



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

”Nerve Growth Factor” i ledvätska från häst

Erica Örtenstedt

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:24*

”Nerve Growth Factor” i ledvätska från häst

“Nerve Growth Factor” in synovial fluid from horses

Erica Örtenstedt

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: *Pia Haubro-Andersen, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:24

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: NGF, osteoartrit, smärta, häst, hälta

Key words: NGF, osteoarthritis, pain, horse, lameness

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Hälta är vanligt förekommande hos häst. Osteoartrit, (OA), vilket är en inflammatorisk sjukdom som karakteriseras av broskdegeneration är den vanligaste orsaken. OA ger kliniska symptom med framförallt smärta som visar sig i klinisk hälta. Den neurotrofa faktorn ”Nerve growth factor” (NGF) som induceras via inflammatoriska cytokiner är delaktig i att inflammationsprocessen upprätthålls och förlängs. Den bidrar även till smärtupplevelsen vid OA genom att sensitisera nociceptiva nerver och ge central sensitisering via substans P (tachykinin). Det är därför relevant att undersöka om NGF-koncentrationen i ledvätska hos hästar går att korrelera till hälta.

I denna pilotstudie undersöktes NGF-koncentrationerna i ledvätska och serum hos halta hästar. Målet var att försöka korrelera NGF-koncentrationen i ledvätska till parametrarna; hältgrad, hältduration, hältutlösande led, NGF-koncentration i serum samt leukocytantal i ledvätska. I studien ingick endast 14 hästar med initial belastningshälta vilka inkommit till hästkliniken vid Sveriges lantbruksuniversitets (SLU) universitetsdjursjukhus. En kontrollgrupp med ledvätska och serum från friska hästar saknas i denna pilotstudie.

Hästarna genomgick en subjektiv hältbedömning av veterinär och en objektiv hältbedömning med ett kamerabaserat rörelseanalyssystem (Qualisys). Vid konstaterad hälta användes, om en led misstänktes vara hältutlösande, intraartikulär anestesi för att lokalisera leden. I samband med detta aspirerades ledvätska och blodprov togs. Ledvätskan analyserades med avseende på leukocytantal och NGF-koncentration och serum analyserades för NGF-koncentration.

Stora skillnader i NGF-koncentrationer uppmättes i ledvätska och serum och mellan hästar. Då det endast ingick 14 hästar och en kontrollgrupp saknades var det omöjligt att testa sambanden mellan NGF-koncentrationer och de ovan angivna parametrarna. Konklusionen från denna studie är att höga värden av NGF kan uppmätas i ledvätska från häst och att orsaken till detta bör undersökas vidare.

SUMMARY

Lameness is a major problem in the athletic horse, with the most common cause being osteoarthritis, (OA), an inflammatory disease characterized by cartilage degeneration. Clinical symptoms of OA are related to pain, which causes clinically observable lameness. The neurotropic factor “Nerve Growth Factor”, (NGF), which is induced by inflammatory cytokines, is involved in maintaining and prolonging the inflammatory process. It also contributes to the pain experience in OA by sensitizing the nociceptive nerves and by causing central sensitization through substance P (tachykinin). It is therefore relevant to examine whether or not the NGF concentration in synovial fluid from horses is correlated to lameness.

In this pilot study the NGF concentrations in synovial fluids and serum from lame horses were examined. The aim was to investigate the correlation between the NGF concentration in synovial fluid and the parameters; lameness degree, duration of lameness, joint responsible for the primary lameness, the NGF concentration in serum and number of leucocytes in synovial fluid. The study only included 14 horses presented to the horse clinic at SLU, with supporting limb lameness. The study also lacks a control group with synovial fluids and serum from healthy horses.

The horses included in this study went through a subjective lameness examination performed by a veterinarian and an objective lameness examination using a camera based system (Qualisys). Intra articular anesthesia was used to locate the joint responsible for the primary lameness. Samples of synovial fluid were aspirated prior to the anesthesia and blood was collected during the examination. A leucocyte count of the synovial fluids was performed and NGF concentrations were measured, with the aid of ELISA, in the samples of synovial fluid and serum.

Large variations of NGF concentrations in synovial fluid and serum were found in lame horses. Due to small numbers of samples and lack of a control group, it was impossible to test the correlation between the parameters mentioned above. It was concluded that high levels of NGF can be found in synovial fluids from horses and this should be evaluated further.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	1
Den synoviala leden	1
Ledbrosk	2
Lubrikation.....	2
Näringsförsörjning.....	2
Periartikulära mjukdelar.....	3
Innervation av leden.....	3
Osteoartrit.....	3
Mekanisk belastning – Orsak till OA.....	3
Brosknedbrytning	4
Morfologiska förändringar i ledbrosk och subkondralt ben	4
Nerve Growth Factor.....	5
NGF och inflammation	5
Nervpåverkan och sensitisering	5
NGF vid smärta	6
Häلتundersökning	6
Subjektiv häلتbedömning	6
Objektiv häلتbedömning.....	7
Material och metoder	8
Material	8
Metod.....	9
Resultat.....	12
Diskussion.....	17
referenser.....	21

INLEDNING

Hälta är den vanligaste orsaken till att hästar undersöks och behandlas av veterinär. Den vanligaste ortopediska skadan utgörs av osteoartrit (OA) (Penell *et al.*, 2005). OA är en inflammatorisk sjukdom som orsakas av överbelastning av ledens vävnader. Detta leder till broskdegeneration, synovit/kapsulit och skleros med mikrofrakturer i det subkondrala benet (SCB). Kliniskt ger OA symptom såsom leddsvullnad, rörelsenedsättning och framförallt smärta med klinisk hälta (För översikt se Goldring & Otero, 2011).

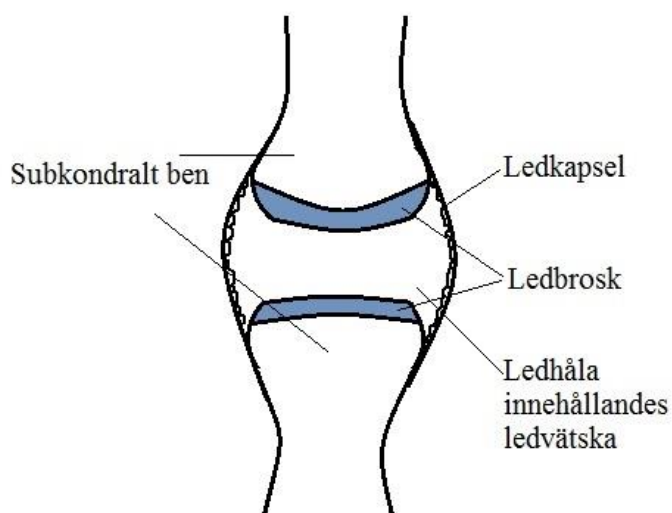
Nerve growth factor (NGF), bidrar till att upprätthålla och förlänga inflammationsprocessen vid ledinflammation (Raychaudhuri & Raychaudhuri, 2009; Rogerson *et al.*, 2010; Zack *et al.*, 2006). Denna neurotrofa faktor är en bidragande orsak till smärta, via nociceptiv och central sensitisering, vilket är det främsta symptomet vid OA (Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015). Flera studier har visat att en inhibering av NGF eller receptorer för NGF såsom TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) och p75 leder till en höjd smärtröskel och kan fungera som smärtstillande behandling vid OA (Ashraf *et al.*, 2014; Kras *et al.*, 2015; Nwosu *et al.*, 2015).

I detta examensarbete utfördes en pilotstudie med syfte att undersöka om det hos hästar med hälta fanns samband mellan NGF-koncentrationer i ledvätska och serum och hältans grad och/eller duration. Utöver detta undersöktes om NGF-koncentrationerna var korrelerade till leukocytantalet i ledvätska.

LITTERATURÖVERSIKT

Den synoviala leden

Den synoviala leden består av två motsatta benstrukturer vars yta täcks av ledbrosk, vilket illustreras i Figur 1. Leden stabiliseras upp av ledkapseln, ligament och senor. I ledhålan finns ledvätska (för översikt se Palmer & Bertone, 1994).



Figur 1. Schematisk bild av ledens anatomi.

Ledbrosk

Ledbrosket består till största del av vatten och extracellulärt matrix (ECM) och en liten andel kondrocyter. Typ II kollagen är den vanligaste typen av kollagen i ledbrosk och ger ett strukturellt stöd samt ansvarar för broskets tånjbara förmåga (Vachon *et al.*, 1990). Nedbrytning och nybildning av kollagen sker långsamt. Brosket byggs även upp av proteoglykaner som består av kedjor av glukosaminoglykaner som binder till ett kärnprotein. Den största andelen av proteoglykanerna i ledbrosk utgörs av aggregaten som kan binda till hyaluron via ett länkprotein (Rosenberg & Buckwalter, 1986: se Palmer & Bertone, 1994). Glukosaminoglykaner drar till sig vatten genom sin laddning vilket gör att brosket klarar av att hantera hög belastning (Greenwald *et al.*, 1978: se Palmer & Bertone, 1994).

Ledbrosket är indelat i fyra lager med olika komposition av kondrocyter och ECM. Den ytliga zonen består av tätt packade kollagen II fibrer som ligger parallellt med ledytan. Där finns också den högsta densiteten med kondrocyter, vilka är avlånga med axis parallellt längs ledytan. Nästa zon är den intermediära zonen där kondrocyterna är färre, runda och större. Kollagenfibrerna ligger inte längre parallellt utan utspritt åt olika håll. Därefter kommer den djupa zonen med stora, runda kondrocyter och kollagenfibrer som båda har sin axis vinkelrätt mot ledytan. Angränsande det subkondrala benet finns den kalkifierade zonen med ett mineraliserat ECM. Den djupa och den mineraliserade zonen skiljs åt histologiskt via en gräns kallad tidemark. Kollagen II fibrerna i ledbrosket förankras mot benvävnadens kollagen I fibrer (Frisbie, 2012).

Lubrikation

Över ledbroskets yta finns glykoprotein och/eller protein vilka formar en gel (Kumar *et al.* 2001). Denna består av lubricin och hyaluronsyra som bildar komplex löst bundna till broskets ytligaste del och ger ett friktionsfritt lager, framförallt vid låg belastning. Brosket skyddas även av ett elastohydrodynamiskt smörjmedel, kallat ”fluid film lubrication”, vid ökande tryck, vilket fungerar genom att vätska pressas ut ur brosket vid belastning och lägger sig som en skyddande och friktionsdämpande hinna. Vid extrema tryck eller långvarig belastning bryts lubricinbindningarna från brosket och hyaluronsyra blir mekaniskt fångat i ledytans ECM eftersom ledbrosket deformeras vid tryck. Detta gör att hyaluronsyra ensam agerar som ett gränsskydd, boundary lubrication, som framförallt skyddar mot slitage (Greene *et al.*, 2011: Kumar *et al.* 2001).

Näringsförsörjning

Den cykliska belastning som leden utsätts för vid normal rörelse bidrar till att molekyler, så som tillväxtfaktorer, hormoner, enzymer och cytokiner, pumpas ner i brosket och på så sätt kan påverka broskets metabolism. De mindre molekylerna så som syre och näringsämnen tar sig ner i brosket via diffusion. Den cykliska belastningen hjälper till att producera mer ledvätska och pumpa runt den varför broskets näringstillförsel indirekt påverkas (O’Hara *et al.* 1990).

Periartikulära mjukdelar

Ledkapsel, ligament och muskler är de periartikulära vävnaderna som ger leden stabilitet. Ledkapsel och ligament har en liknande uppbyggnad som till största delen består av fibrös vävnad med typ I kollagen och en liten del elastin och proteoglykaner. I ligament ses kollagen-fibrerna i täta parallella rader och i ledkapseln i en lucker vaskulariserad vävnad (Frisbie, 2012).

Ledkapseln består av två lager, ett yttre fibröst lager med bindväv som ger ett mekaniskt stöd, och ett lager med mesenkymala celler som delas in i intima och subintima. Intiman, närmast ledhålan, är tunn och består av två typer av synoviocyter, en makrofagliknande och en fibroblastliknande. Subintiman ligger mellan intiman och det fibrösa lagret och är vaskulariserat. Ledkapseln skyddar leden genom att agera som en barriär och bildar delar av ledvätskan (Johansson & Rejno, 1976; Henderson & Pettipher, 1985; se Palmer & Bertone, 1994).

Det subkondrala benet är uppbyggt av kortikalt ben med haverska system som går parallellt med ledytan och ger kontur och stabilitet till ledbrosket. Det är oftast bredare än resten av rörbenet för att fördela det mekaniska trycket vid belastning av leden på en så stor yta som möjligt (Frisbie, 2012).

Innervering av leden

Nerverna i ledens olika vävnader består av C-fibrer och sensoriska fibrer och finns i ledkapsel, ligament och menisker. Tillväxtbrosket innehåller kärlkanaler med kärl men inga nerver och det adulta ledbrosket saknar kärl och nerver. Det finns fyra typer av nervreceptorer i leden. Typ I och typ II receptorer är myeliniserade fibrer som svarar på mekaniskt stimuli och förekommer i ledkapsel, ligament och menisker. Typ III receptorerna är myeliniserade tunna A δ -fibrer som finns på ligamentens ytor. De svarar på ett starkt mekaniskt stimuli och är involverade i smärta vid leddskada. Typ IV receptorerna kallas för polymodala receptorer då de svarar på både mekaniskt, termalt och kemiskt stimuli. De består av omyeliniserade C-fibrer som aktiveras vid inflammation. Typ IV receptorer finns i ledkapsel, ligament och menisker, och svarar även på tryckförändringar. Även denna typ av receptor är involverad i smärta vid leddskada (Perrot, 2015).

Osteoartrit

Osteoartrit OA, är en inflammatorisk sjukdom (Benito *et al.*, 2005; Lisowska *et al.*, 2015) där degeneration av ledbrosket ingår. Kliniskt ses svullnad, stelhet och ledsmärta med hälta. Sjukdomen uppkommer till följd av överbelastning orsakad av akut trauma eller frekvent mekaniskt belastning av leden (För översikt se Goldring & Otero, 2011). Studier (Driscoll *et al.*, 2015) av möss har visat att den mekaniska skadan i ledbrosket med frisättning av inflammatoriska cytokiner och NGF förefaller vara den drivande faktorn vad gäller smärta vid OA.

Mekanisk belastning – Orsak till OA

OA kan utvecklas när onormala krafter påverkar en normal led. Detta sker vid akut eller frekvent trauma där ledens stödjevävnad, framförallt musklerna, inte kan absorbera krafterna

som leden utsätts för. Leden får därför ta emot en större kraft än vad som är fysiologiskt. Ofta leder överbelastningen av leden till ligamentskador som gör leden instabil. Instabilitet gör att leden rör sig på ett onormalt sätt varpå fokala delar utsätts för hög belastning som de normalt inte utsätts för (Andriachi *et al.*, 2003; Brandt *et al.*, 2006).

Brosknedbrytning

Kollagenaser och aggrecanaser är de viktigaste nedbrytande enzymerna vid OA och består av metalloproteinaser, (MMPs) och en familj av disintegrin och metalloproteaser med thrombospondinmotiv, (ADAMTS). Dessa ökar hos kondrocyterna ökar vid mekanisk stimulering (Ding *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2006; Tetsunaga *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). TNF- α och IL-6, som är inflammatoriska cytokiner, uppreglerar ADMATS och MMPs (Rogerson *et al.*, 2010; Zack *et al.*, 2006). I motsats till en överbelastning visade flera studier (Millward-Sadler *et al.*, 2000; Leong *et al.*, 2010; Torzilli *et al.*, 2009) att dynamisk fysiologisk belastning av en led stimulerar till syntesökning av aggrecan och att MMP, IL-1 α och TNF- α minskar.

Vid broskdegeneration bildas fibronektinfragment och andra nedbrytningsprodukter som fungerar som indikatorer på vävnadsskada, vilka kallas damage-associated molecular pattern, (DAMPs). Dessa fragment stimulerar till ytterligare broskdegeneration genom aktivering av ADAMTS, IL-1 β , IL-6 och IL-8 via toll-like receptor, (TLR) (Homandberg *et al.*, 1998; Midwood *et al.*, 2009; Pulai *et al.*, 2005; Zack *et al.*, 2006). TLR är en receptor som finns på kondrocyter och som uppregleras vid OA via inflammatoriska mediatorer såsom IL-1 β , TNF- α och peptidglykaner (Bobacz *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006).

Morfologiska förändringar i ledbrosk och subkondralt ben

Ledbroskets yta uppvisar fibrillering vid kollaps av det kollagena nätverket och förlust av proteoglykan (Andriacchi *et al.*, 2003). Kondrocyterna kan aktiveras och genomgå en fenotypisk förändring där de prolifererar och hypertrofierar vilket leder till grupper av kondrocyter i klusterformationer (Goldring *et al.*, 2011; se Hourd *et al.*, 2013). ECM svullnar genom förlust av kollagen och proteoglykaner då dess tredimensionella struktur förändras när kollagenet bryts ner. De hypertrofiska kondrocyterna kan dessutom syntetisera ECM som mineraliseras (Bank *et al.*, 1997).

I leder hos häst med OA påvisades oregelbundenheter i ledytan jämfört med friska leder, vilka hade kalcifierade djupgåendes sprickor i ledbrosket. Kaviteter (mikrofrakturer) uppstod också i SCB med ökad porositet som följd. En positiv korrelation påvisades mellan de strukturella benförändringar och de histologiska och makroskopiska förändringarna i ledbrosket vid OA vilket visar att det sker förändringar i både ledbrosket och SCB vid OA (Lacourt *et al.*, 2012).

Cruz *et al.* (2008) visade i likhet med ovanstående studie att degeneration av ledbrosket kan ses med samtida lesioner i SCB. Men påvisade även att lesionerna kan finnas separata, antingen som skada i ledbrosk eller SCB i tidigt skede av OA-utvecklingen. Det anses därför troligt att två helt separat mekaniska vägar kan leda till OA. Skadorna kan börja med tidig yttlig ledbrosk fibrillering eller tidig mikrofrakturering och skleros av SCB och senare i ett kroniskt stadium innefatta båda strukturerna.

Benresorptionsgropar, inkluderande kärlkanaler, som utgår från SCB kan ibland ses i ledbroskets mineraliserade djupa lager. Vid grava skador kan dessa resorptionsgropar passera tidemark och även involvera det omineraliserade brosket (Shibakawa *et al.*, 2005). Kanalerna innehåller både kärl och nerver som är av både sensorisk- och sympatisk karaktär (Suri *et al.*, 2007).

SCBs trabekulära djupare lager förtjockas (skleros) och får en förändrad kollagenkomposition med övervägande typ I kollagen homotrimer till skillnad från den normala typ I kollagen heterotrimer. Detta leder troligtvis till att benet blir försvagat. SCBplattan slita ner och får en plattare yta vilket gör att belastningen fördelas på en större yta än normalt. Den nya kraftfördelningen i leden gör att det subartikulära benet utsätts för mindre belastning än normalt och osteoporos utvecklas i epifysen (Buckland-Wright, 2003: Ko *et al.*, 2013). Det sklerotiska SCB är mindre elastiskt och ger därmed en ökad belastning på ledbrosket vilket ökar risken för broskskador (Cruz *et al.*, 2008). Den inflammatoriska reaktionen, som också inkluderar tillväxtfaktorer så som transforming growth factor- β (TGF- β), stimulerar de periostala bencellerna i ledens benkanter att bilda osteofyter via endokondral benbildning (Suri *et al.*, 2007: Ko *et al.*, 2013).

Nerve Growth Factor

NGF är en tillväxtfaktor (neurotrop faktor) och neuromediator som spelar roll inom inflammation, nociception och neuroimmunologi. Den agerar via två receptorer, TrkA, som är en högaffinitetsreceptor, och p75, som är en lågaffinitetsreceptor (för översikt se Skaper, 2001). Koncentrationen av NGF ökar vid flertalet akuta och kroniska smärttillstånd så som OA och ledtrauman (Isola *et al.*, 2011: Kras *et al.*, 2015).

NGF och inflammation

NGF utsöndras normalt i leden av de fibroblastlika synoviala cellerna (synoviocyt B) och kondrocyter. Dessa celler uttrycker även högaffinitetsreceptorn TrkA. Cellerna uppreglerar sitt uttryck av TrkA och utsöndring av NGF efter stimulering av TNF- α och IL-1 β (Iannone *et al.*, 2002: Driscoll *et al.*, 2015: Raychaudhuri & Raychaudhuri, 2009: Rogerson *et al.*, 2010: Zack *et al.*, 2006).

En studie av hundar med OA visade mätbara koncentrationer av NGF i ledvätska från både friska hundar och från hundar med olika stadier av OA. Leder från hundar med kronisk hälta och radiologiska tecken på OA hade signifikant högre nivåer av NGF jämfört med leder från friska hundar (Isola *et al.*, 2011). Även på människa har signifikant högre nivåer av NGF uppmäts i ledvätska från leder med inflammationstillstånd, bl.a. reumatoid artrit, (RA), än i leder hos friska patienter (Halliday *et al.*, 1998).

Nervpåverkan och sensitisering

NGF påverkar nervers tillväxt, överlevnad och sensitisering (Lindsay *et al.*, 1990: Crowder & Freeman, 1998: Liu *et al.*, 2011: Li *et al.*, 2015: Driscoll *et al.*, 2015).

I flertalet studier har man visat att NGF sensitiserar sensoriska nerver genom att uppreglera substans P (tachykinin) (Hoffman *et al.*, 2011: Liu *et al.*, 2011: Shi *et al.*, 2015). Vid injektion

av anti-NGF i en led höjs smärtröskeln och dorsalrotsganglierna visar minskning av substans P (Ottens *et al.*, 1982). NGF bidrar även till en central sensitisering genom att substans P ifrån C-fibrerna aktiverar gliaceller (Li *et al.*, 2015). Vid fraktur bidrar NGF och inflammatoriska mediatorer, så som TNF, IL-1 β och IL-6, till både nociceptiv- och central sensitisering (Shi *et al.*, 2015). En positiv korrelation mellan serumnivåerna av substans P och smärta vid OA och RA har rapporterats hos människa (Lisowska *et al.*, 2015).

NGF vid smärta

Experimentellt inducerad OA, genom menisktransektion, ledprovokation där leden dras isär eller injektion med mononatrium jodacetat, på råttor visade att smärtbeteendet accentuerades vid en intraartikulär injektion med NGF. Även friska råttor uppvisade smärtsymptom efter en intraartikulär injektion med NGF. Smärtan hos de friska råttorna liknade symptomen som påvisades hos råttor med inducerad OA (Ashraf *et al.*, 2014; Kras *et al.* 2015). Behandling med NSAID, ”non-steroid inflammatory drug”, efter att OA inducerats gav en minskning av smärtbeteendet och en minskad uppreglering av TrkA. Denna minskning sågs även om råttorna injicerades med NGF efter NSAID behandling.

Inhibering av TrkA, via oral giva av en TrkA-inhibitor, ger också en minskning av smärtbeteende hos råttor med experimentellt inducerad OA (Nwosu *et al.*, 2015).

Hältundersökning

Subjektiv hältbedömning

Den vanligaste orsaken till att djurägare uppsöker veterinärvård för sina hästar är olika problem med leder (Penell *et al.*, 2005). Vid subjektiv hältbedömning ingår bedömning av hästens rörelser på rakt spår och vid longering. För att fastställa vilket ben hästen är halt på bedöms huvud- och sakrumrörelserna (Buchner *et al.*, 1996). Då hästar naturligt kan uppvisa en asymmetri i sitt rörelsemönster kan det finnas svårigheter med att bestämma vilken led som utlöser hältan och vilken hältgrad hästen uppvisar (Drevemo *et al.* 1987). Den subjektiva bedömningen har visat sig skilja betydligt mellan olika veterinärer. En lågradig hälta bedöms endast likartad vad gäller ben och grad i 61,9% av fallen men vid en måttlig till kraftig hälta överensstämmer bedömningarna däremot upp till 93,1% (Keegan *et al.*, 2010).

Hos en ohalt häst med symmetriskt rörelsemönster uppvisar huvud, manke och tuber sakrale ett symmetriskt sinusoidalt rörelsemönster där de höjs och sänks två gånger under varje stegcykel. De når sin lägsta höjd i understödsfasen och sin maximala höjd mitt i svävningssfasen. När hästen är halt blir dessa rörelser osymmetriska (Buchner *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 2004). Buchner *et al.* (1996) beskriver att hästen har två mekanismer för att hantera hälta. När det halta benet belastas bär hästen upp bålen tidigare i steget och bålens vertikala hastighet nedåt minskar för att spara energi att lyfta upp bålen. En annan mekanism är att bålens maxacceleration minskar för att minska den kraft som belastar det halta benet. Dessa mekanismer visas tydligt vid en bakbenshälta genom tuber sakrales rörelse men syns inte alls lika tydligt i mankens rörelse vid frambenshälta.

Samma studie beskriver att vid en frambenshälta uppvisar hästen huvudnickningar, dvs. sänker huvudet mer när det friska benet belastas och sänker huvudet mindre än normalt vid

belastning av det halta benet. Detta gör att vikten förflyttas bakåt och ökar på de ohalta benen. Vid en bakbenschälta lägger hästen över vikt på motsatt sidas bakben genom en rotation i ryggen i längsaxel för att minska den kraft som behövs för att lyfta det halta benet.

Kramer *et al* (2004) visar att *tuber coxae* höjdförskjutning inte är en bra variabel för att bestämma hälta tvärtemot vad Buchner *et al* (1996) säger. *Tuber coxae* roterar bort från benet som belastas pga. att pelvis roterar vid varje steg. Detta leder till att *tuber coxae* höjdförskjutning kommer att vara olika på samma sida beroende på vilket ben som belastas. När vänster ben belastas kommer vänster *tuber coxae* högre upp än när höger ben belastas.

När hästen longeras ser den halt ut på inre bakbenet pga. att hästens normala symmetri påverkas av böjningen i kroppen som sker vid longering. Denna asymmetri maskerar en mild bakbenschälta när det halta benet är på utsidan, men den accentueras när det halta benet är på insidan (Rhodin *et al.*, 2013).

Hästar uppvisar även kompensatoriska hältor där hästen ser halt ut på ett annat ben än initialhåltan. En bakbenschälta ger kompensatoriska huvudnickningar som gör att hästen ser ut att ha en ipsilateral frambenschälta. Vid inducerad frambenschälta uppvisar hästen en kontralateral bakbenschälta och en mild ipsilateral bakbenschälta pga. kompensatoriska rörelser (Buchner *et al.*, 1996; Rhodin *et al.*, 2013; Kelmer *et al.*, 2005).

Objektiv hältbedömning

Det finns flera kinetik- och kinematiksystem för att genomföra objektiva hältundersökningar där man använder sig av kraftmätningssystem, accelerometrar och kamerasystem med höghastighetskameror och reflektoriska markörer (Kelmer *et al.*, 2005; Halling Thomson *et al.*, 2010; Keegan *et al.*, 2012).

I en studie (Audigié *et al.*, 2002) fastställdes vilka delar av hästen som var användbara för att räkna ut hältgrad och vilket ben som utlöste håltan. Reflektoriska hudmarkörer fästes på hästens rygg på thorakalkota 6 (T6), 13 (T13), lumbarkota 1 (L1) och lumbosakralleden (LS) och en på varje framhovs dorsolateralsida. T6, LS och hovmarkören kunde med hjälp av en algoritm användas för att räkna ut hältgraden och om det var fram- eller bakben och höger- eller vänster sida som var ansvarig för håltan.

Indikatorn som väljs för hälta måste vara känslig för förändringar som sker vid olika grad av hälta. Vid frambensrörelser är det huvudrörelserna och vid bakbenschälta är det *tuber sakrale* som är mest känsliga (Buchner *et al.*, 1996).

Oftast mäts skillnader i mindiff och maxdiff på hältindikatorernas vertikala förskjutning, alltså skillnaden mellan sinuskurvas lägsta punkter och högsta punkter. Detta visar på asymmetri och vilken sidas ben som är orsaken till håltan (Kramer *et al.*, 2004; Kelmer *et al.*, 2005). I studien från 2004 (Kramer *et al.*) visades att vid inducerad bakbenschälta uppstod en signifikant skillnad i maxdiff på pelvis position för varje inducerad grad av hälta.

Keegan *et al.* (2001) delar in huvudets rörelser i tre delar. A1 som är amplituden av den hältutlösta vertikala rörelsen, A2 vilket är den naturliga bifasiska rörelsen och övriga

huvudrörelser, som inkluderar alla rörelser hästen gör med sitt huvud som inte är vertikalt i lodplan vilket sker när hästen är exalterad eller tittig. De övriga huvudrörelserna dras bort med matematisk uträkning varpå A1 och A2 beräknas. Att beräkna A1 fungerar bäst vid enkelsidig hälta men kan användas för att beräkna vilket ben som är mest affekterat vid en bilateral hälta.

Kramer *et al.* (2004) använde sig av samma signalanalys för pelvis rörelse som Keegan *et al.* (2001) använde sig av till hästens huvudrörelse. Pelvis rörelser är inte lika markanta som huvudets rörelser men dessa maskerar lätt en mild bakbenschälta. A1, som sker en gång per stegcykel, och A2, som sker två gånger per stegcykel, beräknas efter att de rörelser som inte är pelvis bifasiska fysiologiska rörelser har räknats bort, vilket motsvarar de övriga huvudrörelserna som ses. Studien räknade fram ett basvärde på A1 som för friska hästar borde vara noll men som pga. hästarnas naturliga asymmetrier inte är det. I studien använde man sig av en kvot mellan A1 och A2 som ökade vid ökande grad av hälta vilket även har visats av Kelmer *et al.* (2005). Att använda sig av A1 och A1:A2 är speciellt bra vid bilaterala hältor där mindiff och maxdiff blir låga men A1 och A1:A2 fortfarande ökar och visar på hälta.

Genom att använda Fourier transformationssystem kan sinuskurvan räknas om till frekvenser vilket beräknar en symmetriprocent (Peham *et al.*, 2001). Studien jämförde frekvensmätningen med den subjektiva bedömningen av veterinär. Detta visade att veterinären bedömde en symmetri på 75 % som hältgrad 1 och symmetriprocent <63% som hältgrad 2 och uppåt. Veterinärens bedömning och frekvensanalysen stämde bra överens i alla försök, men bäst konsensus uppnåddes vid frambenschälta. Författarna anser att frekvensanalysen med symmetriprocent är ett bra komplement till den veterinära bedömningen. Kramer *et al.*, (2004) anser däremot att frekvensanalys är en mindre bra bedömning av hälta då den visar ett medelvärde på flera steg istället för att analysera varje steg separat. Detta gör att metoden missar intermittenta hältor och hältor som försvinner med rörelse.

De system som använder sig av accelerometrar har en bra reproducerbarhet (Keegan *et al.*, 2011) och kan med hjälp av symmetrimått baserade på Fourieranalys beskriva symmetrin hos friska hästar i trav, Index S, symmetrin hos den belastade diagonalen, Index A, och accelerationsfasens symmetri för de två diagonalerna, Index W. Även den här metoden kan skilja på fram- och bakben och höger- och vänster (Halling Thomsen *et al.*, 2010).

MATERIAL OCH METODER

Material

Ridhästar inkomna till UDS hästklinik på grund av hälta eller ridbarhetsproblem vilka uppvisade en initial belastningshälta ingick i studien. Insamling av data har skett under hösten 2015. Hästarnas problem hade pågått i några veckor till över två år. En av hästarna inkom endast för hälsokoll, eftersom djurägaren inte hade uppmärksammat någon hälta, men hästen uppvisade en initialhälta när den undersöktes av veterinär. Hästarna var mellan 3,5 och 20 år gamla, av olika raser och användes inom olika områden såsom promenadridning, westernridning, gångart (islandshäst) samt medelsvår nivå i dressyr och hoppning. Ras, ålder,

kön och användningsområde har sammanfattats i tabell 1. Godkänd etisk ansökan för insamlande av material fanns, Uppsala Djuretiska Nämnd diarienummer C62/13.

Tabell 1. Förteckning över hästarna som ingick i studien.

Individ-nummer	Ras	Ålder (år)	Kön	Användningsområde	Nivå
1	Quarterhäst	7	Sto	Western	Hobby
2	Sv Hbl	4	Valack	Dressyr	Unghäst
3	Sv Hbl	20	Sto	Engelsk ridning	Hobby
4	Sv Hbl	3,5	Valack	Hoppning	Unghäst
5	Korsningshäst	18	Valack	Ridskola	-
6	Korsningsponny	5	Sto	Hoppning	Lätt
7	Sv Hbl	9	Valack	Dressyr	Msv
8	Islandshäst	5	Valack	Gångart	Lätt
9	Sv Hbl	9	Valack	Hoppning	Msv
10	Sv Hbl	5	Valack	Dressyr	Hobby
11	Irländsk hopp-ponny	14	Sto	Hoppning	Lätt
12	Korsningsponny	8	Sto	Hoppning	Lätt-Msv
13	Korsningshäst	19	Sto	Engelsk ridning	Hobby
14	Islandshäst	11	Valack	Gångart	-

- = Ej angivet , Sv Hbl = Svenskt halvblod, MSV = Medelsvår

Metod

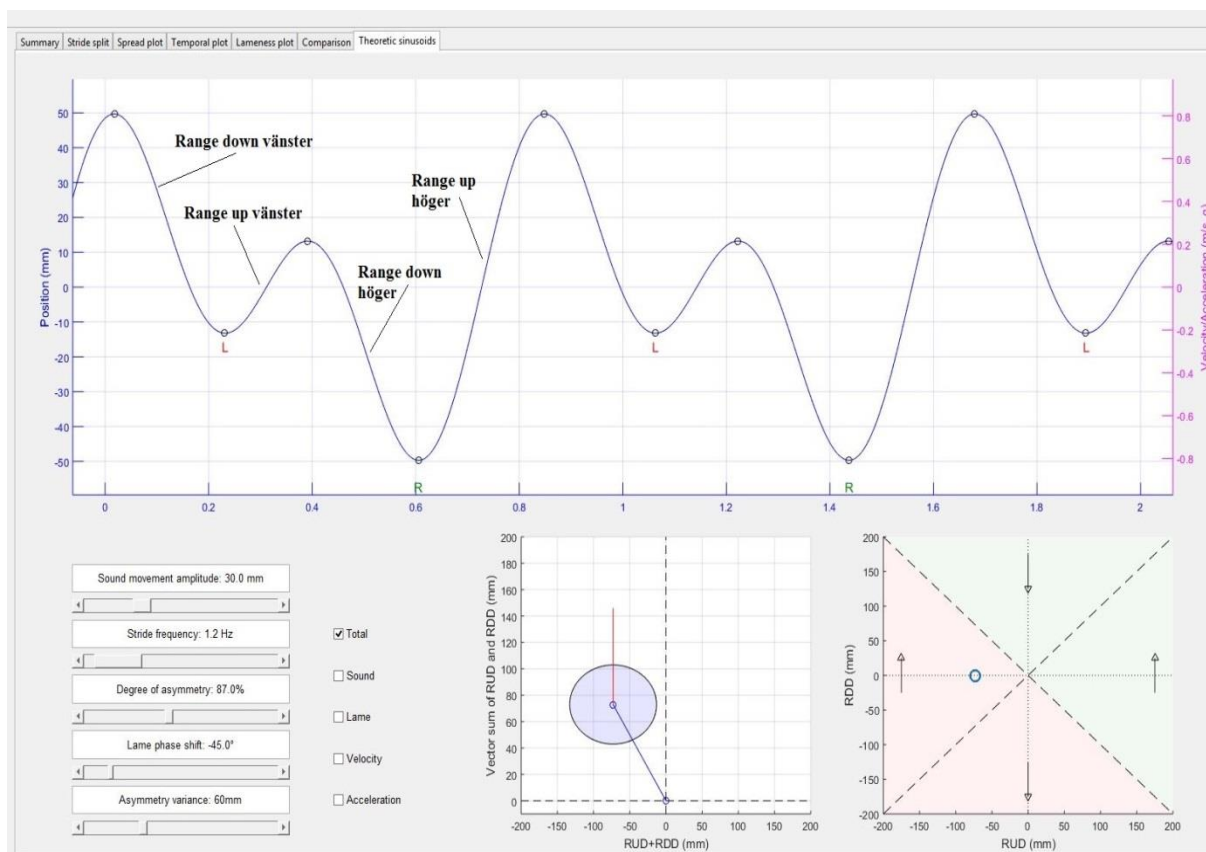
De hästar som inkluderades genomgick en subjektiv hältundersökning, utförd av en av klinkens ortoped, och en objektiv hältundersökning med ett kamerabaserat system (Qualisys), vilken utfördes samtidigt som den subjektiva bedömningen. Detta system användes endast som ett stöd vid den subjektiva hältundersökningen för att säkerställa de låggradiga hältorna som är svåra att bedöma subjektivt. Hältundersökningen bestod av skritt och trav på rakt spår på hårt underlag, följt av longering på grus i båda varv och avslutades med böjprov på alla fyra ben. Den subjektiva bedömningen graderas enligt en femgradig skala, 0-5 där 5 är blockhalt och 0,25 är en liten markering vilket beskrivs i tabell 2. Qualisys är ett system med höghastighetskameror som mäter asymmetrier hos hästar. Nio stycken reflexmarkörer fästes på hästen, tre stycken på pannan, (Figur 2), tre stycken på manken och tre stycken på korset, vilka reflekterar ljuset ifrån kamerorna. Systemet mäter då markörernas position vilket visar på hästens rörelsemönster. Därefter beräknas en skillnad i range-up och range-down mellan höger och vänster ben på den sinuskurva som bildas av varje markörgrupp, huvud, manke och kors, vilket visar vilket ben som orsakar hältan, detta visas med en teoretisk kurva i Figur 3.

Tabell 2. *Subjektiva hältgrader*

0	Ohalt
0,25	Lindrig hälta som syns intermittent i trav
0,5	Lindrig ihållande hälta
1	Tydlig hälta i trav
2	Måttlig hälta
3	Måttlig-kraftig hälta i trav, syns ibland även i skritt
4	Kraftig hälta i trav, tydlig i skritt
5	Ej viktbarande, "blockhalt"



Figur 2. Reflexmarkörerna som fästes i pannan för hältundersökning med Qualisysystemet.



Figur 3. Bild från Qualisys systemet som visar en hälsa på vänster ben. Övre grafen visar en teoretisk sinuskurva som används för att räkna ut vilket ben som uppvisar asymmetri och därmed hälsa. Varje grupp av markörer (huvud, manke och kors) bildar en egen sinuskurva. Skillnaden i range up (RUD) och range down (RDD) adderas för de båda benen och visas på två sätt i de nedre graferna. Vid ett positivt värde på RUD+RDD visar höger ben en asymmetri medan vid ett negativt värde visar vänster ben på asymmetri.

Vid konstaterad hälsa, där en led misstänktes vara den hältutlösande orsaken, bedövades olika leder för att fastställa vilken led som utlöste hältan. I samband med detta aspirerades 0,5-5ml ledvätska/led och överfördes till serumrör. Blodprov togs från jugularvenen i serumrör. Kliniskt laboratorium (SLU) analyserade ledvätska för leukocytantal ifrån de leder där 1ml eller mer aspirerades, normalintervallet sträcker sig upp till 500×10^6 leukocyter enligt analyserande laboratorium. Resterande ledvätska och blod centrifugerades vid $450 \times g$ i 10 min i $4^\circ C$. Supernatanten från ledvätskan och serum allikvoterades och överfördes till centrifugrör och förvarades i $-80^\circ C$.

NGF-koncentrationer i ledvätska och serum mättes via en kvantitativ sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, (ELISA), (Horse Nerve Growth Factor ELISA kit, MyBioSource, katalognummer MB040618) och genomfördes enligt tillverkarens instruktioner. Sammanfattningsvis analyserades proven, $50 \mu L$, i duplikat på en ELISA-platta innehållande NGF-antikropp. Till denna tillsattes HRP (pepparrots peroxid) konjugerad NGF-antikropp följt av inkubering i $37^\circ C$ i 60 minuter. Plattan tvättades med tvättlösning fyra gånger. Chromogen solution A tillsattes följt av chromogen solution B. Plattan inkuberades i $37^\circ C$ i 15 minuter. Stop solution tillsattes till alla brunnar varpå absorbansen avläses vid

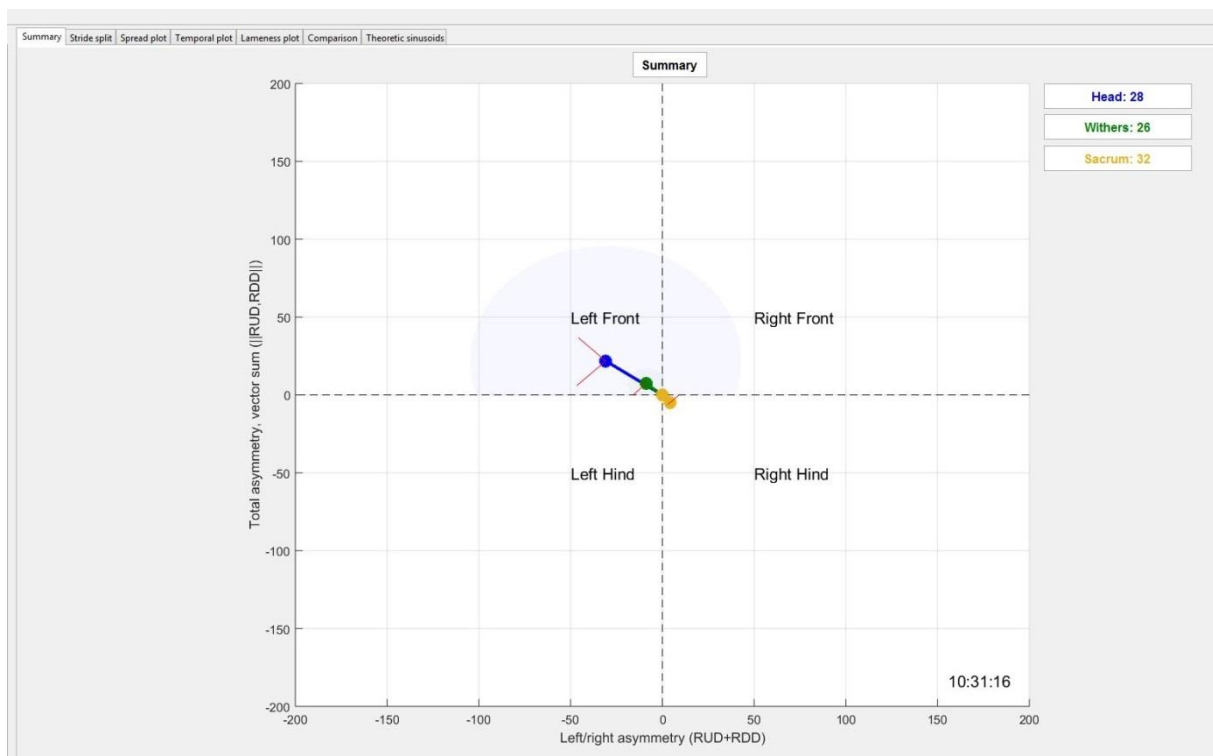
450nm. En standardkurva innehållande kända koncentrationer (15,6-500ng/ml) av NGF användes för att bestämma koncentrationerna i proverna.

Flera av hästarna visade hälta från flera leder och flera ben. Efter undersökning inkluderande intraartikulära anestesier förelåg ibland hållpunkter för att hältan kunde utlösas av fler än en led. För att kunna korrelera NGF-koncentrationer med hältgrad gjordes ett försök att avgöra vilken led som var den mest troliga till initialhältan. Detta baserades på de subjektiva kliniska fynden med hältgrad på rakt spår, hältgrad på volt vid longering, reaktion vid provokation av led vid böjprov och inducerad hälta efter böjprov. Hos de hästar som uppvisade en hälta utlöst av karpus ledavdelningar, valdes NGF-värdet från den proximala ledavdelningen då denna är karpus största ledavdelning samt att den inte kommunicerar med någon av de övriga ledavdelningarna. Vi kan därför vara säkra på att den koncentration av NGF som uppmätts i ledavdelningen inte inkluderar andra ledavdelningar.

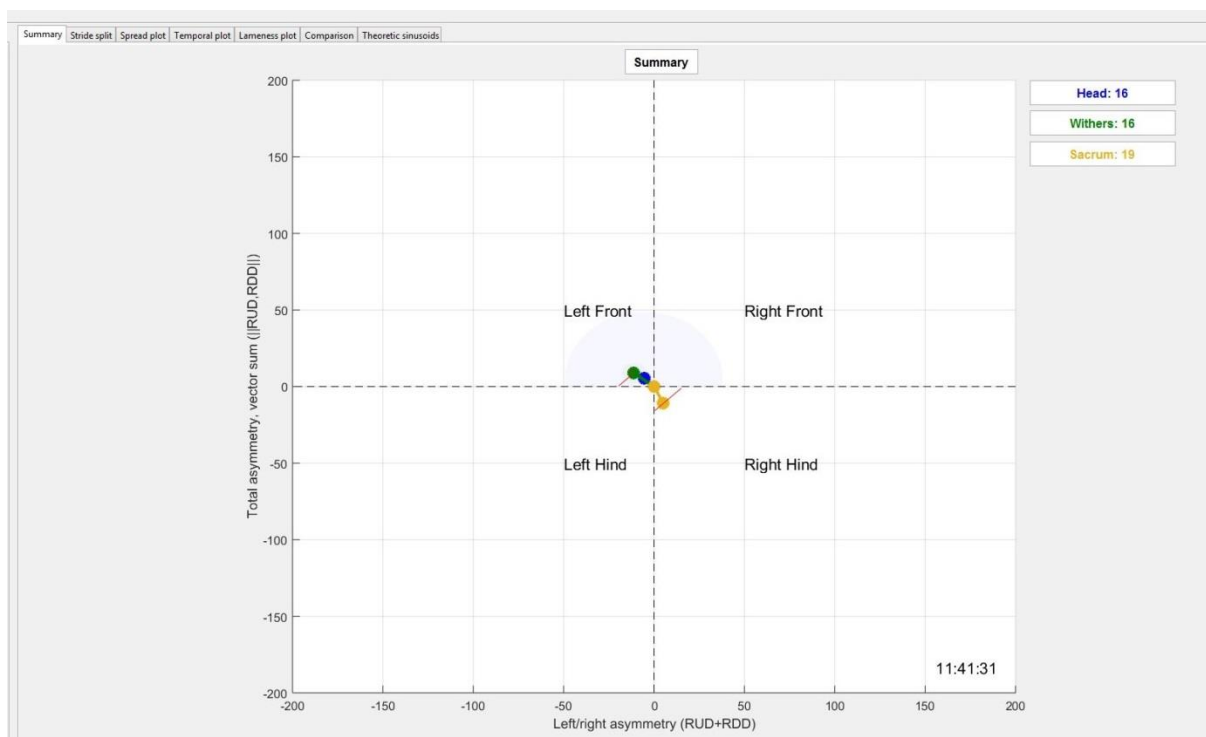
RESULTAT

Det förelåg alltid samstämmighet mellan Qualisysssystemet och den subjektiva bedömningen avseende vilket ben hältan utgick ifrån.

Figurer 4 och 5 visar exempel på resultat från Qualisysssystemet där en minskad grad av hälta efter ledanestesi hos häst 6 kan ses.



Figur 4. Häst nr 6. Diagram från undersökning med Qualisysssystemet som visar en vänster frambenshälta. Den blå huvudmarkören och den gröna mankmarkören visar att vänster framben orsakar hältan.



Figur 5. Häst nr 6. Diagram från undersökning med Qualisysystemet från samma häst som i figur 4 visar minskad hälta efter ledanestesi i karpus övre ledavdelning på vänster framben. Den blå huvudmarkören och den gröna mankmarkören visar att en tydlig minskning av vänster frambenshälta har skett.

NGF-koncentrationerna i ledvätska och serum från samtliga hästar redovisas i tabell 3. De leder som ansågs vara den hältutlösande leden redovisas med **fetmarkerad** stil i tabell 3.

Tabell 3. *Hältgrad, duration, anestesi, NGF-koncentration och leukocytantal*

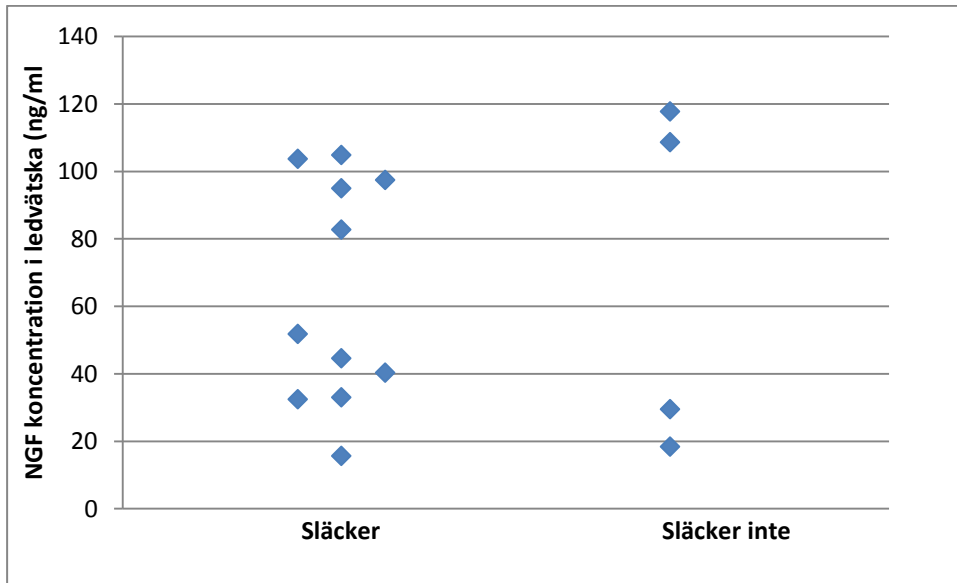
Individ-nummer	Led	Släcks av anestesi	Hältgrad	Duration	NGF i ledvätska (ng/ml)	NGF i serum (ng/ml)	Leukocytantal i ledvätska ($10^6/l$)#
1	HF RC	Förbättrar	0,25° HF	2,5 år ovillig att gå fram	15,6	< Lower Limit	460
	HF IC	Förbättrar			6,1		130
	VF RC	Släcker			10,9		100
	VF IC	Släcker			13,5		
2	VF Kotled	Släcker	0,25° VF	Månader [⊘]	51,8	37,7	260
3	VF IC	Släcker	0,25° VF	3v	32,4	46,0	390
	VF RC	Släcker			32,5		250
	HF IC	*			40,8		120
	HF RC	*			23,8		
4	VF Kotled	Nej	0,25° VF hö varv	4 mån	29,6	34,2	280

4b	HF IC	Nej	0,5° HF vä varv	5 mån	115,2	12,9	120	
	HF RC				108,7		190	
5	VB Kotled	Nej	1° VB hö varv	2-4v	18,4	2,4	480	
6	VF Kotled	Släcker	0,25° VF	>1 mån	22,6	45,1	240	
	VF RC	Släcker			40,3		230	
	VF IC	Släcker			25,5			
7	HF Kotled	Släcker	0,25° HF hö varv	3v	33,0	11,6	160	
8	HB FP	Förbättrar	1° HB vä varv	5 mån	44,6	32,6	230	
9	HF Kotled	Släcker	0,25° HF	Inne för hälsokoll	101,2	17,9	70	
	HF IC	Släcker			86,5			
	HF RC	Släcker			94,9			
10	HF IC	Släcker	0,5° HF	6 mån	101,3	31,8	190	
	HF RC	Släcker			104,9		120	
	VF IC	^			88,9		140	
	VF RC	^			104,2		230	
11	HF Kotled	Förbättrar	0,25° HF	1 år	96,1	11,8	210	
	HF IC	Släcker			103,7		130	
12	HF IC	Nej	0,25° HF	4 mån	80,1	14,1	190	
	HF RC	Nej			125,6			
	HF Kotled	Förbättrar			97,4			
13	HF IC Carb	Släcker	1,5° HF	1 mån	94,5	1,9	630	
	HF RC	Släcker			82,7			
	VF IC	^			81,3			190
	VF RC	^			69,9			210
14	HF IC	Nej	0,5° HF	3 mån	104,6	-	280	
	HF RC	Nej			113,4		200	
	HF Kotled	Nej			117,8			

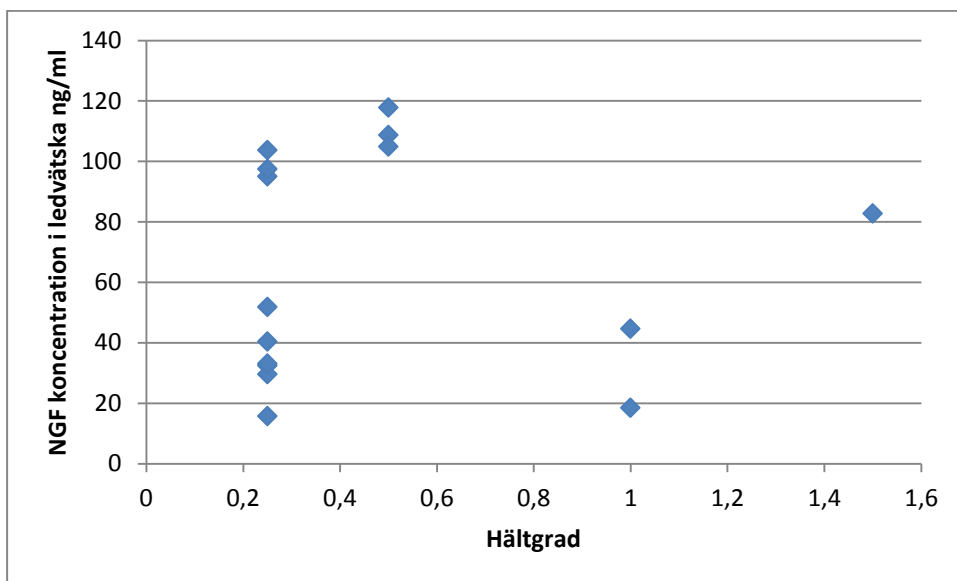
HF – Höger fram, VF – Vänster fram, HB – Höger bak, VB – Vänster bak, Hö varv – Höger varv vid lingering, Vä varv – Vänster varv vid lingering, IC – Interkarpalled, RC – Radiokarpalled, FP – Femurpatellarled, * Ej initialhalt, ^ - Ingen ledanestesi lagd, - Ej analyserat, BP – Böjprov, 4b – återbesök efter 4 veckor. ♂ Uppskattningsvis 4 månader. # - Normalintervallet sträcker sig upp till 500x10⁶ enligt analyserande laboratorium. **Fetmarkerade leder inkluderades i studien**

Då data i denna studie inte lämpade sig för en statistisk analys redovisas resultaten i olika grafer där NGF-koncentrationerna från de hältutlösande lederna jämförs med icke

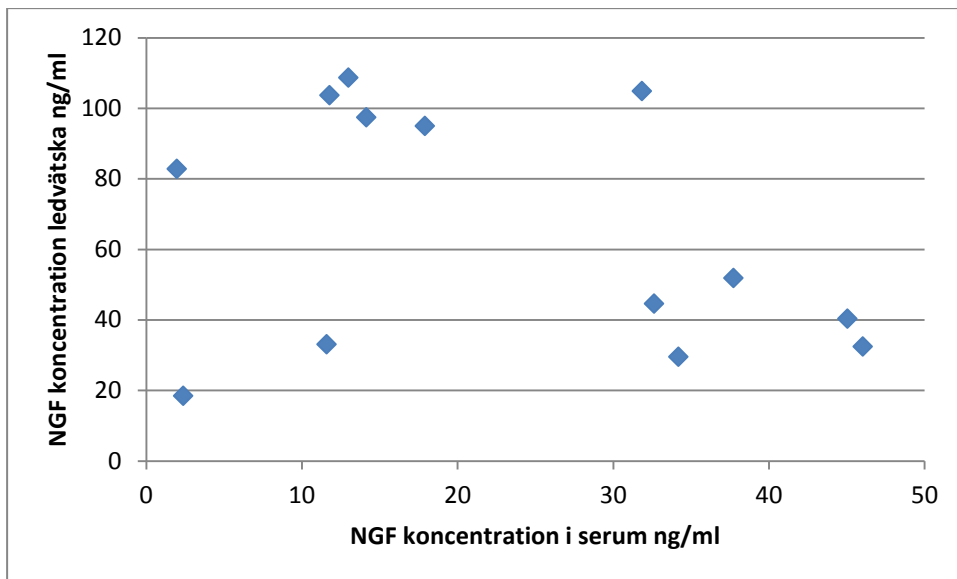
håltutlösande leder (figur 6), håltgrad (figur 7), serumkoncentration av NGF (figur 8), leukocytantal (figurer 9, 10) och håltduration (figur 11).



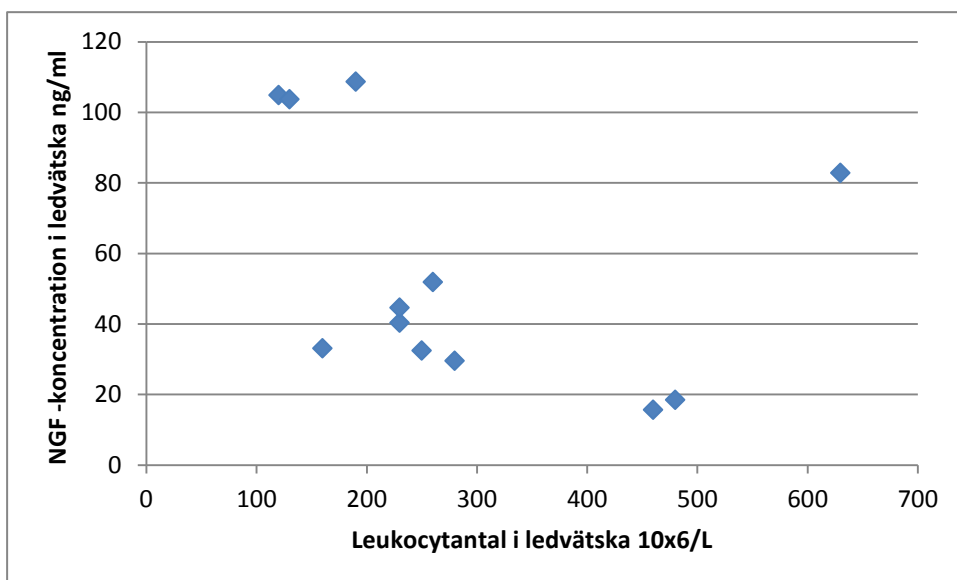
Figur 6. NGF-koncentrationen grupperat för de leder som bedövades bort (släckte) av ledanestesi och de leder som inte bedövades bort av ledanestesi.



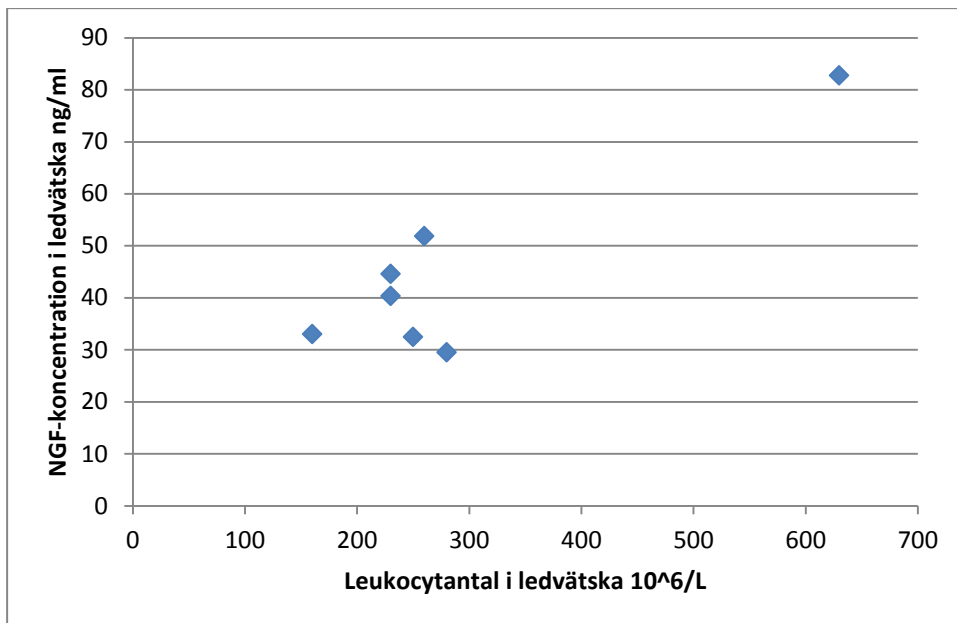
Figur 7. NGF-koncentrationen i ledvätska för varje uppmätt håltgrad i de leder som ingick i studien.



Figur 8. NGF-koncentrationen i serum i relation till koncentrationen i ledvätska.



Figur 9. Leukocytantal i ledvätska i relation till ledens uppmätta NGF-koncentration.



Figur 10. Leukocytantal i ledvätska utan extremvärden. Visar ett tydligare samband mellan leukocytantal och NGF-koncentration i ledvätska.



Figur 11. Hältduration i relation till NGF-koncentrationen i ledvätska.

DISKUSSION

Ortopediska problem med hälta är en av de vanligaste åkommorna hos våra sporthästar (Penell *et al.*, 2005). För att en korrekt behandling ska kunna sättas in tidigt är det viktigt att hältans ursprung diagnostiseras så tidigt som möjligt. En korrekt behandling och rehabilitering kan minska obehaget och smärtan för hästen och också garantera en möjlighet att den kan komma tillbaka till full användning. Det är känt att NGF, en tänkbar smärtmarkör, finns vid inflammatoriska och smärtsamma tillstånd i leder hos hund, råtta och människa (Isola *et al.*, 2011; Kras *et al.*, 2015; Halliday *et al.*, 1998), varför det kan vara relevant att undersöka nivåerna av NGF i ledvätska och serum hos kliniskt halta hästar.

I denna studie har NGF-koncentrationen uppmätts med ELISA i serum och ledvätska från 14 hästar som undersökts för hälta. Dessa hästar utgjorde en heterogen population med olika duration av hälta och hättlösande led samt grad av hälta, hästras, ålder och användningsområde. Eftersom en kontrollgrupp med helt friska hästar inte har kunnat undersökas går det inte att avgöra om de uppmätta NGF-koncentrationerna är inom normalvariationen för ledvätska och serum hos häst. En initial hypotes var att de hästar med leder som inte bedövades bort av en intraartikulär anestesi skulle kunna fungera som en kontrollgrupp. Men som visas i figur 6 uppmättes liknande värden i båda grupperna. Det kan bero på att det är svårt att bedöva bort en kronisk smärta och att lederna ändå var hättlösande trots att det inte gick att bedöva bort hältan helt.

Häst nr. 4, en unghäst som visat hälta sedan fyra månader tillbaka, uppvisade ingen initialhälta på rakt spår men en lindrig hälta på yttre frambenet i båda varven vid longering. Hästen reagerade inte vid högt böjprov, men en lindrig böjprovsreaktion sågs vid lågt böjprov av vänster framben (VF). Denna reaktion bedövades bort med en intraartikulär anestesi i kotleden, men den ursprungliga frambenshältan släcktes inte. En abaxial nervblockad, som läggs vid nervgrenar (*nn. Digitalis palmaris lateralis et medialis*) vid kotsenbenen och som bedövar leder och mjukdelar distalt om injektionsplatsen, på höger framben (HF) släckte den lindriga hältan som påvisats vid longering på volt och accentuerade hältan VF på volt. Hästen behandlades med NSAID systemiskt i tio dagar tillsammans med vila i hagen i tre veckor fram tills återbesök.

Vid återbesök fyra veckor senare ses fortsatt hälta från båda frambenen i yttervarv på volt. Denna gång protesterar hästen kraftigt med stegring vid högt böjprov av både HF och VF, men visar endast en lindrig hälta från HF och ingen hälta VF efter böjning.

Intraartikulär anestesi av radiokarpalleden (RC) och interkarpalleden (IC) HF släcker endast böjprovsreaktionen, men inte den initiala hältan. Trots att ingen ledanestesi släckte initialhältan vid något av de två besöken, och vi inte kan vara säkra på att höger frambens karpalleder är affekterade, uppmättes några av de högsta NGF-koncentrationerna i ledvätskan från RC och IC (115,2 ng/ml och 108,7 ng/ml) vid andra besöket. Detta trots att behandling med NSAID har visats minska nivåerna av NGF i ledvätska (Ashraf *et al.*, 2014). Detta skulle kunna bero på att de periartikulära vävnaderna kan vara ansvariga för de uppmätta NGF-koncentrationerna. Det förefaller troligt att de periartikulära vävnaderna var involverade i smärta som utlöste hältan eftersom hästen visade kraftiga böjprovsreaktioner, vilka blockerades vid ledanestesi. Men det går inte att dra några slutsatser från en enda häst, men även när det gäller häst nr 1 kan en misstanke om periartikulär involvering föreligga.

Denna häst (nr 1), ett sjuårigt Quartersto, som har haft hältproblem i flera år, visade höga leukocytantal (dock inom normalvariation) och låga NGF-koncentrationer. I hästens ledvätska från RC och IC på HF och RC och IC på VF uppmättes en hög andel leukocyter (460, 130 och $100 \times 10^6/l$) och en låg koncentration av NGF (15.6, 6.1, 10.9 och 13.5 ng/ml). Hästen visade en markering (0,25) på HF som initialhälta på rakt spår. Vid högt böjprov av HF protesterade hästen och visade en 2-gradig inducerad hälta som klingade av med rörelse på rakt spår. Vid högt böjprov av VF protesterar hästen kraftigt och visar sedan en 1-gradig hälta som klingar av med rörelse på rakt spår.

Intraartikulär anestesi av RC och IC i både HF och VF släcker inte initialhåltan. Däremot släcks reaktionerna som hästen visade vid böjprov och de håltor som inducerades vid högt böjprov av HF och VF. Detta tyder på att det även är extraartikulära vävnader som är inblandade i håltan. Det höga leukocyttantalet och den låga NGF-koncentrationen kan tala för en pågående ledinflammation vars duration inte går att avgöra.

Häst nr. 3, en 20 år gammal svensk halvblodshäst, som endast haft håltproblem i tre veckor, visade en markering (0,25) på VF som initial hålt på rakt spår. Den intraartikulära ledanestesi i RC och IC släckte håltan och det gick därför att avgöra vilka leder som var håltutlösande. NGF-koncentrationerna i de här ledavdelningarna var lägre (32,4 och 32,5 ng/ml) än många andra uppmätta värden men leukocyttantalet i ledvätskan var relativt högt (390 och $250 \times 10^6/l$) i jämförelse med de uppmätta värdena hos de andra hästarna, dock inom värdet för normalvariation ($<500 \times 10^6/l$). Detta skulle kunna bero på att det först är inflammationsprocessen som sätter igång följt av syntes och utsöndring av NGF i ett senare skede varför koncentrationerna inte har hunnit stiga. Detta stöds av Driscoll *et al.* (2015) som visat att inflammationssvaret hos råttor är störst närmast skadetillfället och att det minskar ju längre tiden går samtidigt som NGF-koncentrationen ökar i ledens vävnader.

Uppmätta värden av NGF i ledvätska i denna studie (6,1-125,6 ng/ml) är mycket höga jämfört med koncentrationer uppmätta vid OA hos hund (Isola *et al.*, 2011) och reumatoid artrit hos människa (Halliday *et al.*, 1998). Hos hund var koncentrationerna av NGF i ledvätska vid OA runt 10 pg/ml (0,01ng/ml) och hos människa med reumatoid artrit runt 500pg/ml (0,5ng/ml). Även i dessa studier påvisades en stor spridning av NGF-koncentrationer. Orsaken till de höga NGF-koncentrationerna hos häst kan bero på mätmetodens känslighet eller vara speciesberoende.

Den redovisade studien har inte kunnat testa om det föreligger någon korrelation mellan NGF-koncentrationerna i ledvätska och serum och de övriga parametrarna: grad av hålt, duration av hålt, håltutlösande led och leukocyttantal i ledvätska. När extremvärden exkluderas (figur 10) ses ett litet samband mellan leukocyttantal och NGF-koncentration i ledvätska. Det kan därför vara relevant att undersöka korrelationen mellan NGF-koncentrationen i ledvätska och serum mot andra inflammationsparametrar (SAA, totalprotein, TNF-alfa, IL-6, IL-8) som kan finnas i ledvätska.

Hästarna som inkluderades i studien var en heterogen grupp vad gällde ålder, håltutlösande led, duration av hålt och användningsområde. Flertalet av de inkluderade hästarna föreföll uppvisa hålt bilateralt och dessutom visade många två eller tre håltutlösande leder på samma ben.

Användandet av Qualisysystemet ansågs av både utredande veterinärer och författaren till detta examensarbete vara ett bra stöd i bedömning av hålt, speciellt vid de lindrigare graderna. För att kunna göra en bättre analys av detta system krävs dock att man tar fram specifika gränsvärden för om håltan har blockerats eller inte med ledanestesi. Dessutom måste ett mått finnas på hur mycket en hålt har förbättrats om den inte har blockerats helt.

Sammanfattningsvis har denna studie påvisat stora skillnader av NGF-koncentration i ledvätska och serum från halta hästar. Höga nivåer av NGF har uppmätts i ledvätska och orsaken till detta bör utredas. Variationen i NGF-koncentrationerna bör klarläggas och en jämförelse med koncentrationer i ledvätska och serum från friska hästar måste inkluderas.

REFERENSER

- Andriacchi, T. P., Mündermann, A., Smith, R. L., Alexander, E. J., Dyrby, C. O. & Koo, S. (2003). A Framework for the *in Vivo* Pathomechanics of Osteoarthritis at the Knee. *Annals of Biomedical Engineering*, 32:447-457.
- Ashraf, S., Mapp, P. I., Burston, J., Bennett, A. J., Chapman, V. & Walsh, D. A. (2013). Augmented Pain Behavioural Responses to Intra-Articular Injection of Nerve Growth Factor in Two Animal Models of Osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73:1710-1718.
- Audigié, F., Pourcelot, P., Deguerce, C., Geiger, D. & Denoix, J. M. (2002). Fourier Analysis of Trunk Displacements: a Method to Identify the Lame Limb in Trotting Horses. *Journal of Biomechanics*, 35:1173-1182.
- Bank, R. A., Krikken, M., Beekman, B., Stoop, R., Mardouas, A., Lafeber, F. P. J. G. & Te Koppele, J. M. (1997). A Simplified Measurement of Degraded Collagen in Tissues: Application in Healthy, Fibrillated and Osteoarthritic Cartilage. *Matrix Biology*, 16:233-243.
- 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*, 64: 1263-1267.
- Bobacz, K., Sunk, I. G., Hofstaetter, J. G., Amoyo, L., Toma, C. D., Akira, S., Weichhart, T., Saemann, M. & Smolen, J. S. (2007). Toll-like Receptors and Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 56:1880-1893.
- Brandt, K. D., Radin, E. L., Dieppe, P. A. & van de Putte, L. (2006). Yet More Evidence That Osteoarthritis is not a Cartilage Disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65:1261-1264.
- Buchner, H. H. F., Savelberg, H. H. C. M., Schamhardt, H. C. & Barneveld, A. (1996). Head and Trunk Movement Adaptations in Horses with Experimentally Induced Fore- or Hindlimb Lameness. *Equine Veterinary Journal*, 28:71-76.
- Buckland-Wright, C. (2003). Subchondral Bone Changes in Hand and Knee Osteoarthritis Detected by Radiography. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12:10-19.
- Crowder, R. J. & Freeman, R. S. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt Protein Kinase are Necessary and Sufficient for the Survival of Nerve Growth Factor-Dependent Sympathetic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 18:2933-2943.
- Cruz, A. M. & Hurtig, M. B. (2008). Multiple Pathways to Osteoarthritis and Articular Fractures: Is Subchondral Bone the Culprit? *Veterinary Clinics Equine Practice*, 24:101-116.
- Ding, L., Heying, E., Micholson, N., Stroud, N. J., Homandberg, G. A., Buckwalter, J. A., Guo, D. & Martin, J. A. (2010). Mechanical Impact Induces Cartilage Degradation via Mitogen Activated Protein Kinases. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18:1509-1517.
- Drevemo, S., Fredricson, I. & Hjertén, G. (1987). Early Development of Gait Asymmetries in Trotting Standardbred Colts. *Equine Veterinary Journal*, 19:189-191.
- Driscoll, C., Chanalaris, A., Knights, C., Ismail, H., Sacitharan, P. K., Gentry, C., Bevan, S. & Vincent, T. L. (2015). Nociceptive Sensitizers are Regulated in Damaged Joint Tissues, Including the Articular Cartilage, when Osteoarthritic Mice Display Pain Behaviour. *Arthritis and Rheumatology*, doi: 10.1002/art.39523 [2015-11-30].
- Frisbie, D. D. (2012). Synovial Joint Biology and Pathology. I: Auer, J.A & Stick, J. A. (ed) *Equine Surgery*, 4. ed. St. Louis, Elsevier Saunders, 1096-1103.
- Goldring, M. B. & Otero, M. (2011). Inflammation in Osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 2011 23(5): 471-478.
- Greene, G. W., Banguy, X., Lee, D. W., Lowrey, D. D., Yu, J. & Isrealachvili, J N. (2011). Adaptive Mechanically Controlled Lubrication Mechanism Found in Articular Joints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:5255-5259.

- Greenwald, R. A., Moy, W. W., & Seibold, J. (1978). Functional Properties of Cartilage Proteoglycans. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 8:53-67.
- Halliday, D. A., Zettler, C., Rush, R. A., Scicchitano, R. & McNeil, D. (1998). Elevated Nerve Growth Factor Levels in the Synovial Fluids of Patients with Inflammatory Joint Disease. *Neurochemical Research*, 23:919-922.
- Halling Thomsen, M., Tolver Jensen, A., Sørensen, H., Lindegaard, C. & Haubro Andersen, P. (2010). Symmetry Indices Based on Accelerometric Data in Trotting Horses. *Journal of Biomechanics*, 43:2608-2612.
- Henderson, B. & Pettipher, E. R. (1985). The Synovial Lining Cell: Biology and Pathobiology. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 15:1-32.
- Hoffman, E. M., Zhang, Z., Andersson, M. B., Schechter, R. & Miller, K. E. (2011). Potential Mechanisms for Hypoalgesia Induced by Anti-nerve Growth Factor Immunoglobulin are Identified using Autoimmune Nerve Growth Factor Deprivation. *Neuroscience*, 193:452-465.
- Homandberg, G. A., Wen, C. & Hui, F. (1998). Cartilage Damaging Activities of Fibronectin Fragments Derived from Cartilage and Synovial Fluid. *Osteoarthritis and Cartilage*, 6:231-244.
- Hourd, X., Goldring, M. B. & Berenbaum, F. (2013). Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports* 2013 November 15(11).
- Iannone, F., De Bari, C., Dell'Accio, F., Covelli, M., Patella, V., Lo Bianco, G. & Lapadula, G. (2002) Increased expression of nerve growth factor (NGF) and high affinity NGF receptor (p140 TrkA) in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology*, 41(12), 1413-1418.
- Isola, M., Ferrari, V., Miolo, A., Bernardini, D. & Busetto, R. (2011). *Veterinary and Comparative Ortopaedics and Traumatology*, 4/2011.
- Johansson, H. E. & Reino, S. (1976). Light and Electron Microscopic Investigation of Equine Synovial Membrane. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 17:153-168.
- 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., Pollitt, C. C., Shaw, R. & Norris, T. (2010). Repeatability of Subjective Evaluation of Lameness in Horses. *Equine Veterinary Journal*, 42:92-97.
- Keegan, K. G., Kramer, J., Yonezawa, Y., Maki, H., Dent, E. V., Kellerman, T. E., Wilson, D. A. & Reed, S. K. (2011). Assessment of Repeatability of a Wireless, Inertial Sensor-Based, Lameness Evaluation System for Horses. *American Journal of Veterinary Research*, 72:1156-1163.
- Keegan, K. G., MacAllister, C. G., Wilson, D. A., Gedon, C. A., Kramer, J., Yonesawa, Y., Maki, H. & Pai, P. F., (2012). Comparison of an Inertial Sensor System with a Stationary Force Plate for Evaluation of Horses with Bilateral Forelimb Lameness. *American Journal of Veterinary Research*, 73: 368-374.
- Keegan, K. G., Pai, P. F., Wilson, D. A. & Smith, B. K. (2001). Signal Decomposition Method of Evaluating Head Movement to Measure Induced Forelimb Lameness in Horses Trotting on a Treadmill. *Equine Veterinary Journal*, 33:446-451.
- Kelmer, G., Keegan, K. G., Kramer, J., Wilson, D., Pai, F. P. & Singh, P. (2005). Computer-Assisted Kinematic Evaluation of Induced Compensatory Movements Resembling Lameness in Horses Trotting on a Treadmill. *American Journal of Veterinary Research*, 66:646-655.
- Kim, H. A., Cho, M-L., Choi, H. Y., Yoon, C. S., Jhun, J. Y., Oh, H. J. & Kim, H-Y. (2006). The Catabolic Pathway Mediated by Toll-like Receptors in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 54:2152-2163.
- Ko, F. C., Dragomir, C., Plumb, D. A., Goldring, S. R., Wright, T. M., Goldring, M. B. & van der Muelen, M. C. H. (2013). In Vivo Cyclic Compression Causes Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Changes in Mouse Tibiae. *Arthritis & Rheumatism*, 65:1569-1578.

- Kramer, J., Keegan, K. G., Kelmer, G. & Wilson, D. A. (2004). Objective Determination of Pelvis Movement During Hind Limb Lameness by Use of a Signal Decomposition Method and Pelvic Height Differences. *American Journal of Veterinary Research*, 65:741-747.
- Kras, J. V., Kartha, S. & Winkelstein, B. A. (2015). Intra-articular Nerve growth Factor Regulates Development, but not Maintenance, of Injury-induced Facet Joint Pain & Spinal Neuronal Hypersensitivity. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23:1999-2008.
- Kumar, P., Oka, M., Toguchida, J., Kobayashi, M., Uchida, E., Nakamura, T. & Tanaka, K. (2001). Role of Uppermost Superficial Surface Layer of Articular Cartilage in the Lubrication Mechanism of Joints. *Journal of Anatomy*, 199:241-250.
- Lacourt M., Gao, C., Girard, C., Henderson, J. E. & Laverty, S. (2012). Relationship Between Cartilage and Subchondral Bone Lesions in Repetitive Impact Trauma-induced Equine Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20:572-583.
- Leong, D. J., Gu, X. I., Li, Y., Lee, J. Y., Laudier, D., Majeska, R. J., Schaffler, M. B., Cardoso, L. & Sun, H. B. (2010). Matrix Metalloproteinase-3 in Articular Cartilage is Upregulated by Joint Immobilization and Suppressed by Passive Joint Motion. *Matrix Biology*, 29:420-426.
- Li, W. W., Guo, T. Z., Shi, X., Wei, T., Clark DJ. & Kingery, D. S. (2015). Substance P Spinal Signaling Induces Glial Activation and Nociceptive Sensitization After Fracture. *Neuroscience*, 310:73-90.
- Lindsay, R. M., Shooter, E. M., Radeke, M. J., Misko, T. P., Dechant, G., Thoenen, H. & Lindholm, D. (1990). Nerve Growth Factor Regulates Expression of the Nerve Growth Factor Receptor Gene in Adult Sensory Neurons. *European Journal of Neuroscience*, 2:389-396.
- Lisowska, B., Lisowski, A. & Siewruk, K. (2015). Substance P and Chronic Pain in Patients with Chronic Inflammation of Connective Tissue. *Public Library of Science One*, 10: e0139206.
- Liu, L., Shenoy, M. & Pasricha, P. J. (2011). Substance P and Calcitonin Gene Related Peptide Mediate Pain in Chronic Pancreatitis and their Expression is Driven by Nerve Growth Factor. *Journal of Oncology Practice*, 12:389-394.
- Midwood, K., Sacre, S., Piccinini, A. M., Inglis, J., Trebaul, A., Chan, E., Drexler, S., Sofat, N., Kashiwagi, M., Orend, G., Brennan, F. & Foxwell, B. (2009). Tenascin-C is an Endogenous Activator of Toll-like Receptor 4 That is Essential for Maintaining Inflammation in Arthritic Joint Disease. *Nature Medicine*, 15:774-780.
- Millward-Sadler, S. J., Wright, M. O., Davies, L. W., Nuki, G. & Salter, D. M. (2000). Mechanotransduction via Integrins and Interleukin-4 Results in Altered Aggrecan and Matrix Metalloproteinase 3 Gene Expression in Normal, but not Osteoarthritic, Human Articular Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 43:2091-2099.
- Nwosu, L. N., Mapp, P. I., Chapman, V., Walsh, D. A. (2015). Blocking the Tropomyosin Receptor Kinase A (TrkA) Receptor Inhibits Pain Behaviour in two Rat Models of Osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Disease*, doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207203 [2015-11-16].
- O'Hara, B. P., Urban, J. P. G. & Maroudas, A. (1990). Influence of Cyclic Loading on the Nutrition of Articular Cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 49:536-539.
- Otten, U., Rüegg, U. T., Hill, R.C., Businger, F. & Peck, M. (1982). Correlation Between Substance P Content of Primary Sensory Neurons and Pain Sensitivity in Rats Exposed to Antibodies to Nerve Growth Factor. *European Journal of Pharmacology*, 85:351-353.
- Palmer, J. L. & Bertone, A. L. (1994). Joint Structure, Biochemistry and Biochemical Disequilibrium in Synovitis and Equine Joint Disease. *Equine Veterinary Journal*, 26:263-277.
- Peham, C., Licka, T., Girtler, D. & Scheidl, M. (2001). Hindlimb Lameness: Clinical Judgement Versus Computerised Symmetry Measurement. *Veterinary Record*, 148:750-752.

- Penell, J. C., Egenwall, 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.
- Perrot, S. (2015). Osteoarthritis Pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 29:90-07.
- Pulai, J. I., Chen, H., Im, H-J., Kumar, S., Hanning, C., Hedge, P. S. & Loeser, R. F. (2005). NF- κ B Mediates the Stimulation of Cytokine and Chemokine Expression by Human Articular Chondrocytes in Response to Fibronectin Fragments. *The Journal of Immunology*, 2005:174, 5781-5788.
- Raychaudhuri, S. P. & Raychaudhuri, S. K. (2009). The Regulatory Role of Nerve Growth Factor and its Receptor System in Fibroblast-like Synovial Cells. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 38:207-215.
- Rhodin, M., Pfau, T., Roepstorff, L. & Egenwall, A. (2013). Effect of Lungeing on Head and Pelvic Movement Asymmetry on Horses with Induced Lameness. *The Veterinary Journal*, 198:e39-e45.
- Rogerson, F. M., Chung, Y. M., Deutscher, M. E., Last, K. & Fosang, A. J. (2010). Cytokine-Induced Increases in ADAMTS-4 Messenger RNA Expression do not Lead to Increased Aggrecanase Activity in ADAMTS-5-Deficient Mice. *Arthritis & Rheumatism*, 62:3365-3373.
- Rosenberg, L. C. & Buckwalter, J. A. (1986). Cartilage Proteoglycans. *Articular Cartilage Biochemistry*, 39-54.
- Shi, X., Guo, T. Z., Wei, T., Li, W. W., Clark, D. J. & Kingery, W. S. (2015). Facilitated Spinal Neuropeptide Signaling and Upregulated Inflammatory Mediator Expression Contribute to Postfracture Nociceptive Sensitization. *Pain*, 156:1852-1863.
- Shibakawa, A., Yudoh, K., Masuko, Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K. & Nakamura, M. D. (2005). The Role of Subchondral Bone Resorption Pits in Osteoarthritis: MMP Production by Cells Derived from Bone Marrow. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13:679-687.
- Skaper, S. D. (2001). Nerve Growth Factor a Neurokine Orchestrating Neuroimmune-Endocrine Functions. *Molecular Neurobiology*, 24:183-199.
- Song, R-H., Tortorella, M. D., Malfait, A-M, Alston, J. T., Yang, Z., Arner, E. C. & Griggs, D. W. (2006). Aggrecan Degradation in Human Articular Cartilage Explants Is Mediated by Both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis & Rheumatism*, 56:575-585.
- Suri, S., Gill, S. E., Massena de Camin, S., Wilson, D., McWilliams, D. F. & Walsh, D. A. (2007). Neurovascular Invasion at the Osteochondral Junction and in Osteophytes in Osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66:1423-1428.
- Tetsunaga, T., Nishida, K., Furumatsu, T., Naruse, K., Hirohata, S., Yoshida, A., Saito, T. & Ozaki, T. (2010). Regulation of Mechanical Stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 Expression by RUNX-2 Transcriptional Factor in SW1353 Chondrocyte-like Cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19:222-232.
- Torzilli, P. A., Bhargavi, M., Park, S. and Chen C. T. C. (2009). Mechanical Load Inhibits IL-1 Induced Matrix Degradation in Articular Cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18:97-105.
- Vachon, A. M., Keeley, F. W., McIlwraith, C. W. & Chapman, P. (1990). Biochemical Analysis of Normal Articular Cartilage. *American Journal of Veterinary Research*, 51:1905-1911.
- Yang, S., Kim, J., Ryu, J-H., Oh, H., Chun, C-H., Kim, B. J., Min, B. H. & Chun, J-S. (2010). Hypoxia-inducible Factor-2 α is a Catabolic Regulator of Osteoarthritic Cartilage Destruction. *Nature Medicine*, 16:687-694.
- Zack, M. D., Arner, E. C., Angling, C. P., Alston, J. T., Malfait, A-M. & Tortorella, M. D. (2006). Identification of Fibronectin Neopeptides Present in Human Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 54:2912-2922.