



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

# Dexametasons effekt på IL-10 hos häst

Sebastian Bergenwall

*Uppsala*

*2013*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697*  
*Examensarbete 2013:49*



Dexametasons effekt på IL-10 hos häst  
The effect of dexamethasone on IL-10 production in horse

Sebastian Bergenwall

*Handledare: Carina Ingvast Larsson, Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap  
Biträdande handledare: Maria Löfgren, Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap; Carl Ekstrand,  
Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap*

*Examinator: Stina Ekman, Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap  
Kurskod: EX0754, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: häst, dexametason, effekt, ELISA, interleukin-10  
Key words: horse, dexamethasone, effect, ELISA, interleukin-10*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697*



## INNEHÅLL

SAMMANFATTNING .....	1
SUMMARY .....	2
INLEDNING .....	3
Syfte.....	3
LITTERATURÖVERSIKT .....	4
Glukokortikoider .....	4
Verkningsmekanism och effekter.....	5
Dexametason .....	5
IL-10 .....	6
Farmakokinetik.....	7
Hur glukokortikoider påverkar IL-10.....	7
Enzyme-linked immunosorbent assay .....	7
MATERIAL OCH METODER .....	9
Djur .....	9
Läkemedel och doser .....	9
Studiedesign.....	9
Pilotstudie.....	9
Huvudstudie .....	9
Utförande .....	10
Infusion.....	10
Blodprovsprotokoll.....	10
Analysering av IL-10.....	11
Val av prover för IL-10 analys .....	11
Laboration ELISA .....	11
Standardkurva.....	11
Plasmaprover .....	12
Beräkning av resultat.....	12
Validering av ELISA .....	13
Repeterbarhet och variation .....	13
Utbyte .....	13
RESULTAT .....	14
Validering .....	14
Utbyte .....	15

Pilotstudie.....	16
Huvudstudie .....	16
Koncentration IL-10 i plasma efter infusion av dexametason.....	16
Pilotstudie.....	16
Huvudstudie .....	16
DISKUSSION.....	19
Validering .....	19
Koncentration IL-10 i plasma efter infusion av dexametason.....	19
Pilotstudie.....	19
Huvudstudie .....	20
Tack till.....	22
REFERENSER.....	23

## **SAMMANFATTNING**

Användning av prestationshöjande- eller prestationsåterställande läkemedel har ökat inom många av hästsportens tävlingsdiscipliner. För att motverka detta arbetar anti-dopinglaboratorier ständigt med att förfinas sina analysmetoder för påvisande av otillåtna substanser. En konsekvens av detta är att även tillåtna läkemedel kan spåras under mycket lång tid efter behandling vilket har lett till ett behov av rapporteringsnivåer för läkemedel som glukokortikoider. Detta för att irrelevanta koncentrationer i plasma och urin med säkerhet kan bedömas ej ha effekt och därför ge ett negativt svar vid dopingkontroll. Ett projekt pågår just nu för att fastställa ett samband mellan plasma- och urinkoncentration med och effekt vilket kommer ligga till grund för ett fastställande av rapporteringsnivåer och adekvata karenstider.

Studiens syfte är att, som en liten del i projektet, undersöka möjligheten att analysera proteinuttrycket av interleukin-10 i plasma hos häst samt att undersöka hur dexametason påverkar interleukin-10 över tid.

Sex varmblodstravare deltog sammanlagt under 2 försök där olika koncentrationer med dexametason alternativt placebo gavs intravenöst över 3 timmar. Blodprover togs före läkemedelsinfusion samt vid olika tidpunkter efter infusionsstart. Plasmaprover analyserades sedan med en *sandwich*-ELISA-metod baserat på antikroppar mot equint interleukin-10.

Resultaten visade att metodens tillförlitlighet var dålig vid analys av interleukin-10 i hästplasma. Ytterligare studier med annan metod för kvantifiering av både proteinuttryck och genuttryck av interleukin-10 samt ett ökat antal inkluderade individer bör utföras för att utreda vilka koncentrationer av dexametason som leder till en ökning av interleukin-10 hos häst.

## **SUMMARY**

The purpose of this study was to investigate the possibility for the analysis of interleukin-10 (IL-10) in equine plasma with a commercial ELISA-kit, as well as how dexamethasone affects IL-10 over time.

In a time when equestrian sports is continuously growing and competition between equipages get tougher, there is a risk of increased usage of performance enhancing and/or performance recovering pharmaceuticals within many of the sport's disciplines. As a countermeasure, the anti-doping laboratories consistently work on improving their methods of analysis for detection of prohibited substances. However, the increased analytical sensitivity also means that permitted pharmaceuticals are traceable long after necessary treatment. To prevent that very low drug concentrations are reported as positive test results in doping controls, screening limits have been determined. These limits are based on a scientific ground and include many of the approved drugs currently used in equine medicine. Concentrations measured in urine and plasma which are below the screening limits are regarded as irrelevant, since such small amounts of substance has no effect in the horse. For glucocorticoids, an essential drug group within equine medicine, the scientific documentation is insufficient. The aim of the actual project is to determine the correlation between urine/plasma concentration of dexamethasone and its effects, which will be the basis to establish screening limits and adequate withdrawal time. This study only covers a small part of the ongoing project.

In this randomized crossover study, six standardbred trotters participated. All horses received either placebo (physiological saline) or three different doses of dexamethasone. Following a bolus injection, dexamethasone was infused during a three hour period. The target dexamethasone concentrations in plasma for the different doses were: 0,05 ng/ml, 0,5 ng/ml and 5,0 ng/ml. Before and after the infusion, blood was sampled at predetermined times for plasma analysis of IL-10. The plasma samples were analysed utilizing a sandwich ELISA assay based on antibodies for equine IL-10.

Validation of the method used showed that <47 % of IL-10 in plasma could be analysed in spiked samples. The intra-assay coefficients of variation in plasma were <47%. This suggests that plasma as medium for analysing IL-10 influences the assay's reliability considerably.

IL-10 in plasma could only be measured in three of the six horses. There were no significant differences in plasma IL-10 concentrations between dexamethasone and placebo treatment. However the assay used was unreliable when analysing IL-10 in equine plasma and the results from this study should therefore be interpreted with caution.

In conclusion, further studies are necessary with other methods of quantification for both protein and gene expression of IL-10.



## INLEDNING

Användningsområdet för häst har förändrats mycket sedan domesticeringen och antalet sporthästar ökar för varje år. Detta har lett till att konkurrensen mellan ekipagen blir allt hårdare. Risken ökar då för användning av prestationshöjande- eller prestationsåterställande läkemedel inom många av hästsportens tävlingsdiscipliner. För att motverka detta arbetar anti-doping-laboratorier ständigt med att förfinas sina analysmetoder för att kunna påvisa otillåtna substanser i blod och urin. En konsekvens av känsligare analysmetoder är att även tillåtna läkemedel kan spåras under mycket lång tid efter behandling. Studier har visat att detekterbara koncentrationer kan påvisas hos hästar även utan att de har behandlats. Orsaken kan vara läkemedelskontamination från miljön till exempel vid uppstallning i box där en behandlad häst vistats (Norgren et al., 2001, Wennerlund et al., 2001). Rädsla för ett positivt dopingprov och de stora konsekvenser som medföljer kan därför leda till att näringen avstår behandling. Adekvat behandling av olika lidanden hos sporthästar är samtidigt ett måste för att uppfylla kraven på ett gott djurskydd. Lösningen på problematiken anses vara rapporteringsnivåer (*screening limits*) och adekvata karenstider för läkemedel godkända att användas till häst, vilket har fungerat tillfredsställande för många godkända läkemedel i Sverige. Uppmätta nivåer under rapporteringsnivån är vetenskapligt grundade koncentrationer som inte utövar någon effekt på hästen (Toutain & Lassourd, 2002) utan härrör ofta från en läkemedelskontaminerad miljö. På grund av brister i den vetenskapliga dokumentationen när det gäller att korrelera plasma- respektive urinkoncentrationer till biologisk effekt, finns idag inga rapporteringsnivåer för glukokortikoider.

Ett projekt finansierat av Stiftelsen Hästforskning pågår nu för att fastställa ett samband mellan koncentration av glukokortikoider i blod respektive urin och effekt. Studierna skall ligga till grund för fastställande av rapporteringsnivåer och lämplig karenstid vilket ökar säkerheten vid användandet och leder förhoppningsvis till adekvat användning av tillåtna läkemedel. En av delstudierna innebär att undersöka koncentration-effektsambandet mellan glukokortikoiden dexametason och inflammatoriska eller antiinflammatoriska cytokiner genom att studera genuttryck och proteinproduktion.

### Syfte

Syftet med studien var att undersöka möjligheten för analys av proteinuttrycket från den antiinflammatoriska cytokinen interleukin-10 (IL-10) i plasma hos häst med hjälp av ett kommersiellt ELISA-kit samt att studera hur IL-10 påverkas av dexametason över tid.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Glukokortikoider

År 1950 fick Kendall, Reichstein och Hench Nobelpriset i fysiologi eller medicin med motiveringen "*for their discoveries relating to the hormones of the adrenal cortex, their structure and biological effects*". Priset gavs till dessa individer eftersom de lyckats syntetisera kortisol och adrenokortikotrop hormon (ACTH) samt visat att behandling med ACTH till patienter med reumatoid artrit gav god effekt (Nobelprisets officiella hemsida, 2013).

I dag används glukokortikoider (GK) i stor utsträckning vid behandling av kroniska inflammationer och autoimmuna sjukdomar tack vare sina antiinflammatoriska och immunosuppressiva egenskaper. Hos hästar används GK ofta vid behandling av *Recurrent airway obstruction* (RAO), också kallat *Chronic obstructive pulmonary disease* (COPD), samt osteoartrit (OA) (Rush *et al.*, 1998a,b; Clegg & Booth, 2000; Cornelisse *et al.*, 2004). Bieffekter som hyperglykemi, polyuri, immunosuppression och muskelatrofi är vanligt förekommande framför allt vid systemisk behandling och begränsar långvarig användning av GK. Forskning pågår inom området för att dokumentera verkningsmekanismerna bakom effekten av GK. Studierna skall ligga till grund för utveckling av läkemedel som mer specifikt kan selektera mellan olika effekter, för att lättare undvika de oönskade bieffekterna (Rang & Dale, 2012; Barnes, 2011).

GK kan tillföras kroppen vid medicinering men syntetiseras också endogent av det mellersta lagret, *zona fasciculata*, i binjurebarken. Syntesen stimuleras av ACTH som frisätts från adenohipofysen. Endogena GK syntetiseras från kolesterol som transporterats till cellen via *low-density lipoproteins* (LDL). Kolesterol tas sedan upp i cellen genom endocytos. Väl inne i cellen bildar mitokondrierna pregnenolon genom hydrolys av kolesterolmolekylernas sidokedjor. Därefter konverteras pregnenolon till olika adrenokortikala hormoner med hjälp av specifika enzymer som finns i binjurebarkens olika lager (Sjaastad *et al.*, 2010). Kortisol och kortikosterooner syntetiseras hos både människor och hästar men kortisol, också kallat hydrokortison, är det dominerande hormonet (James *et al.* 1970; Toutain *et al.*, 1988; Irvine & Alexander, 1994; Rang & Dale, 2012).

Cirkulerande GK, såväl endogena som exogena, ger en negativ feedback som hämmar både hypothalamus produktion av *corticotrophin-releasing factor* (CRF) och adenohipofysens produktion av ACTH vilket gör att kortisolinsöndringen minskar. Förloppet har visats i studier på bl.a. människor, råttor, hundar och hästar (Zimmermann & Critchlow, 1969; Fehm *et al.*, 1979; Keller-Wood *et al.*, 1983; Keller-Wood, 1989; Soma *et al.*, 2005; Grady *et al.*, 2010).

Den endogena kortisolkoncentrationen i blodet varierar normalt över dygnet. Det är högst koncentration vid tidig morgon och koncentrationen minskar sedan gradvis under dagen till en lägsta koncentration sent på kvällen, vilket har visats hos människa, apa, råtta och häst (Hoffsis & Murdick, 1970; Weitzman *et al.*, 1971; Bottoms *et al.*, 1972; Evans *et al.*, 1977;

Keller-wood & Dallman, 1984; Johnson & Malinowski, 1986; Toutain *et al.*, 1986; James *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1987; Irvine & Alexander, 1994; Grady *et al.*, 2010). Grady *et al.* (2010) visade att hos häst var kortisolkoncentrationen högst mellan kl 06:00-08:00. Koncentrationen sjönk sedan under dagen till en lägstanivå mellan kl 20:00-22:00, vilket stämmer överens med tidigare gjorda studier (Hoffsis *et al.*, 1970; Bottoms *et al.*, 1972; Toutain *et al.*, 1986; Irvine & Alexander, 1994). Den naturliga rytmen av kortisolfrisättning är känslig för påverkan av olika faktorer i hästens miljö exempelvis stressande moment som blodprovstagning eller hantering. För att minimera påverkan från omgivningen vid kortisolkoncentrationsmätning är det därför viktigt att standardisera miljö och provtagningsrutiner (Irvine & Alexander, 1994; Grady *et al.*, 2010).

### **Verkningsmekanism och effekter**

Glukokortikoider påverkar kroppen genom en mängd olika reaktionsvägar och har ett brett utbud av effekter (Rang & Dale, 2012). Endogent och exogent tillförda GK diffunderar passivt över cellmembranet in i cellen. I cytoplasman binder GK till ett receptorkomplex som kallas glukokortikoidreceptor- $\alpha$  (GKR $\alpha$ ). Ligand-receptorkomplexet transporteras därefter via cytoskelettet genom cytoplasman in i cellkärnan. Väl inne i kärnan påverkar ligand-receptorkomplexet uppreglering alternativt inhibering av gentranskription (Galigniana *et al.*, 1998; Beato & Klug, 2000; Wu *et al.*, 2004; Sjaastad *et al.*, 2010).

Som läkemedel anses GK ha störst betydelse genom dess antiinflammatoriska- och immunosupprimerande effekter. En del av effekterna medieras genom att syntes av proinflammatoriska cytokiner (e.g. IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, *tumor necrosis factors- $\alpha$* ) hämmas samtidigt som de antiinflammatoriska cytokinerna (e.g. IL-10, IL-1ra, annexin-1) uppregleras. Vid en inflammation leder de antiinflammatoriska effekterna till en minskad effektivitet av neutrofiler, monocyter och mastceller samt att syntesen av prostaglandiner minskar. Minskat uttryck av adhesionsfaktorer försämrar transporten av neutrofiler ut ur blodkärl till inflammerade områden. GK:s immunosupprimerande effekter innebär bland annat att immunförsvaret skiftar karaktär mot ett T-hjälparcell2-försvar (Th2-försvar) (Guyton & Hall, 2006; Rang & Dale, 2012).

GK har också metaboliska effekter t.ex. uppreglering av glukoneogenes och proteinnedbrytning vilket leder till bieffekter som hyperglykemi och förlust av muskelproteiner vilket framförallt ses vid långtidsbehandling. Kalciumbalansen kan också påverkas genom minskad Ca<sup>2+</sup>-upptag från mag-tarmkanalen samtidigt som utsöndringen via njurarna ökar vilket kan leda till osteoporos. Vissa GK har dessutom svaga mineralokortikala effekter genom ökad Na<sup>+</sup>-retention och K<sup>+</sup>-utsöndring via njurarna (Rang & Dale, 2012).

### **Dexametason**

Dexametason är en potent syntetisk glukokortikoid. I Sverige finns idag två beredningsformer registrerade för användning till häst. Dexametasonnatriumfosfat (Dexadreson<sup>®</sup> vet, injektionslösning, 2 mg/ml, Intervet, Sollentuna, Sverige) är en löslig förening med kort halveringstid och dexametasonisonikotinat (Vorenvet<sup>®</sup> vet, injektionslösning, 1 mg/ml,

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Malmö, Sverige) är en svårlöslig ester och fungerar som ett depåpreparat med lång halveringstid. Isopto<sup>®</sup>-maxidex (1 mg/ml, Alcon Sverige AB, Stockholm, Sverige) är en annan beredning av dexametason i ögondroppar för lokalbehandling (Fass<sup>®</sup> vet., 2013).

Studier på människa har visat att dexametason är 30 gånger mer potent än endogent kortisol att påverka negativ feedback och har 25 gånger högre antiinflammatorisk effekt än kortisol (Guyton & Hall, 2006; Fass<sup>®</sup> vet., 2013). Vid dexametasongiva till häst har effekt på den endogena kortisolinsöndringen påvisats i upp till 96 h efter administrering trots att dexametason endast detekterats i blodet i 12h (Soma *et al.*, 2005; Grady *et al.*, 2010). Orsaken till den fördröjda hämningen av endogent kortisol, trots icke-detekterbara nivåer, antogs bero på långsam elimination av dexametason i perifer vävnad men diskuterades också kunna bero på okänsliga analysmetoder (Toutain *et al.*, 1984; Soma *et al.*, 2005).

## **IL-10**

Interleukin 10 (IL-10) är en antiinflammatorisk cytokin som upptäcktes 1989 av Mosmann *et al.* Initialt namngavs den nyupptäckta cytokinen till *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF). År 1990 förstod man att CSIF var en cytokin som påverkade många olika celltyper vilket låg till grund för namnbytet till IL-10 (Howard *et al.*, 1992)

IL-10 har som uppgift att motverka inflammationsresponsen i kroppen för att undvika en negativ och skadlig effekt. Studier på *Knock out*-möss visar att de möss som saknar endogent cirkulerande IL-10 hade högre dödlighet vid infektion på grund av en överdriven immunreaktion (Gazzinelli *et al.*, 1996; Rennick *et al.*, 1997). För att motverka en överdriven immunförsvarsreaktion inhiberar IL-10 aktiveringen av T-celler, monocyter, makrofager och dendritiska celler (Sabat *et al.*, 2010).

Normalt är plasmakoncentrationen av IL-10 i blodet låg men vid infektion och inflammation stiger nivåerna snabbt bland annat på grund av ökad koncentration av endogent kortisol (Sjaastad *et al.*, 2010). Pusterla *et al.* (2006) jämförde genuttrycket av IL-10 i blod med hjälp av *Real-time PCR* (*Polymerase chain reaction*) mellan sjuka föl som överlevde och föl som dog. De föl som dog hade en signifikant högre uttryck av IL-10. Burton *et al.* (2009) kunde dock inte påvisa några signifikanta skillnader av koncentrationen IL-10 i serum mellan friska föl och föl med sepsis. Dock visade ett av de ej överlevande fölen den högsta analyserade koncentrationen av IL-10, 857260 pg/ml, vilket var långt över de i övrigt analyserade koncentrationerna hos andra föl i studien som var lägre än 100 000 pg/ml. Under samma studie undersöktes även plasmakoncentrationen av IL-10 hos 16 av fölstona till både kontrollföl och föl med sepsis. Samtliga koncentrationer uppmättes till mellan <4-963 pg/ml där majoriteten av hästarna ej visade några detekterbara nivåer trots en metodkänslighet på 4 pg/ml.

## **Farmakokinetik**

Hos människa är halveringstiden för IL-10 i serum 1,1–2,6 timmar (Li & He, 2004). Motsvarande halveringstid hos häst är ännu okänt.

## **Hur glukokortikoider påverkar IL-10**

GK uppreglerar specifika gener vilket leder till ökad syntetisering av IL-10. Effekten på IL-10 medieras genom att GK diffunderar genom målcellens cellmembran och binder till ett receptorkomplex bestående av Glukokortikoidreceptor- $\alpha$  (GKR- $\alpha$ ), en dimer av *Heat shock protein-90* (Hsp90) chaperon, en p23 molekyel samt en *tetratricopeptide repeat protein* (TPR) (Simons *et al.*, 1989). I cellkärna och cytoplasma cirkulerar inaktiva komplex och en studie av Galigniana *et al.* (1998) kunde visa att komplexen finns i störst koncentration ute i cytoplasman. När GK sedan bundit till komplexet sker en konformationsändring. Ligand-GKR $\alpha$ -komplexet separeras från de övriga stabiliserandemolekylerna och kan därefter interagera med cellens cytoskelett via bindningsställen som tidigare varit skyddade av bl.a. Hsp90. Ligand-GKR $\alpha$ -komplexet transporteras längs cytoskelettet genom cytoplasma och in i cellkärnan (Galigniana *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2004). Väl inne i cellkärnan binder homodimerer av ligand-GKR $\alpha$ -komplexet till positiva, alternativt negativa, *glucocorticoid-responsive elements* (pGRE) i promotorregionen av cellens glukokortikoid-reglerade gener. Transkription av antiinflammatoriska cytokiner t.ex. IL-10, IL-1ra, annexin-1 uppregleras (*trans-activation*) på så sätt. Antalet glukokortikoid-reglerande gener hos olika celltyper varierar enligt litteraturen mellan 10-100 stycken. GKR- $\alpha$  kan också interagera med koaktivatorer t.ex. *CREB-binding protein* (CBP) och *p300/CBP-activating factor* (pCAF) för att inducera *histone acetyltransferase* (HAT) aktivitet. Detta leder till ytterligare gentranskription genom acetylisering av histoner, speciellt histone 4, vilket luckrar upp de hårda bindningarna mellan kromatin och histoner. Regulatoriska proteiner och *RNA-polymeras 2* kan då lättare tillgå det DNA som skall transkriberas och uppregleringshastigheten ökar (Berghe *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2000; Barnes 2011).

En uppreglering av proteinuttryck samt genuttrycket av IL-10 som en effekt av GK både via inhalation samt vid intravenös giva har visats i studier på människor (Tabardel *et al.*, 1996; Gayo *et al.*, 1998; John *et al.*, 1998; Dandona *et al.*, 1999).

## **Enzyme-linked immunosorbent assay**

*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) blev först beskrivet 1971 av Peter Perlman och Eva Engvall på Stockholms universitet, där de lyckades med att kvantifiera immunoglobulin G ur serum från kanin. Metoden fick stort genomslag under 70- och 80-talet och blev standardmetod vid kvantifiering av olika proteiner. Detta tack vare att ELISA ersatte en äldre metod, *Radioimmunoassay* (RIA) som var både farlig och opraktisk för laboratoriepersonalen då arbetet innebar hantering av radioaktivt material. ELISA-testet hade även bättre sensitivitet, bättre reagenshållbarhet, var relativt billig, hade kortare laborationstid och bättre reproducerbarhet (Hornbeck *et al.*, 2000; Sachdeva & Asthana, 2007).

ELISA har idag många olika betydelsefulla användningsområden t.ex. *Abbot determine*-test, vilket är ett kit som används i utvecklingsländer för att påvisa *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)-infekterade gravida kvinnor för att kunna förebygga överföring av virus till barnet under förlossning. Inom djurhälsovården används ELISA i stor utsträckning vid diagnostik (Arai *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 1999; Engvall, 2010). ELISA används även inom forskning t.ex. vid utvärdering av läkemedelseffekter och verkningsmekanismer.

Olika metoder av ELISA finns att tillgå, men den vanligaste metoden för kvantifiering av cytokiner är *sandwich*-ELISA (Hornbeck *et al.*, 2000; Whiteside, 2002). Under senaste åren har en utveckling av metoden pågått och inom en snar framtid kommer troligtvis de äldre ELISA-metoderna till stor del ersättas av Luminex-metoder som har bättre sensitivitet och kan kvantifiera fler olika cytokiner åt gången (Burton *et al.*, 2009).

I *sandwich*-ELISA används antikroppar, *capture antibody* (cAb) specifikt framtagna för att binda till epitoper på den molekyl som skall kvantifieras. Antikropparna absorberas av ELISA-plattans brunnar genom hydrofoba interaktioner. De immobiliserade cAb fångar sedan upp det specifika antigenet i tillsatta prover under inkubering. Provmaterial som ej bundit till antikroppar efter inkubering sköljs sedan bort. Därefter tillsätts *detection antibody* (dAb) som binder till en annan epitop på antigenet och bildar ett komplex med cAb. *Streptavidin-horseradish-peroxidase* (Strept-HRP) som är ett enzym binds till dAb och katalyserar färgomvandling av en substratlösning som tillsatts. Mängden färg som produceras under processen är direkt proportionell mot mängden cAb-antigen-dAb-enzym-komplex (Hornbeck *et al.* 2000). Med hjälp av en spektrofotometer mäts ljusabsorptionen i brunnen vid en given våglängd. Värdena för absorption omvandlas sedan till koncentration genom att de beräknas mot en standardkurva.

Vid en studie för att utvärdera och jämföra såväl kommersiella ELISA-kit som olika laboratorier påvisades skillnader både mellan de olika kätten och laboratorierna vad gäller absoluta koncentrationer. Trots dessa skillnader var de absoluta koncentrationerna i varje enskild provserie av samma storleksordning (Fahey *et al.*, 2000). God kvalitet på antikroppar är den absolut största enskilda faktorn vilken påverkar analysens prestation vilket gör att korrekt hantering av dessa också är viktigt. Vid valet av antikroppar bör man ta i beräkningen att vissa antikroppar har möjlighet att binda både till löst och bundet antigen medan andra enbart kan binda till en typ (Whiteside, 2005). För att få en så noggrann kvantifiering som möjligt bör man analysera prover i dubletter eller tripletter samt inkubera standardkurva på varje enskild platta vilket fungerar som en internkontroll. Alla värden som ska användas i en studie måste ligga inom referensintervallet för standardkurvan eftersom värden utanför referensintervallet är okända. Dessutom ska all pipettering under laboration ske skyndsamt för att minimera skillnader i inkubationstid (Hornbeck *et al.*, 1991).

Antikroppar specifika för equint IL-10 fanns inte att tillgå förrän 2008 (Wagner *et al.*, 2008) och eftersom homologin mellan humant och equint IL-10 bara är 76 % har mätningar med hjälp av antikroppar mot humant IL-10 inte varit möjliga hos häst (Fickenscher *et al.*, 2002) .

De nya antikropparna har gjort det möjligt att studera hur denna antiinflammatoriska cytokin påverkas samt medverkar i olika inflammatoriska processer hos häst.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Djur**

Sex friska varmbloodstravare, 2 valacker och 4 ston, tillhörande Institutionen för kliniska vetenskaper vid SLU, Uppsala, Sverige ingick i studien. De 2 valackerna ingick även i en pilotstudie (förstudie) som utfördes före huvudstudien. Hästarna vägde mellan 430 och 588 kg. Åldern varierade mellan 6 och 20 år.

Samtliga hästar var väl anpassade till miljö och hantering samt hölls i individuella boxar. Under det första försöksdygnet stod hästarna i box och hade fri tillgång till grovfoder, hö alternativt hösilage, samt bjöds vatten ur hink. Dag 2 fick hästarna 45 minuter skrittmotion vid hand och utfodringen övergick till normala invanda foderrutiner beträffande grovfodergivan. Inget kraftfoder gavs under provtagningstiden.

Försöket var granskat och godkänt av Uppsala djurförsöksetiska nämnd, Dnr C333/11.

### **Läkemedel och doser**

Läkemedlet som gavs via infusion under 3 h var dexametason (Dexadreson<sup>®</sup> vet., injektionslösning, dexametasonnatriumfosfat, 2 mg/ml, Intervet, Sollentuna, Sverige) vilket är en lättlöslig glukokortikoid registrerad för användning i Sverige (Fass<sup>®</sup> vet., 2012).

Målkoncentrationen av dexametason i plasma för de olika behandlingsgrupperna var: lågdos (0,05 ng/ml), medelhög dos (0,5 ng/ml) samt högdos (5 ng/ml).

### **Studiedesign**

#### ***Pilotstudie***

Pilotstudien omfattade två hästar vilka erhöll lågdos respektive högdos av dexametason.

#### ***Huvudstudie***

Huvudstudien följde ett upplägg baserat på en randomiserad *cross-over* modell där alla hästar antingen fick placebo (fysiologisk NaCl) eller en infusion av dexametason i olika koncentrationer. Varje häst hade ett uppehåll mellan försöken på minst 5 och högst 29 dagar.

Alla försök startade 08:00 och inkluderade två hästar från samma behandlingsgrupp.

## Utförande

En timme innan införandet av infusionskanyl förbereddes hästen genom klippning och lokalbedövades genom applicering av EMLA-krem (EMLA<sup>®</sup>, 25 mg/g + 25 mg/g lidokain och prilokain, AstraZeneca, Södertälje, Sverige) över jugularvenen. Därefter rengjordes huden med Hibiscrub (kutan lösning, klorhexidindiglukonat 40 mg/ml 4 %, Regent Medical Overseas Limited, Irlam, Storbritannien) och sedan M-sprit (70 %, Kemetyl AB, Haninge, Sverige). Varje häst fick en permanentkateter (Intranule, 2,0 x 105 mm, Vygon, Ecoeu, Frankrike) i vardera jugularven. Infusionskatetern förankrades i huden med tre enkla isolerade suturer. All hantering vid kateterläggning skedde enligt steril metodik och hästarna stod i tvångsspilta under hela utförandet.

## Infusion

En timme efter kateterläggning gavs hästarna en stötdos av dexametason samt kopplades till infusionsaggregatet och infusion av dexametason som späts i fysiologisk NaCl, till en slutvolym på 400 ml, startade med hjälp av volymetriska infusionspumpar (Colleague, Baxter Healthcare Corporation, One Baxter Parkway, Deerfield IL 60015-4625, United States). Infusionen pågick i 3 timmar och direkt efter infusionsslut togs infusionskatetern bort medan provtagningskatetern satt kvar under studiens 48 timmar. Given mängd läkemedel presenteras i tabell 1.

Tabell 1. Stötdos, infusionsdos, samt koncentration av dexametason efter spädning i NaCl för de olika behandlingsgrupperna

Behandlingsgrupp	Låg	Medel	Hög
Målkoncentration i plasma (ng/ml)	0,05	0,5	5,0
Stötdos (µg/kg)	0,1	1	10
Infusionsmängd (µg/kg)	0,0675	0,675	6,75
Konc. i infusionslösning efter spädning (ng/ml)	2	20	200

## Blodprovprotokoll

Blodprov togs innan infusionsstart, ett så kallat 0-prov. Under pilotstudien togs sedan blodprover varje timme till och med 13 h samt vid 24 och 32 h efter infusionsstart. Vid huvudstudien togs blodprover varje timme, fram till och med 6 h efter infusionsstart därefter var 3:e timme till och med 12 h efter infusionsstart samt vid 24, 36 och 48 h.

Vid provtagning togs först en liten mängd blod ur provtagningskatetern som vaskades. Därefter togs blod med en 20 ml spruta som överfördes omedelbart till ett förkylt heparinrör. Blodproverna hölls sedan på is, maximalt 30 minuter, tills centrifugering (1500 g, 10 minuter, 0-4°C). Plasman avskiljades och alikvoterades till provrör vilka omedelbart placerades i minus 70°C, där de förvarades fram till analystillfället.



## **Analysering av IL-10**

### **Val av prover för IL-10 analys**

Från pilotstudiematerialet analyserades samtliga plasmaprover från den häst som fick hög dos dexametason.

Med erfarenhet av pilotstudieresultatet valdes sedan följande plasmaprover ut ur materialet från huvudstudien: 0-prov, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24 och 48 h. Varje analystillfälle inkluderade standardkurva och provserier från samtliga behandlingsgrupper inklusive placebo från samma häst.

### **Laboration ELISA**

IL-10 analyserades med ett kommersiellt ELISA-kit (#DY1605, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). De antikroppar som användes var specifika för equin IL-10 (Wagner *et al.*, 2008) och medföljande standardprotokoll följdes med ett fåtal modifieringar. Alla plasma- och standardprover analyserades i duplikat.

*Capture antibody* (cAb, #DY1605), med en koncentration av 144 µg/ml, späds i *phosphate buffered saline* (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2 - 7.4) till en total koncentration av 0,8 µg/ml. En 96-brunnars ELISA-platta (#DY990, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) tillfördes cAb, med en total koncentration av 0,8 µl/ml, till varje brunn. ELISA-plattan förseglades med täckplast (#DY992, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) och inkuberades därefter i rumstemperatur över natten.

Nästa dag tömdes plattan ordentligt genom skakning mot rent papper. Därefter tillsattes *wash buffer* (#WA126, 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2 - 7.4) till varje brunn och ELISA-plattan tömdes ur på samma sätt som tidigare. Brunnarna tvättades ytterligare 2 gånger, sedan tillsattes *Reagent diluent* (RD) (#DY995, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) till varje brunn för att blockera antikropparna. ELISA-plattan förseglades med täckplast och inkuberades i rumstemperatur under 1 timme.

### **Standardkurva**

Standardprover förbereddes genom att standardlösning av IL-10, 240 000 pg/ml, späddes i RD till 20 000 pg/ml. I 6 steg halverades därefter koncentrationen i en spädningsserie genom att späda 250 µl av standardlösningen i en lika stor del RD. Blanken bestod av 250 µl RD. Efter varje spädning vortexades (Whirlimixer, Fisons Scientific Apparatus, Loughborough Leicestershire, England) provrören 2 sekunder och centrifugerades i 7800 g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) 6 sekunder i rumstemperatur. Standardkurvans olika koncentrationer efter spädning var: 20 000 pg/ml, 10 000 pg/ml, 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml och 0 pg/ml.

### *Plasmaprover*

Plasmaproverna tinades långsamt upp på is och vändes med jämna mellanrum. Samtliga plasmaprover vortexades och centrifugerades enligt samma utförande som med standardproverna.

ELISA-plattan tvättades enligt tidigare utförande och standardlösning eller plasmaprov tillsattes varje brunn enligt ett förutbestämt schema där varje prov duplikerades som kontroll. ELISA-plattan förseglades därefter med täckplast och inkuberades i rumstemperatur under 2 timmar. ELISA-plattan tvättades därefter enligt tidigare utförande, samt ytterligare en gång på grund av att plasmaprovernas konsistens. *Detection antibody* (dAb, #DY1605), med en total koncentration av 18 µg/ml, späddes i RD till en total koncentration av 0,1 µg/ml. DAb tillsattes till varje brunn, ELISA-plattan förseglades med täckplast och inkuberades i rumstemperatur under 2 timmar.

ELISA-plattan tvättades därefter enligt tidigare utförande och Strept-HRP (#DY998, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) späddes i RD till ett förhållande av 1:200. Strept-HRP-lösning tillsattes sedan varje brunn. ELISA-plattan förseglades med täckplast och inkuberades ytterligare 20 minuter i rumstemperatur utan ljusexponering.

Mindre än 15 minuter innan användning förbereddes *Substrate solution* (#DY999, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) genom spädning av *Color reagent A* (Stabilized hydrogen peroxide) i *Color reagent B* (Stabilized tetramethylbenzidine) till ett förhållande av 1:1. *Substrate solution* tillsattes sedan varje brunn, ELISA-plattan förseglades med täckplast och inkuberades 20 minuter i rumstemperatur utan ljusexponering. Efter inkubation tillsattes *Stop solution* (#DY994, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) till varje brunn och ELISA-plattan analyserades därefter i en microplatteavläsare (Wallac 1420 VICTOR<sup>2</sup>, software version 2.0, Torku, Finland) vid 450 nm samt 570 nm.

### **Beräkning av resultat**

Koncentrationen IL-10 beräknades med hjälp av den exponentiella standardkurvan som inkluderades på varje enskild ELISA-platta (Microsoft Office Excel, version 2007, Microsoft<sup>®</sup>, Redmond, Washington, USA).

Den relativa koncentrationen beräknades genom att medelvärdet av duplikaten dividerades med provseriens 0-provsvärde d.v.s. värdena normaliserades till koncentrationerna i 0-provet för varje häst. De relativa koncentrationerna från olika behandlingsgrupper jämfördes mot placebovärden med hjälp av *Student's t-test*, parade värden (Microsoft Office Excel, version 2007, Microsoft<sup>®</sup>, Redmond, Washington, USA). Signifikansnivån sattes till  $P < 0,05$ .

Värden från varje häst inom de olika behandlingsgrupperna jämfördes också genom beräkning av kovarians, som är ett statistiskt mått på samvariation (Microsoft Office Excel, version 2007, Microsoft<sup>®</sup>, Redmond, Washington, USA).

## **Validering av ELISA**

### ***Repeterbarhet och variation***

Standardkurvor testades under valideringen genom att standardlösning blandades och inkuberades enligt standardprotokoll i olika medium. De olika medium som undersöktes var RD, plasma, värmeinaktiverad plasma samt värmeinaktiverat serum. Värmeinaktiveringen skedde genom uppvärmning under 60 minuter i ett 54°C varmt vattenbad. Standard tillfördes sedan till medium i känd koncentration med ett referensintervall på 313-20 000 pg/ml samt 79-20 000 pg/ml.

Standardkurvor och plasmaprover från både pilotstudien och huvudstudien jämfördes inom- samt mellan analyserna med avseende repeterbarhet (*coefficient of variation, CV %*). Plasmaprover från pilotstudien analyserades två gånger med 4 dagars mellanrum för att kontrollera metodens repeterbarhet mellan analyser och från huvudstudiens plasmaprover beräknades dessutom CV (%) inom analysen. Alla CV-värden beräknades på duplikat.

### ***Utbyte***

Provserier med givna koncentrationer av IL-10 i olika spädningsmedium, såkallade ”spikade” prover, analyserades. Koncentrationen var 10 000 pg/ml, 5000 pg/ml, 2500 pg/ml samt 1250 pg/ml i de 4 olika provserierna som testades. De olika spädningsmedium som testades var RD och värmeinaktiverad plasma. Varje medium analyserades i 2 serier där proverna från en av serierna vortexades och centrifugerades (VC) efter varje ny spädning. De olika provserierna jämfördes sedan med avseende på utbyte beräknat i % av tillsatt koncentration samt CV % beräknat inom och mellan analyser. Även obehandlad plasma från häst med tillsatt koncentration av IL-10 på 10 000 pg/ml analyserades 2 gånger och jämfördes med avseende att utvärdera skillnaden i utbyte vid analys av samma prov vid två tillfällen

## RESULTAT

### Validering

R<sup>2</sup>-värdena för standardkurvor i olika spädningsmedium varierade mellan 0,0126-0,9965 (n=6) (se tabell 2). Standard löst i RD gav högsta R<sup>2</sup>-värdena mellan 0,9706-0,9965 (n=3). Flera spädningssteg med lägre koncentrationer resulterade i sämre R<sup>2</sup>-värde 0,9513 (n=1) vilket även spädning i annat medium gjorde, 0,0126 och 0,8395.

Tabell 2. R<sup>2</sup>-värden för samtliga standardkurvor av IL-10 i olika medium vid validering samt repeterbarhet inom och mellan analyser under valideringen (n=6).

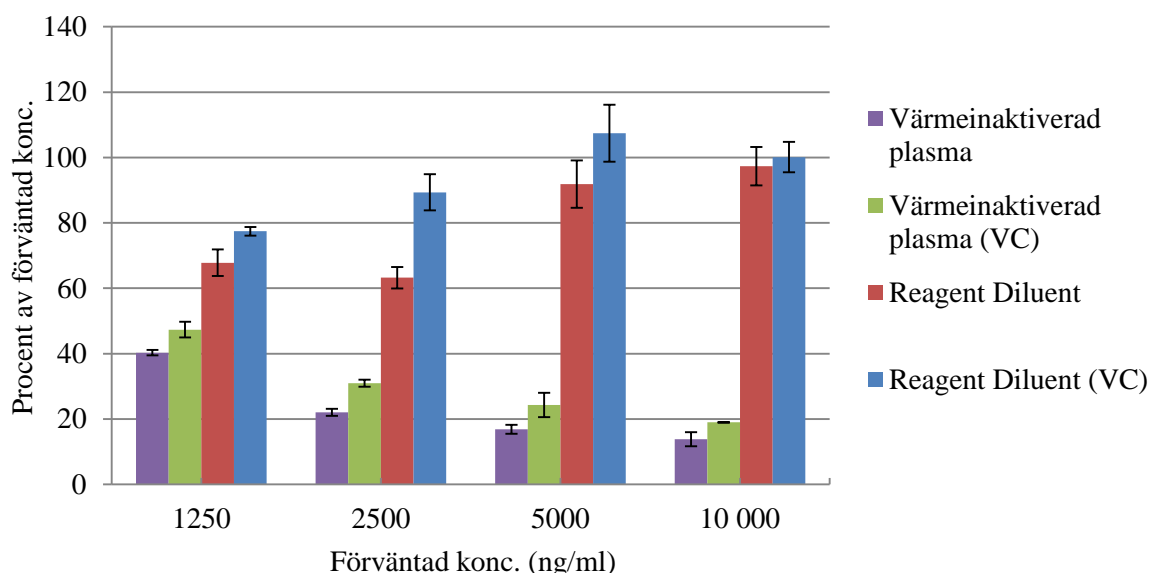
Spädningsmedium	R <sup>2</sup> -värde	CV (%) (medelvärde och range)			Antal analyserade prover	Antal analyser
		Inom analys	Mellan analyser			
RD (lägsta konc. 313 pg/ml)	0,9821*	13,1 (0,1 - 42,6)	11,4 (4,4 - 16,4)	-	42	3
RD (lägsta konc. 79 pg/ml)	0,9513	11,1 (1,0 - 36,0)			18	1
Värmeinaktiverad plasma	0,8395	21,5 (4,6 - 44,8)			14	1
Värmeinaktiverat serum	0,0126	16,6 (6,4 - 26,0)			14	1

\*Medelvärde (n=3)

RD – Reagent Diluent

## Utbyte

Utbytet för spikade prover är redovisade i procent av förväntad koncentration varierade mellan 13 % och 111 % där standardlösning spädd i RD återgav den högsta procenthalten av den förväntade koncentrationen (se figur 1). Repeterbarheten inom analyserna för de olika provserierna presenteras i tabell 3. Den lägsta detekterbara nivån var 484 pg/ml.



Figur 1. Den uppmätta koncentrationen IL-10 i procent av den förväntade koncentrationen (medel  $\pm$  SD) i spikade provserier i olika medium (n=4) VC=vortexade och centrifugerade prover mellan de olika spädningsstegen.

Tabell 3. Repeterbarheten inom analyserna av tillsatt mängd IL-10 i provserier med olika lösningsmedium och metod bl.a. reagent diluent (RD). Koncentrationerna av IL-10 inom varje provserie var 1250, 2500, 5000 och 10 000 pg/ml. CV % är räknat på varje duplikat i analysen och medelvärdet av CV % redovisas i tabellen tillsammans med högsta och lägsta värde

Lösningsmedium/metod	Repeaterbarhet, CV (%)	Antal analyserade prover
RD (VC)*	5,6 (1,3 - 9,7)	8
RD	7,0 (3,6 - 11,5)	8
Värmeinaktiverad plasma (VC)*	7,3 (0,1 - 12,7)	8
Värmeinaktiverad plasma	5,9 (5,5 - 6,2)	8

\* vortexade och centrifugerade prover mellan de olika spädningsstegen (VC)

RD – Reagent Diluent

### **Pilotstudie**

R<sup>2</sup>-värdet för pilotstudiens standardkurvor varierade mellan 0,9859-0,9942 (n=2). CV inom analyserna för standardkurvorna var mellan 0,36-14,5 % och mellan analyserna 0,0 - 12,0 %. CV inom analysen för plasmaprover var 0,33-19,2 % och den upprepade analysen av pilotstudien gav ett CV mellan analysen på 1,0-17,5 %. Alla CV-värden beräknades på duplikaten.

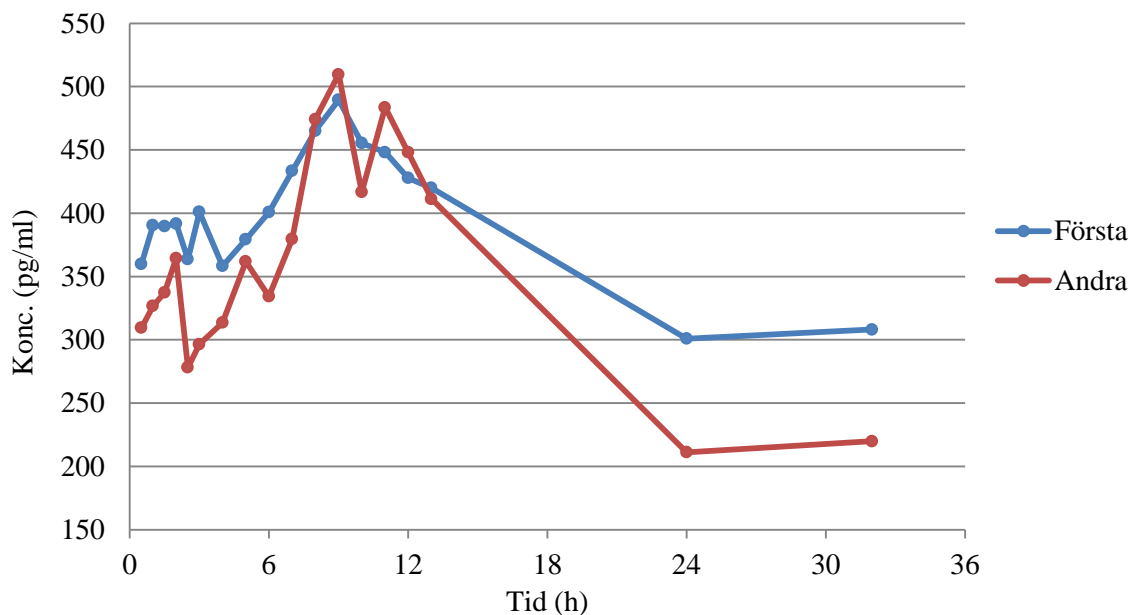
### **Huvudstudie**

R<sup>2</sup>-värden vid samtliga standardkurvor varierade mellan 0,9257-0,9898 (n=6). Repeterbarheten, CV, inom de analyserade plasmaproverna var 0,0 - 45,0 %. Alla CV-värden beräknades på duplikat.

## **Koncentration IL-10 i plasma efter infusion av dexametason**

### **Pilotstudie**

Resultaten från pilotstudien presenteras i figur 2. Den beräknade koncentrationen IL-10 i plasmaproverna varierade mellan 204-518 pg/ml . 6 värden (211-313 pg/ml) hamnade utanför referensintervallet (313-20 000 pg/ml) men inkluderades ändå.



Figur 2. Upprepad analys av koncentration IL-10 i plasma från en häst i pilotstudien efter dexametasoninfusion från 0-3h (målkoncentration 5000 pg/ml).

### **Huvudstudie**

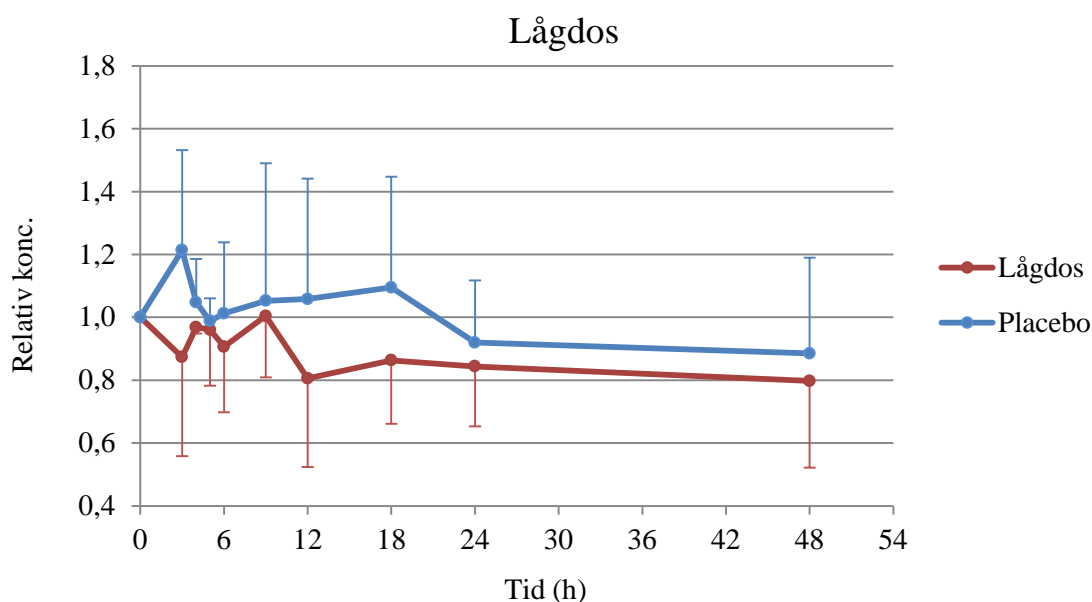
Endast häst 1, 2 och 3 hade koncentrationer inom standardkurvan (313-20 000 pg/ml). Vid analys av häst 4 och 6 var samtliga koncentrationer av IL-10 i plasmaproverna under lägsta punkt i standardkurvan. Häst 5 hade koncentrationer över högsta punkt i standardkurvan. Efter spädning av proverna var koncentrationen av IL-10 lika eller högre. De beräknade koncentrationerna av IL-10 för häst 1-3 varierade mellan 307 pg/ml och 10 908 pg/ml IL-10 i

plasmaproverna. De normaliserade koncentrationerna av IL-10, varierade mellan 0,4-2,08 och är redovisade i figur 3-5. Ingen signifikant skillnad sågs mellan behandlingsgrupper jämfört mot placebokontroll (P-värde > 0,29).

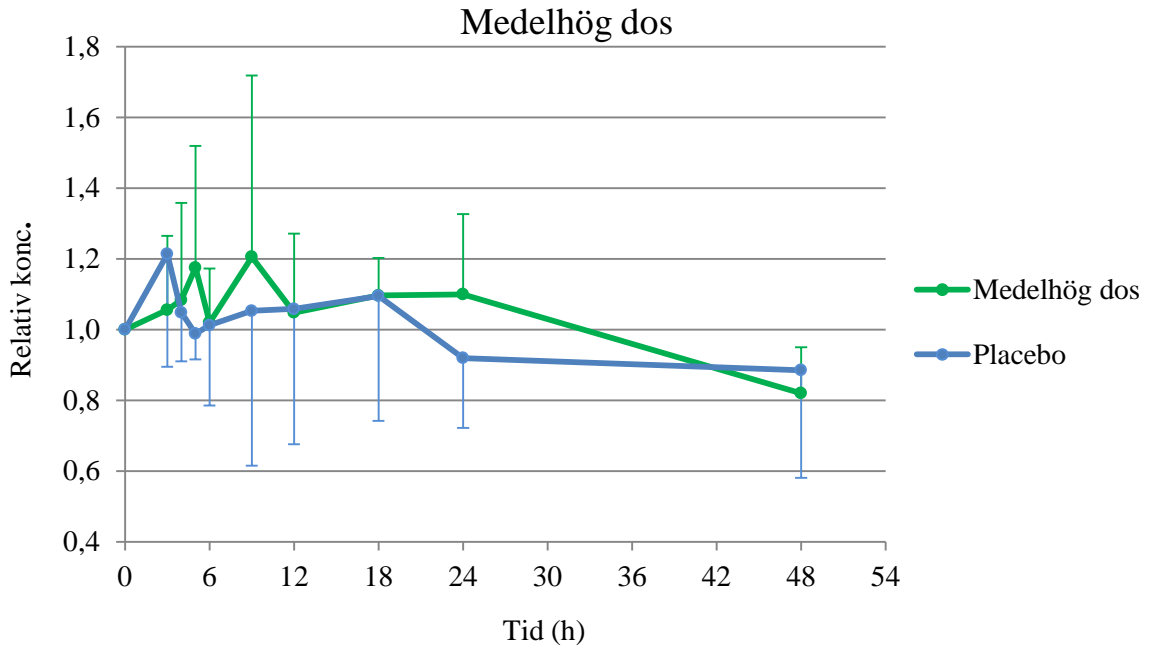
Den beräknade kovariansen mellan olika hästars värden i behandlingsgrupperna varierade enligt tabell 4.

Tabell 4. Kovarians mellan de olika behandlingsgrupperna samt placebokontrollernas resultatkurvor

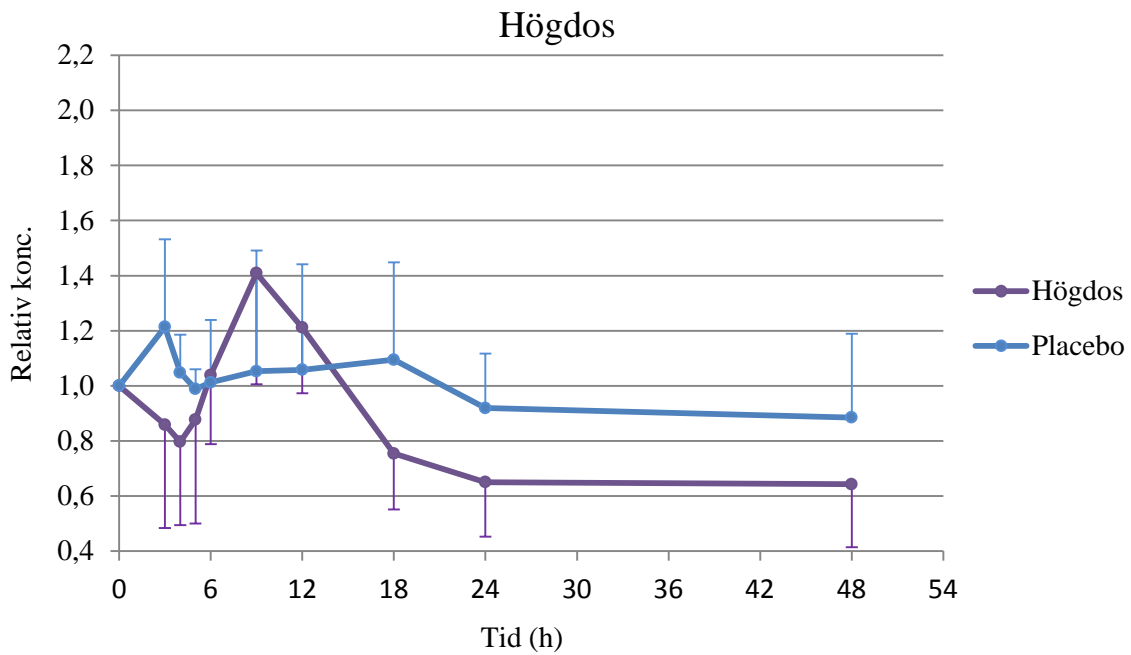
Jämförda hästar	Placebo	Låg	Medel	Hög
Häst 1 - Häst 2	-0,0006	-0,0002	0,0017	0,0480
Häst 2 - Häst 3	0,0013	-0,0051	0,0113	0,0648
Häst 3 - Häst 1	-0,0114	-0,0027	-0,0027	0,0292
Medelkovarians	-0,0036	-0,0027	0,0034	0,0473



Figur 3. Relativ koncentration IL-10 (medel  $\pm$  SD) i hästplasma efter dexametason (målkoncentration 50 pg/ml) samt placebo (fysiologisk koksaltlösning) infusion från 0-3h (n=3).



Figur 4. Relativ koncentration IL-10 (medel  $\pm$  SD) i hästplasma efter dexametason infusion (målkoncentration 500 pg/ml) samt placebo (fysiologisk koksaltlösning) från 0-3h (n=3).



Figur 5. Relativ koncentration IL-10 (medel  $\pm$  SD) i hästplasma efter dexametason infusion (målkoncentration 5000 pg/ml) samt placebo (fysiologisk koksaltlösning) från 0-3h (n=3).



## DISKUSSION

Syftet med denna studie var att se hur dexametason påverkar hästars plasmakoncentration av IL-10 över tid.

### Validering

Utbytet var dåligt när spikade plasmakoncentrationer analyserades. Motsvarande värde för spikad provserie spädd i RD var bättre, vilket indikerar att plasma påverkar utbytet negativt. Det skulle kunna bero på att plasma har en högre komplexitet än RD och att det är detta som påverkar analysen av IL-10 i plasma. Optimering av det protokoll som medförde analysen genom vortexning och efterföljande centrifugering förbättrar utbytet med 10 % (7-14 %, standardavvikelse 5 %) och användes därför i analysmetoden. Metoden behöver dock optimeras ytterligare för att ge ett tillförlitligt resultat. Förlänga vortextiden kan kanske öka utbytet ytterligare.

$R^2$ -värdena under analyserna varierade mellan 0,0126-0,9965 (n=6) för standard löst i olika medium. Standard löst i RD gav de högsta  $R^2$ -värden mellan 0,9706-0,9965 (n=3). Standard löst i både värmeinaktiverad plasma och värmeinaktiverat serum gav de lägsta värdena och skulle kunna orsakas av komplexiteten i dessa spädningsmedium. Flera spädningssteg med lägre koncentrationer i RD resulterade i ett sämre  $R^2$ -värde 0,9513 (n=1) trots ett bättre utbyte. Spridningen mellan duplikat blev procentuellt större vid lägre koncentrationer vilket påverkade  $R^2$ -värdet. Standardkurvan blev alltså osäkrare vid lägre koncentrationer än det undre referensintervallet 313 pg/ml. Referensintervallet för standardkurva 313-20 000 pg/ml användes därför vid analys av provmaterialet.

För att ytterligare förbättra analysmetoden när det gäller påverkan på homogeniteten i plasmaprover bör betydelsen av ytterligare centrifugering och förlängning av vortextiden undersökas. Även hur spädning av plasmaproverna påverkar utbytet borde kontrolleras. Ett plasmaprov med samma koncentration av IL-10 bör också inkluderas i samtliga analyser för att kunna påvisa skillnader mellan analystillfällen. Dessutom bör trippletter av prover användas, för att kunna exkludera externa värden, s.k. *outliers*.

### Koncentration IL-10 i plasma efter infusion av dexametason

#### **Pilotstudie**

Under analysen av pilotstudieproverna låg  $R^2$ -värdena för standardkurvorna på 0,9859 respektive 0,9942 vilket överensstämmer med resultatet vid validering. Repeterbarheten var god både inom och mellan analyserna med undantag från enstaka värden med ett CV på 13,7 % och 19,2 %. Sex värden (211-313 pg/ml) var lägre än standardkurvans lägsta punkt men inkluderades på grund av att detta enbart var en förstudie som skulle ge vägledning inför huvudstudien.

Med ledning av pilotstudien valdes sedan provtagningstillfällen för att maximera informationsmängden, och minimera kostnaderna vid analys.

## Huvudstudie

Stora skillnader kunde ses mellan analyser av absoluta plasmakoncentrationer IL-10 från de olika hästarna. Trots dessa skillnader var de absoluta koncentrationerna för varje enskild häst av samma storleksordning, vilket överensstämmer med tidigare undersökningar (Fahey *et al.*, 2000), där olika laboratorier och analyser jämfördes avseende kvantifiering av bland annat humant IL-10. Om skillnaderna mellan hästar var på grund av analysmetoden eller om det var en skillnad mellan hästarnas absoluta koncentration av IL-10 går ej att uttala sig om då samtliga prover enbart analyserades en gång. Men en stark indikation att de höga koncentrationer som uppmättes var felaktiga är att de absoluta koncentrationerna för placebokontrollen hos två hästar låg på 2227 - 10907 pg/ml vilket skiljer sig från de absoluta koncentrationer som uppmätts hos friska ston (Burton *et al.* 2009). I denna studie på 16 ston kunde absoluta koncentrationer av IL-10 mellan <4-963 pg/ml påvisas. Majoriteten av hästarna visade dock inte några detekterbara värden likt 2 av 4 ston (häst 4 och 6) i vår studie. Enligt en artikel av Sachdeva & Asthana (2007) om cytokinkvantifiering skall inga, alternativt låga koncentrationer IL-10 normalt cirkulera i blodomloppet vilket ytterligare stödjer detta. Burton *et al.* (2009) använde sig av en luminex-metod vid analys av bland annat IL-10 i serum. Metoden baserades på samma typ av hästspecifika anti-IL-10-antikroppar, framtagna av Wagner *et al.* (2008), men den undre gränsen för referensintervallet var 4 pg/ml, vilket är avsevärt lägre än i vår studie. De icke mätbara koncentrationerna för häst 4 och 6 skulle även kunna bero på fel vid analysering eller provhantering, då IL-10 är ett protein som lätt förstörs av t.ex. temperatur. De absoluta koncentrationerna för häst 5 hamnade ovanför den övre gränsen av referensintervallet, 313-20 000 pg/ml, i standardkurvan. Plasmaproverna späddes därför och vid analys av dessa ökade koncentrationen ytterligare. Jitsukawa *et al.* (1989) kunde öka sensitiviteten av ett ELISA genom att späda prover. Kanske påverkar detta komplexiteten i plasma och ökar utbytet vilket skulle förklara varför koncentrationen ökade. Då utbytet i plasma var så lågt som <47% skulle de uppmätta koncentrationerna i plasma ligga långt under de faktiska koncentrationerna. Våra värden skulle i så fall skilja sig mycket från de som tidigare visats hos hästar och människor vilket ytterligare tyder på att analysmetoden ej varit tillförlitlig. Inga studier har tidigare testat utbytet på liknande sätt som i vår studie och det hade varit intressant att kunna jämföra resultat.

De absoluta koncentrationerna skiljde sig mellan hästarna och därför beräknades en relativ koncentration av varje analyserat värde för att kunna jämföra hästar och olika behandlingar. Vid beräkningen jämfördes variationen i absolut koncentration mot en "0-nivå" i form av varje provseries 0-provsvärden. Normalisering på detta viset är en stor felkälla då vilket värde som används som 0-prov har stor betydelse för resultatet. De normaliserade koncentrationerna av IL-10 för de olika dexametasondoserna jämfördes mot placebo i ett parat t-test men ingen signifikant skillnad kunde påvisas. På grund av lågt antal individer med, 3 hästar, påvisbara koncentrationer inom referensintervallet för analysmetoden får varje häst och värde stor påverkan på studieresultatet. Detta i kombination med stor spridning resulterar i dålig signifikans och sämre samvariation.

Inga studier finns tidigare rapporterade där IL-10 hos häst undersöks efter dexametasongivning i plasma. Däremot finns motsvarande studier gjorda på människor, bland annat (Dandona *et al.*,

1999) där 7 friska individer gavs en intravenös dos på 4 mg dexametason. Plasma analyserades sedan med ELISA vid 1, 2, 4, 8 och 24 timmar efter läkemedelsgiva. Lägsta detekterbara koncentration var 1,5 pg/ml. Grundnivån av IL-10 var  $4.8 \pm 1.8$  pg/ml, en timme efter läkemedelsgivan ökade IL-10 koncentrationen till  $5.6 \pm 1.8$  pg/ml och pikade vid 4 timmar med en koncentration av  $8.8 \pm 2.3$  pg/ml vilket var 180 % av den uppmätta grundnivån. Koncentrationen sjönk sedan ner under den uppmätta grundnivån till 24 timmarsprovet. Statistisk analys visade inga signifikanta värden, detta ansågs vara på grund av lågt antal individer inkluderade i studien. Vår studie visar en likartad tendens med resultatet från högdosgruppen dock med en tidsfördröjning. Ökningen skedde från  $5 \pm 1$  (4-6) h med en pik på 134 % av det uppmätta 0-provsvärdet vid 9 timmar efter infusionsstart i högdosgruppen. Den relativa koncentrationen sjönk sedan ner, till ett medelvärde på 64 % (standardavvikelsen 22 %) av det uppmätta 0-provsvärdet, efter 48 timmar. Motsvarande pikvärde för medeldosgruppen skedde också vid 9 timmar och var 114 %. För högdos i pilotstudien var motsvarande värde 150 % och skedde vid 9 timmar efter infusionsstart. I samtliga behandlingsgrupper inklusive pilotstudien sjönk koncentration av IL-10 i plasma under 0-provet vid 24 timmarsprovet. Likartad sänkning vid 24 h noterades även efter placebo vilket skulle kunna bero på en naturlig rytm av IL-10 i kroppen. Det finns inget i litteraturen som pekar på en naturlig rytm av IL-10 men då nivåerna även kan påverkas av den endogena kortisolkoncentrationen borde IL-10 följa dessa. Att 0-proverna var högre än både 24 och 48 timmarsprovet kanske kan bero på att hästarna påverkades mer av blodprover och hantering då detta skedde i tätare intervaller tidigt i studien. Grady *et al.* (2010) påvisar i sin studie att kortisolfrisättningen ökar vid stressande moment exempelvis blodprovtagning eller hantering.

En annan förklaring till de låga värdena av IL-10 som uppmättes vid 24 och 48 h skulle kunna vara skillnad i inkubationstid. Enligt Hornbeck *et al.* (2001) bör fördelning av provmaterial ske skyndsamt för att minimera skillnader i inkubationstid mellan provserierna. Eftersom plasma är relativt svårpipetterat tar detta lång tid. På varje analyserad platta, en häst per platta, fördelades proverna i följande ordning: placebo, lågdos, medeldos och högdos av dexametason. Detta skulle kunna förklara varför samtliga behandlingsdoser uppmätte något lägre koncentrationer IL-10 jämfört med placebokontrollen i och med att de fördelades senare än placebogrupperna. Att provserierna sedan fördelades med 0-prov först för varje provserie skulle kunna leda till att detta värde blir något högre än de sist fördelade provernas värden, 48 timmar, på grund av skillnad i inkubationstid. För att testa denna hypotes skulle proverna kunnat analyseras i omvänd ordning.

Både medeldos, högdos och pilotstudien (högdos) uppvisar samma mönster med en pik vid 9 timmar efter försöksstart vilket skulle kunna antyda att dexametason påverkar uppregleringen av IL-10 vid dessa koncentrationer. Kovariansen var i hög- och medeldosgruppen positiv men i placebo- och lågdosgruppen negativ vilket tyder på en viss samvariation, om än liten, i två av dexametasongrupperna men inte mot placebo. Ingen signifikant skillnad kunde dock påvisas mot placebogrupperna i ett parat t-test. På grund av lågt antal individer, 3 hästar, får varje häst och värde stor påverkan på studieresultatet. Detta i kombination med stor spridning och *outliers* resulterar i dålig signifikans och sämre samvariation.

Enligt litteraturen har luminex-metoder högre känslighet och jämfört med vår ELISA-metod både bättre repeterbarhet och mindre spridning (Burton *et al.*, 2009). Om luminexmetoden håller vad den lovar skulle det bli enklare att studera dynamiken mellan proteinuttrycket av inflammatoriska- och antiinflammatoriska cytokiner eftersom metod klarar av att kvantifierar flera olika cytokiner i samma prov. Dock bör komplettering med metoder för att kvantifiera genuttrycket till att utföras för att få större överblick över produktionen av dessa cytokiner.

Sammanfattningsvis sågs en svag antydning till att dexametason i medel- och högdosgruppen ökar koncentrationen av IL-10 i plasma jämfört med IL-10 koncentrationen i prov taget innan behandling. Ingen signifikant skillnad kunde dock påvisas gentemot placebo. Tyvärr var den använda ELISA-metoden inte tillförlitlig med plasma som medium och mätbara resultat kunde enbart ses från 3 av 6 hästar vilket gör att resultatet bör tolkas med yttersta försiktighet. Ytterligare studier med annan metod för kvantifiering av både proteinuttryck och genuttryck av IL-10 samt ett ökat antal inkluderade individer bör utföras för att utreda vilka koncentrationer av dexametason som leder till en ökning av IL-10 hos häst.

### **Tack till**

Ett stort tack till Carina Ingvast-Larsson, Maria Löfgren, Jonas Tallkvist och Carl Ekstrand som med stort engagemang handlett mig under mitt examensarbete. Tack även till laboratoriepersonalen på institutionen för all hjälp med att hitta material under laborationerna samt Stiftelsen Hästforskning för att ha bidragit med finansieringen av projektet.

## REFERENSER

- Arai, H., Petchclai, B., Khupulsup, K., Kurimura, T. & Takeda, K. (1999) Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 367.
- Barnes, P.J. (2011) Glucocorticosteroids: current and future directions, *British Journal of Pharmacology* 163, 29–43.
- Beato, M. & Klug, J. (2000) Steroid hormone receptors: An update. *Human Reproduction Update* 6, 225–236.
- Berghe, G., Wouters, P., Weekers, F., Mohan, S., Baxter, R.C., Veldhuis, J.D., Bowers, C.Y., & Bouillon, R. (1999) Reactivation of pituitary hormone release and metabolic improvement by infusion of growth hormone-releasing peptide and thyrotropin-releasing hormone in patients with protracted critical illness. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, 1311-1323.
- Bottoms, G.D., Rocsel, O.F., Rausch, F.D. & Akins, E.L. (1972) Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares. *American Journal of Veterinary Research* 33, 785-790.
- Burton, A.B., Wagner, B. & Ainsworth, D.M. (2009) Serum interleukin-6 (IL-6) och IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 132, 122–128.
- Clegg, P. & Booth, T. (2000) Drugs used to treat osteoarthritis in the horse. *In Practice* 22, 594-603.
- Cornelisse, C.J., Robinson, N.E., Berney, C.E., Kobe, C.A., Boruta, D.T. & Derksen, F.J. (2004) Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal* 36, 426–430.
- Dandona, P., Mohanty, P., Hamouda, W., Aljada, A., Kumbkarni, Y. & Garg, R. (1999) Effect of dexamethasone on reactive oxygen species generation by leukocytes and plasma interleukin-10 concentrations: A pharmacodynamic study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 66, 58-65.
- Engvall, E. (2010) Citation classic. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry* 56, 319–320.
- Evans, J.W., Winget, C.M. & Pollak, E.J. (1977) Rhythmic cortisol secretion in the equine: Analysis and physiological mechanisms. *Journal Interdisciplinary Cycle research* 8, 111-121.
- Fahey, J.L., Aziz, N., Spritzler, J., Plaeger, S., Nishanian, P., Lathey, J.L., Seigel, J., Landay, A.L., Kilarui, R., Schmitz, J.L., White, C., Wara, D.W., Akridge, R., Cutili, J., Douglas, S.D., Reuben, J., Shearer, W.T., Nokta, M., Pollard, R., Schooley, R., Asthana, D., Mizrachi, Y. & Waxdal, M. (2000) Need for an external proficiency testing program for cytokines, chemokines, and plasma markers of immune activation. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 540–548.
- Fehm, H.L., Voigt, K.H., Kummer, G., Lang, R. & Pfeiffer, E.F. (1979) Differential and integral corticosteroid feedback effects on ACTH-secretion in hypoadrenocorticism. *Journal of Clinical Investigation* 63, 247-253.
- Fickenscher, H., Hör, S., Küpers, H., Knappe, A., Wittmann, S. & Sticht, H. (2002) The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunology* 23, 89-96.
- Galagniana, M.D., Scruggs, J.L., Herrington, J., Welsh, M.J., Carter-Su, C., Housley, P.R. & Pratt, W.B. (1998) Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Molecular Endocrinology* 12, 1903 – 1913.

- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Müller, W., Trinchieri, G. & Sher, A. (1996) In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *The Journal of Immunology* 157, 798–805.
- Gayo, A., Mozo, L., Suarez, A., Tunon, A., Lahoz, C. & Gutierrez, C. (1998) Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *Journal of Neuroimmunology* 85, 122–130.
- Grady, J.A., Davis, E.G., Kukanich, B. & Sherck, A.B. (2010) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone after oral administration in apparently healthy horses. *American Journal of Veterinary Research* 71, 831-839.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2006) Adrenocortical hormones. *Textbook of Medical Physiology*. 11: e upplagan, Philadelphia: Elsevier, 945–956.
- Hoffsis, G.F. & Murdick, P.W. (1970) The plasma concentrations of corticosteroids in normal and diseased horses. *Journal American Veterinary Medical Association* 157, 1590–1594.
- Hornbeck, P., Scott E. Winston, S.E. & Fuller, S.A. (1991) Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Current Protocols in Molecular Biology*, 11.2.1–11.2.22.
- Howard, M., O'Garra, A., Ishida, H., Malefyt, R.D.W. & Vries, J.D. (1992) Biological Properties of Interleukin 10. *Journal of Clinical Immunology* 12, 239-247.
- Irvine, C.H. & Alexander, S.L. (1994) Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology* 11, 227–238.
- Ito, K., Barnes P.J. & Adcock, I.M. (2000) Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits IL-1 $\beta$ -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Molecular Cellular Biology* 20, 6891–6903.
- James, V.H.R., Horner, M.W., Moss, M.S. & Rippon, A.E. (1970) Adrenocortical function in the horse. *Journal of Endocrinology* 48, 319-335.
- John, M., Lim, S., Seybold J., Jose, P., Robichaud, A., O'Connor, B., Barnes, P.J. & Fan Chung, K. (1998) Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1  $\alpha$ , GM-CSF and IFN- $\gamma$  release from alveolar macrophages in asthma. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine* 157, 256–262.
- Jitsukawa, T., Nakajima, S., Sugawara, I., & Watanabe, H. (1989) Increased coating efficiency of antigens and preservation of original antigenic structure after coating in ELISA. *Journal of Immunological Methods* 116, 251-257.
- Johnson, A.L. & Malinowski, K. (1986) Daily rhythm of cortisol, and evidence for a photo-inducible phase for prolactin secretion in nonpregnant mares housed under non-interrupted and skeleton photoperiods. *Journal of Animal Science* 63, 169-175.
- Keller-Wood, M.E. (1989) Control of canine ACTH by corticosteroids: an integral feedback effect of steroids. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 257, 427-430.
- Keller-Wood, M.E. & Dallman, M.F. (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine Reviews* 5, 1-24.

- Keller-Wood, M.E., Shinsako, J. & Dallman, M.F. (1983) Integral as well as proportional adrenal responses to ACTH. *American Journal Physiology* 245, 53-59.
- Li, M.C. & He, S.H. (2004) IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 10, 620-62.
- Läkemedelsindustriföreningens Service AB. (2013) *FASS VET*. Stockholm, Elanders.
- Nobel Media AB. Nobelprisets officiella hemsida. [online](2013-01-27) Tillgänglig: <http://nobelprize.org> [2013-01-27]
- Norgren, A., Ingvast-Larsson, C., Kallings, P., Fredriksson, E. & Bondesson, B. (2001) Contamination and urinary excretion of flunixin after repeated administration in the horse. *Proceedings of 13th international conference of racing analysts and veterinarians, 2000, Cambridge, England*. Eds: Williams R.B., Houghton E. & Wade J., R&W Public, 377-380.
- Palmer, C.J., Dubon, J.M., Koenig, E., Perez, E., Ager, A., Jayaweera, D., Cuadrado, R.R., Rivera, A., Rubido, A. & Palmer, DA. (1999) Field evaluation of the determine rapid human immunodeficiency virus diagnostic test in honduras and the Dominican republic. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3698.
- Perlmann, P. & Engvall, E. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Pusterla, N., Magdesian, K.G., Mapes, S. & Leutenegger, C.M. (2006) Expression of molecular markers in blood of neonatal foals with sepsis. *American Journal of Veterinary Reserch* 67, 1045-1049.
- Rang, H.P. & Dale, M. (2012) *Rang and Dale's pharmacology*. 7. omarbetade uppl., Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Rennick, D.M., Fort, M.M. & Davidson, N.J. (1997) Studies with IL-10  $-/-$  mice: an overview. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 389-396.
- Rush, B.R., Flaminio, M.J., Matson, C.J., Hakala, J.E. & Shuman, W. (1998a) Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *American Journal of Veterinary Research* 59, 1033-1038.
- Rush, B.R., Raub, E.S., Rhoads, W.S., Matson, C.J., Hakala, J.E. & Gillespie, J.R. (1998b) Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *American Journal of Veterinary Research* 59, 1039-1043.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K. & Geginat, J. (2010) Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21, 331-344.
- Sachdeva, N. & Asthana, D. (2007) Cytokine quantitation: technologies and applications. *Frontiers in Bioscience* 12, 4682-4695.
- Simons, S.J., Sistare, F. & Chakraborti, P. (1989) Steroid binding activity is retained in a 16-kDa fragment of the steroid binding domain of rat glucocorticoid receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 14493 – 14497.
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K. & Sand, O. (2010) *Physiology of Domestic Animals*. 2. omarbetade uppl., Oslo: Scandinavian Veterinary Press.

- Smith CJ & Norman RE. (1987) Influence of gonads on cortisol secretion in female rhesus macaques. *Endocrinology* 121, 2192-2198.
- Soma, L.R., Uboh, C.E., Lou, Y., Guan, F., Moate, P.J. & Boston, R.C. (2005) Pharmacokinetics of dexamethasone with pharmacokinetic/pharmacodynamic model of the effect of dexamethasone on endogenous hydrocortisone and cortisone in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28, 71–80.
- Tabardel, Y., Duchateau, J., Schamartz, D., Marecaux, G., Shahla, M., Barvais, L., Lecler, J.L. & Vincent, J.L., (1996). Corticosteroids increase blood interleukin 10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 119, 76–80.
- Toutain, P.L., Oukessou, M., Autefage, A. & Alvinerie, M. (1988) Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology* 5, 55-59.
- Wagner, B., Hillegas, J.M., Brinker, D.R., Horohov, D.W. & Antczak, D.F. (2008) Characterization of monoclonal antibodies to equine interleukin-10 and detection of T regulatory 1 cells in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122, 57–64.
- Weitzman, E.D., Fukushima, D., Nogeire, C., Roffwarg, G., Gallagher, T.F. & Hellman, L. (1971) Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *Endocrinology* 33, 14-22.
- Wennerlund, I., Ingvast-Larsson, C., Kallings, P., Fredriksson, E. & Bondesson, U. (2001) Pharmacokinetics and urinary excretion of naproxen after repeated oral administration in the horse. *Proceedings of 13th international conference of racing analysts and veterinarians, 2000, Cambridge, England. Eds: Williams R.B., Houghton E. & Wade J., R&W Public.* 195-200.
- Whiteside, T.L. (2002) Cytokine assays. *Biotechniques* 33, 4-15.
- Wu, B., Li, P., Liu, Y., Lou, Z., Ding, Y., Shu, C., Ye, S., Bartlam, M., Shen, B. & Rao, Z. (2004) 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin hetero-complex. *Proceedings of National Academy of Sciences* 101, 8348–8353.
- Zimmermann, E. & Critchlow, V. (1969) Suppression of pituitary-adrenal function with physiological plasma levels of corticosterone. *Neuroendocrinology* 5, 183-192.