



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Autologous Conditioned Serum och Platelet Rich Plasma

Innehåll och användning vid osteoartrit
och senskador hos häst

Johan Lundgren

*Uppsala
2018*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen
Delnummer i serien: 2018:58*

Autologous Conditioned Serum och Platelet Rich Plasma

Innehåll och användning vid osteoartrit
och senskador hos häst

Autologous Conditioned Serum and Platelet Rich Plasma

Content and use in equine osteoarthritis
and tendon injuries

Johan Lundgren

Handledare: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2018:58

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Autologt konditionerat serum, ACS, IRAP, Platelet Rich Plasma, PRP

Key words: Autologous Conditioned Serum, ACS, IRAP, Platelet Rich Plasma, PRP

**Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Osteoartrit (OA)	3
Senskador	4
Cytokiner och tillväxtfaktorer	5
Autologous Conditioned Serum (ACS)	6
<i>Vad är ACS?</i>	6
<i>Hur tas preparatet fram?</i>	6
<i>Innehåll i ACS</i>	6
<i>Skillnader inom ACS</i>	7
<i>Användningsområden för ACS</i>	7
<i>Behandlingsprotokoll för ACS</i>	8
Platelet Rich Plasma (PRP)	8
<i>Vad är PRP?</i>	8
<i>Hur tas preparatet fram?</i>	9
<i>Innehåll i PRP</i>	9
<i>Skillnader inom PRP</i>	9
<i>Användningsområden för PRP</i>	10
Diskussion	11
Litteraturförteckning	14

SAMMANFATTNING

Rörelsestörningar hos hästar är ett problem med många orsaker, exempelvis trauma eller överbelastning. Som behandlande veterinär finns det flera behandlingsmetoder att välja mellan. Autologa behandlingsmetoder växer sig starkare och används idag av många, trots att behandlingarna inte är helt utredda till innehåll och funktion. Två autologa behandlingsmetoder som används är Autologous Conditioned Serum (ACS) och Platelet Rich Plasma (PRP).

Osteoartrit (OA) är en av de vanligaste orsakerna till hälta hos hästar. OA påverkar ledens funktion och struktur. Ledbrosket bryts ner vilket påverkar dess viktiga stötdämpande funktion. Vid OA är lokal inflammation starkt bidragande till det degenerativa sjukdomsförloppet, något som behöver tas hänsyn till vid behandling av OA. ACS kan användas för att dämpa inflammationsförloppet vid OA. ACS tas fram genom att autologt blod inkuberas i rör med medicinska glaskolor, genom inkubationen bildas interleukin-1 receptorantagonist (IL-1ra). Interleukin-1 β (IL-1 β) är en central proinflammatorisk cytokin som intensifierar inflammationsförloppet vid OA. IL-1ra hindrar IL-1 β från att binda till sin receptor. Målet med ACS-behandlingen är att genom denna blockad av IL-1 receptorn bromsa inflammationsförloppet kopplat till OA.

Senskador är en annan vanlig skada som drabbar sporthästar. Senior är en stark struktur främst uppbyggd av kollagena fibrer. Seniorna fyller en viktig funktion i hästens rörelseapparat genom sträckning och böjning av extremiteterna. Vissa senior kan lagra energi och det är framförallt dessa som drabbas av skador. Senior har lång läkningstid vilket resulterar i lång konvalescenstid efter att de skadats. Det har dessutom visat sig att en sena drabbad av senskada har lättare att åter bli skadad. För att behandla senskador kan veterinärer använda sig av PRP som kan tas fram på flera olika sätt. Oberoende av framställningsmetod är målet att öka koncentrationen av blodplättar i plasma som sedan injiceras vid skadan. Det intressanta med beredningen är blodplättars innehåll av tillväxtfaktorer som tros påskynda senans läkningsprocess.

Syftet med denna litteraturstudie är att ta reda på mer om de allt mer populära autologa behandlingsmetoderna. Frågor som har ställts är: vad är ACS och PRP? Vilka metoder används för framställning av preparaten? Vad innehåller ACS och PRP mer än de huvudsakligen tänkta komponenterna? Vilka olika tillstånd kan de vara lämpliga att bota? Vad är skillnaderna mellan preparaten?

Sammanfattningsvis visar litteraturstudien att ACS utöver IL-1ra innehåller ytterligare pro- och antiinflammatoriska cytokiner. Samt att förhållandet mellan ACS innehållskomponenter skiljer sig beroende av framställningsmetod. Även PRP skiljer sig i fördelningen av både blodplättar och tillväxtfaktorer beroende av framställningsmetod. Vita blodkroppar kan också förekomma i PRP. Litteraturstudiens slutsats är att dessa två metoder är intressanta eftersom framgångsrika behandlingsresultat rapporterats. Men det finns ännu en del oklarheter kvar att utreda, exempelvis innehåll samt huruvida det finns en optimal framställningsmetod för preparaten. Detta bör göras innan bredare användning i klinisk praxis kan rekommenderas.

SUMMARY

Lameness is a common disorder among horses. It is caused by different events such as trauma or overload due to training. There are various treatment methods to choose between. Treatment based on autologous blood is a new upcoming method already used by veterinarians in their work, although it is not yet completely understood. There are two different methods available, Autologous Conditioned Serum (ACS) and Platelet Rich Plasma (PRP).

Osteoarthritis (OA) is a common degenerative and inflammatory condition in the equine locomotion apparatus. OA affect the joint structure and the pathogenesis is slow and progressive. It affects the cartilage which loses its weight bearing and shock absorbing function. The cascade of inflammatory mediators caused by OA drives the destructive process. ACS can be used to deal with the inflammation and to slow down the inflammatory process of OA. ACS is based on serum conditioned in tubes with special glass beads to get high content of interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) protein. IL-1ra have an antagonistic function on the proinflammatory Interleukin 1 β (IL-1 β) receptor. The goal with ACS-treatment is to inhibit the inflammation caused by IL-1 β through hindering IL-1 β binding to its receptor.

Another problem affecting the horse locomotion apparatus is tendon injuries. Tendons are strong structures build mainly by collagen fibers. They can be either of flexor or extensor nature. Tendons can store energy and it is often these tendons that gets injured in sport horses. Tendon injuries often lead to long periods of rehabilitation due to slow healing capacity and high frequency of reinjury. PRP can be used to improve healing capacity in tendons. PRP is produced using different methods which all aim to concentrate platelets in plasma for injection at sites of injury. Platelets have a high content of growth factors which is of interest while trying to heal tendons.

This literature study was conducted to find out more about these two autologous treatment methods. It aimed to answer the questions: what are ACS and PRP? What does the process to obtain the substances ACS and PRP look like? Are there other ingredients beside the main contents? Which conditions can they be used to treat? And finally, if there are any similarities between the products?

To summarize, ACS have a large content of cytokines of both pro- and anti-inflammatory nature. Interestingly the cytokine content seems to be dependent on which method used to obtain the preparation. Similar phenomena are seen in PRP which also differ in content of the main ingredient growth factors but also of leucocytes depending on preparation method. At last, these two different methods are interesting since promising treatment results has been shown. However, there are still questions that must be answered before further use in clinical practice can be recommended. These questions concern further investigations of the contents of the products and if there are any preferable methods to obtain the preparations.

INLEDNING

Osteoartrit (OA) är en av de huvudsakliga anledningarna till hälta och problem i rörelseapparaten hos hästar. För OA finns många olika alternativ för behandling. Ett preparat som börjat användas mer frekvent för indikationen är Autologous Conditioned Serum (ACS). ACS produceras av kroppseget, autologt, blod med syftet att halten av Interleukin-1 receptorantagonist (IL-1ra) skall vara hög. IL-1ra förväntas ha en motverkande funktion på inflammation. Likt ACS finns det ett annat autologt preparat som heter Platelet Rich Plasma (PRP). PRP används främst för behandling av senskador. Innehållet i PRP är blodplättar och effekten av PRP är beroende av blodplättarnas innehåll av tillväxtfaktorer som kan hjälpa vid akuta skador som exempelvis senskador (McIlwraith, 2015).

Användningen av dessa autologa preparat växer sig starkare och är idag mer utsträckt än vad det finns tydliga forskningsbelägg för. Detta beror till stor del på att det finns många påståenden om bra behandlingsresultat i enstaka fall. Det finns dessutom många olika varianter för framställning och användning av preparaten. Mellan de olika framställningsmetoderna ses skillnader i innehåll som kan påverka funktionen (Textor, 2011).

Syftet med denna litteraturgenomgång har varit att ta reda på mer om dessa autologa preparat inom hästmedicinen. Fokus har legat på att finna svar på följande frågor: Vad är ACS och PRP? Hur tar man fram preparaten? Vad finns det för varianter av de olika preparaten? Vad är innehållet och varierar det? Finns det något som påverkar innehåll och funktion? Till vilka problem i rörelseapparaten används preparaten? Vad finns det för likheter och skillnader mellan preparaten?

MATERIAL OCH METODER

För att hitta relevanta artiklar har sökning i databaserna Primo, Web of Science, Scopus och PubMed gjorts. Sökord har använts i olika kombinationer som exempelvis ("Autologous Conditioned Serum" or ACS or IRAP) and (horse* or equine) and (component* or ingredient* or content* or cytokine). Och ("Platelet rich plasma" or PRP) and (horse* or equine) and (component* or ingredient* or content* or growth factor). Och (Osteoarthritis or OA) och ("Tendon injuries"). Referenslistor i vetenskapliga artiklar hittade med databassökningen har också använts, samt läkemedelverkets hemsida för att hitta behandlingsrekommendationer.

LITTERATURÖVERSIKT

Osteoartrit (OA)

En vanlig orsak till rörelsestörning hos häst är OA (Goodrich & Nixon, 2006; Kidd *et al.*, 2001). Synovialledens struktur är viktig för förståelsen av uppkomst och förlopp av OA. Leden som är en förbindelse mellan två eller fler ben består av en stark fibrös ledkapsel som på insidan är linjerat med ett synovialmembran bestående av synoviocyter. Synovialmembranet har en viktig funktion i att producera ledvätska som är ett ultrafiltrat av plasma innehållande bland annat

hyaluronsyra. Ledvätskan ger näring till det hyalina ledbrusket. Ledbrusket som täcker benytorna fyller en viktig funktion genom stötdämpning och verkar för en friktionsfri rörelse i leden (Goodrich & Nixon, 2006).

Hyalint ledbrusk består av kondrocyter omgivna av extracellulär matrix (ECM). Bruskets struktur byggs upp av ett ECM som till största delen består av vatten, kollagen och proteoglykaner. Proteoglykanerna har en stötdämpande funktion och kollagenet ger brosket dess slitstyrka (Goodrich & Nixon, 2006).

Orsaker bakom OA hos häst är bland annat trauma på någon av ledens strukturer eller överbelastning. Arbetsbelastningen ledbrusket utsätts för är viktig för broskets hållbarhet då broskets näringsförsörjning är beroende av rörelse. För mycket belastning kan däremot leda till apoptos hos kondrocyterna samt broskskador (Kidd *et al.*, 2001). Typiskt för OA är nedbrytning av ledbrusk, subkondral benskleros, bildning av osteofyter och inflammation. Processen sker successivt och förändringar på brosket är från mild fibrillering med förlust av kondrocyter till stora ulcerationer och broskförluster (Kidd *et al.*, 2001).

Kaskaden av proinflammatoriska mediatorer som frisätts från ledkapseln, synovialmembranet, det subkondrala benet eller brosket är viktig för förståelsen av OA. För att bromsa förloppet och vidare utveckling av sjukdomsbilden är det av stor vikt att behandla OA tidigt i detta inflammationsförlopp (Goodrich & Nixon, 2006). När brosket är nedbrutet kan det inte åter byggas upp med samma kollagena struktur som brosket fått under sin utveckling (Goldring & Goldring, 2007).

Senskador

Senskador är en vanlig orsak till hälta hos sporthästar. Framförallt är skador på den ytliga böjsenan vanliga. Vissa av hästens senor är extra viktiga för rörelseapparaten eftersom de fyller en energilagrande funktion (Patterson-Kane *et al.*, 2012; Batson *et al.*, 2003).

I en reviewartikel av Patterson-Kane *et al.* (2012) beskrivs senans uppbyggnad. Tenocyten som är senans cell bygger upp ett ECM av kollagen, proteoglykaner och glykoproteiner. Tenocyten reglerar även de nedbrytande processerna genom matrix metalloproteinaser (MMP). I senan är antalet tenocyter relativt få och de länkas med cellbindningar och inbindning till matrixet (Patterson-Kane *et al.*, 2012). Styrkan i senan fås genom att buntar av kollagen och tenocyter ligger inkapslade i en struktur som heter endotenon uppbyggt av bindväv. Flera av dessa ligger i en bindvävskapsel som heter epitenon (Voleti *et al.*, 2012). I epitenon finns blodkärl och lymfkärl (Patterson-Kane *et al.*, 2012).

Orsaker till senskador kan vara överbelastning, ålder eller trauma. Den akuta skadan orsakas ofta av trauma eller överbelastning. Ruptur av senor orsakas ofta av att det ligger en kronisk senskada i botten. Läkningen av senor kan delas in i tre steg med inflammationsfas, reparationsfas och remoduleringsfas. I dessa faser fyller tillväxtfaktorer och cytokiner en viktig

funktion (Voleti *et al.*, 2012). Ett problem med senskador är att läkningen sällan blir helt lyckad då ärrvävnad ofta uppstår och risken att skadan återkommer är hög (Batson *et al.*, 2003).

Cytokiner och tillväxtfaktorer

Cytokiner och tillväxtfaktorer reglerar cellers aktivitet. Dessa är molekyler utsöndrade av celler som styr cellaktiviteten. De kan ha påverkan på den egna cellen (autokrin-verkan), på omgivande celler (parakrin-verkan) eller på en helt annan del i kroppen (endokrin-verkan). Genom receptorer fångas denna signalöverföring upp och ger förändrat genuttryck hos mottagande cell (Tizard, 2012).

Uttrycket av cytokiner och tillväxtfaktorer vid OA representeras av bland annat de proinflammatoriska cytokinerna interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) och interleukin-17 (IL-17). De antiinflammatoriska cytokinerna vid OA är IL-1ra, interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13 (IL-13) och interferon- γ och de regulatoriska cytokinerna är interleukin-6 (IL-6) och leukemia inhibitory factor (LIF). Tillväxtfaktorer som finns är insulin-like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor- β (TGF- β), fibroblast growth factors (FGFs) och bone morphogenetic proteins (BMPs) (Fukui *et al.*, 2001; Goldring, 1999).

Vid OA ses ett tydligt samband mellan sjukdomsförloppets inflammatoriska processer och de proinflammatoriska cytokinerna. IL-1 β och TNF- α ökar uttrycket av nedbrytande MMPs. En ökning av prostaglandiner kommer även att fås genom cytokinernas uppreglering av cyklooxygenas. Uppreglering av IL-1 β leder även till ökning av ytterligare cytokiner som IL-6, LIF, IL-17 samt IL-18 som bidrar till inflammationen (Goldring & Goldring, 2007). Upptäckten av IL-1ra skedde 1986 och 1990 förstod man dess antagonistiska funktion mot inflammation då IL-1ra hindrar IL-1 β från att binda till sin receptor (McIlwraith, 2015; Textor, 2011).

Cytokiner och tillväxtfaktorer som ses vid senskador är IL-1, IL-6, TGF- β , IGF-1, vaskular endothelial growth factor (VEGF) och platelet derived growth factor (PDGF) (Voleti *et al.*, 2012). IL-1 leder till inflammation och nedbrytning av senans ECM. Tillväxtfaktorerna IGF-1 och TGF- β uttrycks under hela läkningsfasen men speciellt under inflammation och reparationsfasen. VEGF som stimulerar kärlbildningen är aktiv under senare delen av läkningens remoduleringsfas. PDGF reglerar DNA-syntesen och främjar för vidare produktion av tillväxtfaktorer (Voleti *et al.*, 2012). Vissa av dessa tillväxtfaktorer är dessutom uttryckta i senans normala adaptation till belastning och det är inte helt klarlagt hur dessa tillväxtfaktorer regleras vid skada (Andarawis-Puri *et al.*, 2015).

Autologous Conditioned Serum (ACS)

Vad är ACS?

ACS är en behandlingsform baserad på inkubering av autologt, kroppseget, blod. Hos ACS är ökat innehåll av IL-1ra det huvudsakliga målet efter inkuberingen. Även då syftet med ACS är att det ska innehålla en ökad nivå av IL-1ra innehåller det även andra antiinflammatoriska och proinflammatoriska substanser (Textor, 2011). Det finns flera kommersiellt tillgängliga system för framställning av ACS, till exempel IRAP och IRAP II (Hraha *et al.*, 2011).

Hur tas preparatet fram?

För att ta fram preparatet samlas först blod aseptiskt från individen som skall behandlas. Med de kommersiellt framtagna modellerna inkuberas blodet i 37°C i 24h tillsammans med kulor av medicinskt borosilicatglas. Därefter centrifugeras blodet i 2500-3100 x g och ACS samlas sedan upp och filtreras för att injiceras i patienten (Textor, 2011). I studier har ACS framställts enligt samma protokoll men i blodprovsvär utan de speciella glaskulorna. ACS från dessa manuella framställningar har använts som kontroll till de kommersiellt tillgängliga metoderna (Hraha *et al.*, 2011).

Innehåll i ACS

Innehållet i ACS är komplext sammansatt och består av fler komponenter än IL-1ra. I flera olika studier har innehållet i ACS analyserats. Wehling *et al.* (2007) presenterar i sin review innehållet i humant ACS framställt med Orthokine[®] som är framställningsmetoden för humant ACS från samma företag som står bakom IRAP-metoden. Innehållet de presenterar är IL-1ra, IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10, FGFb, VEGF, HGF, IGF-1, PDGF AB och TGF-β (Wehling *et al.*, 2007). I en studie av Hraha *et al.* (2011) undersöktes innehållet i ekvint ACS framställt med olika metoder. De cytokiner och tillväxtfaktorer som analyserades i studien var IL-1ra, IL-1β, TNF-α, IGF-1 och TGF-β. Fjordbakk *et al.* (2015) analyserade innehållet av IL-1ra, IL-1β, IGF-1, IL-10, TNF-α och TGF-β i ekvint ACS. I en hundstudie analyserades innehållet i ACS tillverkat med IRAP systemet. I försöket analyserades IL-1ra, IL-β, TNF-α, IL-4, IL-10, TGF-β, IGF-1 och FGF-2 (Sawyer *et al.*, 2016).

I en studie på häst av Frisbie *et al.* (2007) analyserades ACS för innehåll av IL-1ra. De jämförde innehållet i ACS som var framtaget med kommersiell teknik och serum som var oprocessat. Resultatet visade först ingen signifikant skillnad. Men efter analys av data kunde ett statistiskt avvikande räknas bort och då visade ACS på signifikant högre nivåer av IL-1ra än i serum (Frisbie *et al.*, 2007).

Sawyer *et al.* (2016) jämförde innehållet i ACS, plasma och serum från hundblod taget från samma individer. Inkubationstiden i ACS var 7 timmar. Resultatet visade att ACS hade signifikant högre koncentrationer av IL-1ra, IL-4 och IL-1β jämfört med plasma. Jämfört med serum var inte innehållet av IL-1ra, IL-1β eller TNF-α i ACS signifikant högre. Mellan serum

och plasma var innehållet av TNF- α och IL-1 β inte signifikant skiljbart. IL-1ra nivån var däremot högre i serum än i plasma (Sawyer *et al.*, 2016).

Skillnader inom ACS

Skillnader i cytokininnehåll i ACS beroende på framställningsmetod kan förekomma. I en studie gjord av Hraha *et al.* (2011) studerades cytokininnehållet i ACS framställt med systemen IRAP och IRAP II. Manuellt framtaget ACS, blod inkuberat i vanligt blodprovsvör 1 timme respektive 24 timmar, analyserades även i studien. I studien testades även om inkubering med tillsatt heparin skulle påverka cytokininnehållet. Resultatet Hraha *et al.* (2011) fick var att IRAP, IRAP II och ACS inkuberat i 24 timmar hade signifikant högre nivå av IL-1ra än manuellt framtaget ACS inkuberat 1 timme. IRAP II innehöll signifikant mer IL-1ra än 24 timmars ACS och IRAP. Manuellt framtaget ACS inkuberat 24 timmar och IRAP gick inte att skilja på avseende IL-1ra nivån. IL 10 var högre i alla tre 24 timmars metoder än 1 timmes manuellt framtaget ACS. TNF- α skiljde sig mellan alla metoder men var högst i IRAP. Nivån av IL-1 β var högre och jämförbar mellan IRAP, IRAP II och manuellt framtagna ACS, jämfört med 1 timmes manuellt framtaget ACS. IGF-1 var jämförbart mellan de manuella metoderna oberoende av inkuberingstiden. Även IRAP och IRAP II var jämförbara avseende IGF-1 men de hade en högre nivå än de manuella metoderna. TGF- β innehållet var lika stort i alla tre 24 timmars inkubationer och lägre i 1 timmes inkubationen (Hraha *et al.*, 2011). Proven med tillsatt heparin testades också med resultatet att innehållet av IGF-1, TNF- α , TGF- β var lägre. Men tillsatt heparin ökade nivån av IL-1ra 1,5 gånger (Hraha *et al.*, 2011).

I studie gjord av Fjordbakk *et al.* (2015) undersöks om ACS påverkas av kirurgisk stress, om det finns markörer i blodet för att förutse ACS-innehåll och om de kommersiella metoderna för framställning av ACS är nödvändiga. För att svara på frågeställningen samlades blod in från 15 hingstar före och efter kastration. Blodet inkuberades i vanliga blodprovsvör och i specifika ACS rör. Resultatet av studien visar att IL-1ra, IL-1 β , IL-10, och TNF- α inte skiljde sig mellan blod samlat före eller efter operation. Däremot visade studien att IGF-1 hade en signifikant lägre nivå efter operation. I försöket delade de även in hästarna i grupper baserat på nivå av serum amyloid A (SAA), som användes som ett mått på kirurgisk stress. Resultatet visar att de hästar med högst SAA hade signifikant lägre nivå av IL-1ra och TGF- β än hästar med medelhög SAA nivå. Dessutom hade hästar med hög SAA signifikant lägre nivå av IGF-1 än hästar med låg nivå SAA. Försöket kom även fram till att cytokininnehållet var jämförbart mellan de olika framställningsmetoderna. Ingen markör för att förut säga ACS cytokinnivå hittades (Fjordbakk *et al.*, 2015).

Användningsområden för ACS

Den klassiska användningen av ACS är att behandla ledproblem specifikt OA, och som ett alternativ till kortikosteroider (McIlwraith, 2015). I en översiktsrapport beskrivs även försök där ACS har provats som en behandlingsform för muskelregeneration i försök på möss. Samma författare skriver även om försök på människa där läkningstiden för muskelskador förkortats med ACS-behandling (Wehling *et al.*, 2007).

I en studie av Frisbie *et al.* (2007) gjordes försök med ACS-behandling av hästar med experimentellt orsakad OA. I försöket inducerades OA genom artroskopi på 16 hästar varav 8 behandlades med ACS och 8 behandlades med placebo. Studien visade på en förbättrad rörelse hos hästar behandlade med ACS jämfört med kontrollgruppen behandlade med placebo. Dessutom var ACS behandlade hästars ledkapsel mindre hyperplastisk och ledbrösket hade mindre fibrillering (Frisbie *et al.*, 2007).

Behandlingsprotokoll för ACS

Den normala administreringen av ACS för OA behandling är enligt Lasarzik *et al.* (2018) ett behandlingsprotokoll med intraartikulär injektion som administreras 3 till 6 gånger med en veckas intervall mellan behandlingarna. Ett behandlingsprotokoll som enligt författarna egentligen saknar vetenskapligt belägg (Lasarzik *et al.*, 2018). I studien av Frisbie *et al.* (2007) var intervallet i behandlingsprotokollet för ACS till behandlingsgruppen 7 dagars mellanrum och 4 behandlingstillfällen.

I studien gjord av Lasarzik *et al.* (2018) undersöktes administreringen av ACS enligt två olika protokoll. I försöket delades 12 hästar in i två grupper. Grupp 1 fick behandling enligt det normala protokollet och grupp 2 fick administrering av ACS varannan dag. Båda grupperna fick vardera 3 behandlingar. Mellan behandlingarna mättes halten av cytokiner i ledvätskan vid tidpunkterna 1 timme (grupp 1) och 4 timmar (grupp 2) efter behandling, samt innan ny behandling. Dessutom mättes cytokinvärdena i ledvätskan efter 42 dagar i båda grupper. Grupp 1 hade en signifikant ökning av IL-1ra efter första och andra behandlingen, denna skillnad sågs ej vid det tredje tillfället. IL-1 β hade i grupp 1 sjunkit en timme efter ACS-behandlingen jämfört med ursprungligt värde. I samma grupp hade cytokinvärdet innan andra behandlingen, en vecka senare, sjunkit till nivån innan första behandlingen. I grupp 2 mättes cytokinvärdena 4 timmar efter ACS-administering, inom denna tidsram sågs en ökning av IL-1ra och minskning av IL-1 β . Innan nästa behandling, 48 timmar senare, hade värdena åter det ursprungliga värdet. Enligt författarna visar försöket att halveringstiden för IL-1ra och IL-1 β administrerat via ACS är lägre än 48 timmar. Dessutom visar försöket en minskning av IL-1ra och IL-1 β i grupp 2 efter 42 dagar jämfört med grupp 1 som inte hade någon minskning i cytokinvärdet. Enligt författarnas studie skulle ett annat behandlingsprotokoll med tätare behandlingar vara att föredra (Lasarzik *et al.*, 2018).

Platelet Rich Plasma (PRP)

Vad är PRP?

PRP är en behandlingsmetod som framställs från individens eget blod. PRP innebär en koncentring av blodplättar i blodplasma. Koncentrationen av blodplättar bör vara 4 till 5 gånger högre än i blod. Syftet med preparatet är att använda de tillväxtfaktorer blodplättarna innehåller för att läka skador (Marx, 2004).

Hur tas preparatet fram?

Vid framställning av PRP tas blod från den individ som ska behandlas. Blodet behandlas med antikoagulantia och centrifugeras i en hastighet som gör att blodplättarna skiljer sig från övriga blodkroppar (Marx, 2004). Framställningsprocessen kan ske på flera olika sätt och det finns varierande scheman för framställning. Blodet kan centrifugeras i standardcentrifug med manuell hantering eller genom kommersiellt framtagna metoder som bygger på centrifugering med speciellt framtagna centrifuger. Det finns också en variant tillgänglig för framställning av PRP som bygger på separation genom gravitation och uppsamling av blodplättar inom 10 minuter (McLellan & Plevin, 2011; Textor, 2011).

Innehåll i PRP

PRP innehåller förutom en hög koncentration av blodplättar i plasma, tillväxtfaktorer som finns i blodplättarnas alfa-granula. Även vita blodkroppar, leukocyter, kan förekomma i PRP på grund av inblandning i blodplättsfraktionen i framställningsprocessen (McLellan & Plevin, 2011). Enligt Marx (2004) är de tillväxtfaktorer som finns i humana blodplättar tre isotoper av PDGF ($-\alpha\alpha$, $-\beta\beta$, $-\alpha\beta$), två varianter av TGF- β (-1, -2), VEGF och epithelial growth factor (EGF). I en studie gjord av Hessel *et al.* (2015) mättes innehållet i PRP från häst, i deras studie benämnt som Autologous Platelet Concentrates (APC). Innehållet som mättes var TGF- β 1, PDGF-BB, vita blodkroppar samt blodplättar. I en studie utförd av Bosch *et al.* (2010) mättes också innehållet i PRP från häst. Innehållet som mättes och identifierades i studien var blodplättar, leukocyter, TGF- β , PDGF-BB. Studien visade även på innehåll av IGF-1, men i lägre nivå än i serum (Bosch *et al.*, 2010).

Skillnader inom PRP

Att val av metod för framställning av PRP kan vara betydelsefullt för dess innehåll beskriver McLellan och Plevin (2011) i sin översiktsartikel. De jämför olika metoder, både kommersiella och manuella scheman, för PRP-framställning. I de jämförda metoderna ligger ökningen av blodplättar i PRP mellan 1,45 och 8,9 gånger och TGF- β 1 ökningen mellan 1,2 och 4,47 gånger. Dessutom var nivån av leukocyter från samma nivå som i blod och upp till en 6 gångers ökning. Överlag är en högre koncentration av blodplättar och tillväxtfaktorer förenligt med höga nivåer av leukocyter, enligt författarnas jämförelse (McLellan & Plevin, 2011).

I en studie gjord av Hessel *et al.* (2015) jämfördes olika system för framställning av APC, som är jämförbart med PRP. Fyra olika kommersiella metoder jämfördes med en manuell metod. Deras studie visade att innehållet varierar mycket beroende av vilken metod som används. De visade att det skiljer i blodplättskoncentration med ökning av blodplättar mellan 130 och 527 procent. Leukocytnivån låg från en sänkning på 9 procent jämfört med blod till en ökning på 663 procent. Dessutom visades signifikanta skillnader mellan nivåer av PDGF-BB och TGF- β beroende av framställningsmetod (Hessel *et al.*, 2015).

Framställningsprocessen av PRP kommer att aktivera blodplättarna till en viss grad. Vissa framställningsmetoder aktiverar blodplättarna mer än andra. Aktivering under beredningen kan leda till förlust av tillväxtfaktorer. Som ett extra steg kan PRPs innehåll av blodplättar istället aktiveras efter att PRP är framtaget, detta för att tillväxtfaktorerna ska frisättas (McLellan & Plevin, 2011). Det finns olika varianter av PRP där blodplättarna har aktiverats. Exempelvis är Platelet Rich Fibrin Clot (PRFC) och Platelet Rich Fibrin Matrix (PRFM) varianter av PRP där blodplättarna har aktiverats innan administrering. Aktiveringen av blodplättarna resulterar i ett koagel av fibrin som blodplättarna och dess tillväxtfaktorer är lösta i. För aktivering kan exempelvis kalciumklorid (CaCl₂) eller trombin användas. Viskositeten i dessa beredningar kommer ändras och PRP blir mer trögflytande (Textor, 2011). En annan variant är att PRP används utan extra aktivering och att blodplättarna då aktiveras i vävnaden genom exponering för exempelvis Kollagen typ 1 (McLellan & Plevin, 2011).

Enligt Textor och Tablin (2012) råder det okunskap om huruvida blodplättarna avger mer tillväxtfaktorer om PRP aktiveras innan administrering, än om blodplättarna aktiveras genom vävnads appliceringen. Inom hästmedicinen används i dagens läge främst oaktiverat PRP. I studien undersöker författarna vilka aktivatorer som skulle fungera bäst för att framkalla rikligt uttryck av tillväxtfaktorer. I försöket aktiverades PRP med CaCl₂, bovint trombin, autologt trombin samt genom en frysning- och upptiningsprocess. De visar i studien att uttrycket av PDGF är störst vid CaCl₂-aktivering och att TGF-β är jämförbart mellan metoderna, förutom autologt trombin där det var lägre. Författarna rekommenderar aktivering med CaCl₂ eftersom det är en enkel metod och inte riskerar att ge en immunologisk reaktion, vilket riskeras med bovint trombin (Textor & Tablin, 2012).

Enligt Hauschild *et al.* (2017) är användningen av PRP beroende av mer information kring vad som påverkar dess innehåll för användning i klinisk praxis. I sin studie prövade de hur två beredningsformer och dess innehåll av PDGF-BB och TGF-1β klarar förvaring i rumstemperatur i 6 timmar. Denna studie visade inte på någon förlust av dessa tillväxtfaktorer och således inte på någon skillnad mellan PRP förvarat i rumstemperatur i 6 timmar jämfört med nyproducerat PRP. Däremot menar författarna att omgivande faktorer påverkan på innehåll och tillväxtfaktorer hos PRP behöver utredas vidare (Hauschild *et al.*, 2017).

Användningsområden för PRP

Skador som man väljer att behandla med PRP hos hästar har klassiskt varit ligament- och senskador (McIlwraith, 2015).

Bosch *et al.* (2010) undersökte i sin studie kvalitén på läkning i inducerade senskador behandlade med PRP hos häst. I studien deltog 6 hästar som fick kirurgisk inducerad senskada i den ytliga böjsenan. Efter 7 dagar behandlades det ena benet med PRP och det andra med placebo. Hästarna avlivades 24 veckor efter studiens början och senorna undersöktes. PRP-behandlade senor visade sig vara starkare, och ha ett högre innehåll av kollagen. Histologiskt

visade PRP-behandlade senor mer regelbundenhet i sin struktur av kollagen än kontrollgruppen som hade mer oregelbunden struktur (Bosch *et al.*, 2010).

I en studie av Maia *et al.* (2009) inducerades senskada i den ytliga böjsenan genom injektion av kollagenas hos 6 friska valacker. Hästarna behandlades 12 dagar efter induktionen av senskadan. Behandlingen bestod av PRP aktiverat med CaCl₂ i det högra benet och med koksalt i det vänstra benet som kontroll. Efter 36 dagar togs biopsier för utvärdering av senans histologi. Resultatet visade att PRP-behandlade senor hade en bättre organisation av kollagena fibrer och fibroblaster i den läkta vävnaden. Ingen skillnad i kärlbildning, fibroblast- eller lymfocytthet sågs mellan de olika grupperna (Maia *et al.*, 2009).

Effekten på kärlbildning efter behandlingen av senskador med PRP undersöktes i studien av Bosch *et al.* (2010) och presenterades i en artikel av Bosch *et al.* (2011). I studien visas PRP-behandlade senor få ett bättre kärlförsörjt epitenon med större lumen i blodkärlen och bättre blodflöde. Undersökningarna gjordes genom immunohistokemi samt ultraljud med färgduppler. Enligt författarna tyder resultatet på att en behandling med PRP kan ge långverkande effekt på senans läkning i akuta senskador i och med bättre kärlbildning (Bosch *et al.*, 2011).

DISKUSSION

ACS och PRP är preparat som båda är framställda av autologt blod. Denna litteraturstudie har visat att båda preparaten har många metoder för framställning. Gemensamt för både ACS och PRP är att framställningsmetoden påverkar dess innehåll.

Kommersiellt tillgängliga metoder och framställning med vanlig blodprovsutrustning är möjlig för ACS-framställning (Hraha *et al.*, 2011). Gemensamt för de olika metoderna är att de får en ökad nivå av IL-1ra, vilket är den huvudsakliga komponenten i ACS. Studien av Hraha *et al.* (2011) visar att IRAP II har högst nivå IL-1ra. Medan manuellt framtaget ACS och IRAP ligger på samma nivå (Hraha *et al.*, 2011). Om funktionen vid behandling med ACS endast skulle bygga på halten IL-1ra vore IRAP II att föredra, annars hade likaväl ACS kunnat framställas utan kommersiell metod. Att nivån av IL-1ra blev högre med tillsatt heparin är också intressant och något som borde utredas mer. PRP-behandlingens funktion bygger på blodplättarnas innehåll av tillväxtfaktorer (Textor, 2011). Eftersom det likt ACS finns många metoder för framställning av PRP är den naturliga frågan vilken metod som är bäst? Liknande fråga ställer McLellan och Plevin (2011) i sin review, ”Does it matter which platelet-rich plasma we use?”. Koncentrationen av blodplättar visar skilja sig åt mellan olika system för PRP-framställning (McLellan & Plevin, 2011). Samband mellan antalet blodplättar och tillväxtfaktorer råder vilket tyder på att en metod som koncentrerar blodplättarna väl är bra. Samtidigt är det viktigt att koncentreringsen av blodplättarna inte aktiverar dem så mycket att tillväxtfaktorer går förlorade. I studien av Hessel *et al.* (2015) visades på stor skillnad i PRP-innehåll beroende av framställningsmetod, vilket skulle kunna vara avgörande för behandlingsresultatet. Med en

ökning av blodplättar mellan 130 till 527 procent är det lätt att förstå framställningsmetoden har betydelse.

Denna litteraturstudie har även visat att ACS och PRP innehåller mer än de huvudsakligen tänkta komponenterna. I ACS är innehållet komplext och består av flera faktorer än IL-1ra. Exempelvis innehåller ACS även tillväxtfaktorer och cytokiner som har påverkan på inflammationsförloppet. Då cytokinerna kan vara av både proinflammatorisk och antiinflammatorisk natur är innehållet av dem i ACS av stor vikt. IL-10, TNF- α , IL-1 β , IGF-1 och TGF- β är exempel på mediatorer analyserade i ACS från häst (Hraha *et al.*, 2011) och från hund (Sawyer *et al.*, 2016). Då dessa faktorer likt IL-1ra varierar mellan de olika metoderna för framställning av ACS bör även hänsyn till dessa tas vid val av framställningsmetod. Vid framtagning av PRP kommer vita blodkroppar följa med den PRP som används för behandling (McLellan & Plevin, 2011). Vita blodkroppar fyller en viktig funktion i inflammationsprocessen. Som behandlande veterinär bör man alltså vara medveten om att båda preparaten alltså även innehåller komponenter med potential att föra inflammationsförloppet vidare istället för att lindra det.

Den klassiska användningen av ACS hos häst är vid OA eftersom IL-1ra lindrar inflammation kopplat till OA förloppet och PRP används främst vid senskador på grund av dess förmåga att avge tillväxtfaktorer med potential till bättre läkning (McIlwraith, 2015; Textor, 2011). Frågan är då ifall preparaten med fördel även hade kunnat användas vid andra tillstånd. ACS borde kunna användas vid andra inflammatoriska tillstånd med tanke på att IL-1ra har antagonistisk verkan på IL-1 som är en viktig proinflammatorisk cytokin. I framtiden hade det varit intressant med ytterligare försök vid andra inflammatoriska tillstånd för ACS. För PRP hade studier på häst som undersöker om preparatet fungerar vid övriga läkningsprocesser för att få förbättrad läkning varit intressanta. Det vore även intressant att i framtiden undersöka om ACS fungerar för behandling av senskador och PRP för läkning av OA.

Behandling med ACS har klassiskt skett genom veckovis upprepad administration i leden som skall behandlas. Detta undersöktes i en studie där jämförelse av behandling varannan dag och klassiska behandlingsprotokollet gjordes (Lasarzik *et al.*, 2018). Eftersom halveringstiden av IL-1ra i leden är snabb kan behandling med två dagars mellanrum vara bättre. Vidare har försök av Fjordbakk *et al.* (2015) undersökt om individens allmäntillstånd har betydelse för blodets innehåll av cytokiner. Försöket visade på signifikant skillnad av IGF-1 postoperativt jämfört med preoperativt. Dessutom undersökte samma studie om det finns markörer i blodet för att förutse innehållet i ACS. Fjordbakk *et al.* (2015) hittade inget samband mellan blodprofilen och innehåll av cytokiner. Skulle samband hittas hade behandlingsformen med största säkerhet blivit mer använd och erkänd. Eftersom man då genom ett blodprov skulle kunna se vilka hästar som skulle få en bra respektive dålig cytokinprofil och därigenom vara mer eller mindre lämpade för ACS-behandling. Likväl finns det oklarheter inom PRP-användningen. Om blodplättarna i PRP bör aktiveras innan administrering är en fråga som togs upp av Textor och Tablin (2012). För att få större förståelse i framtiden skulle det vara intressant med försök som

testar oaktiverat PRP mot aktiverat för att se om behandlingsresultatet skiljer sig. Likväl som det behövs studier som klargör ifall PRP faktiskt ger bättre kärlbildning i senan. Något som Bosch *et al.* (2011) och Maia *et al.* (2009) hade olika slutsatser om.

Enligt Läkemedelverkets behandlingsrekommendationer rekommenderas inte behandling med ACS då det förekommer brist på studier som karaktäriserar sammansättningen och att uppreparheten på försöken behöver förbättras (Läkemedelsverket, 2010). Mer forskning om innehållet i ACS och PRP är absolut relevant. Även bredare analyser av innehåll skulle behövas, eftersom det som analyserats i studierna är faktorer forskarna har valt att analysera. Det kompletta innehållet är alltså inte analyserat. I studien gjord av Frisbie *et al.* (2007) konstaterar författarna att vidare forskning om funktion och innehåll i ACS behövs. Liknande slutsats tas även upp av Hauschild *et al.* (2017) som menar på att faktorer som kan påverka PRP behöver utredas. Men även om vi känner till innehållet i ACS och PRP fullt ut behövs det mer forskning för att veta vilka relationer mellan cytokiner, tillväxtfaktorer och blodkroppar som är optimal vid läkning av olika sjukdomsprocesser.

Sammanfattningsvis är ACS och PRP intressanta preparat eftersom det finns indikationer på att preparaten fungerar. ACS används för att minska inflammation och PRP för att förbättra läkningen. Forskningen har kommit en bit på väg för att utreda innehåll och funktion men mer forskning behövs för att få ytterligare kunskap om skillnader i innehåll mellan preparaten och mellan olika framställningsmetoder. Dessutom vore det intressant att i framtida studier analysera ACS och PRP parallellt mot varandra för att ta reda på ytterligare likheter och skillnader preparaten emellan. Detta behöver också kombineras med mer forskning om optimalt innehåll för en bra effekt i olika vävnader.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Andarawis-Puri, N., Flatow, E.L. & Soslowsky, L.J. (2015). Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *Journal of Orthopaedic Research* 33(6), 780-784.
- Batson, E., Paramour, R., Smith, T., Birch, H.L., Patterson-Kane, J. & 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(3), 314-318.
- Bosch, G., Moleman, M., Barneveld, A., van Weeren, P.R. & van Schie, H.T.M. (2011). The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 21(4), 554-561.
- Bosch, G., van Schie, H.T.A., de Groot, M.W., Cadby, J.A., van de Lest, C.H.A., Barneveld, A. & van Weeren, P.R. (2010). Effects of Platelet-Rich Plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *Journal of Orthopaedic Research* 28(2), 211-217.
- Fjordbakk, C.T., Johansen, G.M., Lovas, A.C., Opegard, K.L. & Storset, A.K. (2015). Surgical stress influences cytokine content in autologous conditioned serum. *Equine Veterinary Journal* 47(2), 212-217.
- Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M., Park, R.D. & McIlwraith, C.W. (2007). Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research* 68(3), 290-296.
- Fukui, N., Purple, C. & Sandell, L. (2001). Cell biology of osteoarthritis: The chondrocyte's response to injury. *Current Rheumatology Reports* 3(6), 496-505.
- Goldring, M.B. (1999). The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: Lessons from animal models. *Connective Tissue Research* 40(1), 1-11.
- Goldring, M.B. & Goldring, S.R. (2007). Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology* 213(3), 626-634.
- Goodrich, L.R. & Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The Veterinary Journal* 171(1), 51-69.
- Hauschild, G., Geburek, F., Gosheger, G., Eveslage, M., Serrano, D., Streitburger, A., Johannlukens, S., Menzel, D. & Mischke, R. (2017). Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations. *Bmc Veterinary Research* 13.
- Hessel, L.N., Bosch, G., van Weeren, P.R. & Ionita, J.C. (2015). Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine Veterinary Journal* 47(3), 319-325.
- Hraha, T.H., Doremus, K.M., McIlwraith, C.W. & Frisbie, D.D. (2011). Autologous conditioned serum: The comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine Veterinary Journal* 43(5), 516-521.
- Kidd, J.A., Fuller, C. & Barr, A.R.S. (2001). Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education* 13(3), 160-168.
- Lasarzik, J., Bondzio, A., Rettig, M., Estrada, R., Klaus, C., Ehrle, A., Einspanier, R. & Lischer, C.J. (2018). Evaluation of two protocols using Autologous Conditioned Serum for intra-articular therapy of equine osteoarthritis-A pilot study monitoring cytokines and cartilage-specific biomarkers. *Journal of Equine Veterinary Science* 60, 35-42.

- Läkemedelsverket (2010). *Information från läkemedelsverket supplement 1:2010*. Uppsala: Läkemedelsverket.
- Maia, L., de Souza, M.V., Ribeiro Júnior, J.I., de Oliveira, A.C., Alves, G.E.S., Dos Anjos Benjamin, L., Silva, Y.F.R.S., Zandim, B.M. & Moreira, J.D.C.L. (2009). Platelet-Rich Plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: Histologic evaluation. *Journal of Equine Veterinary Science* 29(8), 618-626.
- Marx, R.E. (2004). Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 62(4), 489-496.
- McIlwraith, C.W. (2015). Management of joint diseases in horses: Current and future prospects. *Equine Veterinary Education* 27(7), 335-337.
- McLellan, J. & Plevin, S. (2011). Does it matter which platelet-rich plasma we use? *Equine Veterinary Education* 23(2), 101-104.
- Patterson-Kane, J.C., Becker, D.L. & Rich, T. (2012). The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research. *Journal of Comparative Pathology* 147(2-3), 227-247.
- Sawyer, D.M., Lanz, O.I., Dahlgren, L.A., Barry, S.L., Nichols, A.C. & Werre, S.R. (2016). Cytokine and growth factor concentrations in canine Autologous Conditioned Serum. *Veterinary Surgery* 45(5), 582-586.
- Textor, J. (2011). Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 27(2), 275-298.
- Textor, J.A. & Tablin, F. (2012). Activation of equine platelet-rich plasma: Comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Veterinary Surgery* 41(7), 784-794.
- Tizard, Ian R. (2012). *Veterinary Immunology*. 9. uppl. St. Louise: Saunders Elsevier.
- Voleti, P.B., Buckley, M.R. & Soslowsky, L.J. (2012). Tendon healing: Repair and regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 14* 14, 47-71.
- Wehling, P., Moser, C., Frisbie, D., McIlwraith, C.W., Kawcak, C.E., Krauspe, R. & Reinecke, J.A. (2007). Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases - The Orthokine (R) therapy. *Biodrugs* 21(5), 323-332.