

# **Behandling med autologt konditionerat serum vid osteoartrit hos häst**

Autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis in the  
horse



*Stephanie Brodd*

*Uppsala  
2016*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2016:13*



# Behandling med autologt konditionerat serum vid osteoartrit hos häst

## Autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis in the horse

*Stephanie Brodd*

**Handledare:** *Eva Skiöldebrand, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Examinator:** *Eva Tydén, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grund nivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2016

**Omslagsbild:** Privat

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2016:13

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

**Nyckelord:** osteoartrit, ledinflammation, autologt konditionerat serum, ACS, IRAP

**Key words:** osteoarthritis, joint disease, autologous conditioned serum, ACS, IRAP

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>Sammanfattning</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Inledning</b> .....	<b>3</b>
<b>Material och metoder</b> .....	<b>3</b>
<b>Litteraturoversikt</b> .....	<b>4</b>
Synovialledens anatomi och fysiologi.....	4
Ledkapsel .....	4
Synovialvätska .....	5
Det artikulära broskets molekylära sammansättning .....	5
Kondrocyterna.....	5
Kollagen .....	6
Proteoglykaner .....	6
Icke kollagena proteiner.....	6
Subkondralt ben .....	7
Senor och Ligament .....	7
Osteoartrit.....	7
Inflammation vid osteoartrit .....	8
IL-1 och TNF $\alpha$ .....	9
Matrix metalloproteaser .....	9
Aggrekanaser .....	9
Prostaglandin E2.....	9
Fria radikaler .....	9
Skyddande mekanismer .....	10
Transforming Growth Factor Beta.....	10
Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) .....	10
Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) .....	10
Autologt konditionerat serum (IRAP) .....	10
Handelsnamn och bakgrund .....	10
Framställningsteknik.....	11
Verkningsmekanism .....	11
Kompositionen i ACS enligt Orthogen och Arthrex.....	11
Experimentella studier .....	12
Behandling med ACS vid experimentellt inducerad OA på häst .....	12
Kliniska studier .....	13
Behandling med ACS eller kortikosteroider och HA vid OA på häst .....	13
Behandling med ACS vid OA i knäled hos människa.....	13
Sammansättningen i ACS från hund .....	14
IRAP I (Orthokine®) och IRAP II (Arthrex) .....	14
<b>Diskussion</b> .....	<b>15</b>
<b>Litteraturförteckning</b> .....	<b>17</b>



## **SAMMANFATTNING**

Osteoartrit (OA) är en låggradig inflammatorisk och progressiv ledsjukdom som ofta drabbar hästar och som karaktäriseras av degeneration av de ingående strukturerna i den synoviala leden. Sjukdomen har en hög prevalens, är ekonomiskt kostsam för djurägaren och kan innebära slutet på karriären för en tävlingshäst.

Syftet med denna litteraturstudie är att beskriva den synoviala ledens anatomi och fysiologi, samt patogenesen vid OA. Därtill undersöks även huruvida ACS är en effektiv behandlingsmetod vid OA hos häst med utgångspunkt från experimentella och kliniska studier som genomförts inom veterinär- och humanmedicinen.

Den synoviala leden byggs upp av ledkapsel, synovialvätska, artikulärt brosk samt senor, ligament och subkondralt ben. I den friska leden råder en ständig jämvikt mellan anabola och katabola processer. När leden drabbas av OA rubbas denna jämvikt och de katabola processerna dominerar. Vid inflammationen frisätts proinflammatoriska cytokiner såsom interleukin-1 (IL-1) och TNF $\alpha$ , vilket startar en inflammationskaskad där vävnadsnedbrytande enzymer bildas och inflammatoriska celler migrerar till leden.

IL-1 och TNF $\alpha$  spelar en central roll i den tidiga inflammationen och nya biologiska produkter har utvecklats med syftet att hämma dessa. Autologt konditionerat serum (ACS) är en biologisk produkt som går under handelsnamnet IRAP. ACS framställs från hästens eget blod och som inkuberas i 37°C under 24 timmar i ett rör med kromsulfatbehandlade glaskulor, varpå blodet centrifugeras för att separera ut plasman. Processen ska öka syntesen av IL-1Ra (Interleukin-1 receptor antagonist protein), men studier har visat att fler antiinflammatoriska cytokiner och tillväxtfaktorer ökar efter processen. ACS injiceras intraartikulärt i den drabbade leden och IL-1Ra binder kompetitivt till IL-1R, vilket leder till att IL-1 hämmas och därmed inflammationen. I experimentella och kliniska studier har hästar och människor med OA framgångsrikt behandlats med ACS genom intraartikulär injektion. Behandlingen har resulterat i en klinisk förbättring med minskad hälta och smärta jämfört med kontrollgrupperna.

Eftersom ACS är en biologisk produkt som framställs från hästens eget blod varierar kompositionen mellan olika individer, vilket i sin tur medför att behandlingseffekten kan variera från individ till individ. De kliniska och experimentella studier som gjorts visar dock positiva resultat och ACS kan vara effektivt för att behandla OA.

## **ABSTRACT**

Osteoarthritis (OA) is a low-grade progressive and inflammatory joint disease characterized by degeneration of all structures of the synovial joint. The disease has a high prevalence, is economically costly and can be a career ending problem for a sporthorse.

The aim of this study is to describe anatomy and physiology of the synovial joint, as well as the pathogenesis of OA. The study will also investigate whether the ACS is an effective treatment for OA of the horse starting from experimental and clinical studies conducted in veterinary and human medicine.

The synovial joint consists of the joint capsule, synovial fluid, articular cartilage, tendons, ligaments and subchondral bone. In the healthy joint, anabolic and catabolic processes are in constant balance. When the joint is affected by osteoarthritis, an imbalance occurs and the catabolic processes dominate. Proinflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1) and TNF $\alpha$  are released at the beginning of the inflammation. These cytokines start an inflammatory cascade where inflammatory cells migrate to the joint and tissue degradation enzymes are released.

IL-1 and TNF $\alpha$  play an important role in early inflammation and new biological products have been developed with the aim of inhibit these proinflammatory cytokines. Autologous conditioned serum (ACS) is a biological product that goes under the trade name IRAP. ACS is prepared from the horse's venous blood, which is incubated in 37° C for 24 hours in a tube with borosilicate glass beads, and then the blood is centrifuged to harvest the serum. The process is thought to increase the synthesis of IL-1Ra (interleukin-1 receptor antagonist protein), but studies have shown increased concentration of other anti-inflammatory cytokines and growth factors as well. ACS is injected intra-articularly in the affected joint and IL-1Ra binds competitively to IL-1R, which results in inhibition of IL-1 and thereby inflammation. In experimental and clinical studies horses and humans with OA have successfully been treated with ACS by injection intra-articularly. The treatment resulted in clinical improvement with reduced lameness and pain.

Since ACS is a biological product made from the horse's own blood, the composition of the ACS varies between individuals and thereby the efficacy of the treatment. The clinical and experimental studies show positive results and ACS seems to have the potential to effectively treat OA.

## **INLEDNING**

Ledsjukdomar är en av de vanligaste orsakerna till att hästar inte kan tränas och tävlas, och i 60 % av fallen är det på grund av osteoartrit (OA) (Frisbie, 2005). OA är en lågradig inflammatorisk och progressiv ledsjukdom som karaktäriseras av degeneration av de ingående strukturerna i den drabbade leden (Goldring & Goldring, 2007). Med anledning av sjukdomens höga prevalens och höga ekonomiska kostnader för djurägaren utgör OA ett stort problem för hästnäringen (Hraha et al., 2011).

För behandling av OA används ofta intraartikulära glukokortikoider och hyaluronsyra. Glukokortikoider hämmar inflammationen i leden, men har många negativa effekter på det artikulära brosket. De negativa effekterna som rapporteras är bland annat; minskad storlek på kondrocyter, förlust och minskad syntes av GAGs, inhibering av proteoglykansyntes, nekros av kondrocyter samt degeneration av artikulärt brosk och nekros av subkondralt ben (Goodrich & Nixon, 2006).

Interleukin-1 (IL-1) spelar en viktig roll vid inflammatoriska sjukdomar som OA. Biologiska terapeutiska produkter med syftet att inhibera proinflammatoriska cytokiner har en stor potential som behandlingsalternativ vid denna typ av sjukdomar (Meijer et al., 2003). Dessa är lovande för framtiden då de påstås ha regenerativa egenskaper och baseras på individens förmåga att läka en skada (Monteiro et al., 2015).

Autogt konditionerat serum (ACS) är en biologisk produkt som används vid intraartikulära behandlingar av OA hos häst. ACS används kliniskt för dess potentiella anti-kataboliska effekt med målsättningen att hämma inflammationskaskaden genom inhibering av IL-1, men nya rapporter talar för att ACS även innehåller tillväxtfaktorer (Textor, 2011).

Syftet med denna litteraturstudie är att beskriva den synoviala ledens anatomi och fysiologi samt patogenesen vid OA för att vidare undersöka huruvida ACS är en effektiv behandlingsmetod vid OA hos häst med utgångspunkt från experimentella och kliniska studier som genomförts inom veterinär- och humanmedicinen.

## **MATERIAL OCH METODER**

Vid litteratursökningen användes sökorden (IRAP OR ABPS OR ACS OR biologic treatment OR Interleukin-1 receptor antagonist protein) AND (horse OR horses OR equine) AND (joint disease OR osteoarthritis OR osteoarthritis OR OA OR musculoskeletal disease) samt olika kombinationer av dessa. Referenser från artiklarna har också använts i arbetet. Sökningarna gjordes i databaserna PubMed och Web of Science.



Grundläggande anatomi, fysiologi och patologi för hästens leder är hämtat ur boken Joint Disease in the Horse från 2015.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Synovialledens anatomi och fysiologi

Den synoviala leden är uppbyggd av ledkapsel, synovialvätska och artikulärt brosk, samt senor, ligament och subkondralt ben (bild 1). Det artikulära brosket bekläder kontaktytan på de ben som länkas samman via leden och har till funktion att verka stötdämpande och fördela den belastning som uppstår när leden utsätts för en rörelse och belastning. Ledkapseln som omger synovialleden innehåller synovialvätskan som ger leden dess viskositet (McIlwraith et al., 2015).

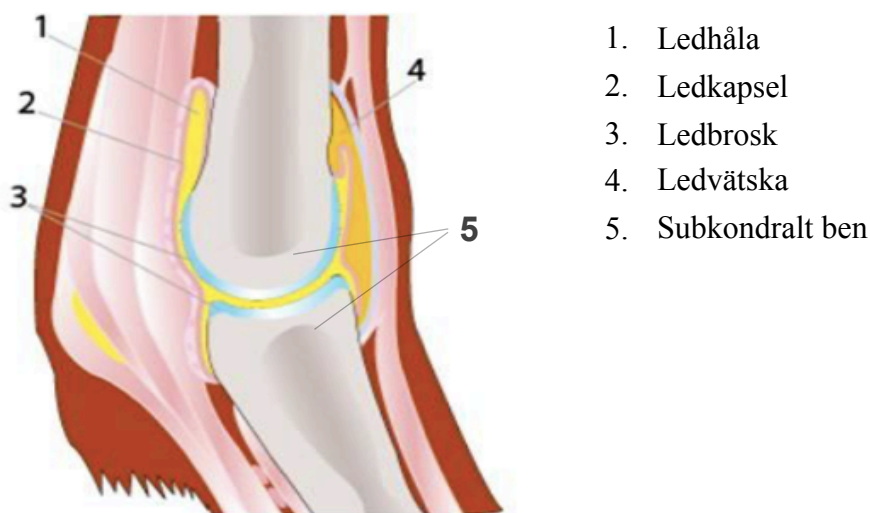


Bild 1. Ledens uppbyggnad (Li Gessbo), Eva Skiöldebrand 2004

### Ledkapsel

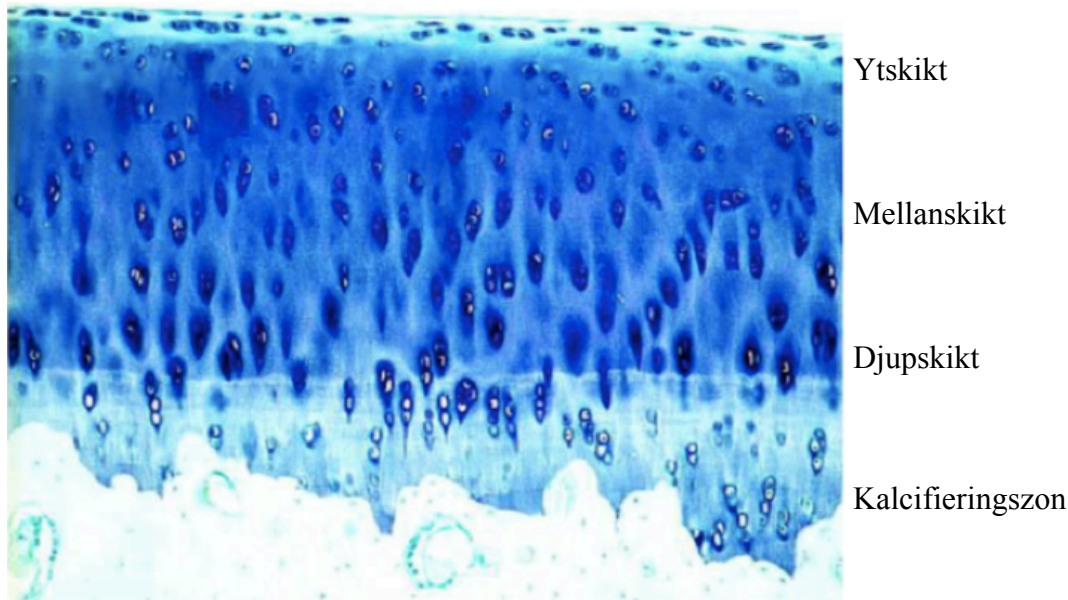
Ledkapseln är uppbyggd av två lager, ett yttre fibrinöst lager, och ett inre synovialt membran. Det yttre fibrinösa lagret samverkar med extraartikulära strukturer som ligament och senor och ger leden stabilitet (McIlwraith et al., 2015). Synovialmembranet består av två lager, *intima synovialis* och *stratum subsynoviale*. *Intima synovialis* innehåller två typer av synoviocyter, fagocyterande typ-A synoviocyter samt typ-B synoviocyter som producerar och sekreterar proteiner (König et al., 2009). *Stratum subsynoviale* är både vaskuläriserad och innerverad (McIlwraith et al., 2015).

## **Synovialvätska**

Synovialvätskan är ett ultrafiltrat av blodplasman. När leden komprimeras trycks slaggprodukter ut från det avaskulariserade brosket och när leden avlastas flödar näringsämnen in. Utbytet sker med hjälp av det hydrostatiska och det kolloidosmotiska trycket som är uppbyggt genom den specialiserade bindväven i brosket. De fibroblastlika typ-B synoviocyterna producerar hyaluronan och glukosaminoglykaner, vilket ger synovialvätskan dess viskositet. Synoviocyterna (typ-A och typ-B) är viktiga för ledens homeostas då de har förmågan att producera cytokiner, tillväxtfaktorer och inflammatoriska mediatorer (McIlwraith et al., 2015).

## **Det artikulära broskets molekylära sammansättning**

Det artikulära brosket delas in i fyra zoner/skikt; ytskiktet, mellanskiktet, djupskiktet och kalcifieringszonen (bild 2). De tre förstnämnda bildar tillsammans den hyalina delen av det artikulära brosket. Histologiskt ses i det yttersta skiktet långsmala kondrocyter som i mellanskiktet ligger oregelbundet organiserade och har en rundare form för att i djupskiktet arrangeras i kolumner. Ytskiktet innehåller mest kollagen typ II, lite proteoglykaner och mycket vatten. I de djupare lagren minskar kollagenhalten, proteoglykanerna ökar i antal, vattenhalten minskar och kondrocyterna ligger i kolumner (McIlwraith et al., 2015).



*Bild 2. Histologisk bild av ledbruskets zoner (Eva Skiöldebrand, Doctoral thesis 2004)*

## **Kondrocyterna**

Kondrocyterna bildar komponenterna i broskets extracellulära matrix (ECM) som innehåller kollagener, proteoglykaner, glykoproteiner, icke kollagena proteiner, mineraler, vatten och lipider. I det friska ledbrusket råder en ständig jämvikt mellan anabola och katabola processer,

och kondrocyterna syntetiserar molekylerna till ECM. De producerar anabola tillväxtfaktorer såsom IGF-1, FGF-2, TGF- $\beta$  och BMPs, vilka har olika uppgifter vid syntesen av matrixkomponenter. Kondrocyten producerar även katabola cytokiner (t.ex. IL-1), MMPs, aggreganser och fria radikaler (McIlwraith et al., 2015).

### *Kollagen*

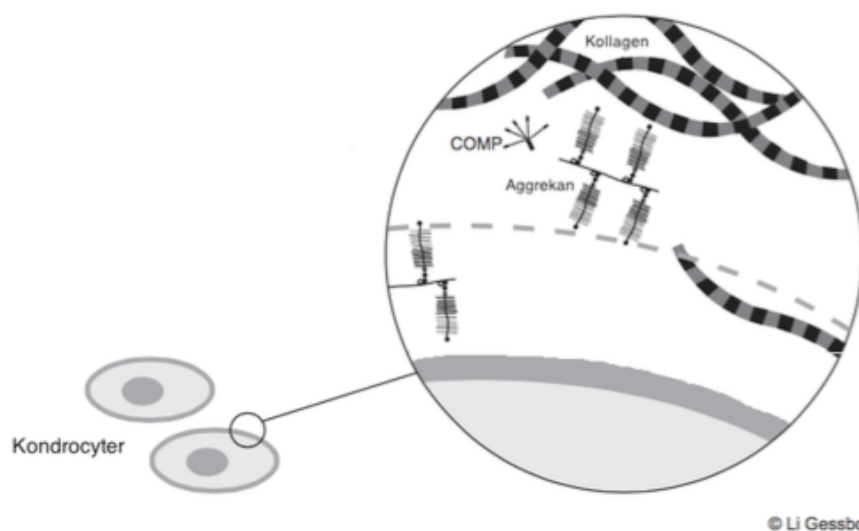
Typ II kollagen består av tre proteinkedjor som tillsammans bildar en trippelhelix. Av flera kollagenfibrer bildas ett starkt och hållfast kollagent nätverk som ger brosket styrka likt armeringsjärn i betong (McIlwraith et al., 2015).

### *Proteoglykaner*

Insprängt bland de kollagena fibrerna i det artikulära brosket finns proteoglykaner som binder direkt eller med hjälp av hyaluronan till fibrerna. Den vanligast förekommande proteoglykanen i artikulärt brosk är aggregan. Aggregan byggs upp av ett protein med sidokedjor bestående av keratinsulfat och kondroitinsulfat. Sulfatgrupperna är negativt laddade, vilket gör att de repellerar varandra och binder vatten, och detta ger brosket dess stötdämpande förmåga (McIlwraith et al., 2015).

### *Icke kollagena proteiner*

Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) är ett icke kollagent protein som består av 5 st subenheter. Subenheterna binder kollagena molekyler, vilket medverkar till att hålla samman det tredimensionella kollagena nätverket (McIlwraith et al., 2015).



*Bild 3. Schematisk bild av kondrocyten och dess ECM (Eva Skiöldebrand, Doctoral thesis 2004)*

### **Subkondralt ben**

Det subkondrala benet länkas samman med det artikulära brosket via kalcifieringszonen i brosket. Närmast ses ett lager av kompakt ben, och därefter det trabekulära benet. Benet verkar stötdämpande och ger stabilitet till leden. Till skillnad från det avaskulariserade och aneurala artikulära brosket, är det subkondrala benet väl vaskulariserat och rikt på nerver. Benet anpassar sig efter den belastning det utsätts för, och vid upprepad hög belastning kan man se förtjockning och benskleros på röntgen (McIlwraith et al., 2015).

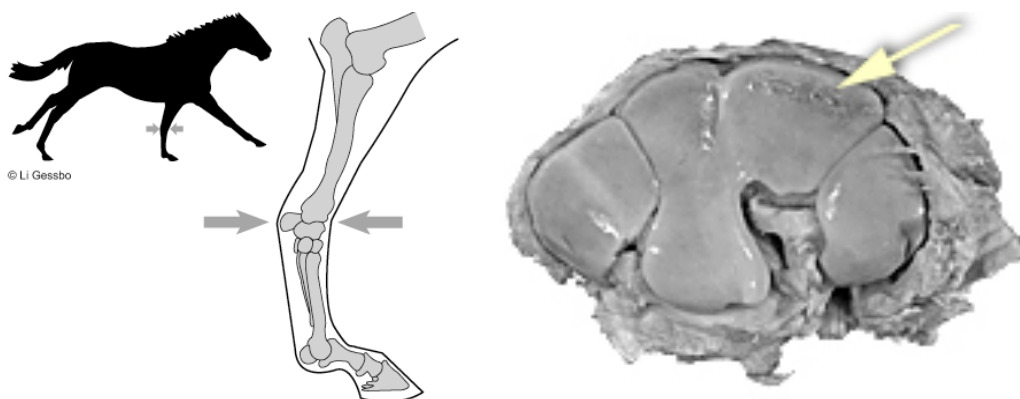
### **Senor och Ligament**

Senor och ligament ger leden mekanisk stabilitet och förhindrar rörelse i oönskade riktningar. Biomekaniskt och strukturellt liknar dessa ledkapseln med ett ECM bestående av kollagen, proteoglykaner, elastin, glukosaminoglykaner och vatten (McIlwraith et al., 2015).

### **Osteoartrit**

Osteoartrit är en låggradig inflammatorisk progressiv sjukdom som kan drabba hästens leder, och som karaktäriseras av degeneration av de ingående strukturerna i leden (Goldring & Goldring, 2007). En skada i hästens led kan uppkomma genom enskilda eller upprepade trauman, vilket senare kan utvecklas till OA (McIlwraith et al., 2015).

Två grundläggande mekanismer sägs idag ligga bakom ökad risk för OA; onormal belastning på normalt ledbrosk, alternativt normal belastning på onormalt ledbrosk (Goldring & Goldring, 2007). En skada i leden kan initieras genom inflammation i ledkapseln (kapsulit), synovialmembranet (synovit), eller i stödjande vävnader såsom senor, ligament eller det subkondrala benet. Oavsett var och hur skadan uppstår, resulterar inflammationen i en biokemisk skada som senare leder till degeneration av det artikulära brosket och utveckling av OA (McIlwraith et al., 2015).



*Bild 4. Ökad hastighet ökar belastningen i karpalledens främre delar (radial facet)  
(Eva Skiöldebrand, Doctoral thesis 2004)*

### Inflammation vid osteoartrit

Vid osteoartrit rubbas jämvikten mellan de anabola och katabola processerna i leden, varpå de katabola processerna dominerar (McIlwraith et al., 2015; Frizziero et al., 2013). OA kan starta i olika delar av den synoviala leden. Om inflammationen startar i synovialmembranet uppstår en synovit där synoviocyterna frisätter de proinflammatoriska cytokinerna IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  och TNF $\alpha$ . Frisättningen av de proinflammatoriska cytokinerna startar en kaskad där vävnadsnedbrytande enzymer bildas såsom t.ex. matrix metalloproteaser (MMPs), aggreganaser och prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (McIlwraith et al., 2015).

Den nära förbindelsen mellan ledkapsel och blodkärl leder även till ett utträde av inflammatoriska celler såsom neutrofiler, makrofager och leukocyter från blodet in i leden, vilket driver på inflammationen ytterligare (McIlwraith et al., 2015).

När inflammationen når det artikulära brosket frisätter även kondrocyterna proinflammatoriska cytokiner (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  och TNF $\alpha$ ), vilket i sin tur leder till ökad frisättning av vävnadsnedbrytande enzymer (McIlwraith et al., 2015). Vid OA uttrycker kondrocyterna dessutom en signifikant högre andel typ-1 IL-1 receptorer (IL-1R), vilket ökar effekten av IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$  (Frizziero et al., 2013).

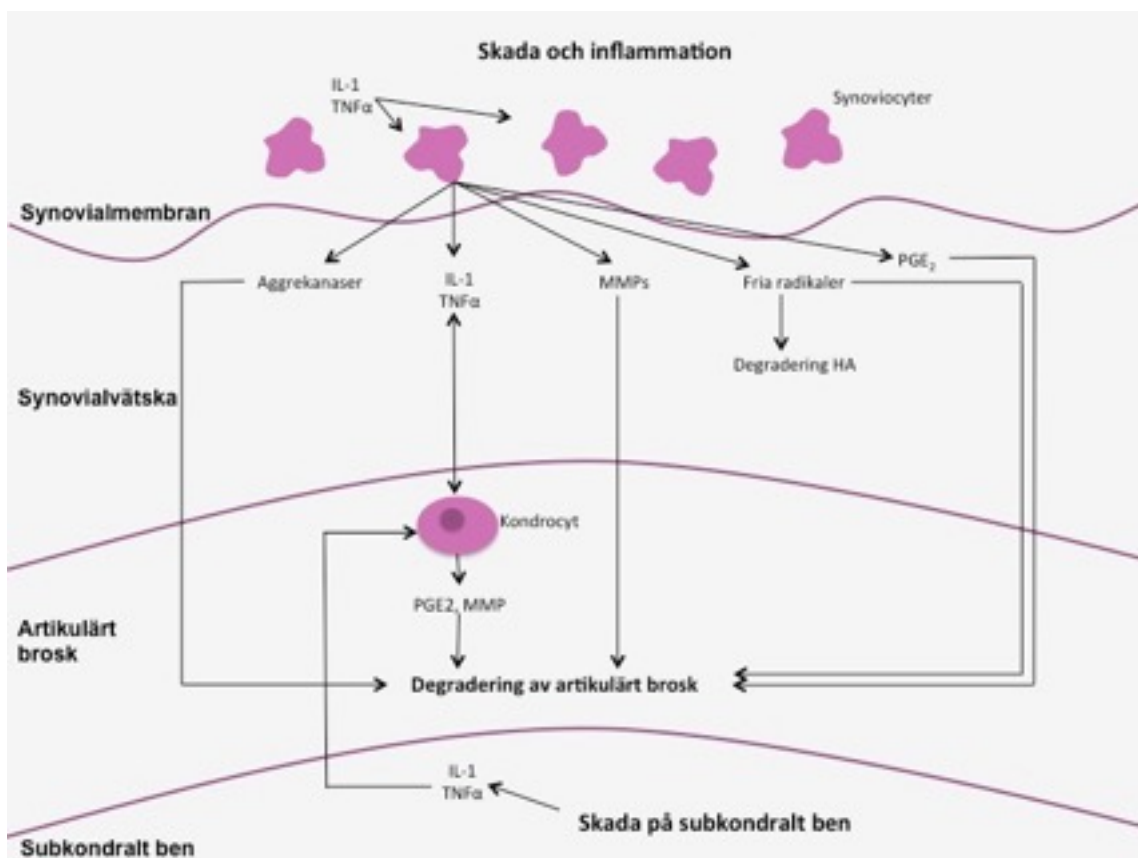


Bild 5. Inflammationskaskaden i leden (egen bild)

### *IL-1 och TNF $\alpha$*

IL-1 (IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$ ) och TNF $\alpha$  spelar en viktig roll i den tidiga inflammationen genom att de stimulerar kondrocyter och synoviala celler att bilda MMPs. Frisättningen av IL-1 leder till att andelen proteoglykaner i det artikulära brosket minskar genom att degraderingen ökar och nysyntesen minskar (McIlwraith et al., 2015).

Till genfamiljen för IL-1 hör agonisterna IL-1 $\alpha$  och IL-1 $\beta$  samt den kompetitiva IL-1 receptor antagonisten (IL-1Ra). Dessa binder till två specifika IL-1 receptorer, IL-1RI och IL-1RII. IL-1RI skapar en signalväg ned i cellen, medan IL-1RII inte skapar någon signal (Dinarello, 1996).

### *Matrix metalloproteaser*

MMPs är en grupp av zinkberoende vävnadsnedbrytande enzymer som har förmåga att bryta ned samtliga komponenter i extracellulärt matrix. Vid inflammationen inducerar IL-1 $\beta$  efter inbindning till IL-1R transkription av MMPs, vilket leder till degradering av kollagen typ II i det artikulära brosket. Inom både veterinär- och humanmedicinen anses MMP-13 (kollagenas 3) vara ett viktigt enzym för utvecklande av OA då den har kapacitet att bryta ned både proteoglykaner och kollagen typ II i brosket (McIlwraith et al., 2015).

### *Aggrekanaser*

Frisättningen av IL-1 $\beta$  leder även till ökat uttryck av aggrekanaser (ADAMTS-4 och 5) vilka driver en proteolytisk process av aggrekan. Detta leder till att brosket förlorar aggrekan vid OA (McIlwraith et al., 2015).

### *Prostaglandin E<sub>2</sub>*

PGE<sub>2</sub> anses vara en viktig mediator för den inflammation och smärta som uppstår vid OA. IL-1 $\beta$  och TNF $\alpha$  ökar syntesen av enzymerna COX-2 och PGE-syntetas, vilka krävs för bildningen av PGE<sub>2</sub>. Vid inflammationen leder frisättningen av PGE<sub>2</sub> till vasodilatation, smärta, demineralisering av subkondralt ben samt degradering och minskad syntes av det artikulära brosket. Frisättningen av PGE<sub>2</sub> leder även till en minskad mängd proteoglykaner i broskmatrix (McIlwraith et al., 2015).

### *Fria radikaler*

Den skadade vävnaden frisätter fria radikaler, vilket leder till att hyaluronan klyvs och  $\alpha$ -kedjan hos kollagenet degraderas. En ökad mängd fria radikaler stimulerar frisättning av NF- $\kappa$ B, vilket gör att kondrocyter går i apoptos samt att brosket degraderas. Även här spelar IL-1 $\beta$  en stor roll genom att stimulera iNOS, som i sin tur gör att mer NO bildas (McIlwraith et al., 2015).

## **Skyddande mekanismer**

### ***Transforming Growth Factor Beta***

Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) syntetiseras av kondrocyterna (Skiöldebrand, 2004) och stimulerar ökad syntes av kollagen II och aggrecan samt gör att andelen matrixnedbrytande enzymer minskar. På människa har man sett att andelen TGF- $\beta$  minskar med stigande ålder, vilket tros vara en anledning till att äldre utvecklar OA (McIlwraith et al., 2015). TGF- $\beta$  nedreglerar även IL-1 (Textor, 2011).

### ***Insulin Growth Factor-1 (IGF-1)***

IGF-1 reglerar broskets homeostas genom att öka nysyntesen samt minska degraderingen av matrixmolekyler. IGF-1 uppreglerar dessutom IL-1RII, vilket gör att ingen signal induceras när IL-1 binder in till receptorn (McIlwraith et al., 2015).

### ***Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra)***

IL-1Ra tillhör IL-1 familjen och kan syntetiseras från många olika celltyper, bland annat monocyter, makrofager och neutrofiler (Arend et al., 1998). IL-1Ra är en kompetitiv antagonist till IL-1R, vilket gör att IL-1Ra har förmågan att reducera effekterna av IL-1 (Dinarello, 1996).

## **Autologt konditionerat serum (IRAP)**

### ***Handelsnamn och bakgrund***

Autologt konditionerat serum (ACS) går under handelsnamnen IRAP och IRAP II inom veterinärmedicinen. IRAP vet 60 tillverkas av Orthogen (Orthokine<sup>®</sup>) och IRAP II (Arthrex Autologous Blood Processing System) tillverkas av Arthrex Vet Systems.

ACS är en biologisk produkt som används vid intraartikulära behandlingar av OA hos häst samt ibland profylaktiskt inför artroskopi (Textor, 2011), och som baseras på kroppens egen förmåga att läka en skada (Fortier et al., 2011). I de flesta fall har ACS använts på hästar med kroniska och progressiva OA, snarare än hästar med akuta skador (Textor, 2011). Inom humanmedicinen i Europa finns rapporter som talar för att ACS framgångsrikt använts vid behandling av OA, reumatoid artrit, skador på ryggraden samt vid muskulära skador (Frisbie et al., 2007).

Historiskt sett har ACS använts för dess potentiella antikataboliska effekt med målsättningen att hämma inflammationskaskaden genom inhibering av IL-1, men nya rapporter talar för att ACS även innehåller tillväxtfaktorer (Textor, 2011).

### **Framställningsteknik**

IRAP och IRAP II kan framställas på veterinärkliniken. Orthogen och Arthrex säljer de tillbehör som krävs (steril 60ml spruta, butterflykanyl, ACS-rör, inkubator, centrifug och mikrofilter) för att kliniken ska kunna erbjuda behandling med ACS (Arthrex, 2015; Orthogen).

ACS framställs sterilt från venöst blod som inkuberas i 37°C under 24 timmar i ett rör med kromsulfatbehandlade glaskulor, vilket aktiverar monocytorna (Carlson et al., 2013). Därefter centrifugeras blodet för att skilja ut plasman (Hraha et al., 2011).

### **Verkningsmekanism**

Den huvudsakliga verkningsmekanismen bakom ACS verkan tros bero på uppregleringen av ett antal cytokiner, framförallt IL-1Ra (Frisbie et al., 2007; Meijer et al., 2003). Humant framställt ACS har rapporterats stimulera produktion av antiinflammatoriska cytokiner och tillväxtfaktorer såsom IL-4, IL-10, IL-1Ra, FGF-1 och TGF- $\beta$ , utan att proinflammatoriska cytokiner som IL-1 och TNF- $\alpha$  uppregleras (Meijer et al., 2003). Den ökade koncentrationen av IL-1Ra hämmar IL-1s verkan i inflammationen, vilket leder till att effekterna av MMPs, aggreganser och PGE<sub>2</sub>, hämmas. Cytokinerna och tillväxtfaktorerna som ACS innehåller förebygger nedbrytning av broskmatrix samt hjälper till att återuppbygga proteoglykaner och kollagen typ II i ledbrösket (Textor, 2011).

IL-1 är en synnerligen potent proinflammatorisk cytokin, och för att hämma IL-1 krävs att IL-1Ra uttrycks i hög koncentration. Inom humanmedicinen rekommenderas att förhållandet mellan IL-1/IL-1Ra bör ligga runt 1:100 för kondrocyter respektive 1:30 för synoviocyter. Inom veterinärmedicinen och för behandling av hästar finns idag inget optimalt förhållande fastställt (Textor, 2011).

Eftersom ACS framställs från hästens eget blod varierar sammansättningen mellan olika individer, vilket innebär att behandlingseffekten varierar från individ till individ och även vid olika tillfällen för samma individ (Textor, 2011).

### **Kompositionen i ACS enligt Orthogen och Arthrex**

Orthogen skriver på sin hemsida att framställd IRAP innehåller höga koncentrationer av IL-1Ra och diverse tillväxtfaktorer som IGF-1, PDGF (platelet-derived growth factor) och TGF- $\beta$ . Verkningsmekanismen bakom IRAP är att IL-1Ra binder till IL-1R, vilket resulterar i en hämning av IL-1, samtidigt som tillväxtfaktorerna i IRAP stimulerar regeneration och bromsar degeneration av ledbrösket (Orthogen). Enligt Arthrex stimulerar processen vid



framställningen av IRAP II monocytorna att tillverka regenerativa och antiinflammatoriska cytokiner som IL-1Ra och diverse tillväxtfaktorer (Arthrex, 2015).

### **Experimentella studier**

#### ***Behandling med ACS vid experimentellt inducerad OA på häst***

I en studie (Frisbie, 2007) inducerades osteoartrit i karpalleden på 16 hästar i åldern 2-3 år. Innan studiens start undersöktes hästarna med avseende på eventuell hälta, kondition, samt radiologiska fynd i karpalleden för att säkerställas att alla parametrar var inom uppsatta referensgränser. Hästarna sövdes dag 0 och genom artroskopi kontrollerades att inga existerande förändringar kunde ses i hästarnas karpalleder. I samband med artroskopi inducerades OA i det ena frambenets mediala karpalled genom att ett osteokondralt fragment skars ut. Det andra frambenet användes som kontroll. Hästarna randomiserades i behandlingsgrupp (8 hästar) och placebo-grupp (8 hästar), där hästarna i behandlingsgruppen behandlades med ACS genom injektion intraartikulärt. ACS tillverkades genom att 50 ml helblod togs från respektive häst i behandlingsgruppen. Blodet inkuberades och samlades i en spruta preparerad med kromsulfatbeklädda glaskulor. Efter ett dygn centrifugerades blodet och serum sparades. Dag 14, 21, 28 och 36 injicerades 6 ml serum intraartikulärt i den ena karpalleden på hästarna i behandlingsgruppen. Kontrollgruppen injicerades samtidigt med fosfatbuffrat koksalt (PBS). Placebogruppen behandlades enbart med PBS.

Under studiens gång undersöktes hästarna med avseende på hälta (grad 0-5 där 0 innebär ohalt och 5 innebär mycket svår hälta), ledsvullnad, röntgenfynd samt ledvätskans innehåll (koncentration av proteiner, cytologi och totalantal leukocyter) och utseende (färg och klarhet). Vid studiens slut (efter 70 dagar) avlivades samtliga hästar för en blindad undersökning av makroskopiska samt histologiska förändringar i leden.

Resultaten av studien visade på en signifikant förbättring av graden av hälta hos hästarna i behandlingsgruppen jämfört med placebo-gruppen, men ingen häst var ohalt vid studiens slut.

Histologiskt jämfördes cellinfiltration, hyperplasi av *intima synovialis* och subintimalt ödem i synovialmembranet. Lederna som behandlats med ACS visade signifikant lägre grad hyperplasi av *stratum intima* jämfört med placebo-gruppen. Inga andra histologiska förändringar var signifikanta.

Makroskopiskt jämfördes graden av broskerosion, synovialvätskans innehåll samt radiologiska fynd, men ingen signifikant skillnad kunde konstateras även om resultaten tydde på en förbättring i behandlingsgruppen jämfört med placebo.

I studien konstaterades att koncentrationen av IL-1Ra i synovialvätskan ökade med tiden för de hästarna som behandlades med ACS, vilket eventuellt kan innebära att behandling med ACS stimulerar den endogena produktionen av IL-1Ra på längre sikt (Frisbie et al., 2007).

### ***Kliniska studier***

#### ***Behandling med ACS eller kortikosteroider och HA vid OA på häst***

I en klinisk studie (Jostingmeier, 2010) jämfördes intraartikulär behandling med ACS respektive kortikosteroider och hyaluronsyra vid osteoartrit på häst. 54 hästar med diagnosticerad hälta från hovleden delades in i två grupper (27 hästar i varje grupp) utifrån ägarnas önskemål. För att hästarna skulle inkluderas i studien fick osteoartriten inte överstiga grad III på röntgen. Grupperna hade ingen signifikant skillnad med avseende på hästarnas ålder, aktivitet och radiologisk klassifikation. Grupp 1 behandlades i.a. med betametason (kortikosteroid) och hyaluronsyra, och grupp 2 behandlades i.a. med ACS. Båda grupperna ordinerades samma träningsprogram efter behandlingarna.

Sex månader efter första behandlingen gjordes en uppföljning för att utvärdera resultaten av behandlingarna. Båda grupperna visade en signifikant förbättring med avseende på minskad grad av hälta. Grupp 1 behandlades i genomsnitt 2,8 gånger, och 63 % av dessa hästar var ohalta vid uppföljningen. Grupp 2 behandlades i genomsnitt 3,3 gånger, och 88,9 % av dessa hästar var ohalta vid samma tidpunkt (Jostingmeier et al., 2010).

#### ***Behandling med ACS vid OA i knäled hos människa***

Inom humanmedicinen genomfördes 2007 (Baltzer, 2007) en randomiserad och dubbelblindad studie i Tyskland där 376 personer med OA i knäleden ingick. Patienterna delades in i tre grupper, vilka behandlades intraartikulärt med ACS (Orthokine<sup>®</sup>), hyaluronsyra (HA) eller koksaltlösning. Behandlingarnas effektivitet jämfördes med hjälp av WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index). Studien pågick under 26 veckor och patienterna undersöktes i vecka 7, 16 samt 26. Vid samtliga tillfällen sågs en signifikant förbättring i ACS-gruppen jämfört med övriga grupper.

Två år efter studiens slut gjordes ytterligare en dubbelblind uppföljning (310 personer) med en ny och oberoende person som utvärderade resultatet. Även vid denna uppföljning sågs en signifikant förbättring hos patienterna som behandlats med ACS jämfört med övriga grupper. Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan gruppen som behandlats med hyaluronsyra och gruppen som behandlats med koksalt (Baltzer et al., 2009).

### ***Sammansättningen i ACS från hund***

2015 genomfördes en studie (Huggins, 2015) där ACS framställdes från 12 st vuxna och friska hundar. Studien hade två syften, dels att studera huruvida IRAP II-systemet ökar mängden IL-1Ra i serum från hundarna, och dels att undersöka hur kylning respektive frysning påverkar stabiliteten hos produkten.

IRAP II framställdes från hundarnas blod och som kontroll samlades ytterligare 50 ml blod från respektive hund. Proverna inkuberades i 37°C i 24 timmar för att följande dag centrifugeras så att plasman kunde separeras. Plasman förvarades därefter i 4°C respektive -20°C i upp till 90 dagar. Utöver proverna samlades även ett ”förkontrollprov” in vilket man lät koagulera i rumstemperatur i 1 timme för att därefter utvinna plasman.

I studien kunde konstateras att hundens IL-1Ra behåller stabiliteten relativt bra vid 4°C (i 30 dagar) respektive vid -20°C (i 90 dagar). Författarna till artikeln påpekar dock att det krävs studier som undersöker huruvida lagrad IL-1Ra behåller sin förmåga att binda in till IL-1R och blockera IL-1.

IL-1Ra ökade markant i IRAP II jämfört med förkontrollprovet. När IRAP II jämfördes med kontrollprovet sågs en trend att koncentrationen av IL-1Ra ökade mer i IRAP II systemet jämfört med kontrollen, men skillnaden inte var signifikant. Författarna lyfter fram att IRAP II-systemet möjligen ändrar sammansättningen av diverse andra cytokiner och tillväxtfaktorer, och konstaterar slutligen att koncentrationen mellan IL-1 och IL-1Ra sannolik är av större betydelse för huruvida ACS-system kan blockera IL-1 eller inte (Huggins et al., 2015).

### ***IRAP I (Orthokine®) och IRAP II (Arthrex)***

I en studie (Hraha, 2011) jämfördes proteinprofilerna för IRAP och IRAP II med avseende på IL-1Ra, IL-10, IGF-1, TGF- $\beta$  och IL-1 $\beta$ . Blod från 5 st friska hästar i åldrarna 2-5 samlades in och 4x60 ml IRAP respektive 4x50 ml IRAP II framställdes. Som kontroll samlades 2x10 ml blod i separata provrör.

Studien visade att IRAP II innehöll en signifikant högre halt av IL-1Ra än IRAP och kontrollprovet efter 24 timmar. Samtliga prov visade en ökad mängd IL-1Ra, men ingen signifikant skillnad kunde ses mellan IRAP och kontrollprovet. IL-10 var högre i samtliga prov, men ingen signifikant skillnad mellan ACS och kontrollprovet kunde ses efter 24 timmar. IGF-1 var signifikant högre i IRAP och IRAP II jämfört med kontrollen. För TGF- $\beta$  sågs ingen signifikant ökning för IRAP och IRAP II jämfört med kontrollen (Hraha et al., 2011).

## DISKUSSION

Osteoartrit är en progressiv och inflammatorisk sjukdom som kan leda till att hästen förlorar sitt användningsområde och tvingas avsluta sin karriär som tävlingshäst (Ferris et al., 2011). Sjukdomen är ett stort problem inom hästsporten och nya behandlingsmetoder behövs (Frisbie et al., 2002).

För att behandla OA finns idag ett antal farmakologiska läkemedel, men inga av dessa botar sjukdomen eller minskar dess progression. På senare tid har det skett en utveckling av biologiska och cellbaserade produkter (Bramlage, 2011), och dessa fokuserar mot förmågan att återfå normal homeostas i leden. IL-1 och TNF $\alpha$  är centrala cytokiner i den tidiga inflammationen, varför behandlingar som hämmar dessa har stor potential (Goldring, 2000).

Det exakta innehållet i ACS är ännu inte helt klarlagt, och kompositionen varierar från individ till individ (Textor, 2011). I en studie (Hraha et al., 2011) konstaterades att inkubering av ekvint helblod i 24 timmar signifikant ökar koncentrationen av IL-1Ra, IL-10, TGF- $\beta$  och IL-1 $\beta$  jämfört med 1-h kontrollprovet. IGF-1 var den enda tillväxtfaktorn som signifikant ökade i båda ACS proverna jämfört med helblodet. I studien konstaterades att IRAP II signifikant ökade koncentrationen av IL-1Ra jämfört med helblod, en ökning man inte kunde påvisa med IRAP. IRAP innehöll dessutom en signifikant högre koncentration av TNF- $\alpha$  jämfört med övriga prover. Resultatet från denna studie skiljer sig från Huggins (2015) där ingen signifikant ökning av IL-1Ra kunde visas i IRAP II från hundar. I en tredje studie (Meijer, 2003), rapporterades inte någon ökning av IL-1 $\beta$  eller TNF- $\alpha$  i ACS framställt från människor.

Inkubering av helblod i 24 timmar leder till en ökning av såväl proinflammatoriska som antiinflammatoriska cytokiner, oavsett om inkuberingen sker i närvaro av kromsulfatbehandlade glaskulor eller inte. Det faktum att olika studier kommer fram till olika resultat med avseende på innehållet i ACS visar på dess komplexitet och stora variation. Resultaten tyder på att ACS ökar koncentrationen av IL-1Ra och andra antiinflammatoriska cytokiner, vilket skulle kunna förklara dess verkningsmekanism. Det man dock måste ha i åtanke när man väljer ACS som behandlingsalternativ vid OA, är att den proinflammatoriska cytokinen IL-1 $\beta$  potentiellt ökar i koncentration. Av denna anledning kan förhållandet IL-1 $\beta$ /IL-1Ra i ACS vara av större betydelse än koncentrationen av enbart IL-1Ra. I Harahas studie (2011) konstaterades att IRAP II har en signifikant bättre kvot mellan IL-1 $\beta$ /IL-1Ra jämfört med IRAP och kontrollprovet. Utifrån studiernas resultat verkar IRAP II ge en bättre sammansättning av cytokiner för att framgångsrikt behandla OA, inte minst med anledning av att IRAP visade en signifikant ökning av TNF- $\alpha$ .

I dagsläget har få kliniska studier genomförts med ACS. Man vet relativt lite om dess betydelse och effekter som behandlingsmetod vid OA på häst. Bakomliggande mekanismer är ännu inte helt klarlagda, och produktens innehåll har visat stor variation. Studierna av Frisbie (2007) respektive Jostingmeier (2010) har lovande kliniska resultat där hästarna som behandlats med ACS visat en lägre grad av hälta (Frisbie et al., 2007) respektive kom tillbaka till arbete i högre grad (Jostingmeier et al., 2010) jämfört med kontrollgrupper. Det som bör beaktas med Jostingmeiers studie är dock att ingen randomisering eller blindning gjordes, vilket lämnar utrymme för subjektiva bedömningar.

Det mest intressanta med Frisbies studie 2007 var iakttagelsen att koncentrationen av IL-1Ra ökade med tiden för de hästar som behandlats med ACS, vilket skulle kunna innebära att ACS stimulerar den endogena syntesen av IL-1Ra (Frisbie et al., 2007). Teoretiskt skulle detta kunna innebära att ACS har förmågan att hämma inflammationen i en OA drabbad led på längre sikt.

I teorin bör ACS vara en effektiv produkt för behandling av OA på häst. Eftersom produkten framställs från individens eget blod är risken liten att kroppen reagerar negativt på behandlingen. En produkt som såväl hämmar inflammationen som stimulerar anabola processer i leden är optimal för att behandla denna typ av sjukdom. I praktiken är dock OA en komplex sjukdom som än idag inte är helt klarlagd. För att avgöra om ACS är en effektiv behandlingsmetod vid OA på häst krävs mer forskning om såväl sjukdomen som behandlingsformen. Kompositionen i ACS varierar från fall till fall, och i dagsläget kan man inte med säkerhet veta exakt vad det är man sprutar in i leden.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Arend, W.P., Malyak, M., Guthridge, C.J. & Gabay, C. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology. *Annual Review of Immunology*, 16, ss. 27-55.
- Arthrex *Arthrex ABPS (Autologous blood processing system)*. [http://www.arthrexvetsystems.com/int/mediacenter/ForPatientsOwner/upload/VLB2-0010-EN\\_E1\\_screen.pdf](http://www.arthrexvetsystems.com/int/mediacenter/ForPatientsOwner/upload/VLB2-0010-EN_E1_screen.pdf) [2016-03-18].
- Baltzer, A.W.A., Moser, C., Jansen, S.A. & Krauspe, R. (2009). Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(2), ss. 152-160.
- Bramlage, L.R. (2011). Introduction to joint therapy. I: Proceedings of the 57th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Antonio, Texas, USA, 18-22 November 2011. Lexington,: American Association of Equine Practitioners (AAEP).
- Carlson, E.R., Stewart, A.A., Carlson, K.L., Durgam, S.S. & Pondenis, H.C. (2013). Effects of serum and autologous conditioned serum on equine articular chondrocytes treated with interleukin-1 beta. *American Journal of Veterinary Research*, 74(5), ss. 700-705.
- Dinareello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), ss. 2095-2147.
- Ferris, D.J., Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W. & Kawcak, C.E. (2011). Current joint therapy usage in equine practice: A survey of veterinarians 2009. *Equine Veterinary Journal*, 43(5), ss. 530-535.
- Fortier, L.A., McCarrel, T.M., Sundman, E.A., Schnabel, L.V., Cole, B.J., Boswell, S. & Karas, V. (2011). Biologic therapy for joint disease platelet-rich plasma, interleukin-1 receptor antagonist protein/autologous condition serum, and bone marrow aspirate. I: *Proceedings of the 57th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Antonio, Texas, USA, 18-22 November 2011*. Lexington,: American Association of Equine Practitioners (AAEP).
- Frisbie, D.D. (2005). Future Directions in Treatment of Joint Disease in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 21(3), ss. 713-724.
- Frisbie, D.D., Ghivizzani, S.C., Robbins, P.D., Evans, C.H. & McIlwraith, C.W. (2002). Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Therapy*, 9(1), ss. 12-20.
- 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), ss. 290-296.
- Frizziero, A., Giannotti, E., Oliva, F., Masiero, S. & Maffulli, N. (2013). Autologous conditioned serum for the treatment of osteoarthritis and other possible applications in musculoskeletal disorders. *British Medical Bulletin*, 105(1), ss. 169-184.
- Goldring, M. (2000). Osteoarthritis and cartilage: The role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep*, 2(6), ss. 459-465.
- Goldring, M.B. & Goldring, S.R. (2007). Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3), ss. 626-634.
- Goodrich, L.R. & Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review. *Veterinary Journal*, 171(1), ss. 51-69.

- 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), ss. 516-521.
- Huggins, S.S., Suchodolski, J.S., Bearden, R.N., Steiner, J.M. & Saunders, W.B. (2015). Serum concentrations of canine interleukin-1 receptor antagonist protein in healthy dogs after incubation using an autologous serum processing system. *Research in Veterinary Science*, 101, ss. 28-33.
- Jostingmeier, U., Reinecke, J. & Hertsch, B. (2010). Comparison of intraarticular injection of autologous conditioned serum (ACS, irap) vs sodium hyaluronate and corticosteroid in front limb coffin joint derived lameness. I: *Proceedings of the 32nd Bain Fallon Memorial Lectures: Reproduction, surgery, critical care, lameness, Lovedale, New South Wales, Australia, 12-16 July 2010*. St Leonards, Australia: Equine Veterinarians Australia.
- König, H.E., Bragulla, H. & Polsterer, E. (2009). *Veterinary anatomy of domestic mammals*. 4th, rev. ed. uppl. Stuttgart : New York, NY ;: Stuttgart : New York, NY ; Schattauer.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C. & Weeren, R.v. (2015). *Joint Disease in the Horse*. 2nd edition uppl: Elsevier.
- Meijer, H., Reinecke, J., Becker, C., Tholen, G. & Wehling, P. (2003). The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. *Inflammation Research*, 52(10), ss. 404-407.
- Monteiro, S.O., Bettencourt, E.V. & Lepage, O.M. (2015). Biologic Strategies for Intra-articular Treatment and Cartilage Repair. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(3), ss. 175-190.
- Orthogen *Schematic illustration of the mode of action*. <http://www.orthogen.com/en/orthokin/method/> [2016-03-18].
- Skiöldebrand, E. (2004). Studies of articular cartilage macromolecules in the equine middle carpal joint, in joint pathology and training. Uppsala : Dept. of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish Univ. of Agricultural Sciences.
- 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), ss. 275-+.