

Wskaźniki biochemiczne krwi przydatne w ocenie układu ruchu koni sportowych. Część I. Charakterystyka wskaźników metabolizmu kości i chrząstki

Agnieszka Turło, Anna Cywińska, Mateusz Hecold, Anna Winnicka

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Choroby układu ruchu są najważniejszym czynnikiem ograniczającym użytkowanie sportowe koni. Urazy, którym ulegają konie podczas treningu lub zawodów, są często następstwem osłabienia kondycji układu mięśniowo-szkieletowego i obecności zmian patologicznych, które nie dają objawów klinicznych. Zmniejszenie ryzyka związanego z urazami zmęczeniowymi zapewnia regularna, obiektywna ocena zdrowia kości, stawów, mięśni oraz ścięgien. Wybrane do tego celu metody powinny być precyzyjne, a równocześnie nieinwazyjne i łatwe do zastosowania. Należy do nich pomiar stężenia w surowicy biochemicznych wskaźników metabolizmu kości i tkanki chrzęstnej (ryc. 1). Są to enzymy pochodzące z aktywnych komórek

kościotwórczych i kościogubnych lub organiczne składniki macierzy międzykomórkowej kości i chrząstki, uwalniane do krążenia podczas jej tworzenia lub resorpcji (1). Zmiany ich stężeń obrazują nie tylko modelowanie kości i chrząstek, ale również tkanek miękkich o dużym udziale włókien kolagenowych. Charakter i intensywność modelowania zmienia się z wiekiem, zależy od masy ciała, profilu hormonalnego, przebytych chorób metabolicznych, wysiłku oraz powstawania i gojenia urazów. Ponieważ każdy wskaźnik odnosi się do innego procesu metabolicznego, w celu uzyskania pełnej informacji o stanie badanych tkanek należy przeanalizować cały ich profil, uwzględniając zarówno wskaźniki anaboliczne, jak i kataboliczne.

Blood biochemical markers in the evaluation of sport horses locomotory system. Part I. Bones and cartilages metabolic markers

Turło A., Cywińska A., Winnicka A., Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This paper aims at the presentation of diagnostic approach to the sport horses locomotory disorders. Changes in cartilage and bone metabolism are reflected by alterations in serum levels of the sensitive biochemical markers. These specific indices of tissue metabolism include enzymes and non-enzymatic peptides of intracellular matrix, produced by activated cartilage and bone cells and secreted into the bloodstream during the tissue formation or resorption. Serum biomarkers express modeling of bone and cartilage, but could also evidence a damage to soft tissues with a high collagen content. Bone and cartilage metabolism is affected by the number of factors including age, body weight, hormonal changes, metabolic diseases, exercise, trauma and healing processes. Molecular markers are indicative of particular anabolic or catabolic pathways, therefore a battery of markers should be measured to obtain complete information on the tissue metabolism.

Keywords: biochemical markers, bone metabolism, cartilage metabolism, horses.

Wskaźniki metabolizmu kości i chrząstki

Kość:

- pochodne kolagenu **typu I** (PICP, ICTP/CTX)
- osteokalcyna (OC)
- fosfataza zasadowa – izomer specyficzny dla tkanki kostnej (BALP)

Chrząstka:

- pochodne kolagenu **typu II** (CPII, Col2-3/4C_{short}, ColCEQ, Col1-2)
- składniki proteoglikanu (CS, GAG, KS)

Ścięgna/więzadła:

- pochodne kolagenu **typu I** (PICP)

Ryc. 1. Podział wskaźników biochemicznych przydatnych w ocenie układu ruchu koni według źródła ich pochodzenia

Składniki biochemiczne krwi pochodzące z tkanek kostnej lub chrzęstnej określone są jako wskaźniki bezpośrednie. Stały się one przedmiotem licznych badań dotyczących fizjologicznego i patologicznego modelowania kości u koni w treningu sportowym. Inną grupą są wskaźniki pośrednie, które nie są wytwarzane w tkankach tworzących układ ruchu, ale mogą wpływać na ich metabolizm. Do tej grupy należą enzymy proteolityczne i ich inhibitory, czynniki wzrostu, cytokiny i mediatory zapalenia. Ich przydatność w badaniu konkretnych tkanek jest jednak ograniczona, ze względu na szerokie spektrum działania.

Wskaźniki obrotu kostnego

Obrot kostny (modelowanie kości) jest zjawiskiem fizjologicznym, mającym na celu adaptację organizmu do zmieniających się czynników zewnętrznych i wewnętrznych. Obejmuje niszczenie oraz odbudowę składników kości, w wyniku współdziałania prekursorów osteoklastów i osteoblastów. Procesy te są ze sobą ściśle sprzężone i u zdrowych, dorosłych koni, poddawanych stałym obciążeniom, zwykle pozostają w równowadze. Stężenie większości wskaźników obrotu kostnego związane jest z syntezą lub rozpadem cząsteczek kolagenu I, który jest głównym białkiem macierzy pozakomórkowej tkanki kostnej. Występowanie tej odmiany kolagenu nie ogranicza się tylko do kości, obejmuje również tkanki miękkie tworzące m.in. ścięgna. Dlatego interpretując zawartość pochodnych kolagenu I w surowicy, należy brać pod uwagę również źródła inne niż kość. Wartości wskaźników obrotu kostnego ulegają zmianom związanym z wiekiem, masą ciała, płcią, porą roku i porą doby. Modyfikacje sposobu utrzymywania i użytkowania koni, a także patologie, znacząco wpływają na te wartości, nie zmieniają jednak profilu zmian fizjologicznych.

Wskaźniki tworzenia kości

C-końcowy i N-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (carboxy and amino terminal propeptide of type I procollagen – PICP i PINP)

Propeptydy prokolagenu I są to skrajne fragmenty jego cząsteczki, odcinane przez

proteazy i uwalniane do krwi w ostatniej fazie tworzenia włókna kolagenowego. Jako produkty uboczne syntezy kolagenu I, wiązane są głównie z wytwarzaniem macierzy pozakomórkowej kości. Wzrost stężenia PICP we krwi stwierdzono u koni w czasie rekonwalescencji po urazie ścięgna mięśnia zginacza powierzchniowego palców (2). Autorzy sugerują, że wynik ten jest przykładem wpływu uszkodzenia tkanki innej niż kostna na zawartość we krwi wskaźników związanych z metabolizmem kolagenu I.

Stężenie PICP, tak jak większości wskaźników obrotu kostnego, maleje z wiekiem. Spadek ten jest szczególnie wyraźny w pierwszych 18 miesiącach życia i sięga 70–85%, w tym 65–71% następuje w ciągu pierwszych 6 miesięcy (3). Wynika to z ograniczenia modelowania kości w związku z zakończeniem wzrostu dojrzewających koni. Równocześnie znacznie zwiększa się masa ich ciała, co jest kolejnym czynnikiem wpływającym na wartości PICP. Stwierdzono, że u koni o wyższej masie ciała stężenia PICP są niższe niż u lżejszych zwierząt w tym samym wieku (3). PICP ulega również zmianom sezonowym, najwyższe wartości osiągając wiosną. Jest to silniej zaznaczone u klaczy, prawdopodobnie w związku ze zmianami hormonalnymi towarzyszącymi zakończeniu okresu bezruchowego (*anoestrus*; 3, 4).

Osteokalcyna (OC, bone Gla protein – BGP)

Osteokalcyna jest białkiem macierzy pozakomórkowej, syntetyzowanym przez osteoblasty, drugim (po kolagenie I) pod względem stężenia w surowicy. Jego wzrost towarzyszy tworzeniu, a przede wszystkim mineralizacji kości. W obecności witaminy K i jonów wapnia osteokalcyna wiąże główny nieorganiczny składnik tkanki kostnej, hydroksyapatyt. Do wzrostu syntezy osteokalcyny dochodzi również pod wpływem parathormonu, który stymuluje niszczenie kości. Zależność ta nie jest jednak do końca wyjaśniona. Być może osteokalcyna pełni rolę w obu procesach, a zmiany jej stężenia są reprezentatywne nie tylko dla tworzenia, ale dla całości procesu modelowania. W przeciwieństwie do pochodnych kolagenu I, osteokalcyna jest wskaźnikiem swoistym dla kości.

Osteokalcyna należy do najczęściej badanych wskaźników obrotu kostnego. Zmiana jej stężenia jest odwrotnie proporcjonalna do wieku i przebiega najbardziej dynamicznie w ciągu pierwszych 30 miesięcy życia (3, 5, 6, 7). Dane na temat wpływu płci na uwalnianie osteokalcyny nie są jednoznaczne. U 2-letnich koni pełnej krwi angielskiej notowano wyższe stężenia osteokalcyny zarówno u klaczy (6), jak i u ogierów (4, 7). Wśród 4-miesięcznych odsadków rasy quarter horse wyższe stężenia osteokalcyny występowały u ogierków (8). Podobnie jak PICP, niższe stężenia osteokalcyny oznaczane były u koni o większej masie ciała (3), między innymi u koni zimnokrwistych w porównaniu z gorąckokrwistymi (9). Sezonowy szczyt stężenia osteokalcyny występuje w okresie późnojesiennym (3). Jej stężenie wykazuje wahania dobowe, jest najniższe około północy, a najwyższe pomiędzy godziną 5.00 a 8.00 rano i utrzymuje wyrównaną wartość przez większą część dnia świetlnego (7).

Izoenzym kostny fosfatazy zasadowej (BALP, BAP – bone-specific alkaline phosphatase)

Na całkowitą aktywność fosfatazy zasadowej (alkalicznej), oznaczaną w surowicy krwi, składa się aktywność izoenzymów pochodzących z różnych tkanek. Izoforma swoista dla kości jest enzymem białkowym związanym z błoną komórkową osteoblastów, a także hipertroficznymi chondrocytów, obecnych w płytce wzrostu. Bierze udział w syntetyzowaniu substancji pozakomórkowej, a następnie jej mineralizacji, pełni więc rolę wskaźnika wzrostu kości. Jej aktywność maleje z wiekiem (3, 10). Do silnej redukcji aktywności tego enzymu dochodzi bardzo wcześnie, w granicach 1 miesiąca życia (3, 11). Ponieważ niemożliwe jest, aby w tym okresie dochodziło do znacznego ograniczenia wzrostu kości, redukcja może być związana z rozwojem krążenia wątrobowego i płucnego, a tym samym sprawniejszej degradacji tego enzymu. W późniejszym okresie życia zmiany jego stężenia odpowiadają zmianom zawartości osteokalcyny w surowicy (5).

Wskaźniki resorpcji kości

C-końcowy telopeptyd kolagenu typu I

Kolagen I jest głównym białkiem tworzącym macierz pozakomórkową, zatem jego degradacja jest nieodłączną częścią procesu resorpcji kości. Przy udziale proteaz, wydzielanych przez aktywowane osteoklasty i osteoblasty, dochodzi do fragmentacji cząsteczek kolagenu, a następnie przedostawania się powstałych odcinków do krwi i ich eliminacji. Rozróżnia się dwa rodzaje fragmentów kolagenu typu I, w zależności od ich długości i umiejscowienia w cząsteczce: CTX (C-terminal crosslinked telopeptide of type I collagen) oraz ICTP (cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen; 12). Zmiany ich stężeń nie zawsze są ze sobą powiązane, co wskazuje na różne drogi kolagenolizy prowadzące do ich powstawania. CTX jest liniowym, C-końcowym fragmentem tropokolagenu, złożonym z ośmiu aminokwasów. ICTP jest peptydem większym niż CTX i zawiera odcinek tworzący wiązanie krzyżowe pomiędzy cząsteczkami kolagenu. C-końcowe telopeptydy kolagenu I są popularnymi wskaźnikami procesu niszczenia kości. U koni z urazami ścięgna zginacza powierzchniowego palców nie wykazano zmian w stężeniu ICTP (2), pomimo dużego udziału kolagenu typu I w budowie ścięgien. Stan innych rodzajów tkanki łącznej nie wydaje się zatem wpływać na wartości stężeń ICTP, co potwierdza przydatność tego wskaźnika w monitorowaniu niszczenia kości.

Wykazano, że stężenie ICTP spada wraz z wiekiem koni (4, 10). Lepage i wsp. (9) w badaniu na grupie koni w wieku 4–15 lat stwierdzili jednak wzrost stężeń ICTP u osobników będących w górnej granicy tego przedziału (11–14 lat). Tłumaczy to fakt, że konie biorące udział w badaniu były intensywnie użytkowane, zmiana ta mogła być więc związana z nabytymi chorobami układu kostnego, które występują częściej u starszych, pracujących koni. Niższe stężenia ICTP opisano u koni gorącokrwistych, w porównaniu do zimnokrwistych. Autorzy sugerowali, że jest to wynik codziennego treningu wyścigowego, któremu podlegały konie gorącokrwiste, który poprawiał adaptację kości do obciążeń i w związku z tym ograniczał degradację. Zaproponowali również ocenę stosunku OC:ICTP jako wskaźnika intensywności obrotu kostnego bardziej uniwersalnego niż ocena wartości bezwzględnych pojedynczych wskaźników, które mogą znacznie się różnić pomiędzy typami użytkowymi koni, co potwierdzono w omawianym badaniu. ICTP, podobnie jak OC, zależy od płci. U dwuletnich ogierów pełnej krwi angielskiej opisano wyższe stężenia ICTP

niż u klaczy w tym samym wieku (4). Na przestrzeni roku ICTP osiąga swój szczyt pomiędzy październikiem a grudniem, co jest zbieżne z sezonową dynamiką osteokalcyiny (3).

Wzrost stężenia wskaźnika obrotu kostnego wraz z wiekiem jest nietypowym zjawiskiem. Opisano je na przykładzie CTX oznaczanego u źrebiąt w wieku od 1 tygodnia do 11 miesięcy, w ramach projektu dotyczącego rozwoju osteochondrozy u młodych koni (13). U wszystkich badanych źrebiąt w wieku 5 miesięcy stwierdzono jednak zmiany radiologiczne związane z osteochondrozą, dlatego nie można wykluczyć wpływu procesu patologicznego na otrzymany wynik. Według autorów mogło być to związane ze wzrastającą izomeryzacją fragmentów degradacji kolagenu i wynikającym z tego skuteczniejszym ich wykrywaniem za pomocą testu ELISA.

Składniki wiązań sieciujących kolagen

Wiązania krzyżowe powstają pomiędzy wybranymi aminokwasami cząsteczek tropokolagenu przy udziale enzymu oksydazy lizylowej. Związkiem łączącym może być pirydynolina (w wiązaniach hydroksylizyna-hydroksylizyna) lub deoksyperydynolina (w wiązaniach lizyna-lizyna). W następstwie degradacji kolagenu składniki wiązań uwalniane są do krwi, a następnie wydalane z moczem. Głównym źródłem ich pochodzenia jest macierz pozakomórkowa kości. Deoksyperydynolina wykazuje szczególnie wysoką swoistość dla kolagenu pochodzenia kostnego, a jej stężenie oznaczane w moczu przez długi czas uważane było za złoty standard wśród wskaźników resorpcji kości. Prace dotyczące wpływu czynników, takich jak: wiek, pora doby i intensywność wysiłku fizycznego na zmiany stężeń pirydynoliny i deoksyperydynoliny u koni są jednak nieliczne (14, 15). Obecnie wskaźniki te pełnią drugorzędą rolę w ocenie stanu zdrowia układu kostnego.

Wskaźniki metabolizmu chrząstki

Degradacja chrząstki stawowej, spowodowana chorobą pierwotną (osteochondroza) lub wtórną do uszkodzeń przeciążeniowych (aseptyczne *osteoarthritis*) jest najczęstszą przyczyną kulawizny u koni. Uszkodzenia chrząstki tylko do pewnego stopnia podlegają gojeniu, które u dojrzałych osobników polega na zwiększonym wytwarzaniu składników istoty pozakomórkowej. Stanowią ją włókna kolagenu typu II oraz kompleksy cząsteczek proteoglikanu (nazywanego agrekanem) i kwasu hialuronowego. W skład monomerów agrekanu wchodzi łańcuchy glikozaminoglikanów: siarczanu keratanu i siarczanu chondroityny. Ich główną funkcją jest

wiązanie cząsteczek wody, której wysoka zawartość zapewnia chrząstce odpowiednie właściwości mechaniczne. Podczas niszczenia lub naprawy chrząstki składniki istoty pozakomórkowej oraz ich pochodne są uwalniane do krwi. Stężenia tych substancji mogą służyć jako wskaźniki metabolizmu tkanki chrzęstnej, obrazując fizjologiczne lub patologiczne procesy, które tam zachodzą. W zdrowej chrząstce stawowej dochodzi do stopniowej wymiany proteoglikanu, w efekcie zrównoważonej aktywności chondrocytów i enzymów proteolitycznych.

Wskaźniki tworzenia i naprawy chrząstki

Propeptyd kolagenu typu II (carboxypropeptide of type II collagen – CPII)

Kolagen typu II występuje wyłącznie w tkance chrzęstnej. Mechanizm syntezy jego cząsteczek jest analogiczny do powstawania kolagenu typu I. Dotyczy to również uwalniania C-końcowych propeptydów, których stężenie w surowicy krwi obrazuje proces tworzenia istoty pozakomórkowej chrząstki.

Siarczan chondroityny (chondroitin sulphate-CS)

Siarczan chondroityny jest głównym glikozaminoglikanem proteoglikanu chrząstki. Jego epitop CS-846 pełni rolę wskaźnika syntezy agrekanu. Wzrost jego stężenia we krwi często wiązany jest z występowaniem chorób stawów (16, 17, 18).

Wskaźniki degradacji chrząstki

Fragmenty kolagenu typu II

Podczas degradacji cząsteczek kolagenu typu II odsłaniane są nowe epitopy konformacyjne, które mogą służyć wykrywaniu produktów jego fragmentacji. Epitop Col 2–3/4C_{short} występuje zarówno w fragmentach kolagenu typu II jak i I (19). Epitop 234CEQ, oznaczany również jako ColCEQ, opisany przez ten sam zespół badawczy, jest swoisty nie tylko dla kolagenu typu II, ale również gatunkowo dla koni (20). Zawartość produktów degradacji kolagenu typu I bywa określana jako różnica Col 2–3/4C_{short} i ColCEQ (13). Swoiste oznaczenia fragmentów kolagenu typu II wykonywane są również przy użyciu ludzkiego testu wykrywającego epitop Col2–1 oraz jego nitrowaną formę Col2–1NO (21).

Col2–1NO jest nie tylko wskaźnikiem degradacji chrząstki, ale również procesu zapalnego w obrębie stawu. Do jego powstawania dochodzi w obecności aktywnych form tlenu: nadtlenkowego rodnika

azotowego (NO) i anionowego rodnika nadtlenkowego (O₂⁻), które reagują ze sobą, tworząc nadtlenoazotyn (OONO). Nadtlenoazotyn reaguje z aromatycznymi aminokwasami pochodnych kolagenu typu II. Źródłem wolnych rodników mogą być makrofagi, neutrofile i chondrocyty aktywowane w przebiegu zapalenia. Inna droga prowadząca do nitracji pochodnych kolagenu wiąże się z aktywnością mieloperoksydazy (MPO), enzymu uwalnianego przez pobudzone neutrofile i traktowanego jako wskaźnik ich aktywności. Znaczenie MPO brano pod uwagę w badaniach nad stresem oksydacyjnym wywołanym przez intensywny wysiłek fizyczny (22). Nie wykazano jednak przydatności MPO w ocenie zdrowia kości i stawów ogierów poddawanych próbie dzielności (23).

Glikozaminoglikany (GAG)

Całkowita ilość glikozaminoglikanów siarkowych w surowicy krwi jest przydatnym wskaźnikiem degradacji chrząstki i osiąga znacznie wyższe wartości u koni ze zmianami patologicznymi w stawach (17, 18). Podlega zmianom związanym z wiekiem, malejąc wraz z dojrzewaniem młodych koni (13).

Obniżone stężenia siarczanu keratanu (keratan sulphate-KS) we krwi stwierdzano u koni z aseptycznym zapaleniem stawów (24). Oznaczanie siarczanu keratanu jako jedyne wskaźnika ma jednak mniejsze znaczenie w wykrywaniu uszkodzeń chrząstki niż oznaczanie całkowitych glikozaminoglikanów (16). Ograniczona przydatność siarczanu keratanu jako wskaźnika degradacji chrząstki może wiązać się z jego krótkim okresem półtrwania. W badaniu wpływu wysiłku fizycznego na uwalnianie siarczanu keratanu, zmiana jego stężenia zauważalna była bezpośrednio po zakończeniu treningu, natomiast już godzinę później powracało ono do wartości stwierdzonej przed treningiem (24).

Siarczan chondroityny oznaczany jako osobny parametr uważany jest za wskaźnik syntezy, a nie degradacji agrekanu.

Oligomeryczne białko macierzy pozakomórkowej chrząstki (cartilage oligomeric matrix protein – COMP)

Białko to jest niekolagenowym składnikiem tworzącym istotę pozakomórkową chrząstki. Wykrywane jest również w ścięgnach, łątkach i błonie maziowej torebki stawowej. Badania dotyczące przydatności surowicznych stężeń oligomerycznego białka macierzy pozakomórkowej chrząstki jako wskaźnika chorób ortopedycznych u koni są nieliczne. Zmiany stężenia tego białka w surowicy wydają się związane z chorobami stawów, podczas

gdzie wzrost stężenia w pochewce maziowej ścięgien zginaczy palców stwierdzono w zapaleniu ścięgien (25). We krwi koni z aseptycznym *osteoarthritis* stężenia oligomerycznego białka macierzy pozakomórkowej chrząstki były niższe niż u koni zdrowych (26), co jest niespójne z wynikami uzyskanymi u ludzi. Autorzy sugerują, że źródłem rozbieżności może być zależność stężenia oligomerycznego białka macierzy pozakomórkowej chrząstki od stadium choroby oraz fakt zastosowania w oznaczeniach przeciwciał monoklonalnych, które nie wykrywały mniejszych produktów jego fragmentacji.

Podsumowanie

Zmiany metabolizmu kości i chrząstki mogą być oceniane na podstawie analizy stężenia wskaźników biochemicznych obecnych we krwi. Dużą swoistością wykazują się wskaźniki bezpośrednie, do których należą składniki macierzy pozakomórkowej tkanki kostnej i chrzęstnej oraz enzymy uwalniane przez komórki kościotwórcze i kościogubne. Pozwalają one nie tylko na określenie rodzaju tkanki podlegającej przebudowie, ale również toczącego się w niej procesu – tworzenia lub degradacji. Modelowanie kości polega na niszczeniu i następującej po niej odbudowie tkanki kostnej i jest zjawiskiem fizjologicznym. Analiza takich wskaźników, jak: fragmenty cząsteczki kolagenu typu I oraz osteokalcyna umożliwiają kontrolę prawidłowego przebiegu remodelingu kości i wykrywanie występujących w nim zaburzeń. Tkanka łączna włóknista budująca ścięgna również zawiera włókna kolagenu typu I i może być źródłem jego pochodnej, PICP, we krwi. Chrząstka ma umiarkowane zdolności naprawy uszkodzeń. Intensywne uwalnianie składników chrząstki do krwi świadczy o rozwoju choroby pierwotnej, zapalenia kostno-stawowego lub choroby zwyrodnieniowej stawów.

Piśmiennictwo

- Seibel M: Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects, *Osteoporos Int* 2000, **11**(S6),18.
- Jackson BF, Smith RKW, Price JS: A molecular marker of type I collagen metabolism reflects changes in connective tissue remodeling associated with injury to the equine superficial flexor tendon. *Equine Vet J* 2003, **35**, 211–213.
- Price JS, Jackson BF, Gray JA, Harris PA, Wright IM, Pfeiffer DU, Robins SP, Eastell R, Ricketts SW: Biochemical markers of bone metabolism in growing Thoroughbreds: a longitudinal study. *Res Vet Sci* 2001, **71**, 37–44.
- Jackson BF, Lonell C, Verheyen K, Wood JLN, Pfeiffer DU, Price JS: Gender differences in bone turnover in 2-year-old Thoroughbreds. *Equine Vet J* 2003, **35**, 702–706.
- Lepage OM, Marcoux M, Tremblay A: Serum osteocalcin or bone gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Can J Vet Res* 1990, **54**, 223–226.
- Chiappe A, Gonzalez G, Fradinger E, Iorio G, Ferretti JL, Zanchetta J: Influence of age and sex in serum osteocalcin levels in Thoroughbred horses. *Arch Phys Bioch* 1999, **107**, 50–54.

- Gianetto C, Casella S, Fazio F, Messina V, Piccione G: Circadian variations in biochemical markers of bone metabolism in horses of different age. *J Appl Biomed* 2010, **8**, 73–79.
- Fletcher KL, Topliff DR, Cooper SR, Freeman DW, Geisert RD: Influence of age and sex on serum osteocalcin in horses at weaning and during physical conditioning. *J Equine Vet Sci* 2000, **20**, 124–126.
- Lepage OM, Hartmann DJ, Eicher R, Uebelhart B, Tschudi P, Uebelhart D: Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Vet J* 1998, **156**, 169–175.
- Price JS, Jackson B, Eastell R, Wilson AM, Russell RGG, Lanyon LE, Goodship AE: The response of the skeleton to physical training: a biochemical study in horses. *Bone* 1995, **17**, 221–227.
- Hank AM, Hoffman WE, Sanecki RK, Schaeffer DJ, Dornier JL: Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and adult serum. *J Vet Intern Med* 1993, **7**, 20–24.
- Garnero P, Ferraras M, Karsdal MA, Nicamhloibh R, Risteli J, Borel O, Qvist P, Delmas PD, Foged NT, Delaisse JM: The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Min Res* 2003, **18**, 859–867.
- Billinghamhurst RC, Brama PAJ, van Weeren PR, Knowlton MS, Mcllwraith CW: Significant exercise-related changes in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horse. *Osteoarthritis cartilage* 2003, **11**, 760–769.
- Black A, Schoknecht PA, Ralston SL, Shapses SA: Diurnal variation and age differences in the biochemical markers of bone turnover in horses. *J Animal Sci* 1999, **77**, 75–83.
- Inoue Y, Matsui A, Asai Y, Aoki F, Yoshimoto K, Matsui T, Yano H: Response of biochemical markers of bone metabolism to exercise intensity in Thoroughbred horses. *J Equine Sci* 2008, **19**, 83–89.
- Frisbie DD, Ray CS, Ionescu M, Poole AR, Chapman PL, Mcllwraith CW: Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. *Am J Vet Res* 1999, **60**, 306–309.
- Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billinghamhurst RC, Kawcak CE, Mcllwraith BV: Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**, 1196–1204.
- Frisbie DD, Mcllwraith CW, Arthur RM, Blea J, Baker VA, Billinghamhurst RC: Serum biomarker levels for musculoskeletal disease in two- and three-year-old racing Thoroughbred horses: a prospective study of 130 horse. *Equine Vet J* 2010, **42**, 643–651.
- Billinghamhurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Burne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR: Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997, **99**, 1534–1545.
- Billinghamhurst RC, Buxton EM, Edwards MG, McGraw MS, Mcllwraith CW: Use of an antineoepitope antibody for identification of type-II collagen degradation in equine articular cartilage. *Am J Vet Res* 2001, **62**, 1031–1039.
- Gangl M, Serteyn D, Lejeune JB, Schneider N, Grulke S, Peters F, Vila T, Deby-Dupont G, Deberg M, Henrotin Y: A type II-collagen derived peptide and it's nitrated form as new markers of inflammation and cartilage degradation in equine osteochondral lesions. *Res Vet Sci* 2007, **82**, 68–75.
- Art T, Franck T, Gangl M, Votion D, Kohlen S, Deby-Dupont G, Serteyn D: Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition. *Equine Vet J Suppl* 2006, **36**, 298–302.
- Verwilghen D, Busoni V, Gangl M, Franck T, Lejeune JP, Vanderheyden L, Detilleux J, Grulke S, Deberg M, Henrotin Y, Serteyn D: Relationship between biochemical markers and radiographic scores in the evaluation of the osteoarticular status of Warmblood stallions. *Res Vet Sci* 2009, **87**, 319–328.
- Okumura M, Kim GH, Tagami M, Haramaki S, Fujinaga T: Serum keratan sulphate as a cartilage metabolic marker in horses: the effect of exercise. *J Vet Med.* 2002, **49**, 195–197.
- Smith RK, Heinegard D: Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in digital sheath synovial fluid and serum with tendon injury. *Equine Vet J* 2000, **32**, 52–58.
- Misumi K, Vilim V, Hatazoe T, Murata T, Fujiki M, Oka T, Sakamoto H, Carter SD: Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis. *Equine Vet J* 2002, **34**, 602–608.

Lek. wet. Anna Turlo, e-mail: a_turlo@op.pl