



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsovetenskap (BVF)

# Intraartikulär behandling med hyaluronan vid osteoartrit hos häst

*Matilda Axelsson*

*Uppsala  
2016*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2016:7*



# Intraartikulär behandling med hyaluronan vid osteoartrit hos häst

## Intra-articular treatment with hyaluronan of osteoarthritis in horses

*Matilda Axelsson*

**Handledare:** Johan Gabrielsson, SLU, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

**Biträdande handledare:** Helena Back, Läkemedelsverket

**Examinator:** Eva Tydén, SLU, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grund nivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2016

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2016:7

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

**Nyckelord:** hyaluronan, häst, osteoartrit, behandling, studiedesign

**Key words:** hyaluronan, horse, osteoarthritis, treatment, study design

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning .....	3
Material och metoder .....	4
Litteraturoversikt.....	4
Synovialledens uppbyggnad .....	4
Molekylär struktur och funktion på endogen hyaluronan.....	5
Osteoartrit .....	5
Patofysiologi .....	5
Behandlingsalternativ .....	6
Intraartikulär behandling med hyaluronan.....	7
Indikationer .....	7
Biverkningar .....	7
<i>In vitro</i> -studier av verkningsmekanismen.....	8
Humana <i>in vivo</i> -studier .....	9
Ekvina <i>in vivo</i> -studier .....	11
Diskussion.....	12
Studier av hyaluronans kliniska effekter.....	12
Felkällor .....	13
Biverkningsprofil .....	15
Slutsats .....	15
Litteraturförteckning .....	16



## SAMMANFATTNING

Osteoartrit är en vanligt förekommande degenerativ ledsjukdom hos häst som kan behandlas på flera olika sätt. Det är viktigt att de behandlingsmetoder som används är väl fungerande och baseras på god vetenskaplig praxis. Intraartikulär injektion med hyaluronan är en vedertagen behandlingsmetod vid osteoartrit som har använts i cirka 40 år inom både human- och veterinärmedicin. Många studier av hyaluronans effekt indikerar att behandlingen har broskskyddande effekt *in vitro*, samt ger ökad rörlighet och smärtreduktion *in vivo*. Sambandet mellan *in vitro*-effekter och kliniska effekter *in vivo* efter intraartikulär behandling är inte helt klarlagd. Författare till flera kritiska översiktsartiklar anser att den kliniska nyttan av behandlingen är överskattad. De studier som fått kritik saknar ofta kontrollgrupper, har alternativ medicinering som jämförelse, eller brister med avseende på den histopatologiska utvärderingen *etc.*

Den här litteraturstudien syftar till att beskriva vad som finns utrett om hyaluronans verkningsmekanism och kliniska effekt kopplade till ett resonemang kring fördelarna med intraartikulär behandling. Dessutom syftar studien till att belysa brister i försöksdesign och analys. En intressant fråga är vad som ligger till grund för den spridda användningen av hyaluronan. Kan det vara tradition snarare än vetenskapliga fakta?

Även om verkningsmekanismen inte är helt utredd, indikerar flera studier och klinisk erfarenhet på en god effekt. *In vitro*-studier indikerar att behandling med hyaluronan har både farmakologisk och mekanisk verkan. Genom inbindning till CD44-receptorer sker en minskad produktion av IL-1 $\beta$ , som i sin tur leder till en ökad produktion av GAG, minskad apoptos och ökad proliferation av kondrocyter samt minskade nivåer av matrixnedbrytande enzymer och fria syreradikaler. Den mekaniska effekten kommer av en minskad friktion tack vare ökad viskositet på ledvätskan. I kliniska studier på både häst och människa har behandlingen medfört reducerad smärta och ökad rörlighet. Studierna har en del brister i form av exempelvis avsaknad av kontrollgrupp, frånvaro av radiologiska/histopatologiska undersökningar samt att patienterna haft tillgång till andra läkemedel samtidigt, vilket gör det svårare att utvärdera behandlingens effektivitet samt försvårar kopplingen mellan *in vivo* och *in vitro*. På grund av detta är det motiverat med bättre designade studier för att ta reda på vilka verkningsmekanismer som ger klinisk effekt, samt hur stor den kliniska effekten är.

## SUMMARY

Osteoarthritis in horses is a commonly occurring degenerative joint disease, to which several treatment options are available and used in clinical praxis. Intra-articular injection with hyaluronan is an established treatment of osteoarthritis that has been used in both human and veterinary medicine for almost 40 years. Studies have suggested that hyaluronan can protect cartilage *in vitro* and increase mobility and reduce pain *in vivo*. The association between effects *in vitro* and clinical *in vivo* effects after intra-articular treatment is still unclear. The use of hyaluronan as a treatment of osteoarthritis has been questioned in several review articles, mainly due to poor study design where absence of control group or alternative treatment as comparison, or lack of histopathological evaluation are main issues.

The aims of this literature study are to describe the mechanisms and clinical effects of hyaluronan in *in vivo* and furthermore to assess its advantages in intra-articular treatment. In addition, the study seeks to illustrate deficits in study design and analysis. Why is hyaluronan such a widespread treatment of osteoarthritis?

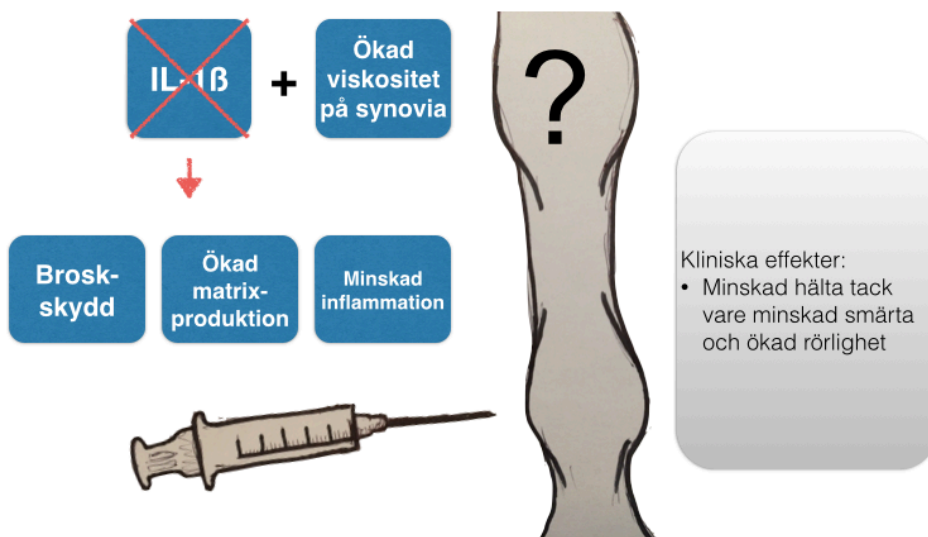
Although the mechanism and clinical relevance of intra-articular treatment of hyaluronan is unclear, several studies and clinical experience indicate a favourable effect. This is supported by results from *in vitro* studies where positive pharmacological and mechanical effects have been demonstrated. Hyaluronan interacts with CD44 receptors which leads to a decreased production of IL-1 $\beta$ . This increases the production of GAG, decreases apoptosis and increases proliferation of chondrocytes and also decreases levels of matrix degrading enzymes and free oxygen radicals. The mechanical effect is related to an increased viscosity of the synovial fluid. In clinical trials, treatment with hyaluronan has been demonstrated to reduce pain and increase mobility in both horses and humans with osteoarthritis. However, these studies have several flaws, for example simultaneous treatment with other medicinal products or absence of a control group, which makes it more difficult to evaluate the treatment and associate the effects *in vitro* and *in vivo*. Taken together, intra-articular treatment of hyaluronan appears to be more favourable than placebo, but further studies are enquired to determine which mechanism of hyaluronan that is associated to the therapeutic effect.



## INLEDNING

Osteoartrit är ett stort problem hos häst och en majoritet av de hältor som förekommer på häst anses orsakas av ledsjukdomar (Information från LMV supplement 1:2010b). Det är därför viktigt att de behandlingsmetoder som används är väl fungerande och baseras på god vetenskaplig praxis. Intraartikulär injektion med hyaluronan är ett vanligt val av behandling vid osteoartrit hos både häst och människa. Behandlingen har använts i cirka 40 år inom både human- och veterinärmedicin och den första rapporten om användning på häst publicerades 1976 (Kirwan, 2001; Information från LMV supplement 1:2010b).

Trots att många studier gjorts om effekterna av hyaluronan är verkningsmekanismen fortfarande inte helt klarlagd. Klinisk erfarenhet talar för en god effekt av intraartikulär injektion med hyaluronan, men det är fortfarande inte utrett vilka av de effekter man sett i *in vitro*-studier som har klinisk betydelse (Information från LMV supplement 1:2010b; Altman *et al.*, 2015) (se figur 1). En hel del av studierna har dessutom brister, som exempelvis frånvaro av kontrollgrupp och avsaknad av utvärdering av patologiska förändringar i leden (Richardson & Loinaz, 2007).



Figur 1. Schematisk bild över hyaluronans hypotetiska verkningsmekanism.

De preparat med hyaluronan som finns registrerade på häst i Sverige idag är *Hy-50 Vet.*<sup>®</sup>, *Hylartil*<sup>®</sup> *vet.*, *Hyonate*<sup>®</sup> *vet.* och *Synvet.*<sup>®</sup> Alla dessa är godkända för intraartikulär behandling av aseptisk ledinflammation. *Hy-50*<sup>®</sup> *Vet.* och *Hyonate*<sup>®</sup> *vet.* kan förutom intraartikulär injektion även administreras intravenöst. *Hylartil*<sup>®</sup> *vet.* har även indikation för användning vid senskador (Fass Djurläkemedel, 2015).

Den här litteraturstudien syftar till att beskriva vad som finns utrett om hyaluronans verkningsmekanism och kliniska effekt kopplade till ett resonemang kring fördelarna med intraartikulär behandling. Dessutom syftar studien till att belysa brister i försöksdesign och analys. En intressant fråga är vad som ligger till grund för den spridda användningen av hyaluronan. Kan det vara tradition snarare än vetenskapliga fakta?

## MATERIAL OCH METODER

De artiklar den här litteraturstudien baseras på har hämtats från databaserna Pubmed, Scopus, Google Scholar och Web of Science med hjälp av dessa sökord som använts i olika kombinationer:

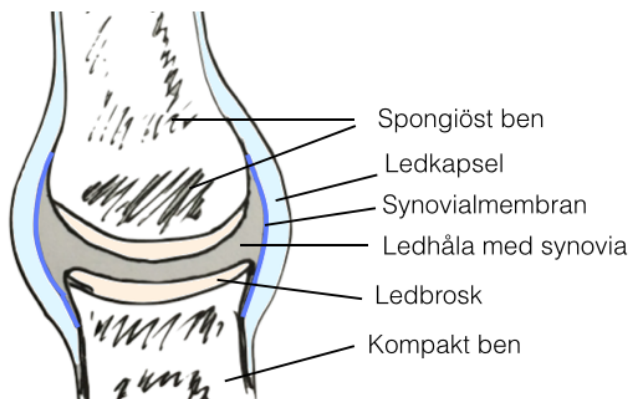
- "hyaluronic acid" OR hyaluronan OR hylan OR hyaluronsyra OR hyaluronate
- osteoarthritis OR osteoartrit\* OR arthritis OR "joint disease"
- equine\* OR horse\*
- intra-articular\*
- effect\*, treatment, "clinical trial"

Referenser till de artiklar som hittats vid litteratursökningen har också använts. Många av de kliniska studier som gjorts gick ej att få tag på och då uteslöts dessa från litteraturstudien, med några få undantag där artiklarna beställdes via SLU:s bibliotek.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Synovialledens uppbyggnad

Synovialleder kännetecknas av att de möjliggör rörelse mellan minst två ben (se figur 2). Utrymmet mellan benen är fyllt med ledvätska som kallas synovia, och det hela omsluts av en ledkapsel. Ledkapseln består av det yttre *stratum fibrosum*, som är rikligt vaskulariserat och ibland innefattar ligament som stabiliserar leden ytterligare, samt det mycket tunna inre synovialmembranet, *stratum synoviale*, som endast är ett par cellager tunt (Zachary & McGavin, 2012; König & Liebich, 2014). De celler man hittar i synovialmembranet är olika typer av synoviocyter: typ A som fagocyterar, typ B som producerar och utsöndrar komponenter till synovialvätskan samt typ C-synoviocyter som är en blandning mellan typ A och typ B (Ekman, 2010; Zachary & McGavin, 2012). Synovialvätskan är ett ultrafiltrat från plasma och finns i leden av flera anledningar (van Weeren & de Grauw, 2010). Dels ska den minska friktionen mellan ledbrösk, dels står den för transport av syre, näring, koldioxid och metaboliska avfallsprodukter till och från ledbrösk. Ledvätskan består av hyaluronan, glukoproteiner samt olika enzymer (Zachary & McGavin, 2012).



Figur 2. Schematisk bild av synovialledens uppbyggnad (Anpassad från Sjaastad et al., 2010).

På benets epifyser sitter ledbrösk. Det utgörs av hyalint brosk som fäster till ett tunt lager av subkondralt ben (König & Liebich, 2014). Brosk saknar kärl och nerver och får därför sin

näring och syre från synovialvätskan och de kärl som finns i perikondriet samt i det subkondrala benet. Största delen av brosket består av vatten, men det innehåller även kondrocyter, kollagen typ 2, proteiner och proteoglukan-aggregat. Proteoglukaner utgörs av glukosaminoglukaner (GAG) som binder proteinkärnor, som i sin tur sitter samman med den stora GAG:en hyaluronan. GAG är polysulfaterade (med undantag från hyaluronan) och får därför en negativ laddning som gör att brosket binder till vatten och blir elastiskt. En viktig proteoglukan är aggrecan. Kollagenet är den komponent av extracellulära matrix som ger brosket sin draghållfasthet (Zachary & McGavin, 2012).

De få celler som finns i brosket är kondrocyter. De producerar beståndsdelarna till broskets extracellulära matrix. Produktionen regleras av nedbrytande enzymer i form av matrixmetalloproteaser som innefattar bland annat kollagenaser (Zachary & McGavin, 2012). Vid obalans mellan produktion och nedbrytning av brosket uppstår skador (Ekman, 2010). Brosket har dålig regenerationsförmåga vid skada. Vid broskulcerationer kan fibröst brosk bildas och ersätta det hyalina brosket (Zachary & McGavin, 2012).

### ***Molekylär struktur och funktion på endogen hyaluronan***

Hyaluronan finns naturligt både i ledbroskets extracellulära matrix och synovialvätskan. Molekylen har strukturen av en stor GAG som är uppbyggd av upprepade disackarider: D-glukuronsyra och N-acetylglykosamin (Caron, 2005). Hyaluronan ser i princip likadan ut hos alla djurarter. I ledbrosket ger endogen hyaluronan elasticitet genom att bilda proteoglukan-aggregat (Caron, 2005; Information från LMV supplement 1:2010b). Elasticiteten som uppstår tack vare hyaluronan gör att brosket blir hållfast mot hårda stötar som uppkommer vid rörelse. Det är kondrocyterna som producerar molekylen i brosket, medan typ B-synoviocyterna står för hyaluronanproduktionen till ledvätskan. Synovialvätskans viskositet beror på mängden hyaluronan. Ökad viskositet leder till minskad friktion samt bättre stötdämpande förmåga (Dougados, 2000; Williams, 2007).

## **Osteoartrit**

### ***Patofysiologi***

Osteoartrit är en degenerativ ledsjukdom som inte involverar infektiösa agens (aseptisk artrit) (Zachary & McGavin, 2012). Degenerativa ledsjukdomar beror på obalans mellan syntes och nedbrytning av broskets extracellulära matrix (Ekman, 2010). Hos häst är hög och frekvent belastning av leden en mycket viktig orsak till utvecklingen av osteoartrit, även om det finns andra predisponerande faktorer som också har betydelse, som exempelvis osteokondros (van Weeren & de Grauw, 2010; Zachary & McGavin, 2012). Skadorna kan uppstå antingen vid för stor belastning av normalt ledbrosk eller normal belastning på defekt ledbrosk (Dougados, 2000).

En led som drabbas av osteoartrit kan genomgå omfattande patologiska förändringar (se figur 3). Först sker en förlust av proteoglukaner i brosket på grund av ökat vatteninnehåll. Detta leder till att brosket blir mjukt och att de kollagena fibrerna tappar sin organisation. I och med att brosket förlorar sin hårda konsistens utsätts det för onormalt slitage och den stötdämpande förmågan försämras. En broskerosion uppstår och det sker en nedbrytning av kollagenfibrerna, så kallad fibrillering (Zachary & McGavin, 2012). Även kondrocyterna påverkas av den

förhöjda belastningen och ökar sin produktion av proinflammatoriska cytokiner (framför allt IL-1 $\beta$ ) och matrixmetalloproteaser, vilket leder till inflammation och ökad nedbrytning av broskmatrix. Kondrocyterna får även försämrade anabol funktion och kan därmed inte bygga upp de komponenter som i högre grad bryts ner, vilket leder till en störd homeostas och innebär att kondrocyterna degenererar eller går i nekros. Dock kan en del av broskcellerna istället genomgå hyperplasi och bilda kluster, men dessa saknar funktion (Ekman, 2010; Zachary & McGavin, 2012).



Figur 3. Sammanfattande bild av patofysiologin vid osteoartrit.

Ledbrosket är inte den enda strukturen som drabbas vid osteoartrit. Även ledkapseln påverkas av inflammationen och det uppstår en synovit. Redan vid tidig osteoartrit kan man se hypertrofi och hyperplasi av synovio-cyter samt infiltration av inflammatoriska celler i ledkapseln (Ekman, 2010). Det sker en ökad nedbrytning av GAG i ledvätskan vilket tillsammans med en ökad filtration från blodet leder till att synovialvätskan tappar sin viskositet (Zachary & McGavin, 2012). På människa har man kunnat se att koncentrationerna av endogen hyaluronan i synovia sjunker vid osteoartrit (Altman *et al.*, 2015). Dessa fynd har dock ej gjorts på häst (Williams, 2007). I takt med att ledbrosket blir tunnare och förlorar sin stötdämpande förmåga får man skleros, det vill säga en förtjockning, av det subkondralt benet. Det förekommer även mikrofrakturer och osteofyter (Ekman, 2010). Eftersom ledbrosket saknar nerver uppkommer smärta vid osteoartrit först när man får en påverkan av ledkapseln och/eller det subkondralt benet. Därför kan förändringar i ledbrosket ses utan att hästen visar tecken på hälta (van Weeren & de Grauw, 2010).

### **Behandlingsalternativ**

En viktig del i rehabiliteringsprocessen vid osteoartrit, förutom farmakologisk behandling, är tillräcklig vila från hårdare fysiskt arbete (Information från LMV supplement 1:2010b). Förutom hyaluronan, som denna litteraturstudie fokuserar på, finns en rad olika behandlingsalternativ.

Den vanligaste behandlingen vid osteoartrit är intraartikulär injektion med glukokortikoider. Glukokortikoider hämmar inflammation genom att bland annat inhibera produktionen av proinflammatoriska cytokiner, hämma arakidonsyra-metabolismen vilket leder till minskad produktion av prostaglandiner, samt öka produktionen och frisättningen av bland annat annexin som är en antiinflammatorisk cytokin (Schaefer *et al.*, 2009; Ingvast-Larsson, 2010). Det är vanligt att man kombinerar glukokortikoider med hyaluronan, även om få kliniska studier gjorts inom området (de Grauw *et al.*, 2015). Det finns dock *in vitro*-studier som visar på en ökad syntes av GAG vid exponering av kombinationen för IL-1-påverkade kondrocyter och klinisk erfarenhet talar för en god effekt (Yates *et al.*, 2006; Schaefer *et al.*, 2009; Information från LMV supplement 1:2010b).

En annan behandling som används vid osteoartrit, framför allt för att lindra symtomen, är icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAID). NSAID verkar genom att hämma enzymet cyclooxygenas (COX) som är centralt för produktionen av prostaglandiner. Vid inhiberad prostaglandinsyntes minskar både inflammation och smärta. NSAID administreras framför allt per oralt och kan orsaka bieffekter, framför allt i gastrointestinalkanalerna (Wattle, 2010).

Polysulfaterade glukosaminoglukaner (PS-GAG) är en annan behandlingsmetod som tidigare användes i Sverige, men just nu marknadsförs inget sådant läkemedel till häst i landet. PS-GAG verkningsmekanism är ej helt klarlagd, men man har bland annat sett en ökad proteoglukansyntes vid intraartikulär injektion (Information från LMV supplement 1:2010b). Intraartikulär injektion med PS-GAG utgör viss ökad risk för infektion (Caron, 2005).

Ytterligare en möjlig intraartikulär behandlingsmetod vid osteoartrit är IRAP, som står för interleukin-1-receptorantagonistprotein. Detta är en relativt ny metod där det saknas kliniska studier på häst. Metoden går ut på att man utvinnet så kallat autologt konditionerat serum från hästens blod. Syftet är att hämma IL-1 och på sådant sätt minska inflammation och smärta (Ljungvall, 2010).

## **Intraartikulär behandling med hyaluronan**

### ***Indikationer***

Vid degenerativa ledsjukdomar på häst är hyaluronan indicerat vid akut synovit och vid tidig aseptisk artrit. Effekten misstänks vara bättre i ett tidigt stadium av sjukdomen, innan allvarligare degenerativa förändringar har skett (Caron, 2005; Information från LMV supplement 1:2010b). På människa används hyaluronan bland annat för att behandla osteoartrit i knäled, men även andra leder med degenerativa förändringar, exempelvis käkled (Dolvik, 2010; Gencer *et al.*, 2014).

### ***Biverkningar***

Det finns alltid risker förknippade med att ge intraartikulära injektioner. Det är därför viktigt att arbeta sterilt för att undvika att bakterier kommer in i injektionshållet. Om det ändå skulle hända kan bakterierna orsaka septisk artrit och i värsta fall sepsis (Caron, 2005). Enligt FASS Djurläkemedel (2015) är den biverkning som finns inrapporterad vid intraartikulär behandling med hyaluronan en lindrig, övergående svullnad vid injektionsstället och detta finns även beskrivet i en litteraturstudie av Altman *et al.* (2015). Hyaluronan är inte förknippad med

svårare biverkningar än något annat intraartikulärt preparat (Dolvik, 2010). En risk med hyaluronan är att det oftast krävs upprepade ledinjektioner, men det kan gälla även för andra preparat, som exempelvis glukokortikoider (Kirwan, 2001; Information från LMV supplement 1:2010b).

### ***In vitro-studier av verkningsmekanismen***

Trots att det finns många studier gjorda på effekterna av hyaluronan är verkningsmekanismen fortfarande inte helt utredd (Information från LMV supplement 1:2010b). Behandling med hyaluronan verkar fungera rent mekaniskt genom att öka viskositeten i ledvätskan, men den tycks också ha farmakologisk verkan i leden (Akmal *et al.*, 2005) (se tabell 1). De farmakologiska effekterna anses uppstå då hyaluronan binder till bland annat CD44-receptorer (CD44-R) som är glukoproteiner som finns på kondrocyternas cellyta (Akmal *et al.*, 2005; Altman *et al.*, 2015). Inbindning minskar uttrycket av IL-1 $\beta$  som är en viktig proinflammatorisk cytokin i osteoartritens sjukdomsförlopp. Lägre nivåer av IL-1 $\beta$  innebär minskad aktivitet av de matrixnedbrytande enzymerna vilket ger en broskskyddande effekt. Även den oxidativa stress som uppstår på grund av IL-1 $\beta$  har setts reduceras med hjälp av hyaluronan. Bindning till CD44-R har även visats minska nivåerna av prostaglandin E2 (PGE2) som tillsammans med minskad mängd reaktiva syreradikaler förhindrar apoptos av kondrocyter. En antiinflammatorisk verkan tycks även uppkomma genom sänkta nivåer av andra proinflammatoriska cytokiner, så som IL-8, IL-6 och TNF-alfa. Många studier har också påvisat ökad syntes av matrixkomponenterna proteoglukaner och glukosaminoglukaner (Altman *et al.*, 2015). I en studie av Smash and Gosh (1987) undersöktes typ B-synoviocyter från en led med osteoartrit med avseende på reaktion vid exponering av hyaluronan *in vitro*. Resultatet blev en ökning av den endogena produktionen av molekylen (Dougados, 2000). Det finns teorier om att exogen hyaluronan inkorporeras i broskmatrix i leden (Akmal *et al.*, 2005).

Tabell 1. Sammanställning av hyaluronans *in vitro*-effekter på ledbrosket

<i>In vitro</i> -effekter
Reduktion av fria syreradikaler
Ökad produktion av GAG
Ökad kondrocytproliferation
Minskad produktion av proinflammatoriska cytokiner
Minskad aktivitet av matrixmetalloproteaser
Minskad apoptos av kondrocyter

I en studie på friska bovina kondrocyter i ett medium med hyaluronan kunde sågs att kondrocyterna ökade sin matrixproduktion, samt visade ett högre DNA-innehåll, vilket indikerar ökad celledelning. Högsta DNA-innehållet uppträdde vid en koncentration på 0.1 mg hyaluronan/mL, jämfört med de högre koncentrationerna (1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL och 3.0 mg/mL) och kontrollen. DNA-innehållet sjönk med stigande hyaluronan-koncentrationer, dock var nivåerna fortfarande högre än i kontrollen. Det var även vid 0.1 mg/mL som GAG- och kollagenproduktionen var som högst. Mätningarna skedde nio och 14 dagar efter studiens start. Höjning av kollagenproduktionen uppmättes med hjälp av hydroproxylin. Även i detta fall var gruppen som exponerats för 0,1 mg/mL den som visade högst produktion. Vid histologisk

undersökning såg man ett ökat cellantal både vid hög (3.0 mg/mL) och framför allt låg (0.1 mg/mL) dos av hyaluronan. I kontrollgruppen sågs låg mitosaktivitet. Även histologiskt påvisades ökat matrixinnehåll i form av kollagen typ 2 och chondroinsulfat (indikerar ökning av GAG) hos kondrocyterna med de lägre hyaluronan-koncentrationerna (Akmal *et al.*, 2005).

I övrigt innebär intraartikulär behandling med hyaluronan att leden smörjs så att friktionen minskar, samt att leden får förbättrad stötdämpande förmåga vilket skyddar brosket från mekanisk skada (Altman *et al.*, 2015). I en *in vitro*-studie kunde sågs att hyaluronan interagerar med makromolekylen lubricin som också finns i leden och att det på sådant sätt uppkommer en smörjande effekt. Dock såg man också att denna effekt inte är specifik för just hyaluronan, eftersom man kunde byta ut molekylen mot dextran och ändå få samma effekt, om än inte lika stark (Bonnevie *et al.*, 2015).

Det finns även ekvina *in vitro*-studier. I en studie undersöktes effekterna av hyaluronan hos kondrocyter från häst som exponerats för IL-1 för att likna en inflammation. En koncentration på 2 mg hyaluronan/mL ökade syntesen och den totala mängden GAG hos kondrocyterna jämfört med kontrollgruppen. Ingen ökning av kollagen eller aggrecan, som är en viktig proteoglukan, detekterades. Histologiskt kunde sågs dock ökad infärgning av proteoglukaner. Det skedde heller ingen påverkan av COX-2. I samma studie tittade man även på effekten av behandling med en kombination av en glukokortikoid och hyaluronan. Där skedde också en ökning av GAG, men där kunde ingen synergistisk effekt mellan läkemedlen påvisas (Schaefer *et al.*, 2009). I en liknande studie gjord några år tidigare tittade man också på behandling med hyaluronan, glukokortikoider och en kombination av dessa hos kondrocyter från häst som exponerats för IL-1. Även här visades att behandling med hyaluronan ökade innehållet av GAG, men inte påverkade proteoglukansyntesen. Kombinationen av hyaluronan och glukokortikoider ledde däremot till ökat proteoglukan-innehåll (Yates *et al.*, 2006).

I en studie där man exponerade synovialceller för lipopolysackarider (LPS) såg man att de celler som behandlades med hyaluronan sänkte produktionen av både proinflammatoriska cytokiner och proteaser (Information från LMV supplement 1:2010b).

### **Humana in vivo-studier**

Intraartikulär behandling med hyaluronan vid osteoartrit hos människa i exempelvis knäled syftar till att minska smärta och ge ökad rörlighet och funktion i den drabbade leden (Akmal *et al.*, 2005; Dolvik, 2010) (se tabell 2). Även om man sett effekter av hyaluronan *in vitro* är det svårt att veta vilka av dessa effekter som har klinisk betydelse (Altman *et al.*, 2015). Studier har visat att tidig behandling har bättre effekt än när ledlesionerna försvårats (Caron, 2005).

Tabell 2. Sammanställning av hyaluronans effekter *in vivo* på häst och människa

Ekvina <i>in vivo</i> -effekter	Humana <i>in vivo</i> -effekter
Minskad hälta	Minskad smärta i vila
Minskad fibrillering av ledbrosk	Minskad smärta i rörelse
Förtjockat ledbrosk	Ökad rörlighet
Förbättrad kvalitet på synovialvätska	Minskad volym synovialvätska

I en kohortstudie gjord i Canada på människor med osteoartrit i en eller båda knälederna sågs en förbättring efter två intraartikulära behandlingar med hyaluronan, både av smärta vid vila samt efter en promenad på sex minuter i jämförelse med kontrollgruppen. Även en ökad rörlighet sågs i sex-minuterstestet vid behandling med hyaluronan (+114,9m vilket är en förbättring med 37%), men denna ökade rörlighet var nästan lika stor i kontrollgruppen (+90,8m vilket motsvarar en ökning med 27%). Ingen av grupperna uppnådde normal rörlighet. Eftersom det var en kohortstudie av tidigare fall är studien inte blindad och kontrollgruppen som behandlingsgruppen jämfördes med kan ha blivit behandlad med smärtstillande, dock ej intraartikulärt. Även gruppen som behandlades med hyaluronan kan ha tagit andra läkemedel (ej intraartikulärt), men på detta finns inga data. De flesta som deltog i studien var kraftigt överviktiga (Petrella & Wakeford, 2015).

En studie jämförde en grupp som behandlats intraartikulärt med hyaluronan med en placebo-behandlad kontrollgrupp som även den blivit injicerad intraartikulärt. Avsikten var att göra studien dubbelblindad, men eftersom injektionsvätskorna hade olika viskositet var det inget man kunde garantera. Injektion gavs en gång i veckan under tre veckor. Patienterna undersöktes kontinuerligt av samma läkare: en gång i veckan de fyra första veckorna, en gång efter sju veckor från det att försöket startade och till sist efter ett år. De fick berätta om sin smärta och testa sin rörlighet. Synovialvätskan från leden aspirerades för att visa tecken på inflammation samt kontrollerade man vilka andra intraartikulära behandlingar som gjorts mellan sista hyaluronanbehandlingen och den sista undersökningen. Efter sju veckor såg man reducerad smärta både i vila och rörelse, ökad rörlighet samt minskad volym synovialvätska i den drabbade leden hos gruppen som behandlats med hyaluronan. Ett år efter studiens början sågs fortfarande ökad rörlighet i behandlingsgruppen i jämförelse med kontrollgruppen (Dougados *et al.*, 1993).

I en studie undersöktes långtidseffekterna av intraartikulär hyaluronanbehandling. Där fick patienter med osteoartrit upprepade injektioner i knäleden under en period av sammanlagt 40 månader. Under behandlingsperioden tilläts patienterna ta receptfria, smärtstillande läkemedel, dock inte åtta dagarna innan varje utvärdering. Studien var dubbelblindad och hade en parallell placebo-behandlad grupp som kontroll. Efter 40 månader hade 22% fler i hyaluronangruppen jämfört med kontrollgruppen blivit bättre enligt studiens kriterier för förbättring som bland annat innefattade minskad smärta och ökad rörlighet. Kontrollgruppen låg på samma nivå av förbättring under hela försöket, medan de som behandlades med hyaluronan först låg på ungefär samma nivå som placebogruppen för att successivt bli bättre under studieperioden. Man tog ej hänsyn till eventuella radiologiska eller patologiska förändringar i leden (Navarro-Sarabia *et al.*, 2011).

Osteoartrit kan förekomma i andra leder än knäleden på människa, exempelvis temporo-mandibularleden, det vill säga käkleden. Käkledsproblem kan leda till smärta vid rörelse, svårigheter att gäpa eller prata samt huvud- och nacksmärta *etc.* (Gencer *et al.*, 2014). I en studie av Gencer *et al.* (2014) jämförde man de intraartikulära behandlingarna: hyaluronan, betametason (glukokortikoid) och tenoxicam (NSAID) med en kontrollgrupp som fick placebo. I den här studien valde man ut personer med tidiga degenerativa förändringar till placebo-gruppen och de med allvarligare förändringar till behandlingsgrupperna. Studien var



randomiserad och dubbelblindad. Patienterna fick berätta hur stor smärta de upplevde en vecka och sex veckor efter injektion. Behandlingsgruppen som fick hyaluronan visade på lägre smärta än de andra behandlingsgrupperna samt kontrollgruppen, speciellt vid sex veckor. Dock finns inga data på hur ont patienterna hade innan behandlingarna administrerades.

Hyaluronan har visats interagera med sträckkänsliga jonkanaler, minska deras aktivitet och på så vis bidra med analgetisk effekt. Det finns också teorier om att hyaluronan skulle binda till hyaluronan-receptorer och fria nervändar vilket skulle minska den upplevda smärtan (Altman *et al.*, 2015).

### **Ekvina in vivo-studier**

På häst sker behandling av osteoartrit för att minska inflammationen i leden, avstanna den ökade matrixdegenerationen av brosket samt minska smärtan i den drabbade leden (se tabell 2). Man tror att hyaluronan verkar smärtstillande genom att bland annat desensitera nociceptorerna och därmed reducera smärtsignaleringen (Caron, 2005).

En litteraturstudie av Caron (2005) tar upp kliniska studier som gjorts på häst, där man sett minskad hälta och ökad kvalitet av synovialvätskan i leden. Dessa studier har dock saknat information om blindning, kontrollgrupper *etc.* Flera andra studier som tas upp av samma författare visar på få eller helt uteblivna effekter av intraartikulär behandling med hyaluronan, men det påpekas också att brister i form av exempelvis för litet antal hästar förekommer i studierna.

Williams (2007) tar upp en studie av Auer *et al.* (1970) som har visat på minskad hälta, minskad fibrillering av ledbrosket och tjockare ledbrosk vid behandling med hyaluronan. Samma översiktsartikel nämner även en studie av Kawcak *et al.* (1997) som visat att intravenös administrering av hyaluronan med låg molekylvikt har minskat PGE2-nivåerna lokalt i leden.

I en studie som gjordes på 25 hästar med inducerad osteoartrit delade man in hästarna i fem behandlingsgrupper (placebo, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg hyaluronan) och undersökte dem en gång i veckan under fyra veckor efter behandling. Det gjordes både en klinisk utvärdering och mätningar på en tryckplatta för mer objektiv bedömning. I behandlingsgruppen som fick 20 respektive 40 mg hyaluronan blev alla hästar utom en ohalta inom första veckan och hästen som inte blev helt bra då visade ingen hälta vid undersökningen efter två veckor. Av de hästar som behandlades med 10 mg hyaluronan blev två stycken ohalta efter de fyra veckorna (Gingerich, 1981).

Hyaluronan har en halveringstid på cirka 96 h i normala hästleder, men det är oklart hur länge tillräcklig mängd finns kvar i leden för att ge en terapeutisk effekt (Williams, 2007).

## DISKUSSION

Den här litteraturstudien syftar till att beskriva hyaluronans verkningsmekanism och kliniska effekt kopplade till ett resonemang kring fördelarna med intraartikulär behandling. Dessutom syftar studien till att belysa brister i försöksdesign och analys. Vad ligger till grund för den spridda användningen av hyaluronan – tradition eller vetenskapliga fakta?

### Studier av hyaluronans kliniska effekter

Trots att många studier har gjorts för att studera effekterna av intraartikulär behandling med hyaluronan, både inom human- och veterinärmedicin, är verkningsmekanismerna inte klarlagda (Information från LMV supplement 1:2010b). En anledning till detta skulle kunna vara de brister som många av studierna har. Även om studierna i de flesta fall pekar på positiva kliniska effekter har man inte kunnat klargöra vilka av de effekter man sett *in vitro* som har klinisk betydelse (Altman *et al.*, 2015). I en studie där de vanligaste ledbehandlingarna vid osteoartrit på häst i USA undersöktes tillfrågades veterinärer om hur de gör när de väljer behandlingsmetod. En majoritet (39%) av veterinärerna ansåg att personlig erfarenhet var den absolut viktigaste parametern i valet av behandling medan 28% ansåg att vetenskapliga fakta om effektiviteten var viktigast (Ferris *et al.*, 2011). Detta pekar på att de behandlingsmetoder som används av veterinärer inte nödvändigtvis måste vara helt bevisade i sin effekt om subjektiv klinisk erfarenhet anser att behandlingen fungerar.

En översiktsartikel av Williams (2007) tar upp ett flertal *in vivo*-studier på häst som har påvisat klinisk effekt vid intraartikulär behandling med hyaluronan, men artikeln påpekar att ingen av dessa har haft kontrollgrupper. Studierna har inte heller tagit med viktiga parametrar som exempelvis radiologiska och histopatologiska förändringar av ledbrosket i utvärderingen. Sådan utvärdering saknas också i studien av Navarro-Sarabia *et al.* (2011) där effekterna av hyaluronan studerades under 40 månader på människor med osteoartrit i knäleden.

Tidiga kliniska studier som gjorts på häst har visat positiva resultat, men där är resultaten ej tillförlitliga på grund av avsaknad av beskrivning gällande randomisering och blindning, frånvaro av kontrollgrupp eller användandet av en positiv kontrollgrupp som behandlats med kortikosteroider (Richardson & Loinaz, 2007). Gingerich (1981) gjorde en studie på 25 hästar med inducerad osteoartrit med lovande resultat, men det framgår inte om studien är blindad. I studien av Dougados *et al.* (1993) där effekterna av behandling med hyaluronan på människa undersöktes under ett år fanns en period då patienterna fick tillgå andra intraartikulära behandlingsmetoder mellan utvärderingarna, vilket kan påverka resultatet.

Petrella & Wakeford (2015) gjorde en human kohortstudie i Canada som inte var blindad och kontrollgruppen som behandlingsgruppen jämfördes med kan ha blivit behandlad med smärtstillande, dock ej intraartikulärt. Även gruppen som behandlades med hyaluronan kan ha tagit andra läkemedel (ej intraartikulärt), men på detta finns inga data. De flesta som deltog i studien var kraftigt överviktiga och det är möjligt att en del av dessa under studiens gång kombinerat annan behandling med exempelvis ändrad kost och på sådant sätt gått ner i vikt, vilket skulle kunna påverka rörlighet och smärta.

Schaefer *et al.* (2009) påpekar att deras *in vitro*-studie med de ekvina kondrocyterna bland annat har bristen att den enda proinflammatoriska cytokin som inkluderades i försöket var IL-1, och

även om den är mycket viktig i sammanhanget är en riktig inflammation *in vivo* betydligt mer komplex, med många olika mediatorer inblandade.

Kirwan (2001) och Richardson & Loinaz (2007) påpekar att de resultat man fått i kliniska studier har liten effekt i jämförelse med kontrollgrupperna, eftersom placeboeffekten i det här fallet är stor och att det därför finns möjlighet att uppfattningen om hyaluronans effekt är något överskattad.

I studien av Gencer *et al.* (2014) jämförs olika intraartikulära behandlingar av käkleden på människa: hyaluronan, en glukokortikoid och en NSAID samt en kontrollgrupp. Patienterna utvärderas med avseende på smärta, men studien saknar baslinjedata, vilket gör det svårt att till fullo utvärdera nyttoeffekterna av behandlingen. Det närmsta man kommer är att jämföra med kontrollgruppen, men eftersom man inte vet hur stor placebo-effekten är, samt att den gruppen valdes ut med andra kriterier än behandlingsgrupperna, kan man fortfarande inte uttala sig om effekten av behandlingarna var för sig.

Enligt LäkeMedelsverkets behandlingsrekommendation vid aseptisk/traumatisk artrit på häst (2010b) ska intraartikulär behandling med hyaluronan ske en eller flera gånger vid behov. Behandlingstillfällena bör dessutom separeras med en till tre veckor. Hyaluronan har dock kort halveringstid, endast nio till 16 timmar vid intraartikulär injektion beroende på ledens storlek på häst. På humansidan injicerar man med kortare intervall än vid användning på häst, men det kan eventuellt finnas fördelar med att behandla även häst fler gånger och med kortare intervall (Dolvik, 2010). Dock finns andra studier på människa där kliniska effekter detekterats upp till ett halvår efter behandling, trots att halveringstiden är ”några dagar” (Altman *et al.*, 2015). Litteraturstudien av Dougados (2000) indikerar att även om den exogena hyaluronan-mängden har försvunnit från leden, kvarstår den terapeutiska effekten i upp till sex månader på människa. Man har sett att hyaluronan lämnat ledhålan helt efter fyra dagar och man har påvisat en del av hyaluronan i själva ledbrusket sex timmar efter behandling. Kliniskt har man sett en effekt långt senare vilket kan förklaras av att hyaluronan verkar stimulera matrixproduktion och inte bara verka smörjande (Akmal *et al.*, 2005). Fler studier behövs för att säkert kunna säga hur hyaluronan ska administreras för bästa effekt.

Många av de studier som påvisar goda effekter av hyaluronan har allvarliga brister i studiedesign, som exempelvis avsaknad av kontrollgrupp och blindning. Detta gör det svårare att utvärdera hur effektiv behandlingen är.

## Felkällor

Det finns flera faktorer som spelar roll när man gör en studie, förutom själva behandlingen. Detta kan göra det svårt att till fullo bevisa effekterna av behandlingen (se tabell 3). En viktig terapeutisk effekt som eftersträvas vid behandling av osteoartrit med hyaluronan är att minska smärtan. Smärta är en subjektiv upplevelse som uppfattas olika från individ till individ och kan te sig olika för samma individ i olika situationer (Sjaastad *et al.*, 2010). Det blir med andra ord svårt även vid studier på människa att uppskatta reduktionen av smärta i ett försök. När man sedan ska försöka göra den bedömningen på en häst som inte kan kommunicera på samma sätt som en människa blir det än mer komplicerat. Det handlar då istället om att bedöma en hälsa, vilket ofta görs med subjektiva metoder. Subjektiviteten kan delvis reduceras genom att en och

samma veterinär gör bedömningen på hästen både innan och efter behandling i en studie, men det blir också extra viktigt med dubbelblindade studier, för att inte veterinären omedvetet blir påverkad av placeboeffekten.

Tabell 3. Felkällor som förekommer i studierna

Felkällor	Exempel på studie
Ej blindad/dubbelblindad studie	Petrella & Wakeford (2015) Gingerich (1981)
Ej placebo-behandlad kontrollgrupp	Petrella & Wakeford (2015)
Radiologiska/histopatologiska undersökningar saknas/tas ej hänsyn till	Navarro-Sarabia <i>et al.</i> (2011)
Samtidig behandling med andra (exempelvis receptfria) läkemedel	Dougados <i>et al.</i> (1993)
Eventuell viktnedgång	Petrella & Wakeford (2015)
Saknar baslinjedata	Gencer <i>et al.</i> (2014)
Bedömning av hälta på häst är subjektivt	
Smärta är en subjektiv upplevelse	

I de studier som saknar placebo-behandlad kontrollgrupp är en möjlig förklaring att patienter av etiska skäl inte kan nekas behandling då de lider av en smärtsam sjukdom. Det är också möjligt att få skulle ställa upp på en studie om de visste att det finns en risk att de blir helt utan behandling. Avsaknaden av en kontrollgrupp innebär dock att behandlingseffekten inte kan utvärderas lika precist eftersom man inte vet hur stor placeboeffekten är i försöket.

Många av studierna på människa, bland annat den av Petrella & Wakeford (2015), har tillåtit medicinering med receptfria läkemedel under studiens gång, vilket också kan påverka resultaten. Här ligger förmodligen problemet i att om den behandling som studien undersöker inte ger tillräcklig smärtlindring är det svårt att hindra patienterna från att självmedicinera.

Williams (2007) tar upp att veterinärens uppfattning om huruvida behandling med hyaluronan är effektivt kan påverkas av vilken typ av häst som behandlas; prestationsnivå, hur allvarlig ledskadan är, antal påverkade leder, ytterligare behandlingar och djurägarens förväntningar.

Ett flertal studier saknar utvärdering både radiologiskt och histopatologiskt av hur leden påverkas inuti av behandling (Williams, 2007). Detta är faktorer som skulle kunna ge en bättre bild av vad som faktiskt händer i leden vid behandling och kanske förenkla kopplingen mellan effekter *in vitro* och *in vivo*.

En del av de brister som förekommer i studierna är svåra att undvika, men man bör ändå sträva efter att utforma så bra studier som möjligt. En möjlighet för att öka pålitligheten vore att exempelvis använda mer objektiva metoder vid håltbedömning, som man gjort i studien av Gingerich (1981), där man använt sig av en tryckplatta.

## Biverkningsprofil

Det finns alltid risker förknippade med att ge intraartikulära injektioner. Intraartikulär behandlingen med hyaluronan är en relativt säker behandlingsmetod som oftast inte medför allvarliga bieffekter (Dolvik, 2010). Många av de andra substanser som används vid behandling av osteoartrit har värre biverkningsprofiler. NSAID har rapporterats orsaka både ulcerationer i magtarm-kanalen, njurskador, CNS-symtom och lokala irritationer (Wattle, 2010). Långtidsbehandling av glukokortikoider leder till negativ feedback av kroppens endogena glukokortikoider från binjurebarken, samt nedreglerar immunförsvaret och anses kunna påverka ledbrösket negativt beroende på koncentration i leden. De systemiska effekterna undviks genom att ge glukokortikoiderna lokalt, men det finns ändå risk för negativa systemeffekter, som exempelvis atrofierad binjurebark vid långvarig behandling (Ingvast-Larsson, 2010).

## Slutsats

Den här litteraturstudien syftade till att beskriva vad som finns utrett om hyaluronans verkningsmekanism och kliniska effekt samt titta på vilka brister som förekommer i de kliniska studierna. Finns övervägande fördelar med behandling eller används hyaluronan framför allt på grund av tradition?

Hyaluronan är en vanlig behandlingsform vid osteoartrit hos både häst och människa. Även om verkningsmekanismen inte är helt utredd, indikerar flera studier och klinisk erfarenhet på en god effekt. *In vitro*-studier indikerar att behandling med hyaluronan har både farmakologisk och mekanisk verkan. Genom inbindning till CD44-receptorer sker en minskad produktion av IL-1 $\beta$ , som i sin tur leder till en ökad produktion av GAG, minskad apoptos och ökad proliferation av kondrocyter samt minskade nivåer av matrixnedbrytande enzymer och fria syreradikaler. Den mekaniska effekten kommer av en minskad friktion tack vare ökad viskositet på ledvätskan. I kliniska studier på både häst och människa har behandlingen medfört minskad smärta och ökad rörlighet. Studierna har en del brister i form av exempelvis avsaknad av kontrollgrupp, frånvaro av radiologiska/histopatologiska undersökningar samt att patienterna haft tillgång till andra läkemedel samtidigt, vilket gör det svårare att utvärdera behandlingens effektivitet samt försvårar kopplingen mellan *in vivo* och *in vitro*. På grund av detta är det motiverat med dubbelblindade studier som inkluderat utvärdering av patologiska förändringar i leden, för att ta reda på vilka verkningsmekanismer som ger klinisk effekt.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Altman, R.D., Manjoo, A., Fierlinger, A., Niazi, F. & Nicholls, M. (2015). The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskeletal disorders*, 16: 321.
- Akmal, M., Singh, A., Anand, A., Kesani, A., Aslam, N., Goodship, A. & Bentley, G. (2005). The effects of hyaluronic acid on articular kondrocytes. *The journal of bone & joint surgery* 87: 1143-1149.
- Bonnevie, E.D., Galesso, D., Secchieri, C., Cohen, I. & Bonassar, L.J.. (2015). Elastoviscous Transitions of articular cartilage reveal a mechanism of synergy between lubricin and hyaluronic acid. *Plos one*, 10 (11): e0143415. doi: 10.1371/journal.phone.0143415.
- Caron, J.P. (2005). Intra-articular injections for joint disease in horses. *Veterinary clinics Equine practice*, 21: 559-573.
- Dolvik, N.I., Läkemedelsverket. (2010). *Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - bakgrundsdokumentation: Behandling med hyaluronsyre ved aseptisk artritt hos hest.* (Information från LMV supplement 1:2010a).
- de Grauw, J.C., Visser-Meijer, M.C., Lashley, F., Meeus, P. & van Weeren, P.R. (2015). Intra-articular treatment with triamcinolone compares with tramcinolone with hyaluronate: A randomised open-label multicentre clinical trial in 80 lame horses. *Equine veterinary journal*, 48: 152-158.
- Dougados, M. (2000). Sodium hyaluronate therapy in osteoarthritis: arguments for a potential beneficial structural effect. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 30: 19-25.
- Dougados, M., Nguyen, M., Listrat, V. & Amor, B. (1993). High molecular weight sodium hyaluronate (hyalectin) in osteoarthritis of the knee: a 1 year placebo-controlled trial. *Osteoarthritis and cartilage*, 1: 97-103.
- Ekman, S., Läkemedelverket (2010). *Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - bakgrundsdokumentation: Den aseptiska artritens patofysiologi.* (Information från LMV supplement 1:2010a).
- LIF. (2012-08-31). *Fass Djurläkemedel: Hy50 Vet.*  
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=19980612000019> [2016-03-12]
- LIF. (2014-06-02). *Fass Djurläkemedel: Hylartil® vet.*  
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=19800509000024> [2016-03-12]
- LIF. (2014-07-03). *Fass Djurläkemedel: Synvet.*  
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20130710000121> [2016-03-12]
- LIF. (2015-04-09). *Fass Djurläkemedel: Hyonate® vet.*  
<http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=19921204000017> [2016-03-12]
- Ferris, D.J., Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W. & Kawcak, C.E. (2011). Current joint therapy usage in equine practice: A survey of veterinarians 2009. *Equine veterinary journal*, 43 (5): 530-535.
- Gencer, Z.K., Özkiris, M., Okur, Aylin., Korkmaz, M. & Saydam, L. (2014). A comparative study on the impact of intra-articular injections of hyaluronic acid, tenoxicam and betametazon on the relief of temporomandibular joint disorder complaints. *Journal of carnio-maxillo-facial surgery*, 42: 1117-1121.

- Gingerich, D.A. (1981). Effect of exogenous hyaluronic acid on joint function in experimentally induced equine osteoarthritis: dosage titration studies. *Research in veterinary science*, 30: 192-197.
- Ingvast-Larsson, C., Läkemedelsverket. (2010). *Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - bakgrundsdocumentation: Glukokortikoider, farmakologi*. (Information från LMV supplement 1:2010a).
- Kirwan, J. (2001). Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? *The knee*, 8: 93-101.
- König, H.E. & Liebich, H-G. (2014). Induction of general anatomy. I: *Veterinary Anatomy of domestic mammals. Textbook and colour atlas*. 6:e upplagan. Stuttgart. Schattauer, 17: 20-23.
- Ljungvall, K., Läkemedelsverket. (2010). *Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - bakgrundsdocumentation: Behandling av aseptiska ledinflammation med interleukin-1 receptorantagonistprotein, IRAP*. (Information från LMV supplement 1:2010a).
- Läkemedelsverket (2010). *Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - ny rekommendation*. (Information från LMV supplement 1:2010b).
- Navarro-Sarabia, F., Coronel, P., Collantes, E., Navarro, F.J., Rodriguez de la Serna, A., Naranjo, A., Gimeno, M. & Herrero-Beaumont, G. (2011). A 40-month multicentre, randomised placebo-controlled study to assess the efficacy and carry-over effect of repeated intra-articular injections of hyaluronic acid in knee osteoarthritis: the AMELIA project. *Annals of the rheumatic diseases*, 70: 1957-1962. doi: 10.1136/ard.2011.152017.
- Petrella, R.J. & Wakeford, C. (2015). Pain relief and improved physical function in knee osteoarthritis patients receiving ongoing hyaluronan G-F 20, a high-molecular-weight hyaluronan, versus other treatment options: data from a large real-world longitudinal cohort in Canada. *Drug design, development and therapy*, 9: 5633-5640. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S88473>.
- Richardson, D.W. & Loinaz, R. (2007). An evidence-based approach to selected joint therapies in horses. *Veterinary clinics Equine Practice*, 23: 443-460.
- Schaefer, E.C., Stewart, A.A., Durgam, S.S., Byron, C.R. & Stewart, M.C. (2009). Effects of sodium hyaluronate and triamcinolone acetonide on glucosaminoglycan metabolism in equine articular kondrocytes treated with interleukin-1. *American journal of veterinary research*, 70: 1494-1501.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2010). The senses & Bone tissue and mineral metabolism. I: *Physiology of domestic animals*. 2:a upplagan. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. 804 pp: 174 - 175, 268, fig. 7.8.
- van Weeren, P.R. & de Grauw, J.C. (2010). Pain in osteoarthritis. *Vet clin equine*, 26: 619-642
- Wattle, O., Läkemedelsverket. (2010). *Medicinsk ledbehandling vid aseptisk/traumatisk artrit hos häst - bakgrundsdocumentation: NSAID - effekt och säkerhet*. (Information från LMV supplement 1:2010a).
- Williams, S. (2007). Intraarticular hyaluronic acid supplementation in the horse: the role of molecular weight. *Journal of equine veterinary science*, 27: 298-303.
- Yates, A.C., Stewart, A.A., Byron C.R., Pondenis, H.C., Kaufmann, K.M. & Constable, P.D. (2006). Effects of sodium hyaluronate and methylprednisolone acetate on proteoglycan metabolism in equine articular kondrocytes treated with interleukin-1. *American journal of veterinary research*, 67: 1980-1986.

Zachary, J.F. & McGavin, M.D. Chapter 16: Bones, joints, tendons and ligaments. I: *Pathologic basis of veterinary disease*. 5:e upplagan. St. Louis, Missouri. Elsevier. 929-930, 933-937.