

# De biochemische samenstelling van de tendo interosseus in het voorbeen van het paard

Kim de Jong



Augustus 2009  
Universiteit Utrecht  
Faculteit der Diergeneeskunde  
Departement Gezondheidszorg Paard

Drs. K. de Jong  
Begeleiding:  
Dr. G. Bosch  
Dr. C.H.A. van de Lest

## **Inhoudsopgave**

<b>Inhoudsopgave</b>	<b>2</b>
<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
<b>Inleiding</b>	<b>4</b>
Antomie en fysiologie	4
Pezen	5
Blessures	5
<b>Materiaal en Methoden</b>	<b>8</b>
Materiaal	8
Waterpercentage	8
Papaïne digestie	8
DNA	8
Glycosaminoglycanen	8
Collageen en crosslinks	9
Gedegradeerd collageen	9
Statistische analyse	9
<b>Resultaten</b>	<b>10</b>
<b>Discussie</b>	<b>12</b>
Non-collagene biochemische parameters	12
Collagene biochemische parameters	12
Relatie met leeftijd, arbeid en blessures	13
<b>Referenties</b>	<b>15</b>

## Summary

**Reasons for performing the study:** Injury to the [suspensory ligament](#) is very common in equine athletes. The site of tendon injury differs, the suspensory ligament can be injured in the proximal or in the middle part, as well as in the branches. A possible explanation could be that the biochemical composition varies at different sites, [as it is in the superficial digital flexor tendon](#) (Lin 2005).

**Hypothesis:** The biochemical composition of the equine interosseus tendon in the front limb is different at different [anatomical](#) locations. [Furthermore it was hypothesized that](#) the composition [of the suspensory ligament](#) is related to age.

**Methods:** Within 4 hours after death, samples of the suspensory ligament interosseus [were collected at 6 anatomical locations](#) of [the](#) right front limb of 20 Warmblood slaughter horses ([age](#):  $12,5 \pm 7,5$  years). The suspensory ligament [had no](#) macroscopical no signs of [any present or previous tendon injury](#).

**Results:** The biochemical composition of the interosseus tendon [varies](#) at different sites. The water percentage, the amount of DNA, glycosaminoglycans, collagen and cross-links were significant different ( $P < 0,05$ ). There was no relation between age and the biochemical composition.

**Potential relevance:** Further investigation of the biomechanical properties of the interosseus tendon is necessary to develop prevention and treatment management for interosseus tendon injuries.

## Samenvatting

**Reden van de studie:** De tendo interosseus is vaak [geblesseerd](#) in [zowel](#) sportpaarden [als](#) [recreatiepaarden](#). De locatie van de blessure varieert; zowel proximaal, in de midbody als in de schenkels komen deze voor. Eén van de mogelijke [verklaringen hiervoor](#) is dat de biochemische samenstelling op de verschillende locaties niet gelijk is. Voor de oppervlakkige buiger is de biochemische samenstelling al bepaald en deze is anders qua samenstelling op verschillende locaties (Lin 2005).

**Hypothese:** De biochemische samenstelling van de tendo interosseus in het voorbeen van het paard is niet gelijk op verschillende locaties en deze samenstelling is gecorreleerd met de leeftijd.

**Materiaal en Methoden:** Van 20 warmbloed slachtpaarden ([leeftijd](#):  $12,5 \pm 7,5$  jaar) zijn binnen 4 uur na de dood, 6 pees monsters genomen van de tendo interosseus van het rechtersvoorbeen ([zie engelse samenvatting, geef verschillende locaties hier aan](#)).

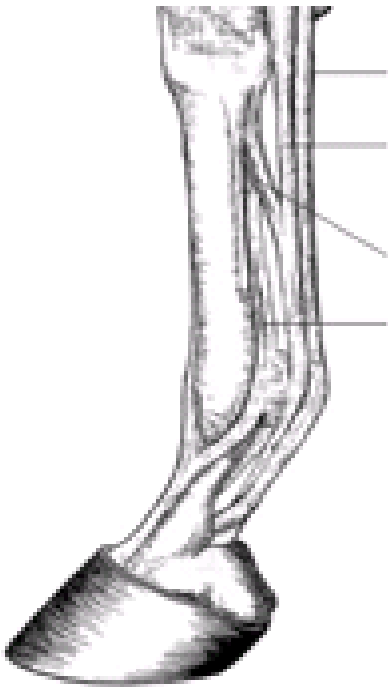
**Resultaten:** De biochemische samenstelling van de tendo interosseus was niet gelijk op verschillende locaties in de tendo interosseus. Zowel het waterpercentage, als de hoeveelheid DNA, glycosaminoglycanen, collageen en crosslinks verschilden significant van elkaar ( $P < 0,05$ ). Er is geen correlatie tussen de leeftijd en de biochemische samenstelling [gevonden](#).

**Klinische relevantie:** Verder onderzoek is geïndiceerd naar biomechanica van de tendo interosseus op de verschillende locaties om meer te kunnen zeggen over preventie en therapeutische mogelijkheden van tendo interosseus blessures.

## Inleiding

Kreupelheid is een veelvoorkomend probleem bij (sport)paarden, dat zorgt voor een terugval in de carrière en soms zelfs voor het beëindigen daarvan. Eén van de oorzaken die een groot deel van de kreupelheden voor zijn rekening neemt, is peesblessures. Deze komen met name voor in de buigpezen, die subcarpaal en subtarsaal gelegen zijn.<sup>3,5,9</sup> De pezen die van belang zijn, zijn de tussenpees (*tendo interosseus*), de diepe buiger (*tendo flexor digitorum profundus*) en het daarmee verbonden distale check ligament en de oppervlakkige buiger (*tendo flexor digitorum superficialis*).<sup>21,22</sup>

## Anatomie en fysiologie



De *tendo interosseus* is de sterkste pees in het voorbeen van volwassen paarden en overspant alleen het kootgewricht.<sup>20</sup> De pees vormt een bijna complete bot op bot connectie en lijkt daarmee meer op een ligament dan op een pees.

De pees ontspringt vanaf de proximale metacarpus en vanaf het ligamentum carpale profundum. Vervolgens ligt de pees tussen de beide griffelbeentjes (*metacarpalia II en IV*) palmar van metacarpus III; proximaal van de proximale sesambeentjes splitst de pees zich in een mediale en laterale schenkel die naar respectievelijk het mediale en laterale proximale sesambeen lopen. Een deel van elke schenkel loopt via de mediale en laterale zijde over het metacarpophalangeale gewricht naar distodorsaal en verenigt daar met de strekpees (*musculus extensor digitorum communis*). Het andere deel van de schenkels blijft palmar lopen en komen samen voordat ze aanhechten op het kootbeen.<sup>11,22,35</sup>

Fig 1. Anatomie

De oppervlakkige en diepe buiger lopen palmar van de carpus in de carpaalschede; van daaruit gaan ze naar distaal en palmar over het ligamentum intersesamoidale, dat tussen de proximale sesambeentjes ligt. De oppervlakkige buiger splitst ter hoogte van het kootbeen (*phalanx I*) en beiden banen lopen door naar de insertieplaats, het kroonbeen (*phalanx II*). De diepe buiger loopt tussen deze splitsing door naar het hoefbeen (*phalanx III*), waar deze zijn insertie heeft.<sup>11,22</sup> Dit onderzoek richt zich op de *tendo interosseus*.

De *tendo interosseus* heeft meerdere functies. Net als andere pezen buigt de *tendo interosseus* een gewricht zodat er een beweging ontstaat. Daarnaast ondersteunt de pees het metacarpophalangeale gewricht; voornamelijk teveel extensie van het gewricht wordt voorkomen. Tijdens de ondersteunende fase in de pas wordt deze functie dus maximaal uitgevoerd. Bij een hogere snelheid vergroot de hyperextensie van de kogel, waardoor er meer kracht op de *tendo interosseus* komt te staan.<sup>11,32,35</sup>

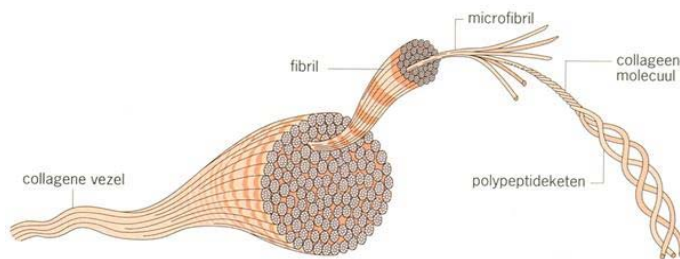
Een derde functie van de *tendo interosseus* is het opslaan van elastische energie, die later weer vrijkomt tijdens de beweging zodat minder spierarbeid vereist is. Door deze

gespecialiseerde functie komt de tendo interosseaus bloot te staan aan hoge rek (strain) en heeft de pees een lage veiligheidsmarge met betrekking tot het ontstaan van blessures.<sup>3,34,35</sup> In welke mate de tendo interosseaus deze laatste functie vervult, is niet bekend.

## Pezen

Peesweefsel is dicht, regelmatig gerangschikt bindweefsel, dat voornamelijk uit tenocyten en extracellulaire matrix (ECM) bestaat. De functie van de tenocyten is het onderhouden van de ECM. De ECM bestaat grotendeels uit water; de droge stof bestaat grotendeels uit bundels collageen (voornamelijk type I) die longitudinaal gerangschikt zijn.<sup>3,5,32</sup>

Collageen wordt als tropocollageen door de tenocyten uitgescheiden, waarna 3 tropocollageen moleculen polymeriseren tot nieuwe collageen fibrillen (de primaire bundel of triple helix). De primaire bundels vormen secundaire bundels (vezels) en deze vormen weer de tertiaire bundels. De secundaire bundels worden omringd door endotenon; de tertiaire bundels door paratenon. Door deze opbouw kan de pees grote krachten weerstaan.<sup>4,23,32</sup>



De fibrillen zijn de basis eenheden van pezen; er bestaan kleine (35-40 nm diameter) en grote (165 – 215 nm diameter) fibrillen. De verdeling hiervan wordt beïnvloed door leeftijd en de mate van arbeid en draagt bij aan de mechanische eigenschappen van de pees.<sup>10,34,38</sup>

Fig 2. Opbouw collagene vezel

Het collagene vezels zijn met elkaar verbonden door crosslinks. De belangrijkste crosslinks zijn hydroxylsilylpyridinoline (HP)<sup>1,4,23</sup> en lylsilylpyridinoline (LP), waarvan de laatste in veel mindere mate aanwezig is in peesweefsel.<sup>26</sup>

Beide crosslinks zijn 3-hydroxypyridinium derivaten en worden gevormd met behulp van het enzym lysyl oxidase.<sup>4,15</sup> De cross linking gebeurt extracellulair, maar de opbouw van HP en LP zijn afhankelijk van intracellulaire modificaties van het collageen molecuul en dan met name de hydroxylatie van lysine residuen.

Het aantal crosslinks neemt toe met de maturiteit van de collageen moleculen en neemt af met leeftijd of ten gevolge van schade. Dankzij de crosslinks heeft het collageen netwerk een opvallend golfpatroon in rust ('crimp' patroon). De collageen fibrillen en de crosslinks bepalen de (rek)sterkte van de pees.<sup>5,26,32</sup>

Naast collageen bevat de ECM ook een noncollagene matrix die uit onder andere proteoglycanen, water en elastine bestaat.<sup>23,34</sup> De proteoglycanen bestaan uit eiwitten met daaraan glycosaminoglycanen (GAGs). GAGs trekken water aan en dragen hierdoor bij aan de stevigheid van en de schokdemping in de pees. Tevens verdelen ze de krachten over de collageen fibrillen. De synthese van GAG's neemt toe als respons op mechanische stimuli.<sup>3,5,26</sup> De tendo interosseaus bevat ook spiervezels, waarmee deze zich onderscheidt van de andere buigpezen.<sup>14,18</sup>

## Blessures

Van de grote hoeveelheid peesblessures waar melding van wordt gemaakt, is de oppervlakkige buiger het meest frequent aangedaan. Daarna volgt de tendo interosseaus. Beiden pezen zijn in het voorbeen vaker aangedaan dan in het achterbeen.<sup>4,5,24</sup>

De pathogenese van peesblessures is divers, maar wat algemeen aangenomen wordt, is dat óf herhaald teveel belasting óf dat éénmalig teveel belasting (peesklap) op treedt. De meeste peesblessures worden door de eerste veroorzaakt; door herhaald teveel belasting, treedt herhaald microschade op, waardoor steeds opnieuw microtrauma optreedt.<sup>10,24,29</sup> Het teveel aan belasting en dientengevolge het microtrauma kan veroorzaakt worden door vermoeidheid van de spieren, hypoxie ten gevolge van een lage bloed aan- en afvoer en overbelasting van de tenocyten.<sup>5,6,33</sup> Doordat er na de ischemie reperfusie plaats vindt, ontstaan er schadelijke vrije radicalen en superoxides; deze tasten de fibrillen en de tenocyten aan en dragen zo bij aan de degeneratieve veranderingen. Daarnaast kunnen hyperthermie en een slechte conformatie van de ledematen aandeel hebben in het ontstaan van microtrauma.<sup>6,33,38</sup>

Tijdens het dagelijkse gebruik ondergaat peesweefsel ook microschade. Afhankelijk van de ratio waarin dit gebeurt, kan de pees regenereren en de biomechanische eigenschappen behouden of degenereren en macrotrauma ondergaan. De microschade wordt teweeg gebracht door natuurlijke veroudering en door arbeid. De degeneratie van peesweefsel neemt toe met leeftijd en de incidentie van peesblessures neemt dan óók toe bij oudere paarden. Als bovenop deze leeftijdsgerelateerde veranderingen (zware) arbeid wordt verlangd, staan de pezen meer bloot aan microtrauma.<sup>4,30,33</sup> Als de ratio waarin dit microtrauma optreedt het normale regeneratievermogen van de pees overstijgt, ontstaat een (subklinische) peesblessure.<sup>30,32,33</sup> De tenocyten herstellen onvoldoende, de microschade accumuleert, de ECM wordt onvoldoende gesynthetiseerd en er ontstaat peesletsel. In combinatie met een te korte periode om te herstellen, ontstaat er een (klinische) peesblessure. Dit fenomeen wordt sneller gezien in pezen die energie opslaan, aangezien zij een kleinere veiligheidsmarge hebben dan positionele pezen.<sup>32,34</sup>

Als er daadwerkelijk een peesblessure ontstaat is, vindt de ontstekingsfase plaats. Tijdens de ontstekingsfase gaat vocht uittreden uit de bloedvaten en worden ontstekingsmediatoren aangetrokken. Door de vochtuittrekking gaat de pees zwellen; deze wordt ook pijnlijk. Hierna kan er nieuw weefsel aangelegd worden; dit is littekenweefsel en bestaat uit type III collageen.

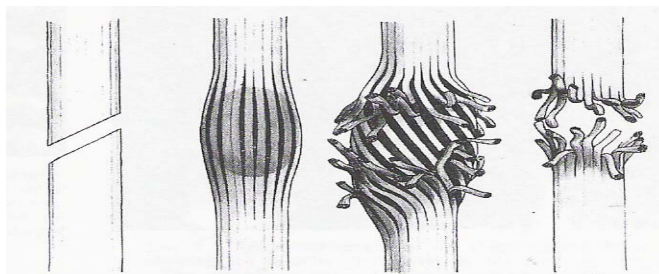


Fig 3. Peesletsel

Type III collageen heeft een kleinere diameter dan collageen type I en is daarmee zwakker. Tijdens de hierop volgende remodeleringsfase wordt type III collageen langzaam omgezet naar type I collageen. Het nieuw aangelegde collageen krijgt echter nooit meer dezelfde kwaliteit als voorheen. De overgang van het nieuw aangelegde weefsel en het bestaande peesweefsel is een zwakke plek, omdat beide soorten weefsels andere eigenschappen hebben. Deze plaats is gevoelig voor een (nieuwe) peesblessure.<sup>3,23,33</sup>

Tendo interosseus blessures kunnen ingedeeld worden op basis van hun anatomische locatie: proximaal (de oorsprong), midmetacarpaal ((mid)body) en de vertakkingen (schenkels). Blessures in de tendo interosseus zijn met name in het proximale deel van de pees en in de schenkels van de pees gelegen. De blessure kan unilateraal, maar ook bilateraal zijn.<sup>14,23,31</sup>

Het gebruik van het paard heeft invloed op de lokalisatie van een tendo interosseus blessure; zo hebben volgens *Dyson (2000a)* en *Reynolds (2000)* dressuurpaarden frequenter een proximale tendinitis dan eventing- en springpaarden. Dit komt waarschijnlijk door de soort arbeid (bijvoorbeeld de uitgestrekte draf), door korte wendingen en door het lopen op kunstmatige bodems.<sup>13,31</sup> In onderzoek van *Murray (2006)* bleek het merendeel van de paarden (ongeacht de tak van sport) een proximale tendinitis te hebben.<sup>28</sup>

*Dyson (2000a)* meldt ook dat dressuur- en eventingpaarden eerder schenkelblessures hebben dan springpaarden. De schenkels glijden tijdens de beweging aan de abaxiale zijde over de condylen van metacarpus III. Als de kogel door treedt, glijden de proximale sesambeentjes naar distaal en werken de schenkels als een articulaire vlak.<sup>12</sup> In onderzoek van *Van Heel (2004)* bleek dat in draf 63,3 % (onbekapt) en 57,8% (symmetrisch bekapt) van de paarden lateraal landt in het voorbeen; voor het achterbeen waren deze percentages respectievelijk 97,8% en 96,7%. Een laterale schenkel blessure ontstaat mede hierdoor eerder dan een mediale schenkel blessure. Tevens is de axiale zijde vaker aangedaan dan de abaxiale zijde. Een andere factor die bijdraagt aan schenkelblessures is een onregelmatige bodem, waardoor de schenkels ongelijk belast worden.<sup>13,16,19</sup>

Ook in racepaarden en dravers is in het voorbeen de tendo interosseus vaak aangedaan.<sup>24,30</sup> De gewichtsdragende fase is de verlengd is en er is een extreme mate van hyperextensie van de kogel, waarin de tendo interosseus juist steun geeft.<sup>16,22,29</sup> De blessure bij deze paarden is meestal in de midbody gelegen.<sup>3,5,29</sup>

Afhankelijk van het type werk en het niveau waarop dit uitgevoerd wordt, worden er verschillende pezige structuren belast. Als het werk eenzijdig is, worden dus steeds dezelfde structuren belast, waardoor overbelasting kan ontstaan.<sup>28,33</sup>

Een andere factor die zou kunnen bijdragen aan het ontstaan van peesblessures is de biochemische samenstelling van de pees. Voor de oppervlakkige buiger is de samenstelling op verschillende anatomische plaatsen onderzocht; er bleken duidelijk biochemische verschillen te zijn tussen de sesam,- en de midmetacarpale regio.<sup>26,27</sup>

Het doel van dit onderzoek is om de biochemische samenstelling in de tendo interosseus op zes verschillende plaatsen te bepalen. De hypothese is dat de biochemische samenstelling van de tendo interosseus in het voorbeen van het paard niet gelijk is op verschillende locaties en dat de biochemische samenstelling veranderd met de leeftijd.

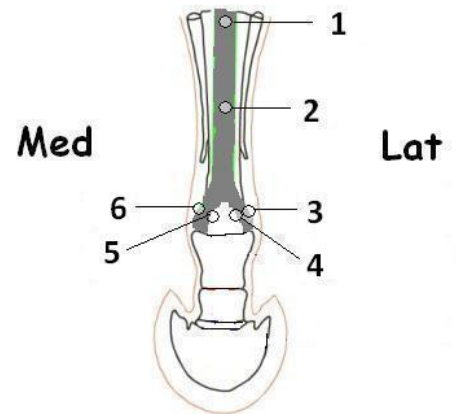
## Materiaal en Methoden

### *Materiaal*

Van 20 rechter voorbenen van paardenkadavers zijn peesmonsters genomen; de leeftijd van de paarden liep uiteen van 1,5 tot 29 jaar, met een gemiddelde van 12,5 ( $\pm 7,5$ ) jaar. Na het vrij prepareren van de tendo interossea zijn op 6 plaatsen monsters genomen met behulp van ponsbiopteurs (Biopsy Punch, Stiefel) (zie Tabel 1 en Fig. 4). De axiale zijdes van de schenkels zijn zo dicht mogelijk bij de aanhechting aan de proximale sesambeenderen bemonsterd. De abaxiale zijdes zijn op dezelfde hoogte bemonsterd.

Monsternr	Monsterplaats
1	Proximale aanhechting aan metacarpus
2	Midbody
3	Abaxiale zijde laterale schenkel
4	Axiale zijde laterale schenkel
5	Axiale zijde mediale schenkel
6	Abaxiale zijde mediale schenkel

Tabel 1. Plaatsen van monstername



Figuur 4. Palmair aanzicht tendo interossea

### *Waterpercentage*

Voor het bepalen van het waterpercentage is het natte gewicht gemeten (Mettler AE 240) en na  $\pm 60$  uur vriesdrogen het droge gewicht.

$$\text{Waterpercentage} = \frac{\text{nat gewicht} - \text{droog gewicht}}{\text{nat gewicht}} \times 100\%$$

### *Papaïne digestie*

Om de hoeveelheid DNA en GAGs te kunnen meten, moet het peesweefsel eerst gedigesteerd worden. Hiervoor is ongeveer 5 mg peesweefsel (droog gewicht) opgelost in 400  $\mu\text{l}$  papaïne buffer (48 uur bij 55 °C). De papaïne buffer bestond uit 20 mM N-Acetyl-L-cysteine (Sigma A7250), 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O (Sigma E5134), 0,5 M fosfaatbuffer (pH 6,5) en 1 U/ml papaïne oplossing (Sigma P3125).

### *DNA*

De cellulariteit ([DNA gehalte](#)) van de pees is bepaald met behulp van de kleurstof Hoechst 33258, 1 mg/ml (bisbenzimidazol; Sigma-Aldrich 861405) en fluorimetrie zoals beschreven door Kim et al (1988)<sup>25</sup>. Na toevoeging van Hoechst aan het in papaïne gedigesteerde peesweefsel is met een luminescentie spectrometer (LS50B, Perkin Elmer) bij 345 nm (excitatie) en 446 nm (emissie) golflengte, de hoeveelheid DNA bepaald aan de hand van een ijklijn (DNA stock, Sigma D4764). De hoeveelheid DNA is weergegeven in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  droog weefsel.

### *Glycosaminoglycanen*

De hoeveelheid GAG is bepaald via de methode volgens Farndale (1982)<sup>17</sup>. Aan het gedigesteerde peesweefsel is 10  $\mu\text{l}$  3% BSA (Bovine Serum Albumine) en 250  $\mu\text{l}$  DMMB reagens (dimethylmethyleen blauw) toegevoegd. Na incubatie (20 minuten,



kamertemperatuur) is de plaat in een colorimeter uitgelezen (Microplate Reader, Benchmark 4.0, 2000, Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands). De hoeveelheid GAG is weergegeven in µg/mg droog weefsel.

#### *Collageen en crosslinks*

Van de gevriesdroogde monsters is ± 2 mg afgewogen en na toevoeging van 500 µl 6 M HCl zijn de monsters 20 uur gehydrolyseerd bij 110°C. Vervolgens zijn de monsters gevriesdroogd, gedurende 48 uur. De gevriesdroogde monsters zijn opgelost in 1,2 ml MilliQ water en daar is 100µl 5,3 µg/ml homoarginine aan toegevoegd; deze laatste dient als interne standaard. Voor het bepalen van de hoeveelheid collageen is de hoeveelheid hydroxyproline gemeten, ervan uitgaande dat er 300 hydroxyproline residuen in 1 triple helix aanwezig zijn.<sup>2</sup> Om hydroxyproline (Hyp), crosslinks (HP en LP) en homoarginine (hArg) te meten, is gebruik gemaakt van een combinatie van HPLC en massa spectrometrie (MS). Voor de HPLC/MS is gebruik gemaakt van een 4000 Q-TRAP massa spectrometer, waarbij de MS op 400°C stond en het voltage van de electronenspray 4,5 kV was. De verschillende stoffen zijn gescheiden op een Synergi MAX-RP80A kolom op een flowrate van 200µl/min. De aminozuren zijn geïdentificeerd in de MRM mode van de MS met de volgende transitities; 429.0/82.0 (HP), 413.0/84.0 (LP), 189.2/143.7 (hArg) en 131.8/67.8 (Hyp).<sup>7</sup>

#### *Gedegradeerd collageen*

Voor de bepaling van gedegradeerd collageen is gebruik gemaakt van de methode van Bank (1997)<sup>1</sup>, Creemers et al (1997)<sup>8</sup> en Stegemann&Stadler (1967).<sup>36</sup> Na extractie van de proteoglycanen met een oplossing van 1 ml 4 M GuHCL in een incubatiebuffer (0,1 M Tris, 1 mM iodoacetamine, 1 mM EDTA, 300 µl pepstatine-A (Sigma P5318) en 300 µl PMSF (Sigma P7626)), is het monster 2 keer gewassen met een buffer (0,1 M Tris en 1 mM EDTA). Vervolgens zijn de monsters overnacht bij 37 °C gedigesteerd met alfa-chymotrypsine (αCT; 1 mg/ml). αCT verteert het gedegenerateerde collageen (supernatant), maar niet de intacte triple helixen (pellet). Daarna zijn zowel supernatant als pellet gehydrolyseerd met 6 M HCl gedurende 22 uur bij 110 °C. Na toevoeging van een buffer en chloramine T reagens is 20 min bij kamertemperatuur geïncubeerd. Vervolgens is DMBA (dimethylbenzylaldehyde) toegevoegd en is nogmaals geïncubeerd voor 25 minuten bij 60 °C.

De microplaat is uitgelezen in een Microplate Reader (Benchmark 4.0, 2000, Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands) en vervolgens is de hoeveelheid gedegradeerd collageen berekend volgens onderstaande formule:<sup>8</sup>

$$\text{Gedegradeerd collageen (\%)} = \frac{[\text{Hyp}] \text{ in supernatant}}{[\text{Hyp}] \text{ in supernatant} + [\text{Hyp}] \text{ in pellet}} \times 100\%$$

#### *Statistische analyse*

De biochemische data zijn geanalyseerd met SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois). Er is gebruik gemaakt van een ANOVA met als post-hoc test Bonferroni. Het significantie niveau is gesteld op P<0,05. Om een correlatie tussen de verschillende parameters en de leeftijd aan te tonen is gebruik gemaakt van een 1<sup>e</sup> orde lineair regressie model.

## Resultaten

Van alle bepaalde parameters was er geen enkele die een significante correlatie had met de leeftijd. Wel waren er significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende monsterplaatsen.

Het gemiddelde waterpercentage was op monsterplaats 5 het hoogst ( $80,16 \pm 3,06$  %). Monsterplaats 4 en 5 bevatten significant meer water dan de overige monsterplaatsen (Fig.5). Het gemiddelde DNA gehalte varieerde van  $6,16 \pm 1,38$  en  $8,47 \pm 1,33$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  droog gewicht, waarbij monsterplaats 2 significant meer DNA bevat dan monsterplaatsen 3,4 en 5 (Fig.6). Het hoogste gemiddelde GAGs gehalte is gemeten op monsterplaats 4; het GAGs gehalte bedroeg daar  $15,41 \pm 5,50$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  droog gewicht. Monsterplaatsen 4 en 5 bevatten significant meer GAGs dan monsterplaats 1. Monsterplaats 4 bevat ook meer GAGs dan monsterplaatsen 2 en 6 (Fig.7)

Het collageen gehalte varieerde tussen  $444,13 (\pm 123,86)$  en  $536,91 (\pm 67,67)$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  droog gewicht, met de laagst gemeten waarde op monsterplaats 1. Deze bevatte significant minder collageen dan monsterplaatsen 3,4,5 en 6. Monsterplaats 2 bevatte significant minder collageen dan monsterplaatsen 5 en 6 (Fig.8). De ratio HP/Collageen was significant lager op monsterplaatsen 4 en 5 (respectievelijk  $0,55 \pm 0,15$  en  $0,55 \pm 0,16$  mol/mol) (Fig.9). Voor de ratio LP/Collageen waren geen significante verschillen tussen de monsterplaatsen aan te tonen (Fig.10).

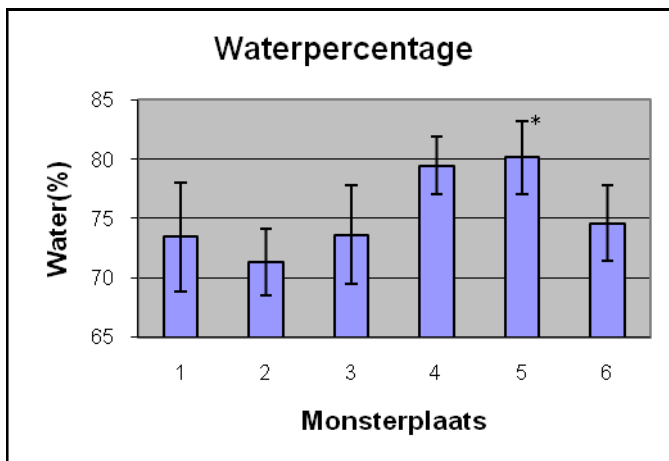


Fig 5. Waterpercentage

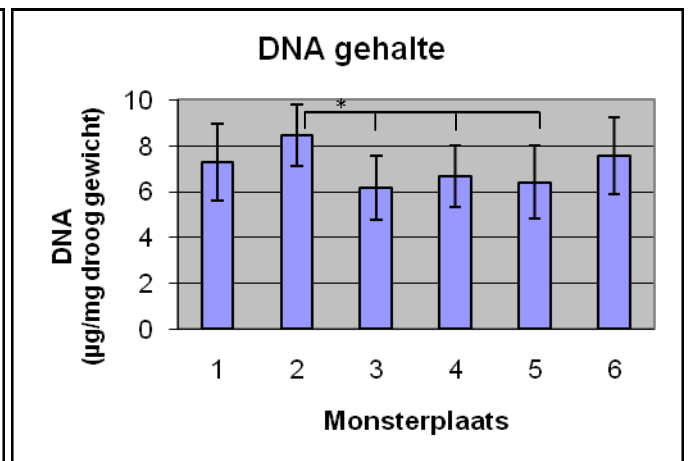


Fig 6. DNA gehalte

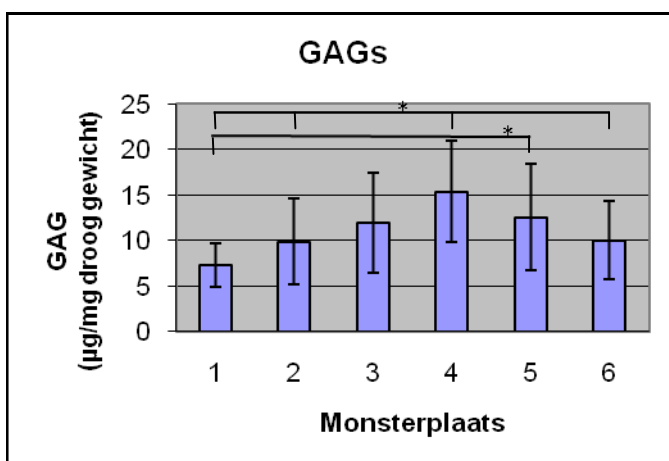


Fig 7. Glycosaminoglycanen

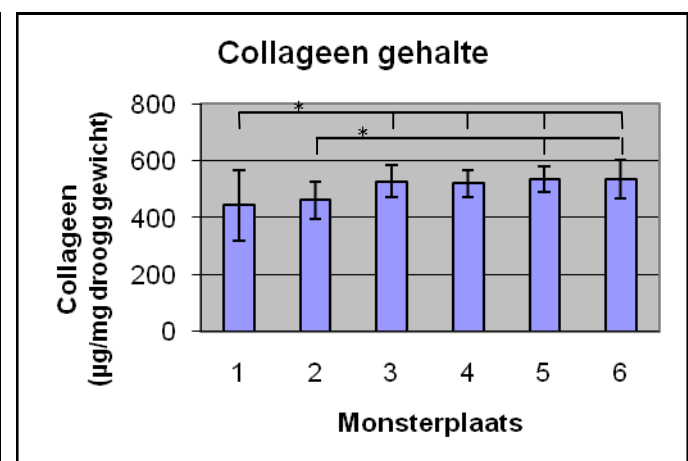


Fig 8. Collageen gehalte

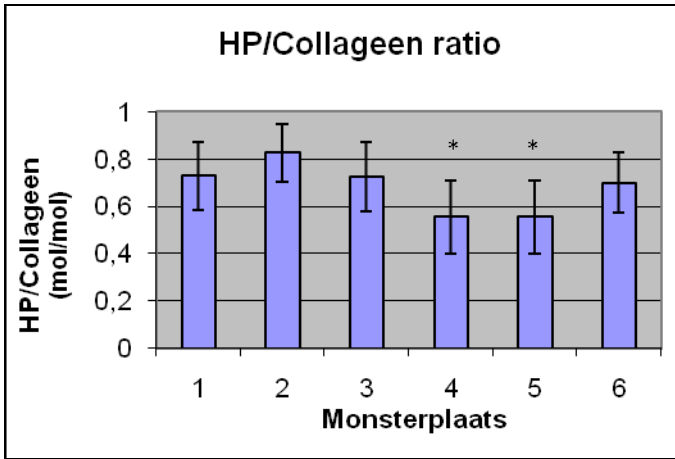


Fig 9. HP/Collageen ratio

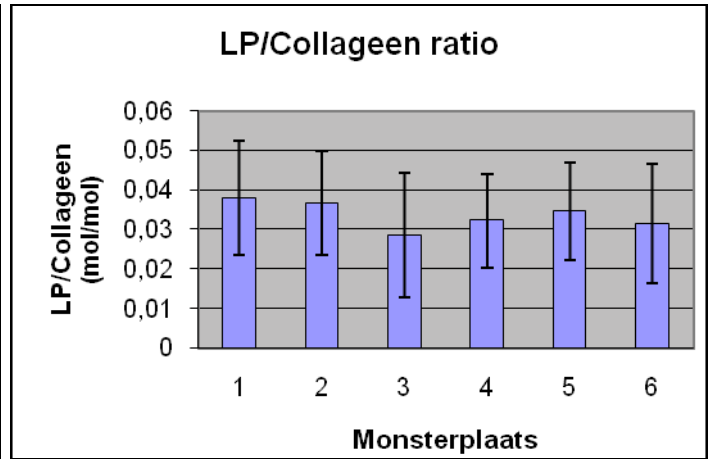


Fig 10. LP/Collageen ratio

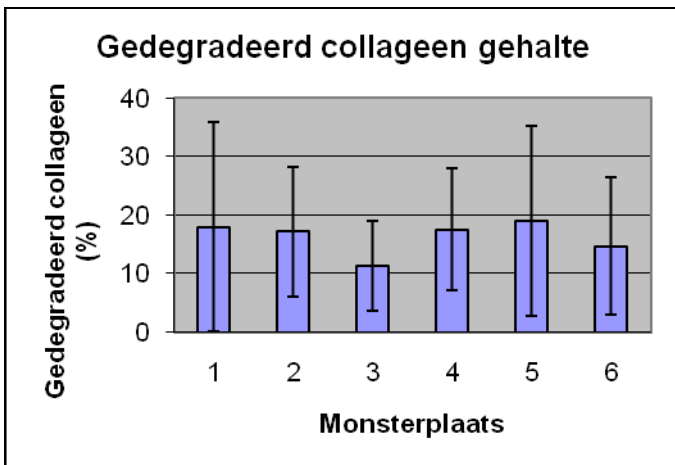


Fig 11. Gedegradeerd collageen gehalte

## Discussie

De biochemische samenstelling in de tendo interosseus is significant verschillende op verschillende plaatsen, zowel voor de non-collagene als voor de collagene parameters. Geen van de parameters heeft een significante correlatie met de leeftijd.

### **Non - collagene biochemische parameters**

Het waterpercentage was zowel in de axiale zijde van de laterale, als in de axiale zijde van de mediale schenkel significant hoger dan op de overige plaatsen. Macroscopisch was ook te zien dat de axiale zijdes van de beide schenkels meer water bevatten dan op de overige monsterplaatsen. Omdat het waterpercentage negatief gecorreleerd is aan de elastische modulus<sup>4,23,32</sup>, lijkt het erop dat de beide axiale zijdes minder stijf zijn dan de overige plaatsen. Bij weinig spanning, rekken de schenkels veel en zouden blessures eerder kunnen ontstaan. Aangezien de schenkels veel kracht moeten weerstaan in met name de extensie fase van elke (draf)pas, worden ze vaak tot bijna maximaal uitgerekt.

In het midmetacarpale gebied was de concentratie DNA significant hoger dan in de schenkels. De gemeten hoeveelheid DNA bestaat uit DNA van spiervezels en uit DNA van tenocyten. Met de gebruikte DNA analyse wordt geen onderscheid gemaakt tussen spiervezels en tenocyten. Omdat bekend is dat de tendo interosseus nog spiervezels bevat, met name midmetacarpaal, wordt er van uit gegaan dat dit voor een hoger DNA gehalte midmetacarpaal zorgt.<sup>14,18,35</sup>

De beide axiale zijdes van de schenkels bevatten significant meer GAGs dan de proximale regio. Dit houdt in dat de axiale zijdes meer compressiekracht aan zouden moeten kunnen dan het proximale deel<sup>26</sup>, terwijl er met name rek krachten op de schenkels komen te staan.-Wat echter niet over het hoofd gezien mag worden is, dat als peesweefsel degenerereerd, de hoeveelheid gesulferde GAGs toeneemt.<sup>4,6,18</sup> Het materiaal wat in dit onderzoek is gebruikt, is afkomstig van slachtpaarden, waarvan de geschiedenis niet bekend is. Beginnende peesblessures zijn zichtbaar op de cross sectional area (CSA) van de pees onder andere door roodverkleuring.<sup>14,16,18</sup> Aangezien in dit onderzoek niet naar de CSA is gekeken vóór monsternamen is het goed mogelijk dat er monsters zijn genomen van al (mild?)gedegenerereerd peesweefsel.

### **Collagene biochemische parameters**

Het gehalte aan collageen was in het proximale deel van de tendo interosseus significant lager dan op de overige plaatsen. Omdat collageen vezels de reksterkte bepalen, is een mogelijke consequentie dat er sneller peesblessures ontstaan in dit proximale deel. In het midmetacarpale gebied was de hoeveelheid collageen significant lager dan in de laterale schenkel, maar niet ten opzichte van het proximale gedeelte en de mediale schenkel.

Uit deze resultaten lijkt de midmetacarpale regio van de tendo interosseus minder reksterkte te hebben en mogelijk gevoeliger te zijn voor blessures. Dit komt niet geheel overeen met de literatuur.<sup>15,28,31</sup> Verklaringen hiervoor kunnen zijn dat óf de resultaten niet kloppen óf dat deze blessures niet onderkend worden.

Het waterpercentage in de midmetacarpale regio was laag, wat inhoudt dat de pees op deze locatie stijver is dan op de andere locaties. Het midmetacarpale gebied zal dan ook weinig 'opgerekt' worden tijdens het dagelijkse gebruik. Een consequentie kan zijn dat de peesvezels in het midmetacarpale regio snel uit elkaar getrokken worden bij teveel belasting.

Niet alleen het collageen gehalte is van belang voor de reksterkte, maar ook de crosslinks die zich tussen de collageenfibrillen bevinden zijn van belang. Om iets over de sterkte van het collageen netwerk te kunnen zeggen, moet de crosslinks/collageen ratio

bepaald worden. Hoe hoger deze is, hoe meer crosslinks er per collageen molecuul aanwezig zijn en hoe sterker het collageen netwerk. De HP/Collageen ratio was in de beide axiale zijdes van de schenkels significant lager dan in de andere plaatsen. Het collageen netwerk lijkt hier minder sterk en waarschijnlijk raakt de pees hier sneller overbelast.

De hoeveelheid LP (en daarmee de LP/Collageen ratio) was veel lager dan de hoeveelheid HP en de HP/Collageen ratio. Dit klopt met het feit dat er maar weinig LP in peesweefsel zit.

In dit onderzoek is ook het gehalte aan gedegradeerd collageen onderzocht. De standaarddeviatie is behoorlijk groot, waardoor de betrouwbaarheid van de bepalingen minder wordt. De uitgevoerde procedure is snel vatbaar voor fouten en het was beter geweest als het percentage gedegradeerd collageen ook met behulp van de massa spectrometer bepaald was.

### **Relatie met leeftijd, arbeid en blessures**

In dit onderzoek is voor geen enkele parameter een significante correlatie met de leeftijd gevonden. Er zijn geen andere onderzoeken naar biochemische leeftijdsrelaties in de tendo interosseus. In andere pezen worden wel correlaties tussen leeftijd en biochemische samenstelling beschreven.<sup>6,10,26</sup>

Het materiaal wat in dit onderzoek gebruikt is, is afkomstig van maar 20 paarden, waarvan de meeste rond de 10 tot 14 jaar oud waren. Voor het bepalen van een mogelijke leeftijdsrelatie zou het beter zijn om deze groep uit te breiden qua totaal aantal, maar ook qua aantal per leeftijdscategorie.

Zoals vermeld ontstaan peesblessures met name door herhaald teveel belasting en daardoor microtrauma. Als een paard steeds hetzelfde werk verricht, worden steeds dezelfde structuren belast, waardoor sneller geblesseerd kunnen raken.<sup>28</sup> Daarbij komt ook dat veel paarden op zachte bodem lopen en dat daar de krachten anders inwerken dan als een paard (ook) op de harde bodem loopt. Andere factoren die bijdragen aan het ontstaan van blessures van de tendo interosseus zijn onder andere de hoek die de hoef met de grond maakt, of er al dan niet al microschade is en de soort arbeid die verricht wordt.<sup>37</sup> Als er al andere musculoskeletale aandoeningen aanwezig zijn, worden de pezen anders belast dan bij een gezond musculoskeletaal systeem. Paarden met bijvoorbeeld ondervoetsproblemen gaan de benen anders belasten en wikkelen de pas ook anders af, wat mogelijk consequenties heeft voor de belasting van de andere structuren in het been.

De toename in peesblessures bij toenemende leeftijd zou toegeschreven kunnen worden aan een veranderd metabolisme.<sup>10,38</sup> De beste parameter hiervoor is de pentosidine crosslink; deze is echter niet bepaald in dit onderzoek. Pentosidine is een eindproduct van een glycosylatie proces, waarmee de snelheid van remodelering van het collageen netwerk geschat kan worden. Hoe hoger het pentosidine gehalte, hoe lager het metabolisme.<sup>26,27</sup> Een andere parameter is de GAG/DNA ratio of de collageen/DNA ratio. In dit onderzoek kwam naar voren dat het metabolisme op de verschillende locaties hetzelfde was, aangezien de trendlijn van GAG/DNA precies gelijk liep met de trendlijn van de GAG's zelf.

De tendo interosseus lijkt zich op een gegeven moment aangepast te hebben aan de mogelijke energie opslaande functie, net zoals de oppervlakkige buiger.<sup>24,30,34</sup> Ondanks toenemende arbeid, vertoont de tendo interosseus geen adaptatieve hypertrofie of een toename in collageen. *Smith (1999)* onderzocht dat in jonge paarden de krimp morfologie van het collageen netwerk hetzelfde is op verschillende plaatsen; in oudere paarden zijn er wél regionale verschillen en daarmee worden bepaalde regio's sneller overbelast dan anderen.

De tendo interosseus kan op meerdere plaatsen letsel oplopen; de vraag is waarom de axiale zijde van de laterale schenkel nu vaker betrokken is bij peesletsel dan de mediale schenkel. Biochemisch gezien is hier geen verklaring voor te geven. Wel lijken de axiale

zijdes van de schenkels biochemisch gezien minder sterk, waardoor ze mogelijk sneller overbelast raken.

Verder onderzoek is geïndiceerd naar de biomechanica van de tendo interossea op de verschillende locaties, zodat er meer inzicht komt met betrekking tot preventie en therapie van tendo interossea blessures. Het verschil in de biochemische samenstelling op de verschillende locaties duidt aan dat krachten op verschillende wijze worden opgevangen, waardoor er een voorkeurslocatie ontstaat voor blessures.

## Referentie

1. Bank, R.A., Krikken, M., Beekman, B., Stoop, R., Maroudas, A., Lafebbers, F.P.J.G., TeKoppele, J.M. (1997) A Simplified Measurement of Degraded Collagen in Tissues: Application in Healthy, Fibrillated and Osteoarthritic Cartilage. *Matrix Biology* **16**, 233 – 243
2. Bank, R.A., Tekoppele, J.M. (1996) Protocolle TNO-Leiden.
3. Batson, E.L., Paramount, R.J., Smith, T.J., Birch, H.L., Patterson-Kane, J.C., Goodship, A.E. (2003) Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions? *Equine vet. J.* **35**, 314 – 318
4. Birch, H.L. (2007) Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *Int. J. Exp. Path.* **88**, 241 – 248
5. Birch, H.L., Smith, T.J., Poulton, C., Peiffer, D., Goodship, A.E. (2002) Do regional variations in flexor tendons predispose to site specific injuries? *Equine vet. J. Suppl.* **34**, 288 – 292
6. Birch, H.L., Bailey, A.J., Goodship, A.E. (1998) Macroscopic ‘degeneration’ of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine vet. J.* **30**, 534 – 539
7. Bosch, G., de Mos, M., van Binsbergen, R., van Schie, H.T., van de Lest, C.H., van Weeren, P.R. (2009) The effect of focused extracorporeal shock wave therapy on collagen matrix and gene expression in normal tendons and ligaments. *Equine Vet. J.* **41**, 335 - 341
8. Creemers, L.B., Jansen, D.C., van Veen-Reurings, A., van den Bos, T., Everts, V. (1997) Microassay for the assessment of low levels of hydroxyproline. *Biotechniques* **22**, 656 - 658
9. Crevier-Denoix, N., Ruel, Y., Dardillat, C., Jerbi, H., Sanaa, M., Collobert-Laugier, C., Ribot, X., Denoix, J.-M., Pourcelot, P. (2005) Correlations between mean echogenicity and material properties of normal and diseased equine superficial digital flexor tendons: an in vitro segmental approach. *J. Biomech.* **38**, 2212 – 2220
10. Dowling, B.A., Dart, A.J. (2005) Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *Vet. J.* **170**, 184 – 192
11. Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G (2002) The Forelimb of the Horse. In: *Textbook of Veterinary Anatomy*. 3<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 573-610
12. Dyson, S.J., Genovese, R.L. (2003) The suspensory apparatus. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 2<sup>nd</sup> ed. Eds: M. Ross, S. Dyson, W.B. Saunders, Philadelphia, pp 654 - 672
13. Dyson, S. (2000a) Lameness and Poor Performance in the Sports Horse: Dressage, Show Jumping and Horse Trials (Eventing). *Proc. Amer. Assoc. Equine Pract.* **46**, 308 – 315
14. Dyson, S. (2000b) Proximal Suspensory Desmitis in the Forelimb and the Hindlimb. *Proc. Amer. Assoc. Equine Pract.* **46**, 137 – 142
15. Eyre, D.R., Mercedes, A.P., Gallop, P.M. (1984) Cross-linking in collagen and elastin. *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 717 - 748
16. Fackelman, G.E. (1973) The Nature of Tendon damage and its Repair. *Equine vet. J.* **5**, 141 -149
17. Farndale, R.W., Sayers, C.A., Barrett, A.J. (1982) A direct spectrophotometric microassay for sulphated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect. Tissue Res.* **9**, 247 - 248

18. Firth, E.C. (2006) The response of bone, articular cartilage and tendon to exercise in the horse. *J. Anat.* **208**, 513 – 526
19. Van Heel, M.C.V., Barneveld, A., van Weeren, P.R., Back, W. (2004) Dynamic pressure measurement for the detailed study of hoof balance: the effect of trimming. *Equine vet. J.* **36**, 778 – 782
20. Jansen, M.O. (1995) Tendon strain, force and function in equine locomotion. DISS, ADDIX, Wijk bij Duurstede
21. Jansen, M.O., Bogert, A.J. van den and Schamhardt, H.C. (1993) In vivo tendon forces in the forelimb of ponies at the walk, validated by ground reaction force measurements. *Acta Anat.* **146**: 162–167.
22. Kainer, R.A. (2002) Functional Anatomy of Equine Locomotor Organs. In: *Adams' Lameness in horses*, 5<sup>th</sup> ed. Ed: T.S. Stashak, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1 - 71
23. Kaneps, A.J. Equine Tendon and Ligament Injuries and Treatment
24. Kasashima, Y., Takahashi, T., Smith, R.K.W., Goodship, A.E., Kuwano, A., Ueno, T., Hirano, S. (2004) Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine vet. J.* **36**, 346 – 350
25. Kim, Y.L., Sah, R.L.Y., Doong, J.Y.H, Grodzinsky, A.J. (1988) Fluorometric Assay of DNA in Cartilage Explants Using Hoechst 33258. *Analyt. Biochem.* **174**, 174 – 176
26. Lin, Y.L., Brama, P.A.J., Kiers, G.H., van Weeren, P.R., DeGroot, J. (2005a) Extracellular Matrix Composition of the Equine Superficial Digital Flexor Tendon: Relationship with Age and Anatomical Site. *J. Vet. Med. Ser A* **52**, 333 – 338
27. Lin, Y., Brama, A.J., Kiers, G.H., DeGroot, J., van Weeren, P.R. (2005b) Functional adaptation through changes in regional biochemical characteristics during maturation of equine superficial digital flexor tendons. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 1623 – 1629
28. Murray, R.C., Dyson, S.J., Tranquille, C., Adams, V. (2006) Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis. *Equine vet. J. Suppl.* **36**, 411 – 416
29. Patterson-Kane J.C., Firth E.C., Parry D.A., Wilson A.M., Goodship A.E. (1998) Effects of training on collagen fibril populations in the suspensory ligament and deep digital flexor tendon of young thoroughbreds. *Am. J. Vet. Res.* **59**, 64 – 68
30. Perkins, N.R., Reid, S.W.J., Morris, R.S. (2005) Risk factors for injury to the superficial digital flexor tendon and suspensory apparatus in Thoroughbred racehorses in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* **53**, 184 – 192
31. Reynolds Cowles, R. (2000) Proximal Suspensory Desmitis – A Qualitative Survey. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* **46**, 143 – 144
32. Smith, R.K.W. (2006) Physiology of Tendon and Ligament. In: *Proc 9<sup>th</sup> Congress on Equine Medicine & Surgery in Geneva*, Eds: P. Chuit and S. Montavon, uitgever, plaats, pp 25 – 29
33. Smith, R.K.W., Birch, H.L., Goodman, S., Heinegård, D., Goodship, A.E. (2002) The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration – hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comp. Bioch. Phys. Part A* **133**, 1039 – 1050
34. Smith, R.K., Birch, H., Patterson-Kane, J., Firth, E.C., Williams, L., Cherdchutham, W., van Weeren, P.R., Goodship, A.E. (1999) Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. *Equine vet. J. Suppl.* **30**, 201 – 209
35. Soffler, C, Hermanson, W. (2006) Muscular Design in the Equine Interosseus Muscle. *J.Morphol.* **267**, 696 - 704



36. Stegemann, H., Stalder, K. (1967) Determination of Hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta* **18**, 267 - 273
37. Stephans, P.R., Nunamaker, D.V., Butterweck, D.M. (1989) Application of a Hall-transducer for measurement of tendon strain in horses. *Am. J. Vet. Res.* **50**, 1098 – 1095
38. Webbon, P.M. (1973) Equine Tendon Stress Injuries. *Equine vet. J.* **5**, 58 – 64