



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Tiludronsyra till häst

Farmakologi och terapeutiska effekter

Emma Storm

*Uppsala
2015*

Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet

Kandidatarbete 2015:46

Tiludronsyra till häst – Farmakologi och terapeutiska effekter

Tiludronate in the horse - Pharmacology and therapeutic effects

Emma Storm

Handledare: Carina Ingvast Larsson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: 2015:46

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

Nyckelord: Tiludronsyra, häst, verkningsmekanismer, effektivitet, tolerans

Key words: Tiludronate, horse, mechanisms of action, efficiency, tolerance

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och Metoder	3
Litteraturöversikt.....	3
Allmän information om bisfosfonater	3
Benresorption	4
Tiludronsyras inverkan på benresorptionen	5
Tiludronsyras anti-inflammatoriska effekt.....	6
Effekter observerade in vitro	6
Effekter observerade in vivo	6
Indikationer, användningsområden och effektivitet hos häst.....	7
Terapeutiska effekter efter behandling med tiludronsyra in vivo	7
Påverkan av tiludronsyra på biomarkörer	8
Doser och doseringsregimer	8
Säkerhet och bieffekter.....	9
Bisfosfonater och tiludronsyra som läkemedel hos människa	9
Diskussion	9
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Hältor och ledsador är inom hästvärlden vanliga problem av stor betydelse som ofta är svåra att behandla. Exempel på skador inom de här kategorierna är spatt och strålbenshälta. På senare år har bisfosfonaten tiludronsyra börjat användas mot dessa åkommor för att hämma benresorptionen. Substansen finns som godkänt läkemedel till häst i ett antal europeiska länder men finns endast tillgängligt som licensläkemedel i Sverige. Syftet med denna litteraturstudie är att redogöra för tiludronsyras verkningsmekanismer, effektivitet och säkerhet.

I kroppen binder tiludronsyra till hydroxyapatit som är en beståndsdel i kroppens benmineral. Substansen verkar genom att hämma benresorptionen på olika sätt. *In vitro* kan tiludronsyra metaboliseras till ATP-analoger i osteoklaster vilket leder till apoptos hos cellerna. Substansen har även visats hämma protonpumpar i osteoklasternas membran vilket gör att nedbrytningen av benmineral minskar. Ett tredje sätt för tiludronsyra att verka mot benresorptionen *in vitro* är genom förstörelse av aktinringar i osteoklasterna. Det medför att osteoklasternas kontakt med benvävnaden försvagas. Utöver hämningen av benresorptionen har tiludronsyra observerats ha en viss antiinflammatorisk effekt. Substansen verkar då genom att hämma cytokiner och kväveoxid (NO). Effekt på metalloproteinaser har också setts.

Tiludronsyras effektivitet hos häst är oklar. Studier har visat att tiludronsyra eventuellt kan förbättra skador som spatt, strålbenshälta och lesioner i vertebralkanalen. Bland annat har minskad hältgrad och ökad flexion i ryggraden observerats efter behandling. Studier tyder också på att behandling med tiludronsyra är effektivare mot skador av lindrigare grad. CTX-1, en biomarkör för benresorption, har påvisats minska efter behandling med tiludronsyra till häst.

Få studier berör tiludronsyras säkerhet hos häst. Bieffekter som setts är hypokalcemi, ökad hjärtfrekvens, muskeltremor, svettningar och kolik. Dock gavs endast normaldosen av tiludronsyra i den säkerhetsstudie som gjorts och mer långsiktiga studier saknas.

Av de studier som utförts för att utreda tiludronsyras effektivitet hos häst har många finansierats av läkemedelsföretaget CEVA som framställer läkemedlet Tildren vilket kan innebära partiskhet. Även metoder för att bedöma tiludronsyras effektivitet kan utgöra bias. Hältbedömning varierar mellan olika personer och koncentrationen av en biomarkör är inte ett mått på benresorptionen i helhet. Delar av studierna har inte varit placebokontrollerade vilket gör det svårt att dra några egentliga slutsatser. För att få en reell bild av tiludronsyras effektivitet samt säkerhet vid olika led- och skelettlidanden behövs det fler oberoende och placebokontrollerade studier med större studiepopulationer.

SUMMARY

Lameness and joint injuries in horses are frequently occurring and often refractory problems of big importance. Bone spavin and navicular disease are examples. In recent years the bisphosphonate tiludronate has been used as a treatment for these injuries and this substance acts by inhibiting the bone resorption. Tiludronate is an approved drug in several European countries but in Sweden it is only available off-label. The purpose of this study is to review on the mechanisms of actions, the efficacy and the safety of tiludronate.

In the body, tiludronate bind to hydroxyapatite in the bone mineral. After binding, it acts by inhibiting the bone resorption in different ways. *In vitro*, tiludronate can be metabolized into ATP analogues in osteoclasts, which causes apoptosis in the cells. It has also been shown that the substance can inhibit proton pumps in the membranes of the osteoclasts. This decreases the breakdown of bone mineral. A third mechanism which inhibits the bone resorption *in vitro* is destruction of actin rings in the osteoclasts. This leads to a weaker contact between the osteoclasts and the bone tissue. In addition to inhibited bone resorption, tiludronate has been observed to have an anti-inflammatory effect *in vitro*. This effect is carried out by inhibiting cytokines and nitrogenmonoxide (NO). An effect on metalloproteinases has also been noticed.

The efficacy of tiludronate is not completely clear. Studies have shown that tiludronate may improve injuries like bone spavin, navicular disease and lesions in the vertebral column. Reduced grade of lameness and increased flexion in the spine are examples of effects observed after tiludronate treatment. Studies also indicate that treatment with tiludronate is more effective against less serious injuries. CTX-1, a biomarker of bone resorption, has been shown to decrease after administration of tiludronate in horse.

Few studies shine light on the safety of tiludronate in horses. Observed side effects are hypocalcaemia, increased heart rate, muscle tremors, sweating and colic symptoms. In horses, the single safety study that has been done only used normal doses of tiludronate and no long-term studies have been conducted.

Many studies on the efficacy of tiludronate in the horse are financed by the drug company CEVA who produce the drug Tildren. This conflict of interest may result in studies with bias and there is also a risk that important information, or negative results, are left out. Methods for assessing the efficacy of tiludronate might also be a source of bias. Assessment of lameness varies between different people and the concentration of a biomarker is not a measure of the bone resorption in its entirety. Parts of the studies on tiludronate have not been controlled with placebo, which makes it hard to draw reliable conclusions. More independent and placebo controlled studies with bigger study populations are therefore needed. This would help in gaining a more representative picture of the comprehensive efficacy of tiludronate and of the safety during treatment of different skeletal and joint injuries.

INLEDNING

Hältor och ledsador är bland de vanligast förekommande skadorna inom hästvärlden (Kaneene, Ross & Miller, 1997). Runt hälften av alla sjukdomsfall hos hästar i Sverige är enligt data från försäkringsbolaget Agria kopplade till hälta (Penell *et al.*, 2005). Skadorna är ofta mycket kostsamma och hälta är en av de vanligaste orsakerna till avlivning av hästar i Sverige (Ireland *et al.*, 2011). Det är därför av stort intresse att finna effektiva behandlingar. Det finns dock svårigheter i detta då hältor kan ha många olika orsaker. Olika behandlingar kan fungera olika bra beroende på etiologin (Adams, 2012).

Bisfosfonater är läkemedel som sedan många år tillbaka använts vid behandling av bland annat Pagets sjukdom, hyperkalcemi och osteoporos hos människa (Graham & Russel, 2011). De verkar genom att hämma benresorptionen (nedbrytningen av ben). På senare tid finns bisfosfonaten tiludronsyra även godkänt till hästar i ett antal länder (CEVA, n.d.). Huruvida behandlingen är effektiv och lönsam är dock oklart. Studier har visat en viss effekt hos hästar diagnostiserade med bland annat spatt, strålbenshälta och osteoporotiska ryggradslesioner (Denoix *et al.*, 2003; Coudry *et al.*, 2007; Gough, Thibaud & Smith, 2010) men frågan är hur pålitliga resultaten egentligen är. Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka och granska tiludronsyras egenskaper och verkningsmekanismer *in vitro* samt dess effektivitet och säkerhet hos hästar *in vivo*.

MATERIAL OCH METODER

Till denna litteraturstudie användes databaserna Web of Science och Pubmed för sökning efter artiklar. Först gjordes en sökning i Pubmed med sökorden "tiludronate OR tiludronic acid AND horse*". Sökningen begränsades till "other animals" samt till språken engelska och franska. Vidare gjordes sökningar på "bisphosphonate* AND horse*" och "tiludronate AND osteoclast* OR mechanism". Sökningar med samma sökord gjordes i Web of science. I denna databas begränsades sökningen till "pharmacology pharmacy", "article" och "review". Sökningar innehållandes sökordet "horse" begränsades även till "veterinary sciences". Från review-artiklars och andra artiklars referenslistor som gavs från sökningarna hittades fler artiklar. En lärobok, ett par review-artiklar och några hemsidor har använts för bakgrundsinformation.

LITTERATURÖVERSIKT

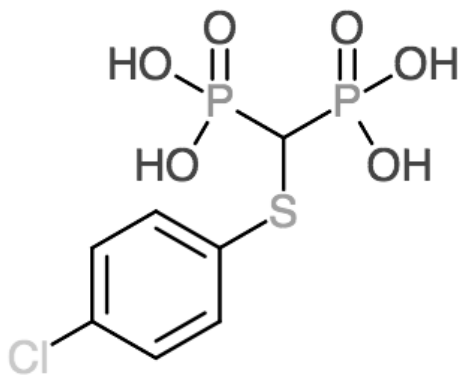
Allmän information om bisfosfonater

Bisfosfonater är syntetiska, organiska ämnen och analoger till pyrofosfater som förekommer naturligt i kroppen. I stället för en syreatom som i pyrofosfaterna har bisfosfonaterna en kolatom bundet till två fosforatomer (Figur 1). Denna bindning bidrar till en värmeresistent och kemiskt stabil molekyl. Bisfosfonater har en stark affinitet till hydroxyapatit vilket gör att de kan binda till benmineral. Där kan de påvisas länge efter administrationstillfället men halveringstiden är okänd. Beroende på hur de olika bisfosfonaternas sidokedjor är utformade kan de ha olika verkningsmekanismer (Soto & Chiappe Barbará, 2014).

Det finns två huvudgrupper av bisfosfonater: aminobisfosfonater och icke-aminobisfosfonater. De skiljer sig i effektivitet och verkningsmekanism. Aminobisfosfonater,

exempelvis ibandronsyra, risedronsyra, zoledronsyra och alendronsyra, anses ha en starkare antiresorptiv förmåga, det vill säga en bättre förmåga att förhindra bennedbrytning, än icke-aminobisfosfanater. Tiludronsyra (Figur 1), liksom etidronsyra och klodronsyra, är en icke-aminobisfosfonat (Soto & Chiappe Barbará, 2014).

Tiludronsyra finns tillgängligt som läkemedel för behandling av häst i Australien, Österrike, Frankrike, Italien, Luxemburg, Nederländerna, Norge, Sydafrika och Storbritannien (Drugs.com, n.d.). Indikationerna för läkemedlet är spott och stålbenshälta. Läkemedlet Tildren skall enligt läkemedelsföretaget CEVA (n.d.) ges intravenöst med dosen 0,1 mg/kg kroppsvikt, en gång dagligen i 10 dagar. Tidigare har tiludronsyra även funnits tillgängligt till människa för behandling av Pagets sjukdom (*Paget's disease*) men preparatet har nu utgått från marknaden (Drugs.com, n.d.). Det finns dock andra bisfosfonater som används för samma ändamål, till exempel pamidronat och zoledronsyra (Graham & Russel, 2011).

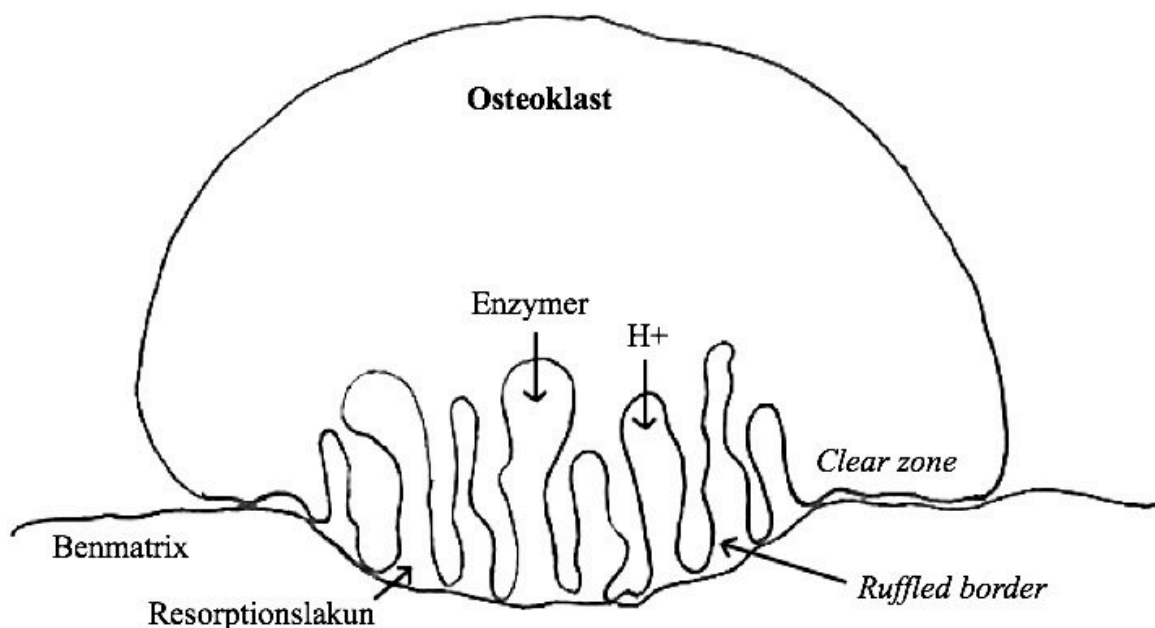


Figur 1. Modell av tiludronsyras molekylära struktur.

Benresorption

Det är osteoklaster som spelar den största rollen vid nedbrytningen av ben (Figur 2). De har så kallade *clear zones*, det vill säga delar av cytoplasman som innehåller gott om aktin och vars omgivande cellmembran binder till benmatrix via integriner. Aktinet bildar aktinringar som bidrar till att osteoklastens kontakt med benet blir starkare. Det medför att en resorptionslakun med bra mikroklimat för benresorption bildas. Mellan osteoklastens *clear zones* finns en del av cellmembranet som kallas *ruffled borders* eller veckade ytor. Där finns det protonpumpar, ATPaser, som skickar ut vätejoner för att benmineral ska lösas upp. Osteoklasterna utsöndrar också proteolytiska enzymer som bryter ned benmatrix. Katepsiner, såsom katepsin K, och kollagenaser, såsom metalloproteinaser, är exempel på sådana enzymer. Slutprodukterna från benresorptionen tas sedan upp genom endocytos (Fleisch, 2000; Sjaastad, Sand & Hove, 2010).

Det finns flera faktorer som påverkar benresorptionen. Bland annat kan den stimuleras av cytokiner. Några cytokiner som spelar roll i det här sammanhanget är IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, TNF- α , TNF- β och prostaglandiner (Fleisch, 2000).



Figur 2. Modell av en osteoklast under benresorption. Modifierad från Fleisch (2000).

Tiludronsyras inverkan på benresorptionen

Genom *in vitro*-studier har det visats att bisfosfonater, tiludronsyra inkluderat, har en anti-resorptiv effekt men en del av verkningsmekanismerna är fortfarande oklara (Rogers *et al.* 1994; Murakami *et al.*, 1995; David *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 1996; Murakami *et al.*, 1997)

Tiludronsyra anses ha en förmåga att orsaka apoptos hos osteoklaster. Det har visats att vissa bisfosfonater, bland annat tiludronsyra, kan metaboliseras till ATP-analoger i amöban, *Dictyostelium discoideum*, med hjälp av aminoacyl-tRNA-syntetaser. Samma reaktion har dessutom observerats i cellfria extrakt från humana cellinjer. De bildade ATP-analogerna verkar ha en hämmande effekt på syntetaserna. Tiludronsyrans förmåga att hämma osteoklaster, och även andra celler, skulle därför kunna bero på ansamlingar av ATP-analoger vilket orsakar osteoklastapoptos alternativt på hämningen av aminoacyl-tRNA-syntetaserna. Denna hämning skulle då leda till en inhiberad proteinsyntes (Rogers *et al.* 1994; Rogers *et al.*, 1996).

En annan förklaring till minskad benresorption är hämning av protonpumpar i osteoklasternas *ruffled borders* vilket leder till att nedbrytningen av benmineral inte fungerar normalt. *In vitro* har det observerats att tiludronsyra är en effektiv inhibitor av dessa pumpar. Tiludronsyra visade sig vara en mer effektiv hämmare än andra bisfosfonater och pyrofosfat vilket innebär att tiludronsyrans sidogrupp, (4-chlorophenyl)-thiometylen, förmodligen spelar en viktig roll för verkningsmekanismen (David *et al.*, 1996).

Fosforylering och defosforylering med hjälp av tyrosinkinaser och tyrosinfosfataser är viktigt vid regleringen av cytoskelettets organisation hos osteoklaster, bland annat när det gäller osteoklastens aktinringar. Tiludronsyra tycks hämma proteintyrosinfosfataser i osteoklaster vilket medför att redan bildade aktinringar förstörs och därmed blir kontakten mellan benmatrix och osteoklasterna svagare. Det påverkar mikroklimatet för benresorptionen och är

sålledes ytterligare ett sätt att verka mot benresorptionen (Murakami *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 1997).

Tiludronsyras anti-inflammatoriska effekt

Effekter observerade in vitro

Tiludronsyra har förutom en anti-resorptiv effekt på benvävnad visats ha en viss påverkan på proinflammatoriska cytokiner och kväveoxid (NO). Det har undersökts ifall tiludronsyra och ibandronsyra kan hämma frisättningen av de LPS-inducerade cytokinerna IL-6, IL-1 β och TNF- α samt frisättningen av NO från en typ av makrofager. Nivåerna som frisattes från aktiva makrofager minskade efter tillsats av tiludronsyra. Ibandronsyra, som är en aminobisfosfonat, visade sig dock kraftigt öka IL-1 β -sekretionen och svagt öka IL-6-sekretionen (Mönkkönen, Similä & Rogers, 1998). Vidare observerade Duesterdieck-Zellmer, Driscoll & Ott (2012) att tiludronsyra i låga koncentrationer gav en minskad IL-1 β -inducerad frisättning av glukosaminoglukaner och en minskad kondrocytaptos i en cellkultur med kondrocyter från häst. Högre koncentrationer ökade dock glukosaminoglukanfrisättningen och kondrocytaptosen. De högre koncentrationerna bidrog även till en signifikant ökad frisättning av IL-8, oberoende av IL-1 β . Tiludronsyra hade i samma studie ingen effekt på IL-1 β inducerad PGE2-sekretion i mediet (Duesterdieck-Zellmer, Driscoll & Ott, 2012).

Metalloproteinaser bidrar till nedbrytningen av extracellulärt matrix, såsom benmatrix. De har emellertid också visat sig påverka proinflammatoriska cytokiner, kemokiner och andra proteiner och spelar därmed även en roll vid inflammation och immunitet (Parks, Wilson & López-Boado, 2004). En hämning av aktiviteten av *Matrix metalloproteinase-1* (MMP-1) och MMP-3 i periodontala ligamentceller har observerats efter behandling med tiludronsyra (Nakaya *et al.*, 2000). I kondrocyter från häst sågs en tendens till att ökande koncentrationer tiludronsyra var korrelerat med minskat uttryck av MMP-13-genen men sambandet var inte signifikant. Genuttrycket av MMP-1 och MMP-3 i kondrocyter från häst varierade inte mellan olika koncentrationer tiludronsyra (Duesterdieck-Zellmer, Driscoll & Ott, 2012).

Då tiludronsyra och andra icke-aminobisfosfonater, till skillnad från aminobisfosfonater, tycks kunna metaboliseras till ATP-analoger i *Dictyostelium discoideum* (Rogers *et al.* 1994) menar J. Mönkkönen, Similä & Rogers (1998) att tiludronsyrans antiinflammatoriska egenskaper kan vara kopplade till icke-aminobisfosfonaternas metaboliter.

Effekter observerade in vivo

Sänkta värden av NO x (nitriter och nitrater) samt sänkta värden PGE2 i synovialvätskan observerades efter behandling med tiludronsyra hos hundar med osteoartrit. Dessutom sågs en minskning av katepsin K i subkondralt ben hos hundar behandlade med tiludronsyra, jämfört med hundar från en placebobehandlad kontrollgrupp. Uttrycket av metalloproteinaserna MMP-13 och *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5* (ADAMTS5) i ledbrösket minskade också jämfört med placebo. Däremot sågs ingen skillnad i nivåer av MMP-1 i tiludronsyragrupperna jämfört med placebogruppen (Moreau *et al.*, 2011). Hos häst har även effekterna efter intraartikulära injektioner med tiludronsyra i leden hos friska djur analyserats. Det konstaterades att en hög dos tiludronsyra temporärt kan höja

glukosaminoglukankoncentrationen och andelen lösta partiklar i ledvätskan. Inga broskskador och inga skillnader i koncentration i ledbrosk vid jämförelse med hästarnas kontroller sågs dock. Vid administrering av lägre doser tiludronsyra sågs ingen skillnad i glukosaminoglukankoncentration i ledvätska vid jämförelse med hästarnas kontroller (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2014).

Indikationer, användningsområden och effektivitet hos häst

Tiludronsyra finns godkänt i ett antal länder för behandling av strålbenshåla (*navicular disease*) och spatt (*bone spavin*) hos häst. Det har gjorts ett antal studier för att fastställa effektiviteten hos djurslaget. Tiludronsyras effektivitet kan mätas med bland annat subjektiva bedömningar, såsom gradering av håla, och biologiska parametrar, såsom analysering av biomarkörer för benmetabolism. *Carboxy-terminal collagen crosslinks-1* (CTX-1) är ett exempel på en biomarkör för benresorptionen som bildas nedbrytningen av kollagen typ 1 av osteoklaster (Bergmann *et al.*, 2009; Chubb, 2012).

Terapeutiska effekter efter behandling med tiludronsyra in vivo

Hästar med spatt, stålbenshåla och osteoartritiska lesioner i torakolumbala vertebralkanalerna blev signifikant bättre efter behandling med tiludronsyra (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003; Coudry *et al.*, 2007; Gough, Thibaud & Smith, 2010). Hos hästar med nyligen uppkommen strålbenshåla sågs en signifikant skillnad 60 dagar efter behandling med en bolusdos på 1 mg/kg tiludronsyra jämfört med placebo. Ingen skillnad sågs mellan hästar med kronisk håla behandlade med samma dos och placebo (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003). Även vid tiludronsyrabehandling hos hästar med spatt med samma dos administrerad genom infusion under 30 minuter sågs en signifikant minskning i håla jämfört med placebo 60 dagar efter behandling. Det iaktogs också en signifikant skillnad i håla mellan dag 60 och dag 120. Vidare sågs i samma studie en förbättring hos hästar behandlade med tiludronsyra dag 0 samt hos hästar som fått placebobehandling vid dag 0 och tiludronsyrabehandling vid dag 60 (Gough, Thibaud & Smith, 2010). En förbättring i ryggradsflexibilitet noterades hos hästar med osteoartritiska lesioner i torakolumbara vertebralkanalerna jämfört med placebo mellan 60 och 120 dagar efter administrering av 1 mg/kg genom 30 minuters infusion. Dock gav studien dessutom flera icke signifikanta resultat (Coudry *et al.*, 2007).

I två studier (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003; Coudry *et al.*, 2007) gavs upprepad behandling till hästar som inte svarade på tiludronsyra efter en administrering. I studien av Denoix, Thibaud & Riccio (2003) gällde det hästar med kroniska symptom på spatt som efter första behandlingen betraktats som misslyckanden. Hålan hos fem av åtta hästar med kroniska symptom minskade efter en, två eller tre behandlingar med 1 ml/kg tiludronsyra. De tre negativa fallen behandlades endast en gång (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003). Den här delen av studien var dock inte placebokontrollerad. När det gällde hästarna med osteoartritiska förändringar i torakolumbala vertebralkanalerna visade resultaten att tre av hästarna som inte svarade på behandlingen hade en högre grad av skada redan i början av studien. Två av dessa hästar uppvisade en förbättrad flexion efter en upprepad behandling men inte heller här gjordes en jämförelse med placebo (Coudry *et al.*, 2007). Hästar med nyligen uppkommen strålbenshåla behandlade med tiludronsyra iaktogs svara bättre på

tiludronsyra än hästar med hälta som pågått längre än 6 månader (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003).

Gough, Thibaud & Smith (2010) antyder i sin studie att svårighetsgraden hos förändringarna vid spatt kan påverka tiludronsyras effektivitet. Inga generella signifikanta radiografiska förändringar sågs i studien men det visade sig dock att hästar med periartikulära osteofyter behandlade med tiludronsyra hade en signifikant lägre grad hälta vid dag 60 än hästar med periartikulära osteofyter i placebogrupper. När det gällde hästar med subkondral benförtjockning sågs en skillnad som var på gränsen till signifikant ($P = 0,064$). Gough, Thibaud & Smith (2010) menar att behandling med tiludronsyra kan fungera bättre hos hästar med periartikulära osteofyter och eventuellt även hos hästar med subkondral benförtjockning.

Påverkan av tiludronsyra på biomarkörer

I några studier har biomarkören CTX-1 använts som ett mått på benresorptionen (Varela *et al.*, 2002; Delguste *et al.*, 2007; Delguste *et al.*, 2008). Hos hästar med långvarig immobilisering mättes signifikanta skillnader i CTX-1 under 14 dagar efter första administreringen av tiludronsyra och 7 dagar efter andra administreringen, jämfört med en placebogrupp. CTX-1-värdena hade dock en liknande utveckling för de båda grupperna från dag 56 (*cast removal*) med en minskning mellan dag 56 och 84, följt av en ökning från dag 84 fram till dag 140 (träningsperiod). Studien indikerar att tiludronsyra inte kan ha haft någon signifikant inverkan på benresorptionen i helhet efter remobiliseringen på grund av den liknande utvecklingen från *cast removal*. När det gällde hältgrad uppvisade båda grupperna kraftigast hälta vid dag 56. Hältan minskade därefter i båda grupperna fram till studiens slut (Delguste *et al.*, 2007).

En signifikant minskning i CTX-1 efter behandling med tiludronsyra har även observerats i en annan studie på häst. Minskningen hos de fem hästarna i studien låg i medel på 72,4 %. I samma studie undersöktes även en annan biomarkör för benresorption, *carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteinases* (CTX-MMP). Ingen skillnad sågs dock i denna parameter efter behandling med tiludronsyra (Varela *et al.*, 2002). CTX-värdena jämfördes dock endast med hästarnas ursprungsvärden och inte med placebokontroller. CTX-1 observerades också minska signifikant mellan dag 0 och dag 1 efter behandling med tiludronsyra i en studie om olika doseringsregimer. Även här gjordes jämförelser med hästarnas ursprungsvärden (Varela *et al.*, 2002; Delguste *et al.*, 2008).

Doser och doseringsregimer

I studien på hästar med strålbenshälta visade sig 1 mg/kg tiludronsyra (0,1 mg/kg tiludronsyra som bolusdos i 10 dagar) ge signifikant positiv effekt till skillnad från dosen 0,5 mg/kg administrerad på samma sätt (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003). Administrering av 1 mg/kg genom 30 minuters infusion gav signifikanta värden både i studien om spatt (Gough, Thibaud & Smith, 2010) och i studien om osteoartritiska lesioner i torakolumbala vertebralkanalen (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003). Vid specifik undersökning av doseringsregimer i en studie av Delguste *et al.* (2008) sågs en minskning i CTX-1 både efter administrering av 1 mg/kg kroppsvikt tiludronsyra som bolusdos och efter infusion med samma dos under 30 minuter.

Säkerhet och bieffekter

Få studier berör tiludronsyras säkerhet hos häst men läkemedlet har visat sig vara relativt säkert. En studie gjordes på fem hästar som injicerades med 1 mg/kg tiludronsyra under ca 30 minuter. Endast ett fåtal biverkningar observerades. En icke-signifikant ökning i hjärtfrekvens uppkom hos alla fem hästarna mellan 30 minuter och två timmar efter injektion med 1 mg/kg tiludronsyra. Två av hästarna upplevdes som oroliga. En svag men signifikant hypokalcemi mättes också hos alla hästarna (från 2,60 mmol/l till 2,06 mmol/l i medel). Ingen påvekan på njure eller lever observerades och inte heller någon lokal påvekan på vävnaden vid injektionsplatsen (Varela *et al.*, 2002). Kortvariga bieffekter som förekommer hos en liten andel hästar är enligt produkttillverkaren CEVA (n.d.) muskeltremor, svettningar och kolik. Vid höga koncentrationer tiludronsyra efter intraartikulära injektioner har förhöjda koncentrationer av glukosaminoglykaner och lösta partiklar observerats i ledvätskan men inga skador har setts på ledbrosket (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2014).

Bisfosfonater och tiludronsyra som läkemedel hos människa

Pagets sjukdom (*Paget's disease*) är en skelettsjukdom hos människa karaktäriserad av en ökad omsättning av benmineral. Sjukdomen orsakar ofta värk och deformerade ben (Landberg, n.d.). Tidigare har tiludronsyra använts som läkemedel mot Pagets sjukdom men preparatet finns inte längre på marknaden (Drugs.com, n.d.). Bisfosfonater är dock fortfarande de dominerande läkemedlen vid behandling av sjukdomen. Till en början behandlades Pagets sjukdom oralt med bisfosfonaterna etidronsyra, klodronsyra, tiludronsyra, alendronsyra och risedronsyra. På senare tid har behandlingen allt mer övergått till intravenösa infusioner med bisfosfonaterna pamidronat och zoledronsyra. Zoledronsyra har visat sig vara effektivt (Graham & Russel, 2011).

Ett annat användningsområde hos människa är osteoporos (benskörhet) och då handlar det främst om behandling med alendronsyra, ibadronsyra och zoledronsyra (Graham & Russel, 2011). Viss evidens finns på tiludronsyras effekt mot osteoporos. I en studie på kvinnor med postmenopausal osteoporos sågs positiva effekter. Dock visade sig tiludronsyra efter vidare undersökning inte kunna minska uppkomsten av vertebrala frakturer (Reginster *et al.*, 2001).

Bisfosfonater används även vid cancerbehandling. Klodronsyra och pamidronsyra har bland annat använts mot malign hyperkalcemi associerad med myelom och benmetastaser. Dessutom har bisfosfonater visats ha en viss effekt mot protozoer och även inom humanmedicinen tror man på lyckosam behandling av artrit med bisfosfonater i framtiden (Graham & Russel, 2011).

DISKUSSION

Att tiludronsyra verkar hämmande på benresorptionen är accepterat. Hur stor tiludronsyras förmåga är att läka hälter och leddskador *in vivo* är dock en annan fråga. Ett väl fungerande läkemedel mot dessa och liknande skador skulle innebära stora framsteg för veterinärmedicinen då hälter idag är bland de vanligaste problemen hos hästar (Kaneene, Ross & Miller, 1997; Penell *et al.*, 2005).

De publicerade studier som finns att tillgå visar på delvis positiva resultat. Skillnaderna mellan behandlings- och kontrollgrupperna i flera studier har varit signifikanta men ofta små. Få hästar och subjektiva bedömningar kan dock ha påverkat resultatet. Med totalt 87 hästar hade studien på hästar med spatt störst studiepopulation. Bedömningen av hälsa varierade emellertid mellan olika bedömare i studien vilket är en källa till bias (Gough, Thibaud & Smith, 2010). Visuellt utförd hältbedömning hos häst har visat sig variera mellan olika utredare men överrensstämningen mellan olika veterinärer ökar med ökad erfarenhet (Hammarberg *et al.*, 2014). Hältbedömning kan därför ha varit en viktig bias också i de andra studierna på häst. Även olika grad av aktivitet och träning kan ha påverkat hästarnas tillstånd i studierna. Det är vanligt att hästar med strålbenshälsa delvis tillfrisknar under vila men hältan återkommer när de åter är i träning (Kobluk, Ames & Geor, 1995). I studien på hästar med osteoartritiska lesioner i torakolumbala vertebralkanalen ingick 29 hästar. En signifikant skillnad sågs mellan hästar i den tiludronsyrabehandlade gruppen och placebogruppen efter 60 dagar vid bedömning av flexion utförd av djurägare. Då studiens utredare efter 60 dagar bedömde djuren sågs dock ingen signifikant skillnad. Inte heller 120 dagar efter behandlingen erhöles signifikanta resultat (Coudry *et al.*, 2007). Det är möjligt att djurägarna haft en viss förväntan av behandlingen och således kan en placeboeffekt ha påverkat resultatet. Även skillnad i hur djurägarna bedömde flexionen och ett begränsat antal hästar i studien kan ha spelat roll. Det är troligt att studiens bedömare hade större erfarenhet än djurägarna vilket talar för att utredarnas resultat är mer pålitligt. Övriga studier utfördes med 50 (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003), 16 (Delguste *et al.*, 2007), 12 (Delguste *et al.*, 2008) respektive 5 hästar (Varela *et al.*, 2002). Större studiepopulationer, mer objektiva bedömningsmetoder och standardiserade levnadssätt hos hästar i samma studie skulle göra forskningen mer pålitlig. Framtida studier bör också i högre grad vara randomiserade, placebokontrollerade och blindade.

Fördelen med att använda sig av biomarkörer för benresorption vid bedömning av tiludronsyras effekt är att metoden är objektiv. Tillgången till värden innan och efter behandling gör det enkelt att bedöma effekten. Dock bör även jämförelser med placebo göras för att eliminera tidsfaktorn vilken kan ha en avgörande roll. Flera studier (Varela *et al.*, 2002; Delguste *et al.*, 2007; Delguste *et al.*, 2008) har visat på sänkta värden av CTX-1 vilket styrker påståendet att tiludronsyra verkligen hämmar benresorptionen. Dock är CTX-1 inte den enda delen i benresorption som spelar roll och minskade värden behöver inte innebära en kraftig förbättring i exempelvis hälsa. I studien av Delguste *et al.* (2007) vid långvarig immobilisering av häst sågs skillnader i CTX-1-värden endast 14 dagar efter första administrationen och sju dagar efter andra. Därefter följde den behandlade gruppen och placebogruppen liknande mönster. När Varela *et al.* (2002) och Delguste *et al.* (2008) utvärderade CTX-1 gjordes det endast en gång ett dygn efter administreringen. Att signifikanta skillnader i studien med långvarig immobilisering endast sågs en kort tid efter administration skulle kunna innebära att tiludronsyra inte har någon långvarig effekt.

Flera studier om tiludronsyra hos häst är utförda och finansierade av delvis samma forskare och företag, CEVA (Varela *et al.*, 2002; Coudry *et al.*, 2007; Delguste *et al.*, 2007; Delguste *et al.*, 2008; Gough, Thibaud & Smith, 2010). CEVA är det företag som framställer Tildren och Equidronat (CEVA, n.d.) och vill troligtvis få läkemedlen att framstå som bra

behandlingsalternativ, vilket innebär en stor bias. Även om resultaten stämmer kan artiklar vinklas och mindre övertygande fakta uteslutas. Ibland medför negativa resultat att studier inte publiceras. Det kan innebära att studier om tiludronsyra på häst med negativa resultat inte finns att tillgå.

Även om tiludronsyra har en effekt mot benresorption innebär det inte att läkemedlet är optimalt för de indikationer som är angivna. Både spatt och strålbenshälta är sjukdomar som inte enbart har att göra med en ökad benresorption. Båda sjukdomstillstånden involverar lederna och är betydligt mer komplexa (Kobluk, Ames & Geor, 1995; Björnsdóttir, 2002). Då frisättningen av glukosaminoglykaner vid intraartikulära injektioner hos friska hästar visats vara dosberoende kan det vara klokt att noga se över doseringen för att undvika negativa effekter. Dock har inga skador på ledbrusk observerats (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2014). Mycket är oklart när det gäller intraartikulära injektioner hos häst. Innan tiludronsyra kan rekommenderas för behandling av aseptisk artrit är det därför av intresse att i större studier på sjuka hästar vidare undersöka substansens bieffekter och eventuella positiva effekter på leden.

Tiludronsyra verkar enligt olika studier vara effektivare vid hältor som uppkommit mer nyligen och som är lindrigare i sin karaktär (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003; Coudry *et al.*, 2007). Om detta är fallet bör skadans allvarlighetsgrad utredas ordentligt innan behandling. Veterinären bör då även förvarna om att chansen för en effektiv behandling troligtvis är lägre vid svårare fall. Det finns dock också en risk att förväntningarna på en förbättring är större vid lindrigare fall av hälta vilket kan bidra till en ökad placeboeffekt och därmed missvisande resultat. Det är dessutom möjligt att lindrigare hältor läker av konservativ behandling såsom vila och adekvat rehabilitering.

Flera studier har visat förbättring efter upprepad behandling vid allvarliga, kroniska tillstånd (Denoix, Thibaud & Riccio, 2003; Coudry *et al.*, 2007). De resultat som erhållits har dock inte varit placebokontrollerade och har endast involverat ett fåtal hästar. Därmed är det möjligt att det inte var tiludronsyrans som bidrog till läkningen av skadan. Kontrollerade studier behövs för att säkra slutsatser skall kunna dras. Även mer långsiktiga studier hos häst skulle behövas då det är oklart vad som händer efter ett år eller flera efter behandling. Hur stor är risken för återfall?

Att tiludronsyra visat sig ha en viss antiinflammatorisk effekt *in vitro* (Mönkkönen, Similä & Rogers, 1998; Nakaya *et al.*, 2000; Duesterdieck-Zellmer, Driscoll & Ott, 2012) kan eventuellt vara en fördel framför användningen av vissa andra bisfosfonater. Resultaten är dock varierande och det är oklart om effekten har en märkbar påverkan på djuret *in vivo*. En antiinflammatorisk effekt skulle även kunna maskera eventuellt kvarvarande hälta eller annan skada.

Tiludronsyra verkar enligt de studier som gjorts vara ett säkert läkemedel vid behandling med den angivna dosen (Varela *et al.*, 2002). Dock stannar tiludronsyra kvar länge i skelettet (Soto & Chiappe Barbará, 2014) och vad som händer i kroppen långsiktigt efter behandling är inte utrett hos häst. Vid behandling med upprepade doser kan det vara befogat att tänka på detta. Skulle tiludronsyra kunna ha en negativ effekt på exempelvis benvävnaden efter en längre tid

av upprepade behandlingar? Endast en studie om tiludronsyras säkerhet med en liten studiepopulation återfanns i litteraturen (Varela *et al.*, 2002). Därför är det också svårt att säga ifall det finns eventuella individvariationer. Kanske finns det vissa hästar som reagerar negativt även på låga koncentrationer tiludronsyra. Andra studier som gjorts om tiludronsyra hos häst tyder dock inte på detta. Det har inte heller utretts hur hästar reagerar på tiludronsyra i högre koncentrationer än normaldosen, 1 mg/kg.

Hos människa används idag framför allt aminobisfosfonater och tiludronsyra finns inte längre att tillgå (Graham & Russel, 2011; Drugs.com, n.d.). Den högre effektiviteten hos aminobisfosfonaterna (Graham & Russel, 2011) har förmodligen lett till att icke-aminobisfosfonater som tiludronsyra har konkurrerats ut. Kanske är aminobisfosfonater i framtiden även ett alternativ inom veterinärmedicinen. Dock är indikationerna för användningen hos människa och häst olika. Att zoledronsyra verkar fungera bra vid behandling av Pagets sjukdom innebär inte att det måste vara fallet vid exempelvis spatt och strålbenshälta. Nyligen utförda studier har undersökt zoledronsyras säkerhet och effektivitet hos häst. Inga biverkningar observerades och zoledronsyra rapporterades ha en viss positiv effekt hos hästar med *bone fragility disorder* (BFD). Dock var den senare studien inte placebokontrollerad och studiepopulationen bestod endast av 10 hästar (Katzman *et al.*, 2012; Nieto *et al.*, 2013). Resultatet bör därför tolkas med försiktighet. Fler studier behövs för att vidare utreda effektiviteten, säkerheten och eventuella användningsområden för zoledronsyra hos djurslaget.

Efter de studier som har gjorts går det inte med säkerhet att säga att tiludronsyra är ett effektivt läkemedel. Det är troligt att bisfosfonaten till en viss del kan hämma benresorption och verka antiinflammatoriskt men det är inte självklart att effekten mot hältor, ledsador och liknande åkommor är tillräcklig. Det är även sannolikt att tiludronsyra idag används mot andra åkommor än spatt och strålbenshälta där ingen evidens finns för att behandlingen fungerar. Säkerheten hos häst vid behandling med tiludronsyra är troligtvis god men tiludronsyras effekter över längre tid är ännu inte utredda. För att få en reell bild av tiludronsyras säkerhet och effektivitet vid olika led- och skelettlidanden behövs det fler oberoende och placebokontrollerade studier med större studiepopulationer.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Adams, B. S. (2012) *Overview of Lameness in Horses*
http://www.merckmanuals.com/vet/musculoskeletal_system/lameness_in_horses/overview_of_lameness_in_horses.html. [2015-03-15].
- Ammann, P., Rizzoli, R., Caverzasio, J., Shigematsu, T., Slosman, D. & Bonjour, J. P. (1993). Effects of the bisphosphonate tiludronate on bone resorption, calcium balance, and bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 8: 1491–1498.
- Bergmann, P., Body, J.-J., Boonen, S., Boutsen, Y., Devogelaer, J.-P., Goemaere, S., Kaufman, J.-M., Reginster, J.-Y. & Gangji, V. (2009). Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *International Journal of Clinical Practice*, 63: 19–26.
- Björnsdóttir, S. (2002). *Bone Spavin in Icelandic Horses: Aspects of Predisposition, Pathogenesis and Prognosis*. Swedish University of Agricultural Sciences. ISBN 9789157663825.
- CEVA. *TILDREN® Injection*.
<http://www.ceva-asiapacific.com/Products/Product-List/TILDREN-R-Injection>. [2015-03-15].
- Chubb, S. A. P. (2012). Measurement of C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) in serum. *Clinical Biochemistry*, 45: 928–935.
- Coudry, V., Thibaud, D., Riccio, B., Audigié, F., Didierlaurent, D. & Denoix, J.-M. (2007). Efficacy of tiludronate in the treatment of horses with signs of pain associated with osteoarthritic lesions of the thoracolumbar vertebral column. *American Journal of Veterinary Research*, 68: 329–337.
- David, P., Nguyen, H., Barbier, A. & Baron, R. (1996). The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H⁺-ATPase. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11: 1498–1507.
- Delguste, C., Amory, H., Doucet, M., Piccot-Crézollet, C., Thibaud, D., Garnerio, P., Detilleux, J. & Lepage, O. M. (2007). Pharmacological effects of tiludronate in horses after long-term immobilization. *Bone*, 41: 414–421.
- Denoix, J. M., Thibaud, D. & Riccio, B. (2003). Tiludronate as a new therapeutic agent in the treatment of navicular disease: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Equine Veterinary Journal*, 35: 407–413.
- Duesterdieck-Zellmer, K. F., Driscoll, N. & Ott, J. F. (2012). Concentration-dependent effects of tiludronate on equine articular cartilage explants incubated with and without interleukin-1 β . *American Journal of Veterinary Research*, 73: 1530–1539.
- Duesterdieck Zellmer, K. F., Moneta, L., Ott, J. F., Larson, M. K., Gorman, E. M., Hunter, B., Löhr, C. V., Payton, M. E., Morr , J. T. & Maier, C. S. (2014). Effects of low and high dose intraarticular tiludronate on synovial fluid and clinical variables in healthy horses—a preliminary investigation. *PeerJ*, 2: e534.
- Fleisch, H. (2000). Bone and mineral metabolism. *Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient*. San Diego: Academic Press, 8-10
- Gough, M. R., Thibaud, D. & SMITH, R. K. W. (2010). Tiludronate infusion in the treatment of bone spavin: A double blind placebo-controlled trial. *Equine Veterinary Journal*, 42: 381–387.
- Hammarberg, M., Egenvall, A., Pfau, T. & Rhodin, M. (2014). Rater agreement of visual lameness assessment in horses during lungeing. *Equine Veterinary Journal*.

- Ireland, J. L., Clegg, P. D., McGowan, C. M., Platt, L. & Pinchbeck, G. L. (2011). Factors associated with mortality of geriatric horses in the United Kingdom. *Preventive Veterinary Medicine*, 101: 204–218.
- Kaneene, J. B., Ross, W. A. & Miller, R. (1997). The Michigan equine monitoring system. II. Frequencies and impact of selected health problems. *Preventive Veterinary Medicine*, 29: 277–292.
- Katzman, S. A., Nieto, J. E., Arens, A. M., MacDonald, M. H., Puchalski, S. M., Galuppo, L. D., Snyder, J. R., Maher, O. & Bell, R. J. W. (2012). Use of zoledronate for treatment of a bone fragility disorder in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240: 1323–1328.
- Kobluk, C. N., Ames, T. R. & Geor, R. J. (1995). *The Horse: Diseases & Clinical Management*. W.B. Saunders. ISBN 9780721659398.
- Landberg, T. Pagets sjukdom. *Nationalencyklopedin*.
[http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/pagets-sjukdom-\(skelettsjukdom\)](http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/pagets-sjukdom-(skelettsjukdom)). [2015-03-13].
- Moreau, M., Rialland, P., Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Boileau, C., Caron, J., Frank, D., Lussier, B., del Castillo, J. R., Beauchamp, G., Gauvin, D., Bertaim, T., Thibaud, D. & Troncy, E. (2011). Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Research & Therapy*, 13: R98.
- Murakami, H., Takahashi, N., Sasaki, T., Udagawa, N., Tanaka, S., Nakamura, I., Zhang, D., Barbier, A. & Suda, T. (1995). A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: Tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone*, 17: 137–144.
- Murakami, H., Takahashi, N., Tanaka, S., Nakamura, I., Udagawa, N., Nakajo, S., Nakaya, K., Abe, M., Yuda, Y., Konno, F., Barbier, A. & Suda, T. (1997). Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity in osteoclasts. *Bone*, 20: 399–404.
- Mönkkönen, J., Similä, J. & Rogers, M. J. (1998). Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sciences*, 62: 95–102.
- Nakaya, H., Osawa, G., Iwasaki, N., Cochran, D. L., Kamo, K. & Oates, T. W. (2000). Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontology*, 71: 1158–1166.
- Nieto, J. E., Maher, O., Stanley, S. D., Knych, H. K. & Snyder, J. R. (2013). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of zoledronic acid in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 74: 550–556.
- Parks, W. C., Wilson, C. L. & López-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4: 617–629.
- 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*, 157: 470–477.
- PubChem. *Tiludronic Acid* | *C7H9ClO6P2S* - PubChem.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60937#section=Top>. [2015-03-16].
- Reginster, J. Y., Christiansen, C., Roux, C., Fechtenbaum, J., Rouillon, A. & Tou, K. P. (2001). Intermittent cyclic tiludronate in the treatment of osteoporosis. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 12: 169–177.

- Rogers, M. J., Brown, R. J., Hodkin, V., Blackburn, G. M., Russell, R. G. G. & Watts, D. J. (1996). Bisphosphonates Are Incorporated into Adenine Nucleotides by Human Aminoacyl-tRNA Synthetase Enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224: 863–869.
- Rogers, M. J., Ji, X., Russell, R. G., Blackburn, G. M., Williamson, M. P., Bayless, A. V., Ebetino, F. H. & Watts, D. J. (1994). Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochemical Journal*, 303: 303–311.
- Russell, R. G. G. (2011). Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*, 49(1): 2–19.
- Sjaastad, O. V., Hove, K. & Sand, O. (2010). Bone Tissue and Mineral Metabolism. *Physiology of Domestic Animals*. 2nd edition. Oslo: Scandinavian Veterinary Press: 267-268
- Soto, S. A. & Chiappe Barbará, A. (2014). Bisphosphonates: Pharmacology and Clinical Approach to Their Use in Equine Osteoarticular Diseases. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34: 727–737.
- Drugs.com. *Tiludronic acid*.
<http://www.drugs.com/international/tiludronic-acid.html>. [2015-03-15].
- Varela, A., Lepage, O. M., Doucet, M., Marcoux, M. & Garnero, P. (2002). Tiludronate in horses: Tolerance and short-term effects on bone metabolism. *Annales De Medecine Veterinaire*, 146: 123–130.