



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Glukokortikoiders effekt på brosk vid intraartikulär behandling av ledinflammation hos häst

Camilla Ahrenbring



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012:33

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2012



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Glukokortikoiders effekt på brosk vid intraartikulär behandling av ledinflammation hos häst

Effects of glucocorticoids on articular cartilage when treating osteoarthritis in horses

Camilla Ahrenbring

Handledare:

Carl Ekstrand, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2012

Omslagsbild: Cecilia Ahrenbring

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012:33
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: betametason, triamcinolon, metylprednisolon, ledbrosk, ledinflammation, osteoartrit, hyaluronsyra, proteoglykaner.

Key words: glucocorticoids, betamethasone, triamcinolone, methylprednisolone, articular cartilage, osteoarthritis, horse.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
LEDINFLAMMATION HOS HÄST	4
GLUKOKORTIKOIDERS ANTIINFLAMMATORISKA EFFEKT VID LEDINFLAMMATION	4
GLUKOKORTIKOIDERS EFFEKT PÅ LEDBROSK.....	5
<i>Introduktion</i>	5
<i>Betametason</i>	5
<i>Triamcinolon</i>	6
<i>Metylprednisolon</i>	7
DISKUSSION	10
LITTERATURFÖRTECKNING	14

SAMMANFATTNING

Ledinflammation är ett vanligt problem som orsakar smärta och nedsatt användbarhet hos häst. Intraartikulär behandling med glukokortikoider anses vara ett effektivt sätt att komma tillrätta med smärtan och inflammationen. Vid behandling av ledinflammation är det även önskvärt att främja ledbroskets funktion och det råder delade meningar kring vad glukokortikoider har för effekt på ledbrosk. Det finns tre föreningar (betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat, triamcinolonacetonid och metylprednisolonacetat) som är vanliga vid intraartikulär behandling av ledinflammation med glukokortikoider hos häst i Sverige. Litteraturstudiens syfte var att utvärdera huruvida det finns skadliga effekter på ledbrosk av dessa glukokortikoider i rekommenderade doser och i sådana fall om effekterna skiljer sig åt mellan föreningarna.

Betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat har ej visats påverka brosket negativt om det administreras i inflammerad led, även om de använda doserna överstiger de rekommenderade något. Däremot har det visats både *in vitro* och *in vivo* att broskmetabolismen förändras om normalt brosk behandlas med betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat.

Triamcinolonacetonid i rekommenderade doser har också visats påverka broskmetabolismen vid administrering i normal led. Även vid inflammation har påverkan på broskmetabolismen noterats *in vivo*, dock reversibelt. Förändringar i extracellulärt matrix har ej påvisats men däremot en förbättring av kondrocytmorfologin.

Negativa effekter av metylprednisolonacetat på brosk har ej visats om läkemedlet ges i samband med inflammation och i doser under 20-30 mg/led (vilket är en lägre dos än rekommenderat). Vid högre doser (inom rekommenderat intervall) är det visat att broskmetabolismen och morfologin hos brosket förändras, oavsett om metylprednisolonacetat administreras i samband med inflammation eller i normala leder.

Litteraturen indikerar att betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat och triamcinolonacetonid inte har negativa effekter på brosk då de används intraartikulärt för att behandla ledinflammation, förutsatt att rekommenderad dos inte överskrids. Metylprednisolonacetat har däremot visats påverka brosk negativt i rekommenderade doser. I doser under 20-30 mg/led som administreras i samband med inflammation, tycks inte heller metylprednisolonacetat påverka brosk negativt. Det vetenskapliga underlaget är dock bristfälligt och fler studier behövs.

SUMMARY

Osteoarthritis is a common problem among horses, and a cause for pain and reduced usability. Intra-articular injections of glucocorticoids are commonly used in equine practice to treat inflammation and reduce pain in joints. Another desired effect in joint therapy is support of the function and structure of articular cartilage. How glucocorticoids affect articular cartilage is not fully understood. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects on articular cartilage of three commonly used glucocorticoids (betamethasone acetate/betamethasone sodium phosphate, triamcinolone acetonide, and methylprednisolone acetate) and to assess possible differences between these substances.

According to the literature betamethasone acetate/betamethasone sodium phosphate did not seem to affect articular cartilage negatively, if administered in inflamed joints. This has been shown even with doses slightly higher than those recommended for clinical practice. However, if betamethasone acetate/betamethasone sodium phosphate was used on normal articular cartilage or in normal joints, articular cartilage metabolism changed.

It has been shown that triamcinolone acetonide caused a change in metabolism of normal articular cartilage. It has also been shown that triamcinolone acetonide in clinically recommended doses changed the metabolism of articular cartilage exposed for inflammation, although this effect seemed to be reversible. However, the content of extracellular matrix did not seem to change with triamcinolone acetonide given during inflammation and the chondrocyte viability appeared better than control according to histological examination.

Methylprednisolone acetate in clinically recommended doses has been shown to affect articular cartilage metabolism and morphology negatively, in inflamed as well as in normal joints. However, it has been shown that methylprednisolone acetate did not alter the metabolism or content of articular cartilage if given during inflammation in doses not exceeding 20-30 mg/joint.

In the studied literature, neither betamethasone acetate/betamethasone sodium phosphate nor triamcinolone acetonide appears to have profound negative influence on articular cartilage if administered during inflammation, provided that they are administered in clinically recommended dosages. Studies suggest that methylprednisolone acetate has negative effects on articular cartilage in clinically recommended doses. In lower doses (20-30 mg/joint) methylprednisolone acetate does not seem to affect articular cartilage in a negative way.

INLEDNING

Ledinflammation är en vanlig åkomma hos hästar. Det är en sjukdom med varierande etiologi som orsakar inflammation, smärta, håla och minskad rörlighet i den drabbade leden samt minskar hästens användbarhet. Medicinsk behandling av ledinflammation hos häst syftar till att minska inflammationen och smärtan i leden, samt inhibera de katabola processer som leder till nedbrytning av ledbrosk för att istället stimulera tillväxt av normalt ledbrosk.

Intraartikulär behandling med glukokortikoider är vanligt för att hämma inflammation, brosknedbrytande enzym och smärta i den drabbade leden. I dessa avseenden anses glukokortikoider effektiva. Det råder dock osäkerhet kring vad glukokortikoider egentligen har för effekter på ledbrosk. Vissa hävdar att behandling med glukokortikoider är skadligt för ledbrosk, vissa påstår att effekten är dosberoende eller att den skiljer sig mellan olika substanser, och åter andra hävdar att rädslan är överdriven.

Om det är så att glukokortikoider skadar ledbrosk så ökar detta risken för att hästen ska få återkommande besvär med lederna. Det är därför mycket viktigt att hästveterinärer som möter hältor i sitt arbete har god kunskap om eventuella skadliga effekter av glukokortikoider på ledbrosk samt eventuella skillnader i preparat och doser. Detta för att de ska kunna behandla med det preparat och den dos som bäst hämmar inflammationen utan att öka risken för ledbesvär på längre sikt.

Det finns tre preparat med olika beredningsformer av glukokortikoider, som är vanliga vid intraartikulär behandling av ledinflammation hos häst i Sverige. Dessa är Celeston® bifas® innehållandes betametonacetat och betametonidnatriumfosfat, Kenacort®-T som innehåller triamcinolonacetat, samt Depo-Medrol innehållandes metylprednisolonacetat. Läkemedelsverket (2010) anger dosrekommendationer för dessa. Det finns nämligen inga glukokortikoidpreparat godkända för intraartikulär behandling för veterinärmedicinskt bruk i Sverige, och därmed finns inga dosangivelser i FASS vet.

Syftet med den här uppsatsen är att utvärdera effekter på brosk av ovanstående tre föreningar, och huruvida det finns skillnader i dessa effekter emellan. Frågeställningen lyder således som följer: *"Är de glukokortikoider som vanligtvis används för intraartikulärt bruk i Sverige skadliga för ledbrosk? I sådana fall, vilken av dessa föreningar har minst skadlig effekt på ledbrosk i rekommenderade doser?"*

MATERIAL OCH METODER

Litteratursökning har gjorts i databaserna PubMed och Web of Knowledge. Sökord som använts är olika kombinationer av betamethasone OR methylprednisolone OR triamcinolone AND equine OR horse* AND cartilage OR synovial OR chondrocyte* OR proteoglycan* OR collagen* OR osteoarthritis OR joint* OR intra-articular OR pharmacokinetic* OR half-life. Jag har även utgått ifrån referenser till Läkemedelsverkets rekommendation om medicinsk ledbehandling av häst, samt vidare referenser utifrån de artiklar jag hittat enligt ovan. Begränsningar har gjorts till att bara läsa studier gjorda på häst eller hästbrosk, där behandling skett med ovan nämnda föreningar.

LITTERATURÖVERSIKT

Ledinflammation hos häst

Ledbrosk består till största delen av vatten (80 %) och i övrigt av kondrocyter, typ II-kollagen och proteoglykaner. Proteoglykaner ger brosket dess stötdämpande förmåga, genom att bibehålla vatteninnehållet i brosk. Proteoglykaner består av hyaluronsyra, coreprotein och glukosaminoglykaner (GAGs) såsom exempelvis kondroitinsulfat eller keratansulfat (McGavin & Zachary, 2007). Den vanligaste proteoglykanen i ledbrosk är aggregan (Kiani *et al.*, 2002). Kollagenfibrernas funktion är att ge elasticitet och stötdämpande förmåga hos brosket. Kondrocyter har som uppgift att producera extracellulärt matrix (proteoglykaner och kollagen) samt att producera enzym (matrixmetalloproteinaser, MMP) som bryter ned extracellulärt matrix. Matrixmetabolismen, dvs balansen mellan produktion och nedbrytning av extracellulärt matrix, regleras alltså via kondrocyter.

Ledbrosk innehåller inga nerver, blodkärl eller lymfkärl. Det största utbytet av näringsämnen och avfallsprodukter sker därför via diffusion till och från synovialvätskan. Leden måste belastas i lagom utsträckning för att detta utbyte ska fungera. Ständigt tryck eller inget tryck försämrar diffusionen (McGavin & Zachary, 2007).

Eftersom brosk saknar blodkärl är det aldrig direkt involverat i någon inflammatorisk process. Däremot involveras brosket indirekt via inflammation i t ex synovialmembran eller subkondralt ben. Inflammationsprocessen innefattar tillströmning av inflammatoriska celler som producerar bland annat interleukin-1 (IL-1) och tumor necrosis factor α (TNF α). IL-1 och TNF α ökar frisättningen av MMP, prostaglandiner och kväveoxid. MMP bryter ned extracellulärt matrix, medan prostaglandiner och kväveoxid hämmar proteoglykansyntes.

Broskdegeneration vid inflammation beror antingen på enzymatisk nedbrytning eller hämmad produktion av extracellulärt matrix (ECM). Oavsett så resulterar det i en minskning av ECM, vilket gör kondrocyterna känsligare för stötar. Nekros av kondrocyter leder till ytterligare minskad produktion av ECM (McGavin & Zachary, 2007).

Glukokortikoiders antiinflammatoriska effekt vid ledinflammation

Glukokortikoider verkar antiinflammatoriskt vid ledinflammation genom att minska genuttrycket för adhesionsmolekyler och därmed minska migrationen av inflammatoriska celler till leden. Glukokortikoider minskar även produktionen av proinflammatoriska mediatorer, bland annat IL-1, TNF α , cyklooxygenas-2 och därigenom prostaglandiner, samt kväveoxid. Dessutom minskas produktionen av histamin och därmed hämmas vasodilatation, vilket leder till mindre ödem. Glukokortikoider ökar även produktionen av antiinflammatoriska mediatorer (Rang *et al.*, 2011).

Glukokortikoiders effekt på ledbrosk

Introduktion

I studierna har olika markörer använts som mått på broskets struktur och viabilitet. Minskad syntes samt ökad nedbrytning av makromolekyler anses negativt, liksom om innehållet av makromolekyler i ledbrosk minskar. Mängden proteoglykaner i ledbrosk kan uppskattas genom att mäta mängden uronsyra i brosket, då uronsyra ingår i kondroitinsulfat. Infärgning med safranin används som mått på mängden GAGs i ledbrosk. Detta kan även mätas med *dimethyl methylene blue dye binding method* (DMMB).

Ökat innehåll av makromolekyler i ledvätska kan bero på ökad nedbrytning, ökad syntes eller på relativ minskning av mängden ledvätska. Ökning av proteoglykaner i ledvätska föreslås bero på ökad nedbrytning av dessa i extracellulärt matrix (Ronéus *et al.*, 1993) medan ökning av hyaluronsyra (HA) föreslås bero på ökad syntes av HA (Ronéus *et al.*, 1993; Frisbie *et al.*, 1997) eller minskad mängd ledvätska (Frisbie *et al.*, 1998). Hyaluronsyra produceras även av synoviocyter (Rang *et al.*, 2011).

Chondrone formation innebär en uppdelning av kondrocyter inom lakunerna. Detta ses histologiskt och anses negativt.

Betametason

Det läkemedel som vanligtvis används i Sverige är Celeston® bifas®. Detta innehåller en kombination av betametasondinatriumfosfat och betametasonacetat i koncentrationen 6 mg/ml (Läkemedelsindustrin, 2012). Rekommenderad dos är 3-18 mg/led. Rekommendationen gäller vid en behandling, men behandlingen kan vid behov upprepas upp till tre gånger (Läkemedelsverket, 2010).

In vitro hämmades proteoglykansyntesen i brosk med behandling av betametason i koncentrationer över 1 µg/ml (Freaan *et al.*, 2002). Koncentrationer under 1 µg/ml hade varken positiva eller negativa effekter på proteoglykansyntesen.

In vivo har betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat visats ha både positiva och negativa effekter på brosk, vid användandet av högre doser än vad som numera rekommenderas (tabell 1). Vid behandling med betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat intraartikulärt i normala leder ökade mängden proteoglykaner i ledvätska efter injektion av betametason, upp till 20 gånger så mycket. Sex veckor efter avslutad behandling var innehållet av proteoglykaner i ledvätska åter på kontrollnivå (Ronéus *et al.*, 1993). Foland *et al.* (1994) visade dock att betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat ej påverkade mängden uronsyra i ledbrosk vid experimentellt inducerad osteoartrit. Foland *et al.* (1994) såg heller inga signifikanta skillnader mellan behandlad och kontralateral led vad gäller morfologiskt synliga skador på brosk, histologisk undersökning av fibrillering, nekros av kondrocyter, *chondrone formation* eller infärgning med safranin. Mängden hyaluronsyra i ledvätska ökade efter injektion av betametasonacetat/ betametasondinatriumfosfat, för att sedan återvända till kontrollnivå (Ronéus *et al.*, 1993).

Tabell 1. Effekter efter intraartikulär administrering av betametasonacetat/betametason-dinatriumfosfat in vivo

Studie	Dos	Antal hästar	Ledstatus	Positiva effekter	Negativa effekter
Ronéus <i>et al.</i> , 1993	24 mg/led 3 tillfällen*	2	Normal	Hyaluronsyra i ledvätska ↑	Proteoglykaner i ledvätska ↑
Foland <i>et al.</i> , 1994	39,75 mg/led 2 tillfällen**	18	Inflammerad	Uronsyra opåverkat. Safranin opåverkat. Opåverkat makroskopiskt och mikroskopiskt.	Ej visade.

*i radiokarpalled samt metakarpofalangealled. **i interkarpalled.

Triamcinolon

Det läkemedel som används i Sverige vid intraartikulär behandling av ledinflammation på häst är Kenacort®-T, vilket innehåller triamcinolonacetonid (TA) i en koncentration av 10 mg/ml eller 40 mg/ml. Rekommenderad dos är 6-18 mg/led. Rekommendationen gäller vid en behandling, men behandlingen kan vid behov upprepas upp till tre gånger (Läkemedelsverket, 2010).

Vid intraartikulär injektion med TA distribuerades läkemedlet snabbt från synovialvätska till blod. Det försvann alltså snabbt från leden i en initial fas. Koncentrationen i blod uppnådde maximum 4,3 ng/ml efter fyra timmar. Fem av sju hästar hade låga nivåer av TA i synovialvätskan dag fyra, medan övriga två hästar hade låga men detekterbara nivåer till och med dag 15. Den individuella variationen var alltså stor. Efter injektion av 6 mg TA minskade koncentrationen i synovialvätska till i snitt 7,5 µg/ml efter ett dygn och 10 ng/ml efter fyra dygn (Chen *et al.*, 1992).

In vitro har både normalt brosk samt brosk med inducerad inflammation studerats. GAG-innehållet i brosk förblev oförändrat efter behandling med TA på normalt brosk (Bolt *et al.*, 2008; Busschers *et al.*, 2010) samt vid behandling av TA+lipopolysackarid (LPS) (Bolt *et al.*, 2008). I en annan studie minskade däremot GAG-innehållet efter tillsats av IL-1 och sedan ytterligare då även TA tillfördes. Dessutom hämmades GAG-syntesen med IL-1, vilket förstärktes då TA tillfördes. I samma studie förstärktes GAG-nedbrytningen orsakad av IL-1 efter tillförelse av TA (Dechant *et al.*, 2003), medan ingen förändring av GAG-nedbrytningen orsakad av IL-1 noterades efter TA i en annan studie. Enbart TA ökade däremot nedbrytningen av GAGs jämfört med kontroll (Busschers *et al.*, 2010). Histologiskt så minskade TA antalet tomma lakuner och pyknotiska kärnor på både normala kondrocyter och kondrocyter behandlade med LPS (Bolt *et al.*, 2008).

In vivo har det visats att broskmetabolismen förändras med injektioner av TA i rekommenderade doser (Frisbie *et al.*, 1997; Céleste *et al.*, 2005) (tabell 2). I normala leder ökade nedbrytningen av typ II kollagen, aggrecan och kondroitinsulfat i behandlad led

jämfört med kontralateral led (Céleste *et al.*, 2005) och syntesen av GAGs ökade jämfört med både kontroll och behandlad, inflammerad led (Frisbie *et al.*, 1997). Effekterna av TA på de tre första parametrarna (dvs typ II kollagen, aggregan och kondroitinsulfat) var reversibel, nedbrytningen av aggregan minskade till och med något efter avslutad behandling. Syntes av typ II-kollagen ökade i både behandlad led och kontralateral led, jämfört med innan behandling (Céleste *et al.*, 2005).

Innehållet av GAGs i ledvätska ökade efter TA-behandling i normal led jämfört med kontroll. Även i leder med inflammation ökade innehållet av GAGs i ledvätska efter behandling, men denna effekt var reversibel och återgick till ursprungsnivåer. Infärgning med DMMB förändrades ej efter behandling med TA. Däremot minskade infärgningen med safranin om TA injicerades i normal led. Ingen skillnad i safranininfärgning noterades mellan kontroll och behandlad, inflammerad led. Mängden hyaluronsyra i ledvätska ökade efter injektion av TA. Histologiskt noterades mindre patologiska förändringar i inflammerad led efter injektion av TA jämfört med placebobehandlad led (Frisbie *et al.*, 1997).

Tabell 2. Effekter efter intraartikulär administrering av triamcinolonacetamid *in vivo*

Studie	Dos	Antal hästar	Ledstatus	Positiva effekter	Negativa effekter
Frisbie <i>et al.</i> , 1997	12 mg/led*	18	Inflammerad/ normal	Förbättring histologiskt. DMMB oförändrat Safranin oförändrat (om inflammation) Hyaluronsyra i ledvätska ↑	GAGs i ledvätska ↑ Safranin ↓ (om normal led)
Céleste <i>et al.</i> , 2005	12 mg/led, 3 tillfällen**	10	Normal	Syntes av typ II kollagen ↑	Nedbrytning av typ II kollagen ↑ Nedbrytning av aggregan ↑ Nedbrytning av kondroitinsulfat ↑

* i interkarpalled. ** i radiokarpalled.

Metylprednisolon

Vid behandling av ledinflammation hos häst med metylprednisolon är Depo-Medrol det vanligaste läkemedlet, vilket innehåller metylprednisolonacetat (MPA) i koncentrationen 40 mg/ml. Den rekommenderade doseringen är 40-120 mg/led, vilket gäller vid en behandling som vid behov kan upprepas upp till tre gånger (Läkemedelsverket, 2010).

Vid intraartikulär administrering av metylprednisolonacetat hydrolyseras MPA till den aktiva formen metylprednisolon (MP) i synovialvätskan. MPA var detekterbart i ledvätska i upp till 6 dygn (Autefage *et al.*, 1986). MP var detekterbart i ledvätska i upp till 39 dygn enligt Autefage *et al.* (1986), men bara i upp till 10 dygn enligt Lillich *et al.* (1996). MPA var ej detekterbart i plasma. Det var däremot MP i ett dygn, i koncentrationer upp till 5 ng/ml (Autefage *et al.*, 1986). Varken MPA eller MP påträffades i kontralateral led (Lillich *et al.*, 1996).

In vitro har en studie visat på dosberoende effekter av MPA, men i motsats till hypotesen att lägre doser glukokortikoider är mindre skadliga för brosk, så visade sig höga doser MPA ha minst negativa effekter på broskexplantat (Dechant *et al.*, 2003). IL-1 hämmade syntesen av GAGs, hämningen förstärktes av MPA i alla testade koncentrationer (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml) men hämningen var minst påtaglig med den högsta koncentrationen. Nedbrytningen av GAGs ökade med IL-1. Tillförsel av MPA påverkade ej denna ökning, annat än i den högsta koncentrationen då nedbrytningen minskade. Däremot sågs ökad förlust av GAGs till mediet efter behandling med MPA oavsett koncentration, jämfört med enbart IL-1. Innehållet av GAGs i brosk minskade med IL-1, MPA påverkade ej denna minskning förutom i den högsta koncentrationen då GAG-innehållet ökade, dock ej till kontrollnivå.

Ett flertal studier har gjorts *in vivo* på metylprednisolonacetat (tabell 3). Makroskopiskt har det i två studier inte påvisats någon skillnad mellan led behandlad med MPA och kontralateral led (Chunekamrai *et al.*, 1989; Trotter *et al.*, 1991) medan det i en annan studie noterats mer broskskador och erosioner makroskopiskt i MPA-behandlad led jämfört med kontroll (Frisbie *et al.*, 1998). Minskat utrymme mellan ledytter i behandlad led har visats med hjälp av röntgen vilket föreslås bero på minskat innehåll av proteoglykaner, mindre vatteninnehåll och därmed kompression då leden belastas (Trotter *et al.*, 1991).

Innehållet av proteoglykaner visades nämligen minska efter injektioner av MPA i normal led (Chunekamrai *et al.*, 1989). Detta stärks av Trotter *et al.* (1991) som visade att mängden uronsyra minskade i behandlad led. Proteoglykansyntesen sjönk i normal, behandlad led (Chunekamrai *et al.*, 1989; Todhunter *et al.*, 1998). Enligt Chunekamrai *et al.* (1989) var denna minskning reversibel, även om den inte hann upp till baslinjevärdet under studiens åtta veckor. Todhunter *et al.* (1998) noterade ingen minskning av proteoglykansyntesen jämfört med kontroll, om MPA administrerades i samband med inflammation. Aggrekansyntesen förändrades inte med injektion av MPA jämfört med kontroll, varken i normal eller inflammerad led (MacLeod *et al.*, 1998). Mängden proteoglykaner i ledvätska ökade efter injektioner av MPA, dock ej lika mycket som efter behandling med betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat i samma studie. Ökningen var reversibel och återvände till kontrollnivå sex veckor efter den sista behandlingen (Ronéus *et al.*, 1993).

Histologiska skillnader mellan MPA och kontralateral led vad gäller nekros, *chondrone formation*, eller fibrillering kunde i en studie inte påvisas (Trotter *et al.*, 1991). Dock har försämring med MPA jämfört med kontroll noterats i andra studier, avseende fibrillering, nekros, och *chondrone formation* (Frisbie *et al.*, 1998) respektive hypocellularitet, tomma lakuner, små kondrocyter samt infärgning med hematoxylin-eosin (Chunekamrai *et al.*, 1989). Infärgning med safranin minskade efter behandling med MPA (Chunekamrai *et al.*, 1989; Trotter *et al.*, 1991). Frisbie *et al.* (1998) såg dock ingen skillnad i innehåll av GAGs i ledbrosk mellan behandlad led och kontroll. Syntesen av GAGs minskade med MPA, och innehållet av GAGs ökade i ledvätska efter behandling (Frisbie *et al.*, 1998).

Kollagensyntesen förändrades inte jämfört med kontroll om MPA administrerades i samband med inflammation (MacLeod *et al.*, 1998; Todhunter *et al.*, 1998), men ökade efter behandling med MPA i normal led (Todhunter *et al.*, 1998). Även Trotter *et al.* (1991) föreslog denna effekt, men de anser att resultatet troligtvis beror på en relativ minskning av mängden proteoglykaner. Andra studier föreslår dock en minskning av kollagensyntesen i normal led efter injektion av MPA, jämfört med kontralateral led respektive kontroll

(Chunekamrai *et al.*, 1989; MacLeod *et al.*, 1998). Kollageninnehållet förändrades inte efter behandling med MPA. Vatteninnehåll ökade efter behandling med MPA, men återgick till kontrollnivåer inom fyra veckor efter sista behandlingen (Chunekamrai *et al.*, 1989).

Mängden hyaluronsyra i ledvätska ökade med MPA, men reversibelt (Ronéus *et al.*, 1993; Frisbie *et al.*, 1998). Minskad mängd ledvätska visades i två studier efter MPA (Chunekamrai *et al.*, 1989; Frisbie *et al.*, 1998). I en annan studie noterades dock ingen förändring av mängden ledvätska (Ronéus *et al.*, 1993).

Tabell 3. Effekter efter intraartikulär administrering av metylprednisolonacetat *in vivo*

Studie	Dos	Antal hästar	Ledstatus	Positiva effekter	Negativa effekter
Chunekamrai <i>et al.</i> , 1989	120 mg/led 8 ggr, samt 120 mg/led*	8	Normal	Oförändrat makroskopiskt Oförändrat kollageninnehåll	Proteoglykaninnehåll↓ Proteoglykansyntes↓ Safranin↓ Kollagensyntes↓ Sämre mikroskopiskt Ledvätska↓
Trotter <i>et al.</i> , 1991	100 mg/led 3 ggr**	4	Normal	Oförändrat histologiskt Kollagensyntes↑?	Uronsyra↓ Safranin↓ Utrymme mellan ledytor↓
Ronéus <i>et al.</i> , 1993	80 mg/led 2 ggr***	2	Normal	Hyaluronsyra i ledvätska↑	Proteoglykaner i ledvätska↑
Frisbie <i>et al.</i> , 1998	100 mg/led 2 ggr****	18	Inflammerad	Oförändrat GAGinnehåll Hyaluronsyra i ledvätska↑?	Sämre makroskopiskt Sämre mikroskopiskt GAGs i ledvätska↑ GAGsyntes↓ Ledvätska↓
MacLeod <i>et al.</i> , 1998	20-30 mg/led**** **	10	Inflammerad/ normal	Oförändrat aggregatinnehåll Oförändrad kollagensyntes (om inflammation)	Kollagensyntes↓(om normal led)
Todhunter <i>et al.</i> , 1998	20-30 mg/led**** ***	10	Inflammerad/ normal	Oförändrad proteoglykansyntes (om inflammation) Oförändrad kollagensyntes (om inflammation). Kollagensyntes ↑ (om normal led).	Proteoglykansyntes↓ (om normal led)

* i radiokarpalled samt interkarpalled. ** i interkarpalled. *** i radiokarpalled samt metakarpofalangealled. **** i interkarpalled. ***** i radiokarpalled samt interkarpalled. ***** i radiokarpalled samt interkarpalled.

DISKUSSION

Det finns inga studier gjorda på farmakokinetiken hos häst för betametason i den beredningsform som används i Celeston® bifas®. Betametasondinatriumfosfat är en lättlöslig ester och betametasonacetat en svårlöslig ester. Därmed uppnås snabb initial effekt av betametasondinatriumfosfat och dessutom en depå av betametasonacetat som ger en långvarig effekt. På människa sägs effekten vara i upp till fyra veckor (Läkemedelsindustrin, 2012). Jämfört med farmakokinetiken för metylprednisolonacetat och triamcinolonacetamid, så är det längre än vad triamcinolonacetamid är detekterbart i led hos häst (15 dagar) (Chen *et al.*, 1992), längre än det intervall för metylprednisolonacetat som Lillich *et al.* (1996) föreslår (10 dagar), men inom det intervall då metylprednisolonacetat är detekterbart i injicerad led enligt Autefage *et al.* (1986) (39 dagar). Det är dock viktigt att komma ihåg att det var få individer som hade detekterbart läkemedel i leden såpass länge i respektive studie. Dessutom säger detta ej per automatik att metylprednisolonacetat har längre duration än triamcinolonacetamid eller betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat. Glukokortikoider utövar till stor del sina effekter på gennivå vilket medför att effekterna kan kvarstå efter det att preparatet eliminerats från behandlingsstället (Rang *et al.*, 2011). Det kan spekuleras i huruvida Celeston® bifas® har kortare duration eftersom det är det enda av de studerade preparaten som innehåller en blandning av lättlösliga och svårlösliga estrar, till skillnad från övriga som enbart innehåller svårlösliga. Det behövs studier som undersöker detta.

Olika metoder har använts för att uppskatta förändringar hos brosket efter behandling med glukokortikoider. Detta minskar säkerheten med vilken frågeställningen kan besvaras. Att ökning av makromolekyler i synovialvätska ges olika betydelse får anses underligt. Författarnas egen syntes ligger till grund för huruvida ökningen i ledvätska har bedömts som positiv eller negativ, och adekvata belegg för detta tycks saknas. Dessa parametrar bör därför bedömas med viss skepsis. Vad gäller studien av Frisbie *et al.* (1997) där en ökning av GAGs i ledvätska noterades efter injektion av TA både i normal samt inflammerad led, så torde ökningen i inflammerad led bero på ökad nedbrytning eftersom ökad syntes ej noterades i det fallet. Vad gäller ökning av hyaluronsyra i ledvätska, kan detta bero av påverkan på synoviocyter likväl som kondrocyter.

In vitro bör det framhåvas överlag att läkemedlet ej kan elimineras, utan durationen blir så lång som den tid forskaren väljer att inkubera cellerna. Det faktum att kondrocyter är exponerade för en oföränderlig dos glukokortikoider *in vitro*, samt att brosknedbrytning påverkas av en rad mediatorer (IL-1, TNF α , prostaglandiner, MMP, m fl) varav endast någon eller några används för att simulera inflammation i studierna *in vitro*, talar för att viss skepsis bör tillämpas då man avläser försök gjorda *in vitro*. Försök *in vivo* bör ges större vikt i bedömningen av relevanta resultat, i frågan huruvida glukokortikoider påverkar ledbrosk negativt.

Frean *et al.* (2002) visade negativa effekter på broskmetabolismen av låga doser betametason *in vitro*. Tre försök genomfördes som alla stärkte detta resultat, dock användes endast brosk från en häst i vardera försök i studien. Vad gäller försök *in vitro* på triamcinolon talar två

studier för att substansen ej påverkar brosk negativt vid inducerad inflammation (Bolt *et al.*, 2008; Busschers *et al.*, 2010). De har båda använt brosk från fler hästar än Dechant *et al.* (2003), som tvärtom visade att triamcinolon påverkar brosk negativt även vid inflammation. I samma studie utvärderades även effekten av metylprednisolon på inflammerade broskceller och resultaten visar att metylprednisolon i högre koncentrationer är mindre skadligt för broskceller än både höga och låga koncentrationer triamcinolon. I denna studie användes brosk från endast en till två hästar i studiens olika försök. Nämnas bör att de själva ifrågasätter den kliniska relevansen av sin studie samt av försök *in vitro* överlag, vad gäller glukokortikoiders effekt på ledbrosk. Busschers *et al.* (2010) har använt lägre doser än Dechant *et al.* (2003) och Bolt *et al.* (2008) vilka har använt likvärdiga doser.

Få studier är gjorda vad gäller effekterna *in vitro* för alla dessa preparat och djurmaterialet är litet. Det verkar som att triamcinolon *in vitro* ej påverkar brosk negativt, vid inducerad inflammation. I övrigt bör slutsatser dras med försiktighet och resultat *in vivo* bör tas i större beaktande.

In vivo visade Ronéus *et al.* (1993) på reversibla negativa effekter av betametonacetat/betametasondinatriumfosfat på proteoglykanmetabolismen, dock på få hästar och normalt brosk. Nedbrytningen av proteoglykaner ökade i denna studie mer efter behandling med betametonacetat/betametasondinatriumfosfat än efter behandling med metylprednisolonacetat. Foland *et al.* (1994) som visade att betametonacetat/betametasondinatriumfosfat ej påverkar ledbrosk negativt, studerade tolv hästar med experimentellt inducerad osteoartrit. I båda dessa försök användes högre doser än vad Läkemedelsverket (2010) rekommenderar.

Vad gäller triamcinolonacetamid så visade Céleste *et al.* (2005) att broskmetabolismen påverkades efter behandling. Denna studie gjordes dock på normalt brosk, 12 mg TA injicerades tre gånger i en led hos tio hästar. Frisbie *et al.* (1997) använde sig däremot av osteokondrala fragment för att inducera inflammation. 18 hästar användes varav sex stycken fick TA injicerat i normal led, sex stycken i fragmenterad led (12 mg/led) och sex stycken fick placebo. Denna studie visade visserligen att nedbrytningen av GAGs ökade reversibelt om TA administrerades i samband med inflammation, men i övrigt påverkades inte brosket negativt efter TA-behandling i inflammerad led. Histologiskt visades till och med en eventuell broskskyddande effekt. Att broskmetabolismen förändrades kan medföra en ökad känslighet hos kondrocyterna för belastning. I studien motionerades dock hästarna i alla gångarter och kondrocytviabiliteten var trots detta hög vid histologisk bedömning. Detta tyder på att eventuell effekt av TA på broskmetabolismen ej påverkar kondrocyterna negativt på längre sikt, eller ökar risken för skada på dessa. En intressant frågeställning är om skillnaden i resultat beror på att Frisbie *et al.* (1997) ej upprepade behandlingen, dvs att den totala exponeringen för läkemedel var lägre, eller på att effekten av triamcinolonacetamid på kondrocyter faktiskt inte är skadlig då substansen administreras i samband med inflammation?

Metylprednisolon är den förmodligen mest omdiskuterade substansen och här finns också flest artiklar att läsa. Det finns två studier *in vivo* som visar att metylprednisolonacetat ej

påverkar broskmetabolismen negativt vid administrering i samband med inflammation (MacLeod *et al.*, 1998; Todhunter *et al.*, 1998). Båda dessa studier har använt sig av 10 hästar där inflammation inducerades med LPS, och behandling skedde med 20-30 mg MPA/led dvs en lägre dos än rekommenderat. Nämnas bör att Todhunter *et al.* (1998) injicerade MPA endast två dagar innan avlivning, vilket kan tyckas kort för ett läkemedel som påträffats i leden upp till 39 dagar (Autefage *et al.*, 1986). För studiens relevans talar att de markörer som studerades gällde broskmetabolismen och dessa hann förändras i normal led trots kort observationstid. Det är dock möjligt att de missade förändringar i effekten på broskmetabolismen på längre sikt, t ex så kan den förändrade metabolismen i normal led efter MPA-behandling ha varit reversibel.

Även Frisbie *et al.* (1998) studerade effekterna av MPA i samband med experimentellt inducerad osteoartrit. 18 hästar studerades varav sex stycken fick MPA injicerat i inflammerad led, sex stycken i normal led och sex stycken fick placebo. Han använde sig av högre doser som dock ligger inom det rekommenderade intervallet (100 mg/led vid två behandlingstillfällen) och visade på negativa effekter av behandling med MPA på både broskmetabolism och kondrocytmorfologi. Alla hästar motionerades efter injektion. I diskussionen till denna studie framhävs att brosket blev sämre histologiskt efter MPA-behandling, jämfört med vad Frisbie *et al.* (1997) visat efter TA-behandling då histologin förbättrades. Dessutom diskuteras att erosioner i hela brosklagret noterades makroskopiskt efter injektion av MPA. Detta är sämre än vad Frisbie *et al.* (1997) noterat efter TA-behandling då endast partiella erosioner iaktogs, eller vad Foland *et al.* (1994) beskrivit efter behandling med betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat då inga erosioner noterades.

När MPA har administrerats i normal led har utslaget till största del blivit negativt vad gäller både metabolism och kondrocytviabilitet. Doserna har i dessa försök legat i dosrekommendationens mellersta till övre spann (Chunekamrai *et al.*, 1989; Trotter *et al.*, 1991; Ronéus *et al.*, 1993). Chunekamrai *et al.* (1989) upprepade administreringen fler gånger än rekommenderat (åtta). Författarna diskuterade här att det ökade vatteninnehållet som noterades i behandlad led tyder på en förändrad kollagenstruktur, eftersom kollagenet i normala fall ska vara såpass fast att kondrocyterna ej kan ta in mer vätska. De menar att detta ökar risken för att kondrocyterna skadas vid belastning.

Intressant är att metylprednisolonacetat rekommenderas i betydligt högre doser än triamcinolonacetonid och betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat. Metylprednisolon är lika potent som triamcinolon men mindre potent än betametason (Rang *et al.*, 2011). Det tycks inte finnas några studier som visar vilken koncentration glukokortikoider i ledvätskan som hämmar inflammation. Det behövs studier som fastställer det terapeutiska fönstret och vilka doser som ger sådana koncentrationer, för alla intraartikulära glukokortikoider. Om dosen metylprednisolonacetat kan sänkas med bibehållen antiinflammatorisk verkan, kanske de skadliga effekterna av detta läkemedel på ledbrosk uteblir? Denna hypotes stärks av Todhunter *et al.* (1998) och MacLeod *et al.* (1998), men det behövs ytterligare studier som undersöker frågan.

Sammanfattningsvis tyder studier på att betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat troligtvis ej påverkar brosk signifikant om det ges i samband med inflammation. Det är däremot visat att broskmetabolismen påverkas om betametasonacetat/betametason-

dinatriumfosfat administreras i normal led, åtminstone vid upprepad administrering. Det senare gäller även för triamcinolonacetamid. Också vid inflammation kan triamcinolonacetamid påverka broskmetabolismen. Litteraturen tyder dock på att detta är reversibelt och andra markörer indikerar att brosket ej skadas vid denna användning av triamcinolonacetamid, åtminstone inte om behandling sker endast en gång och i rekommenderade doser. Studier indikerar att metylprednisolonacetat som ges i rekommenderade doser påverkar broskmetabolismen negativt. Däremot så förändras sannolikt inte broskmetabolismen då metylprednisolonacetat administreras i lägre doser (20-30 mg/led) i samband med inflammation.

En förutsättning för att glukokortikoider ej ska verka skadligt på ledbrosk tycks alltså vara att de administreras i samband med inflammation. Betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat och triamcinolonacetamid bör administreras i rekommenderade doser, och metylprednisolonacetat bör administreras i lägre doser än rekommenderade (under 20-30 mg/led) för att brosket inte ska påverkas negativt.

Det bör nämnas att alla ovanstående studier *in vivo* har injicerat läkemedel i interkarpalleler eller radiokarpalleler. Doserna som diskuteras ovan gäller alltså för leder i motsvarande storlek. För mindre leder kan dosen behöva minskas. Ronéus *et al.* (1993) injicerade dock betametasonacetat/betametasondinatriumfosfat samt metylprednisolonacetat även i metakarpofalangealled.

Att broskmetabolismen påverkas vid höga doser glukokortikoider eller vid behandling av en icke inflammerad led, betyder inte per automatik att risken för framtida ledbesvär ökar. Däremot så styr broskmetabolismen vad brosket har för egenskaper och hur väl det fungerar. Brosket riskerar att bli känsligare för mekanisk påfrestning om broskmetabolismen förändras (Rang *et al.*, 2011). Det är därför viktigt med återhämtning och rehabilitering efter intraartikulär behandling med glukokortikoider. Då hinner eventuella förändringar i broskmetabolismen återgå till det normala, och den eventuellt ökade risken för skador på ledbrosket minimeras.

Det behövs absolut fler studier överlag för att ytterligare studera effekter av glukokortikoider på ledbrosk. Framförallt skulle det vara intressant med en jämförande studie av ovanstående föreningar, där de studeras under samma förhållanden och där samma markörer som mått på broskskada utvärderas för alla substanser.

Konklusionen utifrån litteraturgenomgången är att de beredningsformer som här studerats av betametason och triamcinolon troligtvis ej påverkar brosk negativt. Detta förutsatt att de administreras i kliniskt rekommenderade doser vid inflammation. Studier indikerar att inte heller metylprednisolonacetat påverkar brosk negativt, i låga doser (under 20-30 mg/led) som ges i samband med inflammation. Däremot indikeras negativ påverkan på brosk av metylprednisolonacetat i rekommenderade doser, oavsett om det administreras i normal eller inflammerad led. Litteraturunderlaget är bristfälligt och mer forskning behövs inom området.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Autefage, A., Alvinerie, M., Toutain, P. L. (1986). Synovial fluid and plasma kinetics of methylprednisolone and methylprednisolone acetate in horses following intra-articular administration of methylprednisolone acetate. *Equine Veterinary Journal*, 18, 193-198.
- Bolt, D. M., Ishihara, A., Weisbrode, S. E., Bertone, A. L. (2008). Effects of triamcinolone acetonide, sodium hyaluronate, amikacin sulfate, and mepivacaine hydrochloride, alone and in combination, on morphology and matrix composition of lipopolysaccharide-challenged and unchallenged equine articular cartilage explants. *American Journal of Veterinary Research*, 69, 861-867.
- Busschers, E., Holt, J. P., Richardson, D. W. (2010). Effects of glucocorticoids and interleukin-1 β on expression and activity of aggrecanases in equine chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research*, 71, 176-185.
- Céleste, C., Ionescu, M., Poole, A. R., Laverty, S. (2005). Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid. *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 602-610.
- Chen, C. L., Sailor, J. A., Collier, J., Wiegand, J. (1992). Synovial and serum levels of triamcinolone following intra-articular administration of triamcinolone acetonide in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 15, 240-246.
- Chunekamrai, S., Krook, L. P., Lust, G., Maylin, G. A. (1989). Changes in articular cartilage after intra-articular injections of methylprednisolone acetate in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 1733-1741.
- Dechant, J. E., Baxter, G. M., Frisbie, D. D., Trotter, G. W., McIlwraith, C. W. (2003). Effects of dosage titration of methylprednisolone acetate and triamcinolone acetonide on interleukin-1-conditioned equine articular cartilage explants in vitro. *Equine Veterinary Journal*, 35, 444-450.
- Foland, J.W., McIlwraith, C.W., Trotter, G.W., Powers, B.E., Lamar, C.H. (1994). Effect of Betamethasone and Exercise on Equine Carpal Joints With Osteochondral Fragments. *Veterinary Surgery*, 23, 369-376.
- Frean, S.P., Cambridge, H., Lees, P. (2002). Effects of anti-arthritic drugs on proteoglycan synthesis by equine cartilage. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25, 289-298.
- Frisbie, D. D., Kawcak, C. E., Trotter, G. W., Powers, B. E., Walton, R. M., McIlwraith, C. W. (1997). Effects on triamcinolone acetonide on an in vivo equine osteochondral fragment exercise model. *Equine Veterinary Journal*, 29, 349-359.

- Frisbie, D. D., Kawcak, C. E., Baxter, G. M., Trotter, G. W., Powers, B. E., Lassen, E. D., McIlwraith, C. W. (1998). Effects of 6 α -methylprednisolone acetate on an equine osteochondral fragment exercise model. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 1619 -1628.
- Kiani, C., Chen L., Wu, Y. J., Yee, A. J., Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Research*, 12, 19-32.
- Lillich, J. D., Bertone, A. L., Schmall, L. M., Ruggles, A. J., Sams, R. A. (1996). Plasma, urine, and synovial fluid disposition of methylprednisolone acetate and isoflupredone acetate after intra-articular administration in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 57, 187-192.
- Läkemedelsindustrins Service AB. Fass.se för allmänheten. [online]. Tillgänglig: <https://www.fass.se/LIF/home/index.jsp> [2012-03-01].
- Läkemedelsverket (2010). Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst – ny rekommendation [online]. Tillgänglig: <http://www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Halso---sjukvard/Behandlings--rekommendationer/Veterinara-lakemedel/> [2012-01-30]
- MacGavin , M. D., Zachary, J. F. (2007). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Upplaga 4. Missouri. Elsevier. Sid 1052-1054, 1058-1062.
- MacLeod, J. N., Fubini, S. L., Nian Gu, D., Tetreault, J. W., Todhunter, R. J. (1998). Effect of synovitis and corticosteroids on transcription of cartilage matrix proteins. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 1021-1026.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G. (2011). *Pharmacology*. Upplaga 6. Elsevier. Sid 402-406.
- Ronéus, B., Lindblad, A., Lindholm, A., Jones, B. (1993). Effects of Intraarticular Corticosteroid and Sodium Hyaluronate Injections on Synovial Fluid Production and Synovial Fluid Content of Sodium Hyaluronate and Proteoglycans in Normal Equine Joints. *Journal of Veterinary Medicine*, 40, 10-16.
- Todhunter, R. J., Fubini, S. L., Vernier-Singer, M., Wootton, J. A., Lust, G., Freeman, K. P., MacLeod, J. N. (1998). Acute synovitis and intra-articular methylprednisolone acetate in ponies. *Osteoarthritis and Cartilage*, 6, 94-105.

Trotter, G. W., McIlwraith, C. W., Yovich, J. V., Norrdin, R. W., Wrigley, R. H., Lamar, C. H. (1991). Effects of intra-articular administration of methylprednisolone acetate on normal equine articular cartilage. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 83-87.