



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

# Interleukin-1 $\beta$ och HMGB-1 hos halta hästar

Mirjam Dagis Boström

*Uppsala*

*2013*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2013:17*



Interleukin-1 $\beta$  och HMGB-1 hos halta hästar  
Interleukin-1 $\beta$  and HMGB-1 in lame horses

Mirjam Dagens Boström

*Handledare: Stina Ekman, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Biträdande handledare: Maria Löfgren, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Biträdande handledare: Karin Holm Forsström, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Biträdande handledare: Marie Rhodin, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Carina Ingvast-Larsson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap  
Kurskod: EX0751, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: Interleukin-1 $\beta$ , HMGB-1, ledinflammation, osteoartrit, halta, häst*

*Key words: Interleukin-1 $\beta$ , HMGB-1, osteoarthritis, lameness, equine*

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

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2013:17*



## SAMMANFATTNING

Ledinflammation eller osteoartrit (OA) är en vanlig orsak till hälta hos häst. De metoder som idag används för att diagnosticera ledinflammation är förhållandevis ospecifika och allt för ofta diagnosticeras ledinflammation när skadan har blivit irreversibel med radiologiska skelettförändringar. Genom att mäta förekomsten av olika inflammationsmediatorer vid OA kan denna kunskap i framtiden förhoppningsvis utnyttjas för tidig diagnostik och utvärdering av behandling. Syftet med denna pilotstudie är att studera förekomsten av de två proinflammatoriska cytokinerna interleukin (IL)-1 $\beta$  och high mobility group box protein (HMGB)-1 i ledvätska och serum från halta hästar och korrelera dessa till kliniska fynd.

Studien innefattar 14 hästar som vid klinikbesök uppvisat en initialhälta. Undersökning av hästarna inkluderade uppgifter om tidigare sjukdomshistoria, objektiv hältbedömning med hjälp av Lameness Locator, diagnostiska ledanestesi och i vissa fall röntgen. Ledvätska och blodprov togs i samband med ledanestesi. Serum och ledvätska analyserades med kommersiellt tillgängliga ELISA-analyser.

ELISA-analyserna för båda cytokinerna visade resultat som kunde upprepas. Endast i 6 av 29 ledvätskeprov kunde mätbara nivåer av IL-1 $\beta$  detekteras. I serum påvisades mätbara IL-1 $\beta$  nivåer i 11 av 16 prov. Koncentrationen IL-1 $\beta$  var högre i serum än i ledvätskan från alla hästar i studien. HMGB-1 detekterades i 24 av 29 ledvätskeprov med den högsta koncentrationen på 53,57 ng/ml. I serum kunde HMGB-1 mätas i 8 av 16 prov men endast i 2 av proven var koncentrationen över 2 ng/ml.

Denna pilotstudie visar att de inflammatoriska cytokinerna HMGB-1 och IL-1 $\beta$  kan mätas i ledvätska och serum hos häst. De testade ELISA-metoderna ger säkra resultat som kan upprepas. Inga slutsatser kan dras om varför koncentrationen av HMGB-1 och IL-1 $\beta$  varierar i serum och ledvätska hos de provtagna hästarna. För att få en bättre uppfattning om förekomst och koncentration av IL-1 $\beta$  och HMGB-1 i ledvätska och serum bör framtida studier inkludera fler hästar. Dessutom bör hästar med likartade ledproblem, känd duration av ledproblemen och tidigare behandlingar inkluderas och jämföras med en väl definierad och åldersmatchad frisk kontrollgrupp.

## SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a well known cause of lameness in horses. The methods currently used to diagnose OA are relatively nonspecific and OA is often diagnosed when the joint damage has become irreversible with radiographic skeletal changes. The presence of different inflammatory cytokines in synovial fluid and serum could aid in diagnosing early OA prior to irreversible changes. The purpose of this pilot study was to investigate the presence of two proinflammatory cytokines; interleukin (IL)-1 $\beta$  and high mobility group box protein (HMGB)-1 in synovial fluid and serum from lame horses and correlate the concentration of the cytokines to clinical findings.

The study includes 14 horses presented at the university hospital (UDS) with initial lameness. The study included details of the horses past medical history, objective lameness evaluation with the lameness locator system, intraarticular anesthesia and in some cases radiography. Synovial fluid and blood samples were obtained when the intraarticular anesthesia were performed. Serum and synovial fluid were analysed with commercially available ELISA-assays.

The ELISA assays used presented repeatable concentrations for the two cytokines. Only 6 of 29 synovial fluid samples presented measurable levels of IL-1 $\beta$ . However, in serum IL-1 $\beta$  levels were detected in 11 of 16 samples. The concentration of IL-1 $\beta$  was higher in serum than in synovial fluid from all horses in the study. HMGB-1 was detected in 24 of 29 synovial fluid samples with the highest concentration of 53,57 ng/ml. HMGB-1 in serum was detected in 8 of 16 samples, with a concentration higher than 2 ng/ml in only 2 samples.

This pilot study shows that the inflammatory cytokines HMGB-1 and IL-1 $\beta$  can be measured in synovial fluid and serum from horses. The ELISA methods tested gave repeatable result. However, no correlations between clinical symptoms and concentrations of HMGB-1 and IL-1 $\beta$  in serum and synovial fluid could be detected. To be able to correlate the concentrations of inflammatory cytokines in synovial fluids and serum from lame horses, with type of OA and joint destruction, a large horse population must be included. The horses must also be presented with similar joint problems; known duration of lameness and previous treatment regimes. The study must also include a well-defined and age-matched control group.

# INNEHÅLL

INLEDNING .....	1
BAKGRUND .....	2
Den synoviala leden.....	2
Ledinflammation.....	4
Biomarkörer .....	6
Objektiv bedömning av hälsa .....	6
MATERIAL OCH METODER .....	8
Hästar .....	8
Provhantering.....	9
Analys .....	10
RESULTAT .....	11
DISKUSSION.....	21
SLUTSATS.....	23
REFERENSER .....	24

## INLEDNING

Ledinflammation eller osteoartrit (OA) som orsak till hälta är vanligt hos hästar inom alla discipliner. De metoder som idag används för att diagnosticera ledinflammation är förhållandevis ospecifika. Bortsett från röntgen saknas det metoder för att karaktärisera och mäta den patologiska processens typ och grad. Allt för ofta diagnosticeras ledinflammation först när skadan har blivit irreversibel med ledbroskdestruktion och skelettförändringar såsom subkondral benskleros med mikrofrakturer och osteofytära pålagringar (Sutton et al, 2009). Genom att karaktärisera och mäta förekomsten och koncentrationen av olika inflammationsmediatorer vid OA kan ökad kunskap fås om de molekylära signalvägar som aktiveras och nedregleras under sjukdomsprocessen. Denna kunskap kan sedan utnyttjas för att hitta säkrare diagnostiska metoder och bättre metoder för att utvärdera behandlingar (McIlwraith, 2005).

Interleukin (IL)-1 $\beta$  anses vara central i uppkomsten av OA (Schultze-Tanzil, 2009) och high mobility group box protein (HMGB)-1 finns i cellkärnan och frisätts extracellulärt vid patologiska processer (Bianchi, 2009). Metoder för att mäta båda dessa cytokiner hos häst finns uppsatta på Institutionen för Biomedicin och Veterinär folkhälsovetenskap, SLU. Syftet med denna pilotstudie är att mäta förekomsten av de inflammatoriska cytokinerna IL-1 $\beta$  och HMGB-1 i ledvätska och serum från halta hästar och korrelera dessa till kliniska fynd.



## **BAKGRUND**

### **Den synoviala leden**

Den synoviala leden består av minst två broskbeklädda benstrukturer som hålls ihop med hjälp av en ledkapsel och ligament. Ledhålan innehåller en viskös hyaluronsyrerik ledvätska (Palmer & Bertone, 1994). Dess funktion är att ge en förbindelse och hantera de krafter som genereras av gravitation och rörelse mellan två sammanlänkade benändar. Ledens samtliga beståndsdelar hjälper till att åstadkomma detta (Heinegård & Saxne, 2011; René van Weeren & de Grauw, 2010).

### **Ledbrosk**

Ledbrosket som saknar kärl och nerver, täcker den subkondrala benplattan och är sammansatt för att ta emot och fördela mekaniska krafter (Caron, 2010). Broskets tjocklek varierar mellan olika leder och även inom en led. Brosk innehåller en sparsam mängd kondrocyter, vilka utgör 1-2% av broskets volym, och syntetiserar extracellulärt matrix (ECM) (René van Weeren & de Grauw, 2010). Kondrocyterna är känsliga för mekaniska och biokemiska stimuli och upprätthåller ledbroskets homeostas via ett samspel mellan anabola och katabola processer, samt med pro- och antiinflammatoriska mediatorer (Schultze-Tanzil, 2009). Brosket delas in i fyra histologiskt och biokemiskt olika lager; ytliga, intermediära, djupa samt det mineraliserade lagret. I det ytliga lagret är cellerna avlånga och orienterade parallellt med ledytan. Cellerna i det intermediära lagret är runda och ser ut att vara slumpmässigt fördelade. I de djupa lagren är cellerna arrangerade i kolumner vinkelrätt mot ledytan. ECM i det djupaste lagret mot benet är mineraliserat och innehåller rikligt med hydroxyapatitkristaller. De två djupaste brosklagren är separerade med en oregelbunden linje, mellan det förkalkade och icke förkalkade lagret, kallad "tidemark". Det förkalkade brosklagret förankrar brosket i den subkondrala benplattan (Caron, 2010; Palmer & Bertone, 1994).

### **Extracellulärt matrix**

Ledbroskets fysiska egenskaper beror på sammansättningen av ECM och det innehåller i huvudsak kollagen, proteoglykaner, matrixprotein och vatten (René van Weeren & de Grauw, 2010). Åtskilliga olika typer av kollagen har isolerats från broskvävnad, däribland typ II, V, VI, IX, X och XI kollagen (Palmer & Bertone, 1994). Typ II kollagen utgör ca 90 % av ledbroskets torrsvikt och bildar draghållfasta fibriller. Kollagen i det ytliga lagret är organiserat parallellt med ledytan och fungerar som ett skyddande lager. I djupare lager är de kollagena fibrillerna organiserade vinkelrätt med ledytan och förankrar brosket till den subkondrala benplattan (Caron, 2010).

Proteoglykaner är molekyler som består av protein och glykosaminoglykan (polysackarid). Ett flertal olika proteoglykaner finns i ledbrosket med aggrekan som den mest förekommande, vilken bildar stora aggregat tillsammans med hyaluronsyra (HA). Aggrekan består av ett linjärt kärnprotein med tre globulära domäner. Den första domänen binder in till HA och så många som 100 aggrekanmolekyler kan binda till en och samma hyaluronsyrekedja. Längs med kärnproteinet binder negativt laddade kondroitinsulfatkedjor in. På grund av de kraftigt

negativa laddningar som dessa skapar, kan aggregaten dra åt sig vatten vilket ger brosket dess elasticitet. I ECM finns även andra matrixprotein såsom biglykan, fibromodulin och decorin vilka också bidrar till broskets egenskaper (Caron, 2010).

### **Subkondralt ben**

Det subkondrala benet inkluderar den kortikala benplattan samt underliggande trabekulärt ben med benmärg och är strukturellt och biokemiskt snarlik annan benvävnad. Men den subkondrala benplattan varierar i tjocklek, beroende på belastningen i leden och de haverianska gångarna går parallellt med ledytan (Caron, 2010).

### **Ledkapsel**

Ledkapseln består av två lager, den fibrösa yttre kapseln och ett synovialmembran in mot ledhålan. Det fibrösa lagret består av en kompakt bindväv med elastiska fibrer vilket hjälper till att bygga upp stabiliteten i leden och det förstärks i flera leder av kollateralligament. Synovialmembranet består av ett inre tunt cellulärt lager samt ett yttre stromalt lager, intiman respektive subintiman. Subintiman ligger mot det fibrösa lagret och karakteriseras av fibrös-, och fett-vävnad samt är rik på kärl och nerver. Intiman är en 1-4 celler tunn beklädnad av ledkapseln bestående av synoviocyter med direktkontakt till ledvätskan (René van Weeren & de Grauw, 2010; Palmer & Bertone, 1994). Synovialmembranet utgör en selektiv barriär för ultrafiltration av plasmakomponenter och bestämmer därmed ledvätskans komposition. Eftersom subintiman är rikligt kärlförsörjd kan utbytet av plasmakomponenter ske nära ledkapselns insida mot ledhålan (Palmer & Bertone, 1994).

Tre olika typer av synoviocyter har identifierats, typ A synoviocyter härrör från makrofager, typ B synoviocyter från fibroblaster och typ C är ett mellanting av dessa två. Typ B är vanligast och syntetiserar en rad viktiga makromolekyler såsom HA och kollagen. Typ A synoviocyterna är fagocyterande och utgör endast 10-20% av cellerna. Synoviocyter har förmåga att syntetisera cytokiner (bland annat IL-1), eicosanoider (prostaglandin E2) och proteinaser vilka alla är involverade i uppkomst och upprätthållande av ledinflammation vid OA (Schultze-Tanzil, 2009; Sutton et al, 2009).

### **Ledvätska**

Ledfickan är fylld av ledvätska, vilken kan betraktas som ett ultrafiltrat av plasma där molekyler mindre än 10 KDa förekommer i jämvikt med blodet. Ledvätskan är normalt klar och blekt gul med hög viskositet på grund av det höga innehållet av HA (Steel, 2008). Eftersom ledvätska varken innehåller fibrinogen eller koagulationsfaktorer koagulerar den inte. Ledvätskan agerar friktionsnedsättande, försörjer brosket med näringsämnen samt transporterar bort restprodukter och är därför mycket viktig för att upprätthålla ledens homeostas (René van Weeren & de Grauw, 2010; Palmer & Bertone, 1994). Vid synovit förlorar ledvätskan sin viskositet på grund av utspädning och enzymatisk nedbrytning av HA (Steel, 2008).

## Ledinflammation

OA kan beskrivas som en obalans mellan nedbrytande och uppbyggande processer i leden och involverar samtliga strukturer i leden (Heinegård & Saxne, 2011). De kliniska symptomen vid OA är ledsmärta, svullnad och stelhet. De morfologiska förändringarna som ses vid OA är degeneration av ledbrosk med förlust av broskkomponenter, i synnerhet typ II kollagen och proteoglykaner. Dessutom uppkommer subkondral benskleros med mikrofrakturer och aseptisk synovit (Sutton et al, 2009). OA har också beskrivits som en misslyckad läkningsprocess i leden efter kraftig mekanisk stress (René van Weeren & de Grauw, 2010). Inflammationen som uppstår vid hög belastning får cellerna i leden att skifta från anabola till katabola processer vilket leder till ytterligare vävnadsskada (Heinegård & Saxne, 2011). En kombination av hög, frekvent eller statisk belastning och en inflammation i leden anses vara viktiga faktorer för utveckling av OA (René van Weeren & de Grauw, 2010).

De proinflammatoriska cytokinerna IL-1 $\beta$  och *tumor nekrosis factor* (TNF)- $\alpha$  är centrala i uppkomsten av OA och produceras av infiltrerade leukocyter samt synoviocyter och kondrocyter (Schultze-Tanzil, 2009; Sutton et al, 2009). Ökad mängd TNF- $\alpha$  har påvisats i synovialmembran och ledbrosk vid OA hos häst (Kamm et al, 2010). Vid mekanisk stress svarar kondrocyterna i ledbrösk genom att öka produktion av inflammatoriska cytokiner, aktivera matrix metalloproteinaser (MMPs) och/ eller uppreglera syntetisk aktivitet. IL-1 $\beta$  och TNF- $\alpha$  tillsammans med ytterligare cytokiner aktiverar kondrocyter till att producera kväveoxid (NO), prostaglandin E2(PGE2), leukotriener, cyklooxygenas (COX)-2 och flera olika MMPs. Många av dessa faktorer har en synergistisk effekt med varandra och resultatet blir att de katabola processerna i cellen dominerar. PGE2 hämmar proteoglykansyntesen och ger även en uppreglering av ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin*)-1, (ADAMTS)-5 och MMP-13 (kollagenas-3) med nedbrytning av aggregat och typ II kollagen som följd. Aktivering av MMPs är hårt reglerat i kondrocyter under normala fysiologiska förhållanden och ett ökat uttryck av aktiva MMPs spelar därmed en stor roll för nedbrytningen av ledbrosk (Goldring & Otero, 2011).

Aseptisk synovial inflammation karaktäriseras av infiltration av mononukleära celler, ökad vaskularisering, hyperplasi av synovialmembranet och proinflammatoriska cytokiner som frisätts och produceras av synoviocyter och de mononukleära cellerna. Akut synovit kan vara en av de första patologiska förändringarna i en drabbad led (Sutton et al, 2009). Synovial inflammation är associerat med symptom på sjukdom eftersom inflammationen ger svullnad, stelhet och smärta (Goldring & Otero, 2011).

Kondrocyter har receptorer för ECM-komponenter, bland dessa finns vissa integriner vilka binder till t.ex. fragment av fibronectin och typ II prokollagen. Detta gör att kondrocyterna aktiveras vid broskskada och producerar matrixnedbrytande MMPs, ADAMTSs, proinflammatoriska cytokiner och chemokiner. Därmed förstärks inflammationen vid broskskada (Goldring & Otero, 2011; Schultze-Tanzil, 2009). De skenande inflammationsreaktionerna kommer så småningom att leda till uppmjukning i form av vatteninträde, fibrillering (kollagenfragmentering), och ulceration med förlust av ledbrosk (René van Weeren & de Grauw, 2010). Den inflammation som initieras tidigt i OA förloppet

påverkar även ledbroskets förmåga att stå emot mekaniska krafter (Heinegård & Saxne, 2011). Utvecklingen av en obehandlad OA inkluderar en kronisk synovit, kapsulit med fibros av ledkapsel, skleros av subkondralt ben, periartikulära osteofytära pålagringar och mikrofrakturer med bildning av subkondrala cystor. Kollagen typ II, som dominerar det hyalina ledbrusket, har lång omsättningstid och vid förlust av kollagen typ II repareras skadan istället med fibröst brosk som innehåller typ I kollagen vilket inte har samma elastiska egenskaper (René van Weeren & de Grauw, 2010).

### **IL-1 $\beta$**

Interleukinfamilj-1 består i dagsläget av 11 medlemmar däribland IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  och IL-1-receptorantagonist (Ra) (Dinarello, 2011). En prekursor till IL-1 $\beta$  syntetiseras i cytoplasman av bland annat makrofager, neutrofiler och monocyter (Arend et al, 2008) men också av synoviocyter och kondrocyter (Goldring & Otero, 2011). Via enzym, bland annat kaspas-1, klyvs prekursor som då frisätts extracellulärt som aktivt IL-1 $\beta$  och interagerar med receptorer på omkringliggande celler (Dinarello, 2011). Det finns två olika IL-1 receptorer, IL-1RI samt IL-1RII där endast IL-1RI kan aktivera celler. IL-1RII är biologisk inaktiv men kan hämma inflammationssvaret genom att binda IL-1 och därmed hindra interaktion med IL-1RI. IL-1Ra är strukturellt mycket lik både IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$  och fungerar som en specifik antagonist. När IL-1Ra binder till IL-1RI sker ingen aktivering av cellen (Arend et al, 2008).

### **HMGB-1**

HMGB-1 finns i cellkärnan i däggdjursceller. Proteinet är 99 % identiskt mellan däggdjursarter och består av två DNA-bindande domäner (A resp B-box) samt en negativt laddad C-terminal (Dumitriu et al, 2005). Extracellulärt verkar HMGB-1 som en *damage-associated molecular pattern* (DAMP) och kan frisättas aktivt av bland annat makrofager, dendritceller, endotelceller och synoviocyter vid inflammatoriska stimuli (Bianchi, 2009). Den aktiva frisättningen sker långsamt. Passiv frisättning sker från nekrotiska celler och är mer eller mindre momentan. Apoptos (programmerad celldöd) leder till en mycket liten frisättning av HMGB-1 då proteinet är bundet till kromatin (Andersson & Erlandsson-Harris, 2010; Bianchi, 2009).

Hur HMGB-1 utövar sina proinflammatoriska egenskaper är inte fullständigt klarlagt. HMGB-1 verkar genom att rekrytera mononuklerära celler samt bilda komplex tillsammans med enkelsträngat DNA, lipopolysackarider (LPS), IL-1 $\beta$  och nucleosomer vilka binder in till *toll like receptor* (TLR)-9, TLR-4, IL-1R och TLR-2 och uppreglerar därmed inflammationssvaret (Bianchi, 2009). Enligt andra undersökningar kan extracellulärt HMGB-1 binda till ”*receptor for advanced glycation end products*” (RAGE), TLR2, TLR4 och TLR9 och påverkar därmed mononuklerära celler på egen hand och stimulerar till frisättning av cytokiner, däribland IL-1 och TNF- $\alpha$  (Andersson & Erlandsson-Harris, 2010; Yang & Tracey, 2010; Dumitriu et al, 2005).

## Biomarkörer

Markörteknologin syftar till att ta fram biomarkörer som är unika för tidiga patologiska processer vid exempelvis OA. Målet är att förekomst av olika biomarkörer i ledvätska eller serum ska kunna korreleras till tidig skada i leden så att irreversibel OA kan undvikas, men de ska också kunna användas för att monitorera resultatet av en behandling. Eftersom det vid ledskada uppstår förändringar i balansen mellan katabola och anabola processer kan koncentrationen av olika molekyler och deras fragment öka eller minska och variera med skadans duration. Dessa molekyler kan frisättas i ledvätskan om källan är ledbrosk, menisker, ligament eller synovialmembran. Om det underliggande subkondrala benet är involverat kommer molekylerna sannolikt att frisättas direkt till blodbanan. Molekyler som kan detekteras och mätas i ledvätska, blod eller urin har potentialen att användas som biomarkörer (McIlwraith, 2005).

Biomarkörer inkluderar proteolytiska enzymer och deras inhibitorer, tillväxtfaktorer och pro-inflammatoriska cytokiner som direkt eller indirekt påverkar celler och deras metabolism. Exempel på biomarkörer som mätts vid OA hos häst är MMP-2,-9 (Clegg et al, 1997a), MMP-13 (Trumble et al, 2001), IL-1 $\beta$  (Bertone et al, 2001; Trumble et al, 2001), IL-6 (Ley, 2010), TNF- $\alpha$ , hyaluronsyrafragment, C-reaktivt protein (CRP) (McIlwraith, 2005) och HMGB-1 (Ley, 2010; Brown et al, 2009).

## Objektiv bedömning av hälta

Lameness Locator® är ett trådlöst sensorbaserat rörelseanalys-system utformat för att detektera och objektivt bedöma hälta hos hästar. Systemet består av ett datorprogram med tre sensorer kopplade till sig: en gyrometer som fästs över hästens högra kotben och två accelerometrar som placeras på huvudet respektive korsets högsta punkt. Sensorerna väger ca 30 gram och fästs med särskilt utformade hållare i neopren eller dubbelhäftande tejp.

En accelerometer mäter accelerationen i en riktning, medan gyrometern mäter hastighet och rörelseriktning. Accelerometrarna mäter de vertikala rörelserna hos nacke och kors medan gyrometern på höger kotben definierar stegcykeln. Eftersom trav är en tvåtaktig symmetrisk gångart kan övriga bens positioner bestämmas utifrån var höger framben befinner sig i stegcykeln. Informationen som sensorerna samlar in sänds i realtid via trådlös kommunikation till datorn vilken sedan analyserar hästens rörelse. Systemet analyserar skillnader på huvudets och bäckenets position mellan höger och vänster kroppssida. Skillnaden (differensen) i max-respektive min-position på huvud (Head diff max/min) och bäcken (Pelvis diff max/min), mellan vänster respektive höger sidas ben utvärderas för varje steg och medelvärde samt standardavvikelse (s.d) för alla analyserade steg redovisas. I teorin förväntas den symmetriska, dvs ohalta, hästen ha en differens på noll. Den perfekt symmetriska hästen existerar dock inte i praktiken utan även den ohalta hästen uppvisar en viss grad av asymmetri. Frambenshälta indikeras om Head diff min/max är större än +/- 6mm i absoluta tal och värdet är större än standardavvikelsen. Positiva värden talar för en högersidig hälta och negativt

värde för en vänstersidig hälta. Motsvarande gränsvärde för bakbenshälta är +/- 3mm på Pelvis diff min/max (Keegan et al, 2009).

För en tillförlitlig analys bör minst 25 steg registreras på rakt spår i ett jämnt tempo. Systemet har vissa inbyggda hjälpfunktioner som plockar bort avvikelser som sker inkonsekvent under mätningen. Om hästen bråkar för mycket, blir rädd, eller på annat sätt blir störd rekommenderas att mätningen tas om från början (Keegan et al, 2009). Lameness Locator-systemet har i undersökningar visat god repeterbarhet (Keegan et al, 2011).

## MATERIAL OCH METODER

Studien är godkänd av Stockholms norra djuretiska nämnd (diarienummer N378/12, giltigt till 2013-10-13). Skriftligt medgivande att delta i studien finns från samtliga hästägare.

### Hästar

Provinsamling har skett under hösten 2012 på Universitetsdjursjukhuset (UDS), Ultuna. Totalt har 3 veterinärer deltagit i studien. I studien ingår 14 hästar, av vilka 10 är valacker och 4 är ston. Hästarna är mellan 4 och 18 år gamla med en medelålder på 11 år. Hästmaterialet bestod av 10 hästar av halvblodstyp, 3 ponnyer och 1 Quarterhorse (tabell 1). Samtliga hästar används eller var tänkta att användas till ridning.

Provtagna hästar har vid klinikbesöket uppvisat en initialhälta som subjektivt bedömts av en klinikveterinär. Två hästar har undersökts och provtagits vid två tillfällen, dels vid det första besöket, dels vid återbesök (å.b). Undersökningen av hästarna har inkluderat uppgifter om tidigare sjukdomshistoria, diagnostiska ledanestesier och ledvätske- samt blodprov. Hältan har objektivt bedömts med hjälp av Lameness Locator före och efter varje anestesi. Har håltan avtagit efter ledanestesi enligt veterinär och Lameness Locator bedömdes anestesin vara positiv (leden bedömdes som hältutlösande). Provtagning av hästarna har resulterat i 16 serumprov och 29 ledvätskeprov varav 12 från kotleder, 3 från hasleder, 1 från tarsometatarsled (TMT), 3 från hovleder, och 10 från karpalleder. Proverna från karpalleder innefattar 5 prover från radiocarpalled (r.c) samt 5 prover från intercarpalled (i.c). Om undersökt led har röntgenundersökts har detta och eventuella röntgenförändringar noterats. Röntgentolkningen är utförd av Bilddiagnostiska kliniken, UDS. Hästarna har avidentifierats och fått ett nummer, 1-14.

Tabell 1. Hästar i studien.

Häst	Ras	Kön	Ålder (år)	Provtagen led
1	SWB	Sto	4	Kotled HF Kotled HF å.b
2	New Forest	Valack	18	Hasled VB
3	SWB	Valack	12	Hasled HB
4	SWB	Valack	16	Kotled HB Kotled HF
5	SWB	Valack	9	Hasled VB Kotled VB Kotled VF å.b r.c VF å.b i.c VF å.b
6	SWB	Valack	11	TMT VB Hovled HF
7	Irländsk import	Valack	15	Kotled HF r.c HF i.c VF
8	SWB	Sto	9	Kotled VF
9	SWB	Sto	9	Kotled VF r.c VF i.c VF
10	Korsningsponny	Valack	9	Kotled HF
11	SWB	Sto	13	Kotled HF Hovled HF
12	Quarter horse	Valack	8	r.c VF i.c VF
13	SWB	Valack	13	Kotled VF r.c VF i.c VF
14	SWB	Valack	4	Hovled HF

SWB – Svensk varmblodig häst. å.b – återbesök. r.c – radiocarpalled. i.c – intercarpalled. TMT – tarsometatarsalled. HF - höger framben. VF - vänster framben. HB - höger bakben. VB - vänster bakben.

## Provhantering

Ledvätska aspirerades i steril spruta av veterinär innan lokalbedövningsmedlet injicerades i leden med steril teknik. Blodprov togs i jugularvenen i samband med ledanestesi. Blodet samlades i serumrör med hjälp av vacutainer.

Om >1ml ledvätska provtogs överfördes minst 0,5ml till EDTA-rör för analys av leukocyter. Resterande mängd överfördes till sterilt serumrör. Om mängden ledvätska var <1ml sparades



all vätska i sterilt serumrör, och ingen analys av leukocyter gjordes. Proverna placerades i kyl omedelbart efter provtagningen och centrifugerades sedan i 10 min, 450 x g i 4°C. Supernatanterna alikvoterades till sterila eppendorfrör och förvarades i -80°C till analystillfället. Serum samt ledvätska analyserades inom 3 månader från provtillfället och inga prover tinades under denna period.

## **Analys**

Serum och ledvätska analyserades med kommersiellt tillgängliga ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) för HMGB-1 (Katalog nummer ST51011, IBL International, Hamburg, Tyskland) och IL-1 $\beta$  (Equine IL-1 $\beta$  VetSet<sup>TM</sup>, katalog nummer VS0131E-002, Kingfisher Biotech Inc, USA). Båda testerna var av typen ”sandwich-enzyme immunoassays” och utfördes enligt tillverkarnas instruktioner. Proverna inkuberades i duplikat på mikrotiterplattor innehållande antikroppar specifika för HMGB-1 eller IL-1 $\beta$  och därefter kändes de bundna analyterna igen av enzymmärkta antikroppar. Efter tillsats av substrat skedde enzymatiska reaktioner vilka resulterade i en färgförändring som kunde uppmätas som absorbans vid 450nm. Mellan de olika stegen tvättades plattorna för att avlägsna obundna komponenter. Koncentrationerna av HMGB-1 eller IL-1 $\beta$  i proverna räknades sedan ut från den standardkurva som erhöles från kända koncentrationer av analyten och angavs i ng/ml. Gränsvärdet för detektion anges till 1 ng/ml för HMGB-1 enligt tillverkaren. Motsvarande värde för IL-1 $\beta$  bestämdes till 1,56 ng/ml då det var den lägsta kända koncentrationen given från standardkurvan. Vid varje analystillfälle, användes för IL-1 $\beta$  och HMGB-1 ett tidigare analyserat positivt kontrollprov bestående av ledvätska med känd koncentration för att utvärdera testets repeterbarhet. Två analystillfällen gjordes för respektive cytokin. Prover med synlig förekomst av blod eller hemolys har noterats. Förekomst av erythrocyter kan ge falskt höga koncentrationer av HMGB-1 enligt tillverkaren av analysen.

## RESULTAT

I serum kunde IL-1 $\beta$  detekteras i 11 av 16 prov och den högsta uppmätta koncentrationen var 48,03 ng/ml (tabell 2). Endast i 6 av 29 ledvätskeprov kunde mätbara nivåer av IL-1 $\beta$  detekteras (tabell 3). Den högsta uppmätta koncentrationen IL-1 $\beta$  i ledvätska var 11,24 ng/ml. Om man korrelerar de 5 serumprov med högst koncentration IL-1 $\beta$  med motsvarande hästs ledvätskeprov finns detekterbara koncentrationer även i ledvätskan i åtminstone en led. Koncentrationen IL-1 $\beta$  är högre i serum än i ledvätskan från provtagna leder hos alla hästar i studien. Det positiva kontrollprovet för IL-1 $\beta$  visade en koncentration på 23,3 ng/ml vid första analystillfället och 24,8 ng/ml vid andra analystillfället.

HMGB-1 detekterades i 24 av 29 ledvätskeprov och den högsta detekterbara koncentrationen var 53,57 ng/ml (tabell 3). I serum kunde HMGB-1 detekteras i 8 av 16 prov. Endast i två av serumproven (Häst 1 å.b, Häst 3) där HMGB-1 kunde detekteras var koncentrationen över 2 ng/ml vilket måste anses vara låga koncentrationer jämfört med de detekterade koncentrationerna i ledvätska (tabell 2). Hos häst 3, vilken hade den högsta detekterbara koncentrationen, hade serumprovet dessutom hemolys. Det positiva kontrollprovet för HMGB-1 visade koncentration på 33,8 ng/ml vid första analystillfället och 29,2 ng/ml vid andra analystillfället.

Tabell 2. Analyserade serumprov

Häst	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)
1	<1,56	1,52
1 å.b	<1,56	2,47
2	<1,56	<1
3 *	47,51	3,14
4	3,91	1,48
5	36,24	<1
5 å.b	30,55	1,29
6	20,78	<1
7	48,03	<1
8	9,74	<1
9	3,43	1,71
10	<1,56	1,72
11	9,07	<1
12	14,13	1,79
13	<1,56	<1
14	4,90	<1

å.b- återbesök, \*-hemolys

Tabell 3. Analyserade ledvätskeprov

Häst	Prov Ledvätska	Röntgen	Ledanestesi	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB- 1(ng/ml)
1	Kotled HF	-	Positiv	<1,56	22,76
	Kotled HF å.b $\alpha$	Lindrig entesiofyt	Negativ	<1,56	52,72
2	Hasled VB	ua	Ej halt	<1,56	<1
3	Hasled HB	Lindriga osteofyter	Positiv	11,24	<1
		Lindrig Ankylos DIT			
4	Kotled HB	-	Positiv	<1,56	6,26
	Kotled HF	Misstänkt kondyldefekt	Endast böjreaktion	<1,56	3,45
5	Hasled VB	-	Positiv	<1,56	<1
	Kotled VB	-	Positiv	<1,56	9,29
	Kotled VF å.b	Lindrig osteofyt	Endast böjreaktion	2,42	6,48
	r.c VF å.b	ua	Endast böjreaktion	<1,56	1,14
6	i.c VF å.b	ua	Endast böjreaktion	3,11	1,83
	TMT VB	Lindrig osteofyt	Positiv	<1,56	<1
	Hovled HF $\alpha$	ua	Negativ	9,15	13,71
7	Kotled HF	-	Ej tillförlitlig mätning	<1,56	29,97
	r.c HF	Misstänkt benfragment d.c	Ej tillförlitlig mätning	5,42	10,91
	i.c HF		Ej tillförlitlig mätning	<1,56	14,13
8	Kotled VF	-	Negativ	<1,56	11,41
9	Kotled VF	-	Positiv	<1,56	2,24
	r.c VF	-	Positiv	<1,56	3,63
	i.c VF	-	Positiv	<1,56	1,74
10	Kotled HF	Lindrig entesiofyt	Positiv	<1,56	1,84
11	Kotled HF	ua	Negativ	<1,56	1,95
	Hovled HF	Misstanke osteit	Negativ	<1,56	3,91
12	r.c VF	Måttliga benproliferationer	Endast böjreaktion	1,77	44,84
	i.c VF $\alpha$	Måttlig benproliferationer	Endast böjreaktion	<1,56	53,57
13	Kotled VF	ua	Positiv	<1,56	11,60
	r.c VF	ua	Positiv	<1,56	4,47
	i.c VF	ua	Positiv	<1,56	<1
14	Hovled HF $\alpha$	ua	Positiv	<1,56	3,11

r.c – radiocarpalled. i.c – intercarpalled. d.c – distala karpalleden. TMT – tarsometatarsalled. DIT – distala intertarsalleden. HF - höger framben. VF - vänster framben. HB - höger bakben. VB - vänster bakben ua – utan anmärkning .  $\alpha$  - Blodblandad. - Ej röntgad vid klinikbesök. Endast böjreaktion – Hästen är ej halt utan har endast en böjreaktion i provtagen led.

Efter de inledande analyserna valdes 6 hästar ut för närmare granskning. Häst 1 samt häst 12 valdes på grund av koncentrationer av HMGB-1 över 50 ng/ml i ledvätska. Häst 3 valdes på grund av högsta detekterade koncentrationen IL-1 $\beta$  i ledvätska. Hästarna 5,6 och 7 har förhöjda nivåer av både IL-1 $\beta$  och HMGB-1 i någon led. Samtliga utvalda hästar har någon provtagen led som röntgenundersökts.

### Häst 1

Häst 1 var ett fyraårigt halvblodsto som kom till kliniken då ägaren och tränaren uppfattat hästen som stel eller halt vänster bak. Hästen var under utbildning och var tänkt att användas inom hoppning och dressyr. En månad innan undersökning hade hästen kommit lös och skenat runt med transportskydd på ojämnt underlag. Hästen skadade sig inte, men problemen har noterats sedan dess. Veterinären bedömde att hästen har en initialhälta höger fram på en 0,5 grad vilket bekräftas med Lameness Locator (tabell 4). Låg böjning av båda fram gav en hälta på 1 grad. Inga signifikanta gallor noterades. Intrartikulär anestesi i kotleden höger fram, släckte hälтан enligt veterinär och Lameness Locator. Hästen behandlades intraartikulärt i kotled höger fram med hyaluronsyra och kortison samt peroralt med meloxicam i 9 dagar.

Tabell 4. Lameness Locator analys Häst 1.

	Framben		Bakben	
	Head diff Max/s.d	Head diff Min/ s.d	Pelvis diff Max/s.d	Pelvis diff Min /s.d
Initial	5,76/4,25	<b>15,26/5,24</b>	1,94/2,42	-2,84/2,62
Anestesi Kotled HF	-2,25/5,89	-1,26/7,38	2,04/3,73	-2,29/3,12
Initial å.b	7,20/8,96	<b>9,05/8,00</b>	-1,56/4,41	0,63/3,85
Anestesi Kotled HF å.b	<b>7,31/5,83</b>	<b>10,90/9,65</b>	-1,36/4,30	-2,10/3,52
Anestesi Låg HF å.b	0,35/8,39	-2,11/5,37	-0,71/2,42	-1,01/2,61

Låg – låg nervblockad. s.d – standardavvikelse. Värden som indikerar hälta är fetmarkerade. Positivt värde – högersidig asymmetri. Negativt värde – vänstersidig asymmetri.

Vid återbesök tre veckor senare var hästen fortfarande intitalhalt höger fram. Baserat på den objektiva bedömningen var hälтан mindre än vid första besöket. Ny bedövning av kotled höger fram släckte endast böjreaktionen. Låg nervblockad släckte hälтан vid detta tillfälle (tabell 4).

Röntgenundersökning av kotled och hov HF i samband med återbesök visade en lindrig osteofyt i anslutning till kotled samt en hov med lång tå och låg trakt. Hästen behandlades peroralt med fenylbutazon i 10 dagar samt skoning med ringskor på framhovarna. Vid återbesök tre veckor senare var hästen ohalt enligt veterinär.

I tabell 5 redovisas samtliga prov från häst 1. Ledvätskan från kotleden höger fram vid återbesök var blodblandad. IL-1 $\beta$  detekterades varken i serum eller i ledvätska. HMGB-1 detekterades i samtliga prover och koncentrationen var högre i både ledvätska och serum vid

återbesöket. Detta trots att hästen objektivt sett var mindre halt samt att ledanestesi inte släckte hältan.

Tabell 5. Analyserade prov Häst 1.

Prov	Röntgen	Ledanestesi	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)
Serum			<1,56	1,52
Kotled HF	-	Positiv	<1,56	22,76
Serum å.b			<1,56	2,47
Kotled HF å.b	Lindrig entesiofyt	Negativ	<1,56	52,72

HF - höger framben. å.b-återbesök. - Ej röntgad vid klinikbesök.

### Häst 3

Häst 3 var en tolvårig halvblodsvalack som tävlades i medelsvår dressyr. Hästen har haft en fraktur av tuber coxae höger sida som unghäst vilket gjorde att korset upplevdes snett. För 2.5 år sedan upptäcktes artrosförändringar i båda hasarnas glidleder vid röntgen och scintigrafi i samband med en ortopedisk utredning. Hästen hade sedan dess varit igång och tävlat men hade enligt ägaren haft en lindrigare rörelsestörning på bakbenen. Problemen har tilltagit vilket var anledningen till klinikundersökning. Höger hasled (tibiotarsalled) hade en lindrig galla medan vänster hasled hade en kraftig galla.

På grund av det sneda korset var den initiala hältan svårbedömd på rakt spår. På volt bedömdes hältan till en halv grad höger bak. Hästen hade svårt att hålla galoppen och hältan accentuerades på mindre volt och med inspanning. Lameness locator indikerade hälta höger fram och höger bak. Intraartikulär bedövning av höger hasled förbättrade bakbenshältan och frambenshältan var inte längre synbar. Även efter bedövningen indikerade värdena på pelvis diff Max/Min för hälta, men då standardavvikelsen är större än medelvärdet minskar tillförlitligheten (tabell 6).

Tabell 6. Lameness Locator analys Häst 3.

	Framben		Bakben	
	Head diff Max/sd	Head diff Min/ s.d	Pelvis diff Max/sd	Pelvis diff Min /s.d
Initial	2,44/5,84	<b>6,48/4,70</b>	<b>10,30/4,09</b>	-2,77/2,48
Anestesi Hasled HB	1,74/5,99	1,91/5,69	5,21/11,10	-3,35/4,58

s.d – standardavvikelse. Positivt värde – högersidig asymmetri. Värden som indikerar hälta är fetmarkerade. Negativt värde – vänstersidig asymmetri.

Ny röntgenundersökning av höger has visade lindrigt tilltagande osteoartrosförändringar och en begynnande ankylos av distala intertarsalleden. Hästen behandlades med kortison och hyaluronsyra i hasled och TMT HB. Inget återbesök finns noterat men vid telefonkontakt med ägaren, som är veterinär, framkom att hästen känns mycket bättre.

I tabell 7 redovisas samtliga prov från häst 3. Serumprovet har studiens högsta noterade koncentration av HMGB-1 i serum, men provet har en lindrig hemolys. HMGB-1 i ledvätskan från hasleden var ej detekterbart. Koncentrationen IL-1 $\beta$  i ledvätskan är studiens högsta och även i serum är koncentrationen hög.

Tabell 7. Analyserade prov Häst 3.

Prov	Röntgen	Ledanestesi	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)
Serum	Lindrig		47,51	3,14
Hasled HB	osteofyt + Ankylos DIT	Positiv	11,24	<1

DIT- distala intertarsalleden. HB - höger bakben.

### Häst 5

Häst 5 var en nioårig halvblodsvalack som blev kraftigt halt på höger bakben en månad före klinikbesöket. Hästen vilades i två veckor och hältan försvann. Ett par dagar före klinikbesöket blev han återigen akut halt på höger bakben i samband med dressyrträning. Hältan hade åter avtagit men var fortfarande kvar enligt ägaren. Hästen opererades som treåring för OCD i båda i tibiotarsallederna samt som femåring med artroskopi av höger bakbens kotled som femåring på grund av en cystisk förändring på den mediala kondylen.

Enligt veterinär var hästen 0.5-1 grad halt på vänster bakben. Lameness Locator bekräftade denna hälta. Högt böjprov vänster bakben bedömdes till 1 grad och lågt till 1.5 grad. Böjprov av höger bakben gav inte någon reaktion. Hästen hade relativt kraftiga böjprovsreaktioner högt och lågt på båda frambenen. Bedövning av vänster tibiotarsalled förbättrade hältan samt släckte böjreaktionen, men vid denna mätning noterades en hälta på vänster framben. Bedövning kotleden VB släckte bakhältan och framhältan var inte längre synlig (tabell 8). Ingen röntgenundersökning gjordes vid detta tillfälle. Hästen behandlades intraartikulärt med kortison och hyaluronsyra i kotled VB och tibiotarsalled VB samt peroralt med fenylbutazon i 10 dagar.

Tabell 8. Lameness Locator analys Häst 5.

	Framben		Bakben	
	Head diff Max/sd	Head diff Min/ s.d	Pelvis diff Max/sd	Pelvis diff Min /s.d
Initial	-3,30/7,55	-4,67/5,19	<b>-3,14/2,40</b>	-1,93/3,10
Anestesi Hasled VB	-2,83/5,31	<b>-9,19/5,45</b>	-1,48/2,42	-2,04/2,62
Anestesi Kotled VB	-1,81/4,60	-2,23/3,11	-2,17/3,06	-0,98/2,52
Initial å.b	-2,37/9,06	1,62/7,58	<b>-3,821/2,65</b>	0,83/2,28

s.d – standardavvikelse. å.b-återbesök Värden som indikerar hälta är fetmarkerade. Positivt värde – högersidig asymmetri. Negativt värde – vänstersidig asymmetri.

Vid återbesök 3 veckor senare fanns en liten markering kvar på vänster bakben enligt veterinär. Detta noterade även Lameness Locator men för få steg utvärderades för en säker analys. Bøjprovsreaktionerna på bakbenen var förbättrade medan bøjprovsreaktionerna på frambenen hade försämrats. Bøjprov på vänster framben gav en reaktion på 2,5 grader högt samt 3 grader lågt. Reaktionerna satt i mycket länge. Motsvarande bøjprov på höger framben gav reaktioner på 1 grad respektive 2 grader. Ingen hälta observerades på frambenen (tabell 8) och inga fler analyser med Lameness Locator genomfördes. Bedövning av kotleden på vänster framben förbättrade bøjreaktionen till ca 0,5 grad. Bedövning av intercarpal och radiocarpalleden på vänster framben släckte den höga bøjprovsreaktionen.

Vid röntgenundersökning av kotleden på vänster framben sågs lindriga tecken på osteoartros. Carpus saknade påvisbara skelettala förändringar. Kotled och karpalleder behandlades med kortison och hyaluronsyra båda fram. Inget mer besök finns noterat.

I tabell 9 redovisas samtliga prov från häst 5. Koncentrationen IL-1 $\beta$  ligger förhållandevis högt i de två serumproven. Detekterbara koncentrationer IL-1 $\beta$  finns i kotleden samt intercarpalleden vid återbesöket. HMGB-1 är detekterbart i alla provtagna leder utom hasleden med högst koncentration i proverna från kotlederna.

Tabell 9. Analyserade prov Häst 5.

Prov	Röntgen	Ledanestesi	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)
Serum			36,24	<1
Hasled VB	-	Positiv	<1,56	<1
Kotled VB	-	Positiv	<1,56	9,29
Serum å.b			30,24	1,29
Kotled VF å.b	Lindrig OA	Släcker endast bøjreaktion	2,42	6,48
r.c VF å.b	ua	Släcker endast bøjreaktion	<1,56	1,14
i.c VF å.b	ua	Släcker endast bøjreaktion	3,11	1,83

*r.c* – radiocarpal. *i.c* – intercarpal. *å.b*- återbesök. *HF* - höger framben. *VF* - vänster framben. *VB* - vänster bakben. *ua* – utan anmärkning.

### Häst 6

Häst 6 var en elvaårig halvblodsvalack som tävlar dressyr i msvA. Hästen blev för ett par veckor sedan kraftigt halt vänster bak och besökte då kliniken utan att hälta kunde lokaliseras och vilades i sjukhage tills nästa klinikbesök. Hästen tog vid det andra klinikbesöket för ett kortare steg med vänster bakben i skritt och initialhälta i trav bedömdes till 0,5 grader på vänster bakben. Vid longering i vänster varv på hårt underlag upptäcktes även hälta på höger framben på 0,5-1 grad. Analysen med Lameness Locator gav värden som indikerade hälta vänster bak och höger fram, men standardavvikelsen är hög (tabell 10). Hästen hade en lindrig galla i hovleden på höger framben, samt lindrig-måttlig galla i hasled och kotsenskida på vänster bakben. Högt bøjprov på vänster bakben gav 1.5-2 gradig hälta. Lågt bøjprov på frambenen gav en reaktion på 1.5 grad på vänster och 3 grader på höger.

Vid bedövning av TMT VB kunde 8,5 ml injiceras och det var därför troligt att kommunikation fanns till distala intertarsalleden. Hältan vänster bak släcktes av glidledsanestesi men håltan höger fram kvarstod enligt veterinär. Lameness Locator-analysen bekräftade detta. Bedövning av hovled HF gav inte någon synlig förbättring. Lameness Locator indikerade återigen håltan på vänster bakben. Låg nervblockad på höger framben släckte håltan HF och ingen håltan syntes inte på något ben (tabell 10).

Tabell 10. Lameness Locator analys Häst 6.

	Framben		Bakben	
	Head diff Max/sd	Head diff Min/ s.d	Pelvis diff Max/sd	Pelvis diff Min /s.d
Initial	8,86/11,36	12,32/12,78	-3,15/5,74	-3,42/5,58
Anestesi TMT VB	<b>8,09/6,65</b>	2,75/10,78	-,016/3,17	9,77/10,29
Anestesi Hovled HF	<b>11,59/7,30</b>	9,77/10,29	<b>-9,50/3,42</b>	-2,74/3,86
Anestesi Låg HF	9,57/16,94	5,07/16,03	-3,99/4,77	-0,54/3,43

s.d – standardavvikelse. Låg – låg nervblockad. Värden som indikerar håltan är fetmarkerade. Positivt värde – högersidig asymmetri. Negativt värde – vänstersidig asymmetri.

Vid röntgenundersökning av vänster has fanns tecken på lindrig osteoartros i TMT, lindrig skleros i gaffelbandets proximala infästning samt entesiofytformationer proximalt på tredje metatarsalbenet. Även höger frambens hov- samt strålben röntgas men utan signifikanta fynd. Hästen behandlas intraartikulärt med kortison i glidlederna vänster bak samt peroralt med fenybutazon i 10 dagar. Vid återbesök tre veckor senare var hästen ohalt i trav på rakt spår och på volt bedömd av veterinär och igångsättning rekommenderades.

Varken IL-1 $\beta$  eller HMGB-1 detekterades i serum eller i hasens glidleder trots subjektivt bedömd håltan, böjprovsreaktion och signifikanta röntgenfynd (tabell 11). I hovleden detekterades däremot både IL-1 $\beta$  och HMGB-1 trots att leden inte var ansvarig för håltan samt att röntgenfynd saknades. Ledvätskan från hovled var dock blodig.

Tabell 11. Analyserade prov Häst 6.

Prov	Röntgen	Ledanestesi	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)
Serum			<1,56	<1
TMT VB	Lindrig osteofyt	Positiv	<1,56	<1
Hovled HF	ua	Negativ	9,15	13,71

TMT – tarsometatarsalled. HF - höger framben. VB - vänster bakben. ua – utan anmärkning.

## Häst 7

Häst 7 var en 15-årig ridponny som importerats från Irland och tävlas i fälttävlan. Hästen tävlades så sent som några dagar före klinikbesöket och blev i samband med detta tydligt halt



på höger framben. Vid undersökning fanns lindriga gallor i samtliga kotleder. Initialhältan bedömdes till 0,5 grad på höger framben. Hältan accentuerades på hårt underlag på volt. Analysen med Lameness Locator var inte tillförlitlig då standardavvikelsen var hög för frambenen men analysen pekade ändå mot en höger frambenshälta samt en vänster bakbenshälta. Vid högt böjprov sågs en reaktion på 0,5 grad på båda frambenen. Vid lågt böjprov sågs en reaktion på drygt 1 grad på båda frambenen och hästen var besvärad av böjningen. Höger framhov visiterades och ömmade lateralt över sulan.

Kotledsanestesi förbättrade böjreaktionen men inte frambenshältan. Mätning med Lameness Locator gav inte ett tillförlitligt resultat då standardavvikelsen blir mycket hög på frambenen. Standardavvikelsen var lägre på bakbenen och där har hältan flyttat till höger bakben (tabell 12). På grund av att den höga standardavvikelsen genomfördes inga fler analyser med Lameness Locator. Anestesi av höger carpus ledavdelningar släckte hältan och böjreaktionen enligt veterinär.

Tabell 12. Lameness Locator analys Häst 7.

	Framben		Bakben	
	Head diff Max/sd	Head diff Min/ s.d	Pelvis diff Max/sd	Pelvis diff Min /s.d
Initial	7,706/11,082	10,919/14,696	<b>-8,463/6,177</b>	0,171/3,454
Anestesi Kotled HF	-9,742/23,202	-19,169/28,533	<b>6,594/5,90</b>	-1,521/5,553

*s.d – standardavvikelse. Värden som indikerar hälta är fetmarkerade. Positivt värde – högersidig asymmetri. Negativt värde – vänstersidig asymmetri.*

Vid röntgen och ultraljudsundersökning av höger carpus sågs ett benfragment plantart i carpometacarpalleden. Den provtagna kotleden röntgenundersöktes inte. Hästen behandlades intraartikulärt i höger carpus med kortison och hyaluronsyra samt peroralt med metacam i 10 dagar. Vid återbesök sågs ingen förbättring.

Koncentrationen IL-1 $\beta$  i serum är hos denna häst en av de högst detekterade. IL-1 $\beta$  var även detekterbart i radiocarpalleden men inte i intercarpalled eller kotled höger fram. HMGB-1 detekterades i relativt höga koncentrationer i samtliga provtagna leder men inte i serum (tabell 13). Ledvätskan från kotleden hade en hög koncentration av HMGB-1 samtidigt som leden inte bedömdes vara huvudansvarig för hältan. Det är naturligtvis möjligt att det finns en patologisk process även i kotleden trots att ingen förbättring av hältan sågs vid anestesi. Böjreaktionen förbättrades alltjämt.

Tabell 13. Analyserade prov Häst 7.

Prov	Röntgen	Ledanestesi	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)
Serum			48,03	<1
Kotled HF	-	Förbättrar böjreaktion	<1,56	29,97
r.c HF	Misstänkt benfragment		5,42	10,91
i.c HF		Släcker böjreaktion	<1,56	14,13

*r.c – radiocarpalled. i.c – intercarpalled. HF - höger framben.*

### Häst 12

Häst 12 var en åttaårig Quartervalack som kommer till kliniken på grund av att han egentligen aldrig fungerat som ridhäst. Hästen hade varit hos samma ägare sedan han var föl. Djurägarens uppfattning var att hästen är stel, ovillig och har ont i hela kroppen. Hästen hade i omgångar tränats i vatten och behandlats av en equiterapeut med varierande resultat.

Enligt veterinär hade hästen en markering på vänster framben på rakt spår. Vid longering på hårt underlag blev hästen 1 grad halt på det inre frambenet i båda varven. Vidare var hästen ovillig att galoppa vid longering. Galla noterades i samtliga kotleder, båda de mellersta karpallederna samt båda hasleder. Vid höga böjprov av frambenen noterades en dålig böjbarhet, hästen visade tecken på obehag och reaktionen bedömdes till 1,5 grad på vänster, respektive 1 grad på höger. Inga reaktioner ficks vid böjning av bakbenen. Analysen med Lameness Locator var svårtolkad då standardavvikelsen på frambenen är mycket hög. På bakbenen indikerade Pelvis diff max hälta på vänster bakben och Pelvis diff min hälta på höger bakben (tabell 14).

Tabell 14. Lameness Locator analys Häst 12.

	Framben		Bakben	
	Head diff Max/sd	Head diff Min/ s.d	Pelvis diff Max/sd	Pelvis diff Min /s.d
Initial	2,689/26,724	7,458/25,57	<b>-4,385/3,23</b>	<b>3,019/2,707</b>
Anestesi	-1,038/5,184	0,364/6,949	0,725/3,295	2,469/2,928
Låg BF				

*Låg BF – låg nervblockad båda framben. s.d – standardavvikelse. Värden som indikerar hälta är fetmarkerade. Positivt värde – högersidig asymmetri. Negativt värde – vänstersidig asymmetri.*

Veterinären valde att gå vidare med att lägga låga nervblockader på båda frambenen vilket släckte hältan vid longering på hårt underlag. Enligt veterinär kvarstod en liten markering på vänster framben på rakt spår. Lameness Locator indikerade ingen hälta på något ben och vid denna mätning är standardavvikelsen lägre. Eftersom hästen objektivt sett inte längre var halt gjordes inga fler analyser. Bedövning av carpus ledavdelningar gjordes på denna häst stegvis. Bedövning av carpus mellersta ledavdelning förbättrade böjreaktionen men släckte den inte helt och markeringen var oförändrad subjektivt bedömt. Bedövning av carpus övre ledavdelning släckte den kvarvarande böjreaktionen samt markeringen.

Vid röntgenundersökning av båda carpallederna sågs måttliga benproliferationer i radiocarpalled och mellersta carpalleden, det vill säga tydliga tecken på osteoartros. Även bröst och ländrygg röntgenundersöktes med misstänkt osteoartros i facettleder samt trånga utrymmen mellan tornutskott i sadelstad och länd med tecken på skleros och lysis dvs. kissing spines. Prognosen för en fungerande ridhäst bedömdes som synnerligen dålig och hästen behandlades därför inte.

HMGB-1 i de båda ledvätskeproven från carpus HF är bland de högsta i undersökningen (tabell 15). Provet från intercarpalleden innehöll dock blod. HMGB-1 var även detekterbart i serum på denna häst. IL-1 $\beta$  detekterades i radiocarpalled och i serum men inte intercarpalled.

Tabell 15. Analyserade prov Häst 12.

Prov	Röntgen	Ledanestesi	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	HMGB-1 (ng/ml)
Serum			14,13	1,79
r.c HF	Måttliga periartikulära osteofyter	Släcker böjreaktion	1,77	44,84
i.c HF	Måttliga periartikulära osteofyter	Förbättrar böjreaktion	<1,56	53,57

*r.c – radiocarpalled. i.c – intercarpalled.. HF - höger framben.*

## DISKUSSION

I studien ingår 14 hästar i varierande ålder, av olika ras och med olika användningsområden. Hästarna provtogs och undersöktes efter misstanke om smärta i eller kring en led. Orsaken till hästens hälta lokaliserades sällan till en enda led eller ens ett ben och att hitta tydligt hältorsakande leder även med ledanestesier och ett objektiva bedömningssystem som Lameness Locator, blev därför en tolkningsfråga. Vidare skiljer sig hästarnas hältor åt vad gäller duration och grad, vissa hästar har mycket lågradiga kliniska hältor utan signifikanta röntgenfynd medan andra har skelettförändringar sedan en längre tid tillbaka. På grund av att patientgruppen var så heterogen samt med ett lågt antal prover blir resultaten svårtolkade och det har heller inte varit möjligt att göra någon statistisk analys.

Den testade hästspecifika ELISA-metoden för IL-1 $\beta$  ger resultat som i denna studie var repeterbara. Även ELISA-metoden för HMGB-1 visade sig vara repeterbar. Men den positiva kontrollen för IL-1 $\beta$  respektive HMGB-1 analyserades endast vid två olika tillfällen vardera. ELISA-metoden för HMGB-1 är inte hästspecifik, men eftersom HMGB-1 är mycket likt (99 % homologi) hos olika däggdjursarter (Dumitriu et al, 2005) bör immunoanalysen vara pålitlig. Dock kunde inte koncentrationer under 1 ng/ml mätas för HMGB-1 och koncentrationer under 1,56 ng/ml mätas för IL-1 $\beta$ .

Flera undersökningar avseende IL-1 $\beta$  och leddskada hos häst finns sedan tidigare. En ökad bioaktivitet (förmåga att stimulera IL-1-beroende T-lymfocyter) av IL-1 i ledvätska från hästleder med artrit har setts jämfört med friska leder (Alwan et al, 1991; Morris et al, 1990). Vidare har även en ökad transkription av IL-1 $\beta$  har noterats i ledbroskets kondrocyter hos hästar med OA (Kamm et al, 2010) och osteokondritis dissekans (OCD) (Trumble et al, 2001) jämfört med friska hästar.

Koncentrationen av IL-1 $\beta$  är högre i serum än i ledvätska hos alla hästar i studien och i endast 6 av 29 ledvätskeprov kunde IL-1 $\beta$  detekteras. Inget tydligt samband mellan påvisbar koncentration av IL-1 $\beta$  och positiv ledanestesi eller röntgenförändringar kan ses. Den högsta noterade koncentrationen IL-1 $\beta$  i ledvätska var 11,24 ng/ml från en hasled som var konstaterat hältorsakande och med signifikanta röntgenfynd. Den näst högsta koncentrationen i ledvätska kom från en hovled utan röntgenfynd och som inte ansågs vara hältorsakande. I en undersökning av Bertone et al (2001) är variationen mellan koncentrationen av IL-1 $\beta$  i ledvätska från symptomfria karpaller stor. Vidare verkar koncentrationen IL-1 $\beta$  i ledvätska också påverkas av hästens ålder (Trumble et al, 2001). Bertone et als (2001) undersökning är gjord med immunoanalyser (ELISA) riktade mot humana cytokiner och är därför svåra att validera då hästens IL-1 $\beta$  bara visar 66 % homologi med humant IL-1 $\beta$  (Kato et al, 1995). Våra resultat motsäger oavsett inte deras slutsatser.

Serumkoncentrationen IL-1 $\beta$  varierar från att inte vara påvisbar till 48,03 ng/ml. De högsta koncentrationerna i serum påvisas hos hästar som har röntgenförändringar i någon led men allvarlighetsgraden av röntgenförändringarna varierar och någon fullständig röntgenscreening av hästarna har inte genomförts. Ingen tydlig korrelation finns heller mellan

koncentrationerna IL-1 $\beta$  i serum och ledvätska hos provtagna hästar. Dessutom kan både IL-1 $\beta$  (Goldring & Otero, 2011) och HMGB-1 (Dumitriu et al, 2005) förekomma extracellulärt vid andra patologiska processer i andra vävnader och kan därför inte betraktas som markörer som är ledspecifika i serum (McIlwraith, 2005). En hög koncentration av IL-1 $\beta$  i serum kanske speglar en annan inflammatorisk process än just OA. Vidare finns ingen studie gjord på normalvariationen av koncentrationen IL-1 $\beta$  i serum på häst.

Flera undersökningar visar att HMGB-1 förekommer extracellulärt i samband med artrit. Vid experimentellt framkallad artrit hos gnagare förekommer mätbara nivåer av extracellulärt HMGB-1 (Kokkola et al, 2002). Vid intrartikulär injektion av HMGB-1 i möss utvecklades artrit genom aktivering av makrofager och produktion av IL-1 (Pullerits et al, 2003). Vidare har behandling med anti-HMGB-1-antikroppar av råttor med kollagen-inducerad artrit visat på hämmad utveckling av ledinflammationen (Kokkola et al, 2003). Forskningen på HMGB-1 hos hästar med ledinflammation är begränsad, men i en studie av Brown et al (2009) hade hästar med OCD en signifikant högre koncentration av HMGB-1 i ledvätska än den friska kontrollgruppen.

I vår studie detekterades HMGB-1 i 24 av 29 ledvätskeprov. Inte heller för HMGB-1 kan något tydligt samband ses mellan hög koncentration och positiv ledanestesi eller röntgenförändringar. Flera av proverna från leder med röntgenförändringar har dock höga koncentrationer HMGB-1. I de 5 ledvätskeprov där HMGB-1 inte detekterades var 4 från hasleder. HMGB-1 påvisades inte i någon ledvätska från hasleder. Antalet prover är visserligen få, men fynden väcker ändå frågan om den normalkoncentrationen av HMGB-1 varierar mellan olika leder. I studien av Brown et al (2009) fanns dock ingen signifikant skillnad mellan koncentrationen HMGB-1 i ledvätska från kotleder och karpalleder. Ledvätska från hasleder ingick inte i Browns et als (2009) studie.

Samtliga prov (1 serumprov, 4 ledvätskeprov) med synlig förekomst av erythrocyter (blodblandade eller hemolys) hade detekterbara koncentrationer av HMGB-1 vilket enligt tillverkaren kan ge ett falskt högt värde. Koncentrationen i dessa prover varierar mellan 3,11 ng/ml till 53,57 ng/ml. Flertalet ledvätskor utan synlig förekomst av blod hade betydligt högre koncentration än 3,11 ng/ml och det verkar därför osannolikt att höga koncentrationer endast beror på erythrocytförekomst. Men det kan ändå i framtida studier vara värdefullt att bestämma erythrocytkoncentrationen i de prov där HMGB-1 analyseras för att säkrare slutsatser ska kunna dras.

I serum kunde HMGB-1 mätas i 8 av 16 prov men endast i 2 av proven var koncentrationen över 2ng/ml. Hos häst 3, vilket hade den högsta detekterbara koncentrationen, hade serumprovet dessutom hemolys. Eftersom HMGB-1 inte förekommer extracellulärt i frisk vävnad (Bianchi, 2009) borde dessa låga serumkoncentrationer vara att förvänta eftersom hästarna bortsett från hältan var kliniskt friska.

## **SLUTSATS**

Denna pilotstudie visar att de inflammatoriska cytokinerna HMGB-1 och IL-1 $\beta$  kan mätas i ledvätska och serum hos häst. De testade ELISA-metoderna ger säkra resultat som kan upprepas. Tyvärr kan inga slutsatser dras om varför koncentrationen av HMGB-1 och IL-1 $\beta$  varierar i serum och ledvätska hos de provtagna hästarna. För att få en bättre uppfattning om förekomst och koncentration av IL-1 $\beta$  och HMGB-1 i ledvätska och serum från halta hästar och dess korrelation till typ av OA och leddestruktion bör framtida studier inkludera fler hästar. Dessutom bör hästar med likartade ledproblem, känd duration av ledproblemen och tidigare behandlingar inkluderas och jämföras med en väl definierad och åldersmatchad frisk kontrollgrupp.

## 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 fluids and sera of horses with arthritis. *Research in Veterinary Science*. 51, 72-77.
- Andersson, U. & Erlandsson-Harris, H. (2010) The role of HMGB-1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1799, 141-148.
- Arend, W.P., Palmer, G. & Gabay, C. (2008) IL-1, IL-18, and IL-13 families of cytokines. *Immunological Reviews*. 223, 20-38.
- 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.
- Bianchi, M.E. (2009) HMGB1 loves company. *Journal of Leukocyte Biology*. 86 (3), 573-576.
- Brown, M.P., Trumble, T.N., & Merritt, K.A. (2009) High-mobility group box chromosomal protein 1 as a potential inflammatory biomarker of joint injury in Thoroughbreds. *Am J Vet Res*. 70, 1230-1235.
- Caron, J.P. (2010) Osteoarthritis. In: *Diagnosis and management of Lameness in the Horse*. Ross, M.W. & Dyson, S.J. (Eds) Second edition, Saunders. 655-668.
- Clegg, P.D., Burke, R.M., Coughlan, A.R., Riggs, C.M. & Carter, S.D. (1997a) Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of cellular sources of these enzymes in joints. *Equine veterinary journal*. 31, 324-330.
- Dinareello, C.A. (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 117(14), 3720-3732.
- Dumitriu, I.E., Baruah, P., Manfredi, A.A., Bianchi, M.E., & Rovere-Querini, P. (2005) HMGB-1: Guiding immunity from within. *TRENDS in Immunology*. 26 (7), 381-387.
- Goldring, M.B. & Otero, M. (2011) Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in Rheumatology*. 23, 471-478.
- Heinegård, D. & Saxne, T. (2011) The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *T. Nat. Rev. Rheumatol*. 7, 50-56.
- 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.
- Kato, H., Ohashi, T., Nakamura, N., Nishimura, Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1995) Molecular cloning of equine interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  cDNAs. *Vet immunol Immunopathol*. 48, 221-231.
- Keegan, K.G., Sifuentes, S., Halliday, J., Messbarger, Q. (2009) *Lameness Locator training manual*. Equinosis LLC.
- Keegan, K.G., Kramper, J., Yonezawa, Y., Maki, H., Pai, F., Dent, E.V., Kellerman, T.H., Wilson, D.A. & Reed, S.K. (2011) Assessment of repeatability of a wireless, inertial sensor-based lameness evaluation system for horses. *Am J Vet Res*. 72 (9), 1156-1163.
- Kokkola, R., Li, J., Sundberg, E., Aveberger, A.C., Palmblad, K., Yang, H., Tracey, K.J., Andersson, U., & Erlandsson-Harris, H. (2003) Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis & Rheumatism*. Volume 48, Issue 7, 2052-2058.
- Kokkola, R., Sundberg, E., Ulfgren, A.K., Palmblad, K., Li, J., Wang, H., Ulloa, L., Yang, H., Yan, X.J., Furie, R., Chiorazzi, N., Tracey, K.J., Andersson, U. & Erlandsson Harris, H. (2002) High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis & Rheumatism*. 46 (10), 2598-2603.

- Ley, C. (2010) Inflammatory response in Equine Joints. Doctoral Thesis No: 2010:16. Swedish University of Agricultural Sciences.
- McIlwraith, C.W. (2005) Use of synovial fluid and serumbiomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine vet. J.* 37 (5), 473-482.
- Morris, E.A., McDonald, B.S., Webb, A.C. & Rosenwasser, L.J. (1990) Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. *Am J Vet Res.* 51(1),59-64.
- 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.
- Pullerits, R., Jonsson, I.M., Verdrengh, M., Bokarewa, M., Andersson, U., Erlandsson-Harris, H., & Tarkowski, A.(2003) High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Jun;48(6):1693-700.
- René van Weeren, P. & de Grauw, J.C. (2010) Pain in Osteoarthritis. *Vet Clin Equine.* 26, 619-642.
- Schultze-Tanzil, G. (2009) Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair. *Annals of Anatomy.* 191, 325-338.
- Steel, C.M. (2008) Equine Synovial Fluid Analysis. *Vet Clin Equine,* 24, 437-454.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R. & Mobasheri, A. (2009) The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal,* 179, 10-24.
- Trumble, T.N., Trotter, G.W., 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. *Am J Vet Res.* 62(9), 1467-77.
- Yang, H. & Tracey, K.J. (2010) Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1799, 149-156.