



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsvetenskap

# **Inflammatoriska biomarkörer i ledvätska och serum hos hästar undersökta med Lameness Locator™**

*Jon Samuelsson*

*Uppsala  
2014*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2014:14*



# Inflammatoriska biomarkörer i ledvätska och serum hos hästar undersökta med Lameness Locator™

## Inflammatory biomarkers in synovial fluid and serum from horses evaluated with Lameness Locator™

*Jon Samuelsson*

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

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

**Biträdande handledare:** Cecilia Ley, 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 i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0751

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2014:14

**ISSN:** 1652-8697

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

**Nyckelord:** osteoartrit, biomarkör, interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), matrixmetalloprotein 13 (MMP-13), high mobility group box protein 1 (HMGB-1), häst, håla

**Key words:** osteoarthritis, biomarker, interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), matrixmetalloproteinase 13 (MMP-13), high mobility group box protein 1 (HMGB-1), horse, equine, lameness

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## SAMMANFATTNING

Osteoartrit (OA) är ett mycket vanligt problem hos hästar och har i många fall sitt ursprung från felaktig belastning av leden, blir ofta kroniska och omfattar inflammation i ledens samtliga ingående delar. Resultatet är bland annat nedbrytning av ledbrosk och matrixkomponenter. Idag baseras diagnostik och framtida prognos mestadels på den kliniska bilden och/eller bilddiagnostiska hjälpmedel.

I denna studie har två inflammationsmediatorer; interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), high mobility group box protein 1 (HMGB-1), och ett enzym; matrixmetallopeptidas 13 (MMP-13) mätts i ledvätska och serum med hjälp av kommersiell *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-teknik. Hypotesen är att dessa är förhöjda i ledvätska från leder med konstaterad hälta.

Tjugonio ledvätskeprov och 11 serumprov från 11 hästar som sökt till Universitetsdjursjukhuset i Uppsala för hälta analyserades i denna studie. I samband med diagnostisk ledbedövning samlades ledvätska och blodprov, och utifrån veterinärbedömning samt undersökning med det objektiva rörelseanalyssystemet Lameness Locator™ (LL) bedömdes leden som positiv eller negativ för hälta. IL-1 $\beta$  fanns i detekterbara nivåer i 2 av 29 ledvätskeprov samt i 7 av 11 serumprov. De hästarna med högst serumnivåer hade även förhöjda nivåer i ledvätska. HMGB-1 var detekterbart i 17 ledvätskeprov och ansågs förhöjt i fem av dessa. HMGB-1 var detekterbart i 2 av 11 serumprov. MMP-13 kunde ej analyseras tillfredsställande med den teknik som fanns tillgänglig.

Underlaget var litet och heterogent, och därför svårt att analysera statistiskt. De hästar med leder som bedömts positiva för hälta visade en högre genomsnittskoncentration av HMGB-1 (11,1ng/ml) jämfört med negativa leder (4,5ng/ml). Denna skillnad var ej statistiskt signifikant. De två leder med detekterbara nivåer av IL-1 $\beta$  tillhörde gruppen positiva leder (n=10). En statistiskt signifikant korrelation mellan HMGB-1 och leukocytantal i ledvätska kunde ses (p=0,02). Mycket forskning kvarstår innan man kan använda dessa biomarkörer kliniskt för diagnostik och prognos för OA på häst. Analysmetoderna behöver utvecklas och det saknas än så länge kunskap om normalnivåer hos friska hästar och hur dessa markörer förändras med tid och grad av OA. Det insamlade materialet kommer att tillföras en påbörjad biobank av ledvätskor och serum från kliniskt halta hästar som undersökts med LL. Denna biobank som nu innehåller prover från ca 50 hästar, kommer att ligga till grund för fortsatta studier av tänkbara biomarkörer för OA på häst.

## SUMMARY

Osteoarthritis (OA) with subsequent lameness is a common problem among horses. Inflammation of the joint, often initialized by abnormalities in joint workload, tends to become chronic and includes the tissues of the entire joint (articular cartilage, subchondral bone and synovial membrane) and its adjacent structures (ligaments and synovial capsule). The joint inflammation results in degradation of articular cartilage with chondrocyte necrosis and fragmentation of its matrix components. Today, diagnosis and prognosis of OA in horses is mostly based upon clinical and/or radiological findings.

In the presented study, the presence of two inflammatory mediators; interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), high mobility group box protein 1 (HMGB-1), and one enzyme; matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) in synovial fluid and serum have been analyzed using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technology. The hypothesis being that these substances are elevated in synovial fluid in joints with clinical lameness.

Twenty-nine synovial samples and 11 serum samples were collected from 11 horses. The horses were presented with lameness at the horse clinic Universitetsdjursjukhuset in Uppsala. Samples of synovial fluid and blood samples were collected during diagnostic intra-articular anesthesia. Based on subjective veterinary examination and objective examination with the lameness evaluation system Lameness Locator™ (LL) the joint was determined as being positive or negative regarding lameness. Detectable levels of IL-1 $\beta$  were present in 2 out of 29 synovial fluid samples and in 7 out of 11 serum samples. The horses with highest serum-levels of IL-1 $\beta$  also had elevated synovial fluid levels. HMGB-1 was detectable in 17 out of 27 synovial samples and considered elevated in five of those. HMGB-1 was detected in 2 out of 11 serum samples. MMP-13 could not be analyzed in synovial fluid or serum with the methods available.

The number of horses and samples included in the presented study were few and heterogeneous, which made it difficult to analyze the results statistically. Samples from joints that were determined positive regarding lameness, had higher concentrations of HMGB-1 (mean = 11.1 ng/ml) than negative (non-lame) joints (mean = 4.5 ng/ml), but the difference was not statistically significant. The two joints that had detectable levels of IL-1 $\beta$ , were found in the 10 joints determined as positive (lame). The joints that had elevated levels of IL-1 $\beta$ , were also determined as positive (lame) joints. A statistically significant correlation could be seen between HMGB-1 and leukocyte count in synovial fluid ( $p=0,02$ ). Additional research is still needed before any of these substances can be used as clinically valid biomarkers. More knowledge about normal variations and how these substances vary with duration and severity of OA is required, and the biochemical analyzes needs further development. The synovial fluids and sera, sampled in this study, will be included in a bio bank, where material from lame horses, evaluated by the LL system is stored. Samples from this bio bank will be used in the future research for evaluation of potential biomarkers in equine OA.

## INNEHÅLL

Inledning.....	1
Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	2
High mobility group box protein 1 (HMGB-1).....	3
Matrixmetallopeptidas 13 (MMP-13) .....	4
Material och metoder .....	6
Urval.....	6
Hantering på klinik.....	6
Lameness locator™.....	7
Hantering av prover.....	7
Radiologisk undersökning.....	7
Analys av IL-1 $\beta$ .....	8
Analys av HMGB-1 .....	9
Analys av MMP-13 .....	9
Statistik.....	9
Resultat.....	10
Klinisk bedömning inkluderande LL .....	10
IL-1 $\beta$ .....	12
HMGB-1.....	12
MMP-13 .....	12
Leukocyter.....	15
Radiologisk undersökning.....	15
Diskussion .....	16
IL1 $\beta$ .....	16
HMGB-1.....	16
MMP-13 .....	19
Leukocytantal i ledvätska.....	19
Begränsningar med tolkning av resultat.....	19
Konklusion .....	20
Källor.....	21

## INLEDNING

Osteoartrit (OA) med klinisk hälta är en mycket vanlig åkomma bland hästar. En studie baserad på försäkringsmaterial visade att ledproblem var den vanligaste orsaken till veterinärbesök hos hästar i Sverige (Penell *et al.*, 2005). Av ledbesvären var OA i kotleden den vanligaste orsaken, följt av OA med påverkan på flera leder och OA involverande karpallederna.

OA kan förenklat sägas ha två grundorsaker: onormal belastning på en normal led, eller normal belastning på en onormal led (Goldring & Goldring, 2007). Sjukdomen uppkommer genom ett komplext samspel av biomekanisk stress och biokemiska faktorer där ledens alla delar, såsom ledbrosk, subkondralt ben, synovialmembran, ledkapsel, ligament och ibland menisker ingår (Felson *et al.*, 2000). I en normal led råder balans mellan katabola faktorer (ex. interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), matrix metalloproteinaser, (MMP:s)) och anabola faktorer (ex. transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), insulin-like growth factor 1 (IGF-1)), (Westacott & Sharif, 1996). Vid OA rubbas denna balans vilket leder till ökning av proinflammatoriska och katabola faktorer (Kuiper *et al.*, 1998). Redan tidigt i förloppet kan man upptäcka tecken på inflammation i ledvätska (Saxne *et al.*, 2003), ledbrosk (Borden *et al.*, 1996) och i vissa fall även i synovialvävnad (Benito *et al.*, 2005). Inflammationen medför vidare aktivering av enzymer som medierar nedbrytning av bland annat aggregat och kollagen II, vilka är byggstenar i extracellulära matrix (ECM) som ger broskets draghållfasthet och elasticitet (Borden *et al.*, 1996; Heinegård & Saxne 2011). Nedbrytningsprodukterna kan i sin tur trigga ytterligare inflammation vilket leder till vidare utveckling av sjukdomen (McKee *et al.*, 1996). Exempel på förändringar i ledens vävnader vid OA är nedbrytning av ledbrosk, benskleros, mikrofrakturer av det subkondrala benet, osteofytbildning och inflammation i ledens mjukdelar samt i brosk och ben. (Loeser *et al.*, 2012).

Denna studie syftar till att undersöka hästar som kommer till kliniken pga ledhälta med misstänkt OA, och att analysera blod och ledvätska från dessa hästar med avseende på IL-1 $\beta$ , high mobility group box protein 1 (HMGB-1) och MMP-13, vilka är faktorer som man vet förekommer i förhöjda nivåer hos hästar med OA (Alwan *et al.*, 1991; Schlopov *et al.*, 1997; Kamm *et al.*, 2010; Heinola *et al.*, 2010). Hypotesen är att förekomsten och nivån av dessa i ledvätska och blod är förhöjda hos hästar med konstaterad ledrelaterad hälta. Målet är att man i framtiden ska kunna använda inflammatoriska biomarkörer kliniskt inom diagnostiken av OA.



## INTERLEUKIN 1B (IL-1B)

IL-1 är en grupp av cytokiner som har en framträdande roll för kroppens inflammatoriska försvar, där bl.a. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  och IL-1-receptorantagonist (IL-1ra) ingår. Dessa har en framträdande roll för kroppens inflammatoriska svar. IL-1 $\beta$  kan bland annat vid systemisk frisättning (ihop med TNF- $\alpha$ ) påverka centrala nervsystemet och ge upphov till feber, sjukdomskänsla, nedsatt aptit. IL-1 $\alpha$  och - $\beta$  kan också inducera produktion av akutfasproteiner, påverka celltillväxt och har även en rad andra proinflammatoriska effekter (Tizard, 2009).

IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$  har samma effekt på målcellen, skillnaden ligger i att IL-1 $\alpha$  syntetiseras i mindre omfattning och är knutet till cellytan på den syntetiserande cellen och således har en lokal effekt. IL-1ra binder till IL-1-receptorer men ger ej upphov till någon vidare signalering och verkar därmed som en inhibitor (Lonneman *et al.*, 1989; Tizard, 2009). Det finns två olika IL-1-receptorer; typ I respektive II. IL-1-receptor I är den normala receptorn och bindning till denna ger fortsatt signalering. IL-1-receptor II är en "falsk" receptor som binder IL-1 men inte ger upphov till någon signalering och har därmed liksom IL-1ra en inhiberande effekt (Colotta *et al.*, 1993; Tizard, 2009). IL-1 receptorer uttrycks på cellytan hos många olika celltyper (Tizard, 2009). Studier på människa har visat att antalet IL-1 typ 1-receptorer ökar hos kondrocyter vid OA (Martel-Pelletier *et al.*, 1992).

IL-1 $\beta$  anses tillsammans med TNF- $\alpha$  vara den viktigaste proinflammatoriska cytokinen vid utvecklandet av OA (Goldring & Goldring, 2007). Makrofagen är den dominerande celltypen när det gäller produktion av IL-1 $\beta$ , men flera även andra celltyper har förmåga att producera IL-1 $\beta$  (Tiku *et al.*, 1992; Tizard, 2009). Kondrocyter kan själva syntetisera IL-1 $\beta$  som kan verka lokalt, men påverkas även sekundärt av synoviocyter som producerar IL-1 $\beta$  vid OA, vilket når kondrocyterna via ledvätskan. Hos människa har man visat att IL-1 $\beta$ -produktionen hos synoviocyter är högre tidigt i förloppet vid utvecklandet av kronisk OA (<1år), för att sedan sjunka något (Benito *et al.*, 2005).

Ökning av IL-1 $\beta$  sker tidigt i förloppet av OA och kan i sin tur leda till ökat uttryck av proteolytiska enzymer (MMP:s), och andra inflammationsmediatorer (Borden *et al.*, 1996, Garcia-Anardis *et al.*, 2010). En *in vitro*-studie med kondrocyter från häst har visat att IL-1 $\beta$  ger en kraftig ökning av den enzymatiska aktiviteten hos viktiga aggregkanaser som *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 & 5*, (ADAMTS4/5) och MMP:s, samt att gentranskriptionen av dessa ökar. Detta gör att nedbrytningen av ledbrosk och proteoglykaner accelereras (Busschers *et al.*, 2010). En annan *in vitro*-studie på häst har också visat att IL-1 $\beta$  minskar kondrocyternas syntes av aggregkan och kollagen II (Ley *et al.*, 2011). IL-1 $\beta$  kan även störa kondrocyternas normala differentiering och proliferation enligt en musmodell *in vivo* (Simsa-Maziel & Monsonaga-Orna, 2012). Enligt samma studie kan IL-1 $\beta$  orsaka apoptos hos kondrocyter. Hämmning av IL-1 $\beta$  kan vara skyddande vid utveckling av kirurgiskt inducerad OA (genom avlägsnande av främre korsband) hos hund, där lindrigare

brosklesioner, mindre osteofyter och lägre nivåer av vissa MMP:s påvisades efter intraartikulär administrering av IL-1-receptorantagonist (Caron *et al.*, 1996).

I en *in-vivo*-studie på häst påvisades ökat genuttrycket för IL-1 $\beta$  i ledbrosk vid mild OA, och ytterligare förhöjt genuttryck vid måttlig OA jämfört med en normal led (Kamm *et al.*, 2010). Mellan måttlig och kraftig OA sågs inga signifikanta skillnader i genuttryck. Samma studie försökte även mäta IL-1 $\beta$  i ledvätska hos hästarna, men nivåerna var för låga för att kunna detekteras med den metod som användes, det är därmed inte fullständigt klarlagt om den ökade transkriptionen i ledbrosk leder till ökade nivåer av IL-1 $\beta$  i ledvätska vid OA hos hästar (Kamm *et al.*, 2010).

Förutom studier som visar på IL-1 $\beta$ s proinflammatoriska, nedbrytande effekt vid OA finns även studier som tyder på att IL-1 $\beta$  är nödvändigt för ledens funktion både i normala leder och i leder med OA. I ett försök på möss av Clements *et al.* (2003) inducerades OA kirurgiskt genom att avlägsna mediala kollateralligamentet och delar av mediala menisken i ena knäleden, dels på knock-out möss som saknade förmåga att bilda IL-1 $\beta$  och dels på möss av vildtyp. Man kunde då se att knock-out möss utvecklade kraftigare OA-förändringar och dessutom snabbare i de leder som genomgått kirurgi. En högre incidens av OA i de leder som ej åtgärdats kirurgiskt hos knock-outmöss jämfört med vildtypen konstaterades också (Clements *et al.*, 2003).

### **HIGH MOBILITY GROUP BOX PROTEIN 1 (HMGB-1)**

HMGB-1 tillhör en grupp intranukleära protein som är vanligt förekommande i alla kroppens vävnader (Pisetsky *et al.*, 2008) och är genetiskt sett mycket konserverad mellan arter (Brown *et al.* 2009). HMGB-1 har olika funktioner beroende på om det befinner sig intra- eller extracellulärt. Intracellulärt medverkar HMGB-1 till att förändra den tredimensionella strukturen hos DNA och är med och reglerar transkription av gener (Pisetsky *et al.*, 2008). Knock-out möss som saknar HMGB-1 föds normala men dör inom 48h då viktiga gener för glukosmetabolismen inte kan uttryckas normalt (Calogero *et al.*, 1999). Man har även sett att HMGB-1 har ökat uttryck i tumörceller vilket tros accelerera genuttryck och påskynda cellcykeln (Choi *et al.*, 2003).

Skadade eller döende celler frisätter HMGB-1 från dess normala plats i cellkärnan till cytoplasman och även extracellulärt. Extracellulärt verkar proteinet som en proinflammatorisk alarmin eller *damage-associated molecular pattern molecule* (DAMP), dvs en endogen substans som signalerar vävnadsskada (García-Arnanadis, 2010). Makrofager och andra immunförsvarsceller kan frisätta HMGB-1 även utan cellskada. I ett försök av Wang *et al.*, (1999) tillsattes bakteriellt endotoxin (lipopolysackarid, LPS) till murina makrofager i sådan dos att det inte orsakade celledöd. Detta gav förhöjda nivåer av HMGB-1 i serum. Frisättningen av HMGB-1 var fördröjd jämfört med andra inflammatoriska cytokiner och författarnas slutsats var att frisättningen snarare medierades av andra proinflammatoriska

cytokiner än av LPS självt. Detta har kunnat styrkas av andra studier (Garcia-Arnandis *et al.*, 2010). Studien av Wang *et al.* (1999) visade även att administration av antikroppar mot HMGB-1 ökar överlevnaden hos möss utsatta för normalt dödlig dos av LPS. De visade även att HMGB-1 kan ha direkt letala egenskaper då det vid ensam administrering i höga doser ledde till döden hos möss, vilket ytterligare visar att HMGB-1 har en potent roll i immunförsvaret (Wang *et al.*, 1999).

Vid immunohistokemisk infärgning av HMGB-1 i ledbrosk hos nötkreatur med olika grad av OA, har man visat att vid kraftig OA sker en translokation av HMGB-1 från intranukleärt till extracellulärt (Heinola *et al.*, 2010). HMGB-1 kan även frisättas av synoviocyter vid påverkan av IL-1 $\beta$ , och verka synergistiskt med IL-1 $\beta$  (García-Arnandis *et al.*, 2010).

HMGB-1s exakta roll vid OA är inte fullständigt klarlagd (Ley *et al.*, 2011). Ley *et al.* (2011) har visat att tillsats av HMGB-1 till hästkondrocyter odlade i pelletsystem inte ger en ökning av matrixdegraderande enzymer utan tvärtom tycks stimulera kondrocytdifferentiering och broskbildning. Däremot har HMGB-1 kunnat inducera OA hos möss. Möss som gavs HMGB-1 intraartikulärt utvecklade i 80 % av fallen tecken på OA (Pullerits *et al.*, 2003). Detta skedde dock inte hos en grupp av knock-outmöss som saknade IL-1-receptor. Detta kan vara en indikation på att HMGB-1 har en inflammatorisk verkan vid OA som åtminstone delvis medieras via vidare aktivering av IL-1 (Pullerits *et al.*, 2003). Samma studie visade att HMGB-1 extracellulärt leder till aktivering av *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), en transkriptionsfaktor som är mycket vanligt förekommande och är viktig för syntesen av IL- $\beta$  (Pullerits *et al.*, 2003). I studier med odlade hästkondrocyter sågs ingen tydlig ökning av HMGB1-mRNA eller translokation av HMGB-1 från intranukleärt till extracellulärt efter långtidsstimulering (48h, 96h och 7 dagar) med IL-1 $\beta$  (Ley, opublicerade resultat).

### **MATRIXMETALLOPEPTIDAS 13 (MMP-13)**

MMPs finns i många av kroppens vävnader. Gemensamt för de 23 olika MMP man känner till hos däggdjur är att de bryter ner komponenter i extracellulära matrix (ECM), och är därmed viktiga för exempelvis sårhäkning och fosterutveckling. Enzymen aktiveras av olika signaler såsom tillväxtfaktorer och cytokiner och inhiberas lokalt av *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs) (Visse & Nagase, 2003). MMP-13, också benämnt kollagenas 3, bryter effektivt ner kollagen typ II vilket är den vanligast förekommande kollagentypen i ledbrosk. Det anses vara det mest potenta och därmed viktigaste kollagenaset i ledbrosk (Mitchell *et al.*, 1996). MMP-13 har vid *in vitro*-försök även visat sig kunna bryta ner aggrecan, en proteoglykan som är vanligt förekommande i ledbroskets ECM (Fosang *et al.*, 1996).

MMP-13 finns normalt i friskt ledbrosk hos människa men har visat sig finnas i högre halter vid OA (Schlopov *et al.*, 1997). Vid immunohistokemisk färgning av degraderat kollagen II och MMP-13 i ledbrosk från patienter med OA följer koncentrationen och utbredningen ofta

varandra. Vid mildare OA ses en ökad aktivitet främst pericellulärt i ledbrösket, nära ledytan, vilket skiljer sig från vid kraftiga förändringar, där MMP-13 och kollagen II-fragment ses mer generellt utbrett i ledbrösket (Wu *et al.*, 2002).

Flera studier på möss styrker MMP-13s roll vid OA. Transgena möss med ökat uttryck av MMP-13 visade tecken på OA i form av matrixdegradering, broskerosioner och synovit (Neuhold *et al.* 2001). Försök med knock-out möss som saknar genen som kodar för MMP-13 har visat att vid kirurgiskt inducerad OA blir skadorna på ledbrösk mindre hos knock-out möss än hos vildtyp, vilket indikerar att MMP-13 har en signifikant roll vid nedbrytningen av ledbrösk vid OA (Little *et al.*, 2009).

I en *in vivo*-studie på hästar med olika grad av OA undersöktes förekomsten av en rad inflammationsmediatorer, däribland MMP-13 i ledvätska och MMP-13mRNA i synovialmembran och ledbrösk. Nivåerna av MMP-13-mRNA var förhöjda i synovialmembran och ledbrösk från hästarna med OA. MMP-13 kunde ej detekteras i ledvätska (Kamm *et al.*, 2010). I studien bedömdes graden av OA vara mild, måttlig eller kraftig beroende på radiologiska, histologiska och makroskopiska fynd. Nivåerna av MMP-13-mRNA varierade med grad av skada och var högst vid måttlig OA, för att sedan vara något lägre vid kraftig OA och ytterligare lägre vid mild OA men ändå förhöjt mot nivåerna i normala leder. Detta gällde för samtliga undersökta vävnader. Liknande förhöjning påvisades även hos andra undersökta inflammatoriska biomarkörer (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  och ADAMTS4/5) Nivåerna av MMP-13-mRNA följde i högre grad nivåerna av TNF- $\alpha$  än IL-1 $\beta$ , vilket möjligen antyder att TNF $\alpha$  är viktigare för regleringen av MMP-13 än IL-1 $\beta$  *in vivo* (Kamm *et al.*, 2010). Det har visats att IL-1 $\beta$  ökar gentranskriptionen av MMP-13 *in vitro* och därmed har potential att påverka halterna av MMP-13 *in vivo* (Borden *et al.*, 1996). Det sker en naturligt ökad aktivitet av MMP-13 hos unga hästar, vilket sannolikt speglar en ökad metabolism till följd av skelettets och ledernas normala utveckling och tillväxt (Brama *et al.*, 2000).

## MATERIAL OCH METODER

### URVAL

Studiematerialet utgjordes av 11 hästar (numrerade H1-H11). Samtliga hästar undersöktes och behandlades för hälta på Universitetsdjursjukhuset (UDS) under perioden september-november 2013. Inklusionskriterierna innefattade patienthäst som sökte för hälta, och som vid besök genomgick diagnostisk intraartikulär anestesi. Hästar som tidigare behandlats intraartikulärt < 3 månader före besöket exkluderades, med undantag av uppföljning av hästar som vid första besöket inkluderades i studien. Åldern på hästarna var mellan 6-26 år, med en genomsnittsålder på 13,4 år. Av hästarna som ingick i studien hade cirka hälften (n=6) haft besvär längre än 1 månad. Generellt var besvären låggradiga, i något mindre än hälften av fallen (n=4) hade ägaren sett en hälta före besöket, se tabell 1. Mer ofta var anledningen till veterinärbesök ovilja från hästens sida eller förändrat beteende på annat sätt i samband med ridning, i ett fall var ledsvullnad primär anledning till besöket. Etisk ansökan för studien godkändes av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (diarienummer C62/13). Samtliga hästägare gav sitt medgivande till att låta deras hästar ingå i studien genom att skriva på ett djurägarmedgivande.

Tabell 1. *Duration och grad av besvär enligt anamnes*

Problemens duration enligt djurägare	Antal hästar (n=11)	Manifest hälta enligt ägare
<1 vecka	-	-
1 vecka	2	1
2 veckor	2	-
3 veckor	1	-
>1 månad	6	3

### HANTERING PÅ KLINIK

Anamnes för samtliga patienter samlades in via ett särskilt formulär (bilaga 1). Hästarna genomgick en hältutredning där klinisk undersökning, grad av hälta på rakt och böjt spår, reaktion på böjningsprov samt vilken led som var påverkad bedömdes subjektivt av behandlande veterinär Karin Holm-Forsström. Dessutom genomfördes undersökning med det objektiva rörelseanalyssystemet Lameness Locator™ (LL) på rakt spår och volt. I samband med diagnostisk intraartikulär anestesi samlades ledvätskeprov och blodprov. Förnyad hältbedömning av veterinär samt med LL samt i trav på rakt och böjt spår utfördes 15-25 minuter efter bedövning. I vissa fall bedövades flera leder/ledavdelningar samtidigt, vilket resulterade i att förekommande fall korrelerades två olika ledvätskeprov till samma bedövning.

## LAMENESS LOCATOR™

Lameness Locator™ är ett verktyg för att objektivt påvisa rörelseasymmetrier/hältor hos hästar. Systemet utvecklades vid University of Missouri och består av tre sensorer som mäter rörelse. Dessa sensorer placeras på korset, på huvudlagets nackstycke respektive över kotbenet på höger framben, se figur 1. Genom att mäta asymmetrier i hästens huvud- och bäckenrörelse kan hältor upptäckas, systemet kan också kvantifiera hältan och differentiera mellan vilket ben som rörelsestörningen utgår från samt om den är tydligast tidigt eller sent i stegcykeln. Den insamlade datan analyseras automatiskt av Lameness Locator™ och presenteras numeriskt och visuellt, se figur 2 (Sunesson, 2009; Keegan *et al.*, 2010; Keegan *et al.*, 2011). Studier gjorda på SLU har visat det finns god korrelation mellan en hältutredares bedömning och resultat från Lameness Locator™ vid hälsa på häst (Sandström, 2009; Sunesson, 2009).



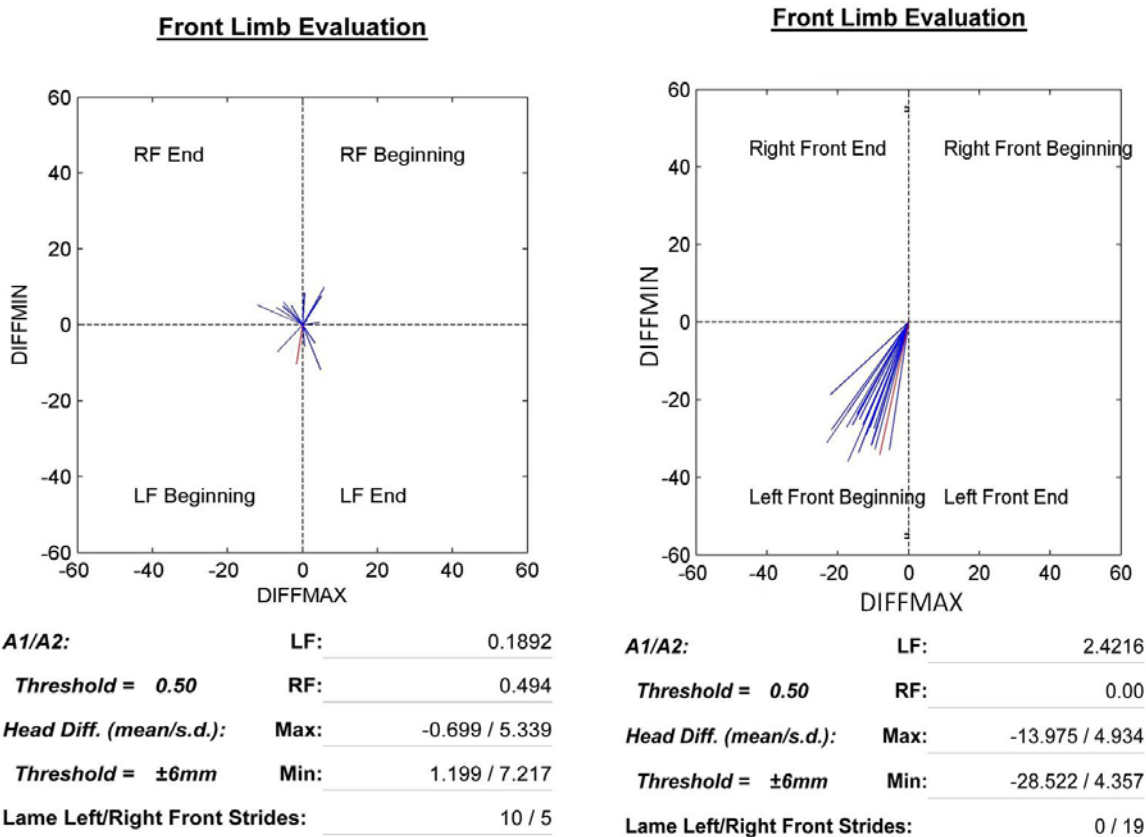
Figur 1. Häst utrustad med Lameness Locator™. De tre sensorerna fästs på korset (vänstra bilden), på huvudlagets nackstycke (bilden i mitten) samt distalt om kotleden på höger framben (högra bilden). Förutom utrustningen på bilden ingår en dator med särskild mjukvara för analys och bearbetning av rådata. Foto: Marie Rhodin.

## HANTERING AV PROVER

Ledvätska och blodprov kylades direkt efter provtagning och centrifugerades vid 450 x g i 10 minuter vid 4°C inom 2,5h efter provtagning. Efter centrifugering av ledvätska separerades supernatanten från cellerna. Vid centrifugering av blod separerades serum och sparades. Samtliga prover förvarades i -80°C innan vidare analys.

## RADIOLOGISK UNDERSÖKNING

I fem fall undersöktes hästarna radiologiskt som ett komplement till hältutredningen. Undersökningen gjordes i samband med besöket och bilderna tolkades av veterinärer på bilddiagnostiska avdelningen på Universitetsdjursjukhuset. I röntgenutlåtandena bedömdes radiologiska tecken på kronisk OA såsom osteofyter och entesiofyter. Förändringarna graderades som milda, måttliga eller kraftiga.



Figur 2. Resultat från mätning av frambensasymmetri, som den presenteras vid användning av Lameness Locator™. Den vänstra grafen visar en ohalt häst och den högra en häst som är halt på vänster framben. Linjerna i figuren motsvarar asymmetrin i varje steg. Längden på linjen anger asymmetriens magnitud och riktningen dess ursprung, linjer riktade uppåt indikerar hälta från höger ben, nedåt indikerar vänster. Om linjen sträcker sig åt vänster eller höger bestämmer om asymmetrin förekommer tidigt (isättning) eller sent (frånskjut) i stegcykeln. Generellt uppvisar en frisk ohalt häst små asymmetrier riktade åt olika håll, i motsats till en halt häst som tenderar att uppvisa samma typ av asymmetri i varje stegcykel och ha kraftigare asymmetri. Under graferna presenteras resultaten numeriskt. För frambenen anges en asymmetri av  $>\pm 6\text{mm}$  som gränsvärde för hälta. En motsvarande bild fås även av bakbenens rörelser. Bild: Marie Rhodin.

## ANALYS AV IL-1B

För analys av IL-1 $\beta$  användes Equine IL-1 $\beta$  VetSet™ ELISA Development test (katalognummer: VS031E-002), utvecklat för användning på supernatant från cellodlingar och blod från häst av Kingfisher Biotech, inc. Analysen utfördes enligt tillverkarens instruktioner med undantag för att proverna inkuberades i två timmar vid den initiala tillsatsen av ledvätska och standard, istället för en timme som protokollet angav. Anledningen till detta var att resultaten ska vara jämförbara med resultat som är gjorda tidigare, då protokollet angav två timmars inkubation. En standardkurva innehållande kända koncentrationer (3,1-200 ng/ml) av IL-1 $\beta$  användes för att bestämma koncentrationen i av IL-1 $\beta$  i proverna. Metoden har tidigare använts för analys av ledvätska och serum av Maria Löfgren, SLU.

## **ANALYS AV HMGB-1**

Halten HMGB-1 i serum och ledvätska kvantifierades med hjälp av en sandwich-ELISA utvecklat av Dr. Ikuro Maruyama och Shino-test corporation och som tillverkas av IBL International GMBH (katalognummer: ST51011). Testet är utvecklat för humant bruk men även indicerat för användning på nöt, gris, kanin, mus och råtta enligt tillverkaren. Då proteinsekvensen för ekvin HMGB-1 är 99 % identisk med den humana sekvensen kan testet även användas för analys av ekvina prover. Metoden har tidigare använts för att analysera ledvätska och serum från häst av Maria Löfgren, SLU. Analyser utfördes enligt tillverkarens instruktioner. En standardkurva innehållandes kända koncentrationer (2,5-80 ng/ml) av HMGB-1 analyserades för att bestämma koncentrationen av HMGB-1 i proverna.

## **ANALYS AV MMP-13**

För att analysera halterna av MMP-13 i ledvätska och serum användes Fluorescein® E (katalognummer: F13M00), en kommersiell sandwich-ELISA som utnyttjar fluorescens för att mäta aktivt MMP-13. Den är utvecklad för humant bruk och tillverkad av R&D Systems, Inc. Analysen genomfördes efter tillverkarens instruktioner utan tillsats av *p-aminophenylmercuric acatate* (APMA) vilket möjliggjorde analys av aktivt MMP-13. En standardkurva innehållandes kända koncentrationer (0,25-16 ng/ml) av MMP-13 analyserades för att bestämma koncentrationerna i proverna. Metoden är ej tidigare utprovad vid SLU på ledvätska och serum från häst.

## **STATISTIK**

Resultaten analyserades statistiskt med hjälp av Mann-Whitney U-test och Spearman's rangkorrelation, vilka är metoder som lämpar sig bra för små datamängder. Användningen av statistik begränsades av studiematerialets begränsade storlek och stora heterogenitet. Gränsvärdet som användes för statistisk signifikans var  $p < 0,05$ . Analys med Spearman's rangkorrelation ger förutom p-värde (signifikans) ett korrelationsvärde mellan 0 och 1 där 1 innebär fullständig korrelation och 0 ingen korrelation alls. Spridningsmättet variationsvidd användes, då de undersökta parametrarna i många fall kan antas vara icke normalfördelade och datamängden var för liten för att använda kvartilavstånd tillfredsställande.



## RESULTAT

### KLINISK BEDÖMNING INKLUDERANDE LL

Resultaten från LL ihop med bedömningen från behandlande veterinären analyserades för att avgöra om den diagnostiska bedövningen av den aktuella leden skulle betraktas som positiv, dvs. att hältan på ett signifikant sätt påverkats positivt av bedövningen eller inte. Grad av hälta bedömdes före och efter varje bedövning av undersökande veterinär. Hältan graderades från markering, vilken är den lindrigaste graden av hälta, och därefter med hjälp av en 10-gradig nominal skala där 0,5° innebär lindrig hälta och 5° representerar blockhälta. Om hältan ej påverkades av den intraartikulära lokalbedövningen tillföll ledvätskeprovet från denna led gruppen negativ kontroll. Sammanlagt samlades 29 ledvätskeprov in från sex olika leder/ledavdelningar, se tabell 2. I samtliga fall där det förekom motstridiga resultat avseende veterinärens bedömning och resultatet från LL användes benämningen ”positiv/negativ med reservation”. Detsamma gällde om förändringarna var mycket små eller på annat sätt svårtolkade. Vid tveksamma fall har som regel den veterinära bedömningen fått visst bedömningsföreträde gentemot LL även om båda resultaten vägts in, se tabell 3. Om mängden ledvätska som provtogs översteg 1ml, användes 0,5 ml för analys av antalet leukocyter på laboratoriet för klinisk kemi på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala.

Tabell 2. *Fördelning av ledvätskeprover mellan olika leder för de hästar (n=11) som ingick i studien*

Leder	Antal ledprov (n=29)
Interkarpalled	9
Radiokarpalled	8
Kotled fram	8
Hovled fram	2
Femoropatellarled	1
Medial knäled	1

Tabell 3: Sammanställning av effekten av diagnostisk ledanestesi samt grad av initialhälta före bedövning. Den sammantagna bedömningen användes i studien och utgjordes av en sammanvägning av resultaten från Lameness Locator™ och resultaten från den subjektiva veterinärbedömningen av veterinär Karin Holm-Forsström. Initialhälta före aktuell bedövning bedömdes subjektivt av Karin Holm-Forsström och objektivt med LL. Teckenförklaringar till tabell 2: Markering är den minsta hältgraden, därefter försetter graderingen från 0,5° (lindrig hälta) till 5° (blockhalt). R.C – radiokarpalled, I.C – interkarpalled, Fem. pat.-femoropatellarled, M. Knä – medial knäled, + = Positiv, (+) = Positiv med reservation, - = Negativ, (-) = Negativ med reservation, dx = höger, sin = vänster.

<sup>1</sup> Bedövad ihop med ovanstående led

<sup>2</sup> Ej halt före bedövning enligt Lameness Locator™

	Sammantagen bedömning	Lameness Locator™	Veterinär- bedömning	Initialhälta Före bedövning
	Resultat av bedövning			
H1 Kotled	+	+	+	Markering
H2 Fem.pat	(+)	-	+	2-3°
H2 M. Knä	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	<sup>1</sup>
H3 Kotled	+	(+)	+	0,5°
H4 R.C	+	+	+	1°
H4 I.C	+	+	+	Markering
H5 R.C. dx	(+)	(-)	+	Markering
H5 I.C dx	(+) <sup>1</sup>	(-) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	<sup>1</sup>
H5 R.C sin	+	+	+	0,5°
H5 I.C sin	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	<sup>1</sup>
H6 R.C	+	<sup>2</sup>	+	Markering
H6 I.C	+ <sup>1</sup>	<sup>2</sup>	+ <sup>1</sup>	<sup>1</sup>
H7 Hovled	-	-	-	0,5°
H7 Kotled	(-)	-	(-)	0,5°
H7 R.C	(+)	-	+	0,5°
H7 I.C	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	Markering
H8 I.C	+	+	+	1°
H8 Kotled	(+)	(-)	+	Markering
H9 Kotled	(+)	(+)	+	1°
H9 R.C	(+)	-	+	Markering
H9 I.C	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	<sup>1</sup>
H10 Kotled	+	+	+	Markering
H10 R.C	(+)	(+)	+	Markering
H10 I.C.	(+) <sup>1</sup>	(+) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	<sup>1</sup>
H11 Kotled	(-)	<sup>2</sup>	(-)	Markering
H11 Hovled	(+)	<sup>2</sup>	(+)	Markering
H11 R.C	(-)	<sup>2</sup>	(-)	Markering
H11 I.C	(-) <sup>1</sup>	<sup>2</sup>	(-) <sup>1</sup>	

## **IL-1B**

Mängden IL-1 $\beta$  i ledvätska uppmättes i två fall till över den lägsta detektionsnivån, 3,1 ng/ml. Båda dessa prover kom från leder med säker positiv effekt av ledbedövning. De förhöjda värdena låg på 4,6 ng/ml (interkarpalled) respektive 4,8 ng/ml (kotled), se tabell 4. Vid analys av serum uppvisade prover från sju hästar nivåer av IL-1 $\beta$  över lägsta detektionsnivå. Dessa värden låg mellan 4-68,5 ng/ml. De hästar som hade högst nivå av IL-1 $\beta$  i ledvätska hade även högst nivåer i serum. Standardkurvan som konstruerades utifrån kända koncentrationer av IL-1 $\beta$  hade  $R^2=0,994$ .

## **HMGB-1**

Samtliga hästar hade nivåer av HMGB-1 som var högre än lägsta detektionsnivå (>2,5 ng/ml) i något ledvätskeprov, se tabell 4. Av 29 ledvätskeprov hade tio provvärden under lägsta detektionsnivå (<2,5 ng/ml), 17 hade värden över detta (medel: 15,1 ng/ml (2,5-71,7 ng/ml)) och två prover gick ej att analysera pga. hemolys. Nivåerna i serum var generellt lägre, endast två hästar hade serumvärden över lägsta detektionsnivå (medel: 4,7 ng/ml (2,8-6,5 ng/ml)). Standardkurvan som konstruerades utifrån kända koncentrationer av HMGB-1 hade  $R^2=0,995$ .

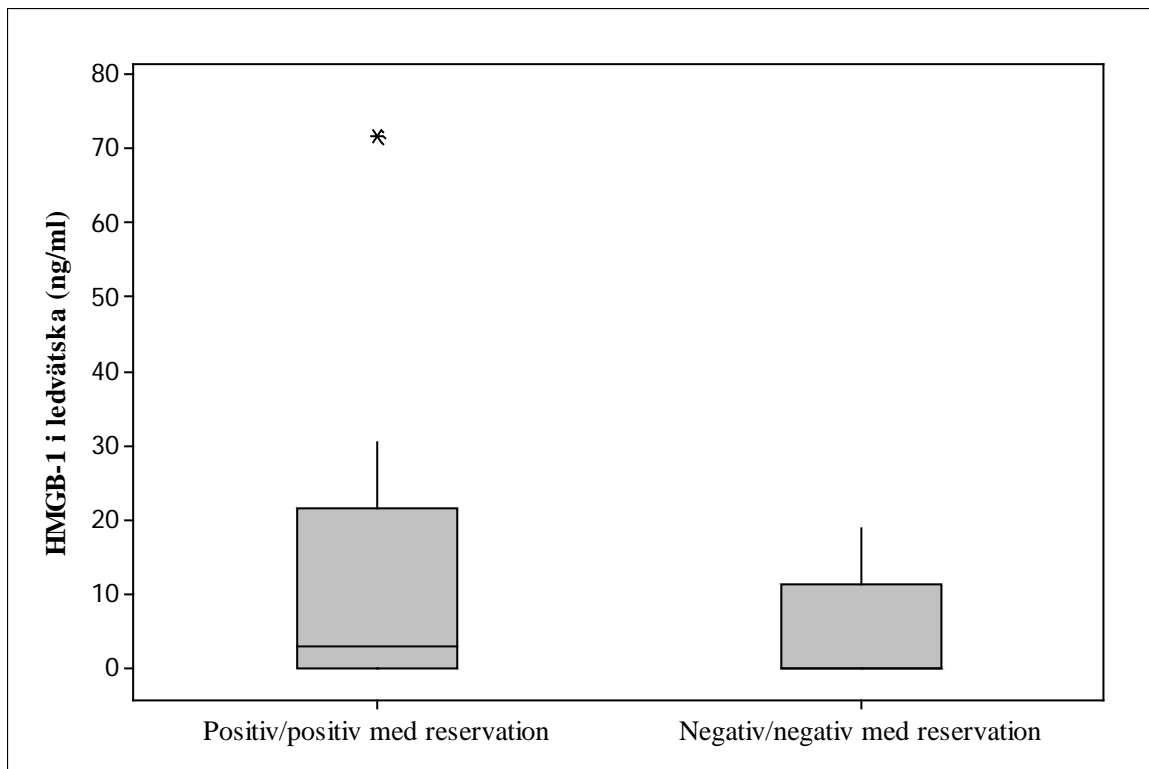
Ingen av de hästar med serumnivåer HMGB-1 över detektionsgränsen hade förhöjda nivåer i ledvätska. Alla prover med förhöjda nivåer HMGB-1 i ledvätska kom från bedövningar som bedömts positiva (n=3) eller positiva med reservation (n=2). Ledprov från bedövningar som bedömts som positiva eller positiva med reservation (n=21) hade en genomsnittskoncentration av HMGB-1 på 11,1ng/ml (<2,5-71,7). Gruppen negativa/negativa med reservation (n=5) hade i genomsnitt 4,5ng/ml (<2,5-19). Resultaten överlappade varandra och skillnaden var ej signifikant (p=0,26), se figur 3.

## **MMP-13**

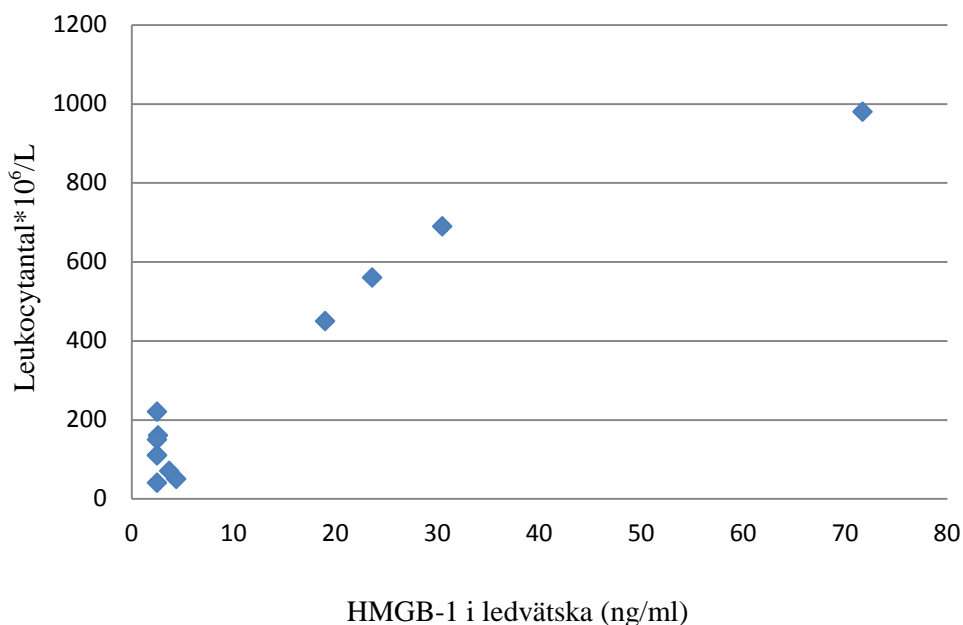
En testanalys genomfördes innan prov från detta projekt analyserades. Då aktivt MMP-13 ej kunde detekteras i de analyserade proverna kräver metoden mer utveckling och validering innan man kan använda den för analys av MMP-13 i ledvätska och serum från häst.

Tabell 4: Sammanställning av nivåer av IL-1 $\beta$  och HMGB-1 i serum och ledvätska samt bedömning av ledbedövning, duration av problem samt i förekommande fall röntgenförändringar och leukocytantal i ledvätska. Teckenförklaringar till tabell 4: R.C – radiokarpalled, I.C – interkarpalled, fem. pat.-femoropatellarled, med. knä – medial knäled, + = Positiv led, (+) = Positiv med reservation, - = Negativ led, (-) = Negativ med reservation, dx = höger, sin = vänster, Ev lindrig artrit = små radiologiska förändringar där normalvariation ej kan uteslutas <sup>1</sup>Bedövad ihop med ovanstående led, <sup>2</sup>Ej undersökt

	IL-1 (ng/ml)		HMGB-1 (ng/ml)		Effekt av bedövning	Duration	Radiologiska förändringar	Leukocyt x10 <sup>6</sup> /l
	Ledvätska	Serum	Ledvätska	Serum				
H1 Kotled	<3.1	4,0	22,4	<2,5	+	>4v	Ev lindrig artrit	- <sup>2</sup>
H2 Fem.pat	<3.1	5,7	6,2	2,8	(+)	>4v	Lindrig- måttlig artrit i knäled	- <sup>2</sup>
H2 M. Knä	<3.1		7,9		(+) <sup>1</sup>			- <sup>2</sup>
H3 Kotled	4,8	68,5	2,6	<2,5	+	1v	- <sup>2</sup>	160
H3b Kotled (återbesök)	<3.1	- <sup>2</sup>	6,8	- <sup>2</sup>	Ej bedövad		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H4 R.C	<3.1	20,6	30,5	<2,5	+	1v	Kraftig artrit i carpus	690
H4 I.C	4,6		Hemolys		+			690
H5 R.C. dx	<3.1	7,8	2,5	<2,5	(+)	>4v	- <sup>2</sup>	110
H5 I.C dx	<3.1		3,0		(+) <sup>1</sup>		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H5 R.C sin	<3.1		2,8		+		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H5 I.C sin	<3.1		<2,5		+ <sup>1</sup>		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H6 R.C	<3.1	<3,1	23,6	<2,5	+	>4v	- <sup>2</sup>	560
H6 I.C	<3.1		20,5		+ <sup>1</sup>		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H7 Hovled	<3.1	<3,1	<2,5	6,5	-	>4v	Måttlig artrit	- <sup>2</sup>
H7 Kotled	<3.1		19,0		(-)		Ev lindrig artrit	450
H7 R.C	<3.1	<3,1	4,4		(+)		Lindrig artrit	50
H7 I.C	<3.1		<2,5		(+) <sup>1</sup>		Ev lindrig artrit	- <sup>2</sup>
H8 I.C	<3.1	<3,1	<2,5	<2,5	+	2v	Måttlig artrit	220
H8 Kotled	<3.1		71,7		(+)		Inga förändringar	980
H9 Kotled	<3.1	10,2	24,0	<2,5	(+)	2v	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H9 R.C	<3.1		<2,5		(+)		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H9 I.C	<3.1		<2,5		(+) <sup>1</sup>		- <sup>2</sup>	40
H10 Kotled	<3.1	15,1	Hemolys	<2,5	+	3v	- <sup>2</sup>	220
H10 R.C	<3.1		<2,5		(+)		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H10 I.C.	<3.1		4,3		(+) <sup>1</sup>		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H11 Kotled	<3.1	<3,1	3,7	<2,5	(-)	>4v	- <sup>2</sup>	70
H11 Hovled	<3.1		<2,5		(+)		- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
H11 R.C	<3.1		<2,5		(-)		- <sup>2</sup>	150
H11 I.C	<3.1		<2,5		(-) <sup>1</sup>		- <sup>2</sup>	110



Figur 3: HMGB-1 i ledvätska, jämförelse mellan leder som betraktas som positiva eller positiva med reservation ( $n=21$ ) respektive negativa eller negativa med reservation ( $n=5$ ) med avseende på hälta. Skillnaden var ej signifikant ( $p=0,26$ ). Linjen inuti boxarna representerar medelvärdet (linjen sammanfaller med lägsta värdet i gruppen negativ/negativ med reservation). Den fyllda boxen representerar övre och undre kvartilen, strecken ovanför boxarna representerar övriga värden och asterixen ett värde som kraftigt avviker från de övriga (outlier).



Figur 4: Leukocytantal i ledvätska korrelerat till HMGB-1 ( $n=10$ ). Korrelationen var 0,67 och statistiskt signifikant ( $p=0,02$ ).

## **LEUKOCYTER**

Leukocytantal i ledvätska mättes i 14 leder och uppvisade värden mellan  $40-980 \cdot 10^6/L$ . Ledvätskeprov från bedövningar som bedömts som positiva eller positiva med reservation ( $n=10$ ) hade ett medelvärde på  $370 \cdot 10^6/L$  ( $40-980 \cdot 10^6/L$ ), ledvätskeprov från bedövningar som bedömts negativa eller negativa med reservation ( $n=4$ ) hade medelvärdet  $130 \cdot 10^6/L$  ( $70-450 \cdot 10^6/L$ ). Skillnaden var ej signifikant ( $p=0,39$ ). Leukocytantal korrelerade till koncentrationen HMGB-1 i ledvätska. Korrelationsvärdet var 0,67 och statistiskt signifikant ( $p=0,02$ ), se tabell 4 och figur 4.

## **RADIOLOGISK UNDERSÖKNING**

Sammanlagt nio leder från fem hästar undersöktes radiologiskt. Resultaten varierade från inga tecken på kronisk artrit till kraftiga förändringar i de undersökta lederna, se tabell 4. Radiologiska förändringar kunde ses i leder med förhöjda nivåer av IL1- $\beta$  och HMGB-1 men även i leder utan detekterbara nivåer av de undersökta substanserna. I tre fall sågs mycket milda radiologiska förändringar som skulle kunna representera normalvariation, men där radiologen ej kunde utesluta artritförändringar, dessa anges i tabell som eventuell (ev) lindring artrit. I övrigt är förändringarna graderade efter radiologens utlåtande om lindriga, måttliga, eller kraftiga tecken på kronisk OA.

## DISKUSSION

Ingen statistiskt signifikant skillnad kunde ses mellan positiva och negativa leder avseende någon undersökt parameter i denna studie. Hos samtliga undersökta parametrar där mätbara nivåer erhöles kunde oftare högre värden i ledvätska från leder som bedömts som positiva eller positiva med reservation gentemot gruppen som bedömts negativa eller negativa med reservation påvisas. Viss koppling kunde ses mellan nivåerna av IL-1 $\beta$  i serum och ledvätska, de högsta serumvärdena uppmättes hos hästar där även IL-1 $\beta$  kunde detekteras i ledvätskan. För HMGB-1 påvisades inte något sådant samband.

### IL1 $\beta$

De två hästar som hade högst nivå av IL-1 $\beta$  i ledvätska hade även högst nivåer av IL-1 $\beta$  i serum. Nivåerna i serum var mellan 4,5-14ggr högre än i ledvätska. Hos människa med akut traumatisk OA har förhållandet visats vara det omvända, med mer än fyra gånger högre nivåer av IL-1 $\beta$  i ledvätska än i serum i det akuta skedet (inom en månad efter skada) (Catterall et al, 2010). Med detta som utgångspunkt är det osannolikt att nivåerna av IL-1 $\beta$  i dessa leder skulle leda till en så pass kraftig höjning av serum-IL-1 $\beta$  enbart pga. av patologi i en led. IL-1 $\beta$  är inte specifikt för OA utan kan stiga vid i princip alla typer av inflammation och därmed ha väldigt många orsaker (Tizard, 2009). Dock visade båda de aktuella hästarna tecken på OA från flera leder och dessutom liknande reaktioner bilateralt vilket skulle kunna ge en kumulativ effekt som leder till högre serumnivåer i blod än i individuella leder. Studier innefattandes många fler halta hästar med olika duration av hältn och antal involverande leder skulle behövas för att klargöra detta. De två hästar som visade högst nivåer av IL-1 $\beta$  i ledvätska hade den kortaste anamnesen med hältn som pågått i sju respektive nio dagar samt palperbar mild-måttlig ledsvullnad, vilket möjligen kan antyda att IL-1 $\beta$  är mer förhöjt i ledvätska tidigt i förloppet. Materialet är dock för litet för att en sådan slutsats ska kunna dras. Det gick inte att se någon koppling mellan detekterbara nivåer av IL-1 $\beta$  och grad av hältn. De leder med detekterbara nivåer hade initialhältn på 1 $^{\circ}$  respektive markering enligt den subjektiva veterinärbedömningen, se tabell 5.

Sannolikt krävs känsligare analysmetoder för IL-1 $\beta$  på häst för att tillfredsställande kunna koppla nivåerna i ledvätska till prognos och diagnosticering avseende OA, då koncentrationer i många fall sannolikt ligger under denna metods detektionsgräns på 3,1 ng/ml även om de är förhöjda. Detta är något som också diskuterats i andra studier (Kamm *et al.*, 2010).

### HMGB-1

Brown *et al.* (2009) anger i sin studie normalvärden för HMGB-1 i kotled till 11,1 $\pm$ 6,1 ng/ml, interkarpalled till 7,2 $\pm$ 6,0 ng/ml och i radiokarpalled till 16,5 $\pm$ 9,1 ng/ml. Dessa normalvärden är framtagna från en undersökning med stora variationer i mätresultat, men om dessa gränsvärden relateras till nivåerna i vår studie ses förhöjda värden i fem leder; tre kotleder, en interkarpalled och en radiokarpalled, se tabell 6. HMGB-1 påvisades i förhöjda nivåer hos

både hästar med kort (en vecka) och lång (>4 veckor) anamnes vilket kan tyda att det var förhöjt under en längre tid. Det sågs både i leder med och utan röntgenförändringar. Den led som hade förhöjt IL-1 $\beta$  hade detekterbart men ej förhöjt HMGB-1-värde. Få studier är gjorda på normalvärden för HMGB-1 i hästens ledvätska, det är därför svårt att med säkerhet avgöra vad som bör räknas som förhöjt. I denna studie har gränsvärdena som Brown *et al.* (2009) tagit fram använts. Dessa normalvärden är baserade på ett relativt litet antal hästar (n=40) och variationen inom normalgränserna är stor. Sannolikt behövs mer forskning för att fastställa vad som är normal koncentration av HMGB-1 i ledvätska på häst, och om värdena skiljer sig mellan olika leder, vilken analysmetod som används, varierar med hästens ålder, etcetera. Förhöjda nivåer av HMGB-1 i ledvätska kunde ej kopplas till grad av hälta, förhöjda nivåer förekom i leder med hältgrad från markering till 1°, se tabell 5.

Koncentrationerna i serum var generellt lägre med endast tre värden över detektionsgränsen på 2,5 ng/ml. När det gäller serum saknas publicerade studier med normalvärden på häst vilket gör dessa värden svårtolkade. Det kunde ej påvisas något samband mellan förhöjd nivå i serum och förhöjd nivå i ledvätska i denna studie. Detekterbara serumvärden sågs hos tre hästar med ledvätskenivåer från ej detekterbart till förhöjt.

Interkarpal- och radiokarpalleader hade högre andel negativa resultat med avseende på HMGB-1, jämfört med kotleder. Det kan ha sin förklaring i att de olika ledavdelningarna i karpus i majoriteten av fallen bedövades samtidigt. Detta har medfört att man vid en positiv bedövning ej kunnat skilja på hästar med påverkan på båda ledavdelningar från de med enbart den ena ledavdelningen påverkad. Detta har gjort att risken för falskt positiva leder ökat och tolkningen av resultaten från dessa leder blivit svår att göra.



Tabell 5. Grad av initialhåla (före bedövning av aktuell led) korrelerat till detekterbara nivåer av IL-1 $\beta$  och förhöjda nivåer av HMGB-1 i ledvätska (Brown et al., 2009). Teckenförklaring tabell 5: Markering är den minsta håltgraden, därefter fortsätter graderingen med 10-gradig nominal skala från 0,5° (lindrig håla) till 5° (blockhalt). R.C – radiokarpalled, I.C – interkarpalled + - förhöjda värden (HMGB-1), detekterbara (IL-1 $\beta$ ).

Häst	Initialhåla	IL-1 $\beta$	HMGB-1
H1 Kotled	Markering		+
H3 Kotled	1°	+	
H4 R.C	1°		+
H4 I.C	Markering	+	
H6 I.C	Markering		+
H8 Kotled	Markering		+
H9 Kotled	1°		+

Tabell 6: HMGB-1 i respektive led. Värdena i tabellen avser medelvärden med variationsvidd inom parentes i förekommande fall. Gränsvärdena som används för förhöjda respektive negativa i tabellen är de som anges i studien av Brown et al., 2009. Teckenförklaring tabell 6: R.C – radiokarpalled, I.C – interkarpalled.

	Antal prov	Antal negativa	Antal förhöjda	Medelvärde negativa (ng/ml)	Medelvärde förhöjda (ng/ml)	Hemolys
Kotled	8	4	3	8,0 (2,6-19)	39,3 (22,4-71,7)	1
R.C	8	7	1	5,8 (<2,5-23,6)	30,5	-
I.C	9	7	1	2,8 (<2,5-4,3)	20,5	1
Hovled	2	2	-	<2,5	-	-
Medial kondylled	1	1	-	7,9	-	-
Femoro-patellarled	1	1	-	6,2	-	-

## **MMP-13**

Inget aktivt MMP-13 kunde detekteras med den metod som fanns tillgänglig att använda. Andra studier har fått liknande resultat vid analys av ledvätska från häst där andra ELISA-metoder utvecklade för humant bruk använts (Kamm *et al.*, 2010). Att MMP-13 ej kan detekteras i ledvätska från häst med en ELISA utvecklad för humant bruk kan bero på dålig korsreakens mellan antikroppar mot human MMP-13 och ekvin MMP-13. Genetiskt sett är ekvin och human MMP-13 lika, homologin i den genetiska sekvensen är över 90 % (Orth *et al.*, 2002). ELISA-teknik bygger på specifika antikroppar som binder in till specifika delar av ett protein, och trots hög total homologi kan det finnas delar av ett protein där graden av överensstämmande är lägre. Om antikroppen är riktad mot ett område där den genetiska skillnaden är stor, kommer det sannolik resultera i dålig korsreakens. En ELISA utvecklad specifikt för ekvint bruk skulle kunna ge andra resultat, men i dagsläget finns inget sådan tillgänglig kommersiellt.

## **LEUKOCYTANTAL I LEDVÄTSKA**

Leukocytantal var i fyra fall högre än vad som anses som normalvariation för leukocytantal i ledvätska på häst ( $<500 \cdot 10^6/L$ ) (Mahaffey, 2002; de Grauw, 2011). Samtliga förhöjda värden kom ifrån leder som bedömts positiva för hälta. Signifikant korrelation sågs mellan HMGB-1 och leukocyter i ledvätska ( $p=0,02$ ). Korrelationsvärdet bestämdes till 0,67 med Spearman-test. Värden över 0,7 indikerar att ett starkt samband föreligger (Scott *et al.*, 2013). I detta fall kan sambandet sägas vara måttligt. Samtliga leder med förhöjda HMGB-1 värden hade leukocytantal  $>450 \cdot 10^6/L$  ( $450-980 \cdot 10^6/L$ ), samtliga med HMGB-1 inom normalvariation hade leukocytantal  $<250 \cdot 10^6/L$  ( $40-220 \cdot 10^6/L$ ), se figur 1 och tabell 4.

Förhöjda HMGB-1-värden (Brown *et al.*, 2009) korrelerade i tre av fyra fall till förhöjda leukocytantal (Mahaffey, 2002; de Grauw, 2011) i ledvätska. I ett fall hade en ledvätska med förhöjda nivåer HMGB-1 leukocytnivåer något under cut-off värdet för stegrat leukocytantal ( $450 \cdot 10^6$ ). Dessa resultat baserades på ett litet antal prover ( $n=10$ ), ett större material behöver utvärderas innan några slutsatser kan dras angående om dessa metodens gränsvärden motsvarar varandra.

## **BEGRÄNSNINGAR MED TOLKNING AV RESULTAT**

All tolkning av resultaten i denna studie bygger på om en given led betraktas som positiv avseende hälta, dvs. anses ha tecken på OA, eller inte. Om leden är feldiagnostiserad och därmed placerad i fel grupp kommer detta att göra att felaktiga slutsatser dras. Majoriteten av de hästar som ingick i studien hade lindriga problem med liten initialhälta. Forskning har visat att hältbedömning vid lindriga hältor är vanskligt, samma hästar kan bedömas olika beroende på undersökande veterinär. I en studie där flera veterinärer fick bedöma samma häst fann man att vid lindriga hältor var graden av överensstämmande (dvs. om hästen ansågs halt på ett givet ben) bland erfarna veterinärer endast 61,7 % (Keegan *et al.*, 2010). I den här studien har samma veterinär bedömt hästarna vid samtliga tillfällen och det objektiva

rörelseanalyssystemet Lameness Locator™ (LL) har använts för att förbättra säkerheten i bedömningen av hältorna. Trots detta finns alltid en risk att vissa leder felbedöms, denna risk ökar sannolikt ju mildare symptom hästen uppvisar.

Vid cirka hälften av de intraartikulära bedövningarna (11 av 20) var det svårt att helt fastställa om den intraartikulära bedövningen påverkade initialhåltan eller ej då resultaten från LL och den subjektiva veterinära bedömningen var helt eller delvis motstridiga. I majoriteten av dessa tveksamma fall sågs effekt av bedövningen vid trav på rakt spår eller volt, trav efter böjprov och/eller framförandet av benet (rörelsemönster) enligt den veterinära bedömningen, medan asymmetrin uppmätt med LL kvarstod. I vissa fall påvisade inte LL någon asymmetri före bedövning, trots att veterinären uppfattade hästen som halt. Dessa skillnader i bedömning kan ha berott på att en veterinär har möjlighet att bedöma andra saker än huvud- och bäckenrörelser, såsom framförande av ben, steglängd, framåtbjudning med mera. Då LL mäter den genomsnittliga asymmetrin för samtliga stegcykler (Keegan *et al.*, 2011) kan intermittenta hältor vara svårtolkade för LL, medan en veterinär har möjlighet att selektera vilka steg som ska ligga till grund för bedömningen. Generellt gavs den veterinära bedömningen bedömningsföreträde vid tveksamma fall i denna studie, men även resultaten från LL påverkade samtliga slutbedömningar.

## KONKLUSION

Resultaten från den här studien tyder på att det möjligen kan finnas en potentiell roll för biomarkörer vid diagnostisering av OA på häst, då leder med positiv hälta visade en högre genomsnittskoncentration av HMGB-1 (11,1ng/ml) jämfört med negativa leder (4,5ng/ml). Denna skillnad var dock inte statistiskt signifikant. Det återstår dock en hel del arbete innan detta kan få praktisk tillämpning. Ingen publicerad studie har enligt författarens vetskap framgångsrikt analyserat MMP-13 i ledvätska hos häst, och mycket få studier är gjorda på HMGB-1 och IL-1 $\beta$ . Mer forskning behövs angående nivåerna av samtliga undersökta substanser i ledvätska och serum för att man ska kunna fastställa vad som är normala nivåer hos friska hästar och hur dessa nivåer förändras vid olika skeden av OA. Först när normalvärden finns framtagna och kännedom om hur nivåerna korrelerar till grad och duration av OA kan ett batteri av biomarkörer möjligen börja användas i klinisk diagnostik.

Materialet i denna studie är för litet för att man ska kunna dra några slutsatser avseende diagnostik av OA på individnivå, men de insamlade proverna kommer att vara en del av en biobank som är under uppbyggnad. Proverna i denna biobank kommer att kunna användas för att utveckla och testa nya analysmetoder som utvecklas avseende biomarkörer för ekvin OA.

## KÄLLOR

- 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*. Vol. 51, ss: 72–77.
- Benito, M. J., Veale, D. J., FitzGerald, O., Van den Berg, W. B., Bresnihan, B. (2005) Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. Vol. 64, ss: 1263–1267.
- Borden P., Solymar D., Sucharczuk A., Lindman B., Cannon P., Heller R. A. (1996). Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, ss: 23577-23581.
- Brama P. A. J., TeKoppele J M., Beekman B. van El B., Barneveld A., van Weeren P. R. (2000). Influence of development and joint pathology on stromelysin enzyme activity in equine synovial fluid. *Annals of the rheumatic diseases*. Vol. 59, ss: 155-157.
- 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. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 70, ss: 1230-1235.
- Busschers, E., Holt, J. P., Richardson, D. W. (2010). Effects of glucocorticoids and interleukin-1 $\beta$  on expression and activity of aggrecanases in equine chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 71 ss: 176-185.
- Calogera, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferarri, S., Bianchi, M. E. (1999) The lack of chromosomal protein HMG-1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nature Genetics*. Vol. 22, ss: 276-280.
- Caron, J., P., Fernandez, J., C., Martel-Pelletier, J., Tardif, G., Mineau F., Geng, C., Pelletier, J-P. (1996). Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 39, ss: 1535-1544.
- Catterall, J. B., Stabler, T. V., Flannery, C. R., Kraus, V. B. 2010. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). *Arthritis Research & Therapy*. Vol. 12, R229.
- Choi, Y. R., Kim, H., Kang, H. J., Kim, N. G., Kim, J. J., Park, K. S., Paik, Y. K., Kim, H. O., Kim, H. (2003) Overexpression of high mobility group box 1 in gastrointestinal stromal tumors with KIT mutation. *Cancer Research*. Vol. 63, ss: 2188-2193.
- Clements, K. M., Price, J. S., Chambers, M. G., Visco, D. M, Poole, A. R, Mason, R. M. (2003). Gene Deletion of Either Interleukin-1, Interleukin-1–Converting Enzyme, Inducible Nitric Oxide Synthase, or Stromelysin 1 Accelerates the Development of Knee Osteoarthritis in Mice After Surgical Transection of the Medial Collateral Ligament and Partial Medial Meniscectomy. *Arthritis & Reumatism*. Vol. 48, ss: 3452-3463.
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, J. E., Mantovani, A. (1993) Interleukin-1 Type II Receptor: A Decoy Target for IL-1 That Is Regulated by IL-4. *Science*. Vol. 261, ss: 472-475.

- de Grauw, J.C. (2011). Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Veterinary Quarterly*. Vol. 31, ss: 77-86.
- Felson, D. T., Lawrence, R. C., Dieppe, P. A., Hirsch, R., Helmick, C. G., Jordan J. M., Kington, R. S., Lane, N. E., Nevitt, M. C., Zhang, Y., Sowers, M. F., McAlindon, T., Spector, T. D., Poole, A. R., Yanovski, S. Z., Ateshian, G., Sharma, L., Buckwalter, J. A., Brandt, K. D., Fries, J. F. (2000). Osteoarthritis: New Insights Part 1: The Disease and Its Risk Factors. *Annals of internal medicine*. Vol. 133 ss: 635-646.
- Fosang, A. J., Last, K., Knäuper, V., Murphy, G., Neame, P. J. (1996). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) letters*. Vol. 380, ss: 17-20.
- García-Arnandis, I., Guillén, M. I., Gomar F., Pelletier, J-P., Martel-Pelletier, J., Alcaraz M. J. (2010). High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1b in osteoarthritic synoviocytes. *Arthritis Research & Therapy* 12:R165.
- Goldring, M. B., Goldring, S. R. (2007). Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology*. Vol. 213, ss: 626-634.
- Heinegård, D., Saxne, T. (2011). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. Vol. 7, ss: 50-56.
- Heinola T., Kouri V. P., Clarijs P., Ciferska H., Sukura A., Salo J., Kontinen Y. T. (2010). High mobility group box-1 (HMGB-1) in osteoarthritic cartilage. *Clinical and Experimental Rheumatology*. Vol. 4, ss: 511-518.
- 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 Veterinary Journal*. Vol 42 ss: 693-699.
- Keegan, K. G., Kramer, J., Yonesawa, Y., Maki, H., Pai, P. F., Dent, E., Kellerman, T., Wilson, D, Reed, S. (2011). Assessment of repeatability of a wireless, inertial sensor-based lameness evaluation system for horses. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 72, ss: 1165-1163.
- Keegan, K. G., Dent, E. V., Wilson, D. A., Janicek, J., Kramer, J., Lacarrubba, A., Walsh, D. M., Cassells, M. W., Esther, T. M., Schiltz, P., Frees, K. E., Wilhite, C. L., Clark, J. M., Pollitts, C. C., Shaw, R., Norris, T. (2010). Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses. *Equine Veterinary Journal*. Vol. 42, ss: 92-97.
- Kuipera, S., Joostena, L. A. B., Bendeleb, A. M., Edwards, C. K., Arntza, O. J., Helsena, M. M. A., Van de Looa, F. A. J., Van den Berga, W. B. (1998). Different roles of tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 in murine streptococcal cell wall arthritis. *Cytokine*. Vol. 10, ss: 690-702.
- Ley, C., Svala, E., Skiöldebrand, E., Blomén, E., Hultenby, K., Eloranta, M-L., Ekman, S. (2010). Gene expression and immunolocalisation of high mobility group box protein (HMGB)-1 in interleukin (IL)-1 $\beta$  and -6 stimulated three dimensional equine chondrocyte cultures. *Inflammatory Resonse in Equine Joints*, doctoral thesis no. 2010:16, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Sveriges Lantbruksuniversitet.

- Ley, C., Svala, E., Nilton, A., Lindahl, A., Eloranta, M-L., Ekman, S., Skiöldebrand, E. (2011) Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. *Connective tissue report*, Vol. 52, ss: 290-300.
- Little, C. B., Barai, A., Burkhardt, D., Smith, S. M., Fosang, A. J., Werb, Z., Shah, M., Thompson, E. W. (2009) Matrix Metalloproteinase 13–Deficient Mice Are Resistant to Osteoarthritic Cartilage Erosion but Not Chondrocyte Hypertrophy or Osteophyte Development. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 60, no. 12, ss: 3723–3733.
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis a disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 64, ss: 1697-1707.
- Lonneman, G., Endres, S., Ven der Meer, J. W. M., Cannon, J. G., Kock, K. M., Dinarello, C. A. (1989) Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1a, interleukin 1b and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *European Journal of Immunology*. Vol. 19, ss: 1531-1536.
- Mahaffey, E.A. (2002). Synovial Fluid. In: Cowell, R.L., *et al.* (Eds.) *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2:nd. ed. pp. 163-170 Elsevier Health Sciences. ISBN 0323013171.
- Martel-Pelletier, J., McCollum, R., Dibattista, R., Faure, M-P., Chin, J. A., Fournier, S., Sarfati, M., Pelletier, J-P. (1992). The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 35, ss: 530-543.
- McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., Noble, C. W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 98, ss: 2403–2413.
- Mitchell, P. G., Magna, H. A., Reeves, L. M., Lopresti-Morrow, L. L., Yocum, S. A., Rosner, P. J., Geoghegan, P. G., Hambor, J. E. (1996). Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 97, ss: 761-768.
- Neuhold, L. A., Killar, L., Zhao, W., Sung, M-L. A., Warnes, L., Kulik, J., Turner, J., Wu, W., Billinghamurst, C., Meijers, T., Poole, A. R., Babij, P., DeGennaro, L. J. (2001) Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 107, ss: 35-44.
- Orth, M. W., Peters, T. L., Haekins, J. N. (2002) Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCl and chondroitin sulphate. *Equine Veterinary Journal*. Vol. 34, ss: 224-229.
- Penell, J. C., Egenvall, A., Bonnett, B. N., Olson, P., Pringle, J. (2005). Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *Veterinary Record* Vol. 157 ss: 470-477.
- Pisetsky D. S., Erlandsson-Harris H., Andersson U. (2008). High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Research & Therapy* 10:209.

- Pullerits, R., Jonsson, I-M., Verdrengh, M., Bokrewa, M, Andersson, U., Erlandsson-Harris, H., Tarkowski, A. (2003). High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. Vol. 48, ss: 1693-1700.
- Sandström, K. (2009). Jämförelse mellan subjektiv bedömning och en objektiv bedömningsmetod av hältor på rakt spår. Sveriges Lantbruksuniversitet. Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap/Veterinärprogrammet. Examensarbete 2010:21.
- Saxne, T., Lindell, T., Månsson, B., Petersson, F., Heinegård, D. (2003). Inflammation is a feature of the disease process in early knee joint osteoarthritis *Rheumatology*, Vol. 42, ss: 903–904.
- Scott, M., Flaherty, D., Curren, J. (2013) Statistics: are we related? *Journal of Small Animal Practice*. Vol: 54, ss:124–128
- Shlopov, B.V., Lie W. R., Mainardi, C. L., Cole A. A., Chubinskaya, S., Hasty, K. A. (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 40 ss: 2065-2074.
- Simsa-Maziel, S. & Monsonaga-Orna, E. (2012). Interleukin-1 $\beta$  promotes proliferation and inhibits differentiation of chondrocytes through a mechanism involving down-regulation of FGFR-3 and p21. *Endocrinology*, Vol. 153, ss: 2296-2310.
- Sunesson, E. (2009). En kvalitativ utvärdering av det accelerometerbaserade hältedetektionssystemet ”Lameness Locator”. Sveriges Lantbruksuniversitet. Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap/Veterinärprogrammet. Examensarbete 2009:16
- Tiku, K., Thakker-Varia, S., Ramachandrala, A., Tiku, M. L. (1992). Articular chondrocytes secrete IL-1, express membrane IL-1, and have IL-1 inhibitory activity. *Cellular Immunology*. Vol. 140, ss: 1-20.
- Tizard, I. R. (2009) *Veterinary Immunology – an introduction*. 8. ed. S:t. Louis: Saunders Elsevier, ss: 20-22.
- Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases - Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation Research*. Vol. 92, ss: 827-839
- Wu, W., Billingham, R. C., Pidoux I, Antoniou, J., Zukor, D., Tanzer, M., Poole, A. R. (2002). Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 46 ss: 2087-2094
- Westacott, C. I., Sharif, M. (1996). Cytokines in Osteoarthritis: Mediators or Markers of Joint Destruction. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. Vol. 25 ss: 254-272.