



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Prednisolon i klinisk dosering intravenöst till hund – farmakokinetik och leukocyterespons

Clinical doses of prednisolone intravenously in dogs – pharmacokinetics and leukocyte response

Sara Adolfsson

*Uppsala
2019*

Prednisolon i klinisk dosering intravenöst till hund – farmakokinetik och leukocyttrespons

Clinical doses of prednisolone intravenously in dogs – pharmacokinetics and leukocyte response

Sara Adolfsson

Handledare: Carl Ekstrand, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Helena Pettersson, Klinisk kemiska laboratoriet, UDS

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

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

Nyckelord: prednisolon, glukokortikoid, kortikoid, kortison, kortikosteroid, farmakokinetik, farmakodynamik, leukocyttrespons, hund, intravenös bolus

Key words: prednisolone, glucocorticoid, corticoid, cortisone, corticosteroid, pharmacokinetic, pharmacodynamic, leukocyte response, dog, canine, intravenous bolus

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Prednisolon är ett av de mest förskrivna veterinärmedicinska läkemedlen i Sverige och i många andra länder. Prednisolon är ett kortisonpreparat med intermediär glukokortikoid effekt och duration. Prednisolon har till hund under lång tid använts i doser baserade på empirisk erfarenhet då det saknas moderna farmakokinetiska studier och risker som utebliven effekt eller svåra biverkningar ökar. Glukokortikoider (GK) ger biverkningar som polyfagi, polyuri, polydipsi, muskelsvaghet/atrofi, insulinresistens, iatrogen hyperadrenocorticism, osteoporos, tunn hud och försämrad sårhäkning. Syftet med studien var att undersöka koncentration-tidsförloppet av prednisolon hos hund efter intravenös administrering i en kliniskt relevant dos (1 mg/kg). Genom användande av moderna analysmetoder för kvantifiering av läkemedelskoncentrationer i plasma, farmakokinetik samt studera utvalda endogena biomarkörer (leukocyttrespons) kan ett evidensbaserat underlag till en framtida doseringsregim hos hund skapas. En optimerad doseringsregim grundad på moderna vetenskapliga metoder vill ge bibehållen terapeutisk effekt och minimerad risk för biverkningar.

Glukokortikoider kan generellt vara indikerat vid olika orsaker till inflammation, allergi, immunmedierade och neoplastiska sjukdomar. Påverkan på immunceller antas vara den största orsaken till de antiinflammatoriska och immunosupprimerande effekterna. Neutrofili, lymfopeni, eosinopeni och monocytos är typiska förändringar på hematologiska parametrar hos hund. Farmakokinetiken beskriver läkemedlets omsättning i kroppen. Clearance är ett mått på kroppens förmåga att eliminera läkemedel framför allt genom metabolism och exkretion via lever och njurar. Distributionsvolym representerar den skenbara volym som läkemedlet fördelar sig i. Terminal halveringstid är tiden för plasmakoncentrationen att sjunka till hälften då sänkningen huvudsakligen beror på elimination.

Studien baseras på en ”cross-over”-modell där tio hundar inkluderades. Hundarna var sina egna kontroller och behandlades under en studiefas med 1 mg/kg prednisolon-natriumsuccinat intravenöst och under den andra studiefasen med natriumkloridlösning. Blodprover togs vid tiden 0, 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 28, 32, 36, 48 och 60 timmar efter administration av prednisolon eller natriumklorid. För farmakokinetiska analyser anpassades en *two-compartment* modell till observerade prednisolonkoncentrationer för varje enskild individ. Farmakokinetiska medianvärden vid en bolusdos intravenöst av 1 mg/kg prednisolon till tio hundar var den skenbara distributionsvolymen i *steady state* 2.86 L/kg, clearance var 24.33 ml/min·kg och den terminala halveringstiden var 1.6 timmar. Statistiskt signifikant neutrofili förelåg mellan behandlad och obehandlad grupp mellan 1–12 timmar efter administration ($P < 0.005$). Lymfocytkoncentrationen var statistiskt signifikant lägre mellan 2–9 timmar. Ingen signifikans kunde påvisas för skillnader gällande eosinofilkoncentrationer mellan behandlad och obehandlad grupp.

Efter en intravenös bolusdos av prednisolon till hund sågs signifikanta skillnader mellan behandlad och obehandlad grupp på två av tre leukocyttyper och större värden för distributionsvolym och clearance redovisas jämfört med vad som publicerats i tidigare litteratur. Det krävs fler studier med beräkning av farmakodynamiska parametrar, andra administrationsvägar och kliniska studier för att etablera ett större vetenskapligt underlag till behandlingsregimer gällande prednisolon till hund.

SUMMARY

Prednisolone is one of the most prescribed drugs to dogs over the world. Prednisolone is a glucocorticoid with intermediate duration of effect. Prednisolone to dogs has for a long time been used in doses mostly based on empirical experience due to lack of stringent pharmacokinetic/pharmacodynamic studies. Low scientific evidence does not guarantee an optimal dosing regimen and side effects or insufficient response may result as a consequence to over-dosing or drug holiday. Glucocorticoids are known for side effects such as increased appetite, polyuria and polydipsia, muscle weakness/atrophy, insulin resistance, iatrogenic hyperadrenocorticism, osteoporosis, thin skin and poor wound healing. The aims of this study were to investigate and characterize the prednisolone plasma concentration-time course following an intravenous bolus dose in dogs at a clinically relevant dose (1 mg/kg) with contemporary methods. A related aim is to capture pharmacological biomarkers of anti-inflammatory effects which may serve as future measures of future dosing regimen.

Glucocorticoids may generally be indicated for various types of allergic reactions inflammatory-, immune-mediated-, and neoplastic diseases. The glucocorticoid induced leukocyte mediated response is considered important for the anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Neutrophilia, lymphopenia, eosinopenia and monocytosis in dogs are typical hematological changes induced by glucocorticoid exposure and might therefore serve as biomarkers for the response to prednisolone. Pharmacokinetics is the study of what the body does to the drug. Clearance is the body's ability to metabolise and remove the drug mainly by the liver and kidneys. Volume of distribution relates the total amount of drug in the body to the plasma concentration of drug. It should be viewed as an apparent volume lacking a direct physiological meaning. The half-life is the time it takes for the drug in blood plasma concentration to fall in half. It's more relevant to use the term terminal half-life, when the reduction in concentration only depends on elimination.

The study was a crossover design including ten dogs. The dogs were treated once with 1 mg/kg prednisolone sodium succinate and once with sodium chloride. Blood samples were drawn at 0, 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 28, 32, 36, 48 and 60 hours after bolus injection. A two-compartment model was fitted to experimental prednisolone data for pharmacokinetic analyses. Pharmacokinetic median parameters of a bolus dose of 1 mg/kg prednisolone administered intravenously to ten dogs was: a volume of distribution at 2.86 L/kg, a clearance at 24.33 ml/min·kg and terminal half-life at 1.6 hours. There is a significant neutrophilia between treated and untreated dogs 1-12 hours after injection. Lymphopenia was significant between 2-9 hours after injection. There was no significant difference in eosinophil concentrations between treated and untreated dogs.

Following an intravenous bolus dose of prednisolone, significant differences were seen between treated and untreated dogs in two out of three leukocyte types, and larger values for volume of distribution and clearance are reported compared to those published in previous literature. There is a need for more studies, calculation of pharmacodynamic parameters with other routes of administration and clinical trials to establish a wider knowledge base for treatment regimens for prednisolone to dogs.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
<i>Binjurens anatomi och fysiologi</i>	2
Hypotalamus-Hypofys-Binjurebarks axeln	2
<i>Glukokortikoider</i>	2
Verkningsmekanism	3
Glukokortikoid effekt på utvalda leukocyter	4
Urval av systemeffekter och möjliga biverkningar	4
Syntetiska glukokortikoider	5
<i>Farmakologi</i>	6
Farmakodynamik	6
Farmakokinetik	6
<i>Specifika farmakokinetiska parametrar</i>	7
Clearance (Cl)	7
Distributionsvolym	8
Halveringstid ($t_{1/2}$)	9
Farmakokinetiska parametrar för prednisolon	10
MATERIAL OCH METODER	11
<i>Experimentell design</i>	11
<i>Provtagningsprotokoll</i>	11
<i>Blodprovsanalyser</i>	12
<i>Farmakokinetisk analys</i>	13
Modellutvärdering	15
<i>Statistisk analys</i>	15
RESULTAT	16
<i>Plasmakoncentrationer</i>	16
<i>Farmakokinetik</i>	17
Anpassning av modell	17
Specifika parametrar	17
<i>Leukocyttrespons</i>	18
DISKUSSION	21
<i>Farmakokinetik och specifika parametrar</i>	21
<i>Leukocyttrespons och endogena biomarkörer</i>	22
KONKLUSION	24
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	25
<i>Introduktion</i>	25
<i>Litteraturöversikt</i>	25
<i>Material och metod</i>	26
<i>Resultat</i>	26
<i>Diskussion</i>	27

FÖRKORTNINGAR

GK - glukokortikoider

HPA - hypothalamus-pityitary-adrenal

CRF - corticotropin-releasing factor

ACTH - adrenocorticotropt hormon

CBG - corticosteroid binding globulin

GR - glukokortikoidreceptor

GRE - glukokortikoid responsiva element (GRE)

cGR - cytosolbunden glukokortikoidreceptor

mGR - membranbunden glukokortikoidreceptor

ADH - antidiuretiskt hormon

PK - farmakokinetik

PD - farmakodynamik

Cl - clearance

ER - extraktionsgrad

V_d - distributionsvolym

$t_{1/2}$ - halveringstid

LOQ – lower limit of quantification

INLEDNING

Som en av flera syntetiskt framställda glukokortikoider för farmakologiskt bruk används prednisolon i stor omfattning runt om i världen inom både veterinär- och humanmedicinen. Prednisolon har länge använts i doser baserade på empirisk erfarenhet till hund då det saknas moderna farmakokinetiska studier till grund för en evidensbaserad doseringsregim. De studier som är gjorda på hund är föråldrade och dagens analysmetoder kan kvantifiera lägre koncentrationer av prednisolon i plasma samt att den tekniska utvecklingen inom både mjuk- och hårdvara kan medföra förändringar på farmakokinetiska parametrar jämfört med tidigare publicerade studier. Problemet är att utan mer kunskap om läkemedlets kinetik kan behandling medföra utebliven effekt vid låg dosering eller långa behandlingsintervall men också risker som svåra biverkningar vid överdosering. Utan kinetiska studier saknas vetskap om hur kroppen omsätter prednisolon och dagens behandlingsregim kan komma att förfinas med minimerad risk för biverkningar men bibehållen effekt. Prednisolon används vid ett flertal indikationer, till exempel vid behandling av inflammation, immunosuppression och som ersättningsbehandling vid endogen GK-brist (Behrend & Kemppainen, 1997). Glukokortikoider har en komplex verkningsmekanism och ger upphov till flertalet oönskade biverkningar som exempelvis polyfagi, polydipsi och polyuri, muskelsvaghet/atrofi, insulinresistens, iatrogen hyper-adrenocorticism, osteoporos, tunn hud och försämrad sårhäkning (Wilcke & Davis, 1982).

Syftet med denna studie var att undersöka prednisolonkoncentrationer över tid vid intravenös administrering hos hund med känsligare och mer precisa analysmetoder. Avsikten var att beräkna farmakokinetiska parametrar som kan ligga till grund för en framtida evidensbaserad doseringsregim samt att studera effekten på leukocytrespons som biomarkör för anti-inflammatorisk effekt och immunosuppression.

LITTERATURÖVERSIKT

Som en av flera syntetiskt framställda GK för farmakologiskt bruk används prednisolon i stor omfattning inom både veterinär- och humanmedicinen. Produktionen av endogena GK som kortisol och kortikosteron ombesörjs av binjurarna.

Binjurens anatomi och fysiologi

Binjurens har sin topografiska lokalisering kranio-medialt om vardera njure och flertalet av deras producerade hormoner anses livsviktiga. Binjuren delas anatomiskt upp i bark och märg. I märgen produceras katekolaminer som noradrenalin, adrenalin och dopamin. Binjurbarkens yttersta zon, *zona glomerulosa*, producerar mineralokortikoider, framför allt aldosteron som upprätthåller blodtryck genom påverkan på elektrolyt- och vätskebalans i njuren (Sjaastad *et al.*, 2010). Mellersta zonen, *zona fasciculata*, producerar GK som fått sitt namn efter påverkan på glukosmetabolismen. Tillsammans benämns mineral- och glukokortikoider för kortikosteroider då de produceras i *cortex*. Innersta zonen, *zona reticularis*, producerar androgena prekursorer som tas upp av perifera vävnader och där metaboliseras till androgena steroider som exempelvis testosteron (Xing *et al.*, 2015).

Hypotalamus-Hypofys-Binjurbarks axeln

Glukokortikoider cirkulerar normalt i basala nivåer men regleras av hypotalamus-hypofys-binjurbarks axeln (*hypothalamus-pituitary-adrenal*, HPA). HPA-axeln aktiveras av både endo- och exogena stimuli (Bellavance & Rivest, 2014). Glukokortikoider sekreteras under pulsatila förhållanden med en dygnsrytm (*circadian*) som ligger som högst på morgonen hos dagaktiva djur. En underliggande oscillerande rytm (*ultradian*) föreslås optimera HPA-axelns responsivitet men orsak till uppkomsten är inte känd (Lightman & Conway-Campbell, 2010). Dygns- och intradygnsvariationer är olika mellan djurslag där häst har en märkbar dygnsrytm om än med låga amplituder, medan det finns bevis för en mindre uttalad dygnsrytm hos hund (Cordero *et al.*, 2012; Kemppainen & Sartin, 1984). Redan 1932 beskrevs förhållandet mellan hypofysens påverkan på produktion av könshormon och det omvända förhållandet, könshormoners påverkan på hypofysen (Moore & Price, 1932). Från hypotalamus produceras *corticotropin-releasing factor* (CRF) som påverkar adenohipofysen att frisätta adrenocorticotropt hormon (ACTH). ACTH stimulerar produktionen av GK i binjurbarken. Glukokortikoider reglerar sedan nivåerna av både ACTH och CRF genom negativ feedback på både hypotalamus och adenohipofysen (Rang *et al.*, 2016; Keller-Wood, 2015; Bellavance & Rivest, 2014; Tasker & Herman, 2011; Lightman & Conway-Campbell, 2010; Behrend & Kemppainen, 1997).

Glukokortikoider

Generellt kan behandling med GK vara indikerat vid inflammation, allergi, immunmedierade och neoplastiska sjukdomar. Trots sina många oönskade effekter används läkemedlet som förstahandsval vid flertalet specifika sjukdomar som exempelvis *protein-losing enteropathy*, *inflammatory bowel disease* och immunmedierad hemolytisk anemi hos hund (Viviano, 2013). Behandlingen anses vara dosberoende och vissa effekter fås vid fysiologiska koncentrationer medan andra effekter kräver suprafysiologiska/farmakologiska koncentrationer (Behrend & Kemppainen, 1997). Endogent GK kortisol och kortikosteron produceras från kolesterol i

varierande koncentration hos olika arter (Behrend & Kemppainen, 1997). Normal kortisolproduktion hos hund anges till 0.2–1.0 mg/kg/dag men kan stiga tiofald i stressfulla situationer (Bonagura *et al.*, 2014).

Plasmaproteiner i blodet binder GK till viss del där endast fri fraktion har aktiv verkan. Prednisolon har en proteinbindningsgrad på 68.4 % hos hund (Frey *et al.*, 1980). Hos människa är 80–90 % bundet till *corticosteroid-binding globulin* (CBG), 5–15 % är bundet till albumin och resterande ca 5 % är fritt i plasma (Cain & Cidlowski, 2015). Proteinbindningsgraden fungerar som en buffert och vid inflammation sjunker nivåerna av plasmaproteiner vilket medför att den fria fraktionen av GK ökar (Hammond, 2016).

Verkningsmekanism

Alla steroidhormoner producerade från binjurebarken är lipofila molekyler som diffunderar över cellmembran alternativt transporteras in genom receptormedierad endocytos (Chen & Farese, 1999). Glukokortikoider utövar sin effekt genom olika signalvägar i cellen som vanligen delas upp i genoma och icke-genoma.

Genoma signalvägar

När GK binder in till den intracellulära, cytoplasmatiske glukokortikoidreceptorn (cGR) sker en transformation av komplexet och en translokation till cellkärnan. Distributionen av glukokortikoidreceptorer (GR) skiljer sig mellan vävnader. På cellulär nivå finns isomerer av GR som verkar olika beroende på tillgängliga coenzymer och kan också påverkas av inflammation vilket kan förklara olika effekter som fås i olika celltyper (Cain & Cidlowski, 2015).

1. GK/cGR-komplex binder till specifika delar av DNA, så kallade glukokortikoid responsiva element (GRE). Det finns positiva och negativa GRE:s där de positiva leder till transkription och generell syntes av antiinflammatoriska proteiner och de negativa inhiberar transkription av inflammatoriska proteiner (Stahn *et al.*, 2007).
2. GK/cGR-komplex påverkar transkription genom inhibering av transkriptionsfaktorer för proinflammatoriska proteiner till exempel aktivatorprotein 1 (AP-1) och NFκB (Reily *et al.*, 2006).

Icke-genoma signalvägar

Tidiga effekter efter administration av GK fås inom några minuter via signalvägar som inte involverar DNA. Dessa signalvägar har till dags datum inte utretts i sin fullständighet (Buttgereit & Scheffold, 2002; Croxtall *et al.*, 2000; Sackey *et al.*, 1997).

1. Glukokortikoid verkan via cGR ger även aktivering av intracellulära signalvägar genom proteiner som är bundna till den inaktiva receptorn. När GK binder in till receptorn frigörs proteinerna och initierar signalvägar som till exempel frisättning av annexin-1. Då hämmas fosfolipas A som spjälkar arachidonsyra från cellmembranet, en prekursor till proinflammatoriska prostaglandiner (D'Acquisto *et al.*, 2008; Croxtall *et al.*, 2000).
2. Glukokortikoid (icke specifik) verkan på cellmembraner genom att inhibera kalcium- och natriumflöden vid höga doser och föreslås ge upphov till snabb immunosuppression då immunceller anses känsliga för sådana förändringar (Buttgereit & Scheffold, 2002).

3. Glukokortikoid (specifik) verkan via membranbunden GR (mGR) startar intracellulära signalkaskader i flertalet celltyper med varierande cellulära effekter (Buttgereit & Scheffold, 2002). Sackey *et al.* (1997) har visat att uttrycket av mGR i humana leukemi-omvandlade lymfoblaster ökar i en viss del av cellcykeln och de fann en korrelation mellan högt antal mGR och GK-inducerad lymfocytolys.

Glukokortikoid effekt på utvalda leukocyter

I terapeutiska doser inhiberar GK det medfödda och det förvärvade immunförsvaret oavsett orsak till inflammation. Den inhiberande effekten på immunceller antas vara den största orsaken till de antiinflammatoriska och immunosupprimerande effekter som erhålls vid behandling. Verkningsmekanismen på inflammationsceller är komplex och responsen är dosrelaterad, högre doser anses krävas för immunosuppression än för antiinflammatorisk effekt (Cohn, 1997). Påverkan på proinflammatoriska- och antiinflammatoriska cytokiner, adherensmolekyler och redistribution är exempel på orsaker till att leukocytantal förändras vid GK-behandling (Ammersbach *et al.*, 2006; Behrend & Kemppainen, 1997; Latimer & Rakich, 1989). Karakteristiska förändringar av hematologiska parametrar (även omnämnt som stress-leukogram) anses allmänt känt vid stegring av antingen endogena eller exogena GK. De hematologiska förändringarna visar neutrofili utan vänsterförskjutning, lymfopeni, eosinopeni och monocytos hos hund (Riviere & Papich, 2018; Rang *et al.*, 2016; Feldman, 2014; Behrend & Kemppainen, 1997; Jain, 1986; Wilcke & Davis, 1982). Den Herder & Prasse (1972) beskrev de hematologiska förändringarna som relevanta att analysera vid GK-behandling på hund. Som indikator för antiinflammatoriska effekter och immunosuppression utvärderas i den aktuella studien responsen av de vita blodcellerna (neutrofiler, lymfocyter och eosinofiler) efter prednisolon-behandling, vilket gjorts med andra GK i tidigare studier utförda på hund (Moore *et al.*, 1992; Braun *et al.*, 1981).

Neutrofili orsakas av ökad frisättning av mogna neutrofiler från benmärg och marginalpool till cirkulationen och förhindrad migration över endotelväggen genom påverkan på uttrycket av adhesionsmolekyler på cellytan (Liu *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 1992). I vävnad påverkar GK neutrofilers överlevnad genom anti-apoptotiska signalvägar som leder till förlängd överlevnadstid (Saffar *et al.*, 2011; Cox, 1995). Lymfopeni uppstår då cirkulerande lymfocyter omfördelas till lymfknutor, benmärg och mjälte i stället för vaskulär cirkulation (Fauci & Dale, 1975). Glukokortikoider inducerar apoptos i neoplastiska och aktiverade T-lymfocyter på människa (Herold *et al.*, 2006; Galili *et al.*, 1980). Ammersbach *et al.* (2006) föreslår att GK-inducerad apoptos av lymfocyter representerar en stor del av den immunosupprimerande effekten hos hund. Exakta mekanismer för eosinopeni är ännu inte klarlagt på hund. På människa föreslås förändringar i adherens och kemotaxis (Clark *et al.*, 1979) och på andra djurslag diskuteras minskad frisättning från benmärg, perifer destruktion och/eller omfördelning från blodet till lymfoida vävnader (Moore *et al.*, 1992; Cohn, 1991; Braun *et al.*, 1981). Monocytos hos hund föreslås bero på påverkad migration ur kärl (Behrend & Kemppainen, 1997; Moore *et al.*, 1992; Cohn, 1991).

Urval av systemeffekter och möjliga biverkningar

Efter påverkan på glukosmetabolismen har GK namngivits. Glukokortikoider ökar glukoneogenesen i levern och minskar glukosupptag i perifera vävnader vilket leder till hyperglykemi

och insulinresistens kan utvecklas. Huvudsakliga syftet är att förse hjärnan med glukos under stress (Wang *et al.*, 2015). Aminosyror bryts ner från proteiner i skelett-muskulaturen till prekursorer för glukoneogenes i levern och under GK-verkan minskar proteinsyntesen i musklerna. Under längre tider av behandling uppstår ett katabolt tillstånd med muskelförtvining som biverkning (Kuo *et al.*, 2013). Lipidmetabolismen påverkas också av GK genom både lipolys och lipogenes. Över tid leder behandling till en omfördelning av fett från perifera depåer till centrala med samtidig total viktökning. Polyfagi ses ofta som biverkning och anses bero på en adaptiv mekanism då däggdjur initialt efter stresspåslag får en CRF-inducerad anorexi som sedan ska ersättas med föda som förberedelse inför kommande stressande moment (Spencer & Tilbrook, 2011). Även bindväv påverkas och fibroblaster hindras från att producera proteiner som kollagen och hyaluron vilket bidrar till den försämrade sårläkningen och den tunnare hud som förknippas med GK-behandling (Behrend & Kempainen, 1997). Den negativa feedback på HPA-axeln som beskrivs tidigare är en förklaring till sänkta plasmakoncentrationer av antidiuretiskt hormon (ADH) som produceras i hypotalamus och frisätts i hypofysen. Det föreslås också att inhibering av ADH i njuren kan bidra till kända bieffekter så som polyuri och polydipsi, vilket ses vid behandling (Riviere & Papich, 2018). Hypertension ses vid både akut och kronisk användning av exogena GK. Mekanismerna är inte helt klarlagda och litteraturen redovisar olika teorier. Publicerad litteratur redogör bevis för ett ökat upptag av Na^+ , vilket sekundärt ökar blodvolym och blodtryck, efter GK-administration som inte medieras av mineralkortikoidreceptorn. Följaktligen beror inte hypertensionen enbart på att GK även kan inneha viss mineralkortikoid effekt (Montrella-Waybill *et al.*, 1991).

Gastrointestinala ulcera och diarré, där den senare ibland kan vara hemorragisk, förekommer i undantagsfall som biverkning efter GK-behandling, men då till följd av en ökad produktion av magsyra (Riviere & Papich, 2018). Alternativt bidrar den minskade frisättningen av arachidonsyra och den sekundärt minskade produktionen av prostaglandiner. Boston *et al.* (2003) visade att risken för gastrointestinala lesioner förvärrades vid samtidig användning av meloxicam och dexametason hos friska hundar varför läkemedelsgrupperna inte bör administreras samtidigt. Glukokortikoidbehandling ger också osteoporos efter långtidsbehandling, sänker nivåer av T3 och T4, påverkar reproduktion negativt och har hämmande effekt på tillväxt hos unga individer (Kempainen, 1984).

Syntetiska glukokortikoider

För att uppskatta verkningstider, även kallad effektduration, mellan olika GK används deras respektive halveringstider, den tid det tar för koncentrationen att sjunka med 50% i plasma. Kempainen (1984) diskuterar dock att halveringstiden i plasma måste ställas mot den biologiska halveringstiden då GK till exempel påverkar syntes av proteiner. Den biologiska halveringstiden är den tid där effekten av läkemedlet halveras och suppression av binjurens endogena frisättning används som referens (Bonagura *et al.*, 2014). Utefter det delas syntetiska GK upp i kortverkande (<12h), intermediärverkande (12-36h) och långtidsverkande (>48h). Glukokortikoiders antiinflammatoriska effekt har jämförts med endogent kortisol som tilldelats siffran 1 (Tabell 1), därefter rankades även den mineralkortikoida effekten (Behrend & Kempainen, 1997).

Tabell 1. Jämförelse mellan olika utvalda glukokortikoiders uppskattade relativa potens mot endogen hydrokortison/kortisol hos hund och människa (Plumb, 2015; Bonagura & Twedt, 2008)

Substans	Duration (h)	Glukokortikoid-potens	Mineralkortikoid-potens	Ekvivalenta doser (mg)
Hydrokortison/Kortisol	<12	1	1	20
Prednison/Prednisolon	12–36	4	0.8	5
Methylprednisolon	12–36	5	0.5	4
Flumethason	>48	30	-	1.5
Dexametason	>48	25–30	0	0.75
Betamethason	>48	25–30	0	0.6

Farmakologi

Farmakologi definieras som läran om läkemedel och de vetenskapliga studier som avser verkningsmekanismer, interaktioner och effekter av substanser på levande organismer. Studier av både naturliga, syntetiska, endogena och exogena substanser inkluderas. Ett läkemedel är en kemisk substans som ger en fysiologisk respons i kroppen. En medicin består av ett eller flera läkemedel framtagna för att ge terapeutisk effekt (Currie, 2018a). Farmakologi delas upp i två övergripande discipliner, farmakodynamik (PD) och farmakokinetik (PK).

Farmakodynamik

Farmakodynamik beskrivs som läkemedlets effekter på kroppen. PD beskriver exempelvis läkemedlets bindning till transportproteiner, påverkan på enzymsystem, jonkanaler och receptorer men också effekt, det vill säga kroppens respons (Currie, 2018a; Rang *et al.*, 2016). Ett läkemedel måste ha hög specificitet för att binda till receptorerna i de vävnader där effekt önskas. Hög specificitet gör att receptorer endast reagerar på särskilda typer av molekyler, men tyvärr finns inga läkemedel som verkar helt specifikt. Hur starkt ett läkemedel binder till receptorn kallas dess affinitet. Genererad effekt beskrivs både av läkemedlets potens, en relativ koncentration som beskriver läkemedlets affinitet, och av *efficacy*, läkemedlets egen effekt. Agonister med högre affinitet kräver oftast en lägre dos, jämfört med låg affinitet för samma receptor (Currie, 2018a; Rang *et al.*, 2016). Sambandet mellan dos och respons påverkas av koncentration och tid och varierar mellan individer beroende på kön, vikt, ras, ålder, hydreringsgrad, blodtryck och sjukdomsstatus (Currie, 2018a).

Farmakokinetik

Farmakokinetik beskrivs som läkemedlets omsättning i kroppen, det vill säga vad kroppen gör med läkemedlet. Relationen mellan farmakologisk eller toxisk effekt av läkemedlet och den tillgängliga koncentrationen beskrivs som en grundläggande hypotes, men det gäller inte för alla läkemedel (Benet & Zia-Amirhosseini, 1995). Farmakokinetik begränsas inte till friska individer utan innehåller även specifika fysiologiska eller patologiska förhållanden, varierande biotillgänglighet och läkemedelsinteraktioner. Sammantaget tillåter farmakokinetik, tillsammans med kännedom om terapeutiska koncentrationer, utformningen av en doseringsregim som ger den bästa effekten för individen (Currie, 2018b).

Absorption, distribution, metabolism och elimination – ADME

Absorption beskriver förflyttningen mellan administrationsplats till systemisk cirkulation (Currie, 2018a; Currie, 2018b; Riviere & Papich, 2018). Ett läkemedel kan exempelvis administreras intravenöst, intramuskulärt, subkutant och gastrointestinalt. Läkemedel som administreras oralt har en första passage effekt då de tas upp i portahepatiska cirkulationen och passerar levern där metabola processer startar redan innan substansen har nått systemisk cirkulation. Även vid intramuskulär och subkutan administration kan den systemiska tillgängligheten vara längre än 100 % till följd av begränsad kärlförsörjning samt att olika vävnadsenzymer metaboliserar en viss del av läkemedlet innan det når blodbanan (Richter *et al.*, 2012; Rowland & Tozer, 2010). Biotillgänglighet definieras som andelen läkemedel som blir systemiskt tillgänglig. Intravenös administrering är den enda administrationsvägen som ger 100 % biotillgänglighet (Currie, 2018b). Distribution handlar om läkemedlets fördelning i kroppen. Ett läkemedel måste nå sin verkningsplats i tillräckliga koncentrationer och över tillräckligt lång tid för att ge en biologisk respons. Distribution påverkas av 1) kemiska egenskaper hos läkemedlet, 2) koncentrationsgradient mellan blod och perifer vävnad, 3) blodperfusion över organet, 4) läkemedlets affinitet till vävnaden (Riviere & Papich, 2018). Proteinbindningsgrad och barriärer i kroppen påverkar också distribution. Generellt gäller att ju högre proteinbindningsgrad ett läkemedel har, desto lägre distributionsvolym (Currie, 2018b). Metabolism innefattar de processer som omvandlar ett läkemedel, så kallad biotransformation. Elimination inkluderar de processer som avlägsnar ett läkemedel. Flertalet enzymsystem omvandlar substansen till aktiva metaboliter eller eliminationsprodukter som är mer vattenlösliga och därmed lätt utsöndras med urin och galla (Riviere & Papich, 2018). Läkemedel kan även elimineras via svett, tårar, saliv och mjölk. Elimination via njurarna kan påverkas av reabsorption och läkemedel eliminerat via gallan kan återupptas till portavenen (enterohepatiskt kretslopp) vilket kan leda till förlängd effekt (Currie, 2018b).

Specifika farmakokinetiska parametrar

Clearance (Cl)

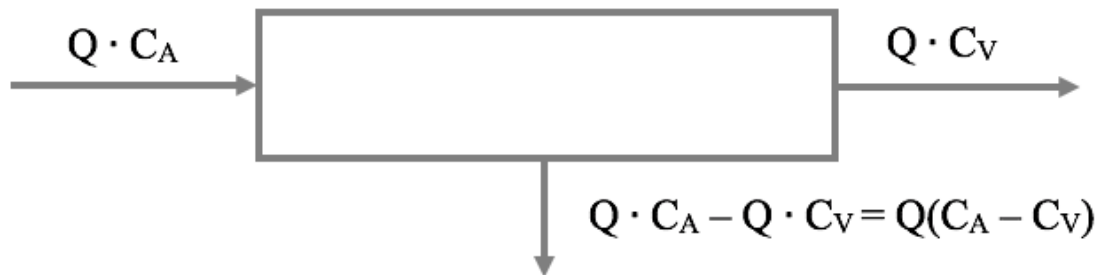
Clearance är ett mått på kroppens förmåga att eliminera läkemedel med enheten volym/tid, det vill säga ett flöde (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a; Benet & Zia-Amirhosseini, 1995). Varje eliminerande organ har ett specifikt Cl (Cl_{lever} , Cl_{njure} , $Cl_{\text{övrig}}$) och tillsammans utgör de kroppens totala clearance (Cl_{tot}). Levern har den högsta metabola kapaciteten och elimination sker genom galla. Njuren eliminerar framför allt genom exkretion till urinen och har en mindre metabol förmåga än levern. $Cl_{\text{övrig}}$ innefattar elimination från ex. lunga, saliv, svett och gastrointestinalkanalen men utgör för en majoritet av läkemedelssubstanserna en försumbar del (Benet & Zia-Amirhosseini, 1995). Cl kan också variera beroende på vilket matrix som analyseras exempelvis Cl_{blod} , Cl_{plasma} , Cl_{obundet} . Det är bara obundet läkemedel som kan passera membran och metaboliseras. Cl_{obundet} används exempelvis då läkemedlets bindning till plasmaprotein inte är linjärt (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a).

Extraktionsgrad (ER)

Hastigheten som ett läkemedel kan presenteras för ett elimineringsorgan är produkten av blodgenomströmningen i det organet (Q) och koncentrationen läkemedel i arteriellt blod (C_A). Hastigheten som ett läkemedel kan lämna ett elimineringsorgan blir således en produkt av

blodflödet (Q) och koncentrationen läkemedel i venöst blod (C_V) som lämnar organet. Hastigheten av elimination är skillnaden mellan dessa, $Q \cdot C_A - Q \cdot C_V = Q(C_A - C_V)$.

ER är förhållandet mellan hastigheten av presentation och hastigheten av elimination (Figur 1). Maximalt ER är 1.0 och beskriver att allt läkemedel elimineras, ingenting går vidare från organet och att $C_V = 0$ (Ekvation 1). Minimalt ER är 0 och beskriver följaktligen när ingenting elimineras, att $C_A = C_V$. $ER > 0.7$ anses högt, $ER < 0.3$ anses lågt (Gabrielsson, 2016; Benet & Zia-Amirhosseini, 1995).



Figur 1. Extraktionsgrad (ER) är förhållandet mellan hastigheten av presentation och elimination som en produkt av blodflödet (Q) och koncentrationen läkemedel som presenteras för ett elimineringsorgan arteriellt (C_A) jämfört med venöst blod (C_V). Modifierad figur från Benet & Zia-Amirhosseini (1995).

$$ER = \frac{Q \cdot (C_A - C_V)}{Q \cdot C_A} = \frac{(C_A - C_V)}{C_A} \quad (1)$$

Clearance presenteras då som produkten av blodflödet (Q) över elimineringsorganet och extraktionsratio för organet (Ekvation 2).

$$Cl_{organ} = Q_{organ} \cdot ER = Q_{organ} \cdot \frac{(C_A - C_V)}{C_A} \quad (2)$$

Ett organs förmåga att rena blodet från läkemedel står i direkt proportionalitet mot aktiviteten av enzymer i det specifika organet. Det finns alltså en begränsning hos organet (Cl_{int}) som relateras till Michaelins-Menten konstant och enzymatisk mättnad (Benet & Zia-Amirhosseini, 1995).

Distributionsvolym

Distributionsvolym (V_d) är en faktor som relaterar till den totala mängden läkemedel i kroppen jämfört med koncentrationen av läkemedel i plasma (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c; Benet & Zia-Amirhosseini, 1995). Då V_d varierar under olika faser, som absorption och distribution, kommer förhållandet mellan mängd och koncentration variera över tid eller vara konstant som vid jämvikt. Specifika definitioner av V_d används därför vid olika tillfällen. För detta ändamål delas kroppen in i så kallade kompartments (eng: *compartment*) där den centrala distributionsvolymen (V_c) består av blod och inre organ och representerar den initiala distributionsvolymen, innan någonting distribuerats eller eliminerats. Distributionsvolymen i vävnaden (V_t) representerar perifera vävnader med sämre perfusion där det tar längre tid för jämvikt att uppstå. Vid jämviktsförhållanden när *steady state* är uppnått används V_{ss} som modellparameter. När plasmakoncentrationen minskar proportionerligt mot plasmaclearance, efter distributionsfasen och koncentrationssänkningen beror på elimination uppstår pseudo-jämviktsförhållanden och

V_{area} används (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c). V_d representerar inte en faktisk volym, utan en tänkt volym som anses motsvara den kroppsvätska som skulle behövas om läkemedlet skulle vara fördelat i lika koncentration i alla delar av kroppen (Benet & Zia-Amirhosseini, 1995). Det är en modell för att förstå hur ett läkemedel beter sig, det vill säga en fördelningsvolym. V_d beror på läkemedlets egenskaper exempelvis om molekylen är lipofil eller hydrofil. Kroppen delas upp i en central sektion där blodet och inre organ ingår och jämvikt uppstår omedelbart. Beroende på vilken analys som utförs delas kroppen upp i fler sektioner mellan vilka jämvikt ställer in sig efter olika tidsintervall (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c). Jämvikt drivs av koncentrationsgradienter mellan de olika sektionerna och distributionen beror på bindning till blodceller, plasmaproteiner och vävnadskomponenter. Det är enbart fritt läkemedel som kan passera mellan olika sektioner, det vill säga över plasmamembran (Riviere & Papich, 2018; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c; Benet & Zia-Amirhosseini, 1995). Ur klinisk aspekt används V_c för att förutse maximala koncentrationer vid intravenösa bolusdoser då toxiska effekter kan vara möjliga. Initiala koncentrationssänkningen efter intravenös bolusdos sker på grund av samtidig elimination från kroppen och distribution till perifera vävnader, inte enbart på grund av elimination. V_{area} används för att skatta resterande mängd läkemedel i kroppen när koncentrationen minskar enligt terminal elimination. V_{ss} är mest användbar då den låter oss beräkna startdos och kan förutse fluktuationer vid doseringsregimer med upprepade givor (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c).

Halveringstid ($t_{1/2}$)

Halveringstid förenklas ofta genom att definieras som tiden det tar för plasmakoncentrationen att reduceras till 50 %, vilket stämmer i de fall där pseudo-jämvikt har uppstått (Riviere & Papich, 2018; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). En vanlig misstolkning är att halveringstiden representerar tiden det tar att halvera administrerad dos vilket är felaktigt. Terminal $t_{1/2}$ ($t_{1/2\beta}$) anses vara mer korrekt benämning och tar hänsyn till att koncentrationssänkningen enbart beror på elimination och inte på distribution (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). Halveringstid är en parameter som beror både på clearance och distributionsvolym, till exempel kan lång halveringstid bero på antingen låg Cl eller stor V_d . Det leder till att $t_{1/2}$ tar dålig hänsyn till förändringar av fysiologiska parametrar och sjukdomsprocesser som ålder, kön etc. respektive njur- eller leverpatologi. Om Cl och V_d minskar eller ökar proportionerligt kommer $t_{1/2}$ inte att förändras (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). Klinisk relevans av $t_{1/2}$ är vid upprepad dosering då $t_{1/2}$ låter oss uppskatta läkemedelsackumulering, tiden till *steady state* och ett eventuellt behov av en startdos. För att uppskatta tiden till *steady state* används 3–5 halveringstider. För att uppskatta den tid som krävs för att ett läkemedel ska elimineras från kroppen används fem halveringstider vilket innebär att 97 % av eliminationen genomförts, resterande del anses försumbar. Den del av halveringstiden som tillåts försummas beror på biologisk effekt exempelvis vid risk för läkemedelsrester i animalieproduktion eller doping (Riviere & Papich, 2018; Trepanier, 2013; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). Den ständiga förbättringen av analysmetoder gör att vi kan detektera lägre nivåer av läkemedelskoncentrationer i plasma och teoretiskt elimineras aldrig läkemedlet totalt utan koncentrationen fortsätter att halveras och $t_{1/2}$ ökar.

Farmakokinetiska parametrar för prednisolon

De tidigare studier som publicerats om prednisolons farmakokinetik hos hund är få och publicerade mellan år 1977–1985 (Tabell 2). Två av studierna (Frey *et al.*, 1980; Tse & Welling, 1977) använder enbart en hund som studiepopulation. Studien av Hankes *et al.* (1985) är den enda publicerade studie som använder sig av en *two-compartment* modell vid analys av farmakokinetiska parametrar. Använd dos är dock 8.8 gånger högre än i denna aktuella studie och således högre än vardagliga kliniska doser.

Tabell 2. Prednisolons farmakokinetiska parametrar efter iv-bolus i publicerad litteratur

Ras	Antal hundar	Dos (mg/kg)	LOQ (ng/ml)	Vd (L/kg)	Cl_{tot} (ml/min·kg)	t_{1/2}β (h)	Källa
Beagle	1	1.7	Ej angivet	0.70	27.68	0.3	Tse & Welling, 1977
Beagle	1	3.4	Ej angivet	0.67	9.31	0.8	Tse & Welling, 1977
Blandras	1	0.4	10	0.49	8.4	1.3	Frey <i>et al.</i> , 1980
Blandras	6	0.4–1.0	10	-	6.1–15.6	-	Frey & Frey, 1982
Blandras	4	8.8	Ej angivet	1.10	4.15	2.7	Hankes <i>et al.</i> , 1985

V_d: total distributionsvolym (V_c + V_t); Cl: clearance; t_{1/2}β: terminal halveringstid.

MATERIAL OCH METODER

Experimentell design

Tio stycken (fyra tikar och sex hanar) försöks- och undervisningshundar vid Sveriges lantbruksuniversitet inkluderades i studien. Hundarna var av rasen beagle, vägde 13–16 kg och var 2–11 år gamla. Veckan före första försöksomgången undersöktes hundarna av veterinär. Då ingen hund visade tecken på sjukdom som bedömdes påverka studieresultat eller förvärras av prednisolonbehandling inkluderades samtliga hundar i studien. De hölls tillsammans i provtagningsrummet under första försöksdagen. Andra och tredje dagen hölls de i sin hemmiljö (rum med tillgång till utevistelse) mellan varje provtagningsstillfälle. De hade fri tillgång på vatten och inga förändringar gjordes i deras dagliga utfodring. Efter varje provtagningsstillfälle belönades de med kommersiellt hundgodis. Undervisningshundarna var sedan tidigare vana vid omständigheterna kring blodprovstagning, provtagningsrummet och vana vid att bli hanterade av flera människor. Hundarna rastades tre till fyra gånger om dagen när de hölls i provtagningsrummet.

Studien följde en icke-randomiserad ”*cross-over*”-modell där två grupper med fem hundar i vardera utformades efter flocktillhörighet och tillgänglighet vid tiden för studiens utförande. Varje grupp medverkade två gånger och behandlades under en studiefas med 1 mg/kg prednisolon-natriumsuccinat (Precortalon® aquosum, 25 mg, pulver till injektionsvätska, Biocodex, Kista, Sverige) och under andra studiefasen med natriumklorid (9 mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige) intravenöst. Läkemedlet späddes med 1 ml sterilt vatten (Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige) före administration. Första gruppen fick placebo under första studiefasen och behandlades med prednisolon under studiefas två, 18 dagar senare. Andra gruppen behandlades med prednisolon första studiefasen och fick sedan placebo 30 dagar senare under deras andra studiefas.

Försöket är granskat och godkänt av regionala etikprövningsnämnden i Uppsala, Dnr: 5.8.18-07216/2017

Provtagningsprotokoll

För denna studies analyser användes 3 ml EDTA-rör (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA). Fler blodprover togs samtidigt för andra syften men redovisas inte i denna studie.

Varje studiefas startade med anläggning av permanentkanyl (Venflon, 1.0x32mm, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) i ett av hundens framben. I samband med kanylläggningen togs ett basblodprov, så kallat preprov. När alla fem hundar hade fått permanentkanyl lades en tillfällig permanentkanyl (Venflon, 0.8x25 mm, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) i ett bakben ur vilken ett så kallat nollprov togs. Antingen injicerades aktiv substans eller placebo i den tillfälliga kanylen innan den avlägsnades. Därefter togs upprepade blodprover vid tiden 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 28, 32, 36, 48 och 60 timmar. Innan varje provtagning aspirerades 0.5 ml blod ur provtagningskanylen när prov togs med permanentkanyl. Proverna togs första dagen ur permanentkanyl med hjälp av vacutaineradapter och blodprov för den beskrivna studies analyser togs alltid först. Dag två och tre togs prover med ny venpunktion med butterfly-kanyl (Safety-Lok™, 0.8x19x178 mm, Becton-Dickinson, Franklin Lakes,

USA). Efter provtagning gavs fysiologisk natriumklorid (NaCl, 9 mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige) genom permanentkanylen motsvarande uttagen mängd blod (3–7 ml). Blodprovsrören vändes manuellt direkt efter blodprovstagning och lades därefter på is. För analys av blodceller pipetterades 250 µl av och proverna analyserades inom två timmar. Inför analys av prednisolon centrifugerades rören i 5°C (Rotina 380R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Tyskland). Därefter pipetterades 1 ml EDTA-plasma till 1.5 ml Eppendorf-rör (CryoPure, Sarstedts, Nümbrecht, Tyskland) och placerades omedelbart i -20°C, inom tre timmar flyttades de till -80°C.

Blodprovsanalyser

Analys av prednisolonkoncentrationer

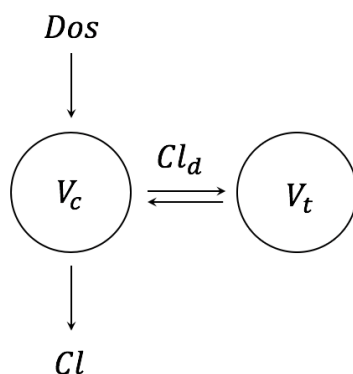
Den kvantitativa analysen av prednisolon utfördes med vätskekromatografi-tandem-masspektrometri utav personal med erfarenhet av analysmetoden vid Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Uppsala. Referensstandarderna för prednisolon och den interna standarden [²H₈]-prednisolon var köpta från Toronto Research Chemicals (North York, ON, Kanada). Provupparbetningen utfördes enligt följande. Till 100 µL Li-heparinplasma från hund (studieprov, kalibrator eller QC-prov) sattes 100 µL internstandardlösning, samt, 200 µL trikloroättiksyra (20 % w/v i vatten) för proteinfällning, varefter proverna vortex-blandades i 10 minuter och centrifugerades vid 10 000g i 10 minuter. Supernatanterna överfördes till 96-hålsplattor och 10 µL injicerades i ett vätskekromatografi-tandemmasspektrometrisystem bestående av en Acquity UPLC kopplad till en Xevo TQ-S micro tandemkvadrupol-masspektrometer via en elektroprayjonkälla med positiv potential (Waters Corporation, Milford, MA). Den analytiska kolonnen var av typen Acquity UPLC BEH C18 (längd 100 mm, I.D. 2.1 mm, partikelstorlek 1.7 µm) och hölls vid 65°C. Den rörliga fasen bestod av (A) 10 mM ammoniumformat in water and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile. Elueringen utfördes enligt följande: initialt 23 % B under 3.0 min, ökning till 80 % B under 0.5 min, konstant vid 80 % B under 1.0 min, minskning till 23 % B under 0.1 min, konstant vid 23 % B under 0.9 min. Flödes hastigheten var 400 µL/min. Analysen skedde med en kapillärspänning på 0.50 kV och en konspänning på 35 V. Desolverings- och källblockstemperaturerna var 500°C och 150°C, och desolveringsgasflödet var 1000 L/timme. Kvantifieringen utfördes med Selected Reaction Monitoring (SRM) med kollisionscellen fylld av argon vid ett tryck på 1.3·10⁻⁵ mBar. De använda massövergångarna var m/z 361 → 147 för prednisolon (kollisionsenergi 25 eV) och m/z 369 → 150 för [²H₈]-prednisolon (kollisionsenergi 25 eV). Uppehållstiden var 0.082 sekunder. Kalibreringskurvor konstruerades genom att avsätta den kromatografiska toppareakvoten (analyt/intern standard) som en funktion av respektive analytkoncentration. Kalibrerings- och QC-prover för prednisolon konstruerades genom att referenssubstans tillfördes i kända koncentrationer till blank hundplasma. QC-prover bereddes både genom spikning av referenssubstans till vatten och till blank hundplasma. Kalibreringsfunktionerna beräknades genom linjär regression med viktningsfaktorer på 1/x². Kalibreringsområdet var 0.50-500 ng/ml för prednisolon. Precisionen uttryckt som relativ standardavvikelse var för prednisolon inom intervallet 1.6–11 %. Riktigheten var för prednisolon inom intervallet 87–108 %.

Analys av leukocytkoncentrationer

Analys av hematologiska parametrar utfördes utav personal med erfarenhet av analysmetoden vid Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetssjukhuset vid SLU, Uppsala, med hematologiinstrumentet Advia 2120 (Siemens Medical Solution Diagnostics, Eschborn, Tyskland) med inställning för hundblod. Kontrollprover från Siemens analyserades dagligen på två nivåer. Advia 2120 analyserar leukocytantal och differentialräkning med laserbaserad flödescytometri. Den automatiserade differentialräkningen av leukocyter utförs i material från människa i två separata kanaler, så kallade peroxidaskanalen och basokanalen. Peroxidas-kanalen mäter intensitet och ljusspridning efter infärgning utifrån cellens peroxidasaktivitet. Resultatet redovisas i ett cytogram där cellerna placeras i ett diagram efter cellstorlek och peroxidasintensitet. Alla cytogram granskades manuellt för att bedöma om instrumentet gjort en bra uppdelning mellan olika leukocytpopulationer. Den basofila kanalen utvecklades ursprungligen för att analysera humana basofiler som inte lyserar tillsammans med instrumentet reagens. Basokanalen är inte användbar för hundblod då instrumentets reagens lyserar alla celler inklusive basofilerna (Lilliehook & Tvedten, 2011), varför enbart resultaten från peroxidaskanalen beaktades i den här aktuella studien. Alla prover med instrumentlarm gällande leukocyträkning kördes en upprepado gång.

Farmakokinetisk analys

En *two-compartment* modell anpassades till data för prednisolons koncentrationsförlopp varje enskild individ (Figur 2).



Figur 2. Schematisk illustration över prednisolons distribution i en *two-compartment* modell. *Dos* representerar mängd prednisolon administrerad intravenöst. V_c och V_t representerar den centrala distributionsvolymen respektive volymen i vävnaden, det vill säga utanför centralt kompartment. Cl är clearance av prednisolon och Cl_d är intercompartment distribution, det vill säga flödet för jämvikt mellan olika kompartment.

Modellparametrar beräknas och beskrivs matematiskt som:

$$V_c \cdot \frac{dC_p}{dt} = dos - Cl \cdot C_p + Cl_d \cdot C_t - Cl_d \cdot C_p \quad (3)$$

där C_p och C_t representerar prednisolonkoncentrationen i centralt- och perifert kompartment. V_c är den centrala distributionsvolymen, *dos* är injicerad mängd läkemedel, Cl är clearance av

prednisolon och Cl_d är *intercompartment distribution*, det vill säga flödet för jämvikt mellan olika kompartment. Det perifera kompartmentet beskrivs som:

$$V_t \cdot \frac{dC_t}{dt} = Cl_d \cdot C_p - Cl_d \cdot C_t \quad (4)$$

där V_t är volymen i vävnaden, det vill säga utanför centralt kompartment. Baserat på modellparametrarna räknades ytterligare parametrar fram som följer. Initial (5) respektive terminal (6) halveringstid för prednisolon i plasma beskrivs som:

$$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln(2)}{\alpha} \quad (5)$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln(2)}{\beta} \quad (6)$$

där α respektive β beskriver lutningen för initial och terminal halveringstid och beskrivs som:

$$\alpha = \frac{k_{21} \cdot k_{10}}{\beta} \quad (7)$$

$$\beta = \frac{1}{2} [k_{12} + k_{21} + k_{10} - \sqrt{[k_{12} + k_{21} + k_{10}]^2 - 4k_{21} \cdot k_{10}}] \quad (8)$$

där k_{10} , k_{12} och k_{21} är eliminations- samt distributionshastigheter från centralt kompartment, från centralt till perifert kompartment och från perifert till centralt kompartment och beskrivs som:

$$k_{10} = \frac{Cl}{V_c} \quad (9)$$

$$k_{12} = \frac{Cl_d}{V_c} \quad (10)$$

$$k_{21} = \frac{Cl_d}{V_t} \quad (11)$$

Koncentrationen vid tiden 0 minuter beskrivs som:

$$C_0 = A + B \quad (12)$$

där A respektive B beskrivs som:

$$A_{iv} = \frac{D_{iv}}{V_c} \cdot \frac{\alpha - k_{21}}{\alpha - \beta} \quad (13)$$

$$B_{iv} = \frac{D_{iv}}{V_c} \cdot \frac{\beta - k_{21}}{\beta - \alpha} \quad (14)$$

Medeltiden en läkemedelsmolekyl är i kroppen, (eng: *mean resicende time*, MRT) beskrivs som:

$$MRT = \frac{V_{ss}}{Cl} \quad (15)$$

där V_{ss} ($V_c + V_t$) är den skenbara distributionsvolymen vid *steady state*.

Vid beräkning utfördes viktning kopplat till uppskattade koncentrationer. En modell för viktning av prednisolonkoncentration-tid data användes med hjälp av datorprogrammet WinNonlin 4.0.1 (Certara, St. Louis, Missouri, U.S.A).

Modellutvärdering

Analys av data gjordes med *one-compartment*- samt *two-compartment* modeller. Val av *two-compartment* modell baserades på visuell inspektion av diagnostiska diagram samt av utvärderingsmodell med objektiva funktions värden: WSSR (*weighted sum of squared residuals*) och AIC (*akaike information criterion*).

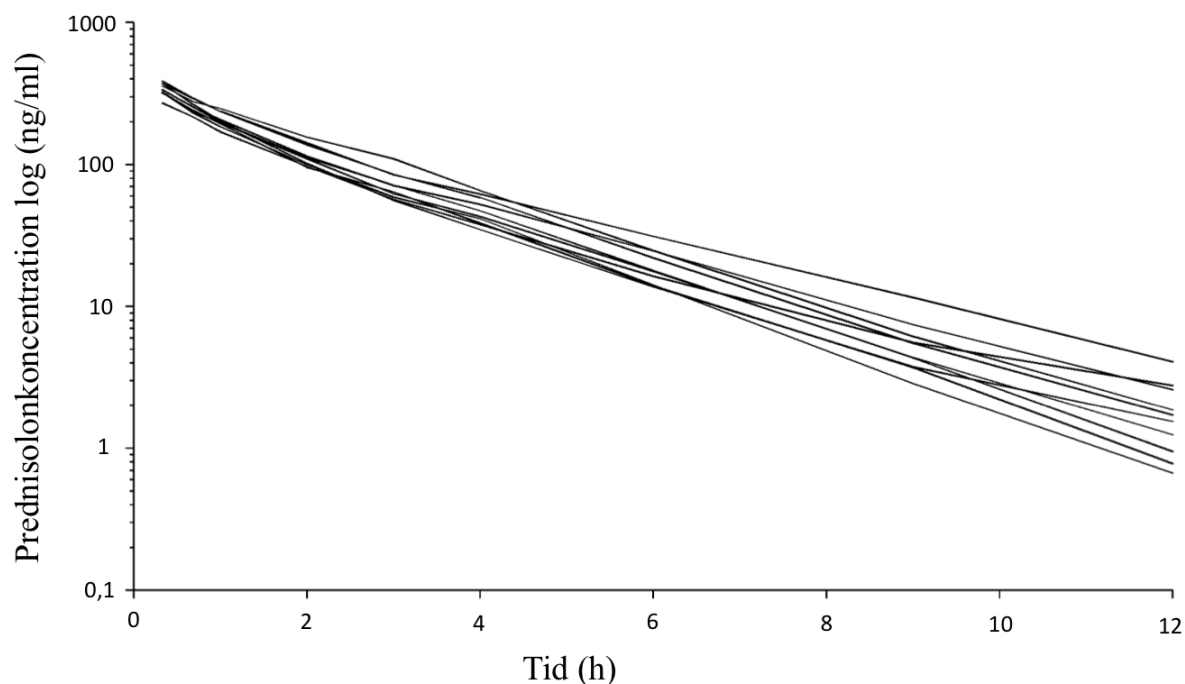
Statistisk analys

För statistisk analys valdes ett tvåsidigt Wilcoxon teckenrangtest, utfört i datorprogrammet R (The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österrike). Statistisk signifikans ansågs föreligga när $P < 0.005$ (Bonferronikorrigerat P-värde).

RESULTAT

Plasmakoncentrationer

Observerade plasmakoncentrationer av prednisolon över tid visas i ett semi-logaritmiskt diagram (Figur 3). Maxkoncentrationen observerades vid första mätningen (efter 20 minuter) hos samtliga hundar med låg interindividuell variation. Samtliga tidsförlopp för plasmakoncentrationer hade ett bifasiskt utseende med initialt brantare lutning och flackare terminal lutning i efterföljande fas. Vid låga plasmakoncentrationer var den interindividuelle variationen större än vid höga koncentrationer. Vid tiden tolv timmar var den interindividuelle variationen 4.25 gånger större än vid första mätpunkten efter 20 minuter. Plasmakoncentrationen varierade mellan 0.67–4.10 ng/ml vid tiden tolv timmar efter administration och variationen vid 20 minuter var 271–389 ng/ml. Prednisolonkoncentrationen i plasma var kvantifierbar till och med tolvtimmarsprovet för samtliga tio hundar, därefter föll koncentrationerna under 0.5 ng/ml vilket var den nedre kvantifieringsgränsen (*lower limit of quantification*, LOQ). Prednisolon var ej kvantifierbart hos någon individ efter behandling med NaCl.

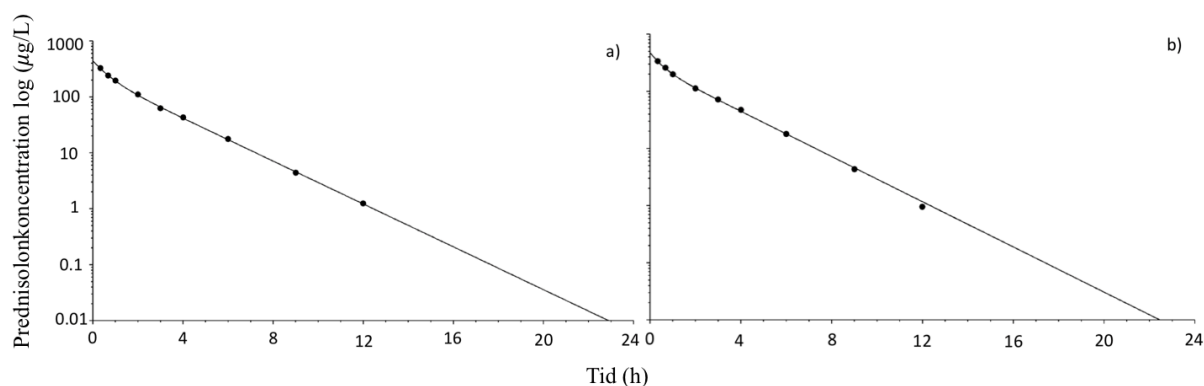


Figur 3. Semi-logaritmiskt diagram över observerade plasmakoncentrationer av prednisolon över tid efter 1 mg/kg administrerat intravenöst till tio hundar.

Farmakokinetik

Anpassning av modell

Two-compartment modellen uppvisade god anpassning till observerade plasma-koncentrationer av prednisolon (Figur 4). Modellutvärderingen gav medianvärden för WSSR och AIC som var mindre vid val av *two-compartment* modellen jämfört med *one-compartment* modell.



Figur 4. Observerade och modellanpassade plasmakoncentration-tidsförlopp av prednisolon efter intravenös administration (1 mg/kg) till två hundar. Figur a) samt b) visar på bättre respektive sämre anpassning till data vid analys med en *two-compartment* modell.

Specifika parametrar

Farmakokinetiska modellparametrar redovisas i tabell 3 och framräknade parametrar i tabell 4. Medianvärden vid en bolusdos intravenöst av 1 mg/kg prednisolon-natriumsuccinat till tio hundar var V_d 2.86 L/kg, Cl 24.33 ml/min·kg och terminal halveringstid 1.6 timmar.

Tabell 3. Farmakokinetiska modellparametrar efter en intravenös bolusdos (1 mg/kg) prednisolon till hund ($n=10$)

Hund	V_c (L/kg)	V_t (L/kg)	V_d (L/kg)	Cl (ml/min·kg)	Cl_d (ml/min·kg)
1	2.21	0.85	3.06	22.33	12.50
2	2.12	0.77	2.89	26.33	19.00
3	2.27	0.69	2.96	25.00	13.00
4	1.94	0.70	2.64	24.83	8.83
5	2.08	0.74	2.82	18.83	8.67
6	0.58	1.47	2.05	17.17	72.17
7	2.30	0.62	2.92	26.17	11.17
8	1.85	0.58	2.43	20.00	14.50
9	2.13	0.69	2.82	23.83	16.17
10	2.96	0.84	3.80	27.83	6.67
Variationsvidd	0.58-2.96	0.77-1.47	2.05-3.80	17.17-27.83	6.67-72.17
Median	2.13	0.69	2.86	24.33	12.75

V_c : central distributionsvolym; V_t : perifer distributionsvolym; V_d : total distributionsvolym ($V_c + V_t$); Cl : clearance; Cl_d : *intercompartment distribution*, det vill säga flödet för jämvikt mellan olika kompartment.

Tabell 4. Framräknade farmakokinetiska parametrar efter en intravenös bolusdos (1 mg/kg) prednisolon till hund (n=10)

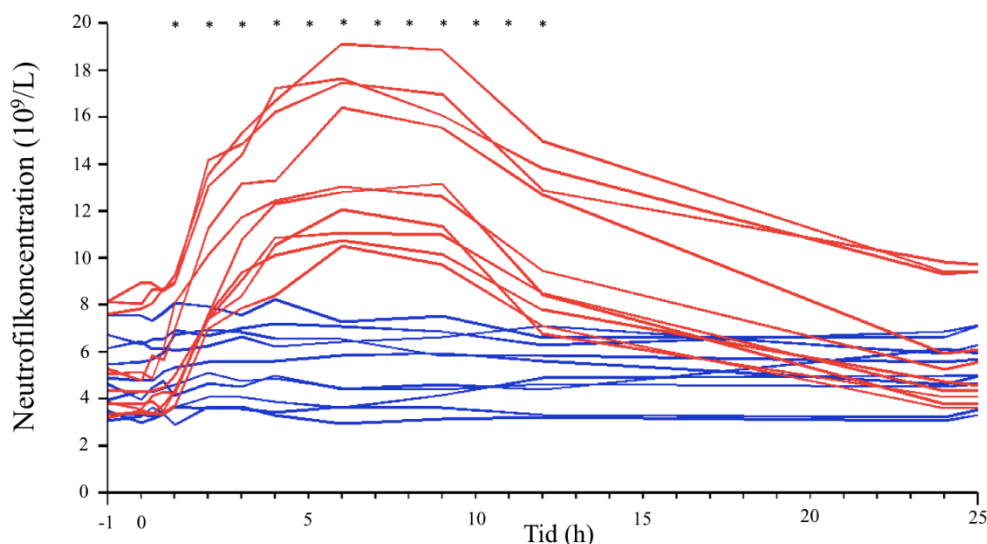
Hund	C_0 (ng/ml)	α (h ⁻¹)	β (h ⁻¹)	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	MRT (h)
1	452.28	1.46	0.37	0.5	1.9	2.3
2	470.83	2.28	0.48	0.3	1.4	1.8
3	439.73	1.69	0.44	0.4	1.6	2.0
4	513.27	1.37	0.42	0.5	1.6	1.8
5	480.57	1.17	0.33	0.6	2.1	2.5
6	1710.62	11.67	0.44	0.1	1.6	2.0
7	434.15	1.59	0.46	0.4	1.5	1.9
8	539.86	2.17	0.45	0.3	1.6	2.0
9	470.10	2.09	0.46	0.3	1.5	2.0
10	337.93	0.87	0.31	0.8	2.2	2.3
Variationsvidd	337.93-1710.62	0.87-11.67	0.31-0.48	0.1-0.8	1.4-2.2	1.8-2.5
Median	470.47	1.64	0.44	0.4	1.6	2.0

C_0 : prednisolonkoncentration vid tiden 0; $t_{1/2\alpha}$: initial halveringstid; $t_{1/2\beta}$: terminal halveringstid; α respektive β : hastighetskonstanter i initial respektive terminal fas; MRT: medeltiden en prednisolonmolekyl befinner sig i kroppen.

Leukocyttrespons

Neutrofilrespons

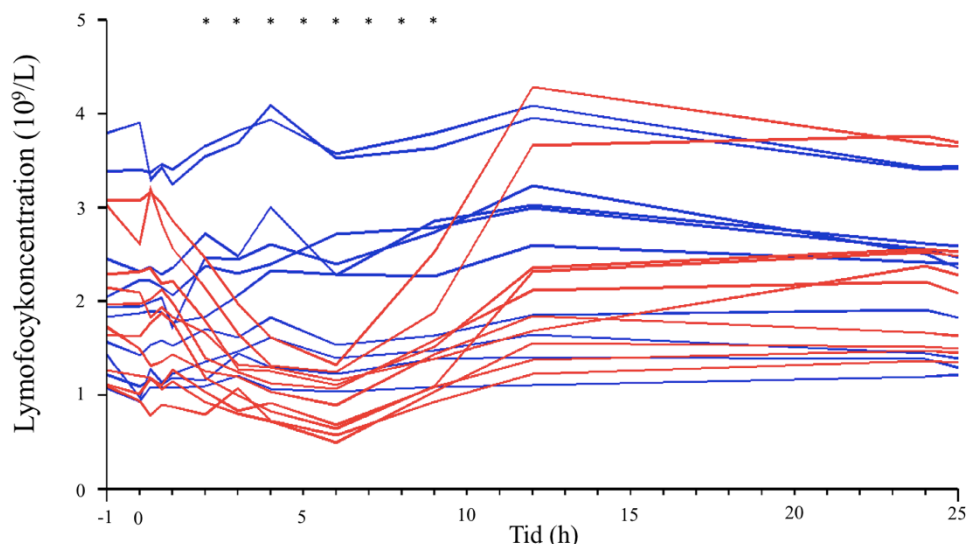
Efter behandling med koksalt observerades neutrofilkoncentrationer mellan $2.89\text{--}8.26 \cdot 10^9/\text{L}$ med låg variabilitet både inom och mellan individer (Figur 5). Efter behandling med prednisolon var variationen i neutrofilkoncentration mellan individer högre och låg mellan $3.19\text{--}19.14 \cdot 10^9/\text{L}$. Maximala observerade neutrofilkoncentrationer inföll vid sex timmar varpå koncentrationen återvände mot baslinjen efter nio timmar för att vara tillbaka på baslinjen vid 24 timmar. Signifikant högre neutrofilkoncentrationer observerades mellan en timme fram till och med tolv timmar efter prednisolonadministration (Tabell 5).



Figur 5. Observerade neutrofilkoncentrationer över tid vid prednisolonbehandling (1 mg/kg) intravenöst till tio hundar (röd) jämfört med kontrollgrupp (blå). * representerar mättider där signifikant skillnad påvisas mellan behandlad och obehandlad grupp. Mätvärdet -1 representerar tidpunkten för provtagning av nollprovet.

Lymfocyterspons

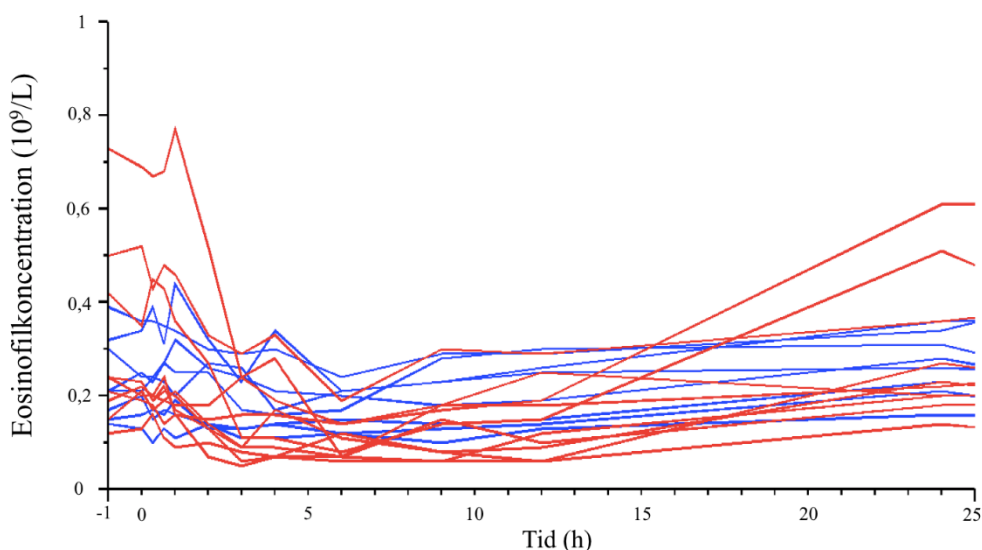
Efter behandling med koksalt observerades lymfocytkoncentrationer mellan $0.94\text{--}4.09 \cdot 10^9/\text{L}$. Individerna pendlar kontinuerligt kring sina respektive baslinjer men med stor interindividuell variation (Figur 6). Efter behandling med prednisolon sjunker koncentrationerna och de följs åt i ett smalt intervall med liten variabilitet mellan individer ($0.5\text{--}1.33 \cdot 10^9/\text{L}$), för att sedan återgå till en större variation mellan individer ($0.5\text{--}4.29 \cdot 10^9/\text{L}$). Lägsta observerade lymfocytkoncentrationer inföll vid sex timmar varpå koncentrationerna direkt återvände mot baslinjen vid 12–24 timmar. Signifikant lägre lymfocytkoncentrationer observerades mellan två timmar och fram till och med nio timmar efter prednisolonadministration (Tabell 5).



Figur 6. Observerade lymfocytkoncentrationer över tid vid prednisolonbehandling (1 mg/kg) intravenöst till tio hundar (röd) jämfört med kontrollgrupp (blå). * representerar mättider där signifikant skillnad påvisas mellan behandlad och obehandlad grupp. Mätvärde -1 representerar tidpunkten för provtagning av nollprovet.

Eosinofilrespons

Efter behandling med koksalt observerades eosinofilkoncentrationer mellan $0.1\text{--}0.44 \cdot 10^9/\text{L}$ (Figur 7). Efter behandling med prednisolon varierar eosinofilkoncentrationerna mellan $0.05\text{--}0.77 \cdot 10^9/\text{L}$. Individuella och interindividuella koncentrationer följer inte iakttagbara förlopp vare sig för behandlad eller obehandlad grupp. Baserade på dessa mätvärden kunde ingen statistisk signifikans påvisas gällande prednisolons egenskaper att orsaka eosinopeni (Tabell 5). En hund har exkluderats ur resultaten för eosinofiler då en mindre del av neutrofilpopulationen feltolkats som eosinofiler, vilket lett till falskt höga koncentrationer av eosinofiler. Två prover tvingades exkluderas ur studien på grund av koagel i blodprovsväret respektive tekniskt fel vid hematologianalysen.



Figur 7. Observerade eosinofilkoncentrationer över tid vid prednisolonbehandling (1 mg/kg) till nio hundar (röd) jämför med kontrollgrupp (blå). En hund exkluderades då instrumentet, på grund av att individens neutrofilpopulation, gav falskt höga eosinofilantal. Mätvärdet -1 representerar tidpunkten för provtagning av nollprovet.

Tabell 5. Redovisning av samtliga P -värden för att visa på skillnader mellan prednisolonbehandling och kontrollgrupp vid provtagningstider till och med 24 timmar efter läkemedelsadministration där * representerar $P < 0,005$ (Bonferronikorrigerat P -värde)

Provtagningstid	Neutrofiler	Lymfocyter	Eosinofiler
0 min	0.40	0.30	0.10
20 min	0.40	0.01	0.30
40 min	0.20	0.02	0.20
1 h	0.002 *	0.05	0.60
2 h	0.002 *	0.002 *	1.00
3 h	0.002 *	0.002 *	0.40
4 h	0.002 *	0.002 *	0.60
6 h	0.002 *	0.002 *	0.01
9 h	0.002 *	0.002 *	0.20
12 h	0.002 *	0.06	0.20
24h	0.50	0.60	0.80

DISKUSSION

Farmakokinetik och specifika parametrar

Denna redovisade studie utvärderar dispositionen av prednisolon i plasma och leukocyttrespons efter intravenös administration av 1 mg/kg prednisolon till hund. Antalet hundar har varit fler och en känsligare och mer robust analysmetod för kvantifiering av prednisolonkoncentrationer i hundplasma har använts jämfört med tidigare studier (Hankes *et al.*, 1985; Frey & Frey, 1982; Frey *et al.*, 1980; Tse & Welling, 1977). Specialiserad mjukvara kombinerat med moderna datorer tillåter anpassning av upp till 500 olika ekvationer till rådata vilket bidrar till ett mer precist resultat (Riviere *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2011). De farmakokinetiska parametrarna V_d och Cl överensstämmer inte helt med litteraturen (Tabell 3, 4 och 6). Halveringstiden var lik de som redovisats tidigare vilket tros förklaras av förändringarna av V_d och Cl . Halveringstid är en parameter som beror både på clearance och distributionsvolym och om Cl och V_d minskar eller ökar proportionerligt kommer $t_{1/2}$ inte att förändras (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). De presenterade farmakokinetiska parametrarna från den aktuella studien kan på grund av sin högre tillförlitlighet också bidra med värdefull information till kliniker i de fall en dos måste justeras på grund av exempelvis behandlingssvikt hos en individ (Trepanier, 2013).

Tabell 6. Farmakokinetiska parametrar efter intravenös administration av prednisolon redovisad i publicerad litteratur jämfört med resultat från den aktuella studien

Ras	Antal hundar	Dos (mg/kg)	LOQ (ng/ml)	V_d (L/kg)	Cl_{tot} (ml/min·kg)	$t_{1/2\beta}$ (h)	Källa
Beagle	1	1.7	Ej angivet	0.70	27.68	0.3	Tse & Welling, 1977
Beagle	1	3.4	Ej angivet	0.67	9.31	0.8	Tse & Welling, 1977
Blandras	1	0.4	10	0.49	8.4	1.3	Frey <i>et al.</i> , 1980
Blandras	6	0.4–1.0	10	-	6.1–15.6	-	Frey & Frey, 1982
Blandras	4	8.8	Ej angivet	1.10	4.15	2.7	Hankes <i>et al.</i> , 1985
Beagle	10	1	0.5	2.86	24.33	1.6	Adolfsson, 2019

V_d : total distributionsvolym ($V_c + V_t$); Cl : clearance; $t_{1/2\beta}$: terminal halveringstid.

Flera variabler kan tänkas förklara skillnader mellan rapporterade farmakokinetiska parametrar. Val av modell ger olika sätt att räkna fram de olika farmakokinetiska parametrarna, antal mätpunkter och tiden plasmakoncentrationerna har följts varierar. I studierna utförda av Frey & Frey (1982) och Frey *et al.* (1980) används inte en specifik modell utan parametrarna skattas efter fristående formler. Exakta mättider angavs inte i studierna utan har grovt fått skattas ur diagram där de mest sannolikt har mätt plasmakoncentrationer under åtta timmar. Tse & Welling (1977) tolkade rådata som ett linjärt förlopp under hela provtagningstiden och en *one-compartment* modell användes. Prednisolonkoncentrationerna mättes i upp till sex timmar efter

administration av läkemedlet, i jämförelse med den aktuella studien där plasmakoncentrationerna föll under LOQ efter tolv timmar. Rådata i den här studien följer ett bifasiskt förlopp där de första tre–fyra mätningarna (1–2 timmar efter läkemedelsadministration) består av en initialt brantare lutning följt av en flackare terminal fas varför data har anpassats till en *two-compartment* modell. I studien utförd av Hanks *et al.* (1985) anpassades en *two-compartment* modell till rådata där plasmakoncentrationer av prednisolon mättes under tio timmar. Plasmakoncentrationer bör följas tills de inte längre kan kvantifieras för att osäkerheten ska minska vid framräkning av farmakokinetiska parametrar. Lägsta kvantifierbara koncentration av prednisolon har bara redovisats av Frey & Frey (1982) och Frey *et al.* (1980) som var 10 ng/ml jämfört med denna rapporterade studie som följt koncentrationerna ner till 0.5 ng/ml. Med en känsligare analysmetod (lägre LOQ) följdes koncentration-tidsförloppet över en längre tid, en mer korrekt beräkning av parametrarna kunde utföras med hänsyn till god karakterisering av den terminala fasen. Analysmetoden att kvantifiera prednisolon kan också ha påverkat resultaten. Exempelvis förekommer det i litteraturen att plasmakoncentrationen uppskattats med hjälp av radioaktivt märkta molekyler och det har diskuterats att metaboliter som är märkta kommer ge falskt höga koncentrationer (Hanks *et al.*, 1985).

I den aktuella studien har tio stycken hundar och en kliniskt relevant dos använts (1 mg/kg). Antalet hundar ger ett större underlag och en större trovärdighet än de få individer (en, fyra respektive sex stycken) som litteraturen baseras på (Hanks *et al.*, 1985; Frey & Frey, 1982; Frey *et al.*, 1980; Tse & Welling, 1977). Administrerad dos varierar mellan 0.4–8.8 mg/kg, där vissa av de publicerade studierna använder doser över 1 mg/kg vilket inte representerar kliniska doser för antiinflammatorisk effekt.

Hund 6 i denna studie avviker från de andra gällande både modellparametrarna och de framräknade parametrarna. Det skulle krävs tätare mätningar under initial fas för att modellen ska kunna analysera parametrarna mer korrekt. Vår studie har använt två mätpunkter under första halvtimmen likt Frey & Frey (1982) och Frey *et al.* (1980) jämfört med Tse & Welling (1977) som har fyra mätpunkter och Hanks *et al.* (1985) mäter åtta gånger under första halvtimmen.

Det är visat på människa att prednisolons farmakokinetik är dosberoende och att parametrarnas värden ökar med ökad dos. Den största orsaken anses vara att proteinbindningsgraden i plasma inte är linjär, det vill säga ju högre koncentrationer läkemedel, desto lägre proteinbindningsgrad och högre koncentrationer fritt prednisolon i plasma (Bergrem *et al.*, 1983). En ökning av dos kan resultera i oproportionerlig ökning av fritt läkemedel och följaktligen ge en oproportionerlig större farmakologisk effekt. Hos hund är det istället visat att ökade koncentrationer i plasma sänker de kinetiska parametrarnas värden och författarna har inte redovisat några teorier (Frey *et al.*, 1980).

Leukocyterespons och endogena biomarkörer

Det är sedan länge känt att GK ger dess antiinflammatoriska och immunosupprimerande effekter bland annat genom påverkan på leukocyter. Leukogram visar vid GK-behandling neutrofili utan vänsterförskjutning, lymfopeni, eosinopeni och monocytos hos hund (Riviere & Papich, 2018; Rang *et al.*, 2016; Feldman, 2014; Behrend & Kemppainen, 1997; Jain, 1986;

Wilcke & Davis, 1982). I tidigare publicerade farmakodynamiska studier på människa har neutrofiler, eosinofiler och lymfocyter använts som endogena biomarkörer på respons av GK-behandling. Även på hund har neutrofiler, eosinofiler och lymfocyter studerats under de första 24 timmarna efter prednisolonbehandling varför dessa variablerna valdes som biomarkörer i den här aktuella studien. Immunförsvarsceller kan också antas vara biomarkörer på den så kallade *causal pathway* som använts i klassificering av biomarkörer inom farmakologin (Keller-Wood, 2015; Stark *et al.*, 2006; Danhof *et al.*, 2005; Mager *et al.*, 2003; Magee *et al.*, 2002; Jasper & Jain, 1965).

Maximal koncentration av neutrofiler i denna aktuella studie observerades vid 6–9 timmar och var åter vid baslinjen efter 24 timmar. Det är i linje med tidigare forskning då maximal koncentration har observerats vid tio timmar och de var åter till baslinjen 12–24 timmar efter prednisolonadministration (Jasper & Jain, 1965). I den studien inkluderades bara tre hundar och prednisolon administrerades oralt (1.3–2.2 mg/kg). Tider för maximal neutrofilkoncentration sammanfaller med tidigare publicerade resultat (Jasper & Jain, 1965) vilket tyder på att prednisolon snabbt blir systemiskt tillgänglig efter oral administration. I denna aktuella studie kan möjligtvis en högre koncentration finnas mellan sex och nio timmar som inte fångas upp på grund av att inget prov togs mellan dessa mätpunkter.

Lymfocytfliktuationer i denna studie följer förväntade förlopp med lägsta koncentrationer efter sex timmar och återvänder till baslinjen efter 12–24 timmar. Jasper & Jain (1965) redovisar lägsta koncentrationer vid 4–6 timmar men efter 24 timmar då provtagningen upphörde hade enbart två hundar återvänt till baslinjen.

Eosinopeni påvisades i samma studie med lägsta koncentrationer vid 6–8 timmar för att sedan återvända till baslinjen efter 12–24 timmar. En studie utförd i Österrike på fem hundar studerade eosinofilkoncentrationer efter administration av 2 mg/kg prednisolon subkutant där lägsta koncentrationer redovisas vid sex timmar för att åter vara vid baslinjen efter 24 timmar. Efter prednisolonadministration var sex timmar den första mätpunkten vilket kan betyda att en sänkning av eosinofilkoncentration kan ha skett vid tidigare tillfälle (Haschka, 1974). Ingen av nämnda studier utförde någon form av statistisk analys. Eosinofilkoncentrationerna i den här aktuella studien var svårtolkade. Vid individuell inspektion av samtliga grafer noterades en lägre koncentration som trend hos majoriteten av de behandlade hundarna, men utan tydligt tidsbestämt förlopp. Eosinofilantalet tolkades sjunka till lägsta koncentrationer omkring sex timmar för att återgå till baslinje mellan 12–24 timmar. Att inte statistisk signifikans kunde påvisas vid förväntade tider mellan behandlad och obehandlad grupp kan bero på att även den obehandlade gruppens eosinofiler sjunker initialt, vilket kan vara en följd av endogen frisättning av kortisol (Jasper & Jain, 1965). Under försöksomgången kan situationen i behandlingsrummet varit stressande eftersom alla hundar i samma omgång vistades där samtidigt och en av tikarna löpte under en försöksomgång. Vissa provtagningstillfällen medförde problem med att blod koagulerade i kanylerna och hundarna behövde sitta på undersökningsbordet en längre tid. Ingen av tidigare nämnda orsaker förklarar varför påverkan på övriga leukocyter vid eventuell endogen GK-effekt förblev oförändrad. Det går också att spekulera i om leukocyter kan vara olika känsliga för GK-effekt. Till sammanhanget hör även att beaglarna inkluderade i den här presenterade studien hade låga koncentrationer av eosinofiler. Eosinofilkoncentrationerna

varierade mellan $0.1\text{--}0.4 \cdot 10^9/\text{L}$ med ett medianvärde på $0.2 \cdot 10^9/\text{L}$ under den obehandlade fasen där aktuellt referensintervall var $0.1\text{--}1.2 \cdot 10^9/\text{L}$ för hematologiinstrumentet Advia 2120. Följaktligen blir precisionen i cellräkningen sämre, en delorsak till att skillnaden mellan behandlad och obehandlad inte blev tydlig och signifikans inte kunde påvisas.

Två prover tvingades exkluderas ur studien på grund av koagel i blodprovsväret respektive tekniskt fel vid analys. Dessa två prover togs vid 32 respektive 48 timmar efter administration av prednisolon och tros därför inte påverka tolkningen av resultaten märkvärt.

KONKLUSION

Genom att analysera farmakokinetiska egenskaper hos prednisolon efter intravenös bolusdos kan redovisade data användas som referensvärden i framtida studier med andra administrationsvägar. Resultaten kan också bidra med värdefull information till kliniker i de fall en dos måste justeras på grund av exempelvis behandlingssvikt hos en individ (Trepanier, 2013). Farmakokinetiska medianvärden vid en bolusdos intravenöst av 1 mg/kg prednisolon-natriumsuccinat till tio hundar av rasen beagle var V_d 2.86 L/kg, Cl 24.33 ml/min·kg och terminal halveringstid 1.6 timmar. I framtiden kan dessa värden ligga till grund för en evidensbaserad doseringsregim. Analys av leukocyttrespons har givit information om hur de viktigaste biomarkörerna beter sig och vilken effekt som kan förväntas vid administration av kliniska doser intravenöst, vilket aldrig tidigare gjorts i en studie på tio hundar. Statistisk signifikans sågs mellan behandlad och obehandlad grupp vid 1–12 timmar för neutrofiler och mellan 2–9 timmar för lymfocyter. Eosinofiler visade inte på statistisk signifikans mellan behandlad och obehandlad grupp vid något provtagningstillfälle. De resultat som redovisas i denna studie var enbart efter intravenös administration av en bolusdos med 1 mg/kg till hund och det krävs fler PK/PD-studier inklusive beräkning av farmakodynamiska parametrar som exempelvis potensvärden. Även fler studier gällandes administrationsvägar och kliniska studier krävs för att etablera ett större vetenskapligt underlag till behandlingsregimer gällandes prednisolon till hund.

TACK

Jag vill ge min handledare Carl Ekstrand mitt allra största tack för hans hjälp, engagemang och all fantastisk stöttning under detta examensarbete. Ett stort tack riktas till Inger Lilliehöök för hjälp med utförande av analyser, support och kloka resonemang samt till biträdande handledare Helena Pettersson för all planering runt studien och värdefulla kommentarer till arbetet. Stort tack till examinator Eva Tydén för synpunkter och återkoppling. Även tack till Johan Gabrielsson för kommentarer under arbetets gång. Varmt tack även till Jeanette Hansson, Sofia Ryberg, Emma Hörnebro och hundarna under försöksdagarna. Slutligen, tack till Mikael Hedeland på Statens Veterinärmedicinska Anstalt för analyser av prednisolon och ovärderlig metodbeskrivning.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Introduktion

Prednisolon är ett av de mest ordinerade läkemedlen till hund i Sverige och i många andra länder. Prednisolon är ett kortisonpreparat som anses ha medellång effekt och varaktighet i kroppen jämfört med andra kortisonpreparat. Kortison används framför allt vid behandling av inflammation eller för att hämma kroppens immunförsvar. Längre har prednisolon använts i doser som baseras på erfarenhet då det saknas moderna studier om läkemedlet, vilket medför risker som kan framkalla svåra biverkningar eller utebliven effekt vid för låga doser eller för långa intervall mellan behandlingarna. Kortisonpreparat kan ge biverkningar som ökad aptit, ökad törst, ökad urinavgång, muskelsvaghet- och förtvinning, diabetes typ II, benskörhet, tunn hud och försämrad sårhäkning. Syftet med denna studie var att undersöka hur koncentrationerna av prednisolon sjunker över tid genom att använda moderna och förbättrade analysmetoder. Detta efter injektion av läkemedlet i blodet med en dos som används i klinisk verksamhet (1 mg/kg) till hund, samt studera utvalda vita blodkroppar som kroppsegna markörer för effekt av läkemedlet. Resultatet kan ge underlag till en framtida vetenskapligt bevisad doseringsregim, det vill säga ett protokoll för vilken mängd, hur ofta och i hur många dagar prednisolon ska administreras till en patient.

Litteraturoversikt

Prednisolon är ett av flera syntetiskt framställda kortisonpreparat som används som läkemedel inom både veterinär- och humanvården. Kroppseget kortison, det vill säga kortisol, produceras i binjurarna som också producerar flertalet andra livsviktiga hormoner. Kortisol finns normalt i blodet i varierande mängd påverkat av dygnsrytmen. Kortisolutsöndringen styrs av hypotalamus, en hormonproducerande körtel i hjärnan som styr aktiviteter i det autonoma nervsystemet. Kortisonpreparat kan generellt vara ett användbart läkemedel vid olika orsaker till inflammation, allergi, autoimmuna- och tumorsjukdomar. Kortison verkar genom att binda till målmolekyler, så kallade receptorer, på och inuti många av kroppens olika celler och genom komplicerade verkningsmekanismer fås då många effekter. Dessutom kan kortison påverka vilka proteiner som bildas i kroppen. Påverkan på vita blodkroppar anses vara den största orsaken till de antiinflammatoriska och immunförsvarshämmande effekter som erhålls vid behandling. Inflammation är en försvarsreaktion från kroppen där vita blodkroppar är en del av immunförsvaret. Med hjälp av kortison kan inflammationen kontrolleras så det inte blir en alltför kraftig reaktion. Kortisonpreparat påverkar immunförsvaret till exempel genom kemiska signaler som verkar hämmande på signalvägar som orsakar inflammation och stimulerar signalvägar som verkar mot inflammation. Kortisonpreparat hämmar också molekyler som gör att vita blodkroppar kan ta sig över kärlväggen och ut i vävnaden, vilket minskar inflammationen. Dessutom gör kortison att vissa vita blodkroppar flyttas från blodet till mjälten och lymfkäntor i kroppen och på så sätt inte är tillgängliga för att orsaka inflammation. Förändringarna på den vita blodbildningen är väl kända och kallas också för ett stressleukogram då liknande förändringar ses vid stress då kroppen utsöndrar kortisol. De vita blodkroppar som studerats i denna aktuella studie är neutrofila granulocyter, eosinofila granulocyter och lymfocyter. Vid kortisol- och/eller kortisonpåverkan ökar de neutrofila granulocyterna (neutrofili) och både de eosinofila granulocyterna och lymfocyterna minskar i antal (eosinopeni och lymfopeni).

Farmakologi är läran om läkemedel och de vetenskapliga studierna avseende verkningsmekanismer och effekter av olika substanser. Ett läkemedel är en kemisk substans som ger en fysiologisk respons i kroppen. Farmakologi delas upp i två övergripande discipliner, farmakodynamik och farmakokinetik. Farmakodynamik beskrivs som läkemedlets effekter på kroppen, jämfört med farmakokinetik som beskriver vad kroppen gör med läkemedlet. Farmakodynamik beskriver exempelvis vilka receptorer och vävnader som läkemedlet påverkar och hur stor effekt som kan fås vid behandling med en viss dos. Farmakokinetik handlar om hur kroppen tar upp läkemedel från magtarmkanalen eller injektionsplatsen, hur läkemedlet sprids mellan olika vävnader i kroppen samt hur läkemedlet bryts ner och försvinner från kroppen. Specifika farmakokinetiska parametrar tillsammans med kännedom om de koncentrationer som krävs för behandlingseffekt utgör underlag för vetenskapligt baserad doseringsregim, alltså rätt dos vid rätt tid. Effektgivande koncentrationer och specifika farmakokinetiska parametrar fås fram genom att utföra studier på djurslaget och effekten i fråga. Specifika farmakokinetiska parametrar som tas upp i denna studie är clearance, distributionsvolym och halveringstid. Clearance är ett mått på kroppens förmåga att eliminera läkemedel genom metabolism och utsöndring framför allt via lever och njurar. Olika djurslag, raser och individer har olika stor förmåga att göra sig av med olika läkemedel och clearance kommer därför variera mellan olika studier. Ett läkemedels distributionsvolym används för att uppskatta hur ett läkemedel fördelas i kroppen vilket beror på läkemedlets egenskaper. Distributionsvolym representerar inte en faktisk volym utan den volym som anses motsvara den kroppsvätska som skulle behövas om läkemedlet skulle vara jämnt fördelat i alla delar av kroppen. Halveringstid definieras som den tiden det tar för läkemedelskoncentrationen i blodet att halveras vilket används för att beräkna när nästa dos behöver ges. I den första fasen från att ett läkemedel administreras sjunker koncentrationerna i blodet även på grund av distribution, det har inte försvunnit ur kroppen men det är lägre koncentrationer i blodet. Terminal halveringstid är därför en mer korrekt benämning och tar hänsyn till att koncentrations-sänkningen enbart beror på elimination

Material och metod

Studien baseras på en försök där tio hundar av rasen beagle ägda av Sveriges lantbruksuniversitet inkluderades i studien. Varje hund var med två gånger i studien, en gång behandlades de med 1 mg/kg prednisolon (injicerat i blodet) och andra gången med koksalt. Blodprover togs vid tiden 0, 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 28, 32, 36, 48 och 60 timmar för analys av prednisolonkoncentrationer och vita blodkroppar. När hundarna fick koksalt i blodet var de obehandlade och tillhörde då kontrollgruppen. Kontrollgruppens resultat kan då jämföras med när de fick läkemedel för att finna skillnader som beror på läkemedelsgeva. För att påvisa skillnader mellan behandlad och obehandlad grupp som inte beror på slumpen användes en statistisk modell.

Resultat

Farmakokinetiska medianvärden vid en dos på 1 mg/kg prednisolon administrerat i blodet till tio hundar gav ett clearance på 24.33 ml/min·kg och en distributionsvolym på 2.86 L/kg. Den farmakokinetiska analysen visar att prednisolon fördelas ut i kroppens vävnader samtidigt som den elimineras snabbt från blodet vilket resulterar i en och terminal halveringstid på 1.57

timmar. Det fanns en skillnad mellan behandlad och obehandlad grupp för två av de tre analyserade vita blodkropparna. Antalet av de så kallade neutrofila granulocyterna steg i blodet efter behandling med prednisolon. Ett ökat antal neutrofiler sågs från provtagningstiden vid en timme och fram till och med tolv timmar efter medicingiva. Det fanns också en skillnad i en antalet av en annan vit blodkropp, de så kallade lymfocyterna. Minskat antal lymfocyter sågs mellan två och nio timmar efter medicingiva. Dock kunde ingen skillnad i koncentration påvisas mellan behandlad och obehandlad grupp för den tredje undersökta blodkroppen. Medelneutrofilantalet låg som högst sex-nio timmar efter administration av prednisolon. Medel-lymfocytantalet låg som lägst vid sex timmar efter administration av prednisolon. Det går inte med säkerhet att dra slutsatser om när medeleosinofilantalet var som lägst.

Diskussion

Tidigare publicerade studier som undersökt farmakokinetik för prednisolon till hund vid administration i blodet är få och omoderna. Dessutom har flera använt doser som är höga och inte är kliniskt relevanta. I jämförelse med tidigare publicerade studier redovisar denna studie större värden för distributionsvolym och clearance. Halveringstiden var lik de som redovisats tidigare vilket tros förklaras av förändringarna av distributionsvolym och clearance. Halveringstid är en parameter som beror både på clearance och distributionsvolym, då de minskar eller ökar proportionerligt kommer halveringstiden ej att förändras. Nutida analys-metoder kan detektera lägre läkemedelskoncentrationer i blodet vilket resulterar i mer exakta uträkningar av de farmakokinetiska parametrarna. Denna studie har också följt förloppet under en längre tid än tidigare, 60 timmar jämfört med fem, sex och tio timmar i tidigare publicerad litteratur. Dessutom har olika typer av metoder används för att räkna fram parametrarna vilket också kan bidra till de skillnader som ses.

Sedan tidigare finns få publicerade studier som undersöker prednisolons påverkan på den vita blodbildningen under de första 24 timmarna efter läkemedels-giva. Neutrofiler och lymfocyter följer de förlopp som redovisas i tidigare litteratur med högsta och lägsta koncentrationer omkring sex timmar efter läkemedels-giva. Publicerad litteratur redovisar att eosinofilantalet sjunker vid 6–8 timmar och är tillbaka till normala nivåer vid 12–24 timmar, jämfört med resultaten från denna studie där det inte går att dra generella slutsatser om eosinofilantalet. Ingen statistisk signifikans kunde påvisas mellan behandlad och obehandlad grupp, vilket betyder att vi inte med säkerhet kan säga att skillnaderna i eosinofilkoncentrationer beror på läkemedelsbehandling utan lika gärna kan bero på slumpen. Det kan bero på att en del stress i samband med provtagningstillfällena gjorde så kroppseget kortisol påverkade värdena även i den obehandlade gruppen. De individer inkluderade i denna studie har låga koncentrationer av eosinofiler normalt, vilket kan vara en delorsak till att signifikans inte kan påvisas.

Farmakokinetiska och dynamiska studier innehåller den vetenskapliga grunden. De resultat som redovisas i denna studie är enbart efter en giva med 1 mg/kg prednisolon i blodet till hund. Det krävs fler studier för att etablera ett större vetenskapligt underlag till behandlingsregimer gällandes prednisolon till hund.

REFERENSER

- Ammersbach, M.A., Kruth, S.A., Sears, W. & Bienzle, D. (2006). The effect of glucocorticoids on canine lymphocyte marker expression and apoptosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(5), ss. 1166-71.
- Behrend, E.N. & Kemppainen, R.J. (1997). Glucocorticoid therapy. Pharmacology, indications, and complications. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 27(2), ss. 187-213.
- Bellavance, M.A. & Rivest, S. (2014). The HPA - Immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. *Frontiers in Immunology*, 5, s. 136.
- Benet, L.Z. & Zia-Amirhosseini, P. (1995). Basic principles of pharmacokinetics. *Toxicologic Pathology*, 23(2), ss. 115-123.
- Bergrem, H., Grottum, P. & Rugstad, H.E. (1983). Pharmacokinetics and protein binding of prednisolone after oral and intravenous administration. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 24(3), ss. 415-9.
- Bonagura, J.D. & Twedt, D.C. (2008). *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Health Sciences.
- Bonagura, J.D. & Twedt, D.C. (2014). *Kirk's Current Veterinary Therapy XV*. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier/Saunders.
- Boston, S.E., Moens, N.M.M., Kruth, S.A. & Southorn, E.P. (2003). Endoscopic evaluation of the gastroduodenal mucosa to determine the safety of short-term concurrent administration of meloxicam and dexamethasone in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 64(11), ss. 1369-1375.
- Braun, J.P., Guelfi, J.F., Thouvenot, J.P. & Rico, A.G. (1981). Haematological and biochemical effects of a single intramuscular dose of 6 alpha-methylprednisolone acetate in the dog. *Research in Veterinary Science*, 31(2), ss. 236-8.
- Buttgereit, F. & Scheffold, A. (2002). Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*, 67(6), ss. 529-34.
- Cain, D.W. & Cidlowski, J.A. (2015). Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(4), ss. 545-556.
- Chen, H.C. & Farese, R.V. (1999). Steroid hormones: Interactions with membrane-bound receptors. *Current Biology*, 9(13), ss. R478-R481.
- Clark, R.A., Gallin, J.I. & Fauci, A.S. (1979). Effects of in vivo prednisone on in vitro eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. *Blood*, 53(4), s. 633.
- Cohn, L.A. (1991). The influence of corticosteroids on host defense mechanisms. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5(2), ss. 95-104.
- Cohn, L.A. (1997). Glucocorticosteroids as immunosuppressive agents. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, 12(3), ss. 150-6.
- Cordero, M., Brorsen, B.W. & McFarlane, D. (2012). Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(4), ss. 317-24.
- Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *The Journal of Immunology*, 154(9), ss. 4719-25.
- Croxtall, J.D., Choudhury, Q. & Flower, R.J. (2000). Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *British Journal of Pharmacology*, 130(2), ss. 289-298.
- Currie, G.M. (2018a). Pharmacology, Part 1: Introduction to pharmacology and pharmacodynamics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(2), s. 81.

- Currie, G.M. (2018b). Pharmacology, Part 2: Introduction to pharmacokinetics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(3), ss. 221-230.
- D'Acquisto, F., Perretti, M. & Flower, R.J. (2008). Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *British Journal of Pharmacology*, 155(2), ss. 152-169.
- Danhof, M., Alvan, G., Dahl, S.G., Kuhlmann, J. & Paintaud, G. (2005). Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling-a new classification of biomarkers. *Pharmaceutical Research*, 22(9), ss. 1432-7.
- Den Herder, J. & Prasse, K.W. (1972). Leukocyte response in the dog and cat. In: *Iowa State University Veterinarian*, Vol. 34: Iss. 2 , Article 3. Available at: https://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol34/iss2/3
- Fauci, A.S. & Dale, D.C. (1975). The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood*, 46(2), s. 235.
- Feldman, E.C. (2014). *Canine and Feline Endocrinology*. 4. ed. Elsevier Health Sciences.
- Frey, F.J. & Frey, B.M. (1982). Inequality of clearance values obtained by intravenous bolus and by steady-state infusion. Prednisolone studies in dogs. *Pharmacology*, 24(6), ss. 346-54.
- Frey, F.J., Frey, B.M., Greither, A. & Benet, L.Z. (1980). Prednisolone clearance at steady state in dogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 215(2), ss. 287-91.
- Gabrielsson, J. & Weiner, D. (2016). *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis - Concepts and Applications*. 5. ed. Swedish Pharmaceutical Press (Apotekarsocieteten).
- Galili, N., Galili, U., Klein, E., Rosenthal, L. & Nordenskjöld, B. (1980). Human T lymphocytes become glucocorticoid-sensitive upon immune activation. *Cellular Immunology*, 50(2), ss. 440-444.
- Hammond, G.L. (2016). Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *The Journal of Endocrinology*, 230(1), ss. R13-R25.
- Hankes, G.H., Lazenby, L.R., Ravis, W.R. & Belmonte, A.A. (1985). Pharmacokinetics of prednisolone sodium succinate and its metabolites in normovolemic and hypovolemic dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 46(2), ss. 476-8.
- Haschka, V.W.J.u.M. (1974). Dosierung und Wirkungsdauer der Kortikoide beim Hund. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 62 Jahrgang, Heft 10/1975, ss. 377-382.
- Herold, M.J., McPherson, K.G. & Reichardt, H.M. (2006). Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(1), ss. 60-72.
- Jain, N.C. (1986). *Schalm's Veterinary Hematology*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Jasper, D.E. & Jain, N.C. (1965). The influence of adrenocorticotrophic hormone and prednisolone upon marrow and circulating leukocytes in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 26(113), ss. 844-50.
- Keller-Wood, M. (2015). Hypothalamic-pituitary--adrenal axis-feedback control. *Comprehensive Physiology*, 5(3), ss. 1161-82.
- Kempainen, R.J. (1984). Effects of glucocorticoids on endocrine function in the dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 14(4), ss. 721-730.
- Kempainen, R.J. & Sartin, J.L. (1984). Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *Journal of Endocrinology*, 103(2), ss. 219-26.
- Kuo, T., Harris, C.A. & Wang, J.-C. (2013). Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 380(1), ss. 79-88.
- Latimer, K.S. & Rakich, P.M. (1989). Clinical interpretation of leukocyte responses. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 19(4), ss. 637-668.

- Lightman, S.L. & Conway-Campbell, B.L. (2010). The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(10), ss. 710-8.
- Lilliehook, I. & Tvedten, H.W. (2011). Errors in basophil enumeration with 3 veterinary hematology systems and observations on occurrence of basophils in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(4), ss. 450-458.
- Liu, D., Xiong, R., Chen, X., Li, P., Ning, Y., Peng, Y., Zhao, Y., Yang, N. & Zhou, Y. (2014). The glucocorticoid dexamethasone inhibits U937 cell adhesion and neutrophil release via RhoA/ROCK1-dependent and independent pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(6), ss. 1654-1662.
- Magee, M.H., Blum, R.A., Lates, C.D. & Jusko, W.J. (2002). Pharmacokinetic/pharmacodynamic model for prednisolone inhibition of whole blood lymphocyte proliferation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 53(5), ss. 474-84.
- Mager, D.E., Lin, S.X., Blum, R.A., Lates, C.D. & Jusko, W.J. (2003). Dose equivalency evaluation of major corticosteroids: pharmacokinetics and cell trafficking and cortisol dynamics. *Journal of Clinical Pharmacology*, 43(11), ss. 1216-27.
- Montrella-Waybill, M., Clore, J.N., Schoolwerth, A.C. & Watlington, C.O. (1991). Evidence that high dose cortisol-induced Na⁺ retention in man is not mediated by the mineralocorticoid receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 72(5), ss. 1060-6.
- Moore, C.R. & Price, D. (1932). Gonad hormone functions, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism. *American Journal of Anatomy*, 50(1), ss. 13-71.
- Moore, G.E., Mahaffey, E.A. & Hoenig, M. (1992). Hematologic and serum biochemical effects of long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 53(6), ss. 1033-7.
- Plumb, D.C. (2015). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 8. Ed. John Wiley & Sons.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. & Henderson, G. (2016). *Rang and Dale's Pharmacology*. 8. ed. London: Churchill Livingstone.
- Reily, M.M., Pantoja, C., Hu, X., Chinenov, Y. & Rogatsky, I. (2006). The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *The EMBO Journal*, 25(1), ss. 108-117.
- Richter, W.F., Bhansali, S.G. & Morris, M.E. (2012). Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration. *The AAPS journal*, 14(3), ss. 559-570.
- Riviere, J.E., Gabrielsson, J., Fink, M. & Mochel, J. (2016). Mathematical modeling and simulation in animal health. Part I: Moving beyond pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(3), ss. 213-23.
- Riviere, J.E. & Papich, M.G. (2018). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 10. ed. Wiley.
- Rowland, M. & Tozer, T.N. (2010). *Clinical Pharmacokinetics & Pharmacodynamics*. 4. ed. Lippincott Williams and Wilkins.
- Sackey, F.N., Watson, C.S. & Gametchu, B. (1997). Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 273(3), s. E571.
- Saffar, A.S., Ashdown, H. & Gounni, A.S. (2011). The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Current Drug Targets*, 12(4), ss. 556-562.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Spencer, S.J. & Tilbrook, A. (2011). The glucocorticoid contribution to obesity. *Stress*, 14(3), ss. 233-46.

- Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W. & Buttgereit, F. (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1), ss. 71-78.
- Stark, J.G., Werner, S., Homrighausen, S., Tang, Y., Krieg, M., Derendorf, H., Moellmann, H. & Hochhaus, G. (2006). Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of total lymphocytes and selected subtypes after oral budesonide. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 33(4), ss. 441-59.
- Tasker, J.G. & Herman, J.P. (2011). Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 14(4), ss. 398-406.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004a). Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), ss. 415-425.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004b). Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), ss. 427-439.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004c). Volumes of distribution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), ss. 441-453.
- Trepanier, L.A. (2013). Applying pharmacokinetics to veterinary clinical practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(5), ss. 1013-1026.
- Tse, F.L. & Welling, P.G. (1977). Prednisolone bioavailability in the dog. *Journal of Pharmaceutical Science*, 66(12), ss. 1751-4.
- Viviano, K.R. (2013). Update on immunosuppressive therapies for dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(5), ss. 1149-1170.
- Wang, J.-C. & Harris, C. (Eds.) (2015). *Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man*. 1st ed. New York: Springer-Verlag.
- Wilcke, J.R. & Davis, L.E. (1982). Review of glucocorticoid pharmacology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 12(1), ss. 3-17.
- Wright, D.F., Winter, H.R. & Duffull, S.B. (2011). Understanding the time course of pharmacological effect: a PKPD approach. *British Journal of Pharmacology*, 71(6), ss. 815-23.
- Xing, Y., Lerario, A., Rainey, W. & Hammer, G.D. (2015). Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 44(2), ss. 243-274.