

# **Utvärdering av autologt konditionerat serum**

**Evaluation of autologous conditioned serum**

**John Österdahl**

**Handledare: Christopher Johnston  
Universitetsdjursjukhuset Hästkliniken  
Biträdande handledare: Ove Wattle  
Inst. för kliniska vetenskaper**

---

**Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet**

**Examensarbete 2008:67  
ISSN 1652-8697  
Uppsala 2008**



**Evaluation of autologous conditioned serum**

**John Österdahl**

**Supervisor: Christopher Johnston  
University animal hospital, Equine clinic  
Assistant supervisor: Ove Wattle  
Department of Clinical Sciences**

---

**Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet**

**Examensarbete 2008:67  
ISSN 1652-8697  
Uppsala 2008**

**Swedish University of Agricultural Sciences  
Faculty of Veterinary Medicine and  
Animal Sciences  
Veterinary Medicine Programme**

**Degree project 2008:67  
ISSN 1652-8697  
Uppsala 2008**

## **Innehållsförteckning**

Sammanfattning .....	1
Summary.....	2
Inledning.....	3
Litteraturoversikt.....	5
Material och Metoder .....	12
Resultat .....	13
Diskussion.....	14
Konklusion.....	14
Litteraturförteckning .....	15

## **SAMMANFATTNING**

Största anledningen till prestationsnedsättning hos sporthästar idag är osteoartrit. Artritens förlängning, osteoartros, karaktäriseras av nedbrytning av ledbrusket. Interleukin-1 (IL-1) anses vara den enskilt viktigaste faktorn i inflammationskaskaden som leder till ledbruskdegeneration. Dessa skador har fram tills idag i princip behandlats med produkter som kortison, hyaluronsyra och polysulfaterad glykosaminoglykaner (PSGAG).

Vid ledbehandling så har inga signifikanta skillnader i effekt kunnat påvisas mellan PSGAG, hyaluronsyra och koksalt. Kortison har däremot i vissa fall kunnat fördröja läkeprocessen samt ha en katabol effekt på ledbrusket.

Autogt konditionerat serum (ACS, handelsnamn häst; Irap) är en autolog behandlingsmetod där hästens eget blod inkuberas och cetrifugeras för att skapa en immunologisk ”soppa” bestående främst av interleukin-1 receptor protein antagonister. Det teoretiska stödet är starkt samt även de kliniska utfallen i flera studier där metoden har jämförts mot hyaluronsyra och koksalt.

I den här uppsatsen jämfördes behandlingsutfallet av Irap på hopphästar, med en ålder av 6-14 år på en nivå från medelsvår och uppåt och som ej blivit bra efter tidigare behandling av artrit/artros med PSGAG eller hyaluronsyra, vid två veterinärpraktiker i mälardalen. Som mått på lyckad behandling var återgång till sport efter tre månader.

Behandlingsresultaten vid de båda veterinärpraktikerna var att 70 % respektive 100 % av behandlade hästar återgick till sport.

Studiens resultat indikerar att det kan vara värt att vidare studera Irap som behandlingsmodell för osteoartrit/osteoartros.

## **SUMMARY**

Joint injury (inflammation) or osteoarthritis is the most common cause of poor performance in the athletic horse. Osteoarthritis is the ensuing degeneration of joint cartilage due to inflammation/injury. The single most important factor in the inflammation cascade of joint injuries is interleukin-1 (IL-1). Until recently, these injuries have been treated with products like hyaluronic acid, cortisone and polysulphated glycosaminoglycans (PSGAG).

Several studies have not been able to demonstrate a significant difference in the clinical improvement of joint injuries treated with hyaluronic acid or PSGAG and saline. Cortisone is a potent-inflammatory agent that may on the other hand delay injury repair and has a catabolic effect on joint cartilage.

Autologous conditioned serum (ACS, trade name; Irap) is a therapeutic method where the horse's own blood is used to create an anti-inflammatory "soup", containing mainly interleukin-1 receptor protein antagonists. The theoretic basis for the use of ACS in inflamed joints is sound, as well as the results of clinical trails where Irap have been tested against hyaluronic acid and saline.

In this clinical survey, Irap was compared with hyaluronic acid and PSGAG in two groups of ten intermediate level jumping horses at two equine clinics. The horses included in this survey were not responsive to treatment with hyaluronic acid or PSGAG and subsequently treated with Irap. A measure for successful treatment with Irap was the return to normal performance three month post treatment.

Seven of ten and ten of ten horses returned to full activity after three month post treatment with Irap that had not responded to hyaluronic acid or PSGAG.

This survey indicates that Irap is well worth further investigation as a therapeutic model of osteoarthritis/osteoarthrosis in the athletic horse.

## INLEDNING

Största anledningen till prestationsnedsättning hos sporthästar är osteoartrit, ledinflammation (McIlwraith, Trotter, 1996). Detta lidande har fram tills idag framförallt behandlats med produkter som kortison, hyaluronsyra och polysulfaterade glykosaminoglykaner (PSGAG). Osteoartrit kan ha olika etiologier men oavsett etiologi så kan följden lätt bli osteoartros, vilket är en degenerativ ledsjukdom. Osteoartrosens patogenes karakteriseras av ledbroskdegeneration. Interleukin-1 (IL-1) anses vara den enskilt viktigaste faktorn i inflammationskaskaden som leder till ledbrosket bryts ner (McIlwraith, 2003).

Hyaluronsyra har sedan 1980-talet använts vid behandling av ledinflammationer, som ersättning för den egna degenererade ledvätskan och för dess direkta antiinflammatoriska effekt. Hyaluronsyra har ofta givits i kombination med kortison i de fall inflammationen pågått en tid (McIlwraith, 2003).

Behandling med PSGAG som har både antiinflammatoriska och chondroprotektiva egenskaper, har av vissa författare ansetts vara golden standard vid aseptiska artriter (McIlwraith, 2003).

Dock kan båda dessa behandlingsmetoder ha vissa bieffekter, kortison påverkar inte bara den tidiga fasen av inflammationen utan även läkningsprocessen (McIlwraith, Trotter 1996) och PSGAG har rapporterats öka risken för septisk artrit (Rashmir-Raven et al, 1992).

Den "senaste" modellen för behandling av osteoartrit baseras på autologa metoder. Hästens eget blod används för att skapa en produkt för lokal antiinflammatorisk behandling av leden. Idag finns det två metoder beskrivna, autologt konditionerat serum (autologous conditioned serum, ACS) med högt innehåll av interleukin-1 receptor protein antagonister (Irap) och autolog konditionerad plasma (ACP). Detta arbete kommer att behandla den förra. Irap är handelsnamnet för häst (equin) ACS och har använts i ett antal år på häst. Metoden går ut på att man med en speciell spruta tar venöst blod från patienten. Sprutan innehåller glaskulor, vilka är till för att stimulera de vita blodkropparnas egen produktion av antiinflammatoriska cytokiner i form av interleukin-1 receptor protein antagonister. Sprutan inkuberas därefter i ett värmeskåp. Därefter centrifugeras sprutan och det interleukinrika serumet samlas i doser som är anpassade till de leder som skall behandlas. Detta är alltså en metod direkt riktad mot IL-1. Hittills finns inga rapporterade bieffekter från "Irap-metoden" (Weinberger, APG-meeting, 2008).

Syftet med arbetet var att teoretiskt beskriva de konventionella metoderna (hyaluronsyra, kortison och PSGAG) och Irap. Samt att se hur Irap-behandling påverkade behandlingsresultatet på hästar med en manifest skada i hovled och/eller kotled där den gängse behandlingen ej givit önskat resultat.

Frågeställningen var om Irap skulle ge ett bättre utfall än de konventionella metoderna på aktiva hopphästar med osteoartrit/osteoartros i hovled och/eller kotled?

Hypotesen var att Irap är en effektiv metod för behandling av skada i led.

Arbetet genomfördes som en retrospektiv journalstudie av hopphästar, 6 – 14 år gamla, som tävlat på en nivå av 130 och uppåt. Hästarna var alla tidigare behandlade med PSGAG och/eller hyaluronsyra i kotlederna eller hovlederna och då de ej hade svarat på denna behandling blev de behandlade med Irap.

Arbetet har dels genomförts på Universitetsdjursjukhuset-SLU och i Enköping vid veterinär Nicholas Dimitris praktik och dels genom deltagande i ett Arbetsgrupp pferd (AGP) möte ”Applying regenerative therapies for tendon and joint caused lameness of horses” i Bonn, Tyskland, samt genom personliga samtal och korrespondens med dr. Julio Reinecke managing director Orthogen Veterinary GmbH, Düsseldorf, Tyskland.



## LITTERATURÖVERSIKT

### Degenerativ leedsjukdom, artrit och artros

Artrit och artros är generella termer som används i samband med många ledlidande. De etiologiska faktorerna för artrit kan vara: traumatisk skada av led och/eller ledkapsel och ligament, utvecklings rubbningar (osteocondrosis), autoimmuna och infektiösa (septiska). Osteoartros (OA) utvecklas troligen om dessa faktorer kvarstår under en längre tid. Termen osteoartros är specifik och innebär en progressiv och permanent degeneration av ledbrosket. Vad det gäller definitionen så skiljer sig den humana och den equina definitionen sig åt. Vad som gäller för båda är en förlust av funktion i ledbrosket, men human OA uppkommer ofta utan föregående inflammation medan den hos häst oftast föregåtts av en synovit/capsulit. OA kallas även degenerativ led sjukdom (DJD; degenerativ joint disease) då den karaktäriseras av degeneration av ledbrosket samt förändringar i benet som skleros i det subchondrala benet och osteofytära pålagringar.

Equin OA kan delas in i tre kategorier:

Typ 1: Associerad med synovit och capsulit, vanligen i carpus, distala intertarsal leden, metacarpophalangeal leden (kotled), distala interphalangeal leden (hovled).

Typ 2: Associerad med, och vanligen sekundär till, andra identifierade skador eller problem inkluderande intra-artikulära frakturer, traumatiska ledbrosk- och ligamentskador, osteochondrosis dissecans, subchondral benskada eller sjukdom, subchondrala cystor, septisk artrit och fragmentering av patella.

Typ 3: Nonprogressiv eller tillfällig ledbrosk erosion.

Den första kategorin uppkommer som följd av ofysiologisk belastning och stress medan den andra kategorin beror på chondrocyternas dåliga förmåga att läka av skada. Den tredje typen avser benremodulering, synoviala responser, mikrofrakturer, vaskulära förändringar och andra extra-artikulära broskförändringar som primära problem, där brosk förändringar anses sekundära.

Synovit och capsulit anses vanligen bero på upprepat trauma (McIlwraith, Trotter 1996). Även om synoviten/capsuliten ofta är primär så kan den också uppkomma sekundärt till följd av den enzymatiska degradationen av ledbrosket.

Synovialmembranet är mekaniskt vekt och har ingen känd biomekanisk roll, men synovialmembranskador kan ha konsekvenser för fysiologin och patofysiologin i leden. Det har föreslagits att vissa av skadorna påverkar diffusionen av metaboliter genom synovialmembranet och därigenom påverkar synoviocyternas metabolism. Förändrade synoviocyter kan frigöra degenerativa cytokiner och enzymer vilka i sin tur ytterligare förändrar miljön i leden och påverka ledbrosket. Det förhöjda vätsketrycket som ses vid synovit/capsulit kan även det leda till cirkulationsrubbningar och en frisättning av fria radikaler som även de kan skada ledbroskets cellulära och matrix makromolekyler.

Inflammation i synovialmembranet och lysosomal aktivitets betydelse för OA har undersökts experimentellt (McIlwraith, Trotter 1996). Det man såg var

degenerativa förändringar hos chondrocyterna och en förlust av glykosaminoglykaner (GAG) samt begynnande osteofyter och entesiofyter, förändringar motsvarande tidig OA.

Ledbroskets kollagen typ II är som starka trådar i ett nätverk och ger både styrka och elasticitet och har en mycket lång omsättningstid, detta nätverk är nödvändigt för att hålla kvar broskets proteoglykaner som även de bidrar till elasticiteten. Broskdegeneration eller degradering är själva karaktären för OA. Den utmärker sig med erosion och slipfårar i ledbrosket. Histologiskt syns nekros av chondrocyter och i ett senare skede förlust av brosk, nekros i det subchondrala benet, fokal osteonekros och periartikulära osteofytformationer. Biomekaniskt sker en reduktion av broskets innehåll av proteoglykaner samt en förändring av strukturen och vatteninnehåll. Dessa förändringar ger ett mindre elastiskt brosk med mindre motståndskraft mot kompression. Vid OA sker en degradering av kollagen typ II och proteoglykaner och leden förlorar en del av sin styrka och elasticitet (McIlwraith, Trotter 1996).

### **Enzymaktivitet förknippad med artrit/artros**

Matrix metalloproteinaser (MMP) anses spela en stor roll i degraderingen av extracellulärt matrix, de tre viktigaste anses vara kollagenas (MMP-1), gelatinas (MMP-2) och stromelysin (MMP-3). Kollagenas produceras av en mängd olika celler; synoviocyter, makrofager, fibroblaster, chondrocyter, osteoblaster och endotelceller. Kollagenas klyver kollagen typ I, II, III, VII, VIII och X. Gelatinas utsöndras från chondrocyter och synovialceller. Gelatinas degraderar denaturerade kollagen typ II och typ IV och har en signifikant aktivitet mot fibronectin, elastin och kollagen typ V, VII, X och XI dock ej kollagen typ I och VI. En andra typ av gelatinas finns kallad MMP-9 eller typ V kollagenas som produceras från PMS och makrofager. Stromelysin produceras av fibroblaster och synovialmembran och degraderar proteoglykaner men även kollagen typ IV, V, VII och XI. Kollagenas från neutrofiler eller MMP-8 klyver även den proteoglykaner.

Alla MMP utsöndras som proenzym som aktiveras extracellulärt. Kollagenas aktiveras av stromelysin från synovialceller, men kollagenas och andra MMP aktiveras även av plasmin, kallikrein och cathepsin B. Stromelysin aktiveras av plasmin och av andra proteinaser som aktiverar kollagenas. Koncentrationen av stromelysin ökar vid närvaron av IL-1. MMP inhiberas av två vävnadsinhibitorer av, TIMP-1 och TIMP-2 (tissue inhibitors of metalloproteinaser), som finns i bindväv. En obalans mellan TIMP och MMP anses ha betydelse för nedbrytningen av ledbrosket. I en normal led finns det ett överskott av TIMP över stromelysin och i en skadad led eller OA påverkad led är koncentrationerna av proteoglykanfragment, stromelysin och kollagenas ökade, dock även mängden TIMP. Men vid en ledskada är koncentrationen stromelysin högre än TIMP, vilket kan bero på stimulering från IL-1 och prostaglandiner.

Serineproteinaser är plasminaktivatorer (PA) som kan produceras från inflammerade synovialmembran. Dessa aktivatorer klyver plasminogen till aktivt plasmin som i sin tur kan aktivera MMP. Två typer av plasminaktivatorer är kända; vävnads plasminaktivatorer (tPA: tissue plasmin activator) och urokinase (uPA, urokinase plasmin activator), vilka båda klyver plasminogen till aktivt plasmin. Båda utsöndras från chondrocyter och synovium om dessa stimuleras av

IL-1 och TNF (tumor necrosis factor). Detta leder till degradering av ledbrösket och förlust av proteoglykaner. Elastas och cathepsin G från neutrofiler är andra serine proteinaser som kan degradera proteoglykaner men deras roll är okänd.

Cysteinproteinaser: cathepsin B, H och L är lysosomala proteinaser som kan bryta ner proteoglykaner, deras utsöndring stimuleras av IL-1 och TNF- $\alpha$  men deras roll i OA är för närvarande okänd.

Aspartic proteinaser: cathepsin D utsöndras under inflammation i surt pH av makrofager och bindvävsceller. Cathepsin D har även den förmågan att bryta ner proteoglykaner men även den rollen är okänd.

Prostaglandiner och då primärt grupp E (PGE) produceras i inflammerade leder och ger ett minskat innehåll av proteoglykaner genom att minska syntesen i ledbrösket och genom att öka degraderingen. PGE<sub>2</sub> frisätts från synovialceller och chondrocyter stimulerade av IL-1. PGE<sub>2</sub> gör även att smärtperceptionen ökar, ben demineraliseringen ökar samt att utsöndringen av både tPA och uPA ökar och då som följd ökar även MMP.

Fria radikaler: superoxidanjoner, hydroxylradikaler och hydrogenperoxider, bryter ner proteoglykaner, hyaluronsyra och kollagen. Vid inflammation bildas dessa från leukocyter och makrofager.

Cytokiner: definieras som lösliga peptider som frisätts av en cell och påverkar andra, många av de ovan beskrivna proteinaserna frisätts av dessa. Cytokiner kan utöva sin effekt på tre olika sätt; frisättning till cirkulationen och påverka över en distans, parakrint på celler i närheten eller autokrint det vill säga direkt på sig självt. På målcellerna verkar de via transmembrana receptorer och ändrar genuttrycket. Studier av leder har visat att IL-1 och TNF- $\alpha$  påverkar syntesen av MMP via påverkan på chondrocyter och synovialceller och produceras av dessa. Båda cytokinerna är viktiga mediatorer i ledsjukdom.

Interleukin-1 (IL-1) familjen består av två agonister IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  och antagonisten interleukin-1 receptor protein antagonist (IL-1Ra). IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$  produceras i respons till infektion, mikrobiella toxiner, inflammationsmediatorer, immunokomplex och av produkter från aktiverade lymfocyter. Ledchondrocyter uttrycker receptorer som interagerar med både IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$ . TNF- $\alpha$  och IL-1 har liknande effekter på leden, produktionen av matrixproteinaser och degradering av matrix från chondrocyter induceras primärt av dessa. Två katabola effekter har setts. En är enzymatisk och förstör både levande och dött brosk i omedelbar närhet. Den andra är indirekt icke-enzymatisk och förstör även den levande brosk men på distans. Den sistnämnda genom proteinet catabolin som är en mindre molekylär sur form av IL-1. Catabolin degraderar proteoglykaner och inhiberar samtidigt deras syntes. IL-1 inducerar frisättningen av MMP (kollagenas och stromelysin) och PA (serineproteinaser). IL-1 stimulerar chondrocyter att syntetisera stromelysin som i sin tur konverterar kollagenas till sin aktiva form. Plasmin producerat från plasminogen aktiverar även denna MMP. Även cysteinproteinaser stimuleras av IL-1. IL-1 uppreglerar även produktionen av PGE<sub>2</sub>.

Sammantaget är synovialmembran skador viktiga i OA patogenesen då de: 1. ger en direkt frisättning av lysosymala enzymer speciellt metalloproteinaser: 2. stimulerar frisättningen av prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). 3. kan ge frisättning av fria radikaler: 4. Orsakar frisättning av cytokiner, speciellt IL-1 som indirekt ökar frisättningen av metalloproteinaser från både chondrocyter och synoviocyter. Inflammationen i synovialmembranet kan ge smärta genom direkt stimulering av smärtreceptorer i kapselvävnaden.

Oavsett bakgrund, OA patogenesen är ju multifaktoriell, sker destruktion av extracellulär matrix genom proteinaser ffa genom metalloproteinaser. Cytokiner som IL-1 är viktiga i regleringen av dessa degenerativa processer. Chondrocyterna försöker ständigt reparera mindre skador genom ökad aktivitet och proteoglykansyntes men när reparationsförmågan överskrids får vi osteoartros i leden (McIlwraith, Trotter 1996).

### **Intra-artikulära kortikosteroider**

Kortisonets användande på hästar med ledinflammation rapporterades första gången av Wheat 1955. Han såg stora kliniska förbättringar men betonade även att patienten måste få vila så att den skadade vävnaden hann läka. Skadliga effekter från intra-artikulärt bruk på häst rapporterades av O'Connor 1968 (McIlwraith, Trotter 1996).

Kortison har både en antiinflammatorisk och en immunosuppressiv effekt men även tyvärr en katabol dito. Kortisonet inhiberar både den tidiga och sena fasen av inflammationen, vilket inkluderar inte bara smärtan, värmen och svullnaden utan även läkningen och reparationen. Effekten utövas på cellnivå genom att kortisonet binder till intracellulära receptorer i cytoplasman. Där stänger kortisonet av transkriptionen för cyclooxygenaser (COX-1 och COX-2), lipooxygenase och cytokiner: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- $\gamma$  och celladhesionsfaktorer samt inducerar transkription för kollagenas. Prostaglandin E<sub>2</sub> produktionen stoppas effektivt, vilket står för stor del av de antiinflammatoriska effekterna. Detta sker genom produktion av proteinet lipocortin som bryter prostaglandinskaskaden tidigare än vad NSAID gör (Tizard, 2004).

Kortison förhindrar även inflammationsceller (neutrofiler, monocyter och makrofager) från rörelse från blodet genom att uttrycket för adhesionsfaktorer nedregleras. Även produktionen av stromelysin och kollagenas hos inflammerade synovialceller minskar. Hos människa har det visats en inhibering av plasminogenaktivatörer vilka aktiverar plasmin som degraderar ledbrosk och basalmembran. Också fibroblasternas funktion påverkas genom minskad produktion av kollagen och glykosaminoglykaner.

Kortisonets påverkan av synovialvätskans hyaluronsyra och proteoglykaner är dosrelaterad. Proteoglykaner degraderas av en hög dos medan påverkan på hyaluronsyra är motstridig. Vissa studier tyder på en minskad syntes av hyaluronsyra och andra på ökad syntes efter intraartikulär kortisoninjektion. Kortison har rapporterats ha en inhiberande effekt på kollagensyntesen och GAG. Dock har det visat sig om kortison och hyaluronsyra ges samtidigt fås en minskad degradering av proteoglykaner, d v s en skyddande effekt uppnås.

I studier med inducerade chipfrakturer mot icke-injicerade leder visade de leder injicerade med methylprednisolone acetate kraftigt minskad inflammation men det påvisades också större degenerativa förändringar såsom broskdegeneration och lokal bennekros. Vid injektion av betamethasone har det inte kunnat påvisas några liknande skillnader.

Förutom de redan upptagna biverkningarna har det rapporterats föreligga en risk för potentiering av en samtidig infektion på grund av de immunosuppressiva effekter kortisonet har, en fördröjning av symtomen och därmed diagnosen, en fördröjning av läkningsprocessen samt utvecklandet av sjukdomen fång setts efter ledinjektion med kortison jämfört med koksaltlösning (McIlwraith, Trotter 1996).

De klinisk mest använda kortisonpreparaten är: methylprednisolone acetate (Depomedrol) långtidsverkande; betamethasone (Celestona) vanligt använt humanpreparat; triamcinolone acetonide (Kenacort) vilken har viss chondroprotektiv effekt (McIlwraith, 2003).

### **Hyaluronsyra**

Hyaluronsyra produceras av synovialmembranets synovialceller och av ledbroskets chondrocyter. Den ger leden viskoelasticitet och smörjer synovialmembranet och ledbrosket samt skapar genom sin höga molekylvikt en barriär för leukocyters tillträde till leden. I ledbrosket fungerar hyaluronsyran som kärna i de extracellulära matrixets proteoglykanaggregat. Detta ger ledbrosket sin kompressiva stelhet. Hyaluronsyra tas upp av lymfsystemet degraderas av levern.

Goda effekter av intraartikulär injektion av hyaluronsyra har visats i samband med artrit både hos människa och hos häst. Den terapeutiska effekten beror troligen på att leden får en komplettering av hyaluronsyra då den endogena blivit degraderad. Halveringstiden för hyaluronsyra injicerad i en normal led är 96 timmar. Denna tid reduceras vid ledsjukdom. Trots att halveringstiden reduceras vid artrit så hinner det intracellulära utrymmet i synovialmembranet påverkas vid behandling, då hyaluronsyran har en direkt antiinflammatorisk effekt, troligen genom att utöva effekt på leukocyternas cellreceptorer. En ökad syntes av endogen hyaluronsyra från synoviocyter har setts i samband med injektion av hyaluronsyra i led (McIlwraith, Trotter 1996).

Bäst behandlingseffekt vid artrit har setts när hyaluronsyra används i kombination med kortison (McIlwraith, 2003).

### **Polysulfaterade glykosaminoglykaner**

Den exakta mekanismen för polysulfaterade glykosaminoglykaner (PSGAG) vid ledbehandling är okänd, men effekten flera studier hävdar att de har en positiv effekt (McIlwraith & Trotter, 1996). Heparinoider, vilka inkluderar PSGAG, påverkar vissa proteoglykaner (Altman et al, 1989). Fibronectin, som är en proteoglykan som ökar i mängd i osteoartros, kan stabiliseras med heparin och andra polysulfaterade polysackarider. PSGAG kan även inhibera många degenerativa enzymer aktivitet, så som lysosomal elastas, lysosomal hydrolas, cathepsin G, serineproteinaser och metalloproteinaser (proteoglykas och kollagenas), som finns i ledbrosket. Teoretiskt skulle en inhibering av syntesen

eller funktionen av dessa enzymer kunna vara av nytta vid behandlingen av OA. PSGAG har också en antiinflammatorisk verkan, indirekt genom att förhindra att leukocyter får tillträde till det inflammerade området och direkt genom sin inhiberande effekt mot prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Dietmar, 1983). PSGAG har även visats sig påverka koncentrationen av hyaluronsyra, genom minskad degradering eller ökad syntes (Adam et al 1980).

Även effekten på chondrocyter är ej heller helt klarlagd. PSGAG har visat sig öka den syntetiserande förmågan hos chondrocyter som stått under påverkan från dexamethason (Annefeld, 1984). I *in vitro* studier gjorda på equin brosk har man fått olika resultat av PSGAGs beroende på om friskt/normalt eller osteoartrosisk vävnad användes. PSGAG inhiberade kollagenets och hyaluronsyrans degradering samt stimulerade till syntes i både normal och osteoartrosisk vävnad. Dock var osteoartros påverkad vävnad mer känslig för PSGAG än normal vävnad. (Glade, 1990)

I kliniska studier har man sett en signifikant förbättring i synovial vätskans proteininnehåll och viskositet samt en generell förbättring av de kliniska tecknen på ledsjukdom såsom minskad svullnad och ökad flexion av leden. Man såg även en minskad fibrillation och erosion av lederna samt mindre chondrocyt död. Dock har man sett att de leder som var behandlade med PSGAG blev reparationsvävnaden mer fibrös till sitt slag, mera av kollagen typ I (Barr et al, 1994).

En bieffekt som setts är att PSGAG kan potentiera effekten av infektion i leden, detta troligen på grund av att PSGAG inhiberar de equina komplementfaktorer som normalt har en baktericid effekt (Rashmir-Raven et al, 1992). Eftersom PSGAG är en heparinoid har läkemedlet även en viss effekt på hemostas mekanismen, en förlängning av den aktiverad partiella tromboplastintiden, den aktiverade koagulationstiden och protrombintiden (Fubini et al, 1993). Dock har man inte sett några problem som är kliniskt relevanta (Hamm et al 1984).

PSGAG anses vara goldenstandard som behandling av ledsador, på grund av sina antiinflammatoriska och chondroprotektiva egenskaper (McIlwraith, 2003).

### **Jämförelser av behandling med hyaluronsyra och PSGAG**

Frisbie *et al* (2009) studerade av 24 friska hästar i åldern 2-5 år där osteoartrit inducerades experimentellt i intercarpalleden. Hästarna delades därefter in i tre behandlingsgrupper, 8 behandlades med 20 mg hyaluronsyra, 8 behandlades med 250 mg PSGAG och 125 mg amikacin och 8 i en kontrollgrupp som behandlades med 0,9 % NaCl och amikacin. Grad av hälta utvärderades, synovia analyserades, brosk och synovialmembran undersöktes postmortem. Inga bieffekter sågs. PSGAG minskade mängden synovia och histologiskt sågs reducerad synovialmembranvaskularitet och mindre subintimal fibros jämfört med kontrollgruppen. I gruppen behandlad med hyaluronsyra sågs signifikant mindre fibrillation jämfört med kontrollgruppen. Dock sågs inga skillnader i kliniska tecken mellan kontrollgruppen och de båda behandlingsgrupperna. Ytterligare en studie har visat på likartad effekt av PSGAG och hyaluronsyra vid behandling av ledinflammation (Gaustad et al, 1995).

## **Autologt konditionerat serum**

Konditionerat autologt serum (autologous conditioned serum, ACS) med högt innehåll av interleukin-1 receptor protein antagonister (IL-1Ra) finns kommersiellt tillgängligt under handelsnamnet Irap (Reinecke, personlig kommunikation, 2008).

Framtagandet av produkten kräver viss utrustning. Venöst blod tas aseptiskt från patienten i speciella 60 mL sprutor innehållande 200 sterila glaskulor som rengjorts med ultraljud och sterilt vatten. Kulorna har en diameter på 2,5 mm och en yta av 21 mm<sup>2</sup>. Sprutan med blodet inkuberas därefter i 37° Celsius i 24 timmar ± 5 timmar. Efter inkubation centrifugeras blodet, 3500 rpm i 10 min, och serumet som under inkubationen syntetiserat antiinflammatoriska cytokiner tas till vara (Reinecke, personlig kommunikation, 2008).

De cytokiner som syntetiseras av monocytorna under inkubationen är IL-1Ra (serumets innehåll ökar med faktor 140), IL-4 (ökar med faktor 2), IL-6, IL-10 (ökar med faktor 2), IL-13, FGFb (fibroblastic growth factor-1), HGF (hepatocytisk growth factor), TGF-β (transforming growth factor beta), VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), dock ingen ökning av pro-inflammatoriska cytokiner såsom TNF-α och IL-1β (Wright-Carpenter et al, 2004) (Wehling et al, 2007).

IL-1Ra är en receptor antagonist till IL-1 som har visats sig krävas i ett förhållande på 1:10 mot IL-1 för positiv effekt (Meier, 2003). Man har även sett en långsiktig effekt som gett en endogen produktion av IL-1Ra i injicerade leder (Wehling et al, 2007). IL-4 nedreglerar IL-1, IL-6 och TNF-α, IL-6 verkar proinflammatoriskt inledningsvis i en inflammationsfas men blir i ett senare skede antiinflammatorisk när processen vänt (Reinecke, personlig kommentar 2008) IL-10 är en immunosuppressiv och antiinflammatorisk cytokin som reglerar inflammationen och inhiberar syntes av IL-2, IFN-γ och TNF-β samt håller ned sekretionen av IL-1, IL-6, TNF-α och oxidanter. TGF-β reglerar celledelning, ökar deponeringen av extracellulära proteiner och är immunosuppressiv (Tizard, 2004). Alla dessa cytokiner anses ha en positiv effekt på ledsjukdom dock återstår att se om dessa resultat även gäller för häst, ELISA testerna som är gjorda är humana. ELISA-test för equin IL-1Ra håller på att tas fram (Reinecke, personlig kommentar 2008).

Hittills har bara ett fall med ledsvullnad och värme hos häst observerats som bieffekt av Irap. Efter det har ca 3000 hästar injicerats på samma klinik utan synbara bieffekter. (Weinberger, APG-meeting, 2008).

Av kliniska erfarenheter rapporterade Weinberger, APG-meeting, 2008 och enligt de studier som är gjorda fås bästa behandlingsresultat om osteoartriten är mild till moderat (Meier et al, 2003). Vidare rekommenderas spolning av leden för att minska koncentrationen av IL-1 före behandling med Irap (Reinecke, personlig kommentar, 2008).

## Studier av ACS och Irap

De flesta studier av ACS behandling är gjorda på människor. I en prospektiv övervakad blind, placebostudie behandlades patienter med OA i knäleden, efter lottnings med ACS, hyaluronsyra eller koksalt. Resultaten visade en signifikant skillnad mellan ACS behandlade patienter och hyaluronsyra och koksalt vad gällde reduktion i symtom, tid till förbättring och relativ förbättring hos patienten. Anmärkningsvärt är att mellan hyaluronsyra och koksalt sågs inga signifikanta skillnader. Inga bieffekter sågs hos de ACS eller koksalt behandlade patienterna men däremot hos de hyaluronsyrabehandlade. Slutsatsen av studien var att ACS märkbart förbättrade de kliniska tecken och symtom från OA (Wehling et al, 2007); ( Baltzar et al, 2008).

I en studie på 16 hästar, där osteoartrit inducerades i intercarpalleden, behandlades 8 hästar med PBS (phosphate bufferd saline) lösning och 8 med Irap. Behandlingsresultatet bedömdes med avseende på grad av hälta, biokemisk analys av synovia samt postmortal undersökning av ledbrosk och synovialmembran. Irap behandlade hästar hade en signifikant klinisk förbättring av hälta tväremot de placebobehandlade hästarna. Irapbehandlade hästar hade signifikant minskad synovialmembranhyperplasi samt en tendens till mindre ledbrosk fibrillation och synovial blödning. Synovial vätskans koncentration av IL-1Ra var ökad efter Irap behandling även efter 70 dagar efter behandling, vilket kan tyda på stimulerad endogen produktion. (Frisbie et al, 2007)

## MATERIAL OCH METODER

Journaler från två hästpraktiker i mälardalen, Universitetsdjursjukhuset (UDS) och veterinär Nicholas Dimitris studerades. Endast halvblodshästar, 6 – 14 år gamla och som tävlade på en nivå från medelsvår hoppning (130 cm) och uppåt och som inte blivit bra på behandling av hov och/eller kotledsartit med polysulfaterade glykosaminoglykaner (Adequanin® 250 mg/mL) eller hyaluronsyra (Hyonate® vet. 10 mg/mL). Hästarnas diagnos ställdes genom hältutredning inkluderande intra-artikulära anestesier i hov-/kotleden (erna), vissa fall kompletterade med röntgen. Som positivt svar på behandling användes återgång till sport inom tre månader.

På de 10 hästarna från UDS, som var 6-14 år gamla (medel 9,6 år), behandlades totalt fem stycken hovleder och tio stycken kotleder. De hade alla tidigare behandlats i lederna med 1 mL polysulfaterade glykosamin och 1 mL amakacin (Biklin®) vid 2-3 tillfällen utan att bli helt återställda. De behandlades med 2 mL Irap per led vid tre tillfällen med en veckas mellanrum.

Veterinär Nicholas Dimitris 10 patienter var 6-14 år gamla (medel 8,8 år), alla tio hade problem utgående från kotlederna. Hästarna hade tidigare behandlades med 2 mL Hyonate per led utan att svara på behandling. Hästarna behandlades därefter med Irap, 2 mL per led tre gånger med en veckas mellanrum.

Eftervården från de båda veterinärpraktikerna var snarlika med skritt/vila en till två veckor och därefter långsam igångsättning, med ökad arbetsmängd.



## RESULTAT

Ingen av hästarna visade tecken på biverkning av behandlingen med Irap. 70 % av hästarna som inte svarat på behandling med PSGAG blev ohalta med Irap (Tabell 1). 100 % av hästarna som initialt behandlats med hyaluronsyra återgick till sport efter behandling med Irap (Tabell 2). Av de tre som ej återkom till sport gick en till avel, en avlivades emedan den tredjes vidare öden gick ej att utröna.

*Tabell 1. Resultat hästar som behandlades vid UDS*

Skada	Kotled	Hovled	Åter sport
Häst 1		X	Nej
Häst 2	X		Ja
Häst 3	3X		Ja
Häst 4		X	Ja
Häst 5		X	Ja
Häst 6	X	X	Ja
Häst 7	X	X	Nej
Häst 8	2X		Ja
Häst 9	X		Ja
Häst 10	X		Nej

*Tabell 2. Resultat hästar som behandlades av veterinär Nicholas Dimitris.*

Skada	Kotled	Hovled	Åter sport
Häst 1	X		Ja
Häst 2	X		Ja
Häst 3	X		Ja
Häst 4	X		Ja
Häst 5	X		Ja
Häst 6	X		Ja
Häst 7	X		Ja
Häst 8	X		Ja
Häst 9	X		Ja
Häst 10	X		Ja

## **DISKUSSION**

IL-1 anses vara den viktigaste komponenten vid ledinflammation och betraktas också som toppen på den "osteoartroskaskad" som underhåller och styr inflammationen i en negativ spiral som leder till OA (McIlwraith, 2003).

De studier som är jämför PSGAG och hyaluronsyra med koksalt talar för att det behövs nya och/eller förbättrade behandlingsmetoder vid behandling av artrit (Gaustad et al, 1995). Vilket även stöds av den humana studie gjord på ACS, där inga signifikanta skillnader syns mellan koksalt och hyaluronsyra (Wehling et al, 2007).

Behandlingsresultaten i denna studie var mycket positiva, UDS hade ett positivt behandlingsresultat med Irap på 70 % av hästarna, vilka ej blivit bra på behandling med PSGAG som ansetts vara golden standard (McIlwraith, 2003). Av Nicholas Dimitris patienter återgick 100 % till arbete. Den högre andelen hästar som återgick till arbete bland de som tidigare behandlats med hyaluronsyra kan bero på att dessa hästar gått en kortare tid med sin ledinflammation innan behandlingen med Irap sattes in. Ledskadorna kan följaktligen ha varit mindre omfattande hos dessa hästar. Det är rimligt att tro att om osteoartrosen gått för långt så hjälper vare sig Irap eller någon annan lokalt administrerad medicin.

Teorin för Irap stödjer utfallet då den arbetar direkt riktat mot IL-1 genom IL-1Ra samt genom produktionen av cytokiner och tillväxtfaktorer.

Om man jämför resultatet med tidigare studier som gjorts på hyaluronsyra och PSGAG så var behandlingsresultatet i denna studie mycket gott. Dock ska man ha i åtanke att det var ett mycket begränsat material i denna uppsats och att studien inte innehöll en kontrollgrupp.

## **KONKLUSION**

På grund av det ringa material som fanns till förfogande var det svårt att dra några större slutsatser i denna studie. Dock går det att se en trend som är positiv för de autologa regenerativa behandlingsalternativen. Dessutom finns det ett mycket starkt teoretiskt stöd för Irap som behandling av osteoartros.

Mer forskning krävs för att kunna säkerhetsställa de tendenser som kan ses i denna studie.

## Litteraturförteckning

Adam M, Krabcova M, Musilova J et al, Contribution to the mode of action of glycoaminoglycan-polysulfate upon human Osteoarthritis cartilage. *Arzneimittelforsch/Drug Res* 1980;30;1730-1732

Altman RD, Dean DD, Muniz O, et al, Therapeutic treatment of Osteoarthritis with glycosaminoglycan polysulfuric acid ester. *Arthritis Rheum* 1989;32;1300-1307

Annefeld M, The effect of chondroprotective substances (GAGPS) on articular cartilage of the rat, *Therapiewoche* 1984;34; 3476-3481

Baltzar AWA, et al, Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage* 2008 doi:10.1016/j.joca.2008.06.014

Barr ARS, Duance VC, Wotton SF, et al, Influence of intra-articular sodium hyaluronate and polysulphated glycosaminoglycaner on the biomechanical composition of equine articular surface repair tissue, *Eq Vet J* 1994; 40-42

Dietmar EGG, Effects of glycosaminoglycan-polysulfate and two non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandinE2 synthesis in Chinese hamster ovary cell cultures. *Pharmacol Res Commun* 1983; 15:709-717

Frisbie D, Kawcak C, McIlwraith C, et al, Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articular for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis, *Am J Vet Res* 2009;70:203-209

Frisbie D, Kawcak C, Werpy N, et al, Clinical, biomechanical and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis, *Am J Vet Res* 2007;68;290-296

Fubini S, Boatwright CE, Todhunter RJ, et al, Effect of intramuscularly administered polysulfated equine n on articular cartilage from equine joints injected with methylprednisolone acetate. *Am J Vet Res*1993;52; 1622-1625

Glade MJ, Polysulfated glycosaminoglycans accelerates net synthesis of collagen and glycosaminoglycans by arthritis equine cartilage tissues and chondrocytes. *Am J Vet Res* 1990;51;779-785

Hamm D Goldman L, Jones EW, Polysulfated glycosaminoglycan: A new intra-articular treatment for equine lameness, *Vet Med* 1984;6; 811-816

McIlwraith, Trotter, *Joint disease in the horse*, Saunders 1996

Meier H, Reinecke J, Becker C, Tholen G, Wehling P, The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction, *Inflamm. Res* 2003;52

Rashmir-Raven AM, Coyne CP, Fenwick BW, et al, Inhibition of equine complement activity by polysulfated glycosaminoglycans, Am J Vet Res 1992;53:87-90

Tizard IR, Veterinary immunology: an introduction, 7 ed Elsevier, 2004

Wright-Carpenter T, Klein P, Schaferhoff P, et al, Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: A pilot study on sportsmen with muscle strains. Int J Sports Med 2004;25:588-593

Wehling P, Moser C, Frisbie D, et al, Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases, Biodrugs 2007;21:323-332

**APG-meeting, Bonn, Tyskland, 6-7 oktober 2008:**

Reinecke J, personlig kommunikation, 2008-10-06

Weinberger T, AGP-meeting Applying regenerative therapies for tendon and joint caused lameness of horses, Bonn, Tyskland, 6-7 oktober 2008

**Internet:**

<http://www.equineortho.colostate.edu/questions/tjd.htm>, McIlwraith 2003