

## Effekt av dexametason på olika biokemiska variabler hos häst

Harold Tvedten<sup>1</sup>, Ulrika Falkenö<sup>2</sup>, Carl Ekstrand<sup>3</sup>, Carina Ingvast Larsson<sup>3</sup> o Inger Lilliehöök<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Inst för Kliniska Vetenskaper, <sup>2</sup> Klinisk kemiska laboratoriet, UDS, <sup>3</sup> Inst för biomedicin och folkhälsovetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

### Bakgrund

Glukokortikoidbehandling av hästar är väldigt vanlig och ges ofta "symptomatiskt" vilket innebär att behandling sätts in mot symptom som inflammation, smärta och feber. Detta händer ofta innan en fast diagnos är ställd. Blodprover ingår i de flesta medicinska utredningar på sjuka hästar. Eftersom kortisonbehandling påverkar patienten på olika sätt som i sin tur kan påverka blodprovresultat, innebär att det kan bli svårare att ställa en korrekt diagnos om man inte vet vilka förändringar som beror på kortisonet.

Syntetiska glukokortikoider används som behandling framförallt vid inflammatoriska och immunmedierade sjukdomar. Utöver de effekter som glukokortikoiderna har på inflammation och immunsystemet har de även en rad biverkningar till följd av deras metabola egenskaper. De stimulerar till nedbrytning av fett och proteiner samt ökad glukoneogenes och leder till minskad muskelmassa, minskad benmassa, ökat blodglukos, minskad perifer användning av glukos och ökad glykogeninlagring i levern. Detta gör att många metabola parametrar påverkas av behandling med glukokortikoider. Det är viktigt att vi förstår hur dexametason och andra glukokortikoider påverkar biokemiska parametrar och på vilket sätt man ska ta hänsyn till det i tolkning av provsvar. Det finns bara några få tidigare studier på häst som beskriver effekt av dexametason på glukos/fettmetabolism (Abraham et al. 2011, Tiley et al. 2007) respektive elektrolyter/mineraler (Eiler et al 1979, Smith et al. 1986).

Med tanke på antidopningsarbetet inom hästsporten söker vi dessutom efter ytterligare biomarkörer i syfte att korrelera plasmakoncentrationen av dexametason till effekten (så kallad kvantitativ farmakokinetik/farmakodynamik). Mer kunskap inom det området kan ge ytterligare vetenskapligt stöd till antidopningsarbetet, samt underlätta optimal dosering av dexametason för den kliniska användningen och minska bieffekter. För att glukokortikoider även fortsättningsvis (trots ökad analyskänslighet vid dopningskontroll-laboratorierna) ska kunna användas inom hästsporten utan risk att för dopningsmisstankar vid påvisande av rests substanser från adekvat läkemedelsbehandling, krävs studier för att kunna fastställa rapporteringsnivåer (nivåer av läkemedel i plasma som har en vetenskaplig dokumentation till grund för att säkerställa att koncentrationer under rapporteringsnivån inte utövar effekt på

hästen). Detta är ett krav framförallt med tanke på att våra sporthästar måste kunna erbjudas adekvat behandling vid sjukdom utan att säkerheten vid tävlingar äventyras. Veterinärer, tränare och ryttare måste vara trygga i att den karenstid som anvisas efter behandling av hästar med glukokortikoider är tillräcklig. Vetenskapligt baserade rapporteringsnivåer har potential att garantera att koncentrationer av glukokortikoider under gränsen inte utövar farmakologiska effekter som påverkar hästens prestation.

Glukokortikoider som används i rutinarbetet på en klinik har effekter på biokemiska parametrar som eventuellt kan användas i den kliniska situationen. Ifall de plasmakoncentrationer som driver förändringarna av biokemiska variabler är jämförbara med de som driver de terapeutiska effekterna är förändringarna av de biokemiska variablerna användbara som ett mått på effektiva plasmakoncentrationer och därmed korrekt dosering. Ofta är det en ganska lång latenstid vid behandling med glukokortikoider dvs. det är sällan som behandlingsresultatet direkt kan observeras. Det innebär att det är svårt att fastställa om läkemedlet administrerats i adekvata doser. Genom att då använda biokemiska biomarkörer för läkemedlets effekt kan behandlingen optimeras dvs. effektiva doser och minskad risk för oönskade bieffekter. Samtliga ovanstående användningsområden har betydelse för djurvälståndet.

## Syfte med studien

Vi analyserade 23 biokemiska blodanalyser i prover tagna vid två tidigare studier där hästar behandlats med dexametason. I delstudie 1 gavs intravenös infusion av dexametason i tre olika koncentrationer utöver placebo och i delstudie 2 gavs intramuskulär injektion med dexametason-21-isonikotinat (Vorenvet vet<sup>®</sup> injv 1mg/ml).

Det finns flera syften med att följa biokemiska parametrar hos dessa hästar behandlade med dexametason:

1. För att bättre förstå biologiska effekter hos hästar som behandlats med dexametason ville vi undersöka hur olika biokemiska variabler som beskriver förändringar i metabolism, lever, njure, elektrolytbalansen, mineralnivåerna påverkas efter behandling med dexametason.
2. För att en behandlande veterinär skall kunna tolka blodprovresultat korrekt för diagnos eller prognos måste effekten av de givna läkemedlen vara kända. Analys av biokemiska blodvariabler är viktigt för diagnos, prognos och bedömning av respons till behandling. Många sjuka hästar behandlas med glukokortikoider (t. ex dexametason), så ett syfte är att undersöka hur dexametasonbehandling påverkar blodprovresultat (klinisk kemiska analyser). Dessa resultat kan ge information till hästkliniker om hur blodprovresultat från hästar under behandling ska tolkas för att undvika felbedömningar.
3. Dessutom söker vi efter ytterligare biomarkörer i syfte ge ytterligare kunskap som kan användas i antidopningsarbetet inom hästsporten. Bra dokumentation över vilka plasmakoncentrationer som driver effekter som kan tänkas påverka hästens prestation är grunden till rapporteringsnivåer inom hästsporten och är även ett fundament för att fastställa

en rimlig och säker karenstid vilket är betydelsefullt för djurväl-färden, samt optimering av dexametasondosering för klinisk användning för att minimera risken för eventuella bieffekter. Effekten på biokemiska parametrar som används i rutinarbetet på en klinik kan även eventuellt användas i den kliniska situationen som ett mått på att läkemedlet har getts i terapeutisk dos.

## Material och metoder

### Dexametasonbehandling och provtagning

#### Studie 1.

Sex hästar har vid fyra tillfällen fått en tre timmar lång intravenös infusion av dexametason efter en plasmakoncentrationshöjande startdos eller en infusion med koksalt. Ordningen på de fyra behandlingarna randomiserades. Varje behandlingsomgång föregicks av en wash-out period på minst 1 vecka. Dos 1: placebo (koksaltlösning), dos 2: startdos 100 ng/kg, infusion 22.5 ng/kg/h, dos 3: startdos 1000ng/kg, infusion 225 ng/kg/h samt dos 4: startdos 10 000 ng/kg, infusion 2250 ng/kg/h. Dexametasondoserna är uträknade så att plasmakoncentrationen av dexametason förväntades bli 0.05 ng/ml plasma, 0.5 ng/ml plasma och 5 ng/ml plasma. Tretton prover från varje häst har samlats under 48 timmar (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 9h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h). Blod har samlats i Na-heparinrör, hållits på is och centrifugerats inom 30 minuter (1000 g/10min/+4 grader). Plasman har sedan frusits till -70°C fram till analys. Allt arbete fram till nedfrysning i -70°C har skett på is. Det finns totalt 312 prover; 13 prov från 6 hästar x fyra olika koncentrationer. Plasmaproverna är tagna som material till en farmakologisk studie utförd av Carl Ekstrand, doktorand och Carina Ingvast Larsson, universitetslektor i klinisk farmakologi, under våren 2012 med medel beviljade från Stiftelsen Hästforskning 2010-11 "Glukokortikoider till häst - säker användning ur ett dopnings- och behandlings-perspektiv".

#### Studie 2

Sex hästar har vid ett tillfälle fått en intramuskulär injektion av 0,03 mg/kg dexametason-21-isonikotinat (Vorenvet vet® injv 1mg/ml), den av tillverkaren rekommenderade doseringen. 35 prover från varje häst har samlats under totalt 4 veckor (0h, 1h 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, sedan dagligen i 14 dagar och varannan dag i ytterligare 14 dagar). Blod har samlats i Na-heparinrör och centrifugerats i 3000 g/20min. Plasman har sedan frusits till -20°C. Plasmaproverna är tagna som material till en farmakologisk studie utförd av Peter Kallings, VMD, Carl Ekstrand, doktorand och Carina Ingvast Larsson, universitetslektor i klinisk farmakologi, under hösten 2010 med medel beviljade från NEMAC (Nordic Equine Medication and Antidoping Comittée). Arbetet med att sammanställa och bearbeta (så kallad farmakokinetisk modellering) dexametasonexponeringen har utförts med medel från Stiftelsen Hästforskning 2010-11 "Glukokortikoider till häst - säker användning ur ett dopnings- och behandlings-perspektiv"

Användande av prover tagna för dessa tidigare studier är ett bra sätt att maximalt utnyttja material från tidigare gjorda studier för att minska användningen av försöksdjur.

## **Biokemiska analyser**

Vi analyserade 23 blodvariabler i plasma som beskriver förändringar i kroppen på olika sätt.

*Metabola parametrar:* glukos, fruktosamin, triglycerider, kolesterol, albumin och totalt protein.

*Njurparametrar:* kreatinin och urea.

*Leverenzym och leverfunktion:* GLDH (glutamatdehydrogenas) GGT (gamma glutamyltranspeptidas), ALP (alkaliskt fosfatas), gallsyror, bilirubin.

*Muskelenzym:* ASAT (aspartataminotransferas), CK (creatine kinase).

*Elektrolyter och mineraler:* natrium, kalium, klorid, fosfat, magnesium, kalcium, järn, UIBC (unbound iron binding capacity) och TIBC (total iron binding capacity).

Serumproverna analyserades med kemiinstrumentet Architect c4000 (Abbott Diagnostics) med redan utvärderade metoder. För de flesta analyser användes kommersiella reagens från Abbott Diagnostics. Reagens från andra tillverkare användes för fruktosamin (Horiba ABX Group, Montpellier, Frankrike), GLDH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland) och Gallsyror (DiaSystem Scandinavia, Jönköping, Sverige).

Studie 1. Alla variabler analyserade på 0-proverna och prover tagna efter att maxkoncentrationen av dexametason getts, medan fem selekterade test analyserades även på prover tagna efter att mellankoncentrationerna av dexametason givits. Totalt analyserades 4368 analyser på 312 heparinprover från 6 hästar.

Studie 2. Alla variabler analyserade på 0-proven och proven efter 12, 24, 48 timmar, samt efter 4, 7, 14, 20 och 28 dagar. Totalt analyserades 1242 analyser på 54 prover från 6 hästar.

## **Farmakodynamiska analyser**

Blodglukoskoncentrationerna över tid i förhållande till plasmakoncentrationen av dexametason från studie 1 har analyserats med hjälp av en sigmoid  $E_{\max}$  modell i den kommersiella mjukvaran Winnonlin 5.0.2 (Certrara).

## Resultat

### Studie 1.

Infusion av dexametason med den högsta koncentrationen (5ng/ml plasma) under tre timmar inducerade förändringar i vissa biokemiska variabler under de två dygn som hästarna provtogs. Förändringar som sågs hos hästarna med de högsta givna dexametasonkoncentrationen var: Plasmaglukos steg snabbt och kvarstod högt i knappt två dygn. Triglycerider sjönk initialt, men steg sedan och låg högt i nästan två dygn. Fosfat och järn sjönk initialt, men normaliserades och började stiga efter 1½ dygn (Figur 1a-d).

För de flesta andra biokemiska variabler sågs ingen tydlig effekt av dexametasonbehandlingen under studieperioden på 2 dagar.

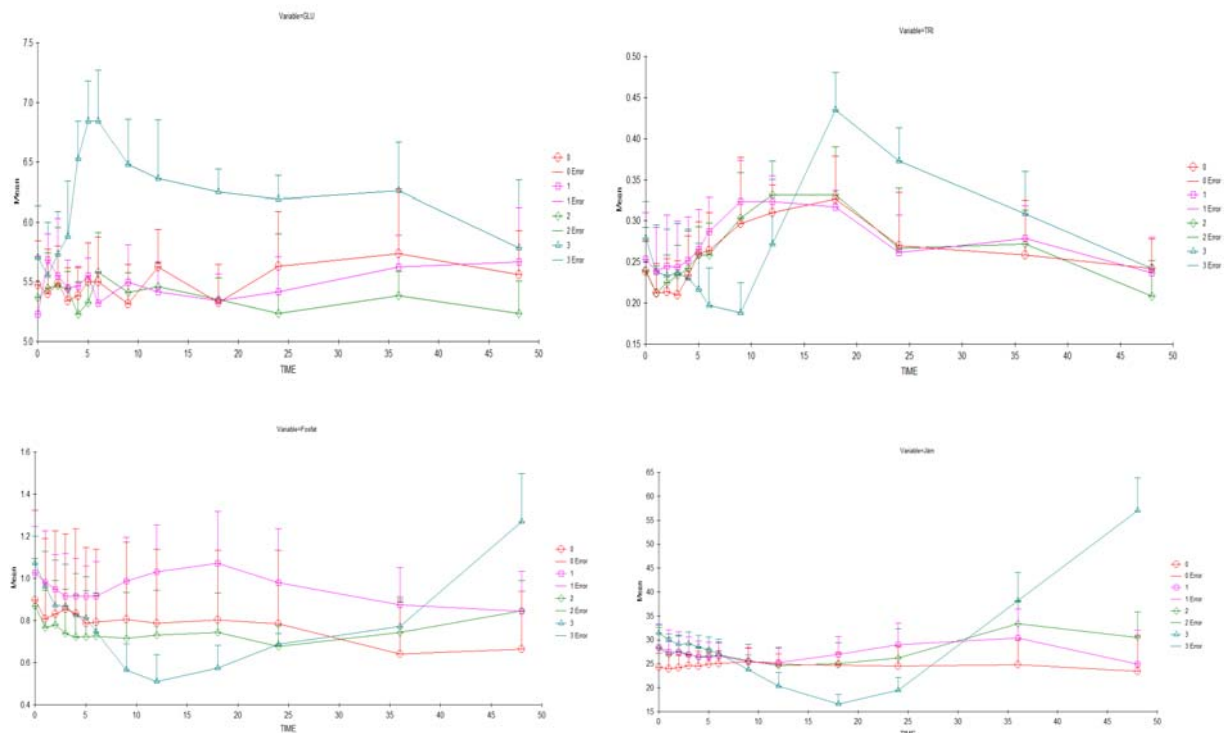


Fig. 1. Plasmakoncentration av glukos, triglycerider, fosfat och järn efter infusion av dexametason i tre olika koncentrationer under 3 timmar till 6 hästar. 0 (orange) är kontroll (koksalt), 1 låg koncentration (rosa), 2 medelkoncentration (grön) och 3 hög koncentration (koncentration i plasma ca 5 ng/ml) i blått. Preliminära resultat

## Farmakodynamik:

Studie 1. Stegningen av glukoskoncentrationen i plasma har relaterats till plasmakoncentrationen av dexametason. De farmakodynamiska parametrarna för blodglukosstegring orsakade av dexametasonexponering är (medel  $\pm$  SD): plasmakoncentrationen av dexametason som ger halva effekten  $0,71 \pm 0,36$  ng/ml, baslinjen för plasmaglukos  $5,23 \pm 0,75$   $\mu$ mol/ml och hills koefficient (beskriver formen på en sigmoid exponerings-effekt kurva) är  $5,5 \pm 4,7$ .

## Studie 2

I denna studie följdes hästarna under 4 veckor efter en intramuskulär injektion med dexametason-21-isonikotinat (Vorenvat vet<sup>®</sup>, injv 1mg/ml) som har en viss depåfunktion. Här kunde vi undersöka effekter orsakade av en längre tids exponering av dexametason än i studie 1.

Glukos, järn och fosfat uppvisade snarlika förändringar som i studie 1, men flera variabler inte började stiga förrän efter några dagar. Gallsyror och GLDH steg först efter 4 dagar.

Dexametason gav ingen ökning i ALP, vilket man ser hos t.ex. hund.

Resultat från delstudie 2 är inte färdigsammanställda ännu men de ger en tydlig bild av vilka biokemiska test som förändras av en engångsbehandling med Vorenvat<sup>®</sup>.

## Diskussion

Dexametasonbehandling av sjuka hästar är vanligt och det ges ofta som en engångsinjektion med preparat som har depåeffekt. Doserna som är givna i studierna speglar de doser som används kliniskt i Sverige. Efter en engångsdos av långtidsverkande dexametason (Vorenvat vet<sup>®</sup>) doserat enligt tillverkarens rekommendation har plasmakoncentrationen av dexametason uppmätts till (medel  $\pm$  SD)  $0,61 \pm 0,12$  ng/ml (Ekstrand *et al.*, 2015). Dosen 5 ng/ml given i första delstudien representerar en uppskattad medelplasmakoncentration under ett dygn efter en engångsdos av vattenlösligt dexametason givet i blodet. I delstudie 2 gavs Vorenvat enligt dosanvisningar i FASS VET.

I den första studien kan vi visa de omedelbara effekterna av dexametason som gavs intravenöst. De två metabola variablerna glukos och triglycerider påverkades inom några timmar efter behandlingen med den högsta koncentration dexametason. Glukos steg så mycket att värdena var utanför referensvärden för häst. Mineralerna fosfat och järn sjönk först för att sedan stiga och var fortfarande höga vid studiens slut efter två dagar.

I den andra studien kunde vi följa både de tidiga och sena effekterna av dexametason givet intramuskulärt som depåpreparat. Detta ger en flackare plasmakoncentrations-tidskurva och mer utdragen effekt över tid jämfört med om samma dos av en mer löslig beredningsform infunderas direkt i blodet

Många biokemiska variabler förändrades inte av behandling med dexametason i dessa studier. Det är viktig information för behandlande veterinär att veta vilka biokemiska parameterar som förväntas ändras eller förväntas förbli oförändrade efter en engångsbehandling med dexametason.

## Projektstatus

Resultat kommer att användas till ett eller två vetenskapliga manuskript om effekt av dexametason på klinisk kemiska parametrar, samt eventuellt en "short communication" om biologisk variation hos häst. Resultaten ingår även i Carl Ekstrands studier om biomarkörer i syfte att kunna användas i antidopningsarbete och ta fram rimlig och säker karenstid (bland annat av djurskyddsskäl), samt optimera dosering av dexametason för den kliniska användningen för att minska bieffekter. Efter publicering planerar vi även sprida resultaten vi t.ex. Hippocampus SLU nyhetsbrev, kongresser och Svensk veterinärtidning.

Några resultat från studien har presenterats i ett abstract på en kongress samt föreligger som manuskript för konferensproceedings:

**Additional Evidence for Dexamethasone Screening Limits.** Ekstrand C, Bondesson U, Falkenö U, Gabrielsson J, Hedeland M, Kallings P, Olsén L, Tvedten H, Ingvast-Larsson C. Abstract International Conference of Racing Analysts and Veterinarians (ICRAV), Mauritius, September 2014

## Referenser

Abraham G et al. Serum thyroid hormone, insulin, glucose, triglycerides and protein concentrations in normal horses: Association with topical dexamethasone usage. *Vet J* 188:307-312, 2011.

Ekstrand, C et al. 2015. Plasma concentration-dependent suppression of endogenous hydrocortisone in the horse after intramuscular administration of dexamethasone-21-isonicotinate. *J Vet Pharm Ther* 38:235-242.

Eiler H et al. Adrenal gland function in the horse: Effect of dexamethasone on hydrocortisone secretion and blood cellularity and plasma electrolyte concentration. *Am J Vet Res* 40:5:727-729, 1979.

Smith JE et al. Exogenous corticosteroids increase serum iron concentrations in mature and ponies. *JAVMA* 188:11:1296-1298, 1986.

Tiley, H et al. Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. *Am J Vet Res* 68:7: 753-759, 2007.