

KLIINISEN HEVOS- JA PIENELÄINLÄÄKETIETEEN LAITOS
HELSINGIN YLIOPISTO

**Merkkiaineet hevosen
nivelnesteessä
erilaisissa sairauksissa
ja niiden diagnostiikassa**

LISENSIAATIN TUTKIELMA

**Asta Tamminen
2014**

Tiedekunta - Fakultet – Faculty		Osasto - Avdelning – Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen laitos	
Tekijä - Författare - Author Asta Tamminen			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Merkkiaineet hevosen nivelnesteessä erilaisissa nivelsairauksissa ja niiden diagnostiikassa			
Oppiaine - Läroämne - Subject Hevossairaudet			
Työn laji - Arbetets art- Level Kirjallisuuskatsaus	Aika - Datum - Month and year 12/2014	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 39	
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Biomarkerit ovat merkkiaineita, jotka vapautuvat elimistön nesteisiin ja kertovat kudoksessa tapahtuvista normaaleista ja patologisista muutoksista. Nivelen eri kudoksista vapautuvien biomarkkereiden pitoisuuksia mittaamalla voi olla mahdollista diagnosoida nivelsairauksia varhaisemmassa vaiheessa nykyisiin menetelmiin verrattuna. Tällä hetkellä diagnoosi saadaan usein vasta silloin, kun nivelrusto on jo selkeästi vaurioitunut.</p> <p>Tutkimustyötä biomarkkereiden pitoisuuksien muutoksista on tehty sekä indusoiduilla että kliinisillä tutkimuspopulaatioilla. Indusoiduissa nivelsairauksissa biomarkkereiden pitoisuudet muuttuivat selkeästi, sillä usein kliinisissä nivelsairauksissa, kuten osteoartriitissa, sairaus etenee aalloittain aktiivisten ja elpymäjaksojen vaihdellessa. Röntgenkuville todetut muutokset nivelessä ovat saattaneet syntyä paljon aiemmin ja näytteenottohetkellä nivelessä voi olla vakaa, tulehduksen tila. Useissa biomarkkereissa, kuten matriksimetallproteiinaaseissa (MMP), myös iällä on merkitystä pitoisuuksiin. Nivelruston kehittyessä synteesi on aktiivisempaa, jolloin myös biomarkkereiden pitoisuudet ovat korkeampia aikuisiin yksilöihin verrattuna. Liikunta ja erilaiset lääkitykset saattavat myös vaikuttaa pitoisuuksiin. Näiden seikkojen vuoksi on haasteellista asettaa biomarkkereiden pitoisuuksille raja-arvoja ja patologisissa tutkimuksissa on tärkeää, että kontrollihevoset ovat samanikäisiä.</p> <p>Tutkimustuloksissa oli erilaisista lähtöasetelmistä riippumatta samankaltaisia tuloksia, mikä on todiste biomarkkereiden toimivuudesta. Selkeimmin esiin nousivat kollageeniin liittyvät biomarkerit, joiden pitoisuudet kohosivat synoviitin seurauksena sekä MMP ja prostaglandiini E₂ (PGE₂), joiden pitoisuudet kohosivat kaikissa nivelsairauksissa. Tällaista ominaisuutta voisi hyödyntää lähinnä nivelsairautta poissulkevana testinä.</p> <p>Tämä tutkielma on kirjallisuuskatsaus, jossa tarkastellaan ja vertaillaan tutkimustuloksia biomarkkereista, joita on yleisimmin käytetty hevosten niveltutkimuksissa.</p>			
Avainsanat - Nyckelord – Keywords Hevonen, merkkiaine, nivelneste, nivelsairaudet			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Eläinlääke- ja elintarviketieteiden talon (EE-talo) Oppimiskeskus			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Riitta-Mari Tulamo, Tytti Niemelä			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	1
2 SUORAT BIOMARKKERIT.....	4
2.1 Kollageeniin liittyvät biomarkkerit.....	4
2.1.1 C2C.....	4
2.1.2 CPII.....	7
2.2 Muut ruston biomarkkerit.....	11
2.2.1 GAG.....	11
2.2.2 CS-846.....	13
2.2.3 COMP.....	15
2.3 Tulehduskipulääkkeen vaikutus kollageenin ja aggregaanin biomarkkereihin.....	17
3 EPÄSUORAT MARKKERIT	17
3.1 Proteolyttiset entsyymit	17
3.1.1 MMP-2 ja MMP-9.....	20
3.2 Sytokiinit.....	23
3.2.1 TNF- α	24
3.2.2 IL-1.....	25
3.2.3 IL-6.....	25
3.3 Eikosanoidit.....	26
3.3.1 PGE ₂	26
3.3.2 LTB ₄	28
3.4 Muut.....	29
3.4.1 Substanssi P.....	29
4 POHDINTA.....	30
5 LÄHTEET.....	36

1 JOHDANTO

Molekyylimerkkiaineet (biomarkkerit) ovat proteiinien kappaleita, jotka vapautuvat elimistön nesteisiin esimerkiksi rustosta, luusta sekä nivelkalvosta ja kertovat normaaleista ja patologisista muutoksista nivelkudoksessa. Mittaamalla biomarkkereiden, jotka vapautuvat esimerkiksi rustokudosten uusiutuessa, pitoisuuksia, on mahdollista saada diagnoosi nivelsairauteen varhaisemmassa vaiheessa nykyisiin menetelmiin verrattuna (kirjassa Frisbie 2011). Nykyinen kuvantaminen röntgenillä, tietokonetomografialla, magneettikuvauksella tai niveltähystyksellä on kallista ja vaatii yleensä rauhoituksen sekä joissain tapauksissa yleisanestesian. Tyypillisesti diagnoosi saadaan vain, jos rustossa on jo massiiviset vauriot. Biomarkkereiden tutkimustyön tarkoituksena on päästä diagnoosiin pienillä toimenpiteillä ja sairauden aikaisessa vaiheessa. Täydellinen biomarkkeri olisi tarkasti yhdistettävissä sairastuneeseen kudokseen ja patologiaan, herkkä muuttumaan sairauden edetessä ja lääkitysten vaikuttaessa sekä hyödyllinen sairauden lopputulosta ennustettaessa (katsauksessa Garvican ym. 2010a).

Biomarkkerit voidaan jakaa suoriin ja epäsuoriin markkereihin. Suorat markkerit ovat tarkasti määritelty tiedettyihin molekulaarisiin prosesseihin tietyssä kudoksessa. Epäsuorat markkerit kertovat enemmän yleisistä muutoksista, joita ei pystytä rajaamaan selkeästi. Markkerit voivat olla osallisena useaan eri tapahtumaan tai kudokseen. Epäsuoria markkereita ovat sytokiinit, kasvutekijät sekä matriksin metalloproteiinaasit (MMPt) (kirjassa Frisbie 2011).

Rustonalainen luu on rakenteeltaan erityinen, koska sen tulee kestää mekaanisia voimia ja tottua harjoitukseen. Nivelrusto on tärkeä kudos nivelessä, sillä se sallii samanaikaisen liikkeen ja painorasituksen ilman hankausta. Rusto on rakentunut vedestä, kollageenista ja proteoglykaaneista (kirjassa Caron 2011).

Nivelrikko on yleinen ja etenevä nivelsairaus, jossa nivelrusto tuhoutuu ja katoaa asteittain korjaus- ja rappeutumisprosessien kautta. Etenevä ruston rappeutuminen johtaa toimintakyvyn katoamiseen ja nivelen vioittumiseen (katsauksessa Garvican ym. 2010a). Sairaus etenee aaltoilevasti, jolloin aktiiviset ja elpymävaiheet vuorottelevat (Trumble ym. 2001). Nivelrikko ei todennäköisesti ole vain yksi sairaus, vaan kaikissa

nivelen osissa (rustonalainen luu, nivelrusto, -neste, -kapseli ja ligamentit) sairaus etenee omaan tahtiinsa ja vaikuttaa nivelen toimintakykyyn. Valitettavasti selkeä eri mekaanisten ja biologisten tekijöiden vuorovaikutus ja osallistuminen nivelrikon kehittymiseen on edelleen selvittämättä. Nivelrikon kehittymiseen arvellaan olevan kolme erilaista patogeneettistä mekanismia. Hevosella voi valmiiksi olla jo viallista nivelrustoa, jolloin sen biomekaaniset ominaisuudet ovat epänormaaleja.

Rustonalaiseen luuhun voi kehittyä fyysisiä muutoksia, jolloin nivelrusto on liian ohut tarvittavaan iskunvaimennukseen, ja normaali mekaaninen rasitus voi aiheuttaa mikrovammoja alla olevaan luuhun. Yleisin hypoteesi kuitenkin on, että mekaaninen voima aiheuttaa vaurioita terveeseen rustoon, josta seuraa metaboliamuutoksia (kirjassa Caron 2011). Erilaiset nivelsairaudet johtavat usein nivelrikon kehittymiseen (Trumble ym. 2001), joten esimerkiksi nuoret hevoset, joilla on osteokondroosi, kehittävät yleensä nivelrikon myöhemmin (Trumble ym. 2009).

Tämän tutkielman tarkoituksena on tarkastella ja vertailla yleisimpien hevosten nivel tutkimuksessa käytettyjen markkerien tutkimustuloksia. Biomarkkereita on tutkittu sekä indusoiduissa että kliinisesti todetuissa sairaustiloissa kuten nivelrikossa, osteokondroosissa, eriateisissa akuuteissa ja kroonisissa nivelsairauksissa, synoviiteissa sekä septisessä artriitissa. Lisäksi tutkielmassa tarkastellaan muutamien lääkeaineiden vaikutuksia biomarkkereiden pitoisuuksiin. Tutkielmassa käsiteltävät biomarkkerit ovat esitelty taulukossa 1.

Taulukko 1. Tutkielmassa käsiteltävät biomarkkerit

MERKKIAINE	KUDOS	VAPAUTUMINEN	TEHTÄVÄ/ERITYISTÄ
Neoepitooppi C2C, C2C	Nivelruston kollageeni	Katabolinen biomarkkeri. Kollageenin hajoamistuote	
Karboksyylipeptidi, CPII	Nivelruston kollageeni	Anabolinen biomarkkeri. Prokollageeni, joita tuotetaan kun rustoa syntetisoidaan.	
Glukosaminoglykaani, GAG	Nivelruston proteoglykaani	Katabolinen biomarkkeri. Proteoglykaanin	

			hajoamistuote
Kondroitiinisulfaatin epitooppi 846, CS-846	Nivelruston aggregaani	Anabolinen biomarkkeri. Tuotetaan, kun rustoa syntetisoidaan	
Ruston oligomeerinen väliaine proteiini, COMP	Nivelrusto	Anabolinen biomarkkeri. Tuotetaan, kun rustoa syntetisoidaan	Linkkiproteiini, joka sitoo kollageenia ja on tärkeä tekijä kollageeniverkon muodostumisessa
Matriksimetalloproteinaasit, MMP:t	Syntetisoidaan synoviosyyteissä ja rustosoluissa	Entsyymiperhe. Esiintyy esiasteena, aktiivisena ja inhibiittoriin sitoutuneena muotona.	Pilkkoo matriksin soluväliaineen komponentteja
Tumor necrosis factor- α , TNF- α	Kaikkiällä elimistössä	Välittäjäaine, jota tuotetaan monenlaisissa elimistön soluissa	Säätää nivelessä esimerkiksi nivelkalvon, luun ja nivelruston metaboliaa niin terveessä kuin sairaassakin nivelessä
Interleukiini-1, IL-1	Kaikkiällä elimistössä	Välittäjäaine, jota tuotetaan monenlaisissa elimistön soluissa	Säätää nivelessä esimerkiksi nivelkalvon, luun ja nivelruston metaboliaa niin terveessä kuin sairaassakin nivelessä
Interleukiini-6, IL-6	Kaikkiällä elimistössä	Välittäjäaine, jota tuotetaan monenlaisissa elimistön soluissa	Säätää nivelessä esimerkiksi nivelkalvon, luun ja nivelruston metaboliaa niin terveessä kuin sairaassakin nivelessä
Prostaglandiini E ₂ , PGE ₂	Kaikkiällä elimistössä	Tulehdusvälittäjäaine jota tuotetaan erityisesti nivelkalvolla	Tarkat vaikutukset nivelen metaboliaan ovat vielä epäselviä, mutta liitetään vahvasti kivun tuntemiseen.
Leukotrieni B ₄ , LTB ₄	Kaikkiällä elimistössä	Tulehdusvälittäjäaine	Saattaa liittyä ruston kataboliseen metaboliaan.
Substanssi P	Hermosto	Vapautuu primaarisen afferenttien neuronien stimulaatiossa.	Hermoston välittäjäaine

Taulukon lähteet: kirjassa Caron (2011), katsauksessa Garvican ym. (2010a) ja (2010b), Marshall ym. (1990), katsauksessa van Weeren ym. (2008)

2 SUORAT MARKKERIT

2.1 Kollageeniin liittyvät markerit

Nivelruston soluväliaine tuotetaan rustosoluissa. Ruston soluväliaine koostuu erilaisista molekyyleistä kuten proteoglykaaneista, hyaluronaanista, glykoproteiineista ja kollageenista. Osteoartriitissa nivelruston rappeutuminen tarkoittaa näiden molekyylien tuhoutumista. Molekyylien osat erittyvät nivelnesteeseen (katsauksessa Garvican ym. 2010a).

Tyypin II kollageeni on kaikista yleisin nivelruston rakenneosana, sillä sen osuus säiemäisestä verkostosta on 90%. Kollageeni tukee rustokudoksen rakennetta (teoksessa Caron 2011). Useat biomarkkerien mittaussuomenetelmät on kehitetty mittaamaan kollageenin synteesiä ja rappeutumista, joista saa tietoa ruston uudistumisesta. Kollageenin hajoamisprosessissa sen kolmoiskierre jakaantuu. Jakaantumistuotteita ovat esimerkiksi C-telopeptidin kappaleet (CTX-II) ja kollageenin jakaantumisesta syntyvät neoepitootit C1, C2 sekä C2C. Näistä yleisimmin tutkittu biomarkkeri on C2C. Tyypin II kollageenin synteessissä tuotetaan esimerkiksi prokollageenia, anabolista karboksyylipeptidiä (CPII) (katsauksessa Garvican ym. 2010a).

2.1.1 C2C

Terveet nivelet; C2C kuuluu katabolisiin biomarkkereihin. Terveiden, aikuisten (3-12 vuotta) hevosten nivelnesteiden C2C-pitoisuuksissa todettiin nivelkohtaisia eroja. Pitoisuudet etupolvinivelessä olivat lähes kaksinkertaisia vuohisniveleen verrattuna. 1-2-vuotiaiden C2C-pitoisuudet etupolvinivelessä olivat samaa luokkaa aikuisten hevosten kanssa, mutta vuohisnivelen pitoisuudet olivat selkeästi korkeammat

aikuisiin verrattuna. Tämän vuoksi on tärkeää, että tutkimus- ja kontrollihevosten ikä ja nivel täsmäävät (Nicholson ym. 2010).

LPS-indusoitu synoviitti; Lucia ym. (2013) tutkimuksessa synoviitti indusoitiin lipopolysakkaridi- (LPS) injektiolla vastavieroitetuille varsoille, jolloin C2C-pitoisuus laski nivelnesteessä ensimmäiset kuusi tuntia injektiosta. Kuitenkin C2C-pitoisuudet nousivat jyrkästi 24 tunnin kuluttua injektiosta. De Grauw ym. (2009a) toteuttivat vastaavanlaisen tutkimuksen aikuisilla hevosilla (taulukko 2). C2C-pitoisuuksissa piikki havaittiin myös vasta 24 tuntia injektion jälkeen, mutta pitoisuudet olivat lähes kaksinkertaiset varsoilla tehtyyn tutkimukseen verrattuna. Näiden tutkimusten perusteella voidaan olettaa iällä olevan merkitystä C2C-pitoisuuksiin (Lucia ym. 2013). De Grauw ym. (2009a) tutkimuksen mukaan C2C-pitoisuus nivelnesteessä oli koholla vielä viikon kuluttua LPS-injektiosta, mikä kertoo, että tyypin II kollageeni jakaantui edelleen. Kahden viikon kuluttua LPS-injektion jälkeen C2C-pitoisuudet olivat palautuneet ennalleen (Lucia ym. 2013).

Murtumat; Nivelen murtuma ei aiheuttanut merkittäviä muutoksia C2C-pitoisuudessa, mutta pientä pitoisuuden nousua oli kuitenkin havaittavissa. Tuloksista tehtävät päätelmät vaatisivat suuremman tutkimuspopulaation (taulukko 3). On myös mahdollista, että ruston kemiallinen rappeutuminen alkoi vasta tutkimusnäytteiden oton jälkeen (Lettry ym. 2010).

Osteokondroosi; Osteokondroosiin tulevaisuudessa sairastuvilla 18-52 viikon ikäisillä varsoilla C2C-pitoisuudet eivät merkittävästi poikkea kontrollinivelten arvoista (de Grauw ym. 2011), kuten ei myöskään kliinisillä, 24-48 kuukauden ikäisillä osteokondroosipotilailla (de Grauw ym. 2006b). Lisääntynyttä tyypin II kollageenin rappeutumista on havaittu 7-12 kuukauden ikäisillä osteokondroosipotilailla samanikäisiin kontrolleihin verrattuna, mutta ilmeisesti kollageenin rappeutuminen osteokondroosinivelissä laantuu iän karttuessa (de Grauw ym. 2006b). Kuitenkin Lettry ym. (2010) totesivat tutkimuksessaan, että 8-42 kuukauden ikäisillä osteokondroosipotilailla C2C-pitoisuudet olivat koholla viereisen raajan vastaaviin niveliin verrattuna. Toisaalta Lettry ym. (2010) tutkimuksen osteokondroosipopulaation mediaani-ikä oli 25 kuukautta, mutta tähän on laskettu

sekä osteokondroosihevokset (n=12) sekä murtumahevokset (n=6), joten ei ole täysin selkeää, millainen ikäjakauma pelkästään osteokondroosipopulaatiolla oli. Jos tutkimushevosista suuri osa oli ikäjakauman alapäässä, tutkimustulokset tukevat toisiaan. Myös Trumble ym.(2009) totesivat tutkimuksessaan osteokondroosin nostavan C2C-pitoisuuksia nivelnesteessä verrattuna niin levänneisiin, terveisiin hevosiin kuin rasituksessa olleisiin, terveisiin hevosiin. Korkeammat C2C-pitoisuudet osteokondroottisissa nivelissä voisi olettaa johtuvan kasvaneesta MMP-välitteisestä rustomatriksin kollageenin jakaantumisesta. Tutkimuksen osteokondroosihevokset olivat 2-7-vuotiaita ja kontrolliryhmän hevokset 14-20 kuukauden ikäisiä. Nuoremmilla hevosilla pitäisi olla enemmän metabolista aktiivisuutta ja siten myös korkeammat C2C-pitoisuudet. Kuitenkin Trumble ym. (2009) saivat tutkimuksessaan päinvastaisen tuloksen. Toisaalta kaikkien osteokondroosihevosten lääkityksistä, hoidoista ja osteokondroosin kestosta ennen näytteenottoa ei ollut tietoa, mikä rajoittaa tutkimustulosten käyttöä. Kuitenkin kohonneet C2C-pitoisuudet korreloivat osteokondroosipotilaiden röntgenkuva- sekä niveltähystyslöydösten kanssa (Trumble ym. 2009). Myös Nicholson ym. (2010) tutkimuksen mukaan kliininen osteokondroosi nosti C2C-pitoisuutta sekä etupolvi- että vuohisnivelessä. Osteokondroosipotilaat olivat iältään 2-7-vuotiaita ja kontrollit 3-12-vuotiaita. Etupolvinivelen pitoisuus oli selkeästi vuohinivelen pitoisuutta korkeampi (Nicholson ym. 2010). Eri nivelten välillä saattaisi siis olla eroavaisuuksia siinä, miten osteokondraaliset muutokset vaikuttavat sen metaboliaan ja sitä kautta biomarkkereiden pitoisuuksiin. De Grauw ym. (2006b) tutkimuksessa osteokondroottiset muutokset olivat koipiluun distaalisen keskiharjanteen alueella ja nivelnesteinäytteet kerättiin tarso-kruraalinivelestä. Myös (Lettry ym. 2010) tutkimuksen hevosilla muutokset olivat koipiluun distaalisen keskiharjanteen tai sisäpuolisen kehräksen alueella. Trumble ym. (2009) sekä Nicholson ym. (2010) tutkimuksissa nivelnesteinäytteet kerättiin sekä vuohis- että etupolvinivelestä. De Grauw ym. (2006b) mukaan tarso-kruraalinivelen osteokondroottiset muutokset tapahtuvat jo 5-24kk iässä, jonka jälkeen nivel vaikuttaa röntgenkuvien perusteella normaalilta. Muutenkin nivelruston muutoksia on vaikeaa määrittää röntgenkuvista (Nicholson ym. 2010).

Puudutteet; Piat ym. (2012) tutkivat toksisten aineiden, bupivakaiinin ja lidokaiinin, varhaisia vaikutuksia nivelruston metaboliaan (taulukko 2). C2C-pitoisuus ei eronnut kontrollinivelten arvoista merkittävästi, mutta bupivakaiini aiheutti selkeän C2C-pitoisuuden laskun 12 tuntia injektion jälkeen. Vastaava lasku oli havaittavissa 6 tuntia lidokaiini-injektion jälkeen. Tutkijoiden on vaikea selittää tätä tulosta, mutta he arvelevat, ettei se ole kliinisesti tärkeää, sillä myös kontrollinivelten C2C-pitoisuuksissa havaittiin samanlainen lasku. Tutkijat odottivat C2C-pitoisuuden selkeää nousua, mutta on mahdollista, että pitoisuuden määrittämenetelmät eivät ole riittävän herkkiä havaitsemaan hienoisimpiakin muutoksia ruston metaboliassa. Tutkimuksen perusteella voisi kuitenkin päätellä, että paikallisten puudutteiden käyttö terveissä nivelissä aiheuttaa vain vähän muutoksia kollageenin katabolisissa markkereissa, joten niiden käyttö on turvallista (Piat ym. 2012).

Yhteenvedo; Sekä Lucia ym. (2013) että de Grauw ym. (2009a) mukaan C2C-pitoisuus kohosi selkeästi synoviitin vaikutuksesta ja pysyi koholla useamman päivän injektion jälkeen. Tämän perusteella C2C voisi olla hyvä biomarkkeri diagnosoitaessa synoviittia. Osteokondroosin suhteen C2C-pitoisuuden muutoksista saatiin hyvin ristiriitaisia tuloksia sekä nuorten että aikuisten hevosten kesken, mikä vaikeuttaa C2C:n käyttöä biomarkkerina. Trumble ym. (2009) tutkimuksessa C2C-pitoisuus korreloi röntgen- ja niveltähystyslöydösten kanssa ja heidän mukaan C2C-pitoisuutta voisi hyvin käyttää työkaluna osteokondroosivaurioita arvioitaessa, mutta jokaiselle nivelelle tulisi laatia erikseen raja-arvot terveen ja osteokondroottisen nivelen välillä. Lettry ym. (2010) tutkimuksessa C2C-pitoisuus ja niveltähystyslöydökset eivät korreloineet keskenään, jolloin pitoisuus ei yhdenmukaisesti kerro nivelen tilasta verrattuna niveltähystykseen. Toisaalta tutkimukseen käytetty niveltähystyslöydösten luokittelu ei välttämättä ollut riittävän tarkkaa nivelvaurioiden osalta. Kuitenkaan tämän tutkimuksen perusteella C2C-pitoisuus ei vastannut nivelmuutoksia, joten sen käyttö biomarkkerina tulee olla varovaista (Lettry ym. 2010).

2.1.2 CPII

Normaali nivel; CPII kuuluu anabolisiin biomarkkereihin. CPII-pitoisuuden todettiin olevan korkeampi nuorilla hevosilla (9-18 kuukautta) kuin aikuisilla (24-48 kuukautta)

vastaavassa nivelessä (Laverty ym. 2000). Nicholson ym. (2010) totesivat, että 1-2-vuotiaiden ja 3-12-vuotiaiden CII-pitoisuudessa nivelnesteissä ei kuitenkaan ollut merkittäviä eroja. Myöskään pitoisuuksissa etupolvi- ja vuohisnivelten välillä ei ollut merkittävää vaihtelua (Nicholson ym. 2010). CII-pitoisuuden nousu nivelvammojen tai osteoartriitin kehittymisen yhteydessä on ajateltu johtuvan vaurioituneen kollageeniverkon korjaavista toimenpiteistä (de Grauw ym. 2009a).

Liikunta; Liikunnan todettiin nostavan CII-pitoisuutta nivelnesteessä. Pitoisuuksia seurattiin 16 viikon liikuntaohjelman ajan. Pitoisuus nousi lähes kaksinkertaiseksi alkuperäiseen arvoon verrattuna. Osteokondraalisella irtopalalla indusoitu osteoartriitti sekä liikunta nostivat CII-pitoisuutta vielä terveitä, vain liikunnalla indusoituja niveliä korkeammaksi. Pitoisuus kohosi muita korkeammaksi 3 viikkoa indusoinnin jälkeen ja 13 viikon kuluttua pitoisuudet olivat kolminkertaiset alkuperäisiin, levossa olleiden, hevosten arvoihin verrattuna (Frisbie ym. 2008).

LPS-indusoitu synoviitti; De Grauw ym. (2009a) totesivat LPS-injektiolla indusoidussa synoviitissa aikuisilla hevosilla CII-pitoisuuden kohoavan nivelnesteessä. Suurimmat arvot mitattiin 24 tuntia injektioista ja edelleen viikon kuluttua injektioista pitoisuus oli koholla (de Grauw ym. 2009a). Lucia ym. (2013) tekivät vastaavanlaisen tutkimuksen (taulukko 2) vastavieroitetuilla varsoilla ja totesivat CII-pitoisuuden piikkiin osuvan 6 ja 24 tunnin päähän injektioista. Pienemmällä LPS-annoksella indusoidut synoviitit (taulukko 2) nostivat CII-pitoisuutta hitaammin ja pitoisuus jäi alhaisemmaksi kuin suuremmalla annoksella (Lucia ym. 2013). Aikuisten hevosten CII-pitoisuus oli lähes kaksinkertainen varsojen vastaavaan verrattuna. Molempien tutkimusryhmien CII-konsentraatio oli koholla vielä viikon kuluttua injektioista (de Grauw ym. 2009a, Lucia ym. 2013). Lucia ym. (2013) tutkimuksessa todettiin pitoisuuden palanneen ennalleen kahden viikon kuluttua injektioista. Lyhytaikainenkin nivel tulehdukselle altistuminen siis aiheuttaa tyyppin II kollageenin synteesiä pidemmän aikaa (de Grauw ym. 2009a). Pitoisuuserojen arvellaan selittyvän iän ja kasvun vaikutuksilla. Nuorilla eläimillä ruston synteesi nopeutuu enemmän kuin rusto rappeutuu (Lucia ym. 2013).

Murtuma; Nivelen murtuma nosti CII-pitoisuutta selkeästi viereisen raajan niveleen verrattuna. Tämä on odotusten mukainen tulos, sillä murtuma on akuutti vaurio, jonka jälkeen ruston soluväliaineen korjausprosessit käynnistyvät (Lettry ym. 2010).

Osteokondroosi; 18-52 viikon ikäisillä varsoilla osteokondroosin kehittämissä nivelissä ja terveissä nivelissä ei ollut merkittävää eroa CII-pitoisuudessa (de Grauw ym. 2011). Osteokondroosi nostaa selkeästi CII-pitoisuutta nivelnesteessä 9-18 kuukauden ikäisillä hevosilla (Laverty ym. 2000), mutta 24-48 kuukauden ikäisillä vastaavaa pitoisuuseroa osteokondroosi- ja normaalinivelten välillä ei ole enää havaittavissa (Laverty ym. 2000, de Grauw ym. 2006). Myös Lettry ym. (2010) totesivat, että 8-42 kuukauden ikäisillä hevosilla osteokondroosi ei muuta CII-pitoisuutta viereisen raajan niveleen verrattuna. Ilmeisesti osteokondroosi lisää tyypin II prokollageenin synteesiä 9-18 kuukauden iässä (Laverty ym. 2000), mutta 24-48 kuukauden iässä osteokondroosin aiheuttamien rustomuutosten kehittyminen ja kollageenin rappeutuminen ovat ehtineet palautua jo normaalin nivelen tasolle (de Grauw ym. 2006b). Kuitenkin Nicholson ym. (2010) totesivat 2-7 vuotiaiden hevosten CII-pitoisuuden kohonneen etupolvinivelissä, joissa oli osteokondroottisia muutoksia. Osteokondroottisissa vuohisnivelissä pitoisuudet eivät kuitenkaan olleet kohonneet kontrolleihin verrattuna (Nicholson ym. 2010).

Puudutteet; Bupivakaiinilla indusoitu toksinen tila nivelessä aiheutti CII-pitoisuuden nelinkertaisen nousun, jonka huippu oli kahden päivän kuluttua injektioista kontrolleihin verrattuna. Lidokaiini-injektio aiheutti CII-konsentraation kaksinkertaistumisen. Pitoisuudet olivat korkeimmillaan yhden ja kahden päivän kuluttua injektioista normaalitasoihin verrattuna, mutta myös kontrollinivelten konsentraatio kohosi samoihin pitoisuuksiin. Molemmissa kokeissa CII-pitoisuudet olivat koholla vielä viikon jälkeen injektioista ja bupivakaiinia käytetyissä nivelissä pitoisuudet eivät olleet laskeneet normaalitasolle vielä kahdenkaan viikon kuluttua injektioista. Tulokset eroavat hieman toisistaan ja kyseiset tutkijat arvelivat, että mahdollisesti biomarkerit saattavat antaa erilaisen vasteen injektioihin siksi, että kokeet tehtiin eri niveliin (taulukko 1), jolloin ruston metabolia saattaa myös olla erilainen. Kuitenkin pitoisuuksien aikajana kertoo, että tyypin II kollageenin synteesi

käynnistyy hieman hidastetusti, mutta on pitkäkestoinen verrattuna esimerkiksi aggregaation synteesiin (Piat ym. 2012).

Kortikosteroidit; Kolme peräkkäistä nivelensisäistä kortikosteroidi-injektiota (taulukko 2) madalsivat CII-pitoisuuden määrää nivelnesteessä. Ensimmäinen injektio ei saanut aikaan merkittäviä muutoksia, mutta toisen injektion jälkeen pitoisuudet laskivat selvästi kontrolliniveliin verrattuna ja olivat kontrolleja sekä normaaliarvoja matalampina vielä viisi viikkoa viimeisen injektion jälkeen. Tulokset saattavat heijastua kollageenisynteesin inhibitiosta, mutta tämä vaatii vielä tarkempia tutkimuksia. Koska CII-pitoisuus jäi pitkäksi aikaa normaaliarvojen alapuolelle vielä injektoiden päätyttyäkin, kortikosteroidi-injektiot saattavat estää rustomatriksin synteesiä pidemmän aikaa (Robion ym. 2001).

Yhteenvedo; Synoviitti nosti selkeästi CII-pitoisuutta useamman päivän ajaksi sekä de Grauw ym. (2009a) että Lucia ym. (2013) tutkimuksissa. Tulosten perusteella voisi ajatella CII olevan varteenotettava biomarkkeri synoviittia diagnosoitaessa. Osteokondroosin vaikutukset CII-pitoisuuteen ovat hieman ristiriitaisia ja mitä ilmeisimmin iästä riippuvaisia. Laverty ym. (2000) ja de Grauw ym. (2006b) mukaan osteokondroosi ei vaikuta CII-pitoisuuteen 24-48 kuukauden iässä, mutta Laverty ym. (2000) mukaan pitoisuus nousee 9-18 kuukauden ikäisillä hevosilla. Kuitenkin Lettry ym. (2000) mukaan osteokondroosi ei vaikuttanut pitoisuuteen 8-42 kuukauden ikäisillä hevosilla. Kaikissa tutkimuksissa oli käytetty saman nivelen, tarso-kruraalinivelen, nivelnestenäytteitä ja kontrollihevoset olivat samaa ikäluokkaa tutkimushevosten kanssa. Osassa tutkimuksissa kontrollit olivat viereisen raajan niveliä. Ehkä Lettry ym. (2000) tutkimuksen laaja ikähaarukka vaikuttaa tuloksiin. Laverty ym. (2000) mukaan osteokondroottisten muutosten koko ja CII-pitoisuus eivät korreloi keskenään, ja Lettry ym. (2010) totesivat, että pitoisuudet ja niveltähystyslöydökset eivät korreloi. Tämä tarkoittaa, että CII-pitoisuus ei johdonmukaisesti kerro nivelen tilasta, joten sen käyttöä biomarkkerina osteokondroosin yhteydessä tulee harkita (Lettry ym. 2010). Lisäksi tulee muistaa, että liikunta (Frisbie ym. 2008) sekä hevosen ikä (Laverty ym. 2000) vaikuttavat pitoisuuteen. Myös erilaiset lääkitykset muuttavat CII-pitoisuutta, kuten puudutusaineet (Piat ym. 2012) ja kortikosteroidit (Robion ym. 2001).

2.2 Muut ruston biomarkkerit

Proteoglykaani on seuraavaksi yleisin ruston komponentti kollageenin jälkeen ja se on rakentunut eri pituisista glykosaminoglykaaniketjuista (GAG). Yleisin nivelruston proteoglykaani on aggregaani. Aggregaatin puuttuminen on yksi osteoartriitin varhaisista ja keskeisistä patofysiologisista muutoksista. Proteoglykaanin tuhoutuessa nivelnesteeseen vapautuu sen kappaleita (katsauksessa Garvican ym. 2010b).

Eräs yleinen aggregaaniin kuuluva GAG on kondroitiinisulfaatti (CS), jonka epitooppia 846 (CS-846) käytetään osteoartriitin anabolisena biomarkkerina. Sikiön nivelrustoissa tai rustossa, joka yrittää korjata itseään, syntetisoidaan suuria määriä aggregaania (katsauksessa Garvican ym. 2010b).

Pieni, mutta tärkeä osa rustomatriksin proteiineista on eräänlaisella linkkiproteiinilla, fibronektiinillä, ruston oligomeerisellä väliaine proteiinilla (COMP) (katsauksessa Garvican ym. 2010b). COMP:n sitoo tyyppien I, II ja IX kollageenien fibrillit ja on siten tärkeä tekijä kollageeniverkon muodostumisessa (Taylor ym. 2006). Varhaisessa osteoartriitissa nivelrusto on aktiivinen yrittäessään korjata tilannetta, mikä on yhdistetty nousseisiin COMP-pitoisuuksiin seerumissa (katsauksessa Garvican ym. 2010b).

Rustomatriksin metabolian biomarkkerien, CPII, C2C, GAG, pitoisuudet eivät merkittävästi eronneet nivelensisäiseen puudutteeseen (lidokaiini HCl 2%) positiivisesti reagoiviin negatiivisesti reagoivista. Vaikka kipeät nivelet tuottavat enemmän ruston metabolian markkereita, itse nivelrustossa ei ole hermoja, joten sen rappeutuminen itsessään ei ole kipua aiheuttava prosessi (de Grauw ym. 2006a).

2.2.1 GAG

Osteoartriitti; Osteoartriitti ei merkittävästi muuta GAG:n pitoisuutta nivelnesteessä Fuller ym. (2001) tekemän tutkimuksen mukaan. Tutkimuspopulaationa toimivat kliiniset potilaat, ja kontrolleina samojen hevosten viereisen raajan nivelet. Fuller ym. (2001) tutkimuksen tulosta saattaa vääristää kontrollinivelten tila, sillä osassa niistä oli havaittavissa rustovaurioita. Ross ym. (2012) tutkimuksessa tehtiin kokeellinen osteoartriitti rekombinoidulla interleukiini-1 -injektiolla (reIL-1 β) ja heidän mukaansa

GAG-pitoisuus nousi nivelnesteessä aina 24 tuntiin asti injektion jälkeen ja oli koholla vielä 48 tuntia injektiosta. Tosin tutkimuksessa suoritettut nivelbiopsiat nostivat myös kontrollinivelten GAG-pitoisuutta 24 ja 48 tunnin kuluttua injektiosta (Ross ym. 2012). Osteokondraalisella irtopalalla indusoitu osteoartriitti liikuntaan yhdistettynä nosti selkeästi GAG-pitoisuutta terveisiin, samassa liikuntaohjelmassa olevien hevosten niveliin verrattuna. Myös terveillä hevosilla liikunta nosti pitoisuutta lepoarvoihin verrattuna. Pitoisuutta mitattiin 13 viikon ajan injektion jälkeen, ja ne nousivat sekä terveillä että osteoartriitti-indusoiduilla hevosilla koko ajan. Osteoartriitti-indusoitujen hevosten pitoisuus nousi lähes kolminkertaiseksi alkuperäiseen, levossa olleiden hevosten arvoon verrattuna (Frisbie ym. 2008).

LPS-indusoitu synoviitti; De Grauw ym. (2009a):n kokeellisessa tutkimuksessa, jossa indusoiittiin synoviitti LPS-injektiolla, GAG- pitoisuuden havaittiin nousevan injektion jälkeen. Pitoisuus oli suurimmillaan 24 tuntia injektiosta ja oli palautunut normaalitasolle viikon kuluessa. Tämä ilmiö näyttäisi vahvistavan sen, että synoviitin indusoiminen lisää aggregaation uudistumista nopeasti ja lyhytkestoisesti (de Grauw ym. 2009a). Ross ym. (2012) käyttivät tutkimuksessaan myös LPS-indusoitua synoviittia ja saivat samankaltaiset tulokset. He totesivat GAG- pitoisuuden olevan koholla vielä 48 tunnin päästä injektiosta. Ross ym. (2012) tutkimuksessa todettiin myös kontrollinivelten (taulukko 1) GAG- pitoisuuden kohoavan 24 tuntia injektiosta. Syyn arveltiin johtuvan tutkimuksessa käytetystä nivelbiopsiamenetelmästä. Vakavat nivelvauriot nostavat nivelnesteeseen GAG pitoisuutta (van den Boom ym. 2005). Tutkimus suoritettiin mittaamalla GAG-pitoisuutta teurashevosten nivelnesteistä ja arvioimalla nivelten rustovaurioiden vakavuusastetta. Van den Boom ym. (2005) tutkimuksen tuloksia on vaikea verrata muihin, sillä tutkimushevosten historiasta ei ole mitään tietoa.

Osteokondroosi; De Grauw ym. (2006b) mukaan osteokondroosi ei merkittävästi muuta GAG-pitoisuutta nivelnesteessä terveisiin niveliin verrattuna. Tutkimuksen hevoset olivat yli kaksi vuotiaita (taulukko 3), joten voidaan päätellä, että osteokondroosipotilailla proteoglykaanin metabolia ei ole poikkeavaa enää yli kahden vuoden iässä. Myöskään 18-52 viikon ikäisillä varsoilla osteokondroosin kehittyminen

tulevaisuudessa ei nosta GAG-pitoisuutta terveenä pysyviin niveliin verrattuna (de Grauw ym. 2011).

Yhteenveto; Kaiken kaikkiaan on vielä epäselvää, johtuvatko GAG-pitoisuuden muutokset lisääntyneestä ruston synteestistä vai etenevästä rappeutumisesta (Ross ym. 2012). Osteokondroosia lukuun ottamatta kaikki tutkitut nivelsairaudet vaikuttivat GAG-pitoisuuteen. Fuller ym. (2001) tutkimuksen kliininen osteoartriitti muodostaa poikkeuksen, mutta tulokseen tulee suhtautua varauksella, sillä kontrolliniveliä ei todettu terveiksi. Tutkimuksissa käytetyt indusoidut nivelsairaudet nostivat pitoisuuksia voimakkaasti ja melko lyhytaikaisesti kollageenin biomarkkereihin verrattuna. Kliinisillä potilailla muutokset saattaisivat olla maltillisempia. Näiden tutkimusten perusteella GAG-pitoisuutta voisi kuitenkin käyttää terveen ja sairaan nivelen erottamiseen, mutta nivelsairauden tarkempaan diagnosoimiseen tarvittaisiin lisää tutkimuksia. GAG-pitoisuus reagoi myös liikuntaan (Frisbie ym. 2008) ja nivelkalvolta sekä nivelrustosta otettuihin nivelbiopsioihin (Ross ym. 2012), joten se tulisi myös huomioida GAG:ia biomarkkerina käytettäessä.

2.2.2 CS-846

Terve nivel; CS-846-pitoisuus nivelnesteessä on korkeammat nuorilla (9-18 kuukautta) kuin aikuisilla (24-48 kuukautta) hevosilla, mikä saattaa olla merkki siitä, että aikuisilla hevosilla aggregaanin synteesi on heikentynyt (Laverty ym. 2000).

Liikunta; Liikunta nosti selkeästi CS-846-pitoisuutta nivelnesteessä. 16 viikon kuluttua liikuntaohjelman aloituksesta pitoisuus oli kohonnut yli kolminkertaiseksi levossa olleiden hevosten pitoisuuteen verrattuna. Osteokondraalisella irtopalalla indusoitu osteoartriitti samaan liikuntaohjelmaan yhdistettynä nosti pitoisuutta vielä korkeammaksi. Osteoartriittisissa nivelissä pitoisuus oli korkeimmillaan 7 viikkoa injektion jälkeen, jolloin se oli yli kuusi kertaa korkeampi levossa olleisiin, terveisiin hevosiin verrattuna (Frisbie ym. 2008).

LPS-indusoitu synoviitti; LPS-injektiolla indusoidussa synoviitissa CS-846-pitoisuus kohosi selvästi nivelnesteessä. Korkein pitoisuus mitattiin 24 tuntia injektioista, ja viikon kuluttua pitoisuus oli laskenut normaalitasolle. Indusoidun synoviitin

aiheuttama aggregaanin lisääntynyt uudistuminen vaikuttaisi olevan nopea ja lyhytkestoinen ilmiö. CS-846-pitoisuus nivelnesteessä muuttuu huomiota herättävän samanaikaisesti GAG-pitoisuuden kanssa (de Grauw ym. 2009a).

Osteokondroosi; Osteokondroosissa CS-846-pitoisuus oli selkeästi alentunut nuorten hevosten (9-18 kuukautta) nivelnesteessä, mutta aikuisilla (24-24 kuukautta) hevosilla selkeää eroa osteokondroottisten nivelten ja normaaliin nivelten ei ollut enää havaittavissa. Alentunut CS-846-pitoisuus osteokondroosissa antaa viitteitä, että aggregaanin synteesi saattaa olla vähentynyt saman ikäisiin terveisiin niveliin verrattuna (Laverty ym. 2000). Jo 18 viikon ikäisillä varsoilla todettiin osteokondroosin kehittyvien nivelten CS-846-pitoisuuden olevan alhaisempi terveisiin niveliin verrattuna. Kyseisessä tutkimuksessa ei kuitenkaan löydetty merkkejä, että aggregaanin muuttunut uudistuminen jatkuisi myöhempään kuin 18 viikon ikään saakka, sillä 22 ja 52 viikon iässä CS-846-pitoisuuksissa osteokondroottisten ja terveiden nivelien välillä ei ollut merkittävää eroa. Erilaiset tutkimustulokset saattavat johtua erilaisista tutkimusanalyysistä. Jälkimmäisessä tutkimuksessa käytetty ELISA-menetelmä saattaa vaikuttaa näytteen laimenemiseen tai digestion protokollaan (de Grauw ym. 2011).

Puudutteet; Sekä bupivakaiinilla että lidokaiinilla induoitu toksinen tila niveleen aiheutti selkeän CS-846-pitoisuuden nousun etenkin 12 ja 24 tuntia injektion jälkeen kontrolleihin ja normaaliarvoihin verrattuna. Myös kontrollinivelten pitoisuus nousi hieman samanlaisella aikataululla. Pitoisuus oli palannut normaaliarvoihin viikon kuluttua injektioista, mikä kertoo siitä, että aggregaanin synteesi käynnistyy nopeasti, mutta on melko lyhytkestoinen (Piat ym. 2012).

Kortikosteroidit; Peräkkäiset nivelensisäiset kortikosteroidi-injektiot (taulukko 1) nostivat CS-846-pitoisuutta jopa kuusinkertaiseksi normaalipitoisuuksiin nähden. Pitoisuuden nousu tapahtui viikon viiveellä injektioista. Kaksi ensimmäistä injektioita saivat aikaan näin voimakkaan reaktion, mutta kolmas, viimeinen, injektio ei enää nostanut CS-846-pitoisuutta. Kolmen viikon kuluttua viimeisestä injektioista pitoisuus laski jopa kontrollinivelen pitoisuuden alapuolelle. Kortikosteroideilla näyttäisi olevan

suoraan tai epäsuorasti selkeä vaikutus nivelrustojen uudistumiseen (Robion ym. 2001).

Yhteenvedo; LPS-indusoitu synoviitti (de Grauw ym. 2009a) sekä osteokondraalisella irtopalalla indusoitu osteoartriitti (Frisbie ym. 2008) nostivat selkeästi CS-846-pitoisuutta ja tätä voisi hyödyntää nivelsairauksia diagnosoidessa. Muutokset CS-846-pitoisuudessa olivat hyvin lyhytaikaisia, mikä tietenkin täsmällisemmin kertoo nivelen juuri sen hetkisestä tilanteesta, mutta ei välttämättä helpota aina diagnoosin tekoa. Tosin nivelsairaudet olivat näissä tutkimuksissa kaikki indusoituja, joka voi nopeuttaa aggregaation metabolian muutoksia, joten tutkimukset kliinisillä potilailla voisivat antaa todellisempaa kuvaa pitoisuuksien muutoksista. Hevosen ikä (Lavery ym. 2000), liikunta (Frisbie ym. 2008), puudutusaineet (Piat ym. 2012) ja kortikosteroidit (Robion ym. 2001) vaikuttavat CS-846-pitoisuuteen, mikä tulee muistaa, jos pitoisuuksia aikoo käyttää nivelen tilan diagnosointiin.

2.2.3 COMP

Osteokondroosi; Misumi ym. (2001) mukaan COMP-pitoisuus laski osteokondroottisten nivelten nivelnesteessä normaaliarvoihin verrattaessa. Odotettua alhaisempi arvo saattoi johtua tutkimuksessa käytetystä primäärisestä vasta-aineesta, joka oli mahdollisesti eri kuin aiemmissa tutkimuksissa on käytetty (Misumi ym. 2001). Skiöldebrand ym. (2005) totesivat tutkimuksessaan osteokondroottisten muutosten nostavan COMP-pitoisuutta melkein kaksinkertaiseksi normaaliarvoon verrattuna. Pitoisuus oli sitä suurempi mitä kauemmin hevonen oli ontunut jalkaa. Korkeampaan COMP-pitoisuuteen on useampia mahdollisia mekanismeja. Esimerkiksi nivelessä voi olla kohonnutta proteiinisynteesiä ja uudet makromolekyylit vuotavatkin nivelnesteeseen ennen soluväliaineeseen yhdistymistä tai nivelnesteeseen määrä on voinut vähentyä, joka nostaa näennäisesti proteiinien pitoisuutta (Skiöldebrand ym. 2005).

Osteoartriitti; Osteoartriitti laski COMP-pitoisuutta nivelnesteessä (Misumi ym. 2001, Taylor ym. 2006). Myös nivelen sisäiset murtumat, synoviitit ja septiset nivelsairaudet laskivat COMP-pitoisuutta. Erilaisten nivelsairauksien välillä ei ollut merkittävää eroa pitoisuuksien suhteen (Misumi ym. 2001). Taylor ym. (2006) totesivat myös iän

laskevan COMP-pitoisuutta, mutta se ei ole tilastollisesti merkittävää. Arai ym. (2005) saivat tutkimuksessaan kuitenkin täysin päinvastaisen tuloksen. Heidän mukaansa osteoartriitti nostaa nivelnesteeseen COMP-pitoisuutta. Poikkeava tulos voi johtua useasta eri tekijästä. Osteoartriitti voi olla erilaisissa vaiheissa, tai tutkimuksessa käytetty vasta-aine on voinut olla erilainen affiniteetiltaan tai spesifisyydeltään. Arai ym. (2005) tutkimuksessa käytettiin vasta-aine 14G4:ää, joka rekisteröi myös hajonneet, hyvin pienet COMP-oligomeerit ehjien proteiinien lisäksi. Usein tutkimuksissa käytetään vasta-aine 12C4:ää, jolla on korkeampi affiniteetti vähemmän hajonneisiin partikkeleihin (Arai ym. 2005). Alhaisempia COMP-pitoisuuksia saattaa saada myös kroonisesti ontuvista, vähän liikkuvista nivelistä verrattuna liikkuvampiin, akuutin vamman saaneisiin niveliin (Taylor ym. 2006).

Rotu; COMP-pitoisuudessa voi esiintyä myös rotujen välistä vaihtelua. Skiöldebrand ym. (2001) tutkimuksessa lämminveristen ravureiden (STB) lievät ja kohtalaiset nivelruston vauriot laskivat COMP-pitoisuutta ja vakavat vauriot nostivat pitoisuutta selkeästi. Ruotsalaisen lämminveriratsulla (SWH) COMP-arvo nousi sen sijaan niin lievässä, kohtalaisissa kuin vakavissakin rustovaurioissa. Merkittävä ero rotujen välillä oli kohtalaisissa rustovaurioissa, jolloin SWH:n pitoisuus oli 1,5-kertainen STB:n arvoon verrattuna. Tästä voidaan päätellä, että STB:n nivelrustojen metabolia-aktiivisuus saattaa olla alhaisempaa kuin SWH:lla. Syitä voi olla monia; hevosen paino ja liikkuminen, ikä, tulehdus, toistuva trauma tai lääkkeet. STB:n alhainen COMP-pitoisuus korreloi negatiivisesti valmennuksen aloitussiinä kanssa. Ratsujen ja ravurien erilaiset valmennusohjelmat saattavat olla yksi selitys eroavaisuuksille. Etupolvinivelen mekaaninen rasitus on myös hyvin erilaista näiden rotujen välillä ja se voi myös selittää ruston metabolian eroja. STB:n valmentautuminen alkaa aikaisemmin ja on huomattavasti intensiivisempää kuin SWH:n. SWH:n valmentautuminen alkaa vasta 3,5-4 vuoden iässä, jolloin luusto on jo aikuisen kaltainen. Kuitenkaan näiden kahden rodun rustovauriot eivät eroa makroskooppisesti (Skiöldebrand ym. 2001).

Yhteenveto; Nähtävästi COMP-pitoisuutta mitattaessa on tärkeää, että kaikki mittaukset tehdään samalla tekniikalla samaa vasta-ainetta käyttäen. Tästä biomarkkerista voisi olla haasteellista määrittää terveen ja sairaan nivelen raja-arvoja mittaussuomenetelmän (Arai ym. 2005) ja jopa hevosen rodun (Skiöldebrand ym. 2001)

vaikuttaessa tuloksiin näin radikaalisti. Myös yksittäisen sairauden diagnosoiminen voisi olla haasteellista, koska useat nivelsairaudet (Misumi ym. 2001) laskivat COMP-pitoisuutta. Kuitenkin COMP-arvoilla saattaisi olla mahdollista ennustaa nivelruston rappeutumisen kehitystä esimerkiksi osteoartriitissa (Misumi ym. 2001). Alentunut COMP-pitoisuus näyttäisi korreloivan nivelen sen hetkiseen vaivaan, mutta yksittäisiä arvoja voi olla vaikea käyttää sairausprosessin tilan arvioimisessa (Taylor ym. 2006). Kohonnut COMP-arvo korreloi nivelvammasta kuluneen ajan kanssa, joten se voisi olla vartenotettava biomarkkeri pitkäaikaisempaan tutkimukseen, jossa arvioidaan COMP:n roolia nivelen paranemisprosessissa (Skiöldebrand ym. 2005).

2.3 Tulehduskipulääkkeen vaikutus aggregaanin ja kollageenin biomarkkereihin

Sekä katabolisten että anabolisten rustomatriksin metabolian biomarkkereiden pitoisuudet vähenivät nivelnesteessä meloksikaamin vaikutuksesta, sillä meloksikaami vaimentaa nivelen tulehdusreaktiota. De Grauw ym.(2009b) tutkimuksessa synoviitti indusoitiin LPS-injektiolla ja tämän jälkeen tutkimushevosille annettiin meloksikaamia viikon ajan suun kautta kerran päivässä. C2C:n, CPII:n, GAG:n, CS-846:n pitoisuudet pysyivät plasebo-lääkittyjen hevosten arvojen alapuolella koko viikon kestäneen seurantajakson ajan. Selvin ero oli CPII-pitoisuudessa, jossa meloksikaamilla lääkittyjen hevosten pitoisuus olivat jopa kolme kertaa pienempi plaseboihin verrattuna. Tämä kertoo siitä, että lääkitys vähentää tyyppin II kollageenin synteesiä synoviitin aikana. Matalampi CPII-pitoisuus voi kertoa myös siitä, että kollageeniverkon vauriot ovat pienempiä meloksikaamilääkityillä hevosilla, jolloin nivelissä on myös vähemmän korjaustarvetta. Pienimmät pitoisuuserot olivat GAG- ja CS-846-pitoisuuksissa, joka tarkoittaa, että meloksikaamilääkityksellä ei ollut merkittävää vaikutusta aggregaanin synteesiin (de Grauw ym. 2009b).

3 EPÄSUORAT MARKKERIT

3.1 Proteolyttiset entsyymit

Matriksimetalloproteinaaseilla (MMP) on suuri merkitys rustomatriksin rappeutumisella osteoartriitissa, sillä proteinaasiryhmän entsyymit pystyvät

pilkkomaan kaikkia yleisimpiä matriksin soluväliaineen komponentteja. MMP:t syntetisoidaan synoviosyyteissä ja rustosoluissa ja niiden pitoisuus nousee nivelrustosairauksissa. Terveessä rustossa proteolyyttisten entsyymien aktiivisuus on tarkasti kontrolloitu usein eri mekanismein. Yksi kontrollimenetelmistä on inhibiittoriproteiinit, joista tärkein on TIMPS. Epätasapaino MMP:n ja TIMPS:n synteisien välillä vaikuttaa matriksin rappeutumisnopeuteen (teoksessa Caron 2011).

MMP-perhe on jaettu kollagenaaseihin (MMP 1, 8 ja 13), stromelysiineihin (MMP 3 ja 10), gelatinaaseihin (MMP 2 ja 9), membraanityyppisiin (MMP 14) sekä muihin MMP:hin (MMP 7, 11, 12, 19). Hevosilla näistä esiintyy ainakin tyypit 1, 13, 3, 2 ja 9 (teoksessa Caron 2011). MMP:t tuottavat entsyymejä, kollagenaaseja, jotka pilkkovat ruston kollageeneja. MMP-pitoisuuksia mitattaessa täytyy muistaa, että MMP esiintyy niin aktiivisena, esiasteena (latenttina) kuin inhibiittoriin sitoutuneenakin. Yleensä aktiivista muotoa esiintyy vähemmän kuin 5 % MMP-kokonaiskonsentraatiosta. Lisäksi on useita eri tapoja osoittaa kollagenaasien olemassaolo, jolloin kaikkia tuloksia ei aina voi verrata keskenään. MMP-pitoisuudet muuttuvat iän mukaan ja varsoilla mitattavat arvot ovat kaikista suurimpia (Brama ym. 1998). On esimerkiksi normaalia, että MMP-1 pitoisuudet ovat jopa 15-kertaiset terveeseen aikuiseen verrattuna, sillä kasvavissa nivelissä soluväliaineen uudistuminen on nopeaa (Brama ym. 2004). Tämän vuoksi on tärkeää, että patologisissa tutkimuksissa käytetään saman ikäisiä kontrollihevosia. Aikuisilla hevosilla ikä ei enää korreloi MMP-pitoisuuksien kanssa (Brama ym. 1998). Nivelen tyyppi ei vaikuta entsyymien aktiivisuuteen. Tutkimuksessa verrattiin katio-, vuohis-, etupolvi- ja kinnerniveltä (Jouglin ym. 2000). Myöskään liikunnalla ei todettu olevan vaikutusta MMP-aktiivisuuteen. Tutkimuksessa käytettiin terveitä eläimiä, joten tulokset voivat olla erilaiset, jos liikunta on ollut todella raskasta tai nivelet eivät ole terveet (van den Boom ym. 2004).

Osteoartriitti; Brama ym. (1998) totesivat osteoartriitin nostavan MMP-pitoisuuksia nivelnesteessä. ReIL-1 β -injektio antoi kokeellisen mallin osteoartriitista Ross ym. (2012) tutkimuksessa, jossa myös todettiin kohonneet MMP-arvot. Arvot olivat korkeimmillaan 8 tuntia injektioista ja olivat vielä selkeästi koholla 48 tuntia injektion jälkeen. Toistuvat aspiraatiot eivät vaikuttaneet MMP-pitoisuuksiin (Ross ym. 2012). Kuitenkin van den Boom ym. (2005) tutkimuksessa vakavissakaan nivelrustovaurioissa

MMP-pitoisuudet nivelnesteessä eivät olleet kohonneet terveempiin niveliin verrattuna. On mahdollista, että nivelruston muutokset ovat tapahtuneet aiemmin ja mittaushetkellä olevat aktiiviset MMP-pitoisuudet ovat vain senhetkinen tilanne. Van den Boom ym. (2005) tutkimuksen hevoset olivat teurashevoseja, joiden historiasta ei ollut tarkempaa tietoa.

LPS-indusoitu synoviitti; LPS-indusoidussa synoviitissa MMP-pitoisuudet nousivat selvästi normaalitasoihin verrattuna. Suurimmat pitoisuudet mitattiin 8 tuntia injektion jälkeen (de Grauw ym. 2009a, Ross ym. 2012). Jo 4 tuntia injektioista Ross ym. (2012) mukaan pitoisuudet olivat selkeästi koholla ja vielä 24 tuntia injektion jälkeen selkeä ero normaaliarvoihin oli havaittavissa. Vielä viikonkin kuluttua injektioista MMP-pitoisuus oli aavistuksen koholla (de Grauw ym. 2009a).

Osteokondroosi; Osteokondroosi ei muuta MMP-pitoisuuksia normaaliarvoihin verrattuna. Mittaukset tehtiin 5kk ja 11kk ikäisille varsoille. Tästä voitaisiin päätellä, että osteokondroosissa ei tapahdu MMP-välitteistä ruston vaurioitumista. Tulos oli poikkeava aiempaan tutkimukseen verrattuna, mutta aiemman tutkimuksen kontrollihevoset olivat tutkimuspopulaatiota vanhempia, jolloin osteokondroosihevosten MMP-pitoisuudet olivat nuoremman iän vuoksi korkeammat (Brama ym. 1998).

Nivelinjektiot; Toistuvien nivelinjektioiden todettiin nostavan aktiivisen MMP:n pitoisuuksia. Pitoisuudet olivat selkeimmin koholla, kun nivelinjektio oli toistettu 12 tunnin ja 2,5 päivän kuluttua. Pitoisuudet laskivat viikon kuluessa, mutta olivat silti vielä normaalitasoa korkeammalla. Kahden viikon kuluttua pitoisuudet olivat laskeneet normaalitasolle. Tämä täytyy ottaa huomioon, mikäli MMP-pitoisuuksia käytetään nivelsairauksien biomarkkerina. Näytteet oli otettu vuohis-, etupolvi- ja tarso-kruraalinivelestä ja nivelten välillä oli hieman vaihtelua. Pienin vaihtelu pitoisuuksien välillä oli tarso-kruraalinivelen näytteissä, joka oli suurin tutkimuksessa käytetty nivel. MMP-pitoisuuksien nousu johtuu nivelkalvon paikallisesta reaktiosta, joka lienee vähäisempi suuremmassa nivelessä. Tässä tutkimuksessa mitattiin MMP-aktiivisuutta ennemmin kuin esiasteiden pitoisuuksia. Lisäksi käytettiin sekä hevoseja että poneja, ja

on mahdollista että hevosten ja ponien MMP-aktiivisuuksissa on eroja (van den Boom ym. 2004).

Tulehduskipulääkkeet; Tulehduskipulääke laski odotetusti MMP:n aktiivisuutta LPS-indusoidussa synoviitissa 8 ja 24 tunnin kuluttua injektiosta. Tulehduskipulääkkeiden kyky rajoittaa eri MMP:n lisääntynyttä aktiivisuutta akuutin synoviitin varhaisessa vaiheessa voi antaa suojaa ruston rappeutumista vastaan (de Grauw ym. 2009b).

Yhteenveto; Tutkimukset osoittivat, että MMP-pitoisuudet nousivat odotetusti lähes kaikissa nivelsairauksissa. Vain osteokondroosi (Brama ym. 1998) ja ilmeisesti aiemmin tapahtuneet, jo vakaassa tilassa olevat rustovauriot (van den Boom ym. 2005) eivät vaikuttaneet MMP-pitoisuuksiin. Ross ym. (2012) mukaan toistuvat aspiraatiot eivät muuttaneet pitoisuuksia, mutta van den Boom ym. (2004) mukaan toistuvat nivelinjektiot nostivat MMP-arvoja. Ehkä tutkimusryhmien tekniikat poikkesivat toisistaan, mikä aiheutti erilaiset tutkimustulokset. MMP:t voisivat olla hyödyllisiä biomarkkereita, koska niiden löytyminen nivelnesteestä kertoo ruston rappeutumisesta jo varhaisessa vaiheessa (Brama ym. 2004).

3.1.1 MMP-2 ja MMP-9

MMP:n eri alatyypeistä on vielä melko vähän tietoa ja tutkimusmenetelmät hevosille kaipaavat vielä kehitystä, jotta kaikki MMP-alatyypit saadaan eriteltyä toisistaan (de Grauw ym. 2009a). MMP-2 ja MMP-9 ovat tutkituimmat alatyypit hevosilla.

MMP-2, esiaste; Trumble ym. (2001) mukaan sekä akuutti että krooninen trauma, osteokondroosi sekä septiset nivelsairaudet nostivat MMP-2 esiasteen pitoisuuksia. Myös Fietz ym. (2008) mukaan osteoartriitti ja krooniset nivelsairaudet nostivat esiasteen pitoisuuksia, mutta sairauksien välillä pitoisuuksissa ei havaittu eroa. Tämä tulos osoittaa, että MMP-2 esiaste voisi kuulua akuuttien tulehdusten lisäksi kroonisten nivelsairauksien prosesseihin (Fietz ym. 2008). Hevosen iällä ja MMP-2 esiasteen pitoisuudella on selkeä yhteys; vanhemmilla hevosilla, joilla oli akuutti niveltrauma, pitoisuus oli korkeampi kuin vastaavan kategorian nuoremmilla hevosilla. Ja päinvastoin, vanhemmilla kroonisen niveltrauman vaivaamilla hevosilla pitoisuus oli

alhaisempi nuorempiin vastaaviin verrattuna (Trumble ym. 2001). Amphotericin B:llä indusoidussa artritissa MMP-2 esiasteen pitoisuus kohosi vain hieman normaaliarvoista, mutta pysytteli koholla koko tutkimusjakson (5 viikkoa) ajan (Marttinen ym. 2006). Septinen artriitti nosti vain vähän MMP-2 esiasteen pitoisuutta Kidd ym. (2007) mukaan, mutta artriitin hoito systeemisellä antibiootilla aiheutti edelleen MMP-2 esiasteen pitoisuuden lievää nousua, joka saattoi johtua sidekudoksen stimulaatiosta hoidon aikana. Korkeampi MMP-2 esiasteen pitoisuus saattaa johtua myös MMP-2:n roolista korjaavissa prosesseissa, jotka pääsevät käynnistymään vasta tulehduksen poistuttua (Kidd ym. 2007).

MMP-2, aktiivinen; Amphotericin B:llä indusoidussa artritissa MMP-2 aktiivisen muodon pitoisuus kuitenkin kohosi yli kolminkertaiseksi viikon kuluttua injektiosta. Pitoisuus alkoi laskea kahden viikon kuluttua injektiosta, mutta oli vielä yli kaksinkertainen normaaliarvoihin verrattuna tutkimuksen loppuessa viiden viikon seurannan jälkeen. Useiden niveltulehdusten jälkeen palautuminen normaalitilaan voi kestää kauemmin, ja tämä voi päteä myös MMP-2 arvoon. Tulehduskipulääkityksellä (bufeksiini) (taulukko 2) ei ollut vaikutuksia MMP-2 pitoisuuteen kontrolleihin verrattuna indusoidun akuutin artriitin mallissa (Marttinen ym. 2006). Kliininen akuutti tai krooninen trauma, kliininen osteokondroosi tai kliininen septinen artriitti ei vaikuttanut MMP-2 aktiivisen muodon pitoisuuteen (Trumble ym. 2001).

MMP-2, yhteenveto; MMP-2 esiasteen pitoisuus kohoaa selkeästi kroonisissa sairaustiloissa ja tätä ominaisuutta voisi hyödyntää ainakin tutkimusten alkuvaiheessa poissulkevana diagnoosina. Tarkkaan diagnoosiin saattaa olla hankala päästä pelkän MMP-2 esiasteen pitoisuutta arvioimalla, koska pitoisuus ei eroa eri kroonisten sairauksien välillä. Aktiivinen MMP-2 voisi olla toimiva biomarkkeri artriitille, koska sen pitoisuus indusoidussa artritissa nousi hyvin korkeaksi ja pysyi selkeästi normaalia korkeampana useamman viikon injektion jälkeen (Marttinen ym. 2006).

MMP-9, esiaste; Useiden tutkimusten mukaan kliininen septinen artriitti nostaa MMP-9 esiasteen pitoisuutta nivelnesteessä (Trumble ym. 2001, Kidd ym. 2007, Fietz ym. 2008). Systeeminen antibiootti kuitenkin laski selkeästi pitoisuutta (Kidd ym. 2007). MMP-9 esiasteen pitoisuus nousi voimakkaasti myös amphotericin B:llä indusoidun

artriitin seurauksena. Pitoisuus oli yli kolminkertaiset normaaliarvoon verrattuna viikon kuluttua injektiosta, mutta oli laskenut lähelle normaaliarvoja jo kahden viikon kuluttua. MMP-9 esiasteen pitoisuus nousi indusoinnin seurauksena huomattavasti korkeammaksi aktiiviseen muotoon verrattuna, jolloin voidaan olettaa, että esiastetta vapautetaan liiaksi verrattuna entsyymien aktivoimiseen (Marttinen ym. 2006). Osteoartriitti ja muut krooniset nivelsairaudet eivät Fietz ym. (2008) mukaan vaikuta MMP-9 esiasteen pitoisuuteen. Kuitenkin lähes puolella kroonisen trauman populaatiosta esiasteen pitoisuus oli kohonnut (Trumble ym. 2001). MMP-9 yhdistetään tulehdustilaan (Fietz ym. 2008), mutta koska osteoartriitti on jaksottainen sairaus, MMP-9 esiasteen pitoisuus voi olla alhainen sairauden hiljaisen jakson ajan ja nousta tulehdusjakson aikana (Trumble ym. 2001). Akuutti trauma ja osteokondroosi nostivat pitoisuutta noin puolella tutkimuspopulaatiosta (Trumble ym. 2001). Eroavaisuudet voisivat johtua siitä, että sairaudet voivat olla hyvinkin erityyppisiä ja erilaisissa vaiheissa.

MMP-9, aktiivinen; Myös MMP-9 aktiivisen muodon pitoisuus nousi selkeästi kliinisessä septisessä artriitissa (Trumble ym. 2001, Kidd ym. 2007), ja laski huomattavasti systeemisen antibiootin avulla (Kidd ym. 2007). Amphotericin B:llä indusoitu artriitti nosti pitoisuutta yli kaksinkertaiseksi normaaliarvoon verrattuna viikon kuluessa injektiosta. Kahden viikon kuluttua pitoisuus oli laskenut jo normaalitasolle. Viikon välein otettavat näytteet saattavat olla liian harvoin, jos halutaan tietää tarkemmin aktiivisen MMP-9 vaste indusoituun artriittiin (Marttinen ym. 2006). Kliininen akuutti tai krooninen trauma sekä osteoartriitti aiheuttivat MMP-9 pitoisuuden nousun vain muutamassa tapauksessa (Trumble ym. 2001). MMP-9 aktiivista muotoa havaittiin terveistäkin nivelistä vain hyvin pieniä määriä, joka voi tarkoittaa, että kroonisissa sairauksissa tai toisaalta hoidetuissa nivelissä pitoisuus voi olla liian alhainen tarkasti mitattavaksi (Kidd ym. 2007). Kuitenkin Jouglin ym. (2000) mukaan vakavat rustomuutokset monissa nivelsairauksissa, kuten osteokondroosi ja ruston rappeutumissairaudet, saivat aikaan MMP-9 aktiivisen muodon pitoisuuden nousun. Nivelessä, jonka rustossa on muutoksia, mutta subkondraaliluu on terve, kohonneet pitoisuudet eivät selity pelkästään ruston muutoksilla, vaan nivelkalvolla on mahdollisesti ollut myös tulehdus (Jouglin ym. 2000).

MMP-9, yhteenveto; MMP-9 aktiivisuus lisääntyy tulehdusprosessin edetessä, joten MMP-9 voisi olla varteenotettava biomarkkeri septiselle artriitille (Marttinen ym. 2006, Fietz ym. 2008). Neutrofiilit ovat ensisijainen MMP-9 lähde, ja tulosten perusteella MMP-9 esiasteen pitoisuutta voisi käyttää vaihtoehtoisena välineenä valkosoluille diagnosoitaessa sekä ennustetta tehdessä septisen artriitin yhteydessä (Fietz ym. 2008). MMP-9 vasteet tulehdusreaktioille olivat nopeita, voimakkaita ja lyhytkestoisia, joten oikein tulkittuna usean näytteen sarja voisi mielestäni antaa hyvinkin tarkkaa tietoa septisen artriitin aikajanasta. Toisaalta Jouglin ym. (2000) mukaan MMP-9 pitoisuus voidaan yhdistää nivelen rappeutumisprosesseihin. Amphotericin B:llä indusoidussa artriitissa kohonnut MMP-9 pitoisuus eivät reagoineet tulehduskipulääkitykseen (bufeksiini) (taulukko 1) (Marttinen ym. 2006).

Amphotericin B:llä indusoidun artriitin yhteydessä mitattu korkea ja hyvin pitkäkestoinen MMP-2 sekä esiasteen että erityisesti aktiivisen muodon pitoisuus saattaa merkitä, että MMP-2:lla on suurempi osuus nivelen rappeutumismuutosten kehittymisellä kuin MMP-9:llä. Sekä MMP-2 että MMP-9 esiasteena olevia sekä aktiivista muotoa löydettiin myös normaalien, terveiden hevosten nivelistä. MMP-9 pitoisuudet ovat huomattavasti alhaisempia kuin MMP-2 pitoisuudet. Voidaan arvela, että molemmat MMP-2 ja MMP-9 muodot kuuluvat pysyvästi myös kliinisesti normaaleihin niveliin, vaikkakin aktiivisen muodon pitoisuus on huomattavasti alhaisempi. Korkea MMP-2 esiasteen pitoisuus terveissä nivelissä saattaa merkitä, että sillä on olennainen ja homeostaattinen osa kudoksen uudistumisessa (Marttinen ym. 2006). Trumble ym. (2001) tutkimuksen mukaan sekä MMP-2 että MMP-9 esiasteita on suurempia pitoisuuksia sekä sairaisissa että terveissä nivelissä aktiivisten muotojen pitoisuuksiin verrattuna. Tutkijat arvelevat, että MMP-2 esiasteen pitoisuuksien nousu vaikuttaa positiivisesti MMP-9 aktivoitumiseen nivelen tulehdusreaktion aikana (Trumble ym. 2001).

3.2 Sytokiinit

Sytokiinit ovat yleinen nimitys suurelle määrälle pieniä säätelyproteiineja, joita tuotetaan monenlaisissa elimistön soluissa. Lukuisat sytokiinit kuuluvat nivelen metaboliaan ja niillä on proinflammatorisia (katabolisia), anti-inflammatorisia

(anabolisia) sekä säätelyyn liittyviä tehtäviä. Proinflammatoriset sytokiinit, kuten interleukiini-1 (IL-1) ja tumor necrosis factor- α (TNF- α), ovat tärkeitä osteoartriitissa. Sekä IL-1 että TNF- α vähentävät proteoglykaanien ja tyypin II kollageenin synteesiä sekä indusoivat proteolyyttisten entsyymien synteesiä ja erityistä (teoksessa Caron 2011). Muita hevosilla tutkittuja sytokiineja on esimerkiksi interleukiini-6 (IL-6).

3.2.1 TNF- α

Liikunta; Liikunta nosti TNF- α pitoisuutta lähes 2,5 kertaiseksi normaaliarvoon verrattuna. Harjoitusohjelman loputtua pitoisuus laski kuitenkin normaalitasolle 3 päivän kuluttua. Toistuva nivelinjektio ei vaikuttanut TNF- α pitoisuuteen (van den Boom ym. 2004).

Osteoartriitti; Kamm ym. (2010) totesivat odotetusti tutkimuksessaan, että vakava kliininen osteoartriitti nosti TNF- α pitoisuutta nivelnesteessä. Myös lievien ja kohtalaisiksi luokitelluiden osteoartriittien TNF- α -pitoisuus oli hieman koholla, mutta ei poikennut merkittävästi normaaliarvoista (Kamm ym. 2010). Kuitenkin Jouglin ym. (2000) ja Ley ym. (2006) tutkimusten mukaan erityyppiset kliiniset nivelvauriot, kuten eriaisteiset rustovauriot ja synoviitti, eivät vaikuttaneet TNF- α -pitoisuuteen. Täytyy muistaa, että kliinisissä tapauksissa sairauden aktiivisuus juuri niveltähystyksen hetkellä vaikuttaa suuresti sytokiinien määrään. Nähtävät muutokset voivat olla peräisin aiemmasta tai meneillään olevasta sairauden aktiivisesta hetkestä ja tämä voi selittää tutkimuksen tulokset (Ley ym. 2007). Jouglin ym. (2000) arvelivat tulokseen vaikuttavan sen, että hevoset olivat olleet levossa ennen näytteiden ottoa, jolloin nivelissä ei ole tulehdusta ja toisaalta sytokiinien antagonistien olemassaolo oli näytteenottohetkellä mahdollista. Hyvin vakavissa rustovaurioissa TNF- α -pitoisuus kuitenkin oli kohonnut (Jouglin ym. 2000). Myös Bertone ym. (2001) tutkimuksessa kliininen, vakava, akuutti niveltulehdus nosti TNF- α -pitoisuutta merkittävästi. Kroonisilla nivelsairauksilla ei ollut vaikutusta pitoisuuteen (Bertone ym. 2001).

Yhteenveto; TNF- α on selkeästi läsnä traumaattisessa artriitissa ja osteoartriitissa, mutta sen pitoisuus ei korreloi nivelvaurioiden vakavuusasteen kanssa (Ley ym. 2007, Jouglin ym. 2000). Ley ym. (2007) mukaan TNF- α :aa löytyi myös kliinisesti terveistä, harjoittamattomista nivelistä. Pitoisuus nousee selkeästi tulehduksissa, mutta se ei

kerro riittävästi nivelen sen hetkisestä tilanteesta yleisellä tasolla. TNF- α -pitoisuus normaalissa nivelessä, kroonisessa artriitissa tai nivelessä jossa on rustovaurioita, mutta ei synoviittia, on hyvin pieni ja alhainen. Akuutin, vakavan nivelsairauden biomarkkerina TNF- α :n rooli on kiistanalainen, sillä kliinikoiden on vaikeaa määrittellä, mikä akuutti, vakava nivelsairaus on (Bertone ym. 2001). Sairauden senhetkinen tila ja hevosen edellisten päivien liikunta vaikuttavat vahvasti sytokiinien erittymiseen. TNF- α -pitoisuuden muutos tuntuu liian epämääräiseltä, jotta sitä voisi luotettavasti käyttää nivelsairauksien diagnosoimiseen.

3.2.2 IL-1

Kliininen, akuutti, vakava nivelsairaus nosti IL-1-pitoisuuksia selkeästi. Tämä tulos oli odotettavissa, sillä akuutti niveltulehdus vapauttaa sytokiineja nivelnesteeseen (Bertone ym. 2001). Kamm ym. (2010) tekemässä tutkimuksessa testit eivät olleet vielä riittävän herkkiä löytämään matalaa IL-1 β -pitoisuutta nivelnesteestä, mutta nivelkalvolla tapahtuva geeniekspressio lisääntyi osteoartriitissa. Kuitenkin ekspressio oli voimakkainta kohtalaisessa osteoartriitissa vakavimman muodon sijaan (Kamm ym. 2010).

Yhteenvedo; Bertone ym. (2001) tutkimuksessa IL-1 β -pitoisuus normaaleissa etupolvinivelissä oli raja-arvoiltaan hyvin laaja, joka vaikeuttaa sen käyttöä biomarkkerina. IL-1-pitoisuudessa normaalissa nivelnesteessä oli hyvin suuria eroja, joka rajaa sen tarkkuutta eri sairauksien suhteen ja sitä kautta vaikeuttaa sen käyttöä nivelsairauksia diagnosoitaessa (Bertone ym. 2001). Bertone ym. (2001) tutkimuksessa suuri pitoisuusvaihtelu saattoi selittyä subkliinisillä ja mikroskooppisilla nivelen muutoksilla normaalihevosilla, sillä IL-1 erittyy jo hyvin varhaisessa vaiheessa nivelsairautta. Suuri vaihteluväli saattaa selittyä myös hevosten suurella ikävaihtelulla (3-10 vuotta). Tutkimuksessa käytettiin ihmisten vasta-aineiden mittaamiseen tarkoitettuja immuunimäärityksiä, joten tulokset saattavat senkin takia olla kyseenalaisia. Kaikki näytteet kerättiin etupolvinivelestä, joten vaihtelua eri nivelten välillä ei tässä tapauksessa ole (Bertone ym. 2001).

3.2.3 IL-6

IL-6-pitoisuus oli selkeästi kohonnut irtopalan sisältävän nivelen nivelnesteessä. Kuitenkaan matala IL-6-pitoisuus ei sulje irtopalojen mahdollisuutta pois. Muun tyyppisten nivelvaurioiden ei todettu merkittävästi nostavan IL-6-pitoisuutta nivelnesteessä. Tämä voi johtua siitä, että tutkimuksessa käytettiin luontaisesti nivelsairauksiin sairastuneita hevosia, joten näytteenottohetkellä sytokiinien aktiivisuus ei ehkä ollut huipussaan verrattuna indusoituihin nivelsairauksiin (Ley ym. 2007). Tässä tutkimuksessa vakavien rustovaurioiden määrä tutkimuspopulaatiossa oli vain kaksi näytettä, jolloin tutkimustulosta ei tältä osin voida pitää luotettavana. IL-6-pitoisuudessa ei todettu merkittävää eroa myöskään nivelpintojen tai ligamenttien ulkonäön perusteella. Nivelensisäisesti lääkityissä nivelissä todettiin IL-6-pitoisuuden olevan alhaisempi kuin lääkitsemättömissä (Ley ym. 2007). Bertone ym. (2001) totesivat tutkimuksessaan hyvin korkean IL-6-pitoisuuden liittyvän kliiniseen, vakavaan, akuuttiin nivelsairauteen.

Yhteenvedo; IL-6 on hyvin yleisesti löydettävissä erilaisissa nivelsairauksissa, ja sen tuotanto käynnistyy IL-1 vapautumisesta. IL-6 on herkkä ja tarkka biomarkkeri nivelsairauksiin ja se voisi olla erinomainen seulontatesti sellaisiin tapauksiin, joissa ontuminen on vaikeaa tunnistaa, se on epäsäännöllistä tai röntgenkuvalöydökset ovat moniselitteiset (Bertone ym. 2001). Ley ym. (2007) mielestä IL-6 voisi olla rajatusti käytetty biomarkkeri traumaattisessa artriitissa ja osteoartriitissa. Koska suurimmat IL-6-pitoisuudet löydettiin nivelistä, joissa oli irtopala, voitaisiin olettaa IL-6:n olevan tärkeä tekijä osteoartriitissa nähtävien nivelvaurioiden kehittymisessä. IL-6 rooli osteoartriitin patogeneesissä tarvitsee vielä lisää selvitystä (Ley ym. 2007). Koska irtopalat nostivat niin yksiselitteisesti IL-6-pitoisuuksia, tätä ominaisuutta voisi hyödyntää nivelsairauksien diagnosoinnissa.

3.3 Eikosanoidit

Eikosanoidit vapautuvat nivelnesteeseen lähes kaikissa nivelsairauksissa vain hieman eri variaatioilla ja ovat siten herkkiä nivelsairauksien indikaattoreita yleisellä tasolla (Bertone ym. 2001). Tutkittuja eikosanoideja ovat esimerkiksi prostaglandiini E₂ (PGE₂), prostaglandiini F_{1-α}, tromboksaani B₂ ja leukotrieni B₄ (LTB₄).

3.3.1 PGE₂

PGE₂- konsentraation nousu nivelnesteessä yhdistetään ontumiseen sekä nivelkipuun ja sitä vapautuukin nivelnesteeseen monissa nivelsairauksissa (Bertone ym. 2001). Tulehduskipulääke vähensi PGE₂:n vapautumista nivelnesteeseen, mikä oli odotettu tutkimustulos (taulukko 2) (de Grauw ym. 2009b). Kuitenkin de Grauw ym. (2006a) totesivat tutkimuksessaan, että PGE₂-pitoisuudessa ei ollut merkittävää eroa nivelissä, jotka reagoivat nivelensisäiseen puudutteeseen positiivisesti negatiivisesti reagoiviin verrattuna. Toisaalta nivelkipu voi olla peräisin myös niveltä ympäröivien kudosten prosesseista nivelen sisäisten prosessien lisäksi, jolloin nivelen sisäinen puudute ei poista kipua (de Grauw ym. 2006a).

Liikunta; Liikunta ei vaikuttanut PGE₂-pitoisuuteen nivelnesteessä. Osteokondraalisella irtopalalla indusoitu osteoartriitti yhdistettynä liikuntaan sen sijaan nosti pitoisuutta selkeästi. Pitoisuus oli korkeimmillaan viikon päästä injektiosta, jolloin se oli kolminkertainen alkuperäiseen arvoon verrattuna. Kolmen viikon kuluttua injektiosta PGE₂-pitoisuus alkoi laskea, mutta oli vielä 13 viikonkin kuluttua injektiosta kaksinkertainen alkuperäiseen arvoon verrattaessa (Frisbie ym. 2008).

LPS-indusoitu synoviitti; Tutkijat ovat yhtä mieltä siitä, että PGE₂- konsentraatio nivelnesteessä kasvaa synoviitin (Bertone ym. 2001, de Grauw ym. 2009a, Ross ym. 2012, Lucia ym. 2013), kroonisten nivelsairauksien yhteydessä (Bertone ym. 2001) sekä osteokondroottisissa nivelissä (de Grauw ym. 2006b). Tutkimuksissa on saatu erilaisia tuloksia siitä, kuinka nopeasti PGE₂-pitoisuus kasvaa nivelnesteessä LPS-indusoidun synoviitin jälkeen. Ross ym. (2012) sekä de Grauw ym. (2009a) mukaan korkeimmat konsentraatiot mitattiin neljästä kahdeksaan tuntiin injektion jälkeen. Lucia ym. (2013) totesivat tutkimuksessaan PGE₂-pitoisuuksien olleen korkeimmillaan vasta 12 tuntia injektion jälkeen. Tämä ero saattaa selittyä sillä, että Lucia ym. (2013) käyttivät tutkimuksessaan alle vuoden ikäisiä hevosia. De Grauw ym. (2009a) tutkimustulosten mukaan PGE₂-konsentraatio oli palannut ennalleen jo 24 tuntia injektiosta, kun taas Ross ym. (2012) konsentraatio oli koholla vielä 48 tunnin kuluttua injektiosta ja Lucia ym. (2013) mukaan vielä kahden viikon kuluttua injektiosta. PGE₂ on lyhytikäinen yhdiste, joten se selittää pitoisuuden nopeaa palautumista (de Grauw ym. 2009a). Sekä Ross ym. (2012) että Lucia ym. (2013) tutkimuksissa nivelnesteitä otettiin useammin kuin de Grauw ym. (2009a) tutkimuksessa, ja myös kontrollinivelten PGE₂-

pitoisuus oli Ross ym. (2012) sekä Lucia ym. (2013) tutkimuksissa koholla. Tutkijat arvelivat useiden niveliin tehtävien pistosten pitävän PGE₂-pitoisuutta koholla pidempään.

Osteokondroosi; De Grauw ym. (2006b) totesivat tutkimuksessaan PGE₂-pitoisuuden kohonneen osteokondroosipotilaiden nivelnesteessä, vaikka yksikään hevonen ei ontunut. Tämä aiheutti pohdintaa siitä, kuinka läheisesti nivelkipu ja kohonnut PGE₂-pitoisuus liittyvät toisiinsa. De Grauw ym. (2006b) tutkimuspopulaatiossa osteokondroosiniveliin kertyi kuitenkin nestettä, joka on primäärinen kliininen oire kohonneesta PGE₂-pitoisuudesta. vuoden ikäisillä varsoilla PGE₂-pitoisuuden todettiin olevan matalampi nivelissä, jotka kehittävät osteokondroosin kuin terveissä nivelissä. Tutkijat eivät osanneet selittää tätä tulosta (de Grauw ym. 2011).

Kipulääke; LPS-indusoidun synoviitin kohonnut PGE₂-pitoisuus laski selkeästi nivelensisäisen morfiini-injektion seurauksena plaseboryhmään verrattuna. Morfiini-injektio annettiin tunnin päästä LPS-injektiosta. Suurin muutos PGE₂-pitoisuudessa oli neljän tunnin kuluttua LPS-injektiosta, jolloin morfiinin vaikutuksesta pitoisuus oli vain kolmanneksen plaseboryhmään verrattuna. Morfiinilla voi siis olla anti-inflammatorisia vaikutuksia akuutissa synoviitissa (van Loon ym. 2010).

Terveiden nivelten PGE₂-konsentraatio on hyvin alhainen ja onkin mahdollista, että PGE₂ vapautuu ”kaikki tai ei mitään”-periaatteella ja sen vapautuminen nivelnesteeseen tapahtuu vasteena niin ruston vaurioitumiselle kuin tulehdusreaktioillekin. Tämän vuoksi PGE₂ voidaan pitää erinomaisena biomarkkerina nivelsairauksille (Bertone ym. 2001). Toisaalta PGE₂ vapautuu siis runsain määrin kaikentyypisissä nivelsairauksissa, jolloin tarkka diagnoosin tekeminen saattaisi olla hyvin vaikeaa pelkän PGE₂-pitoisuuden perusteella.

3.3.2 LTB₄

LTB₄-pitoisuus todettiin nousseen melkein kaksinkertaiseksi osteokondroosinivelissä terveisiin niveliin verrattuna 24-48 kuukauden ikäisillä hevosilla. Osteokondroosissa subkondraaliluu tulee näkyviin ja saattaa olla kosketuksissa nivelonteloon. Onkin arveltu, että osteokondroosinivelessä osa LTB₄:stä saattaa syntyä subkondraaliluussa

(de Grauw ym. 2006b). Toisaalta nuoremmilla varsoilla (18-52 viikkoa) LTB₄-pitoisuus nivelten, jotka myöhemmin kehittävät osteokondroosin, ja kontrollien välillä ei ollut merkittävää eroa. Varsojen LTB₄-pitoisuus nousi kuitenkin iän myötä. (de Grauw ym. 2011). Bertone ym. (2001) olettivat LTB₄-pitoisuuden olevan hyvin korkea vakavissa, akuuteissa nivelsairauksissa verrattuna normaaliarvoihin, mutta merkittävää eroa ei havaittu. Syynä voi olla liian pieni tutkimuspopulaatio (n=5).

Yhteenvedo; LTB₄ saattaisi olla tulevaisuudessa varteenotettava biomarkkeri, sillä PGE₂:n tapaan, se tuntuu erittyvän ”kaikki-tai-ei-mitään”-periaatteella, joka on hyvä ominaisuus diagnosointia ajatellen. Tutkimuksia LTB₄ käyttäytymisestä erialaisissa nivelen sairaustiloissa tarvittaisiin kuitenkin huomattavasti lisää.

3.4 MUUT

3.4.1 Substanssi P

Substanssi P on neuropeptidi, joka esiintyy sekä keskushermostossa että perifeerisessä hermostossa. Perifeerisessä hermostossa sitä on primaarisissa afferenteissa neuroneissa, jotka vastaanottavat, monistavat ja lähettävät kipuun liittyviä impulsseja keskushermostoon. Primaarisen afferentin neuronin stimulaatio vapauttaa substanssi P:tä, ja tämä mahdollisesti käynnistää paikallisen tulehdusreaktion (Marshall ym. 1990).

De Grauw ym. (2006a) tutkivat substanssi P-pitoisuuksia ontuvien hevosten nivelissä. Substanssi P-pitoisuus oli selkeästi koholla sellaisissa nivelissä, joiden kipu saatiin loppumaan nivelen sisäisellä puudutteella (lidokaiini HCl 2%). Tästä voitaisiin päätellä, että substanssi P:llä on tärkeä osa hevosten nivelten kipureseptoreissa (de Grauw ym. 2006a).

Osteoartriitti; Myös kliinisen osteoartriitin todettiin nostavan selkeästi substanssi P-pitoisuutta nivelnesteessä, vaikkakin odotettua vähemmän. Todennäköisesti indusoitu tulehdus aiheuttaa huomattavasti suuremman substanssi P:n vapautumisen kliinisiin nivelsairauksiin verrattuna. Kuitenkaan substanssi P-pitoisuus ja osteoartriittisten nivelten röntgenkuvat eivät korreloineet keskenään. Toisaalta substanssi P on ensisijaisesti merkki aktiivisesta niveltulehduksesta, ja röntgenkuvathan eivät kerro

nivelkapselin sisällä olevien pehmytkudosten senhetkisestä tulehdustilasta. Tulokseen saattaa vaikuttaa myös tutkimuksen pieni otoskoko (n=10) (Kirker-Head ym. 2000).

LPS-indusoitu synoviitti; LPS-injektiolla indusoidussa synoviitissa substanssi P-pitoisuus nousi selkeästi 8 tuntia injektion jälkeen ja oli koholla vielä 24 tuntia injektioista. Viikon kuluttua pitoisuus oli laskenut normaalitasolle (de Grauw ym. 2009a). LPS-indusoidussa synoviitissa substanssi P-pitoisuus laski tulehduskipulääkkeen vaikutuksesta (taulukko 2) (de Grauw ym. 2009b), mutta nivelen sisäinen morfiini-injektio ei vaikuttanut substanssi P-pitoisuuteen plaseboryhmään verrattaessa. Tämä voi johtua siitä, että opioidien vaikutus perustuu lähinnä presynaptiseen kontrolliin, kun taas substanssi P kuuluu ensisijaisesti afferentteihin kipureseptoreihin (van Loon ym. 2010).

Yhteenveto; Tutkimuksen tulokset antavat uskottavuutta ajatukselle, että substanssi P:llä on osuutta kliinisten nivelsairauksien patogeenisissä ja antaa siten ajattelunaihetta uusiin kipua lievittäviin ja hoidollisiin strategioihin (Kirker-Head ym. 2000). Substanssi P on alkuperältään hyvin erityyppinen biomarkkeri muihin paljon tutkittuihin biomarkkereihin verrattuna. Tähän mennessä tehtyjen tutkimusten perusteella substanssi P:llä vaikuttaisi olevan hyvän biomarkkerin ominaisuuksia, mutta varmasti tarvitaan vielä lisätutkimuksia, ennen kuin molekyyli saadaan kliinisten niveltutkimusten työkaluksi.

4 POHDINTA

Tutkimuksia nivelnesteeseen biomarkkereista hevosen nivelsairauksissa on tehty paljon, mutta tulokset ovat yhteneväisiä valitettavan harvoin. Nivelessä on paljon eri rakenteita, jotka kaikki läpikäyvät sairauden aiheuttamat muutokset omassa tahdissaan. Kaikkien rakenteiden biomarkkerit erittyvät nivelnesteeseen, mikä saattaa aiheuttaa ristiriitoja kliinisen kuvan ja biomarkkereiden pitoisuuksien välillä.

Suorat markkerit erittyvät suoraan nivelen rustokudoksesta ja kertovat rustossa tapahtuvasta muutoksesta. Kuitenkin useat nivelsairaudet aiheuttavat rustomuutoksia, joten kovin tarkan diagnoosin tekeminen voi olla haasteellista. Epäsuorista markkereista MMP ja PGE₂ vapautuivat kaikentyypisissä nivelsairauksissa, joten

niiden perusteella voitaneekin todeta vain, että nivel ei ole terve. Sytokiineista saadut tulokset olivat ristiriitaisia ja pitoisuuden määrittämisessä oli myös ongelmia. Ilmeisesti hevosille tarkoitettuja vasta-ainemäärittäyksiä ei ole markkinoilla, ja ihmisille tarkoitetuilla testeillä tulokset eivät ole luotettavia. 90-luvulla interleukiini-pitoisuuksiin liittyviä tutkimuksia on julkaistu paljon, mutta 2000-luvulla vain muutama. Ilmeisesti myös tutkijat ovat huomanneet, että saadut tulokset eivät välttämättä ole käyttökelpoisia.

Biomarkkereiden erityyppiseen saattaa vaikuttaa hevosen ikä, viimeaikainen liikunta, aiempi ja meneillään oleva lääkitys sekä mahdollisesti myös hevosen rotu. Joidenkin biomarkkereiden pitoisuudet vaihtelivat myös eri nivelten välillä. Käytössä on myös erilaisia tutkimusmenetelmiä, joiden tuloksia ei tietenkään voi verrata toisiinsa. Hevosilla on käytetty niin ihmisille kuin kaneillekin tarkoitettuja vasta-aineita, mikä voi myös aiheuttaa epätarkkuutta tuloksiin. Viiterajat pitäisi siis kartoittaa jokaiselle nivellelle jokaisesta ikäryhmästä erikseen. Tutkimusmenetelmän tulisi olla aina sama, ja hevosten otot tarkoin kartoitettuja ennen näytteenottoa. Jos jonkinlaiset viitearvot saataisiin määritettyä, myös potilaiden tulisi olla samoista olosuhteista, jotta tuloksia voitaisiin arvioida. Arvelisin, että erityisesti lääkitysten kohdalla tämä voisi olla haasteellista. Todellista diagnostista hyödyntämistä ajatellen nivelnesteeseen biomarkkerit taitavat olla liian herkkiä reagoimaan ulkopuolisiin ärsykkeisiin.

Taulukko 2. Kokeelliset tutkimukset

KIRJOITTAJA	TUTKIMUSPOPULAATIO JA OTOSKOKO	TUTKITUT BIOMARKKERIT	KOKEEN SUORITUS	KONTROLLI	JOHTOPÄÄTÖKSET
de Grauw ym. 2009a	5-8 v, N=6	PGE ₂ , substanssi P, MMPt, CPII, C2C, CS-846, GAG	LPS-indusoitu synoviitti: 0,5ng injektio		PGE ₂ nousi korkeimmilleen 8 tuntia injektioista. Substanssi P sekä aktiivisen MMP nousivat suurimmilleen 8h ja 24h injektioista. GAG ja CS-846 nousivat hitaammin. Huippupitoisuudet 24h injektioista. C2C ja CPII korkeimmillaan 24h injektioista ja 168h päästä injektioista pitoisuudet vielä koholla.
de Grauw ym. 2009b	N=6	CPII, C2C, GAG, CS-846, PGE ₂ , substanssi P, MMP	LPS-indusoitu synoviitti, 0,5ng injektio. Suun kautta meloksikaamia kerran päivässä 0,6mg/kg viikon ajan.	N=3 plasebo-lääkitys suun kautta	Kaikki laskivat selkeästi meloksikaamia saaneilla hevosilla plaseboihin verrattuna.
de Grauw ym. 2006a	Ontuvia hevosia, N=22	substanssi P, CPII, C2C, GAG, PGE ₂ , LTB ₄	testattiin vastetta nivelensisäiseen puudutteeseen ja markkereiden pitoisuuksia mitattiin sekä positiivisen ja negatiivisen vasteen antavista nivelistä		Substanssi P koholla positiivisen puudutevasteen nivelissä (ontuminen loppui). CPII, C2C, GAG ja PGE ₂ -pitoisuuksissa ei merkittäviä eroja positiivisen ja negatiivisen vasteen antavien nivelten välillä.
Frisbie ym. 2008	2v, N=16	CS-846, CPII, GAG, PGE ₂	toiseen etupolvi niveleen indusoiitiin osteokondraalisella irtopalalla OA, toiseen plasebo-injektio (N=8), Tällä ryhmällä + terveellä ryhmällä (N=8) harjoitusohjelma	N=8	liikunta nosti CS-846:a, CPII:a ja GAG:a. Olivat korkeimmat OA-indusoidussa nivelessä. PGE ₂ ei reagoanut, mutta OA-indusoidussa nivelessä pitoisuus nousi selkeästi kaksi viikkoa injektion jälkeen.
Lucia ym. 2013	vastavieroitettuja varsoja. N=19	PGE ₂ , CPII, C2C	LPS-indusoitu synoviitti: 0,25ng injektio N=7, 0,50ng injektio N=6	N=6 ringer-liuos	CPII nousi injektion jälkeen. Huippupitoisuus mitattiin 6h ja 24h injektioista. Pitoisuus oli palautunut normaalitasolle 336h injektion jälkeen. Nivel tulehdus nostaa PGE ₂ :a, huippu 12h injektioista ja oli edelleen koholla 336h kuluttua injektioista. C2C laski ensimmäiset 6h injektioista. 24h injektion jälkeen pitoisuus nousi selvästi. 336h kuluttua injektioista pitoisuus oli normaalitasolla.

Marttinen ym. 2006	3-7 v, N=24	MMP-2, MMP-9	Amfoterisiini B:llä indusoitu (20mg) aseptinen artriitti. Viikon ja kahden viikon päästä NSAID-lääkitys; annos 10mg, 20mg tai 40mg.	N=6, plasebo-hoito	Indusoitu OA nosti sekä MMP-2:a että MMP-9:ää NSAID-lääkitys ei vaikuttanut MMP-arvoihin.
Piat ym. 2011	N=6	CS-846, CPII, C2C	Kaksivaiheisesti indusoitu toksinen tila: 1. 05% bupivakaiinia interkarpaaliniveleen, 2. 2% lidokaiinia tarsokruraaliniveleen.	vastakkaisen raajan nivelet, 0,9% NaCl-injektio	Bupivakaiini: CPII koholla päivinä 1 ja 2 injektion jälkeen, CS-846 koholla 12h sekä päivänä 1, C2C ei merkittäviä eroja kontrolliin verrattuna, pitoisuus laski 12h injektioista. Lidokaiini: CPII ei merkittäviä eroja kontrolliin nähden, mutta pitoisuus nousi 2 pvää injektioista, CS-846 selvästi koholla 12h injektioista kontrolliin verrattuna, normaaliarvoihin verrattuna koholla päivinä 1 ja 2 injektion jälkeen. C2C ei merkittäviä eroja kontrolliin, normaaliarvoihin verrattuna pitoisuus laski 6h injektioista.
Robion ym. 2001	N=10	CS-846, CPII	kahden viikon välein kolme metyyliiprednisoloni-injektioita (á la 60mg)	kontraleteraalinivelet, plasebo-injektio	CS-846 kohosi viikon päästä 1. injektioista kuusinkertaiseksi. 2. injektio vaikutti melkein yhtä voimakkaasti, 3. ei ollut vastaavaa vaikutusta. Pitoisuus palautui jopa kontrolliniveliin pitoisuuksien alapuolelle 3vkoa viimeisen injektion jälkeen. CPII ei muuttunut ensimmäisestä injektioista, toisen injektion jälkeen pitoisuus laski selvästi sekä kontrolliniveltten että normaaliarvojen alapuolelle ja pysyi siellä kaksi viikkoa vielä kolmannen injektion jälkeen. Pitoisuus oli normaaliarvojen alapuolella vielä 5vkoa viimeisen injektion jälkeen.
Ross ym. 2012	N=12, normaalit etupolvinivelet.	PGE ₂ , MMP, GAG	LPS indusoitu synoviitti ja reL-1 β -indusoitu OA: 0,50ng injektio N=6 ja reL-1 β 100ng injektio N=6.	kontralateraalinivelet, steriili liuos-injektio	MMP nousi niveltulehduksessa. Myös PGE ₂ nousi niveltulehduksessa ja oli korkeimmillaan neljästä kahdeksaan tuntiin injektioista. GAG nousi etenkin synoviitissa 24h kohdalla, mutta myös kontrollit nousivat normaaliarvojen yläpuolelle. reL-1 β -indusoidussa nivelessä GAG nousi myös, ja myös kontrollin pitoisuus nousi lähes samalle tasolle.
van den Boom ym. 2004	5-17v. N=16	MMP, TNF- α	harjoitusohjelma, N= 8, karsinalepo, N=8		MMP nousi toistuvista nivelinjektioista, mutta liikunta ei nostanut pitoisuuksia. TNF- α nousi liikunnan takia, mutta toistuvat nivelinjektiot eivät vaikuttaneet pitoisuuksiin.
van Loon ym. 2010	N=8	PGE ₂ , substanssi P	LPS-indusoitu synoviitti: 0,50ng injektio. 120mg morfiini- injektio tunnin kuluttua.	X	Morfiini laski PGE ₂ :tta, selkeimmin 4h LPS-injektioista. Substanssi P ei muuttunut morfiinin vaikutuksesta.

OA= osteoartriitti

Taulukko 3. Kliiniset tutkimukset

KIRJOITTAJA	TUTKIMUSPOPULAATIO JA OTOSKOKO	TUTKITUT BIOMARKKERIT	KONTROLLI	JOHTOPÄÄTÖKSET
Arai ym. 2005	Kilpahevosiä, joilla on OA, OC tai irtopaloja. N=100	COMP	n=80	OA nostaa konsentraatiota.
Bertone ym. 2001	Akuutti nivelsairaus N=28, krooninen nivelsairaus N=32, rustovaurioita N=9	TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE ₂ , LTB ₄	X	TNF- α koholla erityisesti akuuteissa, vakavissa nivelsairauksissa mutta myös kroonisissa tiloissa. IL-1 β suurta vaihtelua terveidenkin nivelten välillä -> raja-arvojen määrittäminen vaikeaa. Akuutissa, vakavassa nivelsairaudessa IL-1 β ja IL-6 huomattavasti koholla. PGE ₂ koholla kaikentyyppisissä nivelsairauksissa. LTB ₄ konsentraatio nousi akuutissa, vakavassa nivelsairaudessa.
Brama ym. 2004	lopetettuja, terveitä hevosia. N=14. Eri ikäisiä terveitä varsoja. N=10 jokaisesta ikäluokasta (sikiö, 5kk, 11kk, aikuinen)	MMP-1	X	MMP-1 oli kohonnut OA:ssa. Mitä nuorempi eläin, sitä korkeammat MMP-1-pitoisuudet.
Brama ym. 1998	hevosia, joilla OA N=22, hevosia, joilla OC ikä 5kk N=8, ikä 11kk N=6	MMP	X	Mitä nuorempi hevonen, sitä suuremmat MMP-pitoisuudet. OA nostaa MMP-pitoisuutta. OC ei muuta MMP-pitoisuutta.
de Grauw ym. 2011	18-52 vko:n ikäisiä varsoja, jotka kehittivät OC:n 24 tai 48 viikon ikään mennessä. N=22	CPII, C2C, CS-846, GAG, MMP, PGE ₂ , LTB ₄	n= 18	CPII korkeammat, CS-846 matalammat, C2C ja GAG matalammat 18 ja 22 vkon iässä ja hieman korkeammat 52vkon iässä. MMP ja LTB ₄ nousivat iän myötä, OC:lla ei vaikutusta. PGE ₂ hieman matalampi OC-potilailla kuin kontrolleilla.
de Grauw ym. 2006b	ikänsä 24-48 kk, joilla OC distaalissa koipiluun keskihajanteessa. N=22	CPII, C2C, GAG, PGE ₂ , LTB ₄	n=16	CPII, C2C ja GAG eivät eroa OC -ja normaalinivelen välillä. PGE ₂ korkeampi OC:ssa kuin kontrolleissa. LTB ₄ kohosi OC:ssa.
Fietz ym. 2008	ei-septisiä nivelsairaita ja septisiä artriitteja. N=62	MMP-2, MMP-9	n=18	MMP-2 ja MMP-9 nousevat sekä septisissä että ei-septisissä nivelsairauksissa. Ei-septinen nivelsairaus ei muuta aktiivista MMP-9:ä. Aktiivinen MMP-2 nousee sekä septisessä että ei-septisessä tulehduksessa. Aktiivinen MMP-9 nousee heti septisen niveltulehduksen alkuvaiheessa. MMP-2 saattaa liittyä myös kroonisiin nivelvaivoihin akuutin tulehduksen lisäksi.
Fuller ym. 2001	kilpahevosiä, joilla oli todettu varhainen nivelrikko. N=22	GAG	vastakkainen raaja	GAG ei muuttunut.
Jouglin ym. 2000	N=90, joilla rappeumasairaus, OC tai muutoksia rustossa, mutta ei subkondraaliluussa	TNF- α , MMP-2, MMP-9		MMP-pitoisuuksiin ei vaikuttanut nivelen tyyppi eikä muutosten laatu. Vakavat muutokset nostivat MMP-9:ää. TNF- α ei korreloinut mitenkään eri muutoksiin tai niiden vakavuusasteisiin.
Kamm ym. 2010	Hevosia, joilla OA. N=36	TNF- α , IL-1 β	n=22	TNF- α nousi vakavassa niveltulehduksessa. Lievemmissä niveltulehduksissa ero ei merkittävä. IL-1 β pitoisuudet ovat niin matalia, että testit eivät ole vielä riittävän herkkiä havaitakseen muutoksia.
Kidd ym. 2007	Niveliä (N=32), joissa septinen artriitti. Ei hoitoa N=20, systeeminen antibiootti N=19.	MMP-2, MMP-9	n=39	Septisessä OA:ssa sekä esiaste että aktiivinen MMP-9 nousi selvästi. MMP-2 esiasteessa ei ollut merkittävää muutosta. Systeeminen ab laski selkeästi aktiivisen sekä esiasteen MMP-9:ää
Kirker-Head ym.	OA nivelnestenäytteitä. N=16	Substanssi P, PGE ₂	n=46	Substanssi P ja PGE ₂ oli selvästi kohonnut OA:ssa.

2000

Laverty ym. 2000	OC-potilaita, ikä 9-18kk ja 24-48kk, N=21	CPII, CS-846	n=55	CS-846 ja CPII oli selvästi korkeampia terveillä nuorilla kuin aikuisilla. Nuorilla OC laski CS-846:a, aikuisilla ei eroa. CPII nousi OC:lla nuorilla, ei eroa aikuisilla.
Lettry ym. 2010	OC-potilaita, ikä 8-42kk; N= 17, nivelmurtuma, N=7	C2C, CPII	n=12, kontralateraalisia niveliä.	C2C nousi OC:ssa, mutta ei murtumanivelissä. CPII nousi murtumanivelissä, mutta ei OC:ssa. Kumatkaan pitoisuudet eivät korreloineet niveltähystyslöydösten kanssa.
Ley ym. 2007	Ontuvia urheiluhevosia (N=51). Osalla (N=36) nivelen sisäistä hoitoa.	TNF- α , IL-6	n=6	TNF- α :ssa ei eroja eri nivelsairauksien välillä. IL-6 nousi nivelissä, joissa oli irtopala. Muun tyyppiset nivelaauriot eivät nostaneet IL-6 pitoisuuksia.
Misumi ym. 2001	aseptiset nivelsairaudet ja septiset nivelsairaudet. N= 123	COMP	n=40	COMP laski sekä aseptisissä että septisissä sairauksissa. Aseptisten ja septisten pitoisuudet eivät merkittävästi eronneet toisistaan.
Nicholson ym. 2010	OC- hevosia; N=41. 1-2v hevosia; N=40. aikuisia, terveitä; N=19	CPII, C2C	X	CPII korkeampi OC-ryhmän etupolvinivelessä aikuisryhmään verrattuna, mutta vuohisnivelessä ei eroa. OC-ryhmän etupolvinivelissä suurempi CPII-pitoisuus kuin vuohisnivelissä. C2C selkeästi korkeampi OC-ryhmän etupolvi- ja vuohisnivelissä aikuisryhmään verrattuna. 1-2v-ryhmässä C2C oli aikuisryhmää selkeästi korkeammalla vuohisnivelissä. C2C oli korkeampi etupolvinivelissä kuin vuohisissa sekä OC- että aikuisryhmällä.
Skiöldebrand ym. 2005	lämminveriravureita (STB) N=49, täysiverisiä (TB) N=14. Hevosilla OC ja eriasteisia rustomuutoksia	COMP	n=5	TB: OC nostaa COMP:ia. STB: OC laskee COMP:ia ja lievät rustomuutokset aavistuksen nostavat.
Skiöldebrand ym. 2001	lämminveriravureita (STB) N=52, puoliverisiä ratsuja (SWH) N=21 nivelissä eriasteisia rustomuutoksia	COMP	STB; n=16, SWH; n=8	STB: lievissä ja kohtalaisissa rustomuutoksissa COMP laskee, vakavassa nousee. SWH: korkeimmat pitoisuudet lievissä rustomuutoksissa, kohtalaisissa ja vakavissa vain hieman kohonneet pitoisuudet.
Taylor ym. 2006	25 näyttettä ontuvista hevosista.	COMP	n=25	COMP alenee OA:ssa.
Trumble ym. 2009	OC-potilaita, N=27	C2C	n=20	OC nostaa C2C-pitoisuutta.
Trumble ym. 2001	akuutti trauma, krooninen trauma, OC tai septinen nivelsairaus. N= 76	MMP-2, MMP-9	n=5	MMP-2 esiaste koholla akuutissa ja kroonisessa traumassa, laskenut selvästi septisessä nivelsairaudessa. Aktiivinen MMP-2 ei muutu. Aktiivinen MMP-9 kohoa kaikissa, eniten OC:ssa. MMP-9 esiaste koholla akuutissa ja kroonisessa traumassa, OC:ssa jonkun verran, septisessä nivelsairaudessa vähän koholla.
van den Boom ym. 2005	Aikuisia teurashevosia. n=60.	GAG, MMP		GAG:n pitoisuus saattaa nousta, mikäli nivelrusto on vakavasti vaurioitunut.

OA=osteoartriitti. OC= osteokondroosi

5 LÄHTEET

Artikkelit

Arai K, Misumi K, Carter SD, Shinbara S, Fujiki M, Sakamoto H. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. *Equine Vet J* 2005, 37: 31-36.

Bertone AL, Palmer JL, Jones J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Vet Surg* 2001, 30: 528-538.

Brama PA, TeKoppele JM, Beekman B, van Weeren PR, Barneveld A. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. *Ann Rheum Dis* 1998, 57: 697-699.

Brama PA, van den Boom R, DeGroot J, Kiers GH, van Weeren PR. Collagenase-1 (MMP-1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. *Equine Vet J* 2004, 36: 34-40.

de Grauw JC, van de Lest CH, van Weeren R, Brommer H, Brama PA. (2006a) Arthrogenic lameness of the fetlock: synovial fluid markers of inflammation and cartilage turnover in relation to clinical joint pain. *Equine Vet J* 2006, 38: 305-311.

de Grauw JC, Brama PA, Wiemer P, Brommer H, van de Lest CH, van Weeren PR. (2006b) Cartilage-derived biomarkers and lipid mediators of inflammation in horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. *Am J Vet Res* 2006, 67: 1156-1162.

de Grauw JC, van de Lest CH, van Weeren PR. (2009a) Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. *Arthritis Res Ther* 2009, 11: R35.

de Grauw JC, van de Lest CH, Brama PA, Rambags BP, van Weeren PR. (2009b) In vivo effects of meloxicam on inflammatory mediators, MMP activity and cartilage biomarkers in equine joints with acute synovitis. *Equine Vet J* 2009, 41: 693-699.

de Grauw JC, Donabedian M, van de Lest CH, Perona G, Robert C, Lepage O, Martin-Rosset W, van Weeren PR. Assessment of synovial fluid biomarkers in healthy foals and in foals with tarsocrural osteochondrosis. *Vet J* 2011, 190: 390-395.

Fietz S, Einspanier R, Hoppner S, Hertsch B, Bondzio A. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. *Equine Vet J* 2008, 40: 266-271.

Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, Kawcak CE, McIlwraith CW. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16: 1196-1204.

Fuller CJ, Barr AR, Sharif M, Dieppe PA. Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9: 49-55.

Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Innes JF, Clegg PD. (2010a) Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *Vet J* 2010, 185: 36-42.

Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Clegg PD, Innes JF. (2010b) Biomarkers of cartilage turnover. Part 2: Non-collagenous markers. *Vet J* 2010, 185: 43-49.

Jouglin M, Robert C, Valette JP, Gavard F, Quintin-Colonna F, Denoix JM. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. *Vet Res* 2000, 31: 507-515.

Kamm JL, Nixon AJ, Witte TH. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. *Equine Vet J* 2010, 42: 693-699.

Kidd JA, Barr AR, Tarlton JF. Use of matrix metalloproteinases 2 and 9 and white blood cell counts in monitoring the treatment and predicting the survival of horses with septic arthritis. *Vet Rec* 2007, 161: 329-334.

Kirker-Head CA, Chandna VK, Agarwal RK, Morris EA, Tidwell A, O'Callaghan MW, Rand W, Kumar MS. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. *Am J Vet Res* 2000, 61: 714-718.

Lavery S, Ionescu M, Marcoux M, Boure L, Doize B, Poole AR. Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* 2000, 18: 399-405.

Lettry V, Sumie Y, Mitsuda K, Tagami M, Hosoya K, Takagi S, Okumura M. Divergent diagnosis from arthroscopic findings and identification of CPII and C2C for detection of cartilage degradation in horses. *Jpn J Vet Res* 2010, 57: 197-206.

Ley C, Ekman S, Elmen A, Nilsson G, Eloranta ML. Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007, 54: 346-351.

Lucia JL, Coverdale JA, Arnold CE, Winsco KN. Influence of an intra-articular lipopolysaccharide challenge on markers of inflammation and cartilage metabolism in young horses. *J Anim Sci* 2013, 91: 2693-2699.

- Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum* 1990, 33: 87-90.
- Marttinen PH, Raulo SM, Suominen MM, Tulamo RM. Changes in MMP-2 and -9 activity and MMP-8 reactivity after amphotericin B induced synovitis and treatment with bufexamac. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006, 53: 311-318.
- Misumi K, Vilim V, Clegg PD, Thompson CC, Carter SD. Measurement of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in normal and diseased equine synovial fluids. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9: 119-127.
- Nicholson AM, Trumble TN, Merritt KA, Brown MP. Associations of horse age, joint type, and osteochondral injury with serum and synovial fluid concentrations of type II collagen biomarkers in Thoroughbreds. *Am J Vet Res* 2010, 71: 741-749.
- Piat P, Richard H, Beauchamp G, Laverty S. In vivo effects of a single intra-articular injection of 2% lidocaine or 0.5% bupivacaine on articular cartilage of normal horses. *Vet Surg* 2012, 41: 1002-1010.
- Robion FC, Doize B, Boure L, Marcoux M, Ionescu M, Reiner A, Poole AR, Laverty S. Use of synovial fluid markers of cartilage synthesis and turnover to study effects of repeated intra-articular administration of methylprednisolone acetate on articular cartilage in vivo. *J Orthop Res* 2001, 19: 250-258.
- Ross TN, Kisiday JD, Hess T, McIlwraith CW. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20: 1583-1590.
- Skiöldebrand E, Lorenzo P, Zunino L, Rucklidge GJ, Sandgren B, Carlsten J, Ekman S. Concentration of collagen, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid from equine middle carpal joints. *Equine Vet J* 2001, 33: 394-402.
- Skiöldebrand E, Heinegard D, Eloranta ML, Nilsson G, Dudhia J, Sandgren B, Ekman S. Enhanced concentration of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in osteochondral fractures from racing Thoroughbreds. *J Orthop Res* 2005, 23: 156-163.
- Taylor SE, Weaver MP, Pitsillides AA, Wheeler BT, Wheeler-Jones CP, Shaw DJ, Smith RK. Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. *Equine Vet J* 2006, 38: 502-507.
- Trumble TN, Trotter GW, Oxford JR, McIlwraith CW, Cammarata S, Goodnight JL, Billingham RC, Frisbie DD. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am J Vet Res* 2001, 62: 1467-1477.

Trumble TN, Scarbrough AB, Brown MP. Osteochondral injury increases type II collagen degradation products (C2C) in synovial fluid of Thoroughbred racehorses. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17: 371-374.

van den Boom R, Brama PA, Kiers GH, DeGroot J, Barneveld A, van Weeren RR. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor alpha activities in normal equine joints. *Equine Vet J* 2004, 36: 155-159.

van den Boom R, van der Harst MR, Brommer H, Brama PA, Barneveld A, van Weeren PR, DeGroot J. Relationship between synovial fluid levels of glycosaminoglycans, hydroxyproline and general MMP activity and the presence and severity of articular cartilage change on the proximal articular surface of P1. *Equine Vet J* 2005, 37: 19-25.

van Loon JP, de Grauw JC, van Dierendonck M, L'ami JJ, Back W, van Weeren PR. Intra-articular opioid analgesia is effective in reducing pain and inflammation in an equine LPS induced synovitis model. *Equine Vet J* 2010, 42: 412-419.

van Weeren PR, Firth EC. Future tools for early diagnosis and monitoring of musculoskeletal injury: Biomarkers and CT. *Vet Clin Equine* 2008, 24: 153-175

Kirjat

Caron JP. Arthritis. Teoksessa: Ross MW & Dyson SJ. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 2p. Saunders, USA 2011; 655-668.

Frisbie DD. Markers of osteoarthritis: Implications for early diagnosis and monitoring of the pathological course and effects of therapy. Teoksessa: Ross MW & Dyson SJ. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 2p. Saunders, USA 2011; 668-671.