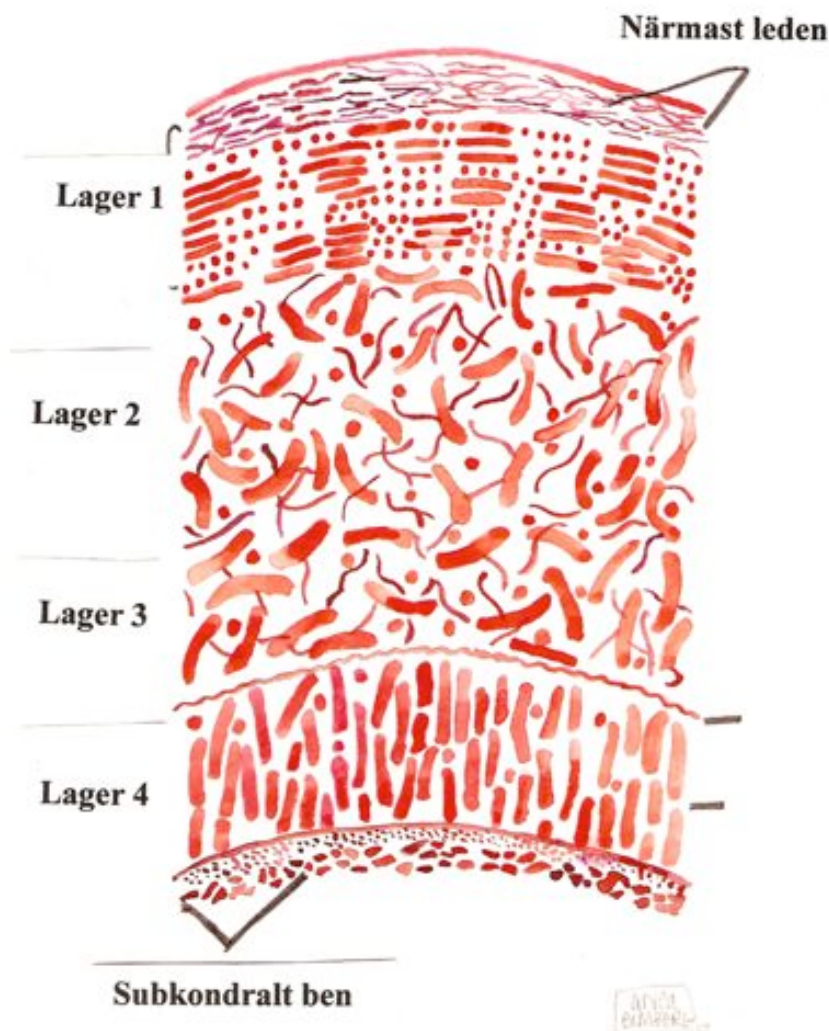
Det subkondrala benet som ledbrösket vilar på tar upp delar av kraften som genereras vid belastning. Största delen av denna belastning vilar dock på stödjevädnaden (Todhunter Rory J. 1996).



Figur 1. Kotled i genomsnitt. Akvarell av aNca eLMBeRg 2012.

Ledbrosk

Hos vuxna hästar är ledbrosket avaskulärt, aneuralt och indelat i fyra (se figur 2) skilda lager (Palmer JL, Bertone AL 1994) samt får sin näringsförsörjning tillgodosedd från ledvätskan som levereras över synovialmembranet (Sutton et al 2009). Broskets viktigaste beståndsdelar är kondrocyter, kollagen (50 % av broskets torrsvikt), proteoglykaner (35 % av broskets torrsvikt), glukosaminoglykaner (som hyaluronsyra, kondroitinsulfat och keratansulfat) samt icke-kollagena proteiner. Kollagen ger dragstyrka, proteoglykanerna och glukosaminoglykanerna ger tillsammans motstånd vid kompression genom att dra in vatten i brosket när leden är obelastad (Bertone AL 2004, Palmer JL, Bertone AL 1994, Todhunter Rory J. 1996). Sambandet mellan proteoglykaner och glukosaminoglykaner består av att olika glukosaminoglykaner binder till de olika proteoglykanerna. Ett välkänt exempel är aggregan som binder hyaluronsyra. Man har sett en enda HA molekyl binda 100 aggreganer och således bilda stora komplex (Todhunter Rory J. 1996).



Figur 2. Schematisk indelning av ledbrosket. Akvarell av aNca eLMBerG 2012.

Ledbrösket har förmågan att omsättas och bytas ut även om processen är extremt långsam. Efter nysyntes utsöndras kollagen typ II (som är den vanligaste formen av kollagen i ledbrösk) till broskmatrix. Detta sker som prokollagen, som efter enzymatisk aktivering kan bilda fibriller och inkorporeras i brosket (Platt David 1996).

På grund av den långsamma regenerationen av ledbrösk är ledbröskets viktigaste komponent kollagen skyddad från enzymatisk nedbrytning. Endast två enzymer med förmåga att bryta ned trippel-helix strukturen hos kollagen typ II finns beskrivna, MMP-1 (interstitiellt kollagenase) och MMP-2 (neutrofilt kollagenase). Det finns dessutom säkerhetssystem för att undvika massiv kollagen nedbrytning. Kollagenase (MMP-1) som degraderar kollagen utsöndras från kondrocyterna i inaktiv form och kräver aktivering av proteolytiska enzymer (Todhunter Rory J. 1996). Brosket har också kollagenasehämmare för att undvika alltför excessiv nedbrytning (Palmer JL, Bertone AL 1994).

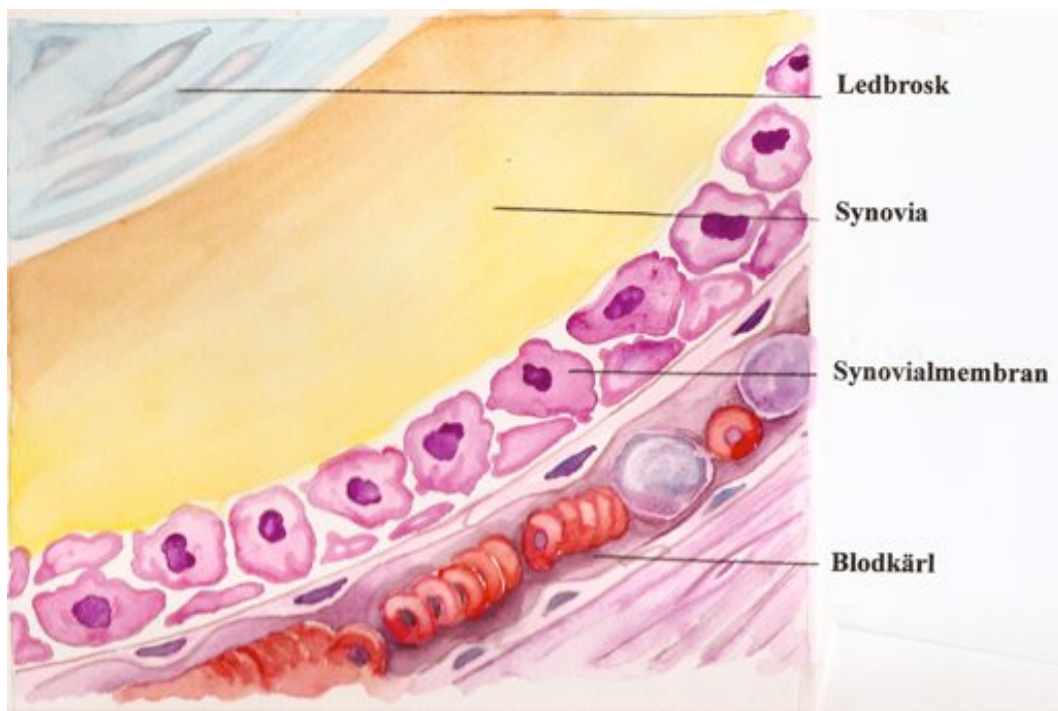
Den mekaniskt pumpande effekten som rörelse ger tros påverka ledbröskets metabolism i positiv bemärkelse. Effekten blir en införsel av näring till och en utförsel av slaggprodukter från brosket. Lagom arbete ger en ökad syntes av proteoglykaner och proteiner och en överbelastning det motsatta (Todhunter Rory J. 1996). Inom humanmedicinen är det bevisat att fysiologisk rörelse har en positiv inverkan på ledbrösket och att både överanvändning och inaktivitet leder till broskdestruktion (Sun Hui B. 2010).

Extracellulärt matrix

När det gäller broskets matrix, eller nätverk, som omger kondrocyterna, så behöver även dess beståndsdelar regenereras. Denna omsättning ombesörjs av kondrocyterna, och kan både stimuleras av belastning på leden och av cytokiner som kan aktivera degradativa enzymer (Todhunter Rory J. 1996). Proteoglykanerna anses som extra viktiga då deras nedbrytning vid en rubbad homeostas går mycket snabbare än nedbrytningen av kollagen. Nettoeffekt av en förlust av proteoglykaner är ett mjukare ledbrösk som ej längre kan motverka det tryck som leden utsätts för vid belastning (Palmer JL, Bertone AL 1994, Todhunter Rory J. 1996). Glukosaminoglykanen hyaluronsyra har två viktiga funktioner i en synovial led. Den är dels en viktig beståndsdel i ledvätskan där den ökar viskositeten och har en smörjande effekt (Todhunter Rory J. 2006), dels ingår den i ledbröskets matrix där den bunden till proteoglykanen aggrekan bidrar till den kompressionshämmande effekten (Kamm JL et al. 2010). Hyaluronsyrans association till proteoglykan medför att även den kan försämrast styrkan hos ledbrösket om syntesen störs och för korta HA molekyler produceras (Palmer JL, Bertone AL 1994). Vad som styr längden på HA molekyler i den normala leden är inte fastställt (Todhunter Rory J 1996), men vid patologiska tillstånd kan polymeriseringen störas och HA molekyler blir kortare (Tew W.P. & Hotchkiss R.N. 1981).

Ledkapsel

Ledkapseln ger ledens dess integritet och skydd mot omvärlden. Den fibrösa yttre delen av ledkapseln ingår i ledens stödjevävnad. Innerst finns synovialmembranet som är i kontakt med ledvätskan. Synovialmembranet täcker de inre delar av leden som inte är ledbrosk och kan delas in i intima och subintima, där det sistnämnda lagret är beläget närmast ledkapselns fibrösa yttre del. Subintiman är till skillnad från ledbrosket rik på blodkärl (se figur 2), vilket krävs för näringsförsörjningen av ledbrosket. För att detta ska ske effektivt saknar synoviocyterna i intima basalmembran, och kärlen är fenestrerade så att mindre molekyler ska kunna passera. Inflammatorisk svullnad kan därför verka negativt på detta utbyte. Ledkapselns intima inhyser två olika typer av synoviocyter. Typ A är en variant av mononukleära fagocyter (liknande makrofager), och typ B är en variant av fibroblaster som även syntetiserar hyaluronsyra (Palmer JL, Bertone AL 1994).



Figur 3. Ledkapsel med omgivande strukturer. Akvarell av aNCa eLMBeRg 2012.

Ledvätska

Synovia utsöndras från synovialmembranet och är den enda vägen för näringsförsörjning till det icke kärlförsörjda ledbrusket. Synovia har även en uppstädande och smörjande funktion (Sutton et al. 2009). Förutom sin proportionellt höga koncentration av hyaluronsyra är synovia egentligen ett ultrafiltrat av plasma med de flesta komponenter som normalt finns i blodplasman, exklusive proteiner och större molekyler vilka inte tar sig över ett normalt synovialmembran (Todhunter Rory J. 2006, Tew W.P.& Hotchkiss R.N. 1981). Synovia innehåller därför normalt vita blodkroppar men halten av kärnförande celler ska inte överstiga 500 celler/ μ l (Todhunter Rory J 2006).

Makroskopiskt normal synovia ska vara tråddragande, genomskinlig och till färgen glasklar till ljusgul. Då synovia saknar koagulationsfaktorer ska den normalt inte koagulera (Steel C.M. 2008).

Differentiering mellan septiska och aseptiska tillstånd är den vanligaste analysen som görs på ledvätska. Denna distingering görs med hjälp av analys av vita blodkroppar, totalprotein och andel neutrofiler. För övrigt är bedömningen som görs kliniskt rent subjektiv men ändå värdefull (Steel C.M. 2008). Färg, genomskinlighet och viskositet kan lätt uppskattas kliniskt.

Man började tidigt betrakta analys av synovia som en tänkbar diagnostisk väg för olika patologiska tillstånd i leder. Att ledvätskan speglar ledens välbefinnande är klarlagt men hur detta kan användas i praktiken är mer osäkert (Tew W.P, Hotchkiss R.N. 1981, Steele C.M. 2008). Även om analysteknik och kunskap gått framåt under de 30 åren som gått sedan Tew och Hotchkiss sammanfattade dessa teorier, har analys av synovia inte fått fäste inom rutindiagnostiken.

CYTOKINER

Cytokinerna är immunförsvarets budbärare, de är polypeptider och tillverkas av de olika immunförsvarscellerna (Tizard 2004). Exempel på cytokiner är interleukiner, interferoner, tumor necrosis factor (TNF), colony stimulating factors (CSF) och tillväxtfaktorer (Palmer J.L, Bertone A.L. 1994). Undergruppen interleukiner har fått sitt namn efter sin funktion som består i att förmedla information inom och mellan celltyperna lymfocyter och leukocyter (Tizard 2004).

De senaste 25 åren har dessa små signalmolekyler väckt stort intresse när det gäller ledens patologi. Enormt mycket arbete har lagts ner på att kartlägga deras påverkan på ledbroskets homeostas (Platt David 1996).

Interleukin-1

Förutom att vara den först upptäckta interleukinen (Tizard 2004) har Il-1 viktiga och vitt omspännande uppgifter i kroppen såsom att verka proinflammatoriskt, ge upphov till sjukdomskänsla och stimulera immunförsvarets övriga komponenter. Själva känslan av att vara sjuk uppstår när Il-1 kommer ut i blodomloppet med effekter såsom feber, letargi, illamående och aptitlöshet. Nervus vagus har specifika Il-1 receptorer på sensoriska neuron vilket snabbt ger systemiska effekter direkt från hjärnan. Dessa effekter sker i synergi med TNF- α och Il-6 (Arend 1998, Tizard 2004).

Interleukin-1 är inte en enda molekyl utan en grupp av proteiner. Det finns två positivt verkande agonister som benämns α och β . Dessa två kan binda till någon av de två receptorerna Il-1RI eller Il-1RII, där den sistnämnda inte ger någon aktivitet efter bindning. Utöver dessa finns en antagonist kallad Il-1Ra vars funktion är att neutralisera Il-1's effekt när den binder till receptorn, en effekt som är viktig för att undvika sjukdom (Tizard 2004). Det krävs dock stora mängder Il-1Ra i förhållande till Il-1 för att lyckas motverka effekten av Il-1. Studier visar att en obalans mellan Il-1 och dess antagonist (för mycket agonist och/eller för lite antagonist) predisponerar för ledsjukdomar av både inflammatoriskt och autoimmunt ursprung (Arend 2002).

Makrofager är de inflammatoriska celler som producerar mest Il-1 som svar på stimuli (Tizard 2004). Merparten är Il-1 β som utsöndras som en inaktiv promolekyl och kräver enzymet Caspase1 för att aktiveras (Arend 2002). Il-1 α har en begränsad räckvidd då den förblir adherent till makrofagen och har därmed mindre betydelse i sammanhanget (Tizard 2004).

Som svar på en frisättning av Il-1 kan man bland annat se en förhöjd migration och adhesion av neutrofiler samt en aktivering av fibroblaster som utsöndrar reparativt kollagen3 (Tizard 2004). Det ger även en ökad produktion av andra proinflammatoriska cytokiner såsom Il-6 och Il-8 (Arend 2002). I leden är det kanske dock Il-1's stimulerande effekt på produktion av såväl metalloproteinaser, eikosanoider, plasminogen aktivatorer, akutfasproteiner, samt dess hämmande effekt på broskmatrix, kollagen och proteoglykaner, som väcker störst intresse (Palmer JL, Bertone AL 1994, Morris EA et al 1994).

En nyligen publicerad studie av Scott et al. 2009, där man tittat på effekten av intraartikulär injektion av 10ng Il-1 β i fotleder på råttor, påvisar en signifikant ledsvullnad jämfört med kontroller. Syftet med studien var att kartlägga förekomst av ett ökat genuttryck för proinflammatoriska och prodegradativa mediatorer som svar på Il-1 β injektionen (47 olika gener). Man fann ett ökat genuttryck för såväl Il-6, prostaglandin syntase2 (PTGS2), inducerbart kväveoxid syntase2 (NOS2), TNF- α , NF κ B1 och ADAMTS5 (Aggrekanase-2) synkroniserat med själva ledinflammationen. Il-6 var signifikant ökat i synovia fyra timmar efter injektionen (normaliserat efter ett dygn). Halten PGE₂ var däremot inte mätbar. Dessutom sågs en synovit med hypertrofi av synovialmembranet som förvärrades över tid. Några akuta broskskador sågs inte men Il-1 β inducerade bevisligen den kaskadreaktion som föreslagits (Scott et al. 2009).

Studier på både humant och equint ledbrosk har indikerat en skillnad i Il-1's förmåga att stimulera produktion av nedbrytande enzymer. Ett moget ledbrosk har visats mer motståndskraftigt mot Il-1 än ett omoget (Platt David 1996).

LEDINFLAMMATION

Upprepat mikrotrauma där leden utsätts för påfrestningar som ligger en aning över dess toleransnivå anses som en huvudorsak till ledinflammation. Därutöver är traumatiska skador, införsel av bakterier iatrogen och förekomst av osteokondrosfragment vanliga orsaker.

Klinisk bedömning av en ledinflammation utgår ifrån kriterierna svullnad, värme och smärta. Vad som sker på insidan av leden vid inflammation är att blod och inflammatoriska celler förtjockar synovialmembranet vars funktion störs och synovians sammansättning förändras (Palmer J.L. et al. 1996). Smärta vid ledinflammation orsakas delvis av synoviten (Sutton et al 2009).

Först på plats när leden signalerar att den har problem är blodburna vita blodkroppar (flerkärniga leukocyter och monocytter), som producerar fria radikaler och olika mediatorer. Dessa stimulerar i sin tur cellerna i leden (kondrocyter, synoviocyter och makrofager) att producera bland annat cytokiner men även eikosanoider och matrixenzymer såsom matrix metalloproteinaser (MMP's). Inbyggt i ledens eget försvar finns hämmare av de olika inflammationsmediatorerna såsom "tissue inhibitors of matrix metalloproteinases" (TIMP's). Inbördes fördelning av proinflammatorisk "gas" och antiinflammatorisk "broms" påverkar utgången och möjligheten för ledens komponenter att reparera skadan (Palmer JL, Bertone AL 1994). Antalet vita blodkroppar (leukocyter) som ansamlas vid en ledskada speglar hur pass extensiv inflammationen är (Tew W.P & Hotchkiss R.N 1981).

Ledvätskans kvalitet och kvantitet visar generellt hur väl synovialmembranet fungerar (Steel C.M. 2008). Om skada påverkat synovialmembranets unika arkitektur och dess genomsläpplighet förändrats, leder det oundvikligen till en förändring av synovians sammansättning. Detta i sin tur påverkar direkt ledbrosket som är beroende av synovia för sin homeostas. Synoviocyterna som ansvarar för produktion av hyaluronsyra både till synovia och ledbrosk, tillverkar vid en synovit både mindre och kortare HA molekyler. Hyaluronsyrekoncentrationen kan även reduceras genom ett nettoinflöde av

vätska över synovialmembranet i samband med vätskeutträde på grund av en rubbad blod-synovia barriär (Tew W.P.&Hotchkiss R.N. 1981). Bägge skeendena reducerar viskositeten och därmed även smörjningen av leden vid rörelse.

Experimentella studier där man inducerat synovit med hjälp av en LPS-modell (E.Coli) påvisade en övergående (1 vecka) ökad koncentration av kärnförande celler och protein i synovia. Kvarstående en längre tid var däremot eikosanoiderna (PGE₂ och TXB₂) som sammanföll med en hyperplasi hos synoviocyterna, Dessutom sågs en ökad produktion av kortare proteoglykaner som tänkbart kan försvaga brosket på längre sikt (Palmer J.L. et al. 1996). I en annan studie med ledinflammation inducerad av humant Il-1 β sågs en mycket snabbt insättande men även snabbt övergående inflammatorisk reaktion. Il-1 β var signifikant ökad i de leder som inflammerats men var i avtagande vid sista mättpunkten (330 min). Il-1 β inducerade snabbt (240 min) leukocytos i synovia samt en neutrofil vaskulit i synovialmembranet. Man såg även en ökning över tid av Il-6 och PGE₂ i dessa leder (Hardy J. et. al 1998).

Det endogena försvaret är också viktigt vid en ledinflammation. Olika antiinflammatoriska cytokiner såsom Il-4, Il-10, Il-13 och Il-Ra har förmåga att motverka både PGE₂ och MMP produktion och effekten av de proinflammatoriska cytokinerna (Sutton S. 2008). Koncentrationen av de inbyggda skyddsmekanismerna i form av TIMP's och andra hämmare till de destruktiva enzymerna vilka produceras vid inflammation avgör delvis om inflammationen hejdas (Palmer J.L, Bertone A.L. 1994).

FRÅN SYNOVIT TILL OSTEOARTROS

Intraartikulär behandling med kortison och systemisk administration av NSAID är två vanliga behandlingsmetoder vid ledinflammation hos häst.

Dessa behandlingsmetoder baseras på en hämning av olika stadier av prostaglandin-syntesen. Kortison anses dessutom kunna hämma Il-1 och TNF- α om det administreras i högre koncentrationer. Gemensamt för både prostaglandinerna och ovan nämnda cytokiner är att de har förmågan att sensitisera smärtreceptorer (Bertone A.L. 2004). Neurotransmittorn Substans P har nämnts som viktig i patogenesen då denna kan modulera det inflammatoriska svaret hos synovialmembranet (Sutton S. 2008, Bertone A. 2004). Även andra substanser såsom aminen Serotonin och neurotransmittorn CGRP deltar och detta via en aktivering av både C fibrer och A δ -fibrer (Bertone A.L. 2004).

En faktor som anses påverka utvecklingen av den akuta synoviten till ett kroniskt problem är viloperioden efter en behandling. Om denna efter en akut synovit kortas av och hästens sätts i träning för tidigt kan de inflammatoriska mediatorerna antingen kvarstå för länge eller kraftigt öka i koncentration. Dessa mediatorer kan om de får övertag direkt skada ledbrosket. Ledbehandling med konventionella behandlingsmetoder (såsom intraartikulär injektion med kortison) vars avsikt är att påskynda läkningsprocessen har i vissa fall direkt negativ effekt på själva ledbrosket. Både tidig igångsättning och själva behandlingen kan således starta en ond cirkel som resulterar i kroniska förändringar (Palmer JL, Bertone AL 1994). Denna onda cirkel är självunderhållande när väl broskdegenerationen börjat. Nedbrytningsprodukter från brosket leder till aktivering och produktion av

proinflammatoriska cytokiner och kollagenaser från synoviocyterna. Nedbrytningsprodukterna som ansamlas i synoviocyterna leder dessutom till hypertrofi av synovialmembranet (Sellam J. & Berenbaum F. 2010).

Ledens blodförsörjning är en annan aspekt som är sammanlänkad med utvecklingen till artros. Kronisk inflammation i synovialmembranet leder till fibros i ledkapseln tillsammans med trängre kapillärer. Denna ledkapsel kan inte längre sköta sina arbetsuppgifter på ett optimalt sätt. Det ökade intraartikulära trycket i leden kan i sin tur leda till ischemiska skador och ännu mer fibros i ledkapseln (Bertone Alicia L. 2004).

Även hos hund och människa är osteoartros är en mycket vanlig orsak till hälta och/eller smärta (Sutton et al. 2009). Det är visat att osteoartros i många fall är en följd av broskskador som orsakats av en ledinflammation (Todhunter Rory J. 1996, Sutton et al. 2009), samt att det är synoviten som förorsakar stora delar av den smärta och ledinflammation som ses simultant med osteoartrosen (Sutton et al. 2009). Dessutom diskuteras huruvida ledinflammationen är sekundär till de förändringar och nedbrytningsprodukter man ser i leden under utvecklingen till osteoartros (Sutton et al. 2009). Det exakta händelseförloppet är med andra ord inte helt klarlagt, men att en synovit finns närvarande under hela patogenesen är bevisat. Det finns även bevis för att denna synovit kan skynda på och förvärra de broskskador den resulterar i, via produktion av MMP's (Sutton et al. 2009). Humant anser man att den broskdestruktionen som ses vid reumatism och osteoartros påverkas av inflammatoriska cytokiner och MMP's som producerats av synovialmembranet (Sun Hui B. 2010). Med detta sagt anses osteoartros humant ändå vara en ickeinflammatorisk process. Hos häst ses osteoartros ofta efter akut skada och inflammation i någon av ledens mjukdelar där man inte lyckats vända sjukdomsförloppet i positiv riktning (McIlwraith C. Wayne 1996).

Vid en manifest osteoartros finns per definition skador på ledbrosket i form av fibrillering eller fissurer (Sutton et al 2009). I de fall broskskadorna penetrerat hela broskets tjocklek så att det subkondrala benet är blottat innehåller även benvävnad cytokiner med potential att förvärra skadan (Todhunter Rory J 1996).

Osteoartros omfattar många (om inte alla) strukturer i leden. För att undvika detta scenario är framtiden att lyckas identifiera tidiga tecken på skada och därefter vända sjukdomsprocesserna innan den onda cirkeln initierats. Nyckeln är i många fall synovialmembranet då detta är så viktigt för ledens homeostas.

MATERIAL OCH METOD

Denna pilotstudie har utförts på vid Universitetsdjursjukhuset Ultuna under 2011. Tre klinikveterinärer har deltagit i provinsamling och mätningar.

Hästar

Totalt har cirka 75 hästar bedömts vilket resulterat i 18 provtagna hästar, 3-20 år gamla med en medelålder på 11 år. Materialet bestod av 10 hästar av halvblodstyp, 6 ponnyer, 1 varmblod och 1 islandshäst (se tabell 1). Hästarna har vid besöket uppvisat en initialhätta på rakt spår subjektivt bedömd av klinikveterinär och därefter verifierad som hätta med Lameness Locator. Hästarna har avidentifierats och fått ett löpnummer, KC1-18.

Tabell 1. Anamnes provtagna hästar.

	Ålder (år)	Kön	Användning	Tävlas	Provtagen led/er	Problem
KC 1	14	Sto	Dressyr/hoppning	Lätt klass	VF Karpus VF Karpus	Hätta fram
KC 2	11	Sto	Hoppning	Lätt klass	VF Kotled HF Kotled	Hätta fram
KC 3	4	Sto	Dressyr	Tävlas ej	HF Kotled	Svullnad HF
KC 4	17	Valack	Dressyr	Unghäst	HF Kotled HF Karpus HF Karpus HF Hovled	Intermittent hätta fram
KC 5	20	Valack	Dressyr	Msv/svår	VB	Gått omkull
KC 6	9	Valack	Ridskolehäst	Lätt klass	HF Karpus HF Karpus HF Kotled	Ovillig, vägrar
KC 7	16	Valack	Dressyr/hoppning	Tävlas ej	VF Karpus VF Karpus VF Kotled	Ojämn, ej hoppglad
KC 8	9	Valack	Dressyr	Tävlas ej	HF Hovled	Halt höger fram
KC 9	8	Sto	Hoppning	Lätt klass	HF Kotled	Återkommande hätta
KC 10	8	Valack	Dressyr	Msv	VB	Ovillig till arbete
KC 11	10	Sto	Promenadridning	Tävlas ej	HF Karpus HF Karpus	Intermittent hätta
KC 12	4	Valack	Dressyr	Unghäst	HF Kotled	Ovillig till arbete
KC 13	17	Valack	Dressyr/hopp	Lätt klass	HF Hovled	Återkommande hätta
KC 14	10	Valack	Hoppning	Lätt klass	VB VB TMT	Stannar på hinder
KC 15	15	Valack	Dressyr	Lätt klass	HB Kotled	Ojämn vid ridning
KC 16	6	Hingst	Hoppning	Lätt klass	HF Hovled HF Kotled HF Karpus HF Karpus	Intermittent halt
KC 17	18	Sto	Dressyr	Tävlas ej	HB Kotled	Ojämn vid ridning
KC 18	3	Sto	Unghäst	Unghäst	VF Kotled	Halt vänster fram

Provinsamling och analys

Om veterinär under undersökningens gång lagt diagnostiska ledanestesier har synovia aspirerats i steril spruta innan lokalbedövningsmedlet injicerats. Blodprov från hästen har tagits i samband med synoviaprovtagningen. Hästen har återigen mätts på rakt spår med Lameness Locator när veterinär läst av effekt av lagd anestesi.

Blodprov har tagits med hjälp av vacutainer från jugularvenen i två serumrör. På cell-laboratoriet vid Patologen SLU centrifugerades rören 5 minuter i 1500 rpm i 4 grader. Supernatanten överfördes och alikvoterades till autoklaverade eppendorfrör och frystes ned till -80 grader, ca 250 µl/rör. Serumanalys har inte utförts inom ramen för denna studie av analystekniska skäl.

Synovia överfördes från sprutan till EDTA-rör (minst 0,5 ml) för analys av vita blodkroppar, differentialräkning och analys av totalprotein på Klinisk kemi UDS.

EDTA-rör är att föredra för cytologisk undersökning, dessutom förhindrar det koagulation i de fall totalprotein är förhöjt eller injektionen resulterat i kontamination med blod (Steel C.M. 2008). Resterande mängd synovia överfördes till sterilt serumrör. Synovian sattes direkt efter provtagning in i kylskåp och togs inom en till två timmar efter provtagning omhand på cell-laboratoriet vid Patologen SLU och centrifugerades i 5 minuter i 1500 rpm i 4 grader. Supernatanten alikvoterades till autoklaverade plaströr med ca 250 µl/ rör och frystes ned till -80 grader. Cell-pelleten som återstod resuspenderades i RNAlater, minst 5 ggr cellvolymen eller 200µl och förvarades i kylskåp (4 grader) över natten och frystes sedan ned till -80 grader.

Supernatanten från synoviaproverna analyserades sedan med ett kommersiellt tillgängligt Equine IL-1β VetSet™ ELISA development kit som kvantifierar mängden Interleukin-1β i proverna. Därefter mättes absorbans vid 450nm. Analysresultaten räknades ut från ekvationen given ur den standardkurva med kända koncentrationer som samkörts med analysen. Halten IL-1β angavs i ng/ml.

Lameness Locator

Lameness Locator är ett kommersiellt tillgängligt system för att objektivt utvärdera avvikelser i hästars rörelsemönster. Systemet består av en dator med tre sensorer kopplade till sig: en gyrometer som anbringas över kronbenet höger fram och två accelerometrar där den ena sätts på grimman mellan hästens öron och den andra på korsets högsta punkt. Sensorerna detekterar och jämför avvikelser i hästens stegcykel mellan höger och vänster kroppssida i trav på rakt spår. Därefter sänds informationen trådlöst till datorn som bearbetar informationen. Rörelsestörning motsvarande håla på ett framben medför antingen en höjning och/eller sänkning av huvudet. Detta anges i systemet som head diff max eller min värden och en differens i amplitud på mer än +/- 6mm definieras av Keegan et al. som ett avvikande rörelsemönster. Sensorn belägen på korset gör motsvarande tolkning för hästens bakben där ett niggande eller höjande av korset i samband med håla ger ett asymmetriskt rörelsemönster. Pelvis diff max och min värden för bakbens rörelser tolkas av datorn och amplituder på mer än +/- 3mm räknas som avvikande. Systemet kan även med ledning av var i stegcykeln avvikelser sker, tolka denna som antingen en isättnings- eller frånskjutshåla.

En bråkig eller busig häst kan störa analysen genom att påverka sensorerna under mätningen. Detsamma gäller även en hästägare som med grimskaflet påverkar hästens huvudhöjd och position. Systemet har inbyggda hjälpfunktioner för att plocka bort så kallade outliers (kraftiga avvikelser som inte sker konsekvent under mätperioden) vid behov. Annars gäller det för användaren av systemet att instruera djurägaren, tillse att tillräckligt många steg analyserats (att hästen travat en tillräckligt lång sträcka), samt att ta om mätningar där hästen inte uppfört sig väl (Keegan et al. 2009).

Om en häst enligt mätning med Lameness Locator var för låggradigt halt på rakt spår för att komma över systemets gränsvärden (+/- 6mm huvud respektive +/- 3mm i pelvis och en standardavvikelse överstigande mätvärdet) exkluderades den. I de fall där bedövning ej släckt i den led som ledvätska samlats från uteslöts de synoviaproverna från studien men analysvärden på synovia har beaktats och anses då vara av karaktären normalprov. Hästar som varken passade in bland normalprov eller har kunnat inkluderas blev även de exkluderade.

RESULTAT

Inkluderade

Hästarna benämnda KC4, KC5, KC9, KC12, KC13 och KC15 är inkluderade i studien. Dessa hästar har en initialhätta på rakt spår som släckts med ledanestesi. Synovia analyserad från dessa leder redovisas nedan.

KC4

Kliniskt sågs hos denna häst en lindrig ledfyllnad i kotleden HF och en lindrig till måttlig ledfyllnad i hovleden HF. Hästen var initialhalt HB och efter böjprov även tydligt halt HF. Hos denna häst lades först en kotledsbedövning HF vilken släckte ungefär hälften av hästens hälta. Därefter lades ytterligare två ledbedövningar utan subjektiv eller objektiv förbättring, synovia från dessa leder är att anse som normalprover. Hältan återkom drygt två timmar efter att den första anestesi lagts (kotled HF). Anmärkningsvärt för övrigt hos denna häst var synovian från hovled HF som var makroskopiskt avvikande, grumlig och med nedsatt viskositet. Hästen har inte röntgats i aktuell kotled. Hältan enligt Lameness Locator är en isättningshätta höger fram som är tydlig initialt och efter hovledsbedövning (se tabell 2).

Il-1 β kotled HF 0,02 ng/ml (under gränsvärde)

Tabell 2. Lameness Locator protokoll KC 4. Fet markerat = hälta

KC 4	Head diff MAX	Standard avvikelse	Head diff MIN	Standard avvikelse
Initialt	6,591	5,504	9,983	8,288
Efter anestesi kotled HF	0,725	7,232	6,705	6,226
Efter anestesi karpus HF	1,603	7,775	5,436	7,541
	2,021	6,987	-0,892	6,734
Efter anestesi hovled HF	8,078	6,585	16,465	4,836
	6	6,074	8,768	7,534

KC 5

Subjektivt bedömd var hästen 2 grader halt rakt ut VB och anestesi av tarsocruralled VB släckte hältan i sin helhet. Enligt Lameness Locator hade hästen en hälta VB (frånskjuts- och isättningshätta) på -7,3 respektive -6mm som efter hasledsanestesi sjönk till normalvärde. Detta överensstämde med klinikveterinärens bedömning (se tabell 3). Hästen behandlades i tarsocruralled VB vilket gav ett positivt behandlingssvar tillsammans med en längre tids vila.

Il-1 β tarsocruralled VB not detectable

Tabell 3. Lameness Locator protokoll KC 5. Fet markerat = hälta

KC 5	Pelvis diff MAX	Standard avvikelse	Pelvis diff MIN	Standard avvikelse
Initialt	-7,318	1,926	-5,95	2,251
Efter anestesi tarsocruralled VB	-0,755	2,842	-2,915	2,864
	2,222	2,09	-2,13	1,849
Återbesök	0,064	1,777	-6,26	1,839

KC 9

Hos denna häst sågs en halvgradig hälta höger fram som ökade till cirka 1,5 grad vid både högt och lågt böjprov som var ihållande efteråt. Longering höger varv gav en markant cirka 2-gradig hälta höger fram. Initialhältan enligt Lameness Locator ses som ett förhöjt maxvärde och ett kraftigt förhöjt minvärde, vilket kan översättas till en isättningshälta höger fram. Efter abaxial anestesi HF sjönk maxvärdet till ohalt men minvärdet kvarstod relativt oförändrat, detta tolkades som en förbättring av hälтан. Efter lagd kotledsbedövning sjönk även minvärdet. Hästen var därefter objektivt sett ohalt (se tabell 4). Detta resonemang är samstämmigt med klinikveterinärens subjektiva tolkning.

Tabell 4. Lameness Locator protokoll KC 9. Fet markerat = hälta.

KC 9	Head diff MAX	Standard avvikelse	Head diff MIN	Standard avvikelse
Initialt	11,35	4,78	23,851	4,947
Efter anestesi abaxial HF	2,016	3,364	19,118	5,725
	0,341	3,055	8,022	4,566
	-0,566	3,46	7,964	3,37
Efter anestesi kotled HF	1,052	3,574	7,997	4,691
	1,578	2,732	3,527	4,59
	-0,469	4,293	4,702	5,772

Il-1 β kotled HF not detectable.

Kotleden HF var utan anmärkning radiologiskt. Hästen behandlades i båda kotlederna fram och hovled höger fram när undersökningarna som utförts summerades ihop. Vid återbesök en månad senare hade reaktion på de låga böjproven minskat men de höga kvarstod.

KC 12

Vid undersökningstillfället bedömde klinikveterinären att hästen markerade rakt ut höger fram vilket accentuerades vid longering i höger varv. Låga böjprov gav 1 grads hälta vänster fram som värmdes ur, och cirka 2-gradig hälta höger fram. Bedövning av hästens kotled HF släckte initialhåltan partiellt enligt den subjektiva bedömningen vilket konfirmerades med Lameness Locator. Håltan återkom cirka 50 minuter efter att kotledsbedövningen lagts, något som kan bero på att bedövningen börjat gå ur. Därefter lades en abaxial ledningsanestesi som även den väsentligt minskade hästens hälta. Rörelseavvikelsen ses som ett förhöjt maxvärde på 32mm, vilket översätts till hälta höger fram. Hästen behandlades i båda kotleder fram då även hälta vänster fram setts på böjt spår. Tre veckor senare kvarstod fortfarande hälta höger fram rakt ut (se tabell 5). Hästen har inte röntgats i det aktuella högra frambenet.

II-1 β kotled HF 2,8 ng/ml.

Tabell 5. Lameness Locator protokoll KC 12. Fet markerat = hälta

KC 12	Head diff MAX	Standard avvikelse	Head diff MAX	Standard avvikelse
Initialt	31,261	11,31	2,898	5,345
Efter anestesi kotled HF	16,05	11,609	-4,212	14,574
	13,704	13,994	-5,593	9,991
	9,957	10,18	-2,683	12,01
Efter anestesi abaxial HF	27,106	15,999	6,34	13,32
	21,22	11,344	9,281	11,386
	13,941	15,259	4,769	12,265
Återbesök	11,71	8,603	-1,81	12,572

KC 13

Vid detta besök var hästen 1,5 grad halt rakt ut i trav HF subjektivt bedömd. Med hjälp av Lameness Locator sågs hästens initialhälta som ett 13,2mm förhöjt maxvärde och ett 11,9mm förhöjt minvärde (frånskjutshälta HF). Anestesi av hovled HF släckte hättan (se tabell 6). Röntgenundersökning som utfördes vid besöket påvisade förändringar i båda hovlederna fram indikerande artrosförändringar. Palpatoriskt kändes hovledernas ledkapslar förtjockade. Hästen behandlades i båda hovleder fram och svarade bra på behandlingen kombinerad med sjukbeslag till återbesöket tre veckor senare.

Il-1 β hovled HF 8,1 ng/ml

Tabell 6. Lameness Locator protokoll KC 13. Fet markerat = hälta

KC 13	Head diff max	Standard avvikelse	Head diff min	Standard avvikelse
Initialt	13,255	6,318	11,928	2,819
Efter anestesi hovled HF	-1,33	6,639	3,104	5,363
	-1,614	4,865	2,676	5,559
	7,972	5,52	3,069	5,162

KC 14

Ponnyn var vid besöket cirka en halv grad halt rakt ut VB subjektivt bedömd. Detta konfirmerades med Lameness Locator och preciserar denna som en frånskjutshälta vänster bak på -9mm. Hättan släcktes efter bedövning av tarsocruralled och TMT och i samband med detta sågs en begynnande låggradig hälta i det andra bakbenet som uppgick till 4,7mm vid mätning tre (se tabell 7). Röntgen av hasledsområdet VB visade på liten entesiofyt i TMT, sannolikt utan klinisk relevans.

Il-1 β tarsocruralled VB not detectable

Il-1 β TMT VB not detectable

Tabell 7. Lameness Locator protokoll KC 14. Fet markerat = hälta

KC 14	Pelvis diff MAX	Standard avvikelse	Pelvis diff MIN	Standard avvikelse
Initialt	-9,238	6,519	2,056	4,536
Efter anestesi tarsocruralled+TMT VB	-8,882	7,27	3,36	3,723
	-4,024	5,392	4,69	2,976

KC 15

Hästen visade vid ett tidigare veterinärbesök en halv grads hälta VF och markering HB, subjektivt bedömd. Behandlades då VF efter lokalisation med hjälp av ledanestesier. Detta besök syftade till en fortsatt utredning HB efter två veckors konvalescens. Hästen är mätt med Lameness Locator vid båda besökstillfällena. Vid detta återbesök kvarstod enligt Lameness Locator en låggradig frånskjutshälta HB på 5mm. Efter anestesi av kotled HB minskade denna till 3,8mm och en tendens till isättningshälta VB på 3,4mm uppstod (se tabell 8). Ridprov efter lagd kotledsbedövning gav ett mycket positivt resultat (av ryttaren subjektivt bedömt). Hästen är inte röntgad i kotleden HB.

II-1 β kotled HB not detectable.

Tabell 8. Lameness Locator protokoll KC 15. Fet markerat = hälta

KC 15	Pelvis diff MAX	Standard avvikelse	Pelvis diff MIN	Standard avvikelse
Initialt	5,054	3,525	-2,969	2,5
Efter anestesi kotled HB	3,862	2,869	-3,376	1,5

Exkluderade

Hästarna KC2, KC3, KC7, KC8, KC10 är exkluderade ur studien. Dessa hästar hade antingen en för liten rörelseavvikelse på rakt spår (KC2, 3 och 7) eller en rörelseavvikelse som inte släcktes i den led synovia erhållits från. En av hästarna kan inte betraktas som normalprov då den subjektiva bedömningen och Lameness Locators objektiva bedömning inte överrensstämde (KC8). Hos en annan häst har fynd vid ett senare besökstillfälle indikerat patologi från led som vid mätningarna ansågs normal (KC10). Totalt 7st synoviaprover är tagna från gruppen med exkluderade hästar (se tabell 9).

Tabell 9. II-1 β exkluderade hästar. N.d. (not detectable)

	Led	II-1 β
KC 2	VF kotled	n.d
	HF kotled	n.d
KC 3	HF kotled	23 ng/ml
KC 7	VF karpalled övre	n.d
	VF karpalled mellersta	n.d
KC 8	HF hovled	n.d.
KC 10	VB tarsocruralled	5 ng/ml

KC2 var för låggradigt halt på rakt spår för att kunna tas med i studien.

KC3 är inte inkluderad i studien då hästens rörelseavvikelser enligt Lameness Locator inte var tillförlitliga. Hästen är dock värd att nämna då den hade riktigt hög koncentration II-1 β (23 ng/ml) i synovia från kotled höger fram korrelerat med en hög koncentration vita blodkroppar i synovia.

KC7 var för låggradigt halt på rakt spår för att kunna tas med i studien.

KC8 blev enligt Lameness Locator inte ohalt efter någon av de bedövningar som lagts höger fram (låg, hovled och abaxial). Snarare sågs en tendens till att hältan ökade under en period av undersökningen för att sedan sjunka till ett värde strax under initialhältan. Klinikveterinären bedömde att hovledsbedövningen hade god effekt tillsammans med den abaxiala ledningsanestesin och hästen behandlades i kron- och hovleder. Hästen hade vid återbesök svarat bra på denna behandling. Röntgenundersökning av hov- och kronledsområdet på båda fram visade en lindrig osteoartros kronleder samt entesiofyter på hovledens kollateralligamentfästen på kronbenet båda fram. Hästen har haft återkommande problem från området.

Hos KC10 gav lagda bedövningar vid besöket, vänster bak (knäled, tarsocruralled, TMT, ringblock) ,varken någon subjektiv eller objektiv (Lameness Locator) förbättring av hästens hälsa. Hästen har vid uppföljande besök undersökts med hjälp av scintigrafi utan signifikanta fynd. Vid ytterligare ett uppföljande besök befanns hästens tarsocruralled VB vara huvudfyndet men positivt behandlingsvar uteblev.

Normalprov

Hos hästarna benämnda KC1, KC4[#], KC6, KC11^{*}, KC16, KC17 och KC18 släcktes ej hältan i en eller flera av de leder som synovia aspirerats från. De anestesier som lagts är då en kontroll för att det vid undersökningstillfället inte fanns någon hältutlösande process i dessa leder. Totalt 16st synoviaprover från sådana leder har analyserats och inte i något fall har vi kunnat se detekterbara koncentrationer av II-1 β .

[#] KC 4 är inkluderad i studien då kotledsbedövning släckt hältan, övriga anestesier normalprov.

^{*} KC11 har uppmätt värde på 0,103 ng/ml II-1 β från övre karpalledsavdelningen, detta är under analysens gränsvärde.

II-1 β

Totalt 33 synoviaprover har analyserats. Av dessa sågs II-1 β i mätbar koncentration i 6 prov varav två prov låg under standardkurvan för beräkningar (värden under 2,3 ng/ml). Av återstående 4 prov är 2 inkluderade, en häst exkluderad på grund av alltför små rörelseavvikelser på rakt spår och hos en häst släcktes inte hältan från aktuell led. De mätbara koncentrationerna uppmättes i två kotleder, en tarsocruralled och en hovled. De två inkluderade hästarna med mätbara koncentrationer var av vitt skilda åldrar (4 respektive 17 år). För den yngre av hästarna var det första veterinärbesöket och den andra hade sedan två år tillbaka återkommande problem med hälsa och konstaterad artros i aktuell hovled. Hos de 6st inkluderade hästarna fann vi således mätbara koncentrationer av II-1 β i två leder (se tabell 10).

Tabell 10. Samtliga provtagna hästar.

	Ålder (år)	Hälta dgr*	OA #	Led	II-1β ng/ml	Status
KC 1	14	45	VF kotled	VF Karpus mell. VF Karpus övre	n.d n.d	normalprov normalprov
KC 2	11	14	Ej röntgad Ej röntgad	VF Kotled HF Kotled	n.d n.d	exkluderad exkluderad
KC 3	4	60	BF kotleder [”]	HF Kotled	23,0	exkluderad
KC 4	17	75		HF Kotled Ej röntgad HF Karpus mell. HF Karpus övre HF Hovled	n.d (0,02) n.d. n.d. n.d.	inkluderad normalprov normalprov normalprov
KC 5	20	41	Neg röntgen	VB Tarsocrural	n.d	inkluderad
KC 6	9	21		HF Karpus mell. Ej röntgad HF Karpus övre HF Kotled	n.d n.d n.d	normalprov normalprov normalprov
KC 7	16	45		VF Karpus mell. Kronleder BF VF Karpus övre VF Kotled	n.d n.d n.d	exkluderad exkluderad exkluderad
KC 8	9	14	Kronleder BF	HF Hovled	n.d	exkluderad
KC 9	8	110	Neg röntgen	HF Kotled	n.d	inkluderad
KC 10	8	30	Ej röntgad	VB Tarsocrural	5,0	exkluderad
KC 11	10	45	Neg röntgen Neg röntgen	HF Karpus mell. HF Karpus övre	n.d (1,3) n.d	normalprov normalprov
KC 12	4	25	Ej röntgad	HF Kotled	2,8	inkluderad
KC 13	17	45	Hovleder BF	HF Hovled	8,1	inkluderad
KC 14	10	30	Neg röntgen Neg röntgen [□]	VB Tarsocrural VB TMT	n.d n.d	inkluderad inkluderad
KC 15	15	45	Kotled VB	HB Kotled	n.d	inkluderad
KC 16	6	30		HF Hovled Ej röntgad HF Kotled HF Karpus mell. HF Karpus övre	n.d n.d n.d n.d	normalprov normalprov normalprov normalprov
KC 17	18	90	Ej röntgad	HB Kotled	n.d	normalprov
KC 18	3	42	Ej röntgad	VF Kotled	n.d	normalprov

* uppskattad tidsperiod i dagar sedan hältan/problemet upptäcktes

diagnostiserad osteoartros i provtagen eller annan led

” lindriga förändringar

□ entesiofyt TMT som antas sakna klinisk relevans

DISKUSSION

Den vanligaste orsaken till hälta hos häst, så har ledrelaterade hältor beskrivits. I denna studie var det endast 18 hästar som föll inom ramen för de inklusionskriterier som satts upp. Detta trots att cirka 75 hästar initialbedömts på hästkliniken UDS. Av dessa hästar har synovia analyserats från konfirmerat hältorsakande leder hos 6 hästar. Svårigheten att få ett större provmaterial kan delvis bero på patientunderlaget vid hästkliniken UDS, som ofta är av lite diffusare karaktär och inte har kunnat utredas i fält. Hade hästarna varit yngre högpresterande tävlingshästar hade fler hästar möjligen matchat inklusionskriterierna och därmed kunnat inkluderas i studien. Hos en dylik hästpopulation hade sannolikheten för kroniska förändringar varit mindre och mer akuta hältor vanligare.

En fråga som veterinärer ställer sig efter att ha lokaliserat en hälta till en specifik led är hur länge den patologiska processen pågått, och hur allvarlig och djupt gående denna skada är. En etablerad osteoartros med klassiska röntgenförändringar är relativt enkel att diagnostisera. Broskförändringar av olika svårighetsgrad är svårare att bedöma ur ett kliniskt perspektiv och det vore av nytta att ha en tillförlitlig diagnostisk markör för att enkelt upptäcka dessa förändringar tidigt. Idealiskt vore det dessutom om denna markör kunde användas för att kunna välja en lämplig behandlingsmetod, och undvika utveckling till osteoartros.

Redan 1981 föreslog Tew & Hotchkiss, efter att ha sammanfattat både egen och andras forskning på området, att det i synovia vore tänkbart att hitta en markör som skulle gå att använda som ett finkänsligt diagnostiskt verktyg. Förvisso var diagnosmetoderna inte lika förfinade som dagens ELISA-teknik, men tidiga studier för att utröna förekomst av Interleukin-1 och dess antagonist i leder hos häst finns från början av 90-talet. Morris et al. kunde redan 1990 konstatera att Interleukin-1 fanns närvarande i synovia hos fem hästar med diagnostiserad osteoartros (baserat på röntgenfynd och klinisk hälta som släckts med ledanestesi).

En generell slutsats för majoriteten av de hästar som ingått i vår pilotstudie är att mätbara IL-1 β koncentrationer i ledvätska är ovanliga. Detta mönster ses såväl i normala leder som i leder där lagda anestesier bekräftat att en smärtsam process pågår. I denna pilotstudie saknas därmed en väsentlig korrelation för att gradera och gruppera ledpatologier med IL-1 β som diagnostisk markör.

Förutom mycket sparsam förekomst av IL-1 β i de leder vi har tittat på finns även fallgropar med den utrustning vi använt för att bekräfta hälta i denna studie. Det största problemet är att många av hästarna varit mycket låggradigt halta, i synnerhet på rakt spår. Många av hästarna hade dessutom multipla problem med dubbelsidiga hältor som Lameness Locator har svårt att detektera och utvärdera.

Provtagna hästar

KC9 svarade mycket bra på de bedövningar som lagts och blev ohalt fram efter dessa. Sannolikt fanns någon patologisk process i hästens kotled vänster fram men inga detekterbara nivåer av IL-1 β sågs i synovia. Röntgen och

ultraljudsundersökningar gav inte någon definitiv diagnos i form av ledfyllnad eller tydliga tecken på osteoartros.

Detta skulle kunna relateras till att processen inte var helt akut och att Il-1 β gett plats för de sekundära mediatorerna som producerats som svar. En analys av exempelvis Il-6 som är en av de molekyler som produceras som svar på Il-1 och ökar över tid hade kunnat vara av intresse (Bertone et al. 2001). Detta skulle även kunna vara fallet för KC4, KC14 och KC15.

KC14 uppvisade en låggradig hälta VB. Hältan släcktes efter anestesi av tarsocruralled och TMT. Efter lagda anestasier VB sågs en begynnande hälta i det andra bakbenet. Röntgenundersökning VB utfördes och kunde inte påvisa några artrosförändringar i hasens leder. Däremot sågs en synovit i tarsocruralled VB men inga mätbara koncentrationer Il-1 β hittades i ledvätskan från denna led. Hästen hade inga kända hältproblem sedan tidigare men en anamnes som sträckte sig cirka en månad tillbaka i tiden.

Även KC4 hade en lång anamnes (mer än två månader) med diffusa problem. Liksom för KC14 kunde man hos KC4 inte hitta något avvikande med hjälp av röntgen som skulle kunna indikera artros. Hos KC4 återkom hältan HF drygt två timmar efter kotledsbedövning HF vilket kan tyda på att bedövningen i kotleden hade börjat gå ur.

KC15 hade en låggradig hälta HB som trots att den inte minskade till helt ohalt (3,8 mm jämfört med gränsvärdet 3,0 mm) ändå räknades som en signifikant förbättring. Detta till stor del sammanvägt med att hästen vid ridning nu kändes helt bra enligt djurägaren. Hästens smygande VB hälta som uppstod efter ledanestesi HB har sin förklaring i en redan diagnostiserad artros i kotleden på detta ben. Denna misstänks i sin tur vara orsakad av två osteokondrala fragment (som påvisats med röntgenundersökning tidigare under hästens liv). Kotleden höger bak är inte röntgad så artrosförändringar där går ej att utesluta. Hästen hade dessutom stått på allmänbehandling med NSAID efter föregående veterinärbesök som skedde drygt två veckor innan detta besök. Analysen av synovia från kotled HB visade inga detekterbara nivåer med Il-1 β , men relativt lång anamnes, konstaterad artros i kotled VB och NSAID behandling gör tolkningen svår. Sannolikheten att hästen har en tidig synovit är dock liten och mer kroniska förändringar sannolika.

KC5 har på grund av den akuta arten hos sin skada även ett konkret datum (41 dagar innan mätningarna) för när denna uppstod. Hos denna häst har man förutom röntgen vid skadetillfället (för att utesluta skelettskada) även gjort en uppföljande röntgenundersökning cirka ett halvår senare. Båda undersökningarna var utan anmärkning förutom mjukdelsansvällning av varierande grad. Hästen har direkt efter olyckan fått adekvat hantering med boxvila och behandlats både lokalt och systemiskt med NSAID. Då skelettskador kunnat uteslutas och hästen hanterats utmärkt under konvalescensperioden har mjukdelskadorna fått tid att läka utan att en självunderhållande inflammation propagerats. Det hade varit mycket intressant att ha ett synoviaprov från denna häst vid skadetillfället, för vid det uppföljande besöket en dryg månad senare sågs inte några detekterbara koncentrationer Il-1 β från den skadade tarsocruralleden. En synovit fanns närvarande även om denna minskat sedan skadetillfället.

KC12 är en ung häst där sannolikheten för kroniska förändringar innefattande även ledbrosk (osteoartros) är mycket liten. Analysresultat visade en förhöjd halt av Il-1 β (2,8 ng/ml) i kotled höger fram, vilket skulle kunna indikera en tidig synovit. Anmärkningsvärt nog svarade hästen inte tillfredställande på behandling, något som skulle kunna indikera på en okänd bakomliggande faktor såsom osteokondros.

Man har vid jämförande studier mellan olika patologiska tillstånd i hästleder funnit signifikant ökade halter Il-1 β i synovialmembran vid just osteokondros (Trumble T.N et al. 2001). Något som en röntgenundersökning kunnat fastställa alternativt utesluta hos KC12. Tittar man på mätningarna med Lameness Locator är det minvärdet som styr vilket framben hästen är halt på. Detta överstiger inte gränsvärdet samt genererar för höga standardavvikelser hos KC12, vilket kan vara en indikation på ett dubbelsidigt problem.

Den andra hästen med detekterbar koncentration av Il-1 β som är inkluderad i studien är KC13. Hästen är ett 17 år gammalt svenskt halvblod med återkommande håltproblem som relaterats till hovleder fram och har pågått i mer än 1,5 år. Hästen är röntgenundersökt i hovledsområdet så sent som några månader före våra mätningar, utan tecken på artros. Vid detta besök och förnyad röntgenundersökning ses artrosförändringar i hovlederna på båda hästens framben. Hästen har ett Il-1 β värde i synovia från hovled HF på 8,1 ng/ml. De palpatoriska fynden med förtjockade ledkapslar i hovlederna båda fram indikerar en kronisk synovit och ett dåligt fungerande synovialmembran. Inflammation kan ge en förtjockad ledkapsel som därefter inte kan sköta ledens homeostas. Ischemin som blir följden av ett dåligt fungerande synovialmembran kan leda till fibrosomvandling och en ännu sämre funktion. Detta leder till att brosket inte får tillräckligt med näring vilket kan initiera en produktion av proinflammatoriska cytokiner som kan starta en degenerativ process.

Hos de övriga två hästarna där Il-1 β kunnat detekteras i synovia fanns faktorer som gjort att de inte kunnat inkluderas i vår pilotstudie. KC3 som hade den absolut högsta koncentrationen av Il-1 β på 23 ng/ml i HF kotled, var den enda hästen med en förhöjd koncentration leukocyter i synovia. Hästen hade dessutom lindriga artrosförändringar i båda kotleder fram vilket skulle kunna indikera ett dubbelsidigt problem. Enligt tidigare redogörelse har Lameness Locator svårare att bedöma dubbelsidiga problem, något som kan ha påverkat att hästen enligt systemet ansågs ohalt rakt ut initialt. Den andra hästen som ej inkluderats i pilotstudien var KC10. Mätningarna med Lameness Locator gav inte något konkret svar på de bedövningar som lagts. Dessutom gjorde temperamentet hos hästen vissa avläsningar svåra då sedering krävdes för att lägga anesthesierna, detta medförde att en längre tid fick förflyta mellan mätningarna. Hästen var svårbedömd rent generellt med många komponenter involverade i håltan, flera ben samt eventuellt även rygg. Hästen svarade sedan inte tillfredställande på den behandling som gjordes. Vid ett senare besökstillfälle lokaliserade man tarsocruralleden vänster bak som ursprung till åtminstone delar av håltan. Hästen är ej röntgad i aktuell led men man har gjort en scintigrafisk undersökning utan anmärkningsvärda fynd. Analys på ledvätska från tarsocruralled VB ger Il- β -koncentration på 5 ng/ml.

II-1 β analys

Det finns en nyligen publicerad studie av Kamm et al. 2010 med liknande diagnostik som den vi använt till denna studie, baserad på detektion med monoklonala häst II-1 antikroppar. Den visar ett liknande mönster med ej detekterbara halter av II-1. Där fann man inte mätbara koncentrationer hos någon av de 31 sjuka och 21 friska leder som undersökts. Man drog där slutsatsen att diagnostiken ännu inte har den känsligheten (under 1 ng/ml) som krävs, snarare än att förekomsten kan antas vara noll. För TNF- α som ofta benämns som en synergistisk parhäst till II-1 fann man däremot signifikant ökade koncentrationer i sjuka leder jämfört med normala leder. I synovialmembran och brosk sågs ett ökat genuttryck för II-1 β men endast signifikant i brosk. Värt att nämna är att man i denna studie tittat på leder med konstaterad osteoartros i den sjuka gruppen.

I en annan studie av Alwan et al. där man jämfört normala leder och leder med konstaterad osteoartros, septisk artrit, osteokondros eller traumatisk artrit fann man signifikant ökade nivåer "Interleukin-1-lik" aktivitet i de patologiska lederna. Högsta halterna sågs hos de septiska artriterna. I serum kunde man däremot inte påvisa Interleukin-1 i något fall (Alwan et al. 1991). Förekomst av inhiberande verkan på human rekombinant II-1 har befunnits vara högre i synovia från normala hästleder samt tidigt i sjukdomsförloppet. Nedgången i denna inhiberande verkan ansågs lika viktig i patogenesen vid en kronisk ledsjukdom som en ökning av II-1 (May et al. 1992).

Bertone et al gjorde 2001 en jämförande studie på ett större hästmateriale med olika patologiska tillstånd och normala hästleder med avseende på ett flertal tänkbara markörer. Detta var innan häst Interleukin-1 β (även TNF- α och II-6) kunnat syntetiseras för diagnostiska ändamål, så human rekombinant II-1 β användes. Av denna orsak kunde man inte kvantifiera halterna mer än som relativ massa. Man fann precis som i andra studier en stark korrelation mellan II-1 β och halten av vita blodkroppar. För övrigt var II-1 β i enlighet med denna studie inte tillförlitlig för att tidsbestämma och gradera ledsjukdom annat än vid grava akuta tillstånd. Samma mönster sågs hos TNF- α . Dessutom fann man II-1 β i varierande grad även hos de hästar som ingick i normalgruppen, vilket teoretiskt kan bero på tidig ledskada eller åldersvariation. Att man hittade höga koncentrationer II-1 β vid akut allvarlig ledskada ansågs oväsentligt när man vill utvärdera en finkänslig diagnostisk markör, då denna skada är så uppenbar rent kliniskt för den undersökande veterinären. Interleukin-6 däremot fann man endast i de kliniskt sjuka lederna. II-6 produceras bland annat som svar på II-1. Man spådde därför större potential för II-6 som markör men faktum kvarstår att ett mönster hos II-1 (som troligen föregår stora delar av de kliniska symptomen) kan vara värdefullt. I denna studie kartlades även tre eikosanoider där PGE₂ var lika bra på att identifiera ledpatologi som II-6. Även eikosanoider produceras som svar på II-1. Slutsatsen var att II-6 och PGE₂ var bra indikatorer på ledsjukdom och att så inte var fallet för II-1 och TNF- α (Bertone et al. 2001).

SLUTSATSER

Ur denna pilotstudie för att utröna förekomst av Il-1 β i synovia vid hältorsakande patologiska tillstånd kan inga slutsatser dras. Hur Interleukin-1 i detalj påverkar patogenesen vid osteoartros och när i sjukdomspanoramata dess effekt är som störst är fortfarande en gåta. För att komma närmare sanningen krävs fler och mer omfattande studier från ett mer diversifierat hästmateriäl. Som tillägg till detta bör inbördes förhållande mellan agonist (Il-1) och antagonist (Il-1Ra) klarläggas hos häst, i synnerhet när etablerade behandlingsmetoder redan finns tillgängliga.

TACK

Ett stort tack vill jag rikta till min huvudhandledare **Karin Roethlisberger Holm** för all hjälp med provinsamling, trevliga dagar nere på hästkliniken. Samt inte att förglomma tålamod med de skriftliga bitarna som gjort det möjligt för mig att jobba parallellt.

Biträdande handledare **Marie Rhodin** som lärt mig allt om Lameness Locator och tålmodigt svarat på samma frågor gång på gång.

Maria Löfgren som analyserat synoviaproverna efter konstens alla regler.

Klinikveterinärerna **Malin Santesson** och **Ulrika Lagerquist** på hästkliniken UDS för att ni varit så vänliga och låtit oss använda era patienter och hästägare.

Till **alla trevliga hästägare** som så nyfiket låtit oss montera vår utrustning på sina hästar och sedan sprungit maratonlopp i hältgången för vår skull!

Sist och inte på något sätt minst ett fenomenalt stort tack till min vän **Annica** för fantastiska illustrationer. www.ancaelmberg.com

REFERENSER

- Alwan, W.H., Carter, S.D, Dixon, J.B., Bennett, D., May, S.A, Edwards, G.B. (1991) Interleukin-1-like activity in synovial fluid and sera of horses with arthritis. *Research in Veterinary Science*, 51, 72-77
- Arend, William P. (2002) The balance between Il-1 and Il-Ra in disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13, 323-340
- Arend, W.P., Malyak, M., Guthridge, C.J., Gabay, C. (1998) Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in biology. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 27-55
- Bertone, Alicia L. (2004) Joint physiology: response to exercise and training. In: *Equine sports medicine and surgery*, Hinchcliff, K.W., Kaneps, A.J., Geor, A.J. (Eds). Philadelphia: Saunders Elsevier Ltd., 152-160
- Bertone, A.L., Palmer, J.L., Jones, J. (2001) Synovial fluid cytokines and Eicosanoids as Markers of Joint Disease in Horses. *Veterinary Surgery*, 30, 528-538
- Hardy, J., Bertone, A.L., Weisbrode, S.E., Muir, .WW., O'Dorisio, T.M., Masty, J. (1998) Cell trafficking, mediator release, and articular metabolism in acute inflammation of innervated and denervated isolated equine joints. *AJVR*, 59, 88-100
- Kamm, J.L., Nixon, A.J., Witte, T.H. (2010) Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. *Equine Vet. J.*, 42 (8), 693-699
- Keegan, K.G., Sifuentes, S., Halliday, J., Messbarger, Q. (2009) *Lameness Locator training manual*. Equinosis LLC.
- McIlwraith, C. Wayne (1996) General pathobiology of the joint and response to injury. In: *Joint disease in the horse*, McIlwraith C. Wayne and Trotter Gayle W. (Eds). Philadelphia: W.B Saunders Company, 40-70
- May, S.A., Hooke, R.E., Lees, P. (1992) Inhibition of Interleukin-1 activity by equine synovial fluid. *Equine Vet. J.*, 24 (2), 99-102
- Morris, E.A. & Treadwell B.V. (1994) Effect of interleukin-1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *AJVR*, 55 (1), 138-146
- Morris, E.A., McDonald, B.S., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J. (1990) Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. *AJVR*, 51 (1), 59-64

- Palmer, J.L., Bertone A.L., Malemud C.J., Mansour J. (1996) Biochemical and biomechanical alterations in equine articular cartilage following an experimentally-induced synovitis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 4, 127-137
- Palmer, J.L. & Bertone, A.L. (1994) Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet. J.*, 26 (4), 263-277
- Platt, David (1996) Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: *Joint disease in the horse*, McIlwraith C. Wayne and Trotter Gayle W. (Eds). Philadelphia: W.B Saunders Company. 29-40
- Scott, I., Midha, A., Rashid, U., Ball, S., Walding, A., Kerry, P., Delaney, S., Cruwys, S. (2009) Correlation of gene and mediator expression with clinical endpoints in an acute interleukin-1 β -driven model of joint pathology. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17, 790-797
- Sellam, Jérémie & Berenbaum, Francis (2010) The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 6, 625-635
- Steel, Catherine M. (2008) Equine Synovial Fluid Analysis. *Vet. Clin. Equine*, 24, 437-454
- Sun, Hui B. (2010) Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1211, 37-50
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., Mobasher, A. (2009) The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 179, 10-24
- Tew, William P. & Hotchkiss, Robert N. (1981) Synovial fluid analysis and equine joint disorders. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1 (5), 163-170
- Tizard, Ian R. (1977) *Veterinary Immunology* 7th ed. Philadelphia, PA, 133-137
- Todhunter, Rory J. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints, In: *Joint disease in the horse*, McIlwraith C. Wayne and Trotter Gayle W. (Eds). Philadelphia: W.B Saunders Company. 1-28
- Trumble, T.N., Trotter, G.W., Thom Oxford, J.R., McIlwraith C.W., Cammarata, S., Goodnight, J.L., Billingham, R.C., Frisbie, D.D. (2001) Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *AJVR*, 62 (9), 1467-1477.