

Slutrapport för projekt 0447045

Detta projekt har fått fortsatt stöd av SLF (nr: H0547061).

I de årliga ansökningarna har jag kontinuerligt avrapporterat (bilaga årsrapport för 0447075) utvecklingen av detta projekt. Tyvärr har jag inte uppmärksammat att även en slutrapport skulle lämnas in i juni 2006 för de första 3 åren.

Jag ber om ursäkt för detta och lämnar härmed nedan redogörelse:

INFLAMMATIONSMARKÖRER VID TIDIG LEDSKADA HOS HÄST

Stina Ekman, professor, Inst. för Patologi, SLU, Box 7028, 750 07 Uppsala

Maija-Leena Eloranta, docent, Inst. för Immunologi, SLU, BMC, Uppsala

Kjell Hultenby, docent, Inst. för Patologi, KI., Huddinge.

Bakgrund

Vid leddskada (OA) uppträder alltid en inflammation i någon fas av processen. Denna kan vara sekundär till en destruktiv skada (osteoarthros) eller primär och som resultat ge en destruktion (osteoartrit) (Radin, 1995). Att kunna särskilja dessa två i en kroniskt skadad led är oftast omöjligt. När kliniska symtom med hälta, radiologiska förändringar med benscleros/osteofyter och patologiska förändringar med broskerosioner och subkondral nekros visar sig är det oftast omöjligt att avgöra vad som orsakade skadan.

För att bättre förstå mekanismerna bakom kroniska leddskador hos våra tävlings- och ridhästar måste vi förstå vad som startar den inflammatoriska processen. Om vi tidigt kan fånga upp en begynnande inflammation med hjälp av inflammationsmarkörer skulle vi kunna korrelera denna med tänkbara uppkomstmekanismer för OA. Eftersom brosket har dålig förmåga att läka är det också viktigt att upptäcka en begynnande inflammation innan vävnadsskada uppstår. Om vi får fram inflammationsmarkörer kan dessa kunskaper relateras till och utnyttjas för tidig behandling, anpassning av träningsdosen, uppföljning av olika behandlingar och konvalescensprogram.

Patofysiologi vid leddskada

Generellt kan olika stimuli påverka leden till uppbyggnad eller nedbrytning av sina vävnadskomponenter. Dessa olika stimuli påverkar broskcellerna i ledbrosket, synoviocyterna i ledkapseln och bencellerna i det subkondrala benet, så att balansen mellan anabola och katabola processer i brosk och benmatrix rubbas. Resultat kan bli att brosket bryts ned (broskerosioner) och benet byggs upp (benscleros). Detta är fallet i flera leddestruktiva sjukdomar såsom OA.

Exempel på mekanisk stimuli som påverkar vävnaden i leden är frekvent fysiologiskt tryck, trauma och ofysiologiskt upprepat tryck. Dessa olika stimuli kan i sin tur aktivera produktionen av inflammationscytokiner (IL-1, IL-6 och TNF- α), tillväxtfaktorer, "high mobility group box chromosomal protein-1" (HMGB-1) (Kokkola, 2003), och adhesionsmolekyler (t.ex integriner) som leder till fysiologiska eller patologiska cellreaktioner. Cellerna kan t.ex börja proliferera och producera andra cytokiner och inflammationsmediatorer, öka sin syntes av extracellulärt matrix och av brosknedbrytande enzymer. Cellerna kan migrera eller differentiera till en annan typ av bindvävscell, och slutligen kan även en celledöd ske. De ovan beskrivna stimuli interagerar och vid OA förekommer en blandning av dessa.

Inflammation vid leddskada

Principiellt startar en inflammation när stimuli aktiverar en cell att producera eller frisätta en kaskad av inflammationsmediatorer såsom histamin, serotonin, bradykinin, prostaglandiner,

leukotriener, PAF (platelet activating factor), komplementfaktorer, cytokiner, och proteolytiska faktorer.

Tillväxtfaktorer och cytokiner har påvisats i ledvätska från OA – leder. Cytokiner är lösliga peptider som produceras av synoviocyter, endothel celler och chondrocyter och påverkar andra cellers aktivitet. Denna påverkan kan ske endokrint och parakrint, men även autokrint. Cytokiner kan vara både anabola och katabola. Flera av de anabola cytokinerna går dock under benämningen tillväxtfaktorer såsom transforming growth factor beta (TGF β) och insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Vid OA förekommer både katabola cytokiner som IL-1, IL-6 och TNF-alfa, samt anabola tillväxtfaktorer som TGF- β och IGF-1.

En primär inflammation i ledkapseln kan starta en kaskad av processer till följd av frisättning av inflammationsmediatorer, metalloproteinaser, fria radikaler, kväveoxid (NO) och prostaglandiner. Alla dessa påverkar kondrocyterna och/eller broskmatrixkomponenterna.

När en primär metabolisk imbalance uppstår i ledbrösket till följd av ett trauma mot kondrocyten påbörjas också en kaskad av processer av både anabol och katabol karaktär. Nedbrytningen sker främst till följd av frisättning av olika proteinaser och prostaglandin E från kondrocyten, vilket ger en matrix degeneration med olika nedbrytningsprodukter. Dessa "wear particles" kan i sin tur starta en serie av cell-medierade reaktioner, såsom aktivering av synoviocyter, lymfocyter och monocyter i ledkapseln. Därefter uppstår en akut inflammation med flera proinflammatoriska cytokiner som IL-1, IL-6, TNF-alfa. Nedbrytningsprodukterna kan också reta till en ökad cell-syntes av prostaglandin E₂ och matrix metalloproteinaser (MMP:s). Inflammationskaskaden är nu igång.

Intressanta resultat avseende ledinflammation och kopplingen till den mekaniska stressen som ledbrösket utsätts för har redovisats (Fermor et al., 2001). *In vitro* undersökningar med dynamisk kompression av ledbrösk från gris visar att denna koppling kan härledas till en ökning av leukotriener via en ökning av kväveoxid (NO). En ökad produktion av andra inflammatoriska mediatorer vid dynamisk kompression, såsom prostaglandiner (E-gruppen), har också diskuterats, som en del i pathogenesen vid OA.

OA hos häst

Vid OA hos häst anses en inflammation av synovialmembranet (synovit) och/eller ledkapseln (kapsulit) nästan alltid förekomma primärt eller i anslutning till ledskada (McIlwraith, 1996). Det är därför ytterst viktigt att kartlägga den inflammatoriska processen hos häst. Den equina OA är vanligen inte åldersrelaterad, varierar mycket i orsak, utseende och kliniskt förlopp när det gäller olika leder. Ett försök till uppdelning av 3 olika typer av OA hos häst har gjorts, där typ 1 angivits förekomma tillsammans med synovit och kapsulit i leder såsom karpus, kotled, hasled och kron- och hovled, typ 2 ses oftast sekundärt till en klart identifierad skada såsom intra-artikulära frakturer, traumatisk skada av ledbrösk eller ligament i leden, osteokondritis dissecans, subkondrala bensador, subkondrala bencystor, septisk arthrit och fragmentering av distala patella. Typ 3, anses vara kliniskt oväsentliga icke-progressiva ledbröskerosioner, vilka kan ses i flera olika leder.

Oavsett hur man definierar OA hos häst bör man komma ihåg att en inflammation i leden, primär eller sekundär, alltid uppstår i någon grad och form.

Vid en traumatisk arthrit hos häst anses den mekaniska delen med ett ökat frekvent trauma spela en stor roll tillsammans med den tidiga inflammationen (synoviten/kapsuliten) där interleukin-1 (IL-1) föreslås ha en initial roll (Platt –Bayliss, 1994; Pelletier – Martel-Pelletier, 1989).

Aktivitet av IL-1 i serum och ledvätska från hästar med OA påvisades för 10 år sedan av Alwan och medarbetare (1991). Koncentrationerna av IL-1 i ledvätska var lika hög vid OA i kotled och karpalled hos häst som vid OA i knäled hos människa. Vi vill därför gå vidare med undersökningar avseende cytokin profilen vid olika typer av OA hos häst i ett väl definierat material. Vid den tidiga inflammationen i leden anses IL-1 degradera proteoglykaner via NO,

men hos häst stämmer ej detta, då endast en IL-1 styrd inhibering av proteoglykan syntesen är reglerad via NO, men ej degraderingen (Bird et al., 1997).

In vitro försök på kondrocyter från häst ledbrusk har visat att IL-1- och TNF- α -behandling av cellerna ger en ökad expression av MMP:s, men ej TIMP, vilket resulterar i en brosknedbrytning (Richrdson – Dodge, 2000). *In vitro* studier har visat att den anabola effekten som TGF- β framkallar, med en ökning av proteoglykansyntesen i equint ledbrusk, oavsett hästens ålder, tyvärr nedregleras av IL-1 (Iqbal et al., 2000).

Studier avseende aktiviteten av olika matrixmetalloproteinaser i ledvätska från hästar med OA har visat att den totala MMP:s aktiviten i ledvätska är högre vid OA i kotleden än i normal hasled eller i hasleder med osteokondros (Brama et al., 1998). En ökning av prostaglandin (PGE-2) i ledvätska från OA leder har också rapporterats från häst (May et al., 1989). Det rapporterades även en positiv korrelation med håltgraden och ökade prostaglandinnivåer hos dessa hästar.

Material & Metoder och Resultat

Analys av cytokinerna IL-6 och TNF- α i ledvätska hos hästar

Hittills har vi satt upp två bioassayer för mätning av de proinflammatoriska cytokinerna IL-6 och TNF- α i ledvätska hos häst. Bioassayen för IL-6 baseras på en murin hybridom cellinje B9 som är beroende av IL-6 för sin överlevnad och proliferation. För mätning av TNF- α har vi använt en murin fibroblast cellinje L929, som är känslig för den cytotoxiska effekten av TNF- α . Båda dessa murina cellinjer har tidigare rapporterats vara känsliga för icke-artspecifikt IL-6 resp TNF- α , bland annat humant, porcint och häst. Som standard för kvantifiering av cytokinerna har vi använt kommersiella preparationer av humant IL-6 och TNF- α . Vi har även testat porcint IL-6 och funnit det likvärdigt den humana motsvarigheten. För avläsning av cellproliferation resp. cytotoxicitet i cellkulturerna efter tillsats av prov eller standard har ett icke-radioaktivt test (EZ4U, Biomedica) använts. Testet bygger på att levande celler kan reducera EZ4U-reagenset, bestående av ett tetrazolium salt, till en formazan derivat vilket ger ett färgomslag i mediet som kan läsas av i en spektrofotometer. Fördelen med detta test är att det kan användas för avläsning av både IL-6 och TNF- α bioassayer.

En ELISA för equine TNF-alfa har också satts upp och utvärderats (Ley et al., 2007).

Vi analyserat 51 ledvätskeprover aspirerade vid diagnostiks arthroskopi i mellersta karpalleder och kotleder från kliniskt halta tävlingshästar. I vissa prover har påvisats både IL-6 och TNF- α , i olika koncentrationer. Resultaten visar att mycket höga halter av IL-6 korrelerar starkt med förekomst av chipfrakturer. Ingen sådan korrelation kan ses mellan förekomst av ledbruskskada, ledkapselinflammation, chipfrakturer och förhöjda halter av TNF- α i ledvätska. TNF-alfa koncentrationen i ledvätska uppvisar inget som talar för att denna cytokin kan vara en kandidat för markör av ledinflammation hos häst. TNF-alfa har mätts med både bioassay och ELISA (equine specifik), utan att förhöjda koncentrationer har kunnat påvisas. Sammanfattningsvis kan vi säga att mycket höga halter av IL-6 ses i ledvätska vid OA med osteokondrala fragment (chipfrakturer) vilket talar för en roll av fragmenten i upprätthållande av ledinflammationen (Ley et al., 2007).

En studie av vävnaden i leden har påbörjats. Polyklonala antikroppar mot IL-6, TNF-alfa, HMGB-1 har använts på ledkapslar från 20 tävlingshästar med OA i karpalleder eller kotleder. Synoviten har också karakteriserats histologiskt inkluderande cellidentifiering, immunohistokemiskt. Immunohistokemiska undersökningar avseende förekomst av B- (CD79alfa), T- (CD3), makrofager (CD163) och fibroblater (PGP 9.5) har gjorts på dessa ledkapslar. En ingående klassificering av

synoviten med relation till brosk/ben skada kan förhoppningsvis ge indikationer om hur grav inflammationen är.

I denna studie (manuskript A; se nedan) ses en mild synovit i de flesta leder utan signifikant korrelation till typ av vävnadsskada. Den morfologiska inflammationen är lindrig i samtliga fall. Däremot kan en förekomst av HMGB-1 och IL-6 påvisas i osteokondrala fragment. I dessa ses ofta positiva celler i områden vid övergång till förkalkat brosk ("tidemark") samt i degenererat ledbrosk. IL-6 kan ses i flera av ledkapseln celler och i chondrocyter. HMGB-1 förekommer normalt intranukleärt, men i ledkapsel från OA med osteokondrala fragment och även i fragmenten ses HMGB-1 även i cytoplasman och ställvis utanför cellerna (extracellulärt). Påvisandet av IL-6 i fragmenten och att HMGB-1 ses utanför cellerna kan tala för en aktiv sekretion vilket kan upprätthålla inflammationen och därmed ge en kronisk OA.

En tredje experimentell studie (manuskript B: se nedan) är också genomförd där 5 travare fick springa till utmattning på rullmatta i 7m/s och 10m/s. Denna studie gjordes för undersökning av muskelutmattning och ledvätska samt serum (före, direkt efter och 24 timmar efter) fanns sparade. Vi analyserade dessa prover avseende inflammationsmarkörer (TNF-alfa, SAA, PGE2) samt strukturella broskmatrix proteiner (COMP och aggrecan). Preliminär bearbetning av resultaten visar att SAA och aggrecan koncentrationen i ledvätska är förhöjda och korrelerad direkt efter träningspasset. Detta kan tala för en koppling mellan inflammation och broskmatrix destruktion med nedbrytning av aggrecan. Vi arbetar vidare med denna undersökning och kommer genom western blot (avseende aggrecanase) att kunna avgöra om aggrecan visar fragment efter molekyldestruktion eller nysyntes. Vår hypotes är att träning till utmattning ger en inflammation i leden som ger en nedbrytning av strukturella broskproteiner i ledbrosket.

Projektet har under de första tre åren utkristalliserats till följande:

Nedanstående manuskript skall ingå i Cecilia Leys avhandling.

Dessa arbeten har genomförts med hjälp av bidrag från ATG och Stiftelsen Svensk Hästforskning (0447045) samt en doktorandtjänst finansierad av SLU:s strategiska satsning på häst (Hippocampus).

"Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology" Cecilia Ley, Stina Ekman, Annika Elmén (Ekelid), Gunnar Nilsson and Maija-Leena Eloranta J. Vet. Med A. 54; 346-51, 2007. (bilaga; publicerad artikel samt poster)

"Immunolocalization of TNFalpha, IL-6, HMGB-1 in synovial membrane and articular cartilage from horses with carpal joint pathology"

Cecilia Ley, Stina Ekman, Bengt Roneus och Maija-Leena Eloranta. (Manuskript A bilagd som poster)

"COMP, aggrecan, TNFalpha, PGE2 and IL-6 in synovial fluid from horses during sub maximal treadmill exercise to fatigue"

Cecilia Ley, Marianne Gottlieb-Vedi, Dick Heinegård, Stina Ekman, Maija-Leena Eloranta, Eva Skiöldebrand. (Manuskript B)

Vi har nu tillsammans med forskargrupper i Danmark (Marianne Gottlieb-Vedi, docent) också sökt pengar för att genomföra studier på inköpta försökshästar. Dessa skall delas i olika träningsgrupper med olika typer av träningsintensiteter. Dessutom söks pengar för en kontrollgrupp som endast vistas på bete, eller i paddock. Medel för dessa studier söks i Danmark och in vivo försöken skall ske vid KVL under ledning av Gottlieb-Vedi.

Där kan resultaten visa hur intensiv träning påverkar leden vad gäller inflammation, samt brosk och benmetabolismen. Kunskap om den fysiologiska tröskeln avseende belastning av de olika vävnaderna i leden är viktig om vi ska kunna förhindra att förslitningsskador uppkommer under intensiv träning av tävlingshästen.

Hypoteserna som vi utgick från i detta projekt har nu modifierats och följande hypoteser arbetar vi nu vidare med i det nya projektet (**H0547061**)

Den unga hästen tränas och tävlas så hårt att belastningen på olika bindvävnader överskrider den fysiologiska tröskeln. Detta ger en inflammation med matrixdestruktion (förslitningsskada).

Våra hypoteser är att:

- 1) Förekomsten av osteokondrala fragment upprätthåller inflammationen och därmed hältan vid equine-OA. Detta främst genom syntes av IL-6, IL-1 och HMGB-1.
- 2) Profilen (aktivitet, kvantitet och typ) av inflammationsmediatorer varierar vid olika tidpunkter (akut, kronisk) i OA processen.
- 3) Den tidiga biokemiska skadan startar i djupare delar ledbrusket med en klar koppling till underliggande benvävnad och denna sker vid intensiv belastning.

Referenser

- Alwan WH., Carter SD., Dixon, JB. et.al.: "Interleikin-1-like activity by equine synovial fluids and sera of horses with arthritis." *Res Vet Sci.* 51:72-77, 1991.
- Armstrog, S, Lees, P: "Effects of carprofen (R and S enantiomers and racemate) on the production of IL-1, IL-6 and TNFalfa by equine chondrocytes and synoviocytes." *J. Vet Pharmacol. Therap.* 25:145-153, 2002.
- Bird, JL., Wells, T., Platt, D., Bayliss, MT.: "Il-1 beta induces the degradation of equine articular cartilage by a mechanism that is not mediated by nitric oxide." *Biochem Biophys Res Commun.* 238:81-5, 1997.
- Brama, PAJ., TeKopple, JM., Beekman, B., van Weeren, PR., Barneveld, A.: "Matrix metalloproteinase (MMP) activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis and osetochondrosis." *Ann Rhem Dis.* 57:697-699, 1998.
- Femor, B., Haribabu, B., Weinberg, B., Pisetsky, DS., Guilak, F.: "Mechanical stress and nitric oxide influence leukotriene production in cartilage." *Biochem Biophys Res Com.* 285:806-810, 2001.
- Iqbal, J., Dudhia, J., Bird, JL., Bayliss, MT.: "Age-related effects of TGF-beta on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage." *Biochem Biophys Res Commun.* 274:467-71, 2000.
- May, SA, Hooke, RA, Lees, P.: "Identity of the E-series prostaglandin produced by equine chondrocytes and synovial cells in response to a variety of stimuli." *Res Vet Sci.* 46:54-57, 1989.
- McIlwraith, CW.: "General pathophysiology of the joint and response to injury" Chapter 3, page 40-70, *In Joint diseases in the horse*, McIlwraith – Trotter (eds), 1996.
- Pelletier, JP., Martel-Pellitier, J.: "Evidence for the involvment of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID." *J Rheumatol Suppl.* 18:19-27, 1989.
- Radin, EL.: Osteoarthrosis – the orthopedic surgeon's perspective. *Acta Orthop Scand (Suppl 266)*, 66:6-9, 1995.
- Richardson, DW., Dodge, GR.: "Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alfa on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondocytes." *Am J Vet Res.* 61:624-30, 2000.
- Skiöldebrand, E., Lorenzo P., Zunino, L., Rucklidge, G.J., Sandgren, B., Carlsten, J. and Ekman S.(2001) Concentration of collagen , aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid from equine middle carpal joints. *Equine Vet. J.* **33**, 394-402 .
- Uhlhorn H., Eksell P., Sandgren B. and Carlsten J. (2000) Sclerosis of the Third Carpal Bone. A prospective Study of its significance in a group of young Standardbrde trotters. *Acta Vet. Scand.* **41**, 51-61.

Sammanfattning av projekt 0447045

Vid ledskada (OA) uppträder alltid en inflammation i någon fas av processen. För att bättre förstå mekanismerna bakom kroniska ledskador hos våra tävlings- och ridhästar måste vi förstå vad som startar den tidiga skadan och upprätthåller den inflammatoriska processen, som ger en kronisk skada med OA. Om vi får fram specifika inflammationsmarkörer för olika delar av inflammationsprocessen vid OA, kan typ och koncentration av dessa i serum och/eller ledvätska relateras till ledens "hälsotillstånd" och utnyttjas för tidig behandling av ledskada, anpassning av träningsdosen för att undvika leddestruktion, uppföljning av olika behandlingar och konvalescensprogram.

Projektet har utmynnat i ett publicerat arbete (Ley et al 2007) och två manuskript.

I det publicerade arbetet undersökte vi innehållet av bioaktivt IL-6 och TNF-alfa i 51 ledvätskeprover från mellersta karpalleder och kotleder från tävlingshästar (2-8 år gamla). Dessa hästar var halta och inremitterade för diagnostisk arthroskopi. Vid operationen klassificerades leden avseende ledkapselinflammation, ledbroksskada och förekomst av osteokondrala fragment (chipfrakturer). Resultaten visar att mycket höga halter av IL-6 korrelerar starkt med förekomst av osteokondrala fragment i leder med klinisk hälta. Däremot kan ingen association mellan typ av ledskada och TNF-alfa koncentration ses. Dessa resultat, tillsammans med andra forskargrupperns nyare resultat, indikerar klart att TNF-alfa inte är användbar som inflammationsmarkörer vid equine OA. Men däremot visar det att IL-6 är en intressant inflammationsmarkör för OA vid brosk/ben fragmentering. Vid operation där fragmentet tas bort, ses oftast en läkning och troligen är fragmentet kopplat till upprätthållandet av en kvarstående inflammation.

I en annan av våra studier karakteriserades inflammationen i ledkapseln avseende morfologi och immunohistokemisk förekomst av IL-6, TNF-alfa och HMGB-1. Ledkapslar samlades från karpal- och kotleder vid diagnostisk arthroskopi. Tjugo halta tävlingshästar ingick i studien. I dessa leder påvisades en makroskopisk ledkapselinflammation, men endast en lindrig mikroskopisk synovit, avseende cellinfiltration, med tydlig immunohistokemisk förekomst av IL-6 och HMGB-1. IL-6 påvisades i både ledkapselns permanenta celler (synoviocyter; fibroblaster och makrofager) som i vita blodceller (lymfocyter och plasmaceller), HMGB-1 förkom i nästan alla celler kärna, men i den inflammerade vävnaden fanns HMGB-1 även i cytoplasman och utanför cellen (extracellulärt). Förekomsten av dessa inflammationsmarkörer fanns också i ben/brosk fragmenten och där ffa i skadat brosk och i djupare delarna av brosket mot benövergången. Detta fynd är mycket intressant då många forskare mer och mer är överens om att ledskadan startar i ledbrosk och underliggande benvävnad samtidigt, och inte som tidigare alltid förutsattes, i ytliga ledbrosket med en uppfibring, sämre stötdämpning och därmed ett ökat tryck på benvävnaden.

En tredje experimentell studie är också genomförd där 5 travare fick springa till utmattning på rullmatta i 7m/s och 10m/s. Denna studie gjordes för undersökning av muskelutmattning och ledvätska samt serum (före, direkt efter och 24 timmar efter) fanns sparade (Gottlieb-Vedei et al., 1999). Vi analyserade dessa prover avseende inflammationsmarkörer (TNF-alfa, SAA, PGE2) samt strukturella broskmatrix proteiner (COMP och aggrecan). Preliminär bearbetning av resultaten visar att SAA och aggrecan koncentrationen i ledvätska är förhöjda och korrelerade till varandra direkt efter träningspasset. Detta kan tala för en koppling mellan inflammation och broskmatrix destruktion med nedbrytning av aggrecan. Vi arbetar vidare med denna undersökning och kommer genom western blot (avseende aggrecanase) att kunna avgöra om aggrecan visar fragment efter molekyldestruktion eller nysyntes. Vår hypotes är att träning till utmattning ger en inflammation i leden som ger en nedbrytning av strukturella broskproteiner i ledbrosket.

Studierna av koncentrationen av cytokiner i ledvätska och serum hos häst har försvårats eftersom de flesta analyserna är gjorda för människa eller råtta/mus. Homologin mellan species är inte tillräcklig för att icke-species specifika analyser ska kunna användas, då risk för felaktiga analysvärden är stor (Armstrong & Lee, 2002). Vi har därför utvecklat bioassays (IL-6, TNF-alfa) och equine-specifik ELISA (TNF-alfa), vilket har tagit längre tid än vi beräknade. Ett annat problem är att kliniskt material alltid är mycket heterogent, eftersom hästarna inkommer med hälta som funnits under olika lång tid och ofta involverar flera leder. Hästarna har dessutom genomgått olika typer av behandlingsregimer under olika lång tid. Vi har inte haft ekonomiska möjligheter att arbeta med experimentella studier designade specifikt för våra hypoteser, men via samarbete kunnat använda material som ingått i andra studier. Vi har nu startat ett samarbete med KVL; Köpenhamn (docent Gottlieb-Vedi) där vi söker pengar för egna försökshästar, en förutsättning för in vivo studier. Vi har själva startat in vitro studier, med odling av broskceller, för att molekylärbiologiskt kunna gå vidare med de indikationer vi visat med dessa tre studier. Cellodling har påbörjats av Eva Skiöldebrand hos professor Anders Lindahl, Göteborgs universitet och ska sedan användas på SLU.

Sammanfattningsvis har projektet visat följande:

- 1) kopplingen SAA, aggregat koncentration i ledvätska vid utmattning
- 2) omstrukturering och inflammation i ledbrosk/ben vid OA
- 3) osteokondrala benfragmentens uttryck av inflammationsmediatorer.