



NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for sports- og familiedyr
Seksjon for hestesykdommer

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2019, 15 stp
Differensiering, hest

Differensiering. hest

'Biologisk' behandling av ledd og seneskader: Cytokinprofil i autologt kondisjonert serum og platerikt plasma hos hester med leddrelatert halthet

Biologic therapy for articular and tendon-related injuries: Cytokine profile in autologous conditioned serum and platelet-rich plasma in horses with joint related lameness

Mia Mehlum Henriksen, Anna Margreta Jacobsen,
Karoline Mosand Reitan
Kull 2013

Veileder: Cathrine T. Fjordbakk, Hesteklinikken

Innhold

Sammendrag	3
Definisjoner og forkortelser	5
Innledning	7
Osteoartritt/osteoartrose	7
Sene- og ligamentskader	14
Halhetsdiagnostikk	17
Behandling av osteoartritt/osteoartrose	19
Behandling av sene- og ligamentskader	21
AKS og PRP	22
Autologt kondisjonert serum	22
Platerikt plasma	25
Formål med studien:	29
Hypotese	30
Materiale og metoder	31
Hester inkludert i studien	31
Uttak av blod	32
Preparering av AKS, PRP og kontroller	33
Fremstilling av AKS	34
AKS-kontroll (KON)	35
Ustimulert serum (USTIM)	35
PRP	35
Behandling av hester intra-artikulært med AKS	36
Analyse av AKS, PRP og kontrollprøver	37
ELISA	37
Multiplex	38
Statistikk	38
Resultater	39
Hester og halhetsgrad	39
ELISA	39
TGF- β 1	40
IGF-1	41
IL-1Ra	42
Multiplex	43
Diskusjon	44
TGF- β 1	44
IGF-1	44
IL-1Ra	44
Konklusjon	48
Takk til bidragsytere	49
Summary	50
Referanser	52
Vedlegg	59

Sammendrag

Tittel: Biologisk behandling av ledd og seneskader: Cytokinprofil i autologt kondisjonert serum og platerikt plasma hos hester med leddrelatert halthet

Forfattere: Mia Mehlum Henriksen, Anna Margreta Jacobsen, Karoline Mosand Reitan

Veileder: Cathrine T. Fjordbakk, Institutt for sports- og familiedyrmedisin

Halthet er et vanlig helseproblem hos hester, og det er behov og interesse for effektive behandlingsmetoder for osteoartritt og sene- og ligamentlidelser. Vi har sett på 'biologiske' behandlingsalternativer fremstilt fra pasientens eget blod, hos en gruppe hester med en naturlig oppstått leddlidelse. Formålet var å se på faktisk innhold av cytokiner og vekstfaktorer i de framstilte produktene. I denne studien ble det tatt blod fra 20 hester med osteoartritt, alle sammen travere i alderen 2-7 år. Blodet ble preparert på 4 forskjellige måter: 1)'Ustimulert' blod ble sedimentert i vanlige vacutainerrør 1 time i romtemperatur før sentrifugering, deretter ble serum filtrert av; 2)'Autologt kondisjonert serum' (AKS) ble inkubert i kommersielle AKS-beholdere i 37°C i 24 timer før sentrifugering og filtrering av serum; 3)'Kontroll'-serum ble inkubert i vanlige vacutainerrør i 37°C i 24 timer før sentrifugering og filtrering av serum; og 4)'Platerikt plasma' (PRP) ble preparert direkte, uten inkubering, gjennom en sentrifugeringsprosess i en spesialsprøyte. Konsentrasjonen av IL-1Ra, IGF-1 og TGF- β i de forskjellige preparatene ble målt ved bruk av kommersielt tilgjengelige ELISA-kits, og det ble i tillegg satt opp en Multiplex-analyse for følgende analytter: IFN γ , IL1- α , IL1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), MCP-1, RANTES og TNF α . Resultatene viste at IL-1Ra var tilstede i ustimulert blod, samt at det ble oppformert i AKS. I denne studien skjedde ikke oppformeringen i like stor grad som vist i tidligere studier på friske hester. Kontrollprøvene oppnådde en signifikant høyere konsentrasjon av IL-1Ra, sammenlignet med ustimulert serum. Som tidligere vist, viste også vår studie at *de novo*

syntese av IL-1Ra skjer ved inkubering av fullblod, uavhengig om blodet inkuberes i vanlige vacutainerrør eller i spesiallagde AKS-system. I PRP var det en signifikant økning av TGF- β sammenlignet med ustimulert blod. Basalnivået av IGF-1 i ustimulert serum var høyere enn antatt hos friske hester, men det var ingen signifikant økning av IGF-1 i AKS eller PRP. Multiplex-analysen viste ikke-detekterbare nivåer for de fleste analyttene. Om dette skyldes analysefeil eller faktiske forhold i prøvene vites ikke.

Definisjoner og forkortelser

AAEP = American Association of Equine Practitioners

ACD = Acid Citrate Dextrose

AKS = Autologt kondisjonert serum

ABPS = Autologous Blood Processing System (Arthrex, Inc.)

ACPS = Autologous Conditioned Plasma System (Arthrex, Inc.)

BMA = Benmargsaspirat

CaCl₂ = Kalsiumklorid

COMP = Cartilage oligomeric matrix protein

CrSO₄ = Kromsulfat

ECM = ekstracellulært matrix

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

IFN- γ = Interferon gamma

IGF-1 = Insulin-like growth factor 1

IgG = Immunoglobulin G

IL-1 (α , β) = Interleukin-1 (alfa og beta)

IL-1Ra = Interleukin-1-reseptorantagonist

IL-4 = Interleukin-4

IL-6 = Interleukin-6

IL-8 = Interleukin-8

IL-10 = Interleukin-10

IL-12 p70 = Interleukin-12

KON = AKS-serumkontrollprøve, blod inkubert i vacutainerrør ved 37°C i 24 timer før serum ble pipettert av

MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1

MMP = Matrix metalloproteinaser

MMP-3 = Metalloproteinase-3

MMP-13 = Metalloproteinase-13

NSAIDs = Non-steroidal anti-inflammatory drugs

OA = Osteoartritt/osteoartrose

PBS-løsning = Phosphate buffered saline/saltløsning

PDGF = Platelet-derived growth factor

PPP = Platelet-poor plasma/ platefattig plasma

PRFM = Platerikt fibrinmatrix

PRP = Platelet-rich plasma/ platerikt plasma

RANTES = Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RT-PCR = Real-time polymerase chain reaction

SAA = Serum Amyloid A

TGF- β = Transforming growth factor beta

TNF α = Tumornekrosefaktor alfa

USTIM = Kontrollprøve med serum, pipettert av etter 1 time i romtemperatur i vacutainerrør

Innledning

Halthet kan defineres som bevegelsesforstyrrelser som gir avvik fra normal gange.

Bevegelsesforstyrrelser kan også utarte seg med diffuse symptomer som endret oppførsel eller nedsatt prestasjon. Halthet forårsakes av smerte og/eller mekaniske defekter som påvirker hestens bevegelsesmønster. Derfor representerer halthet et dyrevelferdsmessig problem, samtidig som det kan føre til nedsatt prestasjon og bruksverdi. I en britisk spørreundersøkelse som rapporterte helsetilstanden i en populasjon på 4730 hester (1), ble halthet som symptom rapportert hos 18,6% av hestene. I denne undersøkelsen var halthet det hyppigst forekommende helseproblemet, og 14,8% av halthetene var assosiert med degenerativ leddsykdom (1, 2). Da degenerativ leddsykdom er en utbredt lidelse, kreves det velfungerende behandlinger. Tradisjonell behandling av degenerativ leddsykdom dreier seg i hovedsak om symptomatisk, men ikke terapeutisk behandling. På grunn av dette utvikles det stadig nye behandlingsmetoder, og de siste årene har biologiske produkter utviklet fra pasientens eget blod blitt mer og mer populært, både i human- så vel som i veterinærmedisin. Autologt kondisjonert serum (AKS) og platerikt plasma (PRP) er to slike preparater som via forskjellige mekanismer kan fungere ved å dempe betennelse og fremme helingsprosesser.

Osteoartritt/osteoartrose

Halthet har som nevnt ofte tilknytning til ledd. Hester er fluktdyr fra naturens side, og for å ha muligheten til å forflytte seg raskt må hesten ha et funksjonelt bevegelsessystem.

Høybevegelige ledd, slik som koden og carpus, er mer utsatt for skader eller slitasje enn lavbevegelige ledd, slik som kronledd og glideleddene (3). Et ledd binder to knokler sammen, der det subkondrale beinvevet i enden av knokkelen, dekket av leddbrusk, utgjør selve

leddflaten. Leddbrusken er generelt cellefattig og kondrocyttene utgjør omtrent 1-12% av volumet (3). Kondrocyttene produserer ekstracellulær matriks (ECM) som hovedsakelig består av kollagen, proteoglykaner og vann. Leddbrusken er med på å skape en overflate som gjør at leddflatene kan bevege seg i forhold til hverandre med minimal friksjon (4).

Kollagenet har viktige mekaniske støtteegenskaper, spesielt på grunn av organiseringen i arkadestrukturer som strekker seg gjennom hele brusken og er forankret i det dypeste kalsifiserte laget. Proteoglykaner er større molekyler som ligger spredt mellom kollagenfibrillene, og de danner aggregater rundt hyaluronsyre (5). Proteoglykaner tiltrekker seg vann, og gir brusken en støtabsorberende egenskap (6). Selve leddhulen er kledd med en synovialmembran og er fylt med leddvæske. Synovialmembranen produserer hyaluronan, kollagen, lubricin, matrix metalloproteinaser, interleukiner og prostaglandiner til leddvæsken. Disse bidrar til de metabolske prosessene, som i et friskt ledd er i likevekt mellom det anabole og katabole (7). Leddvæsken tilfører smøring til leddet på grunn av innholdet av hyaluronan og lubricin. I tillegg sørger leddvæsken for næring og fjerning av avfallsstoffer, siden brusken selv mangler vaskularisering og lymfekar (8). Brusken mangler også nerver, lesjoner kun i brusken vil derfor ikke være smertefulle. Smerter relatert til leddlidelser kommer fra ikke-mieliniserte nervefibre som finnes i leddkapselen, synovialmembranen og subkondralt beinvev (9). Det er mange komponenter i et ledd som bidrar til normal funksjon, og patologi i leddet oppstår når det er dysfunksjon i en eller flere av disse komponentene.

Osteoartritt/osteoartrose (OA) er en progredierende degenerativ leddsykdom som fører til tap av leddbrusk, og etter hvert redusert bevegelighet, subkondral sklerose og påleiring av beinvev (10, 11). Osteoartritt/osteoartrose oppstår når brusken blir utsatt for slitasje eller en skade (12). Et traume på brusken påvirker synovialmembranen til å øke sekresjonen av cytokiner, proinflammatoriske mediatorer og det proteolytiske enzymet matrix

metalloproteinase (MMP). Disse komponentene kan bryte ned brusken, og fører leddet over i en katabol tilstand. Synovitt er derfor en viktig pådriver for videre utvikling av sykdom i leddet, og inflammasjonsfaktorer spiller en sentral rolle (13, 14, 15). Hvis dette ikke blir korrigert kan det medføre ytterligere nedbrytning av brusk og etterhvert skade på subkondralt beinvev. Denne prosessen vil i tillegg være selvforsterkende ved at bruskbestanddelene og debris fører til økt fagocytose og økt produksjon av cytokiner og betennelsesmediatorer (16). I et sykdomsforløp som beskrevet over foregår det altså inflammatoriske og degenerative prosesser samtidig. Disse prosessene kan også forsterke hverandre, og kulminere i en overveiende katabol tilstand som resulterer i tap av leddbrusk. Tap av brusk gir leddet nedsatt kompresjonsmotstand, nedsatt mekanisk styrke, økt friksjon og det vil være mer utsatt for slitasje. Leddvæsken vil også bli mindre viskøs på grunn av redusert hyaluronkonsentrasjon og dette vil føre til ytterligere økt friksjon i leddet (17).

Kliniske tegn på OA er leddfylning på grunn av synovial effusjon, nedsatt bevegelighet, tap av funksjon samt smerte som resulterer i halthet. Ved vedvarende OA kan man se røntgenforandringer som påleiringer med osteofytter, smal leddspalte, sklerose eller lysis av subkondralt vev, og i noen tilfeller osteokondrale fragmenter (9). Det kan imidlertid være dårlig samsvar mellom røntgenforandringene og de kliniske tegnene, spesielt tidlig i forløpet (9). En mer sensitiv diagnostisk modalitet kan da være artroskopi, der en via direkte visualisering av leddflaten kan avdekke tynn brusk, slitasje og i noen tilfeller eksponert beinvev. Graden av skade blir bestemt ut fra størrelsen på lesjonen og hvor dyp skaden er. Mulighet for heling og regenerering av normal funksjon vil også påvirkes av anatomisk lokalisering (18, 19).

Brusken selv har en begrenset evne til heling og reparasjon. En av årsakene til dette er det lave innholdet av kondrocytter i brusken og at disse cellene har begrenset evne til regenerasjon og mitotisk aktivitet (9, 12). I tillegg vil tapet av ECM i brusken være høyere enn kondrocyttenes produksjon av kollagen og proteoglykan. på grunn av lite effektiv økning i produksjonen av kollagen og proteoglykan (9, 12). Små og overfladiske lesjoner har en viss evne til heling og fører vanligvis ikke til videre degradering av brusken, leddet kan derfor få tilbake sin normale funksjon (20, 21). Større lesjoner som strekker seg gjennom hele brusken vil bli reparert med innvekst av fibrøst vev fra omkringliggende vev, som omdannes til fibrøs bruske (18, 22). Fibrøs bruske har ikke de samme biomekaniske egenskapene som frisk leddbrusk innehar. Leddbrusk har som tidligere nevnt en unik oppbygning med blant annet organiseringen av kollagenfibre i arkadestrukturer som bidrar til strukturell støtte. Fibrøs bruske har ikke den samme oppbygningen og har heller ikke samme tilheftning til det subkondrale beinvevet (18, 23). Normal belastning kan dermed føre til at lesjoner reparert med fibrøs bruske blir utsatt for videre skade og degenerasjon. Statistisk sett heler små lesjoner i et vekt bærende område bedre sammenlignet med større lesjoner og ikke-vekt bærende lesjoner (18).

Studier og analyser har forsøkt å kartlegge tilstanden i ledd ved degenerative leddsykdommer, men selve utviklingen fram til det degenerative stadiet vet man lite om. Årsaken til dette kan være at diagnosen i de fleste tilfeller ikke stilles før kroniske forandringer har oppstått. Det er vist gjennom immunhistokjemiske analyser at spesifikke cytokiner og vekstfaktorer har økt ekspresjon i leddbrusk med degenerative forandringer som samsvarer med OA (24). Det gir grunn til å tro at disse komponentene også har en vesentlig relevans i utvikling av lidelsen. De cytokiner og vekstfaktorer som er vist å ha en økt ekspresjon er blant annet IL-1, TNF α , IL-6,

IL-10, TGF- β og IGF-1 (24). Kort beskrivelse av deres funksjon og opphav og eventuelle økning i AKS og PRP er vist i tabell 1.

Inflamasjon er en prosess som starter med aktivering av makrofager som setter i gang en inflammasjonskaskade ved å produsere cytokinene IL-1 og TNF α . IL-1 produseres av makrofager, endotelceller og epitelceller, og særlig IL-1 β er sett på som en nøkkelkomponent ved inflammatoriske tilstander. Det er en viktig mediator for økt vaskulær permeabilitet, kjemotaksis og leukocytaktivering (25). IL-1 fungerer også på hypothalamus ved å indusere feber, og setter i gang syntese av akutfaseproteiner i leveren (26). TNF α produseres av makrofager og T-celler og har mange av de samme egenskapene som IL-1, men i tillegg setter den i gang katabole prosesser og apoptose. IL-1 er essensielt for aktivering av TNF α , som deretter fører til beinerosjon og osteoklastaktivitet i ledd (27). IL-6 er et annet proinflammatorisk cytokin som produseres av makrofager, endotelceller og T-celler. I likhet med IL-1 stimulerer det til syntese av akutfaseproteiner i leveren og induserer feber. Det har også effekt på B-celler og fører til proliferasjon av antistoffproduserende celler (26). IL-10 er et cytokin som demper inflammasjon. Det produseres av makrofager og dendritiske celler, og har som effekt å inhibere makrofagers proinflammatoriske funksjoner (28). TGF- β og IGF-1 er vekstfaktorer som er relevante ved remodellering av den skadede brusken. IGF-1 er et peptid som har en rolle i sårheling og keratinocyttnigrering, og stimulerer beinmatriks og stripet muskulatur. Det er sett en positiv effekt på heling av kollagent vev ved tilførsel av IGF-1 (29, 30). TGF- β har mange funksjoner som blant annet inkluderer regulering av cellemigrering, neovaskularisering og angiogenese (31). TGF- β har effekter på ECM ved å stimulere fibroblasters syntese av proteiner som for eksempel kollagen (32). Det er også sett økte konsentrasjoner av TGF- β i osteofytter (33). TGF- β har mange funksjoner, som

inkluderer regulering av celledifferensiering, neovaskularisering og angiogenese (31). TGF- β har effekter på ECM ved å stimulere fibroblasters syntese av proteiner som kollagen (32).

Tabell 1: Oversikt over utvalgte pro- og anti-inflammatoriske cytokiner og vekstfaktorer, deres funksjoner og opphav, samt økning (vist med \uparrow) i de biologiske preparatene AKS og PRP, sammenlignet med kontrollprøver.

	Funksjon	Opphav	AKS	PRP
Pro-inflammatoriske:				
IL-1β	Fremmer inflammasjon. Øker kollagensyntese, kondrocyttaktivitet, fibroblastaktivitet, benresorpsjon. Gjør vaskulære endotelceller adherente for nøytrofile granulocytter, stimulerer deres produksjon av kjemokiner og fremmer dermed kjemotaksis. Induserer feber. Fremmer produksjon av akutfaseproteiner. Fremmer katabolisme av muskelprotein (34).	Monocytter, makrofager, dendritiske celler, nøytrofile granulocytter	\uparrow (35)	\uparrow (36)
TNFα	Trigger frigjøring av kjemokiner og cytokiner fra nærliggende celler. Fremmer adhekanse, migrasjon, attraksjon og aktivering av leukocytter. Fremmer antigenpresentasjon og T-celleaktivering. Trigger endringer i vaskulære endotelceller, og gir kardinaltegn på inflammasjon; varme, hevelse, smerte og rødhet. (37)	Endotelceller, T-celler, B-celler, fibroblaster, nøytrofile granulocytter, mastceller	\uparrow (35)	\uparrow (36)

IL-6	Påvirker inflammasjon og adaptiv immunitet. Fremmer inflammasjonsrespons ved vevsskade. Regulerer overgang fra nøytrofil- til makrofagdominert inflammasjon. Fremmer differensiering av B-celler. Stimulerer akutfaserespons. Har antiinflammatorisk virkning ved å hemme IL-1, samt øke produksjon av IL-1Ra og IL-10. (38)	Makrofager, T-celler, mastceller, nøytrofile granulocytter	↑ (39)	↑ (36)
Anti-inflammatoriske:				
IL-1Ra	Hemmer aktiviteten til IL-1, ved å ha antagonistisk effekt på IL-1-reseptorer (40).	Nøytrofile granulocytter, makrofager, monocytter	↑ (35,41)	-
IGF-1	Fremmer celleproliferasjon (42).	Makrofager	↑ (35)	(↑) (43)
TGF-β	Fremmer celleproliferasjon og vekst. Stimulerer fibroblasters produksjon av ECM. Regulerer makrofagaktivitet. Reduserer T- og B-celle-proliferasjon, og fremmer apoptose av disse (44).	Blodplater, makrofager, nøytrofile granulocytter, B- og T-celler, dendritiske celler, fibroblaster.	↑ (35)	↑ (43)
IL-10	Hemmer medfødt og ervervet immunrespons. Hemmer produksjon av IL-1, IL-6 og TNFα. Stimulerer produksjon av IL-1Ra. Induserer apoptose av makrofager og mastceller i utvikling. Hemmer antigenpresentasjon (45).	Makrofager, dendritiske celler, T-celler, NK-celler, B-celler, mastceller, nøytrofile.	↑ (35)	↑ (36)

Sene- og ligamentskader

En annen viktig årsak til halthet hos hest er skader i sener og ligamenter. Disse skadene tar ofte lang tid å hele og faren for residiv er stor. Sener består av fast bindevev som fungerer som en forlengelse av muskelen og fester denne til skjelettet. Den overflatiske bøyesenen, dype bøyesenen og gaffelbåndet er spesielt utsatt siden de må bære mye vekt under normal bevegelse. Disse strukturene er lokalisert palmart og plantart på den distale delen av ekstremitetene (46). Gaffelbåndet ligger nærmest pipeknokkelen og har utspring rett nedenfor carpus på frambeinet og hasen på bakbeinet, og strekker seg ned til kodesenebeina.

Ligamentet deler seg i to forgreininger proksimalt for kodesenebeina, fester seg på hvert sitt kodesenebein og avgir en ekstensorgrein som tilhefter til strekkesenen dorsalt på kodebeinet. Hovedoppgaven til gaffelbåndet er å gi støtte til og hindre hyperekstensjon av kodeleddet.

Den dype bøyesenen ligger mellom gaffelbåndet og den overfladiske bøyesenen, og har som funksjon å bøye hovleddet. Den strekker seg fra *musculus flexor digitorum profundus*, over kode- og hovsenebeina og har tilhefting til solar-siden av hovbeinet. Den overfladiske bøyesenen strekker seg fra *musculus flexor digitorum superficialis* og over kodesenebeina, deretter deler den seg i to hvor den ene delen hefter til kodebeinet og den andre delen fester seg til kronbeinet. Hovedoppgaven til den overfladiske bøyesenen er å bøye kodeleddet (47).

Sener har stor strekkstyrke i fiberretningen og overfører kraft fra muskelen til knokkelen. De har også en viktig støttefunksjon. Sener er bygget opp av flere mindre enheter som er organisert i et parallelt mønster (48). Cellene i senen er spesialiserte fibroblaster og kalles tenocytter, som er ansvarlig for produksjon og vedlikehold av ECM. Tre ulike cellepopulasjoner er identifisert, men funksjonen til disse er ikke fullstendig kartlagt. Det er tydelig at celletypene har ulik metabolsk aktivitet, da celletypene har ulik lokalisasjon i senen, samt at deres komposisjon endres med hestens alder. Den viktigste komponenten i ECM er

kollagen type 1. Når en hest er i vekst og senene utvikles, vil kollagenmolekyler bli satt sammen til kollagenfibriller ved hjelp av Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP). Mengden COMP blir påvirket av hvor stor belastning senen utsettes for når hesten er i vekst, og det er sett en sammenheng mellom økt mengde COMP og senens strekkstyrke (49), (50). Kollagenfibriller går sammen i bunter med kryssbindinger mellom seg og danner kollagenfibre. Kollagenfibre er igjen organisert i bunter og danner større enheter, kalt fasikler. Disse har en bølgeform når senen er avslappet, noe som gjør at senen kan bli lengre ved belastning. Fasiklene blir både omgitt og bundet sammen av endotenon, et løst bindevev. Endotenon er viktig fordi det tillater at enhetene av kollagenfibre kan gli over hverandre når senen strekkes, i tillegg til at det inneholder blodkar og nerver (51, 52). Fasiklene går sammen til større bunter, som sammen utgjør senen. Senen er omgitt av et løst bindevev som kalles epitenon, og er deretter omgitt av enten en seneskjede eller et tykkere lag med bindevev kjent som paratenon (52). Paratenon eller seneskjeden er ansvarlig for den eksterne blodtilførselen til senevevet, i tillegg til muskelen senen går ut fra proksimalt og tilheftningen til skjelettet distalt (53). Ligamenter fungerer som et bindeledd mellom to knokler, de består også av fast bindevev og har lignende oppbygning som sener. Ligamenter har ikke like stor elastisitet som sener og bidrar i hovedsak til å styrke og støtte leddet samt hindre overbelastning (47).

Sener og ligamenter vil strekke seg under vektbæring, og hvor mye de kan strekke seg avhenger av de strukturelle egenskapene de innehar. Dette undersøkes ved å se på hvor mye en sene kan strekke seg i prosent i forhold til belastning (46). Ved lav belastning vil det være bølgeformen som strekkes ut, og når belastningen øker vil kollagenfibre flytte seg i forhold til hverandre slik at senen forlenges ytterligere. Sener og ligamenter har en maksimal tåleevne, og når denne overskrides kan det føre til skade. Først vil kryssbindingene mellom kollagenfibrillene rupturere, og hvis overbelastningen ikke opphører vil fibre i senen eller

ligamentet ryke og resultere i en alvorlig, irreversibel sene- eller ligamentskade (46, 54). I en studie som undersøkte den strukturelle egenskapen til den overfladiske bøyesenen hos Engelsk fullblods, ble det vist at ved normal belastning vil senen bli forlenget med opptil 7,6% i skritt, 10,1% i trav og 16,6% i galopp (55). Tester *ex vivo* har vist at bøyesenene kan bli forlenget med opptil 18,5% før ruptur skjer, men at strekkstyrken varierer i de ulike segmentene av senen (56, 57). Dette betyr at ved normal aktivitet fungerer bøyesenene i området for sin maksimale strekkstyrke, og det skal derfor lite til før en skade oppstår.

Skader på sener og ligamenter oppstår ved et akutt traume eller ved overbelastning. Den vanligste årsaken er overbelastning, og dette kan skje akutt eller ved gradvis degenerasjon på grunn av mikrotraumer (58). En skade vil føre til en intratendinøs blødning med påfølgende tendinitt. Symptomene vil være hevelse over det affiserte området, varme og smerte. Hesten vil som oftest være akutt halt, og dette er forbundet med inflammasjonsfasen som varer i 1 til 2 uker (59). Reparasjonsfasen overlapper med inflammasjonsfasen og varer i flere måneder. Denne fasen kjennetegnes av angiogenese og infiltrasjon og akkumulering av fibroblaster (59). Fibroblastene syntetiserer arrvev med økt mengde kollagen type 3, med små fibriller organisert i tilfeldige enheter (60, 61). En utfordring er at den eksterne blodtilførselen i midtre del av senen kan være opphørt ved skade på paratenon eller seneskjeden, og det vil kunne gi en dårligere helingsrespons i dette området (62). Remodeleringsfasen er også langvarig, og i denne fasen vil det bli et skifte fra kollagen type 3 til økt mengde kollagen type 1. Senefibrene vil i denne fasen organisere seg mer parallelt i belastningsretningen (63). Arrvevet vil på den måten oppnå bedre strukturelle og mekaniske egenskaper, men arrvevet vil aldri samsvare med friskt senevev.

Halhetsdiagnostikk

Rask og adekvat behandling kan være essensielt for å unngå forverring av skade eller utvikling av degenerative forandringer, og da er det viktig at veterinæren utfører en grundig undersøkelse for å stille rett diagnose. Normalt skal hester bevege seg med et balansert bevegelsesmønster. Årsaken til en halheth er ofte lokalisert til ett eller flere bein, men smerter i nakke, rygg, skuldre, hofter eller bekken kan også manifesteres som halheth. I noen tilfeller kan halheth være lokalisert til flere områder samtidig, dette gjør diagnostikken mer krevende. Ettersom den vanligste årsaken til halheth er smerte, er diagnostiske anestesier et nyttig hjelpemiddel for å finne riktig lokalisasjon (64).

For at veterinærbransjen skal kunne tilby diagnostikk og behandling av god kvalitet er det viktig med grundige, standardiserte undersøkelsesmetoder. The American Association of Equine Practitioners (AAEP) har utviklet retningslinjer for halhetsundersøkelse av hest, samt en skala for halhetsgradering som brukes verden over. En slik halhetsundersøkelse skal inneholde hestens tidligere sykdomshistorikk, visuell inspeksjon, grundig palpasjon, visitering av høver, mønstring i både skritt og trav og bøyepøver. The American Association of Equine Practitioners' graderingssystem er utviklet for å standardisere halhetsdiagnostikk og for å forenkle journalføring, oppfølging og kommunikasjon, både med eiere, trenere og mellom veterinærer. Halheth graderes fra 0-5, der 0 er ingen synlig halheth og 5 er den mest ekstreme, ikke-vektbærende halheth.

AAEPs skala:

0. Ingen synlig halheth under noen omstendigheter.

1. Halthet er vanskelig å observere og ikke konstant til stede. Kan være tilstede under spesielle omstendigheter, for eksempel kun på hardt underlag, ved longering eller under rytter.
2. Halthet er vanskelig å observere i skritt og trav på rett spor, men er konstant tilstede under spesielle omstendigheter, for eksempel på hardt underlag, ved longering eller under rytter.
3. Halthet er konstant tilstede i trav ved alle omstendigheter.
4. Halthet er tilstede i skritt.
5. Halthet forårsaker minimal vektbering og er synlig i bevegelse og/eller hvile. (65)

Subjektiv halthetsvurdering ble evaluert av Keegan *et al* (66). Resultatene viste at det å stille korrekt halthetsdiagnose er vanskelig, og at subjektiv evaluering kun er marginalt akseptabelt som en god metode. Da veterinærene i forsøket skulle gradere mellom halt og haltfri og avgjøre hvilket bein hesten var halt på, var de enige i 3 av 4 tilfeller på frambein og i 2 av 3 tilfeller på bakbein. Studien viste også at enigheten var større når veterinærene fikk utført en grundig halthetsutredning, sammenlignet med tidligere studier der de vurderte filmer av hester på tredemølle. Studien konkluderte med at det er behov for utvikling av en pålitelig og objektiv metode for å evaluere halthet hos hest (66).

Det finnes i dag ulike objektive hjelpemidler på markedet, og flere er under utvikling. Disse skal øke presisjonen ved halthetsdiagnostikk, og baserer seg på kinematisk og kinetisk analyse. Kinematikk beskriver bevegelse, uten å ta hensyn til kraft, mens kinetikk beskriver kraften som forårsaker bevegelse. Et per dags dato mye anvendt system, Equinosis Lameness Locator®, er brukt i denne studien. Dette er et sensorbasert kinematisk analysesystem som beregner hestens forflytning framover og måler asymmetri i bevegelsene mellom venstre og

høyre side av kroppen. En hest kan ha avvik i symmetri uten at det nødvendigvis skyldes smerte eller patologi. En asymmetrisk hest trenger med andre ord ikke å være halt. Et eksempel er dersom en hest er engstelig eller nysgjerrig og forflytter hodet for å holde oppsikt med noe. Slike avvik gjør at en objektiv halthetsanalyse ikke kan erstatte en subjektiv undersøkelse, men det kan likevel være et godt supplement (67).

Behandling av osteoartritt/osteoartrose

Målet med behandlingen av OA er å gi smertelindring, kontrollere og begrense den akutte inflammasjonen, hemme progresjon av forandringer og å bryte den selvforsterkende sirkelen av leddskade som er tilstede når leddet er i en katabol tilstand. Dette kan oppnås ved å endre hestens treningsprogram, treningsintensitet eller bruksområde, og ved bruk av systemiske og/eller intra-artikulære smertestillende og anti-inflammatoriske medikamenter. Tradisjonell medikamentell behandling er systemisk non-steroid antiinflammatory drugs (NSAIDs) og intra-artikulær kortison, disse benyttes for å dempe inflammasjon og hemme den katabole tilstanden i leddet. NSAIDs hemmer produksjonen av betennelsesmediatorer, blant annet prostaglandiner. Prostaglandin E₂ har en viktig rolle i opprettholdelse av inflammasjonen i et ledd med OA, og medvirker også til smerte og endret bruskmetabolisme (68). Ulempen med NSAIDs er at det også hemmer de prostaglandinene som er viktig for normal funksjon av nyrer og gastrointestinaltraktus, og kan føre til blant annet magesår (69). NSAIDs skal derfor ikke brukes over lengre tid, og har et begrenset bruksområde ved leddlidelser. Kortison er et kortikosteroid som er mye brukt som intra-artikulær injeksjon ved leddlidelser. Kortison er et effektivt virkemiddel for å redusere inflammasjon, og hemmer også prostaglandiner i tillegg til flere andre betennelsesmediatorer. Fordelen med lokalbehandling med kortison er at det kun hemmer de prostaglandinene som er involvert i betennelsesprosessen (70). Det er vist at

kortison er toksisk for friske bruskceller *in vitro* (71), men det er ikke bevist at denne toksiske effekten gjelder skadet eller inflammet brusk *in vivo*. Kortison bør derfor brukes etter en kost-nytte-vurdering (72, 73). Kortison skal også brukes i en begrenset mengde på grunn av risikoen for kortison-indusert laminitt (74, 75, 76). Denne risikoen er også omdiskutert da det ikke er bevist noen direkte assosiasjon, men siden dette er klinisk rapportert og en potensiell alvorlig bivirkning må det tas med i vurderingen. Intra-artikulær injeksjon med hyaluronsyre blir også benyttet, enten alene eller sammen med kortison. Hyaluronan finnes, som tidligere nevnt, naturlig i leddbrusk og leddvæske. Målet med bruk av hyaluronsyre er å gi leddvæsken viskositeten tilbake slik at leddet får redusert friksjon, i tillegg har hyaluronsyre en anti-inflammatorisk effekt (76, 77).

Tradisjonell behandling gir begrensninger på grunn av mulige bivirkninger, og det er ikke alltid en oppnår den ønskede effekten. Det er derfor et behov for nye eller supplerende behandlingsmetoder. Årelang forskning har gradvis bidratt til økt forståelse for patofysiologien i OA-prosessen, og hvilke mediatorer som bidrar til at det oppstår en sykdomsprosess i leddet. For enkelte mediatorer, slik som IL-1 β , finnes det en naturlig forekommende antagonist, IL-1-reseptorantagonist (IL-1Ra). Det er blant annet denne en ønsker å oppformere og dermed kunne dra nytte av i biologisk leddbehandling slik som AKS (78). Målet med denne type behandling er å hemme de sykdomsfremkallende mediatorene, slik at den katabole tilstanden i leddet opphører og en unngår videre degenerasjon av brusken. Biologisk leddbehandling kan både benyttes som primær behandling, eller hos hester som ikke responderer på tradisjonelle medikamenter som kortison. Fordelen med å bruke biologisk leddbehandling er at det er svært få kjente bivirkninger (79). Autologt kondisjonert serum og PRP er to aktuelle biologiske preparater. Den mest aktuelle biologiske behandlingen i ledd er AKS, da det foreløpig er lite studier om bruk av PRP i ledd.

Behandling av sene- og ligamentskader

Ved en sene- eller ligamentskade er det viktig med raskt innsettende behandling for å begrense omfanget av inflammasjon. Hensikten med inflammasjonsfasen er å fjerne nekrotisk senevev, men hvis den vedvarer vil frigjøring av proteolytiske enzymer også bryte ned intakt kollagen og skaden kan bli mer uttalt (60, 80). Standard behandling av seneskader i den akutte fasen er nedkjøling av affisert område, støttebandasje, hvile, anti-inflammatoriske legemidler og videre kontrollert mosjon. En plan for opptrening blir bestemt ut fra alvorlighetsgraden av skaden, og rehabiliteringsperioden kan ta opptil ett år. Kontrollert mosjon skal gjøre arrvevet i senen sterkere ved at det gradvis utsettes for økt belastning, og på den måten å bidra til remodellering av kollagen og forbedring av elastisiteten (81, 82). En annen viktig årsak til at kontrollert mosjon er svært viktig, er som tidligere nevnt at hesten raskt blir haltfri. Dette kan føre til at hesten selv ikke begrenser belastningen, og det er en fare for en forverring av skaden hvis eier ikke kontrollerer bevegelsesmulighetene til hesten.

I tillegg til å hemme inflammasjon og legge forholdene til rette for optimal heling, er målet med behandlingen at det dannes et så funksjonelt arrvev som mulig. Gjennom hele helingsprosessen er arrvevet svakere enn det omkringliggende senevevet, og det er derfor stor fare for en forverring av skaden eller at en ny seneskade oppstår. Etter at senen er avhelet vil arrvevet ha god mekanisk styrke, men vil ikke være like elastisk som normalt senevev (83). Dette vil føre til at det friske senevevet rundt arrvevet må strekke seg ytterligere for å kompensere. En ny skade oppstår derfor ofte i samme sene, nærliggende den tidligere skaden. Biologisk behandling i form av PRP er en aktuell behandling som kan fremme helingsprosessen og dannelse av et mer funksjonelt arrvev. En enkel behandling med PRP har

vist å øke styrken og elastisiteten til senevevet, i tillegg til en bedre organisering av kollagennettverket (84). Som tidligere nevnt er endringen til økt mengde kollagen type 1 i forhold til kollagen type 3 en viktig del av remodelleringsfasen, og det er vist at behandlinger som fremmer denne prosessen kan forbedre strekkstyrken til senevevet og reduserer risikoen for tilbakefall (61). Behandling med PRP sammen med de tradisjonelle behandlingene kan forhåpentligvis bedre prognosen til hesten som atlet og redusere risikoen for tilbakefall.

AKS og PRP

Autologt kondisjonert serum

Autologt kondisjonert serum er et produkt som prepareres fra pasientens eget blod, med det formål å oppkonsentrere innholdet av antiinflammatoriske mediatorer, og da særlig IL-1Ra. IL-1Ra ble tidlig beskrevet som en naturlig forekommende antagonist til IL-1 og produseres i hovedsak av monocytter, makrofager, nøytrofile granulocytter og dendritiske celler (se tabell 1). De samme cellene produserer også IL-1. Både IL-1 og IL-1Ra binder seg til samme IL-1-reseptor med lignende affinitet, men de har forskjellig effekt på reseptoren. Når IL-1 binder seg endrer reseptoren konformasjon, og binder seg til en co-reseptor som kreves for transduksjon av proinflammatoriske signaler. Når IL-1Ra binder seg til reseptoren skjer det ingen konformasjonsendring, noe som gjør at co-reseptoren ikke rekrutteres (85). For å hemme effekten av IL-1 er det sett at IL-1Ra må være tilstede i opptil 100 ganger høyere konsentrasjon enn IL-1 (86). Det er påvist økte serumnivåer av IL-1Ra hos mennesker med flere forskjellige patologier, blant annet kronisk polyartritt (87) og andre tilstander som ikke er knyttet til ledd.

På 90-tallet ble det oppdaget at produksjonen av IL-1Ra kunne oppkonsentreres *in vitro* ved å utsette fullblod for diverse stimuli (78). Først ble immunoglobulin G (IgG) brukt som stimuli, men senere fant en god effekt ved å inkubere blod i nærvær av CrSO₄-behandlede glasskuler (66). Ved å inkubere blodet ved kroppstemperatur i 24 timer induseres en *de novo*-syntese av blant annet IL-1Ra, men den totale sammensetningen av cytokiner og vekstfaktorer i AKS er ukjent. Det er vist at en inkubasjonsperiode på over 24 timer ikke fører til noen signifikant økning i konsentrasjonen av cytokiner og vekstfaktorer (41). Etter inkubasjonen filtreres serum, og det resulterende serumet, nå kalt AKS, injiseres lokalt ved betennelsesstedet.

Leukocytstimuleringen med resulterende *de novo*-syntese er ikke spesifikk for IL-1Ra. AKS har økt nivåer av vekstfaktorer som TGF- β , men også pro-inflammatoriske cytokiner som interleukin-1 (IL-1) og tumor nekrosefaktor alfa (TNF α) sammenlignet med serum fra blod inkubert ved 37°C i 1 time (35). Studier har vist at de anti-inflammatoriske komponentene oppkonsentreres i større grad enn de pro-inflammatoriske (79). Det er grunn til å tro at alle cytokiner og vekstfaktorer som finnes i AKS ikke er fullstendig kartlagt, og det er store individuelle variasjoner i nivået av de cytokinene og vekstfaktorene en hittil har kunnet måle. Videre antas det å være slik at et individ med høy AKS-konsentrasjon av IL-1Ra også har tilsvarende høy AKS-konsentrasjon av IL-1. Som tidligere nevnt, er det forholdet mellom de anti-inflammatoriske og de pro-inflammatoriske komponentene, og da særlig IL-1Ra:IL-1-ratioen, som sannsynligvis gir opphav til en eventuell terapeutisk effekt.

Leddbehandling med AKS ble brukt i en gruppe på 262 hester med OA som ikke responderte på tradisjonell behandling med kortikosteroider og hyaluronsyre, der 68% av hestene ble haltfrie etter 12 uker (88). I en annen studie ble 54 hester med kronisk halthet i hovleddet delt i to grupper, der gruppe 1 ble behandlet med hyaluronsyre og kortikosteroider og gruppe 2 ble

behandlet med AKS. I gruppe 1 var 17 av 27 hester haltfrie etter 26 uker, og suksessraten etter gjennomsnittlig 2,8 behandlinger var 63%. I gruppe 2 var 25 av 27 hester haltfrie etter 26 uker, og suksessraten etter gjennomsnittlig 3,3 behandlinger var 88,9%. Begge grupper viste altså bedring, men utfallet var signifikant bedre hos gruppen som ble behandlet med AKS (89). Disse er noen få av flere studier som viser at AKS begrenser inflammasjon og reduserer halthet. Det er likevel lite data som sier noe om effekten denne behandlingsformen har på tap av brusk.

Frisbie *et al* utførte en placebokontrollert studie med eksperimentelt induisert OA i carpus på 16 hester (90). Halvparten av hestene, placebogruppen, ble behandlet med fosfatbufret saltløsning (PBS-løsning) og de resterende ble behandlet med AKS intra-artikulært. Halthetsgrad, synovialvæske og histopatologiske undersøkelser av brusk og synovialmembran ble vurdert. Hestene som ble behandlet med AKS viste signifikant klinisk bedring og synovialvæsken hadde lavere konsentrasjon av IL-1. Disse hestene hadde også redusert hyperplasi og blødning i synovialmembranen i forhold til PBS-gruppen og mindre grad av bruskfibrillering. Denne studien konkluderte med at behandling med AKS resulterte i både klinisk og histologisk bedring i de OA-induserte leddene sammenlignet med placebogruppen (90). Det er likevel viktig å ta hensyn til at en induisert OA kan ha en annen patofysiologi enn naturlig forekommende forandringer i ledd.

Nivåene av IL-1Ra, IL-1 β og IGF-1 i blod fra en gruppe hester med naturlig forekommende OA ble sammenlignet med en frisk kontrollgruppe. Det ble ikke sett noen signifikant forskjell i nivåene av IL-1Ra og IL-1 i AKS sammenlignet med kontrollprøver fra samme hest etter 24 timer inkubasjon (41). Det ble derimot sett en økning av begge komponentene i basalprøvene fra OA-hestene. Denne studien hadde en liten studiepopulasjon (6 OA-hester og 7

kontrollhester), og prøvene fra OA-hestene ble alle tatt 2 til 4 dager etter at de hadde gjennomgått kirurgi (41). I en annen studie ble innholdet i AKS-prøver tatt før og etter elektiv kirurgi undersøkt (91). Det ble konkludert med at stress i forbindelse med kirurgi hadde negativ innflytelse på innholdet av cytokiner og vekstfaktorer i AKS, og det kan antas at det er en mulig assosiasjon med et økt SAA-nivå (91). Dette er verdt å ta med seg dersom AKS skal brukes som behandling i tillegg til kirurgi.

Gjennom erfaring ved klinisk bruk er det konkludert med at AKS er trygt (92). Det har lite bivirkninger og har ikke gitt noen allergiske reaksjoner. Likevel er det alltid en risiko forbundet med intra-artikulære injeksjoner, først og fremst ved introduksjon av bakterier og påfølgende infeksjon. Det er også sett kortvarig smerte og hevelse etter injeksjoner (93).

Platerikt plasma

Platerikt plasma er et annet produkt fremstilt fra pasientens eget blod og har en konsentrasjon av blodplater som er høyere enn i fullblod. Normalt blod inneholder fra 150 000/ μ l til 350 000/ μ l med blodplater. PRP har en konsentrasjon på $> 1\,000\,000/\mu$ l. Den økte konsentrasjonen av blodplater, og dermed også cytokiner og vekstfaktorer, skal initiere en helingsprosess og øke rekruttering, proliferasjon og differensiering av celler nødvendige for heling. Så tidlig som på 1970-tallet ble det vist interesse rundt bruken av PRP ved sår og skader i bevegelsessystemet. Sammenlignet med vanlig plasma inneholder PRP en høyere konsentrasjon av cytokiner og vekstfaktorer som IGF-1 og TGF- β med flere. Likevel er det få gode kontrollerte studier som har undersøkt effekten av PRP hos hest, og de studiene som finnes har vist varierende resultat.

Hos mennesker er det gjort en rekke studier på bruken av PRP i forbindelse med akutte og kroniske skader i sener og ligamenter, samt bruk intra-artikulært. Ved intra-artikulær injeksjon med PRP hos 16 personer med osteokondroselesjoner i ankelen, ble det rapportert mindre smerte og bedre funksjon hos disse enn i en kontrollgruppe som ble behandlet med hyaluronsyre (94). Hos kanin ble syntesen av glykosaminoglykan (GAG) i kondrocytter økt *in vitro* ved stimulering med PRP. *In vivo* ble det vist økt mRNA-uttrykk av proteoglykan etter injeksjon med PRP i kneleddet. Histologisk var progresjonen av OA og destruksjon av leddbrusken i PRP-behandlede kaniner mindre ekstensiv enn i kontrollgruppen (95).

Hos hester er det gjort studier på bruken av PRP intra-artikulært (96), ved tendinopatier (97). og ved stimulering av sårheling (98). Det er vist at konsentrasjonen av blodplater økte signifikant i ledd hos 7 friske hester etter injeksjon med PRP sammenlignet med en placeboinjeksjon i et annet ledd hos samme hest (96). Blodplater kunne observeres i synovialvæsken inntil 5 dager etter den intra-artikulære injeksjonen. Det ble også sett en økning av hvite blodceller, blant annet en høyere prosentandel av nøytrofile granulocytter, i leddet (96).

I en klinisk kontrollert studie av hester med tendinitt, resulterte intralesjonal PRP-injeksjon i den overfladiske bøyesenen i raskere reduksjon av halthet og tidligere organisering av fibriller, sammenlignet med en kontrollgruppe behandlet med 0,9% steril natriumklorid. 60% av de PRP-behandlede hestene nådde sitt tidligere prestasjonsnivå etter 24 måneder, mot 50% i kontrollgruppen (97). I en annen studie evaluerte man effekten av PRP på senevev *in vitro*. Senevev fra den overfladiske bøyesenen ble høstet fra 6 hester i alderen 2-4 år. Vevsbitene ble kuttet opp og dyrket i 5 forskjellige autologe medium: blod, plasma, PRP, platefattig plasma (PPP), og benmargaspirat (BMA). Real time-PCR ble brukt for kvantitativ genekspressjon av

kollagen type 1, kollagen type 3, COMP, MMP-3 og MMP-13, og IGF-1, TGF- β og PDGF ble analysert ved ELISA. Senevevet dyrket i PRP viste signifikant økning av COMP, kollagen type 1 og 3, sammenlignet med vev dyrket i plasma. TGF- β og PDGF var også høyere i PRP sammenlignet med de andre mediene. Det ble ikke stimulert uttrykk av MMP-3 og MMP-13 (43). PRP førte altså til en økning av vekstfaktorer som fremmer helingsprosessen i senen uten å øke uttrykk av katabole mediatorer. Hos mennesker er det derimot gjort en studie med behandling av tendinopati med PRP hvor én gruppe fikk injisert PRP intratendinøst, og én gruppe fikk placeboinjeksjon med isotont saltvann. Her ble det ikke påvist signifikante forskjeller i smerte eller aktivitetsnivå mellom de to gruppene etter 24 uker (99).

Det er også gjort studier ved bruk av PRP ved sårheling hos hest. Ved eksperimentelt induerte sår på pipa, resulterte PRP-behandling topikalt i såret i en sekundær sårhelingsprosess av dårligere kvalitet enn i kontrollgruppen som kun ble bandasjert. Det var et økt uttrykk av TGF- β 1 i de PRP-behandlede sårene, men også uheldig utvikling av granulasjonsvev og sårhelingen var forsinket sammenlignet med kontrollene (98). En annen studie undersøkte effekten av subkutan PRP-injeksjon i forbindelse med kirurgiske sår som ble sydd. De PRP-behandlede sårene viste histologisk en raskere epiteldifferensiering og økt organisering av dermalt kollagen sammenlignet med sår som kun ble sydd, men ikke fikk PRP-injeksjon (100).

Det er med andre ord mange motstridende resultater ved bruk av PRP og det er fortsatt ikke kartlagt med sikkerhet hvilken effekt preparatet har. På grunn av dette vet man derfor ikke ved hvilke tilstander PRP vil ha best effekt. Det er likevel et produkt som er mye benyttet i hestemedisin, og er ansett som trygt i forhold til bivirkninger.

Som tidligere nevnt er PRP en platerik plasmafraksjon som fremstilles fra pasientens eget blod. Fullblod tas fra en perifer vene, og antikoagulant (vanligvis ACD, acid citrate dextrose) tilsettes om preparatet ikke skal brukes umiddelbart. Blodet sentrifugeres for å separere plasma fra de røde og hvite blodcellene, og avhengig av prepareringssystemet kreves i noen tilfeller en ny sentrifugering for å konsentrere blodplatene og skille PRP fra PPP. For at blodplatene i preparatet skal frigjøre vekstfaktorer må de aggregere og aktiveres. Dette kan gjøres på flere måter, hvorav én er å tilsette bovin trombin. Ved denne tilsetningen er det alltid en risiko for at pasienten kan reagere på bovin trombin, noe som kan resultere i en immunmediert koagulopati (101). En annen mulighet for plateaktivering er å tilsette kalsiumklorid (CaCl_2), noe som danner platerik fibrinmatrix (PRFM). CaCl_2 initierer dannelsen av autogent trombin fra protrombin (102). En tredje metode for plateaktivering er å bruke type 1-kollagen, som aktiverer platene like effektivt som trombin (103). Videre studier kreves for å avgjøre hvilken metode som fungerer best for plateaktivering (104). Etter aktivering kan PRP-preparatet deretter injiseres direkte på ønsket sted, for eksempel intrasynovialt, peri- eller intratendinøst.

Alle komponentene i PRP er per i dag ikke fullstendig kartlagt. Funksjonen til de viktigste vekstfaktorene er utdypet i tabell 1. Det er syntesen og frigjøringen av disse faktorene med anabole effekter som er antatt å være grunnlaget til PRPs funksjon. Det er vist at fibroblastkulturer fra blant annet sene og synovium viser økt proliferasjon i respons på stimulering med blodplater (105). Ønsket er at helingsprosessen skal skje raskere og med bedre kvalitet og mindre fibrotisk vev. Hvite blodceller i preparatet kan også stimulere immunresponsen og fremme kjemotaksis, proliferasjon og differensiering av celler. I tillegg utgjør leukocytter et forsvar mot infeksjon. Det er likevel mistenkt at en høy andel leukocytter i forhold til blodplater vil kunne forskyve prosessen i en inflammatorisk/katabol retning, og det er antydning at et suksessfullt PRP-preparat bør ha en lav konsentrasjon av leukocytter i

forhold til blodplater (106). Det finnes PRP-preparater med både høy og lav konsentrasjon av hvite blodceller og bruken av disse må vurderes i hvert tilfelle.

Formål med studien:

Det er behov for trygge og effektive behandlinger av OA og sene- og ligamentskader. I denne studien var formålet å se nærmere på to aktuelle autologe preparater; AKS og PRP, og å lære mer om disse. Ved bruk av disse behandlingsmetodene er målet å forhindre mer ødeleggelse av vev og å bremse eller helst stoppe betennelsesreaksjonen (anti-katabol effekt) på skadestedet, men det finnes lite evidensbasert dokumentasjon på denne effekten. I denne studien har vi målt konsentrasjonen av pro- og anti-inflammatoriske komponenter i fire forskjellige prepareringsmetoder av fullblod tatt fra hester med naturlig forekommende leddrelatert halthet. Konsentrasjonen av IL-1Ra, IGF-1 og TGF- β ble målt ved bruk av ELISA. Konsentrasjonen av IFN γ , IL1- α , IL1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), MCP-1, RANTES og TNF- α ble analysert ved bruk av en Multiplex-analyse. De fire forskjellige preparatene var følgende: 1) Ustimulert serum, 'USTIM'; 2) Autologt kondisjonert serum, 'AKS'; 3) AKS-kontroll, 'KON' og 4) Platerikt plasma, PRP, preparert som beskrevet i tabell 2.

Tabell 2:

Fremstilling av de fire autologe preparatene brukt i denne studien. USTIM = ustimulert serum. AKS = autologt kondisjonert serum. KON = AKS-kontroll. PRP = platerikt plasma. *ABPS = autologous blood processing system. **ACP = autologous conditioned plasma.

	Preparering
USTIM	Kontrollprøve med serum. Blodet ble tatt ut i vanlige røde vacutainerrør. Stod 1 time i romtemperatur før sentrifugering. Serum ble deretter pipettert av.
AKS	Fremstilt ved bruk av IRAP II ABPS* fra Arthrex, Inc. etter produsentens retningslinjer.
KON	Fremstilt fra blod tatt ut i vanlige røde vacutainerrør. Inkubert ved 37°C i 24 timer. Deretter ble blodet sentrifugert før serum ble pipettert av.
PRP	Fremstilt ved bruk av ACP** Double-Syringe System fra Arthrex, Inc. etter produsentens retningslinjer.

Hypotese

Hypotesen var at inkubering av fullblod i kommersielt tilgjengelige AKS-beholdere ville resultere i en signifikant økning i konsentrasjonen av IL-1Ra sammenlignet med blod som ikke ble inkubert. Ut ifra tidligere studier forventet vi også en tilsvarende økning av IL-1Ra i blod inkubert i vanlige vacutainerrør (det vil si ikke i spesialiserte AKS-beholdere).

Sammenlignet med tidligere lignende studier gjort på friske hester forventet vi også at hestene i denne studien ville ha en høyere basalkonsentrasjon av både IL-1 og IL-1Ra, fordi man kan forvente en høyere konsentrasjon av IL-1 hos hester med en pågående OA. Det var forventet et høyere innhold av vekstfaktorer i PRP sammenlignet med øvrige prepareringsmetoder.

Materiale og metoder

Hester inkludert i studien

Hester med en antatt leddhalthet ble rekruttert til studien via annonsering i Trav- og Galoppnytt. Hester ble inkludert dersom de oppfylte følgende kriterier: være av traverrase (både varmbloodstravere og kaldbloodstravere ble akseptert); i aldersgruppen 2 – 7 år; være systemisk friske basert på klinisk undersøkelse, hematologi og serum amyloid A (SAA); og ha et halthetsproblem lokalisert til ledd som detaljert under. Følgende eksklusjonskriterier ble satt; hesten kunne ikke ha vært leddbehandlet de foregående 3 måneder, og kunne heller ikke få andre behandlinger eller operasjoner i løpet av studieperioden som varte i ca. 8 uker.

Hestene gikk igjennom en rutinemessig subjektiv halthetsundersøkelse med detaljert inspeksjon og palpasjon av rygg og ekstremiteter, samt mønstring på rett linje, hardt underlag, og standardiserte bøyeprov (1 minutt bøyning for tåledd, samt proksimal bøyning på frambein; 1,5 minutt for proksimal bøyning på bakbein). Halthet ble vurdert etter AAEPs skala fra 0-5. I tillegg ble hestene undersøkt objektivt ved bruk av et kommersielt tilgjengelig sensorbasert kinematisk analysesystem (Equinosis Lameness Locator®). For dette objektive systemet ble sensorene plassert på nakken, manken, krysset og dorsalt på kronbeinet på høyre frambein. Sensorene er små og lette, og skal ikke forstyrre hestens naturlige bevegelser. Sensoren som festes på hodet måler differansen mellom hodets høyeste og laveste punkt gjennom stegsyklusen. Sensoren på høyre frambein sørger for at systemet alltid vet hvilket bein som er i bakken. Sensoren på bekkenet måler differansen mellom bekkenets høyeste og laveste punkt på høyre og venstre side. Det er viktig at sensorene på hodet og bekkenet er festet i midtlinjen. Avvikene måles i millimeter og deles opp i «impact» og «pushoff», og angir om asymmetrien er størst i stegfasens belastningsdel eller ved fraspark. Produsenten rapporterer

normal variasjon hos en uhalt hest til å være opptil ± 6 mm assymetri for frambein og ± 3 mm assymetri for bakbein. Lameness locator ble i dette studiet brukt som et supplement for å kvalitetssikre den subjektive halthetsvurderingen, og vil her ikke vektlegges i større grad. Diagnostiske anestesier ble brukt for å lokalisere haltheten nærmere, og halthet ble definert som lokalisert til ledd ved minst 50% forbedring i subjektiv og objektiv halthet etter anestesi av det aktuelle leddet (vurdert 10 og 30 minutter etter injeksjonen).

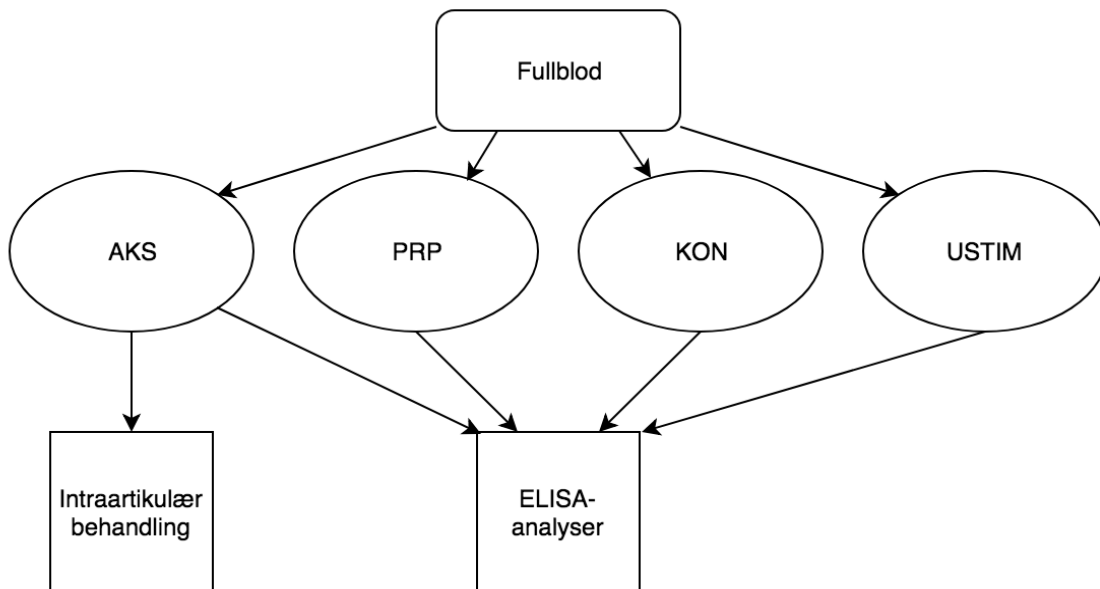
Osteoartitt/osteoartrose er en smertefull tilstand som gir halthet. Det er mange måter å definere OA på, og i denne studien ble det valgt å definere det som en sykdom som angår leddbrusk og er karakterisert av degenerasjon og tap av leddbrusk. Inflammasjonsfaktorer spiller en viktig rolle for utvikling av OA. Kriteriet for å sette diagnosen var en halthet hvor det ble observert minst 50% bedring av utgangshalthet eller bøyeutslag som følge av diagnostisk leddanestesi. For å kunne stille helt korrekt diagnose er det nødvendig med mer sensitive undersøkelsesmetoder som artroskopi eller avansert billeddiagnostikk, for eksempel computertomografi (CT). Dette ble ikke utført på hestene og er derfor en usikkerhetsfaktor som må tas i betraktning. Skade på nært omliggende strukturer eller intra-artikulære ligamenter ville også kunne gi halthet som responderer på bruk av leddanestesi, uten at det nødvendigvis er OA.

Uttak av blod

Fullblod ble tatt ut aseptisk fra en jugularvene med en butterfly-kanyle. Blodet ble videre preparert som beskrevet nærmere under.

Preparering av AKS, PRP og kontroller

Det ble fremstilt fire blodpreparater fra hver pasient. Dette inkluderte AKS, PRP, AKS-kontroll og ustimulert serum. Cytokiner og vekstfaktorer ble undersøkt i alle de fire prepareringsmetodene, men kun AKS ble brukt klinisk til intra-artikulær behandling av de inkluderte hestene.



Figur 1: oversikt over fremstilte blodpreparater og deres benyttelse.

Fremstilling av AKS

Et kommersielt tilgjengelig system (Autologous blood processing system; ABPS; Arthrex, Inc.) ble benyttet for å fremstille AKS. Produsentens retningslinjer for fremstilling ble fulgt. Blod ble tatt ut fra hestens jugularvene. Innstikksstedet og et lite område rundt ble klippet og vasket sterilt. Blodet ble tatt ut med butterfly-kanyle og en 60 ml-sprøyte etter steril metode (figur 2).



Figur 2: Uttak av blod fra jugularvene (Arthrex Inc.).



Figur 3: Beholder med glasskuler for fremstilling av AKS (Arthrex Inc.).

Blodet ble deretter overført til en beholder med glasskuler innsatt med kromsulfat (figur 3) for leukocytstimulering. Den røde korken ble åpnet, og beholderen ble holdt ved 60 graders vinkel mens blodet ble sprøytet inn. Beholderen ble vendt 10 ganger og deretter inkubert i vertikal posisjon ved 37°C i 24 timer. Etter inkubasjonen ble beholderen tatt ut av varmeskapet og plassert vertikalt i 20 minutter. Deretter ble den sentrifugert i 10 minutter ved 4000 rpm (omdreininger per minutt). Deler av preparatet ble benyttet til intra-artikulær behandling av pasienten etter filtrering gjennom et 0,22 μ g Sterifix-filter. Det øvrige volumet ble benyttet til biokjemiske analyser, og fordelt i cryorør med en 16G steril kanyle, og oppbevart ved -80°C frem til analysene ble foretatt.

AKS-kontroll (KON)

Kontroller til AKS ble laget ved å fylle 3 røde vacutainerglass (type Vacuette Serum, nr 454204, figur 4) på 10 ml til maks-merket. Disse ble vendt 10 ganger, og deretter inkubert ved 37°C i 24 timer. Serumet ble pipettert ut av vacutainerglassene med en 16G steril kanyle, og fordelt i cryorør og oppbevart ved -80°C inntil analysering. Kontrollprøvene hadde altså samme inkubering som AKS-preparatene, men ble oppbevart i vacutainerglass og ikke i en spesialbeholder.



Figur 4: Vacutainer benyttet til fremstilling av KON og USTIM (Greiner Bio-One).

Ustimulert serum (USTIM)

Ett rødt 10ml vacutainerglass (type Vacuette Serum, nr 454204, figur 4) ble fylt til maks-merket og plassert i romtemperatur for sedimentering i maks 1 time. Det ble deretter sentrifugert før serumet ble pipettert av med en steril 16G-kanyle, og overført til cryorør og oppbevart ved -80°C inntil analysering.

PRP

Autologous Conditioned Plasma System (ACPS; Arthrex, Inc.) ble benyttet for å fremstille PRP. Prepareringen skjedde etter produsentens retningslinjer. Systemet har en dobbelsprøyte, som består av en indre og ytre sprøyte. Disse ble satt sammen ved å vri den indre sprøyten med klokken. De to sprøytestemplene ble presset ned til stoppkanten. Den ytre ACP-sprøyten ble fylt med blod etter steril metode gjennom den røde korken, før denne korken ble lukket

igjen. Sprøyten ble deretter sentrifugert i 5 minutter ved 1500 rpm. Sprøyten ble holdt vertikalt da den ble tatt ut av sentrifugen. PRP-fraksjonen ble overført til den indre sprøyten ved å trykke det røde stempelet sakte ned samtidig som det øvre stempelet ble trukket opp (figur 6). Den indre sprøyten ble deretter skrudd løs (figur 7), og det ferdige PRP-preparatet ble fordelt i cryorør med en 16G steril kanyle, og lagret ved -80°C frem til analysering.



Figur 5: Uttak av blod i ACP-sprøyte (Arthrex Inc.).



Figur 6: Overføring av PRP-fraksjon fra ytre til indre sprøyte (Arthrex Inc.).



Figur 7: Den indre sprøyten med PRP-fraksjonen tas av (Arthrex Inc.).

Behandling av hester intra-artikulært med AKS

Hestene ble oppstallet over natten etter uttak av blod og for preparering av AKS.

Etterfølgende dag ble de behandlet intra-artikulært med AKS. De ble deretter behandlet to etterfølgende ganger med ca. 14 dagers mellomrom, slik at de totalt ble behandlet intra-artikulært tre ganger. Hestene ble halthetskontrollert ved eller 2 uker etter tredje gangs behandling, samt etter ca. 6 måneder. Disse dataene ligger imidlertid utenfor denne oppgaven, og vil dermed ikke bli omtalt nærmere.

Analyse av AKS, PRP og kontrollprøver

ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) er en biokjemisk analysemetode hvor man bruker en enzymatisk reaksjon for å detektere konsentrasjonen av en komponent i en prøve. De enzymatiske reaksjonene gir en fargeendring avhengig av prøvens konsentrasjon av den undersøkte komponenten. ELISA-platen leses av fotometrisk. Prøvenes konsentrasjon regnes deretter ut etter en standardkurve for fotometrisk verdi og konsentrasjon for det aktuelle brettet.

De fire preparatene, AKS, PRP, KON og USTIM, fra hver pasient ble satt opp i ELISA-systemer for å undersøke konsentrasjonen av IGF-1, TGF- β og IL-1Ra. Følgende kit (R&D systems) ble benyttet:

- ELISA: Equine DuoSet IL-1Ra
- ELISA: Human IGF-1
- ELISA: Human TGF- β 1

De to humanspesifikke ELISA-ene har bekreftet kryssreaktivitet med TGF- β 1 (107) og IGF-1 (108) hos hest. Produsentens retningslinjer ble fulgt ved analysering. Prøvene ble tint opp i romtemperatur rett før analysering og ble så oppbevart på is. Ved første oppsett av ELISA-ene var det problemer med koagler i PRP-prøvene. Oppsettet ble derfor gjort på nytt, med en forbehandling av PRP-prøvene. Denne forbehandlingen innebar at alle PRP-prøvene ble overført til 1,5 ml eppendorfrør før de ble sonikert i ultralydvannbad i 10 sekunder. Deretter ble 10 μ l med CaCl₂ med 230Mm styrke tilsatt 90 μ l prøvemateriale. Dette ble inkubert ved 37°C i 30 minutter. Sonikeringen i ultralydbad ble så gjentatt i 10 sekunder, før prøven ble

sentrifugert ved 21 000g i 5 minutter. Supernatanten ble pipettert av og benyttet i ELISA-oppsettet. Forbehandlingen ble kun benyttet for PRP-prøvene.

Multiplex

Det ble satt opp en Multiplex-analyse (Merck Millipore) for å undersøke ble konsentrasjonen av følgende cytokiner og kjemokiner: IFN γ , IL1- α , IL1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), MCP-1, RANTES og TNF- α . Produsentens retningslinjer for fremstilling ble fulgt, disse er vedlagt. Multiplex er et biokjemisk analyseoppsett hvor man analyserer immunologiske komponenter på overflaten av fluorescent-kodete magnetiske glasskuler. Resultatet kvantifiseres basert på et fluorescerende signal.

Statistikk

Et kommersielt tilgjengelig statistikkprogram (JMP Pro 14, SAS Institute Inc) ble brukt til å regne ut gjennomsnitt og 95% konfidensintervall for alle ELISA-resultater og alle prepareringsmetoder.

Resultater

Hester og halthetsgrad

Det ble totalt inkludert 20 hester som oppfylte inklusjonskriteriene. Hestene og halthetsgrad ved mønstring og bøyning ved prosjektstart er listet under (tabell 3).

Tabell 3: halthetsgrad hos hestene (nummerert 1-20) inkludert i studien, affiserte bein og ledd. VF = venstre frambein, HF = høyre frambein, VB = venstre bakbein, HB = høyre bakbein.

Hest nr.	Halthetsgrad Mønstring	Halthetsgrad Bøyning	Affisert bein	Affisert ledd
1	0	1	HF	Carpalledd
2	1	2	VF	Carpalledd
3	2	4	VF	Carpalledd
4	1	2	HF	Kodeledd
5	1	2	VF	Carpalledd
6	0	2	VF + HF	Kodeledd, hovledd
7	1	2	VF	Carpalledd
8	1	1	VF	Carpalledd, kodeledd
9	1	1	VF + VB	Carpalledd, tibiotarsalledd
10	1	1	VF + HF	Kodeledd
11	1	1	VF + HF	Hovledd
12	1	2	VF + HF	Kodeledd
13	1	1	HF + HB	Kodeledd, femoropatellarledd, femorotibialledd
14	1	1	HF + HB	Kodeledd
15	1	3	VF + HF	Kodeledd
16	1	1	VB	Tibiotarsalledd
17	0	2	HB	Kodeledd
18	2	3	VF	Kodeledd
19	1	1	HB	Tibiotarsalledd
20	1	2	VF	Hovledd

ELISA

Ved første runde med ELISA-analyser var det betydelige koagler i PRP-prøvene, noe som antas å ha innvirkning på konsentrasjonen av cytokiner i materialet som ble pipettert ut.

Analysene ble derfor kjørt på nytt, og PRP-prøvene ble forbehandlet med kalsiumklorid.

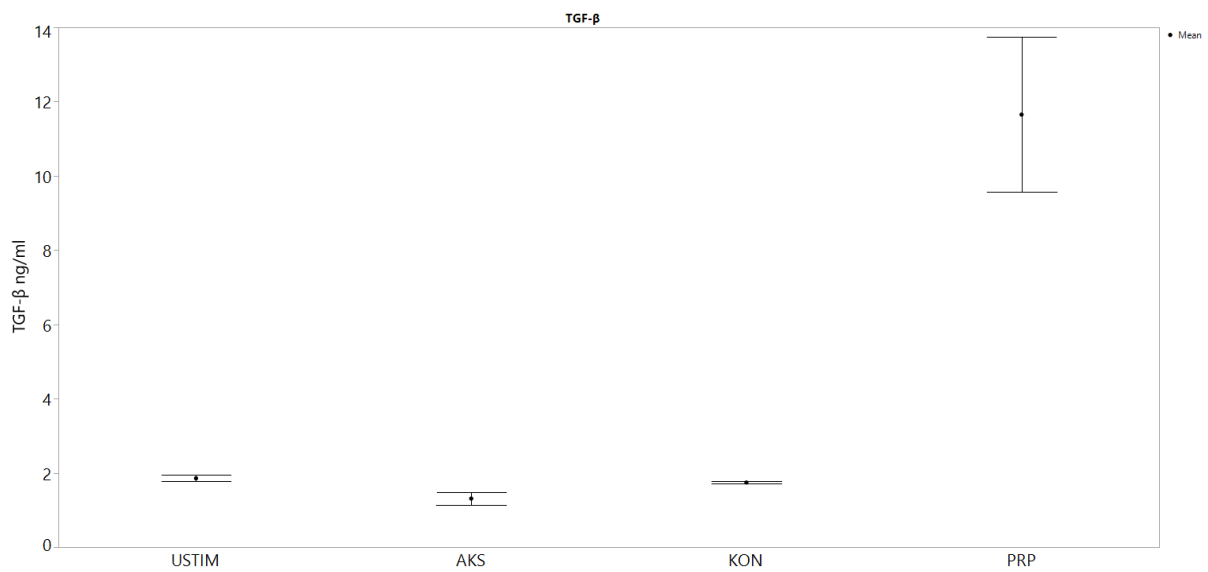
Dette ga betydelig høyere konsentrasjoner av de analyserte komponentene. Se tabell 4 til 6 for

konsentrasjoner av cytokiner og vekstfaktorer i de ulike prepareringsmetodene, samt grafisk fremstilling i figur 8 til 10.

TGF- β 1

Tabell 4: Gjennomsnitt og 95% konfidensintervall for konsentrasjonen av TGF- β 1.

	Gjennomsnitt, ng/ml og 95% KI
USTIM	1,85 [1,76 - 1,95]
AKS	1,31 [1,13 - 1,49]
KON	1,74 [1,71 - 1,77]
PRP, sonikert	11,65 [9,57 - 13,73]
PRP, uten sonikerinng	1,28 [1,14 - 1,42]

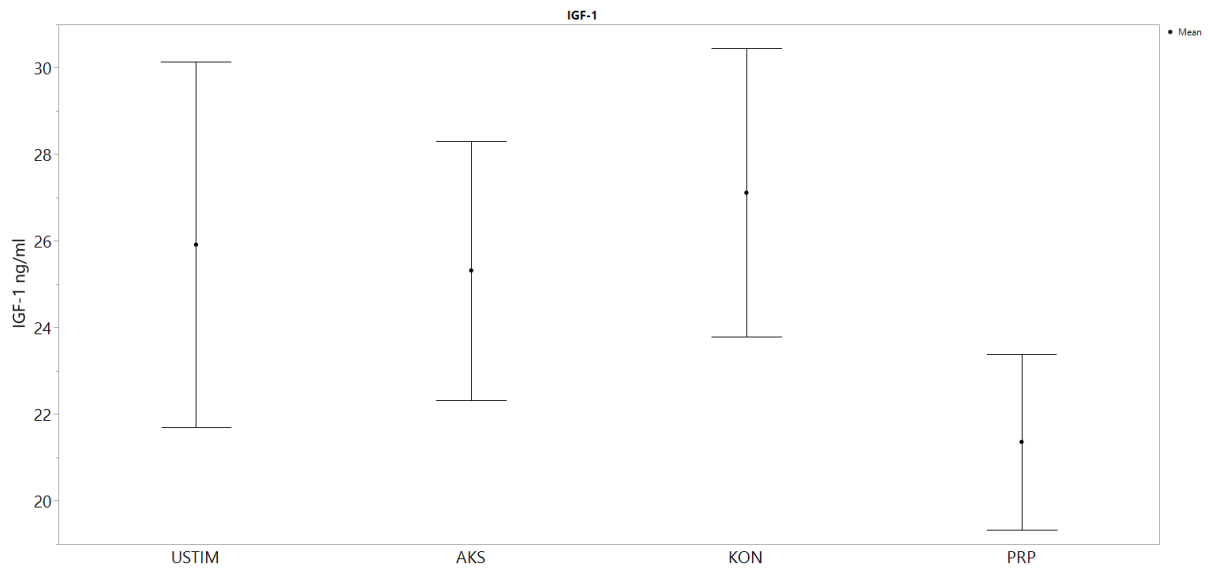


Figur 8: Konsentrasjon av TGF- β med 95% konfidensintervall og gjennomsnitt i USTIM, AKS, KON og PRP.

IGF-1

Tabell 5: Gjennomsnitt og 95% konfidensintervall for konsentrasjonen av IGF-1.

	Gjennomsnitt, ng/ml og 95% KI
USTIM	25,92 [21,69 – 30,13]
AKS	25,32 [22,33 – 28,30]
KON	27,11 [23,78 – 30,44]
PRP, sonikert	21,36 [19,33 – 23,39]
PRP, uten sonikering	-0,02 [-0,04 – -0,0009]

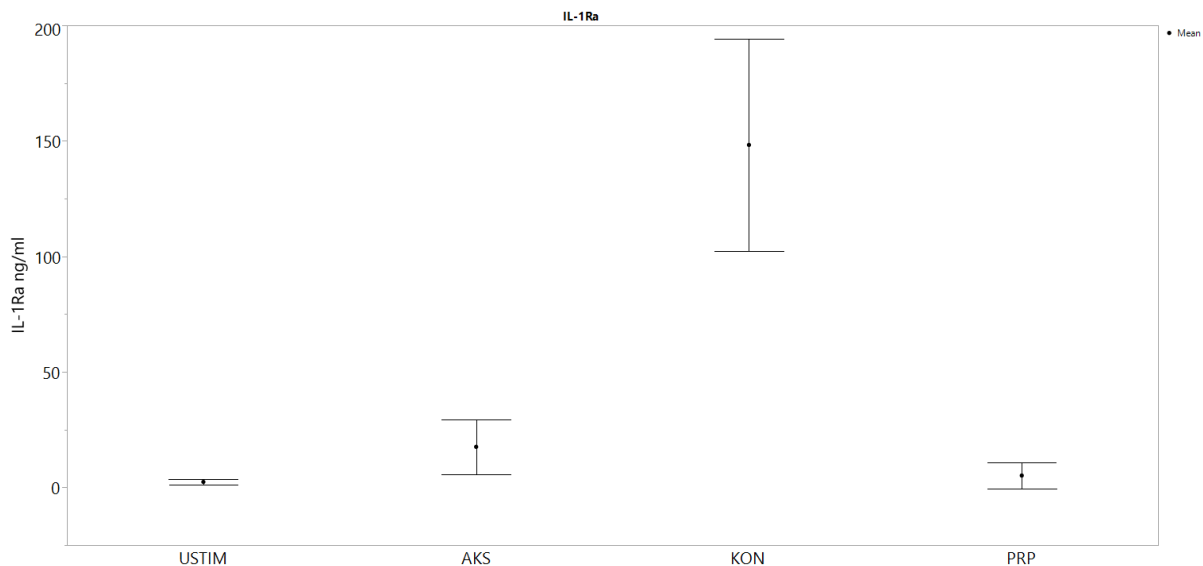


Figur 9: Graf som viser konsentrasjonen av IGF-1 i de forskjellige preparatene med gjennomsnitt og 95% konfidensintervall.

IL-1Ra

Tabell 6: Gjennomsnitt og 95% konfidensintervall for konsentrasjonen av IL-1Ra.

	Gjennomsnitt, ng/ml og 95% KI
USTIM	2,38 [1,24 – 3,52]
AKS	17,58 [5,78 – 29,38]
KON	148,26 [102,44 – 194,09]
PRP, sonikert	5,14 [-0,60 – 10,89]
PRP, uten sonikering	-3,61 [-7,00 – -0,22]



Figur 10: Grafen viser konsentrasjon av IL-1Ra i USTIM, AKS, KON, PRP med gjennomsnitt og 95% konfidensintervall.

IL-1Ra hadde en høyere konsentrasjon i AKS enn i USTIM. Den laveste økningen var 1,6 ganger og den høyeste 20,2 ganger, med en median på 4,1 ganger økning. IL-1Ra hadde en høyere konsentrasjon i KON enn i USTIM. Den laveste økningen var 13,6 ganger og den høyeste økningen 229,3 ganger, med en median på 38,2 ganger økning.

Multiplex

Multiplex-analysen ble kjørt etter produsentens anbefalinger, men samtlige komponenter hadde svært lave konsentrasjoner, eller konsentrasjon under deteksjonsgrensen. Data er presentert for IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 (p70), TNF α og IFN γ i tabell 7. For IL-1 α , IL-4, IL-8, MCP-1 og RANTES var det ingen detekterbare verdier.

Tabell 7: Gjennomsnitt og 95% konfidensintervall for komponenter analysert med Multiplex. U.D. = under deteksjonsgrensen. n = antall prøver med konsentrasjon over deteksjonsgrensen brukt til utregning av data.

	IL-1β, gjennomsnitt, pg/ml, 95% KI, n	IL-6, gjennomsnitt, pg/ml, 95% KI, n	IL-10, gjennomsnitt, pg/ml, 95% KI, n	IL-12 (p70), gjennomsnitt, pg/ml, 95% KI, n	TNFα, gjennomsnitt, pg/ml, 95% KI, n	IFNγ, gjennomsnitt, pg/ml, 95% KI, n
USTIM	2,53 [-1,29-6,34] n=15	25,45 [-14,57-65,47] n=2	95,47 [-75,84-266,77] n=3	139,30 [-1273,63-1552,23] n=2	14,10 [6,48-21,72] n=2	U.D.
AKS	1,50 [-1,64-4,64] n=20	48,65 [36,58 – 60,72] n=2	108,93 [52,55-185,32] n=3	U.D.	28,90 [-29,55-87,35] n=2	U.D.
KON	128,02 [73,34-182,69] n=20	101,65 [37,48-165,82] n=2	85,01 [37,44-132,57] n=16	95,48 [-9,7-200,66] n=8	26,95 [-14,68-68,58] n=4	830,42 [-159,56-1836,41] n=4
PRP	U.D.	U.D.	U.D.	U.D.	U.D.	U.D.

Diskusjon

TGF- β

Det ble funnet en signifikant økning av TGF- β i PRP-preparatene. TGF- β er en vekstfaktor som ved vevsskade skal sette i gang reparasjonsfasen og sørge for bedre sårheling (44). Dette støttes opp av andre studier som også har konkludert med at TGF- β øker betraktelig i PRP sammenlignet med ustimulert blod (35).

IGF-1

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i konsentrasjonen av IGF-1 i de forskjellige preparatene. IGF-1 er en vekstfaktor som stimulerer celleproliferasjon og bidrar til økt mekanisk styrke etter for eksempel en seneskade (109). Vi har ikke kunnet påvise en økning i konsentrasjonen av IGF-1 i AKS eller PRP i forhold til KON og USTIM i denne studien. En mulig forklaring er at hestene i denne studien allerede hadde en høy konsentrasjon av IGF-1 i blodet, på grunn av en pågående inflammasjonsprosess lokalisert til det halte leddet. En studie gjort på mennesker med OA i kneledd viste at basalverdien av IGF-1 i blodet var betydelig høyere sammenlignet med friske individer (110). Tidligere studier har også konkludert med at IGF-1 ikke har en signifikant økning i PRP (111).

IL-1Ra

Analysene viste en signifikant økning i konsentrasjon av IL-1Ra i AKS-preparatene sammenlignet med USTIM. KON-preparatene hadde en enda høyere økning enn både AKS og USTIM. Dette viser at inkubering av blod fører til en oppformering av IL-1Ra. Det kan antas basert på IL-1Ra sin funksjon, at dette vil kunne ha en terapeutisk effekt på den

inflammatoriske tilstanden i leddet. I denne studien ble det observert en økning på 1,6 til 20,2 ganger fra USTIM til AKS. Det er i et tidligere studie sett 92-119 ganger økning fra kontrollprøver inkubert 1 time ved kroppstemperatur til AKS (35). Den største forskjellen på denne studien og vår var at alle hestene i vår studie hadde en leddrelatert halthet. En kan anta at hester med OA har en høyere basalkonsentrasjon av IL-1Ra på grunn av en pågående inflammasjonsprosess. J. Lasarzik de Ascurra *et al* gjorde funn som støtter opp den teorien. De sammenlignet prøver fra friske hester med prøver fra OA-hester og oppdaget et høyere nivå av IL-1Ra i de ustimulerte prøvene fra OA-hestene sammenlignet med de friske hestene (41). Prøvene fra OA-hestene til Ascurra *et al* har en tilsvarende konsentrasjon av IL-1Ra som USTIM-prøvene i denne studien. De friske hestene hadde konsentrasjoner tilnærmet null. De fikk derimot ingen signifikant forskjell i prøvene som var inkubert i 24 timer. Det må nevnes at disse prøvene ble tatt etter gjennomført artroskopi, og det er beskrevet hvordan kirurgisk stress kan ha en negativ virkning på cytokiner og vekstfaktorer i AKS (91).

Det var en betydelig høyere konsentrasjon av IL-1Ra i KON-prøvene sammenlignet med alle de andre prepareringsmetodene. I denne studien ble det observert en økning av IL-1Ra på 13,6 til 229,3 ganger fra USTIM til KON. Studier har vist lignende tendenser (35, 41, 90, 91), men disse har ikke fått like høye økninger i preparater tilsvarende KON-prøvene i denne studien. KON-prøvene hadde ikke en tilsvarende økning av TGF- β eller IGF-1.

Studier har sammenlignet innholdet av IL-1Ra i AKS-preparater med innholdet i vanlige vacutainerrør tatt fra samme hest og inkubert i samme tidsrom. Det er ingen signifikant økning i AKS-preparatene med CrSO₄-behandlede glasskuler sammenlignet med fullblod inkubert i vanlige vacutainerrør i 24 timer (35, 41). Dette stiller spørsmål ved hvor nødvendig det er med behandlede glasskuler i egne spesialsystemer når samme resultat kan oppnås med

vanlige blodprøveglass. Den største utfordringen i forbindelse med bruk av blodprøveglass antas å være aseptikken. De største serum vacutainerglassene er på 10ml og har kun én hette, noe som resulterer i at samme hettekork må penetreres flere ganger. Det resulterende serumvolumet tilgjengelig for behandling blir mindre enn det en normalt oppnår ved preparering av AKS i kommersielle system. Fordelen med AKS-systemene er dermed en utforming som gjør det mulig å ha store volum og å kunne preparere serumet på en mer aseptisk måte. Dette er spesielt viktig med tanke på at preparatet skal injiseres i ledd.

Resultatene i denne studien viser stor individuell variasjon. En årsak til dette kan være at varmblodige- og kaldblodige hesteraser har ulike referanseområder når det angår blodverdier, og at vi derfor kan forvente variasjon (112). Dette gjenspeiler seg også i cytokinnivå. Det er en rekke likevekter mellom anti- og pro-inflammatoriske komponenter i kroppen som ikke kommer fram i studien, blant annet likevekten mellom IL-1Ra og IL-1. Ettersom vi ikke fikk noen akseptable resultater ved analyse av de pro-inflammatoriske komponentene ved bruk av Multiplex, har vi ikke kunnet regne ut ratioen som nevnes innledningsvis. Vi kan anta ut fra tidligere studier at økningen av de pro-inflammatoriske komponentene ikke foregår i like stor grad som de anti-inflammatoriske. (79). Dette må tas høyde for ved tolkning av resultater da høye nivåer av IL-1Ra ikke nødvendigvis er ensbetydende med god terapeutisk effekt. Den store individuelle variasjonen vil tilsa at en lignende studie med et større antall individer er nødvendig for å få signifikante resultater.

Det er ikke fullstendig kartlagt hvilke cytokiner og vekstfaktorer som finnes i AKS. Det var derfor av stor interesse å få utført denne Multiplex-analysen, dette er en utvidet analyse spesifikk for et stort antall cytokiner hos hest. Slike hestespesifikke analyser har til nå vært begrenset på markedet. Analysen viste lavere verdier enn forventet, og det kan være flere

årsaker til dette. Et eksempel kan være feil med reagenser, analyseoppsett eller avlesing. Menneskelige feil som forurensing ved behandling av prøver eller regnefeil er alltid en potensiell feilkilde. Det kan også være feil med valideringsprosessen eller oppbevaring av kitet før bruk. En annen mulighet er at det reelt var svært lave verdier i prøvene, men det er tidligere vist at både IL-1 β og IL-10 er tilstede i AKS i detekterbare nivåer (35).

Inklusjonskriteriene gjør at hesteutvalget er representativt for travere hovedsakelig hjemmehørende i Østlandsområdet. Vårt utvalg av hester er basert på pasienter som er kommet til Hesteklinikken NMBU. Eiere som for eksempel kun ønsker behandling i felt eller av andre årsaker ikke velger å dra inn til klinikk med sin hest vil derfor ikke bli med i utvalget. Det er likevel flere faktorer som øker variasjonen hos hestene i utvalget. Slike faktorer er tidligere sykdomshistorie og variasjon i rase og alder. Dersom en kandidat har hatt en tidligere sykdom i samme ledd eller leddproblemet har pågått over lengre tid vil dette kunne ha innvirkning på cytokininnholdet.

Mulige seleksjonsfeil kan ha forekommet ved seleksjon av kandidater til studiet. Slike feil kan oppstå ved subjektiv halthetsvurdering. Hestene i denne studien har blitt halthetsdiagnostisert både subjektivt og objektivt med Lameness Locator®, som bidrar til å minimere risikoen for seleksjonsfeil. Ved diagnostiske anestesier er det en risiko for feilinjesjoner eller feilvurdering, spesielt 'positiv bias' der en vurderer respons på anestesien som bedre enn det den egentlig er. En feilinjesjon av anestesi kan gjøre at en halthet av annen årsak mistolkes som lokalisert til ledd. Injeksjonene ble gjort av erfarne klinikere, og leddvæske ble aspirert før injeksjonen ble gjort. Bruk av Lameness Locator® for å vurdere respons på anesthesiene minimerer risikoen for 'positiv bias'.

Klassifikasjonsfeil eller menneskelige feil er alltid en mulig feilkilde som må vurderes. I denne studien er det flere mulige; både i forbindelse med prøvetaking, prøvebehandling og laboratoriefeil. Prøvene skal håndteres i mange ulike steg, og det er en risiko for blant annet feilmerking. Serumprøvene som ble brukt til laboratoriske analyser ble fryst og tint to til tre ganger, og det kan ha hatt betydning for resultatene.

Det er mange faktorer som kan antas å påvirke innholdet av cytokiner og vekstfaktorer i blodet hos en leddhalt hest, blant annet alvorlighetsgrad av leddproblemet og hvor lenge tilstanden har vart. Alder og helsetilstand vil også kunne tenkes å ha innvirkning på kroppens produksjon av cytokiner og vekstfaktorer. Det er få hester med i studien og det er ingen kontrollgruppe med friske hester. Mange faktorer som til nå ikke er fullstendig kartlagt vil kunne ha innvirkning på resultatene.

Konklusjon

Resultatene fra denne studien viser en betydelig økning av IL-1Ra i AKS-prøvene og en meget betydelig økning i KON-prøvene, i forhold til alle de andre prøvene. Vi fant også en høyere konsentrasjon av IL-1Ra i USTIM-prøvene sammenlignet med tidligere analyser. Dette kan være relatert til en pågående inflammasjonsprosess i kroppen, da alle hestene i denne studien var diagnostisert med et halthetsproblem relatert til ledd. Dette bør tas i betraktning når AKS skal brukes som behandlingsmetode for OA. Disse funnene innebar at preparering i AKS-systemet ikke hadde noen fordel på oppformeringen av IL-1Ra sammenlignet med inkubering i vanlige vacutainerglass.

Det ble også påvist en betydelig økning av vekstfaktoren TGF- β i PRP-preparatene, og en samtidig reduksjon av IGF-1. Dette støttes opp av tidligere forskning, og vi konkluderer med at PRP oppformerer vekstfaktoren TGF- β . IGF-1 er en vekstfaktor som i likhet med TGF- β bidrar til sårheling og reparasjon, men som ikke ble oppformert i ønsket grad i verken AKS eller PRP. Hester med en leddrelatert halthet har en viss konsentrasjon av IGF-1 i ustimulert blod.

Takk til bidragsytere

Vi vil takke vår veileder Cathrine T. Fjordbakk for all hjelp og gode råd gjennom denne skriveprosessen. Vi vil også rette en takk til Grethe M. Johansen for tålmodig veiledning på laboratoriet.

Summary

Title: Biologic therapy for articular and tendon-related injuries: Cytokine profile in autologous conditioned serum and platelet-rich plasma in horses with joint related lameness.

Authors: Mia Mehlum Henriksen, Anna Margreta Jacobsen, Karoline Mosand Reitan

Supervisor: Cathrine T. Fjordbakk, Department of Companion Animal Clinical Sciences

Lameness is a common symptom in horses, and there is a great need and interest for effective treatments of osteoarthritis, tendon and ligament strains in horses. We have examined biological treatments prepared from the patient's own blood in a group of horses with a naturally occurring joint disease. The purpose was to analyze the concentration of cytokines and growth factors in the preparations. In this study, blood was drawn from 20 horses with osteoarthritis, all of which were trotters aged 2 to 7 years old. The blood was prepared in 4 different ways: 1) 'Untreated' blood was left in room temperature in blood vacutainer tubes for one hour before centrifugation and filtering of serum; 2) 'Autologous conditioned serum' (ACS) was incubated in a commercial ACS system at 37°C for 24 hours; 3) 'Control' blood was incubated in blood vacutainer tubes at 37°C for 24 hours; 4) PRP was prepared directly, without incubation, through a centrifugation process in a specialist syringe. ELISAs were used to measure the concentrations of IL-1Ra, IGF-1 and TGF- β in the preparations. A Multiplex analysis was used to measure concentrations of the following analytes: IFN γ , IL1- α , IL1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), MCP-1, RANTES og TNF α . Results showed that IL-1Ra was present in untreated blood, and that it in fact increased in ACS. In this study, the increase was not as substantial as shown in previous studies in healthy horses. The control preparations also had a significant increase of IL-1Ra, compared to untreated serum. As

shown in previous studies, our study also found that *de novo* synthesis of IL-1Ra happens with incubation of full blood, both when blood is incubated in serum vacutainer tubes and in special ACS systems. In PRP there was a significant increase of TGF- β compared to untreated blood. The basal level of IGF-1 in untreated serum was higher than expected in healthy horses, but there was no significant increase of IGF-1 in ACS or PRP. The Multiplex analysis had non-detectable values for most of the analytes. It is uncertain if this is caused by analytical errors or the actual condition of the samples.

Referanser

1. Equine health survey highlights the prevalence of lameness. *Veterinary Record*. 2013;173(6):132-.
2. Slater J. Equine disease surveillance. *Veterinary Record*. 2014;175(11):271-2.
3. Weeren PRv. *Joint Disease in the Horse*. Missouri: Elsevier; 2016, p. 2
4. Frisbie DD. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1096.
5. Frisbie DD. *Synovial Joint Biology and Pathobiology*. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1100,1101.
6. Lyn March CL. *Articular Cartilage in Health and Disease*. *The Musculoskeletal System*: Elsevier; 2010, p. 77-95.
7. Frisbie DD. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1097.
8. Caron JP. *Osteoarthritis. Diagnosis and management of lameness in the horse*: Elsevier; 2011, p. 656.
9. Frisbie DD. *Synovial Joint Biology and Pathobiology*. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1109,1110.
10. Frisbie DD. *Synovial Joint Biology and Pathobiology*. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1105.
11. Caron JP. *Osteoarthritis. Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*: Elsevier; 2011, p. 660.
12. Caron JP. *Osteoarthritis. Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*: Elsevier; 2011, p. 660.
13. Frisbie DD. *Synovial Joint Biology and Pathobiology*. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p 1105.
14. McIlwraith CW. *Traumatic Arthritis and Posttraumatic Osteoarthritis in the Horse*. *Joint Disease in the Horse*: Elsevier; 2016, p. 38.
15. Kawac CE. *Models of Equine Joint Disease*. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*: Elsevier; 2011, p. 674.
16. Frisbie DD. *Synovial Joint Biology and Pathobiology*. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1107.
17. Tulamo RM, Houttu J, Tupamaki A, Salonen M. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. *Am J Vet Res*. 1996;57(6):932-7.
18. Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 1988;52(1):137-46.
19. Frisbie DD. *Synovial Joint Biology and Pathobiology*. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1010.
20. Wayne McIlwraith C. *Joint Disease in the Horse*. Elsevier; 2016, p. 43.

21. Frisbie DD. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1110.
22. McIlwraith CW. *Joint Disease in the Horse*: Elsevier; 2016, p. 44.
23. Mike W. Ross SJD. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*: Elsevier; 2011, p. 656.
24. Moos V, Fickert S, Muller B, Weber U, Sieper J. Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol.* 1999;26(4):870-9.
25. James F. Zachary MDM. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*: Elsevier; 2012, p. 92.
26. Abul K. Abbas AHL, Shiv Pillai. *Basic Immunology, Functions and Disorders of the Immune System*: Elsevier; 2014, p. 39.
27. Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(28):11742-7.
28. Abul K. Abbas AHL, Shiv Pillai. *Basic Immunology, Functions and Disorders of the Immune System*: Elsevier; 2014, p. 44.
29. Provenzano PP, Alejandro-Osorio AL, Grorud KW, Martinez DA, Vailas AC, Grindeland RE, et al. Systemic administration of IGF-I enhances healing in collagenous extracellular matrices: evaluation of loaded and unloaded ligaments. *BMC physiology.* 2007;7:2-.
30. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *The Journal of biological chemistry.* 1978;253(8):2769-76.
31. Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *The Journal of cell biology.* 1990;111(2):731-41.
32. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979).* 2002;39(2):258-63.
33. Uchino M, Izumi T, Tominaga T, Wakita R, Minehara H, Sekiguchi M, et al. Growth Factor Expression in the Osteophytes of the Human Femoral Head in Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007).* 2000;377:119-25.
34. Tizard IR. *Veterinary Immunology*: Elsevier; 2013, p. 23.
35. Hraha TH, Doremus KM, McIlwraith CW, Frisbie DD. Autologous conditioned serum: the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine veterinary journal.* 2011;43(5):516-21.
36. Pochini AdC, Antonioli E, Bucci DZ, Sardinha LR, Andreoli CV, Ferretti M, et al. Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns. *Einstein (Sao Paulo, Brazil).* 2016;14(3):391-7.
37. Tizard IR. *Veterinary Immunology.* Elsevier; 2013, p. 22-23.

38. Tizard IR. *Veterinary Immunology*. Elsevier; 2013, p. 24, 45.
39. Rutgers M, Saris DBF, Dhert WJA, Creemers LB. Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(3):R114-R.
40. Tizard IR. *Veterinary Immunology*. Elsevier; 2013, p. 24.
41. Lasarzik de Ascurra J, Ehrle A, Einspanier R, Lischer C. Influence of Incubation Time and Incubation Tube on the Cytokine and Growth Factor Concentrations of Autologous Conditioned Serum in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2019;75:30-4.
42. Tizard IR. *Veterinary Immunology*. Elsevier; 2013, p 199.
43. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research*. 2007;25(2):230-40.
44. Tizard IR. *Veterinary Immunology*. Elsevier; 2013, p. 218.
45. Tizard IR. *Veterinary Immunology*. Elsevier; 2013, p. 217.
46. Mike W. Ross SJD. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*: Elsevier; 2011, p. 694.
47. Victoria Aspinall MC. *Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology Textbook*: Elsevier; 2015, p. 196-198.
48. Frisbie DD. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1157.
49. Smith RK, Gerard M, Dowling B, Dart AJ, Birch HL, Goodship AE. Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine veterinary journal Supplement*. 2002(34):241-4.
50. Smith RK, Zunino L, Webbon PM, Heinegard D. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1997;16(5):255-71.
51. Screen HR, Lee DA, Bader DL, Shelton JC. An investigation into the effects of the hierarchical structure of tendon fascicles on micromechanical properties. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, Journal of engineering in medicine*. 2004;218(2):109-19.
52. Frisbie DD. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1158.
53. Mike W. Ross SJD. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*: Elsevier; 2011, p. 696.
54. Frisbie DD. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1159.
55. Stephens PR, Nunamaker DM, Butterweck DM. Application of a Hall-effect transducer for measurement of tendon strains in horses. *Am J Vet Res*. 1989;50(7):1089-95.

56. Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Rose RJ, Walsh WR. Recombinant equine growth hormone does not affect the in vitro biomechanical properties of equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary surgery : VS.* 2002;31(4):325-30.
57. Crevier N, Pourcelot P, Denoix JM, Geiger D, Bortolussi C, Ribot X, et al. Segmental variations of in vitro mechanical properties in equine superficial digital flexor tendons. *Am J Vet Res.* 1996;57(8):1111-7.
58. Frisbie DD. *Equine Surgery: Elsevier; 2012, p. 1160-1162.*
59. Frisbie DD. *Equine Surgery. Elsevier; 2012, p. 1163-1164.*
60. Mike W. Ross SJD. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse. Elsevier; 2011, p. 705.*
61. Dahlgren LA, Brower-Toland BD, Nixon AJ. Cloning and expression of type III collagen in normal and injured tendons of horses. *Am J Vet Res.* 2005;66(2):266-70.
62. Mike W. Ross SJD. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse. Elsevier; 2011, p. 706.*
63. Watkins JP, Auer JA, Gay S, Morgan SJ. Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. *Am J Vet Res.* 1985;46(10):2091-6.
64. Arkell M, Archer RM, Guitian FJ, May SA. Evidence of bias affecting the interpretation of the results of local anaesthetic nerve blocks when assessing lameness in horses. *Veterinary Record.* 2006;159(11):346-8.
65. Practitioners AAoE. Lameness Examination: Evaluating the Lame Horse American Association of Equine Practitioners2019 [Available from: <https://aaep.org/horsehealth/lameness-exams-evaluating-lame-horse>].
66. KEEGAN KG, DENT EV, WILSON DA, JANICEK J, KRAMER J, LACARRUBBA A, et al. Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses. *Equine veterinary journal.* 2010;42(2):92-7.
67. Clayton H, Schamhardt HCC. *Techniques for gait analysis*2001. 55-76 p.
68. McIlwraith CW. *Joint Disease in the Horse: Elsevier; 2016, p. 192.*
69. MacAllister CG, Sangiah S. Effect of ranitidine on healing of experimentally induced gastric ulcers in ponies. *American journal of veterinary research.* 1993;54(7):1103-7.
70. Masferrer JL, Seibert K. Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor.* 1994;4(1):25-30.
71. Dragoo JL, Danial CM, Braun HJ, Pouliot MA, Kim HJ. The chondrotoxicity of single-dose corticosteroids. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA.* 2012;20(9):1809-14.
72. Frisbie DD. *Equine Surgery: Elsevier; 2012, p. 1115-1116.*

73. Todhunter RJ, Fubini SL, Vernier-Singer M, Wootton JA, Lust G, Freeman KP, et al. Acute synovitis and intra-articular methylprednisolone acetate in ponies. *Osteoarthritis and cartilage*. 1998;6(2):94-105.
74. Bailey SR. Corticosteroid-Associated Laminitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2010;26(2):277-85.
75. J. McCluskey M, B. Kavenagh P. Clinical use of triamcinolone acetonide in the horse (205 cases) and the incidence of glucocorticoid-induced laminitis associated with its use 2010. 86-9 p.
76. Frisbie DD. *Equine Surgery*: Elsevier; 2012, p. 1117.
77. McIlwraith W. Use of sodium hyaluronate (Hyaluronan) in equine joint disease 2010. 296-303 p.
78. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, et al. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*. 1990;343(6256):336-40.
79. Wehling P, Moser C, Frisbie D, Wayne McIlwraith C, Kawcak CE, Krauspe R, et al. Autologous Conditioned Serum in the Treatment of Orthopedic Diseases. *BioDrugs*. 2007;21(5):323-32.
80. Frisbie DD. *Equine Surgery*. Elsevier; 2012, p. 1168.
81. Frisbie DD. *Equine Surgery*. Elsevier; 2012, p. 1169.
82. L. Gillis C. *Rehabilitation of Tendon and Ligament Injuries* 1997.
83. Crevier-Denoix N, Collobert C, Pourcelot P, Denoix JM, Sanaa M, Geiger D, et al. Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine veterinary journal Supplement*. 1997(23):23-6.
84. Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010;28(2):211-7.
85. Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(16):10331-6.
86. Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *The Journal of Clinical Investigation*. 1990;85(5):1694-7.
87. Jouvenne P, Vannier E, Dinarello CA, Miossec P. Elevated levels of soluble interleukin-1 receptor type II and interleukin-1 receptor antagonist in patients with chronic arthritis: Correlations with markers of inflammation and joint destruction. *Arthritis & Rheumatism*. 1998;41(6):1083-9.
88. Weinberger. Clinical experience with ACS/Orthokine/IRAP in horses. *Equine Sports Med*. 2008(3):1-5.
89. Jöstingmeier U, Reinecke J, Hertsch B. Comparison of intraarticular injection of autologous conditioned serum (ACS, irap) vs sodium

hyaluronate and corticosteroid in front limb coffin joint derived lameness. *Australian Equine Veterinarian*. 2010(29):75.

90. Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research*. 2007;68(3):290-6.

91. Fjordbakk CT, Johansen GM, Lovas AC, Oppegard KL, Storset AK. Surgical stress influences cytokine content in autologous conditioned serum. *Equine veterinary journal*. 2015;47(2):212-7.

92. Evans CH, Chevalier X, Wehling P. Autologous Conditioned Serum. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*. 2016;27(4):893-908.

93. Wehling P, Moser C, Frisbie D, McIlwraith CW, Kawcak CE, Krauspe R, et al. Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases: the orthokine therapy. *BioDrugs*. 2007;21(5):323-32.

94. Mei-Dan O, Carmont MR, Laver L, Mann G, Maffulli N, Nyska M. Platelet-rich plasma or hyaluronate in the management of osteochondral lesions of the talus. *The American journal of sports medicine*. 2012;40(3):534-41.

95. Saito M, Takahashi KA, Arai Y, Inoue A, Sakao K, Tonomura H, et al. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clinical and experimental rheumatology*. 2009;27(2):201-7.

96. Textor JA, Tablin F. Intra-articular use of a platelet-rich product in normal horses: clinical signs and cytologic responses. *Veterinary surgery : VS*. 2013;42(5):499-510.

97. Geburek F, Gaus M, van Schie HTM, Rohn K, Stadler PM. Effect of intralesional platelet-rich plasma (PRP) treatment on clinical and ultrasonographic parameters in equine naturally occurring superficial digital flexor tendinopathies - a randomized prospective controlled clinical trial. *BMC veterinary research*. 2016;12(1):191-.

98. Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res*. 2009;70(2):277-82.

99. de Vos RJ, Weir A, van Schie HTM, Bierma-Zeinstra SMA, Verhaar JAN, Weinans H, et al. Platelet-Rich Plasma Injection for Chronic Achilles Tendinopathy: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2010;303(2):144-9.

100. DeRossi R, Coelho ACAdO, Mello GSd, Frazílio FO, Leal CRB, Facco GG, et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2009;24:276-81.

101. Dorion RP, Hamati HF, Landis B, Frey C, Heydt D, Carey D. Risk and clinical significance of developing antibodies induced by topical thrombin preparations. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1998;122(10):887-94.

102. Isobe K, Suzuki M, Watanabe T, Kitamura Y, Suzuki T, Kawabata H, et al. Platelet-rich fibrin prepared from stored whole-blood samples. *International Journal of Implant Dentistry*. 2017;3(1):6.
103. Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2008;66(4):684-90.
104. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American journal of sports medicine*. 2009;37(11):2259-72.
105. Anitua E, Sánchez M, Zalduendo MM, De La Fuente M, Prado R, Orive G, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Proliferation*. 2009;42(2):162-70.
106. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *The American journal of sports medicine*. 2011;39(10):2135-40.
107. Penha-Goncalves MN, Onions DE, Nicolson L. Cloning and sequencing of equine transforming growth factor-beta 1 (TGF beta-1) cDNA. *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping*. 1997;7(6):375-8.
108. Nixon AJ, Brower-Toland BD, Sandell LJ. Primary nucleotide structure of predominant and alternate splice forms of equine insulin-like growth factor I and their gene expression patterns in tissues. *American journal of veterinary research*. 1999;60(10):1234-41.
109. Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2002;20(5):910-9.
110. O'Shaughnessey K, Matuska A, Hoepfner J, Farr J, Klaassen M, Kaeding C, et al. Autologous protein solution prepared from the blood of osteoarthritic patients contains an enhanced profile of anti-inflammatory cytokines and anabolic growth factors. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2014;32(10):1349-55.
111. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2007;25(2):230-40.
112. Sentrallaboratoriet. Referanseverdier, hest Sentrallaboratoriet.no [09.05.2019]. Available from: <https://www.sentrallaboratoriet.no/wp-content/uploads/ref-hest-2018-2.pdf>.

Vedlegg

Equine IL-1Ra DuoSet ELISA (R&D Systems), side 60, 61
Human IGF-1 DuoSet ELISA (R&D Systems), side 62, 63
Human TGF- β 1 DuoSet ELISA (R&D Systems), side 64, 65

Oppsett, Equine IL-1Ra DuoSet ELISA (R&D Systems), side 66-69
Oppsett, Human IGF-1 DuoSet ELISA (R&D Systems), side 70-72
Oppsett, Human TGF- β 1 DuoSet ELISA (R&D Systems), side 73-75

Multiplex: MILLIPLEX MAP Equine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel -
Immunology Multiplex Assay (Merck), side 76-85

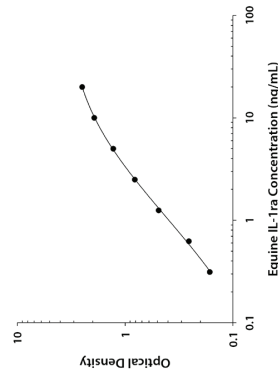
CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the equine IL-1ra concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



SPECIFICITY

The following factors prepared at 200 ng/mL were assayed and exhibited no cross-reactivity or interference.

Recombinant equine:
IL-1β

The factors listed below were assayed and exhibited the following cross-reactivities:

Recombinant Factor	Concentration Tested (pg/mL)	Observed Value (pg/mL)	% Cross-reactivity
human IL-1ra	200,000	401	0.4
mouse IL-1ra	12,500	2215	17.7
rat IL-1ra	50,000	2433	4.9
porcine IL-1ra	100,000	1119	1.1

TECHNICAL HINTS & LIMITATIONS

- We recommend the use of R&D Systems' Reagent Diluent Concentrate 2 (Catalog # DY995) to prepare Reagent Diluent for use in this assay.
- The use of high quality Bovine Serum Albumin (BSA) for the Reagent Diluent is crucial for the optimum performance of the DuoSet ELISA Development kit. Impurities such as proteases, binding proteins, soluble receptors or other interfering substances can be found to varying degrees in virtually all BSA preparations and can inhibit or interfere with the detection of certain analytes. If the standard curve appears suppressed, consider evaluating a different preparation of BSA.
- It is suggested to start Reagent Diluent optimization for serum and plasma samples by using PBS supplemented with 10-50% animal serum. Do not use buffers with animal serum to reconstitute or dilute the Detection Antibody or Streptavidin-HRP.
- It is important that the Reagent Diluent selected for reconstitution and dilution of the standard reflects the environment of the samples being measured.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- The use of PBS from tablets may interfere in this assay.

TROUBLESHOOTING

Note: For more detailed troubleshooting, please visit:
www.RnDSystems.com/ELISADevelopment

Poor Standard Curve

- Impure BSA used for Reagent Diluent preparation.
- Improper reconstitution and/or storage of standard.
- Improper dilution of highest standard and standard curve.
- Incomplete washing and/or aspiration of wells.
- Unequal volumes added to wells/pipetting error.
- Incorrect incubation times or temperatures.

Poor Precision

- Unequal volumes added to wells/pipetting error.
 - Incomplete washing and/or aspiration of wells.
 - Unequal mixing of reagents.
- Low or no color Development**
- Inadequate volume of substrate added to wells.
 - Incorrect incubation times or temperatures.
 - Impure BSA used for Reagent Diluent preparation.

DuoSet® ELISA
DEVELOPMENT SYSTEM

Equine IL-1ra/IL-1F3

Catalog Number: DY2466 (15 plates)

INTENDED USE

For the development of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant equine Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL-1ra). The Reagent Diluent recommended may be suitable for most cell culture supernate, serum, and plasma samples. The Reagent Diluent selected for use can alter the performance of an immunoassay. Reagent Diluent optimization for samples with complex matrices such as serum and plasma, may improve their performance in this assay.

This kit contains sufficient materials to run ELISAs on at least fifteen 96 well plates, provided the following conditions are met:

- The reagents are prepared as described in this package insert.
- The assay is run as described in the General ELISA Protocol.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

Refer to the Certificate of Analysis for component concentrations as they may vary. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400
E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420
E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050
TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001
E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

R&D SYSTEMS
a biotechne brand

www.RnDSystems.com

7/15

752707.3

OTHER MATERIALS & SOLUTIONS REQUIRED

DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (5 plates): (R&D Systems, Catalog # DY008) containing 96 well microplates, plate sealers, substrate solution, stop solution, plate coating buffer (PBS), wash buffer, and Reagent Diluent Concentrate 2.

The components listed above may be purchased separately:

96 well microplates: (R&D Systems, Catalog # DY990).

Plate Sealers: (R&D Systems, Catalog # DY992).

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems, Catalog # DY006).

Wash Buffer: 0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4 (R&D Systems, Catalog # WA126).

Reagent Diluent: 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems, Catalog # DY995).

Quality of BSA is critical (see Technical Hints).

Substrate Solution: 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems, Catalog # DY999).

Stop Solution: 2 N H₂SO₄ (R&D Systems, Catalog # DY994).

Normal Goat Serum: (R&D Systems, Catalog # DY005).

PRECAUTIONS

Some components in this kit contain ProClin® which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution.

The Color Reagent B suggested for use with this kit may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Please refer to the MSDS on our website prior to use.

CALIBRATION

This DuoSet is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed recombinant equine IL-1ra produced at R&D Systems.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

DESCRIPTION	PART #	# VIALS	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Equine IL-1ra Capture Antibody	843380	1 vial	Refer to the lot-specific Certificate of Analysis (C of A) for storage conditions.
Equine IL-1ra Detection Antibody	843381	1 vial	
Equine IL-1ra Standard	843382	3 vials	
Streptavidin-HRP	890803	1 vial	

REAGENT PREPARATION

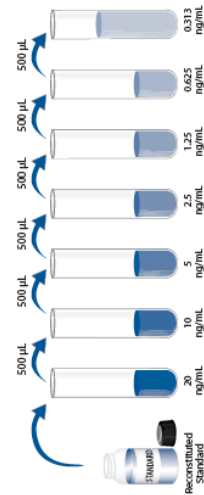
Bring all reagents to room temperature before use. Allow all components to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation after initial reconstitution. Working dilutions should be prepared and used immediately, unless otherwise noted.

Streptavidin-HRP: 1.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase. Dilute to the working concentration specified on the vial label using Reagent Diluent.

Goat Anti-Equine IL-1ra Capture Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute with 1.0 mL of PBS. Dilute in PBS without carrier protein to the working concentration indicated on the C of A.

Biotinylated Goat Anti-Equine IL-1ra Detection Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute with 1.0 mL of Reagent Diluent. Dilute in Reagent Diluent with 2% heat inactivated normal goat serum (NGS) to the working concentration indicated on the C of A. Prepare 1-2 hours prior to use.

Recombinant Equine IL-1ra Standard: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 0.5 mL of Reagent Diluent. A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions in Reagent Diluent is recommended. Prepare 1000 µL of high standard per plate assayed at the concentration indicated on the C of A.



All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in PBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate with 100 µL per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 µL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 µL of Reagent Diluent to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

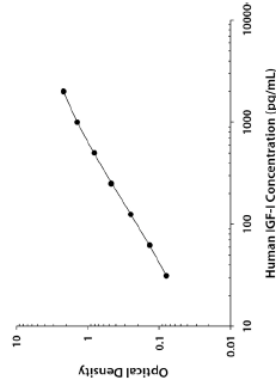
1. Add 100 µL of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well. Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 µL of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent with NGS, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 µL of the working dilution of Streptavidin-HRP to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspiration/wash as in step 2.
7. Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 µL of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.). Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human IGF-I concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



SPECIFICITY

The following factors prepared at 50 ng/mL were assayed and exhibited no cross-reactivity or interference. However, all these proteins will suppress the IGF-I signal.

Recombinant human:

IGF-I-R
IGF-II
IGFBP-1
IGFBP-2
IGFBP-3
IGFBP-4
IGFBP-5
IGFBP-6
Insulin

Recombinant mouse:

IGF-I
IGF-II

A sample containing 6.25 ng/mL of recombinant human LR3 IGF-I reads as 1452 pg/mL (23.2% cross-reactivity).

A sample containing 50 ng/mL of recombinant rat IGF-I reads as 105 pg/mL (0.2% cross-reactivity).

TECHNICAL HINTS & LIMITATIONS

- We recommend the use of R&D Systems® Reagent Diluent Concentrate 3 (Catalog # DY004) to prepare Reagent Diluent for use in this assay.
- If assaying sample types other than cell culture supernates, each laboratory should develop and validate its own diluent. The diluent must not be used to dilute the Detection Antibody or the Streptavidin-HRP.
- It is important that the Reagent Diluent selected for dilution of the standard reflects the environment of the samples being measured.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- The use of PBS from tablets may interfere in this assay.
- Since bovine IGF-1 shares 100% sequence identity with human IGF-1, we do not recommend using a reagent diluent containing serum or BSA.

TROUBLESHOOTING

Note: For more detailed troubleshooting, please visit: www.RnDSystems.com/ELISADevelopment

Poor Standard Curve

- Improper reconstitution and/or storage of standard.
- Improper dilution of highest standard and standard curve.
- Incomplete washing and/or aspiration of wells.
- Unequal volumes added to wells/pipetting error.
- Incorrect incubation times or temperatures.

Poor Precision

- Unequal volumes added to wells/pipetting error.
- Incomplete washing and/or aspiration of wells.
- Unequal mixing of reagents.
- Low or No Color Development**
 - Inadequate volume of substrate added to wells.
 - Incorrect incubation times or temperatures.

DuoSet® ELISA
DEVELOPMENT SYSTEM

Human IGF-I

Catalog Numbers: DY291-05 (5 plates)
DY291 (15 plates)

INTENDED USE

For the development of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant human Insulin-like Growth Factor I (IGF-I). The Reagent Diluent recommended is suitable for most cell culture supernate samples. The Reagent Diluent selected for use can alter the performance of an immunoassay. Reagent Diluent optimization for samples with complex matrices such as serum and plasma, may improve their performance in this assay.

This kit contains sufficient materials to run ELISAs on at least five 96 well plates, provided the following conditions are met:

- The reagents are prepared as described in this package insert.
- The assay is run as described in the General ELISA Protocol.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

Refer to the Certificate of Analysis for component concentrations as they may vary. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc.
614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400
E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.
19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420
E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050
TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001
E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

737561.3

9/16

www.RnDSystems.com

RD SYSTEMS
a biotechne brand

OTHER MATERIALS & SOLUTIONS REQUIRED

DuoSet® Ancillary Reagent Kit 3 (5 plates): (R&D Systems®, Catalog # DY009) containing 96 well microplates, plate sealers, substrate solution, stop solution, plate coating buffer (PBS), wash buffer, and Reagent Diluent Concentrate 3.

The components listed above may be purchased separately:

96 well microplates: (R&D Systems®, Catalog # DY990).

Plate Sealers: (R&D Systems®, Catalog # DY992).

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems®, Catalog # DY006).

Wash Buffer: 0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4 (R&D Systems®, Catalog # WA126).

Reagent Diluent: 5% Tween 20 in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered. (R&D Systems®, Catalog # DY004).

Substrate Solution: 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems®, Catalog # DY999).

Stop Solution: 2 N H₂SO₄ (R&D Systems®, Catalog # DY994).

PRECAUTIONS

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution.

The Color Reagent B suggested for use with this kit may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Refer to the MSDS on our website prior to use.

CALIBRATION

This DuoSet® is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed recombinant human IGF-I produced at R&D Systems®.

SAMPLE PRETREATMENT

IGF-I in biological fluids may be bound to IGF Binding Proteins. The IGF-I sequestered by the binding protein complex is not detected in this assay; therefore, pretreatment of samples may be required. For an IGF-I extraction protocol, see Daughaday WH, et al. (1980) J. Clin. Endocrinol. Metab. 51:781. The standard material in this assay does not need to be pretreated.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

DESCRIPTION	PART #	CATA-LOG #	STORAGE OF OPENED/RECONSTITUTED MATERIAL
Human IGF-I Capture Antibody	840264	DY791-05 1 vial	3 vials
Human IGF-I Detection Antibody	840265	1 vial	3 vials
Human IGF-I Standard	840266	1 vial	3 vials
Streptavidin-HRP	893411	1 vial	3 vials

Refer to the lot-specific Certificate of Analysis (C of A) for storage conditions.

REAGENT PREPARATION

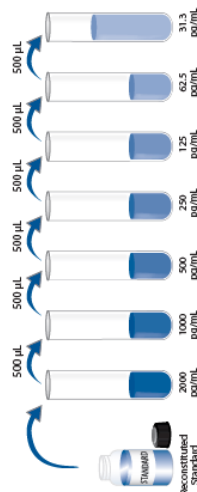
Bring all reagents to room temperature before use. Allow all components to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation after initial reconstitution. Working dilutions should be prepared and used immediately.

Streptavidin-HRP: Each vial contains 2.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase. Dilute to the working concentration specified on the vial label using Reagent Diluent.

Mouse Anti-Human IGF-I Capture Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 0.5 mL of PBS. Dilute in PBS without carrier protein to the working concentration indicated on the C of A.

Biotinylated Goat Anti-Human IGF-I Detection Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 1.0 mL of Reagent Diluent. Dilute in Reagent Diluent to the working concentration indicated on the C of A.

Recombinant Human IGF-I Standard: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 0.5 mL of deionized or distilled water. A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions in Reagent Diluent is recommended. Prepare 1000 µL of high standard per plate assayed at the concentration indicated on the C of A.



All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in PBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate with 100 µL per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 µL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 µL of Reagent Diluent to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

1. Add 100 µL of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well. Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 µL of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 µL of the working dilution of Streptavidin-HRP to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspiration/wash as in step 2.
7. Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 µL of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in PBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate with 100 µL per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 µL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or auto washer. Complete removal of liquid from each well is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 µL of Block Buffer to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

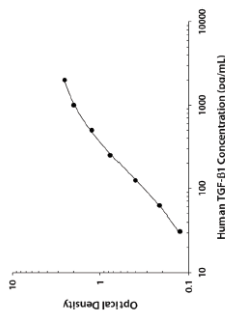
1. Add 100 µL of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well. Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 µL of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 µL of the working dilution of Streptavidin-HRP B to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspiration/wash as in step 2.
7. Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 µL of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.). Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human TGF-β1 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. Since samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



SPECIFICITY

The factors below were assayed and exhibited the following cross-reactivity:

Factor	Concentration Tested (pg/mL)	Observed Value (pg/mL)	% Cross-reactivity
ptfG-β2	50,000	145	0.3%
mTfG-β1.2	2500	1421	57%
mTfG-β2	50,000	74	0.15%
mTfG-β3	50,000	481	0.96%
mTfG-β5	50,000	904	1.8%

A sample containing 25 ng/mL of recombinant human latent TGF-β1 reads as 37.4 pg/mL (0.15% cross-reactivity).

TECHNICAL HINTS & LIMITATIONS

- We recommend the use of R&D Systems® Reagent Diluent Concentrate 1 (Catalog # DY997) to prepare Reagent Diluent for use in this kit.
- It is important that the Reagent Diluent selected for reconstitution and dilution of the standard reflects the environment of the samples being measured.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- The use of PBS from tablets may interfere in this assay.

TROUBLESHOOTING

Note: For more detailed troubleshooting, please visit: www.RnDSystems.com/ELISADevelopment

Poor Standard Curve

- Improper reconstitution and/or storage of standard.
- Improper dilution of highest standard and standard curve.
- Incomplete washing and/or aspiration of wells.

Poor Precision

- Unequal volumes added to wells/pipetting error.
- Incomplete washing and/or aspiration of wells.
- Unequal mixing of reagents.

Low or No Color Development

- Inadequate volume of substrate added to wells.
- Incorrect incubation times or temperatures.

DuoSet® ELISA DEVELOPMENT SYSTEM

Human TGF-β1

Catalog Numbers: DY240-05 (5 plates)
DY240 (15 plates)

INTENDED USE

For the development of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant human Transforming Growth Factor beta 1 (TGF-β1). The Reagent Diluent recommended may be suitable for most cell culture supernatant, serum, and plasma samples. The Reagent Diluent selected for use can alter the performance of an immunoassay. Reagent Diluent optimization for samples with complex matrices such as serum and plasma, may improve their performance in this assay.

This kit contains sufficient materials to run ELISAs on at least five 96 well plates, provided the following conditions are met:

- The reagents are prepared as described in this package insert.
- The assay is run as described in the General ELISA Protocol.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

Refer to the Certificate of Analysis for component concentrations as they may vary. For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Manufactured and Distributed by:

USA R&D Systems, Inc.
614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413
TEL: 800 343 7475 612 379 2956 FAX: 612 656 4400
E-MAIL: info@bio-technique.com

Distributed by:

Europe | Middle East | Africa Bio-Techne Ltd.
19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420
E-MAIL: info.emea@bio-technique.com

China Bio-Techne China Co., Ltd.
Unit 1901, Tower 3, Raffles City, Changning Office,
1193 Changning Road, Shanghai PRC 200051
TEL: +86 (21) 52380373 (400) 821-3475 FAX: +86 (21) 52371001
E-MAIL: info.cn@bio-technique.com



www.RnDSystems.com

6/18

7373705

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

DESCRIPTION	PART #	CATALOG #	CATALOG #	STORAGE OF OPEN/ RECONSTITUTED MATERIAL
		DY240-05	DY740	
Human TGF-β1 Capture Antibody	84016	1 vial	3 vials	
Human TGF-β1 Detection Antibody	84017	1 vial	3 vials	Refer to the lot-specific Certificate of Analysis (C of A) for storage conditions.
Human TGF-β1 Standard	84018	2 vials	6 vials	
Streptavidin-HRP B	83975	1 vial	3 vials	

OTHER MATERIALS & SOLUTIONS REQUIRED

DuoSet® Ancillary Reagent Kit 1 (5 plates): (R&D Systems®, Catalog # DY007) containing 96 well microplates, plate sealers, substrate solution, stop solution, plate coating buffer (PBS), block buffer, wash buffer, and Reagent Diluent Concentrate 1.

The components listed above may be purchased separately:

96 well microplates: (R&D Systems®, Catalog # DY990).

Plate Sealers: (R&D Systems®, Catalog # DY992).

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems®, Catalog # DY006).

Wash Buffer: 0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2-7.4 (R&D Systems®, Catalog # WA126).

Block Buffer: 5% Tween 20 in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems®, Catalog # DY004).

Reagent Diluent: Add 1.4 mL of Reagent Diluent Concentrate 1 (R&D Systems®, Catalog # DY997) to 98.6 mL of 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered.

Substrate Solution: 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (tetramethylbenzidine) (R&D Systems®, Catalog # DY999).

Stop Solution: 2 N H₂SO₄ (R&D Systems®, Catalog # DY994).

Also available for purchase:

Sample Activation Kit 1: 3 vials (10 mL/vial) of 1N HCL and 3 vials (10 mL/vial) of 1.2 N NaOH/0.5M HEPES (R&D Systems®, Catalog # DY010).

CALIBRATION

This DuoSet® is calibrated against a highly purified CHO cell-expressed recombinant human TGF-β1 produced at R&D Systems®.

PRECAUTIONS

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. The Color Reagent B suggested for use with this kit may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Refer to the SDS on our website prior to use.

REAGENT PREPARATION

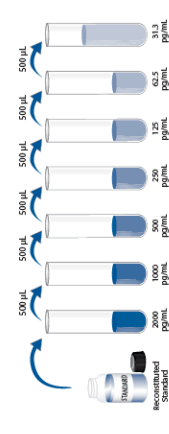
Bring all reagents to room temperature before use. Allow all components to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation after initial reconstitution. Working dilutions should be prepared and used immediately.

Streptavidin-HRP B: Each vial contains 2.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase. Dilute to the working concentration specified on the vial label using Reagent Diluent.

Mouse Anti-Human TGF-β1 Capture Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 0.5 mL of PBS. Dilute in PBS without carrier protein to the working concentration indicated on the C of A.

Biotinylated Chicken Anti-Human TGF-β1 Detection Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 1.0 mL of Reagent Diluent. Dilute in Reagent Diluent to the working concentration indicated on the C of A.

Recombinant Human TGF-β1 Standard: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 0.5 mL of Reagent Diluent. A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions in Reagent Diluent is recommended. Prepare 1000 µL of high standard per plate assayed at the concentration indicated on the C of A.



All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

ACTIVATION REAGENT PREPARATION

To activate latent TGF-β1 to the immunoreactive form, use **Sample Activation Kit 1** (R&D Systems®, Catalog # DY010) or prepare the following solutions for acid activation and neutralization. The solutions may be stored in polypropylene bottles at room temperature for up to one month.

Caution: Wear protective clothing and safety glasses during preparation or use of these reagents.

- 1 N HCl** (100 mL) - To 91.67 mL of deionized water, slowly add 8.33 mL of 12 N HCl. Mix well.
- 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES** (100 mL) - To 75 mL of deionized water, slowly add 12 mL of 10 N NaOH. Mix well. Add 11.9 g of HEPES. Mix well. Bring final volume to 100 mL with deionized water.

TGF-β1 SAMPLE ACTIVATION

To activate latent TGF-β1 to immunoreactive TGF-β1, follow the activation procedure outlined below. Assay samples after neutralization (pH 7.2-7.6). **Use polypropylene test tubes.**

Note: Do not activate the kit standards. The kit standards contain active recombinant TGF-β1.

CELL CULTURE SUPERNATE ASSAY	SERUM/PLASMA ASSAY
To 100 µL of cell culture supernate, add 20 µL of 1N HCL.	To 40 µL serum/plasma, add 20 µL of 1N HCL.
Mix well.	Mix well.
Incubate 10 minutes at RT.	Incubate 10 minutes at RT.
Neutralize the acidified sample by adding 20 µL of 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES.	Neutralize the acidified sample by adding 20 µL of 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES.
Mix well.	Mix well.
Assay immediately.	Prior to assay, dilute the activated sample 20-fold with Reagent Diluent.*
The concentration read off the standard curve must be multiplied by the dilution factor, 1.4.	The concentration read off the standard curve must be multiplied by the appropriate dilution factor.

*A suggested 20-fold dilution is 10 µL of activated sample + 190 µL of Reagent Diluent. (final dilution factor is 40).

Note: For each new lot of activation reagents, measure the pH of several representative samples after neutralization to ensure that it is within pH 7.2-7.6. Adjust the volume and corresponding dilution factor of the neutralization reagent as needed.

Cell Culture Supernates Note

Significant levels of latent TGF-β1 are found in bovine, porcine, equine, and caprine sera. The reported levels of TGF-β1 in bovine and fetal bovine sera can be as high as 16 ng/mL after activation (1, 2). Therefore, conditioned medium containing 10% fetal bovine serum can be expected to have a TGF-β1 concentration of about 1600 pg/mL. The background level of TGF-β1 in control medium can be determined and subtracted from samples of conditioned medium. As an alternative, the background level of TGF-β1 in medium can be lowered using the following procedure prior to assaying (reference 1 with modifications): After growth to confluence in medium containing 10% serum, the medium is changed to serum-free medium supplemented with 200 µg/mL crystalline BSA with four changes of medium over 12-24 hours. Cells are then switched to medium alone or medium containing 200 µg/mL crystalline BSA. Particular cell lines may require specific additions to the serum-free medium for maintenance. After 24 hours, the serum-free conditioned medium is clarified by centrifugation and samples are stored at ≤ -70 °C. Optionally, 2.0 µg/mL aprotinin, leupeptin, pepstatin A, and 120 µg/mL PMSF can be added before freezing. Thawed or fresh samples of serum-free or serum-containing conditioned medium are processed further as described above. If bovine serum added as a supplement to conditioned media exceeds 5%, further dilute the activated sample at least 2-fold using Reagent Diluent. The dilution as a result of the sample activation procedure (1.4-fold) should be taken into consideration in the final concentration of TGF-β1 in culture media samples.

Plasma Note

TGF-β1 is present in platelet granules and is released upon platelet activation. Therefore, to measure circulating levels of TGF-β1, platelet-poor plasma should be collected for measurement. It should be noted that many protocols for plasma preparation, including procedures recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), result in incomplete removal of platelets from blood. This will cause variable and irreproducible results for assays of factors contained in platelets and released by platelet activation.

REFERENCES

1. Danielpour, D. et al. (1989) Growth Factors 2:61.
2. Danielpour, D. et al. (1993) J. Immunol. Meth. 158:17.

DuoSet ELISA Equine IL-1ra/IL-1F3

REAGENSER OG UTSTYR.

DuoSet ELISA DuoSet Ancillary Reagent Kit 2	Equine IL-1ra/IL-1F3 cat. nr: DY2466, Lot: P109317 DY007. Plater, PBS til coating, Tape, 5 x Reagent Diluent 2, substrat A+B, Stop løsning og vaskebuffer.
Mikrotiterbrett til fortynning av prøver Reagensreservoar/petrisåler Multikanals pipette	
Capture antibody	144 µg geit-anti-equine IL-1 ra/IL-F3 løses i 1 ml PBS = 144 µg/ml, Lagre ved 2 – 8°C i opp til 8 weeks, aliquoter i - 70°C og lagre opptil 24 uker. Arbeidsfortynning = 0,8 µg/ml (1:180 fort, dvs. 66,7 µl + 11,9 ml til ett brett) i PBS uten carrier protein.
Diluent/Blokkeringsbuffer	Reagent diluent 2 (PBS med 1 % BSA). Ferdig kjøpt, Dy 995, 10x. Stabil i 30 dager etter åpning ved lagring 2- 8°C. Fortynn i cellekulturrenset vann til 1x.
Vaskebuffer, 25x	Hvis krystaller i konsentratet, varm til rom temperatur og bland forsiktig til oppløst. Fortynn fra 25 x løsning slik: 21 ml + 504 ml renset vann.
Standarder (3 stk/kit)	Rec equine IL-1ra/IL-1F3, 460 ng/ml når løst i 0,5 ml diluent, la stå i min 15 min med forsiktig blanding. Aliquoter og lagre ved -70 °C opp til 2 mnd. Lag 7 standarder, 2- fold i diluent, med høyeste konsentrasjon 20 ng/ml (1:23 dvs 45 + 990), 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, og 0,313 ng/ml). Hold ufort std på is til fortynning.
Detection antibody	Biotinylert Geit anti Equine IL-1ra/IL-1F3, 36 µg/ml når innholdet løses i 1 ml diluent. Lagre ved 2 – 8°C i opp til 60 dager, eller -20 til -70 °C i opptil 6 mnd. Arbeidsfortynning = 200 ng/ml (1:180, 66,7 µl + 11,9 ml til ett brett) i diluent.
Streptavidin-HRP, 1 ml	Lagres ved 2-8°C opptil 6 mnd etter åpning. Må IKKE fryses! Arbeidsfortynning 1:200 (60 µl + 11,94 ml til ett brett).
TMB substrat	Substrate Reagent Pack. Holdbar i 30 dager etter åpnet ved 2-8°C. Romtemperer før bruk og bland Color

Reagent A og Color Reagent B i like deler (12+12 pr brett) rett før bruk (dvs. 10 min eller mindre før bruk, beskytt mot lys).

Stopp løsning

1 M (= 2N) H₂SO₄, 50 µl til 100 µl.

METODE.

Alle reagensene skal ha romtemperatur!

1. Brettene coates med **0,8 µg/ml i PBS** uten carrier protein, 100 µl i hver brønn. Brettene forsegles, og inkuberes i romtemperatur over natt. (3 brett: 200 µl + 35,8 ml)
2. Brønnene vaskes 3 x med **400 µl 1x PBS Tween 20** (= vaskebuffer).
3. Tilsett **300 µl** blokkeringsløsning til hver brønn. Forsegl brettene og inkuber minimum 1 t ved romtemperatur.
4. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
5. Fortynn prøver 2-folds (1:8, 1:16 og 1:32, ustim 1:2) og standarder i diluent (rett før bruk). Tilsett 100 µl/brønn. Standardene settes opp med 2 paralleller. Forsegl og inkuber **2 t** ved romtemperatur. Husk blank!
6. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
7. Tilsett **100 µl** detection antibody, fortynnet til **200 ng/ml** i diluent, i hver brønn. Forsegl og inkuber **2 t** ved romtemperatur.
8. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
9. Tilsett **100 µl Streptavidin-HRP**, fortynnet **1:200 i diluent**, til hver brønn. Forsegl og inkuber i **20 min** ved romtemperatur (i mørke).
10. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
11. Tilsett **100 µl** substrat til hver brønn og inkuber i **20 min** ved romtemperatur. Settes mørkt.
12. Tilsett **50 µl 1 M H₂SO₄** til hver brønn for å stoppe reaksjonen. Rist forsiktig.
13. Les av ved **450 nm**.

Antigen:

Brett: 1

Dato:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<u>Fortynning</u>			8	16	32	8	16	32	8	16	32	
A		Std 1	Std 1	Blk	Blk	Blk	H8 ACS	H8 ACS	H8 ACS	H16 ACS	H16 ACS	H16 ACS	
B		Std 2	Std 2	H1 ACS	H1 ACS	H1 ACS	H9 ACS	H9 ACS	H9 ACS	H17 ACS	H17 ACS	H17 ACS	
C		Std 3	Std 3	H2 ACS	H2 ACS	H2 ACS	H10 ACS	H10 ACS	H10 ACS	H18 ACS	H18 ACS	H18 ACS	
D		Std 4	Std 4	H3 ACS	H3 ACS	H3 ACS	H11 ACS	H11 ACS	H11 ACS	H19 ACS	H19 ACS	H19 ACS	
E		Std 5	Std 5	H4 ACS	H4 ACS	H4 ACS	H12 ACS	H12 ACS	H12 ACS	H20 ACS	H20 ACS	H20 ACS	
F		Std 6	Std 6	H5 ACS	H5 ACS	H5 ACS	H13 ACS	H13 ACS	H13 ACS	H1 PRP	H1 PRP	H1 PRP	
G		Std 7	Std 7	H6 ACS	H6 ACS	H6 ACS	H14 ACS	H14 ACS	H14 ACS	H2 PRP	H2 PRP	H2 PRP	
H		Blk	Blk	H7 ACS	H7 ACS	H7 ACS	H15 ACS	H15 ACS	H15 ACS	H3 PRP	H3 PRP	H3 PRP	

Antigen:

Brett: 2

Dato:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<u>Fortynning</u>			8	16	32	8	16	32	8	16	32	
A		Std 1	Std 1	H4 PRP	H4 PRP	H4 PRP	H12 PRP	H12 PRP	H12 PRP	Blk	Blk	Blk	
B		Std 2	Std 2	H5 PRP	H5 PRP	H5 PRP	H13 PRP	H13 PRP	H13 PRP	H20 PRP	H20 PRP	H20 PRP	
C		Std 3	Std 3	H6 PRP	H6 PRP	H6 PRP	H14 PRP	H14 PRP	H14 PRP	H1 KON	H1 KON	H1 KON	
D		Std 4	Std 4	H7 PRP	H7 PRP	H7 PRP	H15 PRP	H15 PRP	H15 PRP	H2 KON	H2 KON	H2 KON	
E		Std 5	Std 5	H8 PRP	H8 PRP	H8 PRP	H16 PRP	H16 PRP	H16 PRP	H3 KON	H3 KON	H3 KON	
F		Std 6	Std 6	H9 PRP	H9 PRP	H9 PRP	H17 PRP	H17 PRP	H17 PRP	H4 KON	H4 KON	H4 KON	
G		Std 7	Std 7	H10 PRP	H10 PRP	H10 PRP	H18 PRP	H18 PRP	H18 PRP	H5 KON	H5 KON	H5 KON	
H		Blk	Blk	H11 PRP	H11 PRP	H11 PRP	H19 PRP	H19 PRP	H19 PRP	H6 KON	H6 KON	H6 KON	

Antigen:

Brett: 3

Dato:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<u>Fortynning</u>			8	16	32	2/8	2/16	2/32	2	2	2	2
A		Std 1	Std 1	H7 KON	H7 KON	H7 KON	H15 KON	H15 KON	H15 KON	H8 Ustim	H8 Ustim	H16 Ustim	H16 Ustim
B		Std 2	Std 2	H8 KON	H8 KON	H8 KON	H16 KON	H16 KON	H16 KON	H9 Ustim	H9 Ustim	H17 Ustim	H17 Ustim
C		Std 3	Std 3	H9 KON	H9 KON	H9 KON	H17 KON	H17 KON	H17 KON	H10 Ustim	H10 Ustim	H18 Ustim	H18 Ustim
D		Std 4	Std 4	H10 KON	H10 KON	H10 KON	H18 KON	H18 KON	H18 KON	H11 Ustim	H11 Ustim	H19 Ustim	H19 Ustim
E		Std 5	Std 5	H11 KON	H11 KON	H11 KON	H19 KON	H19 KON	H19 KON	H12 Ustim	H12 Ustim	H20 Ustim	H20 Ustim
F		Std 6	Std 6	H12 KON	H12 KON	H12 KON	H20 KON	H20 KON	H20 KON	H13 Ustim	H13 Ustim	Blk	Blk
G		Std 7	Std 7	H13 KON	H13 KON	H13 KON	H6 Ustim	H6 Ustim	H6 Ustim	H14 Ustim	H14 Ustim	Blk	Blk
H		Blk	Blk	H14 KON	H14 KON	H14 KON	H7 Ustim	H7 Ustim	H7 Ustim	H15 Ustim	H15 Ustim	Blk	Blk

DuoSet ELISA Human IGF-I

REAGENSER OG UTSTYR.

DuoSet ELISA Ancillary Reagent kit 3	Human IGF-I cat. nr: DY291 Plater, PBS til coating (60 ml), Tape, 5 x Reagent Diluent 3, 20 x PBS til fortynning av dil, substrat A+B, Stop løsning og vaskebuffer (F-brønn) til fortynning av prøver evt 1,5 ml rør til std.
Mikrotiterbrett Reagensreservoar/petrisåler Multikanals pipetter	
Capture antibody (840264)	Lot BIM1114091: 240 µg mus-anti-IGF-I løses i 0,5 ml PBS = 480 µg/ml . Lagre ved 2 – 8°C i opp til 8 uker, eller aliquoter i 70°C i opptil 3 mnd. Arbeidsfortynning 4 µg/ml (=1:120 fort, dvs. 100 µl + 11,9 ml til ett brett) i PBS uten carrier protein = ELISA plate coating buffer i Ancillary Reagent Kit 3.
1x PBS	20x PBS fortynnes slik: 3 ml + 57 ml dest vann.
Reagent Diluent 3, DY004	Reagent Diluent Concentrate 3 (5x), (Lot P144790), 25 % Tween 20 i PBS med 0,05 % NaN₃ . Fortynnes 1:5 (12 ml + 48 ml) i 1x PBS pH 7,2 – 7,4, før bruk til 5 % Tween 20 , lagre ved 2-8°C og brukes innen 1 mnd.
Blokkeringsløsning	= 1x Reagent diluent 3 (300 µl/brønn)
Vaskebuffer 25x	0,05 % Tween 20 i PBS . Fortynn 25x Wash buffer slik: 21 ml + 504 ml dest vann.
Standarder (3 stk/kit)	Lot 1360091, 55 ng : Rec equine IGF-I: 110 ng/ml (= 110 000 pg/ml), når løst i 0,5 ml dest. vann , la stå i min 15 min med forsiktig blanding. Aliquoter og lagre ved -70°C opp til 3 mnd. Lag 7 standarder, 2- fold i diluent, med høyeste konsentrasjon 2000 pg/ml. (dvs. 2000 (1:55), 1000, 500, 250, 125, 62,5 og 31,25 pg/ml). Hold ufortynnete std på is.
Detection antibody	Lot AJ1214091: Biotinylert chicken anti humant IGF-I (840265), 9000 ng/ml når løst i 1 ml diluent. Lagre ved 2 – 8°C i opp til 60 dager, eller -20 til -70 °C i opptil 6 mnd. Arbeidskonsentrasjon = 150 ng/ml (=1:60 fortynning, 200 µl + 11,8 ml til ett brett) i reagent diluent 3.

Streptavidin-HRP, 2 ml	Lot 322712. Lagres ufortynnet ved 2-8°C opptil 3 mnd etter åpning. Må IKKE fryses! Arbeidsfortynning 1:40 (300 µl + 11,7 ml) i reagent diluent.
TMB substrat	Substrate Reagent Pack. Holdbar i 30 dager etter åpnet ved 2-8°C. Romtemperer før bruk og bland Color Reagent A og Color Reagent B i like deler rett før bruk (dvs. maks 10 min før bruk, beskytt mot lys).
Stopp løsning	1 M (= 2N) H ₂ SO ₄ , 50 µl til 100 µl substrat.

METODE.

Alle reagensene skal ha romtemperatur!

1. Brettene coates med **4 µg/ml Capture Antibody i PBS** uten carrier protein, **100 µl** i hver brønn. Brettene forsegles, og inkuberes i romtemperatur **over natt**.
2. Brønnene vaskes **3 x** med **400 µl** vaskebuffer.
3. Tilsett **300 µl** blokkeringsløsning til hver brønn. Forsegl brettene og inkuber minimum 1 t ved romtemperatur.
4. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
5. Fortynn prøver 1:2 og standarder i diluent (rett før bruk). Tilsett 100 µl/brønn. Standardene og prøvene settes opp med 2 paralleller. Forsegl og inkuber **2 t** ved romtemperatur. Husk blank.
6. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
7. Tilsett **100 µl detection antibody**, fortynnet til **150 ng/ml i diluent**, i hver brønn. Forsegl og inkuber **2 t** ved romtemperatur.
8. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
9. Tilsett **100 µl Streptavidin-HRP**, fortynnet **1:40 i diluent**, til hver brønn. Forsegl og inkuber i **20 min** ved romtemperatur.
10. Sett på Elisaleseren.
11. Gjenta vask, **3 x**, som i pkt. 2.
12. Tilsett **100 µl TMB substrat** til hver brønn og inkuber i **20 min** ved romtemperatur. **Settes mørkt.**
13. Tilsett **50 µl 1 M H₂SO₄** til hver brønn for å stoppe reaksjonen. Rist forsiktig.

14. Les av ved **450 nm**. Hvis bølgelengde korreksjon er tilgjengelig les av ved 540 nm og 570 nm. Hvis ikke subtraher 540 el 570 med avlesningene ved 450 nm. Korrigerer for optiske imperfeksjoner i platen.

Antigen: Humant IGF-1 **Brett: 1** **Dato:**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				1:2		1:2		1:2		1:2		1:2	
A		Std 1	Std 1	Blk	Blk	H8 ACS		H16 ACS		H4 PRP		H12 PRP	
B		Std 2	Std 2	H1 ACS		H9 ACS		H17 ACS		H5 PRP		H13 PRP	
C		Std 3	Std 3	H2 ACS		H10 ACS		H18 ACS		H6 PRP		H14 PRP	
D		Std 4	Std 4	H3 ACS		H11 ACS		H19 ACS		H7 PRP		H15 PRP	
E		Std 5	Std 5	H4 ACS		H12 ACS		H20 ACS		H8 PRP		H16 PRP	
F		Std 6	Std 6	H5 ACS		H13 ACS		H1 PRP		H9 PRP		H17 PRP	
G		Std 7	Std 7	H6 ACS		H14 ACS		H2 PRP		H10 PRP		H18 PRP	
H		Blk	Blk	H7 ACS		H15 ACS		H3 PRP		H11 PRP		H19 PRP	

Coatingbuffer: Elisa Plate Coating buffer

Diluent: Reag dil 3 fortennet i PBS

Serum: 1:2 i diluent

Capture antibody:

Detection antibody: 1:60 i diluent

Ettercoat:

Streptavidin-HRP: 1:40 i diluent

Vask:

Substrat: A + B

Antigen: Humant IgF-1 **Brett: 2** **Dato:**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				1:2		1:2		1:2		1:2		1:2	
A		Std 1	Std 1	Blk	Blk	H7 KON		H15 KON		H8 Ustim		H16 Ustim	
B		Std 2	Std 2	H20 PRP		H8 KON		H16 KON		H9 Ustim		H17 Ustim	
C		Std 3	Std 3	H1 KON		H9 KON		H17 KON		H10 Ustim		H18 Ustim	
D		Std 4	Std 4	H2 KON		H10 KON		H18 KON		H11 Ustim		H19 Ustim	
E		Std 5	Std 5	H3 KON		H11 KON		H19 KON		H12 Ustim		H20 Ustim	
F		Std 6	Std 6	H4 KON		H12 KON		H20 KON		H13 Ustim		Blk	Blk
G		Std 7	Std 7	H5 KON		H13 KON		H6 Ustim		H14 Ustim		Blk	Blk
H		Blk	Blk	H6 KON		H14 KON		H7 Ustim		H15 Ustim		Blk	Blk

DuoSet ELISA Human TGF- β 1

REAGENSER OG UTSTYR.

Activation kit 1, DY010	Syre aktivering og nøytralisering
DuoSet ELISA	Human TGF-β1 cat. nr: DY240
DuoSet Ancillary Reagent Kit 1	DY007. Plater, PBS til coating, Tape, 5 x Reagent Diluent 1, Blokkeringsbuffer, 20x PBS, substrat A+B, Stop løsning og vaskebuffer.
Mikrotiterbrett (F-brønn) til fortynning av prøver evnt 1,5 ml rør til std.	
Reagensreservoar/petrisåler	
Multikanals pipetter	
Capture antibody	120 μg mus-anti-TGF- β 1 løses i 0,5 ml PBS = 240 μg/ml . Lagre ved 2 – 8°C i opp til 60 dager, eller aliquoter i -70°C i opptil 3 mnd. Arbeidsfortynning 2 μg/ml (=1:120 fort, dvs. 100 μ l + 11,9 ml til ett brett) i PBS uten carrier protein.
Reagent Diluent 1, DY997	Diluent (PBS med 1,4 % BSA). Ferdig kjøpt, Reagent Diluent, 840149 . Stabil i 60 dager etter åpning ved lagring 2-8°C. Fortynn (1,4 ml + 98,6 ml), i vaskebuffer, lagre ved 2-8°C og brukes innen 8 timer .
Blokkeringsløsning	Reagent Diluent 3, fortynn 8 ml 5x + 32 ml 1x PBS
Vaskebuffer	PBS med 0,05 % Tween 20, pH 7,2 – 7,4, fortynnet fra 20x løsning, se oppskrift bufferperm ved vektene.
Standarder (3 stk/kit)	Rec equine TGF- β 1 90 ng/ml (= 90 000 pg/ml), når løst i 0,5 ml diluent, la stå i min 15 min med forsiktig blanding. Aliquoter og lagre ved -70°C opp til 2 mnd. Lag 6 standarder, 2- fold i diluent, med høyeste konsentrasjon 2000 pg/ml. (dvs. 2000 (1:45), 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 pg/ml). Hold ufortynnede std på is.
Detection antibody	Biotinylert chicken anti humant TGF- β 1 (840117), 3 μg/ml (3000 ng/ml) når løst i 1 ml diluent. Lagre ved 2 – 8°C i opp til 60 dager, eller -20 til -70 °C i opptil 6 mnd. Arbeidskonsentrasjon = 50 ng/ml (=1:60 fortynning, 200 μ l + 11,8 ml til ett brett) i diluent.
Streptavidin-HRP, 2 ml	Lagres ved 2-8°C opptil 6 mnd etter åpning. Må IKKE fryses! Arbeidsfortynning 1:40 (300 μ l + 11,7 ml) i Diluent.
TMB substrat	Substrate Reagent Pack. Holdbar i 30 dager etter åpnet ved 2-8°C. Romtemperer før bruk og bland Color Reagent A og

Color Reagent B i like deler rett før bruk (dvs. maks 10 min før bruk, beskytt mot lys).

Stopp løsning 1 M (= 2N) H₂SO₄, 50 µl til 100 µl substrat.

METODE.

Alle reagensene skal ha romtemperatur!

Forbehandling av sera:

Tilsett til 40 µl serum/plasma 20 µl 1 M HCl og bland godt. Inkuber i 10 min ved romtemperatur. Nøytraliser ved å tilsette 20 µl 1,2 M NaOH/0,5 M Hepes. Bland godt. Prøven er nå fortynnet 1:2.

1. Brettene coates med **2 µg/ml** mus-anti-TGF-β1 i **PBS** uten carrier protein, **100 µl** i hver brønn. Brettene forsegl, og inkuberes i romtemperatur **over natt**.
2. Brønnene vaskes **3 x** med **400 µl PBS Tween 20** (= vaskebuffer).
3. Tilsett **300 µl** blokkeringsløsning til hver brønn. Forsegl brettene og inkuber minimum 1 t ved romtemperatur.
4. Gjenta vask **3 x**, som i pkt. 2.
5. Fortynn de forbehandlede prøvene 1:20 (10+190, de blir da fortynnet 1:40) og standarder i diluent (rett før bruk). Tilsett 100 µl/brønn. Både prøvene og standardene settes opp med 2 paralleller. Forsegl og inkuber **2 t** ved romtemperatur. Husk blank.
6. Gjenta vask **5 x**, som i pkt. 2.
7. Tilsett **100 µl detection antibody**, fortynnet til **50 ng/ml i diluent**, i hver brønn. Forsegl og inkuber **2 t** ved romtemperatur.
8. Gjenta vask **5 x**, som i pkt. 2.
9. Tilsett **100 µl Streptavidin-HRP**, fortynnet **1:40 i diluent**, til hver brønn. Forsegl og inkuber i **20 min** ved romtemperatur.
10. Gjenta vask, **5 x**, som i pkt. 2.
11. Tilsett **100 µl TMB substrat** til hver brønn og inkuber i **20 min** ved romtemperatur. **Settes mørkt**.
12. Tilsett **50 µl 1 M H₂SO₄** til hver brønn for å stoppe reaksjonen. Rist forsiktig.
13. Les av ved **450 nm**.

Antigen: **Humant TGF-β1**

Brett: **1**

Dato:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				1:20		1:20		1:20		1:20		1:20	
A		Std 1	Std 1	Blk	Blk	H8 ACS	H8 ACS	H16 ACS	H16 ACS	H4 PRP	H4 PRP	H12 PRP	H12 PRP
B		Std 2	Std 2	H1 ACS	H1 ACS	H9 ACS	H9 ACS	H17 ACS	H17 ACS	H5 PRP	H5 PRP	H13 PRP	H13 PRP
C		Std 3	Std 3	H2 ACS	H2 ACS	H10 ACS	H10 ACS	H18 ACS	H18 ACS	H6 PRP	H6 PRP	H14 PRP	H14 PRP
D		Std 4	Std 4	H3 ACS	H3 ACS	H11 ACS	H11 ACS	H19 ACS	H19 ACS	H7 PRP	H7 PRP	H15 PRP	H15 PRP
E		Std 5	Std 5	H4 ACS	H4 ACS	H12 ACS	H12 ACS	H20 ACS	H20 ACS	H8 PRP	H8 PRP	H16 PRP	H16 PRP
F		Std 6	Std 6	H5 ACS	H5 ACS	H13 ACS	H13 ACS	H1 PRP	H1 PRP	H9 PRP	H9 PRP	H17 PRP	H17 PRP
G		Std 7	Std 7	H6 ACS	H6 ACS	H14 ACS	H14 ACS	H2 PRP	H2 PRP	H10 PRP	H10 PRP	H18 PRP	H18 PRP
H		Blk	Blk	H7 ACS	H7 ACS	H15 ACS	H15 ACS	H3 PRP	H3 PRP	H11 PRP	H11 PRP	H19 PRP	H19 PRP

Coatingbuffer: Elisa Plate Coating buffer

Capture antibody: Mus-anti-TGF-β1

Ettercoat: Reagent Diluent 3 fort i PBS

Vask: 3x 400 µl

Diluent: Reagent diluent 3 fortyntet i PBS

Detection antibody: 1:60 i reagent diluent 1

Streptavidin-HRP: 1:40 i reagent diluent 1

Substrat: A + B

Serum: 1:2 i aktivering og 1:20 i dil = 1:40

Antigen: **Humant TGF-β1**

Brett: **2**

Dato:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				1:20		1:20		1:20		1:20		1:20	
A		Std 1	Std 1	Blk	Blk	H7 KON	H7 KON	H15 KON	H15 KON	H8 Ustim	H8 Ustim	H16 Ustim	H16 Ustim
B		Std 2	Std 2	H20 PRP	H20 PRP	H8 KON	H8 KON	H16 KON	H16 KON	H9 Ustim	H9 Ustim	H17 Ustim	H17 Ustim
C		Std 3	Std 3	H1 KON	H1 KON	H9 KON	H9 KON	H17 KON	H17 KON	H10 Ustim	H10 Ustim	H18 Ustim	H18 Ustim
D		Std 4	Std 4	H2 KON	H2 KON	H10 KON	H10 KON	H18 KON	H18 KON	H11 Ustim	H11 Ustim	H19 Ustim	H19 Ustim
E		Std 5	Std 5	H3 KON	H3 KON	H11 KON	H11 KON	H19 KON	H19 KON	H12 Ustim	H12 Ustim	H20 Ustim	H20 Ustim
F		Std 6	Std 6	H4 KON	H4 KON	H12 KON	H12 KON	H20 KON	H20 KON	H13 Ustim	H13 Ustim	Blk	Blk
G		Std 7	Std 7	H5 KON	H5 KON	H13 KON	H13 KON	H6 Ustim	H6 Ustim	H14 Ustim	H14 Ustim	Blk	Blk
H		Blk	Blk	H6 KON	H6 KON	H14 KON	H14 KON	H7 Ustim	H7 Ustim	H15 Ustim	H15 Ustim	Blk	Blk

REAGENTS SUPPLIED

Note: Store all reagents at 2 – 8°C

Reagents Supplied	Catalog Number	Volume	Quantity
Equine Cytokine Standard	EQCYT-8093	Lyophilized	1 vial
Equine Cytokine Quality Controls 1 and 2	EQCYT-6093	Lyophilized	1 vial each
Serum Matrix	MXEQ-SM	Lyophilized	1 vial
Set of one 96-Well Plate with 2 sealers	-----	-----	1 plate 2 sealers
Bead Diluent (<i>not provided with premixed panel</i>)	LBD	3.5 mL	1 vial
Assay Buffer	L-AB	30 mL	1 bottle
10X Wash Buffer Note: Contains 0.05% Proclin	L-WB	60 mL	1 bottle
Equine Cytokine Detection Antibodies	EQCYT-1093	3.2 mL	1 bottle
Streptavidin-Phycoerythrin	L-SAPE10	3.2 mL	1 bottle
Mixing Bottle (<i>not provided with premixed panel</i>)	-----	-----	1 bottle

Equine Cytokine Antibody-Immobilized Premixed Magnetic Beads:

Premixed 23-plex Beads	EQCYPMX23-MAG	3.5 mL	1 bottle
------------------------	---------------	--------	----------

Included Equine Cytokine Antibody-Immobilized Beads are dependent on customizable selection of analytes within the panel (next page).

Equine Cytokine Antibody-Immobilized Magnetic Beads:

Bead/Analyte Name	Luminex® Magnetic Bead Region	Customizable 23 Analytes 50X concentration, 90µL Available	Cat. #	23-Plex Magnetic Premixed Beads
Anti-FGF2 Bead	13	✓	HCYFGF2-MAG	✓
Anti-Eotaxin Bead	14	✓	HETXN-MAG	✓
Anti-G-CSF Bead	18	✓	HGCSF-MAG	✓
Anti-IL1 α Bead	19	✓	RIL1A-MAG	✓
Anti-GM-CSF Bead	20	✓	HGMCSF-MAG	✓
Anti-Fractalkine Bead	21	✓	HFKN-MAG	✓
Anti-IL13 Bead	25	✓	EIL13-MAG	✓
Anti-IL5 Bead	30	✓	EIL5-MAG	✓
Anti-IL18 Bead	33	✓	EIL18-MAG	✓
Anti-IL1 β Bead	35	✓	EIL1B-MAG	✓
Anti-IL6 Bead	37	✓	EIL6-MAG	✓
Anti-IL17A Bead	39	✓	HIL17-MAG	✓
Anti-IL2 Bead	44	✓	EIL2-MAG	✓
Anti-IL4 Bead	46	✓	EIL4-MAG	✓
Anti-IL12p70 Bead	52	✓	RIL12P70-MAG	✓
Anti-IFN γ Bead	53	✓	EIFNG-MAG	✓
Anti-IL8 Bead	55	✓	FIL8-MAG	✓
Anti-IP10 Bead	57	✓	MIP10-MAG	✓
Anti-GRO Bead	61	✓	MKC-MAG	✓
Anti-MCP1 Bead	62	✓	MCYMCP1-MAG	✓
Anti-IL10 Bead	67	✓	EIL10-MAG	✓
Anti-TNF α Bead	77	✓	ETNFA-MAG	✓
Anti-RANTES Bead	78	✓	RRNTS-MAG	✓

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

A. Preparation of Serum Samples:

- Allow the blood to clot for at least 30 minutes before centrifugation for 10 minutes at 1000xg. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Avoid multiple (>2) freeze/thaw cycles.
- When using frozen samples, it is recommended to thaw the samples completely, mix well by vortexing and centrifuge prior to use in the assay to remove particulates.
- Serum samples should be neat.

B. Preparation of Plasma Samples:

- Plasma collection using EDTA as an anti-coagulant is recommended. Centrifuge for 10 minutes at 1000xg within 30 minutes of blood collection. Remove plasma and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Avoid multiple (>2) freeze/thaw cycles.
- When using frozen samples, it is recommended to thaw the samples completely, mix well by vortexing and centrifuge prior to use in the assay to remove particulates.
- Plasma samples should be diluted neat.

C. Preparation of Tissue Culture Supernatant:

- Centrifuge the sample to remove debris and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Avoid multiple (>2) freeze/thaw cycles.
- Tissue culture supernatant may require a dilution with an appropriate control medium prior to assay. Tissue/cell extracts should be done in neutral buffers containing reagents and conditions that do not interfere with assay performance. Excess concentrations of detergent, salt, denaturants, high or low pH, etc. will negatively affect the assay. Organic solvents should be avoided. The tissue/cell extract samples should be free of particles such as cells or tissue debris.

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE (continued)

NOTE:

- A maximum of 25 µL per well of neat serum or plasma can be used. Tissue culture or other media may also be used.
- All samples must be stored in polypropylene tubes. **DO NOT STORE SAMPLES IN GLASS.**
- Avoid debris, lipids and cells when using samples with gross hemolysis or lipemia.
- Care must be taken when using heparin as an anti-coagulant since an excess of heparin will provide falsely high values. Use no more than 10 IU heparin per mL of blood collected.

PREPARATION OF REAGENTS FOR IMMUNOASSAY

A. Preparation of Antibody-Immobilized Beads

If premixed beads are used, sonicate the premixed bead bottle 30 seconds and then vortex for 1 minute before use.

For individual vials of beads, sonicate each antibody-bead vial for 30 seconds; vortex for 1 minute. Add 60 µL from each antibody-bead vial to the Mixing Bottle and bring final volume to 3.0 mL with bead diluent. Vortex the mixed beads well. Unused portion may be stored at 2-8°C for up to one month. (Note: Due to the composition of magnetic beads, you may notice a slight color in the bead solution. This does not affect the performance of the beads or the kit.)

Example 1: When using 3 antibody-immobilized beads, add 60 µL from each of the 3 bead vials to the Mixing Bottle. Then add 2.820 mL bead diluent.

Example 2: When using 20 antibody-immobilized beads, add 60 µL from each of the 20 bead vials to the Mixing Bottle. Then add 1.8 mL bead diluent.

B. Preparation of Quality Controls

Before use, reconstitute Quality Control 1 and Quality Control 2 with 250 µL deionized water. Invert the vial several times to mix and vortex. Allow the vial to sit for 5-10 minutes. Unused portion may be stored at ≤ -20°C for up to one month.

C. Preparation of Wash Buffer

Bring the 10X Wash Buffer to room temperature and mix to bring all salts into solution. Dilute 60 mL of 10X Wash Buffer (two bottles) with 540 mL deionized water. Store the unused portion at 2-8°C for up to one month.

D. Preparation of Serum Matrix

This step is required for serum or plasma samples only.

Add 1 mL water to the bottle containing lyophilized Serum Matrix. Mix well. Allow at least 10 minutes for complete reconstitution. Leftover reconstituted Serum Matrix should be stored at ≤ -20°C for up to one month.

PREPARATION OF REAGENTS FOR IMMUNOASSAY (continued)

E. Preparation of Equine Cytokine Standard

1.) Prior to use, reconstitute the Equine Cytokine Standard with 250 μL deionized water. Refer to table below for analyte concentrations. Invert the vial several times to mix. Vortex the vial for 10 seconds. Allow the vial to sit for 5-10 minutes. This will be used as Standard 6; the unused portion may be stored at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ for up to one month.

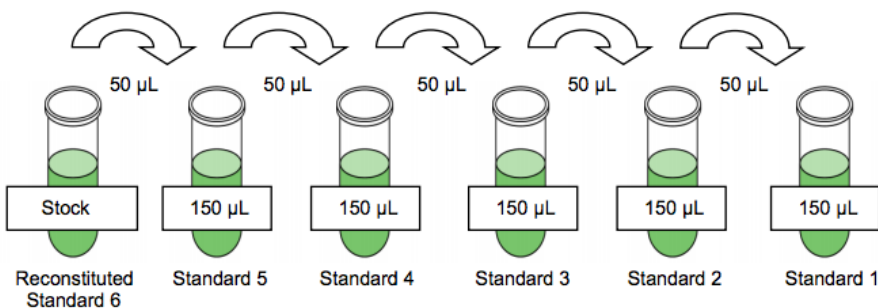
2). Preparation of Working Standards

Label 5 polypropylene microfuge tubes Standard 1 through Standard 5. Add 150 μL of Assay Buffer to each of the 5 tubes. Prepare serial dilutions by adding 50 μL of the reconstituted standard to the Standard 5 tube, mix well and transfer 50 μL of Standard 5 to the Standard 4 tube, mix well and transfer 50 μL of Standard 4 to the Standard 3 tube, mix well and transfer 50 μL of Standard 3 to the Standard 2 tube, mix well and transfer 50 μL of Standard 2 to the Standard 1 tube and mix well. The 0 pg/mL standard (Background) will be Assay Buffer.

Standard #	Volume of Deionized Water to Add	Volume of Standard to Add
Standard 6	250 μL	0

Standard #	Volume of Assay Buffer to Add	Volume of Standard to Add
Standard 5	150 μL	50 μL of Standard 6
Standard 4	150 μL	50 μL of Standard 5
Standard 3	150 μL	50 μL of Standard 4
Standard 2	150 μL	50 μL of Standard 3
Standard 1	150 μL	50 μL of Standard 2

Preparation of Standards



PREPARATION OF REAGENTS FOR IMMUNOASSAY (continued)

2). Preparation of Working Standards (continued)

Standard	FGF-2 (pg/mL)	Eotaxin (pg/mL)	G-CSF (pg/mL)
Standard 1	24	7	78
Standard 2	98	27	312
Standard 3	391	109	1250
Standard 4	1,563	438	5,000
Standard 5	6,250	1,750	20,000
Standard 6	25,000	7,000	80,000

Standard	IL-1α, IL-8 (pg/mL)	GM-CSF, RANTES (pg/mL)	Fractalkine (pg/mL)
Standard 1	59	5	586
Standard 2	234	20	2,344
Standard 3	938	78	9,375
Standard 4	3,750	313	37,500
Standard 5	15,000	1,250	150,000
Standard 6	60,000	5,000	600,000

Standard	IL-13, IL-12p70 (pg/mL)	IL-5, IL-6, IL-17A, IL-2, IP-10 (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)
Standard 1	39	15	34
Standard 2	156	59	137
Standard 3	625	234	547
Standard 4	2,500	938	2,188
Standard 5	10,000	3,750	8,750
Standard 6	40,000	15,000	35,000

PREPARATION OF REAGENTS FOR IMMUNOASSAY (continued)

Standard	IL-1β (pg/mL)	MCP-1 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
Standard 1	29	342	293
Standard 2	117	1,367	1,172
Standard 3	469	5,469	4,688
Standard 4	1,875	21,875	18,750
Standard 5	7,500	87,500	75,000
Standard 6	30,000	350,000	300,000

Standard	IFNγ (pg/mL)	GRO (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
Standard 1	488	6	49
Standard 2	1,953	23	195
Standard 3	7,813	94	781
Standard 4	31,250	375	3,125
Standard 5	125,000	1,500	12,500
Standard 6	500,000	6,000	50,000

Standard	TNFα (pg/mL)
Standard 1	4
Standard 2	16
Standard 3	63
Standard 4	250
Standard 5	1,000
Standard 6	4,000

IMMUNOASSAY PROCEDURE

- Prior to beginning this assay, it is imperative to read this protocol completely and to thoroughly understand the Technical Guidelines.
- Allow all reagents to warm to room temperature (20-25°C) before use in the assay.
- Diagram the placement of Standards [0 (Background), [Standard 1 through 6], Controls 1 and 2, and Samples on Well Map Worksheet in a vertical configuration. (Note: Most instruments will only read the 96-well plate vertically by default.) It is recommended to run the assay in duplicate.
- If using a filter plate, set the filter plate on a plate holder at all times during reagent dispensing and incubation steps so that the bottom of the plate does not touch any surface.

1. Add 200 µL of wash buffer into each well of the plate. Seal and mix on a plate shaker for 10 minutes at room temperature (20-25°C).
2. Decant wash buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times.
3. Add 25 µL of each Standard or Control into the appropriate wells. Assay buffer should be used for 0 pg/mL standard (Background).
4. Add 25 µL of assay buffer to the sample wells.
5. Add 25 µL of appropriate matrix solution to the background, standards, and control wells. When assaying serum or plasma, use the serum matrix. When assaying tissue culture or other supernatant, use proper control culture medium as the matrix solution.
6. Add 25 µL of Sample (neat) into the appropriate wells.
7. Vortex Mixing Bottle and add 25 µL of the Mixed or Premixed Beads to each well. (Note: During addition of Beads, shake bead bottle intermittently to avoid settling.)
8. Seal the plate with a plate sealer. Wrap the plate with foil and incubate with agitation on a plate shaker overnight (16-18 hours) at 2-8°C. Alternatively, incubate for 2 hours at room temperature (20-25°C), but the overall performance, including sensitivity may be less than compared to the overnight incubation.
9. Gently remove well contents and wash plate 3 times following instructions listed in the **PLATE WASHING** section.

Add 200 µL wash buffer per well



Shake 10 min, RT
Decant

- Add 25 µL Standard or Control to appropriate wells
- Add 25 µL assay buffer to background and sample wells
- Add 25 µL appropriate matrix solution to background, standards, and control wells
- Add 25 µL (neat) Samples to sample wells
- Add 25 µL Beads to each well



Incubate overnight (16-18 hours) at 2-8°C or 2 hours at room temperature (20-25°C)

10. Add 25 μ L of Detection Antibodies into each well. (Note: Allow the Detection Antibodies to warm to room temperature prior to addition.)
11. Seal, cover with foil and incubate with agitation on a plate shaker for 1 hour at room temperature (20-25°C). **DO NOT ASPIRATE AFTER INCUBATION.**
12. Add 25 μ L Streptavidin-Phycoerythrin to each well containing the 25 μ L of Detection Antibodies.
13. Seal, cover with foil and incubate with agitation on a plate shaker for 30 minutes at room temperature (20-25°C).
14. Gently remove well contents and wash plate 3 times following instructions listed in the **PLATE WASHING** section.
15. Add 150 μ L of Sheath Fluid (or Drive Fluid if using MAGPIX[®]) to all wells. Resuspend the beads on a plate shaker for 5 minutes.
16. Run plate on Luminex[®] 200[™], HTS, FLEXMAP 3D[®] or MAGPIX[®] with xPONENT[®] software.
17. Save and analyze the Median Fluorescent Intensity (MFI) data using a 5-parameter logistic or spline curve-fitting method for calculating analyte concentrations in samples. (Note: *No sample dilution is required for this assay.*)

Remove well contents and wash 3X with 200 μ L Wash Buffer



Add 25 μ L Detection Antibodies per well

Incubate 1 hour at RT



Do Not Aspirate

Add 25 μ L Streptavidin-Phycoerythrin per well

Incubate for 30 minutes at RT



Remove well contents and wash 3X with 200 μ L Wash Buffer

Add 150 μ L Sheath Fluid or Drive Fluid per well

Read on Luminex[®] (100 μ L, 50 beads per bead set)

WELL MAP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 pg/mL Standard (Background)	Standard 4	QC-2 Control									
B	0 pg/mL Standard (Background)	Standard 4	QC-2 Control									
C	Standard 1	Standard 5	Sample 1									
D	Standard 1	Standard 5	Sample 1									
E	Standard 2	Standard 6	Sample 2									
F	Standard 2	Standard 6	Sample 2									
G	Standard 3	QC-1 Control	Etc.									
H	Standard 3	QC-1 Control										



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no