



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Hematologiska förändringar hos hund efter behandling med kliniska doser av prednisolon

Hematological changes in dogs treated with clinical doses of prednisolone

Linda Daly

*Uppsala
2020*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Hematologiska förändringar hos hund efter behandling med kliniska doser av prednisolon

Hematological changes in dogs treated with clinical doses of prednisolone

Linda Daly

Handledare: Inger Lilliehök, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Emma Strage, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

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

Nyckelord: prednisolon, glukokortikoid, hematologiska förändringar, hund

Key words: prednisolone, glucocorticoids, hematological changes, dog, canine

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Glukokortikoider används frekvent inom veterinärmedicin tack vare sina antiinflammatoriska och immunosupprimerande egenskaper. Generella indikationer till behandling med glukokortikoider är bland annat allergier, immunmedierade sjukdomar, neoplastiska sjukdomar och som ersättningsterapi vid hypoadrenokortisism. Det finns flera olika syntetiska glukokortikoider vilka varierar i effekt och duration. Prednisolon, som är en av de vanligaste använda glukokortikoiderna för per oral behandling till hund, har en medellång duration och verkan. Biverkningsprofilen vid systemisk behandling med glukokortikoider är bred och inkluderar polyfagi, polydipsi och polyuri men även hematologiska förändringar. Hematologiska förändringar vid en ökad koncentration av endogena eller syntetiska glukokortikoider anses vara neutrofil utan vänsterförskjutning, monocytos, lymfopeni och eosinopeni. De tidigare studier om effekt av syntetiska glukokortikoider på blodceller är begränsade och har ofta använt sig av andra glukokortikoider än prednisolon i tablettform och/eller med långa provtagningsintervall. Därför var frågeställningen i denna studien i vilken utsträckning prednisolon (Prednisolon Pfizer, tablett) i en klinisk dos på 1mg/kg påverkar hundens hematologi.

Studien var en ”*cross-over*”-studie med tio beaglar uppdelade i två grupper. Hundarna var sin egen kontroll och det gick fem veckor mellan det att de fick behandling och agerade kontroll eller vice versa. I behandlingsgruppen gavs de 1mg/kg (0,97–1,07) prednisolon i form av tabletter i fodret på morgonen en gång dagligen i tio dagar. Blodprov togs på morgonen innan utfodring dag 0, 1, 3, 6, 9, 10, 12, 16 och 20 samt 1, 2, 4, 7, 10, 22, 26 och 30 timmar efter sista behandlingstillfälle. Kontrollgruppen provtogs enligt samma schema. Proverna analyserades på ett automatiskt hematologiinstrument och resultatet bearbetades i statistikprogram för att se huruvida det förelåg signifikant ($p < 0,05$) skillnad mellan hundarnas blodcellresultat när de var behandlade respektive obehandlade. Resultatet visade signifikant ökning av neutrofilerna hos de behandlade hundarna från fyra till tio timmar efter prednisolongiva, lymfocyterna var signifikant lägre sju till tio timmar efter behandling, monocytorna signifikant högre mellan två och tio timmar och eosinofilerna var signifikant lägre vid provtagningen tio timmar efter sista behandling. Det påvisades inga signifikanta förändringar på erythrocyter eller trombocyter vid något av provtagningstillfällena. De erhållna resultaten visar att det är tidpunkten för blodprovstagningen i förhållande till medicingiva som är avgörande för vilka leukocytförändringar som är att förvänta.

SUMMARY

Thanks to their anti-inflammatory and immunosuppressive effects glucocorticoid therapy is one of the most commonly prescribed treatments in veterinary medicine. General indications for use include allergies, immune-mediated diseases, neoplasia and as replacement-drugs for animals with hypoadrenocorticism. There are multiple synthetic glucocorticoids with varied effect and duration. Prednisolone, which is one of the most common for oral administration, has an intermediary duration and effect. There are several adverse effects connected to systemical use of glucocorticoids, including polyphagia, polydipsia, polyuria and haematological changes. Elevated blood levels of endogenous or exogenous glucocorticoids is considered to result in haematological changes such as neutrophilia without left shift, monocytosis, lymphopenia and eosinopenia. Previous studies are limited and often done with other glucocorticoids than prednisolone as tablets and/or with an extended time period between blood sampling. Therefore, in this study, the aim was to see to which extent a clinical dosage of 1 mg/kg prednisolone given orally affected the dog's haematology.

The study was a cross-over study, which included ten beagles divided in two groups. Each dog acted as their own control and the time between being in the treatment group versus in the control group was five weeks. In the treatment group they were given 1 mg/kg (0.97-1.07) prednisolone tablets in their breakfast once daily for ten days. Blood collection was made every morning before breakfast at day 0, 1, 3, 6, 9, 10, 12, 16 and 20 as well as 1, 2, 4, 7, 10, 22, 26 and 30 hours after the latest treatment. The same schedule for blood withdrawal was used in the control group. Blood analysis was made with an automatic haematology instrument and the results were statistically processed with a statistic program to investigate whether there were any significant ($p < 0.05$) differences between treated and untreated dogs. A significant increase in neutrophils could be seen in the treatment group four to ten hours post treatment, lymphocytes were significantly decreased seven to ten hours post treatment, monocytes significantly increased two to ten hours post treatment and the eosinophils were significantly decreased at blood withdrawal ten hours post treatment. No significant changes could be seen for the erythrocytes or thrombocytes for any of the sampling occasions. According to the results, the expected changes in leukocytes are dependent on the time between treatment and blood withdrawal.

INNEHÅLL

| | |
|---|-----------|
| INLEDNING | 1 |
| LITTERATURÖVERSIKT | 2 |
| Endogena glukokortikoider..... | 2 |
| Syntetiska glukokortikoider | 2 |
| <i>Ett urval av syntetiska glukokortikoider</i> | 3 |
| Glukokortikoiders effekt på hematologin | 4 |
| MATERIAL OCH METODER | 7 |
| Studiedesign | 7 |
| Blodprovsanalys..... | 8 |
| Statistisk analys..... | 8 |
| RESULTAT | 10 |
| Leukocyter..... | 10 |
| Erythrocyter och trombocyter | 15 |
| DISKUSSION | 16 |
| KONKLUSION | 18 |
| POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING | 19 |
| Inledning och litteraturöversikt | 19 |
| Material och metoder | 19 |
| Resultat och diskussion | 20 |
| REFERENSER | 21 |

INLEDNING

Glukokortikoiders anti-inflammatoriska och immunsupprimerande egenskaper är något som frekvent används inom veterinärmedicin (O'Neill *et al.*, 2012). Några behandlingsområden inkluderar atopisk dermatit, immunmedierade sjukdomar såsom immunmedierad hemolytisk anemi samt neoplasier (Feldman, 2004). Utöver detta sker även behandling med glukokortikoider som ersättningsterapi vid hypoadrenokortisism (Kalenyak & Heilmann, 2018). Det finns flera olika syntetiska glukokortikoider, allt från korttidsverkande hydrokortison och medellångtidsverkande prednison/prednisolon till långtidsverkande dexametason (Rang *et al.*, 2016). En studie rapporterar att hela 90 % av alla behandlingar med glukokortikoider per oralt i Storbritannien görs med prednisolon (Elkholly *et al.*, 2019) och även om ingen liknande studie utförts i Sverige torde det vara rimligt att anta att det i alla fall är en av de vanligaste substanserna som används även här. Glukokortikoider har flera biverkningar, inkluderat bland annat polyuri och polydipsi samt det är sedan tidigare känt att det även påverkar blodprovresultat. Det som brukar beskrivas som klassiska hematologiska förändringar vid glukokortikoidbehandling är leukocytos med neutrofilier utan vänsterförskjutning, lymfopeni monocytoos samt eosinopeni (Zinkl, 1981; Latimer & Rakich, 1989; Behrend & Kemppainen, 1997; Cohn, 1997; Feldman, 2004). Eftersom hematologi är någonting som ofta körs vid veterinärbesök är det av stor vikt att förstå vilka förändringar som är orsakade av en eventuell glukokortikoidbehandling, samt vilka som har andra orsaker (Latimer & Rakich, 1989). Vid tidigare studier där glukokortikoiders påverkan på hematologiska celler har studerats har många gånger långtidsverkande preparat och/eller höga doser använts. Dessutom är många av studierna utförda på andra djurslag än hund. Målet med denna studie var därför att undersöka om, och i så fall i vilken utsträckning, hematologiska parametrar förändras när man ger en antiinflammatorisk peroral behandling med prednisolon (1mg/kg/dag) till hund.

LITTERATURÖVERSIKT

Endogena glukokortikoider hos hund och delvis människa

Binjuren består av en bark och en märg. Binjurebarken, som delas upp i tre lager *zona glomerulosa*, *zona fasciculata* samt *zona reticularis*, producerar kortikosteroider (Xing *et al.*, 2015) medan produktionen av adrenalin och noradrenalin sker i binjuremärgen (Rang *et al.*, 2016). Kortikosteroider delas upp i mineralkortikosteroider, vilka produceras i *zona glomerulosa*, och glukokortikoider, vilka produceras av *zona fasciculata*. I *zona reticularis* produceras androgena prekursorer som sedan i perifer vävnad metaboliseras till androgena steroider (Xing *et al.*, 2015). Kortikosteroiderna är livsviktiga då de spelar en stor roll för kroppens homeostas (Cohn, 1997). Mineralkortikoiderna, framförallt aldosteron, reglerar vatten- och elektrolytbalansen (Rang *et al.*, 2016) medan glukokortikoiderna påverkar bland annat kolhydrat- och proteinmetabolismen (Cohn, 1997). Den särskiljningen stämmer enbart delvis då de endogena glukokortikoider även har viss effekt på vatten- och elektrolytbalansen (Rang *et al.*, 2016). Binjurebarkens produktion av kortikosteroider sker under reglering av hypofyshormonet adrenokortikotropiskt hormon, ACTH, vilketets produktion och sekretion i sin tur regleras av hypothalamus och dess kortikotropinfrisättande hormon, CRH. Både ACTH och CRH regleras främst via negativ feedback från blodets glukokortikoid-nivåer (Gjerstad *et al.*, 2018) men även en negativ feedback till hypothalamus beroende på ACTH-nivåerna, vilken inte anses vara lika viktig, existerar. Det sker ingen lagring av glukokortikoider i binjuren och frisättningen sker pulsatilt hos både hund och människa (Behrend & Kempainen, 1997; Rang *et al.*, 2016). Det föreligger en variation över dygnet, där nivåerna är som högst på morgonen och lägre på kvällen/natten hos bland annat människa (Rang *et al.*, 2016) men hos hund är rytmen mindre uttalad (Kempainen & Sartin 1984). Binjurebarken producerar en mix av olika glukokortikoider. Hos människa är det framförallt hydrokortison, synonymt med kortisol, som är det huvudsakliga producerade hormonet medan det hos gnagare är kortikosteron (Rang *et al.*, 2016). Hos hund produceras de bägge i ungefär samma utsträckning (Behrend & Kempainen, 1997).

Syntetiska glukokortikoider

Glukokortikoider är antiinflammatorisk och immunsupprimerande läkemedel. Deras effekt är dosberoende och det krävs högre doser för att erhålla immunosuppression än för att få en antiinflammatorisk effekt (Cohn, 1997). De påverkar immunförsvaret på flera sätt, och detta oberoende av inflammationens grundorsak (Behrend & Kempainen, 1997; Cohn, 1997). Trots att glukokortikoidbehandling är förenat med ganska många biverkningar används det frekvent inom veterinärmedicin och en storbritannisk studie rapporterar data där ca 15 % av veterinärkonsultationerna som resulterat i farmakoterapi resulterat i just systemisk glukokortikoidbehandling (O'Neill *et al.*, 2012). Biverkningar inkluderar iatrogen hyperadrenokorticism med symtom på detta såsom polyuri, -dipsi, -fagi och viktuppgång, suppression av binjurerna, katabolism av muskelvävnad, försenad sårhäkning och risken för opportunistiska infektioner ökar (Cohn, 1997; Viviano, 2013). Generella indikationer till glukokortikoidbehandling är bland annat inflammation, immunmedierade- och neoplastiska sjukdomar (Behrend & Kempainen, 1997) och det används därför vid till exempel protein-losing enteropathy (PLE), inflammatory bowel disease (IBD), samt immunmedierad hemolytisk anemi (IMHA) (Viviano, 2013). Utöver detta sker även behandling med glukokortikoider som ersättningsterapi vid binjurebarksinsuf-

ficiens (Kalenyak & Heilmann 2018). Ytterligare ett stort användningsområde för glukokortikoider är inom dermatologin där det exempelvis används vid atopisk dermatit (Feldman, 2004). De vanligaste anledningarna till användning av syntetiska glukokortikoider är alltså för deras antiinflammatoriska och immunosupprimerande egenskaper. Övriga egenskaper, inklusive deras mineralkortikoida effekter, ses därför ofta som oönskade. Av denna anledning har man vid framställandet av syntetiska glukokortikoider försökt särskilja dessa egenskaper, och delvis lyckats när det gäller deras mineralkortikoida effekt, men man har inte kunnat separera deras antiinflammatoriska verkan från övriga glukokortikoida effekter (Rang *et al.*, 2016).

Ett urval av syntetiska glukokortikoider

Det finns flera olika syntetiska glukokortikoider såsom hydrokortison, kortison, prednison, prednisolon, metylprednisolon och dexametason för att nämna några. Dessa har framställts för att minimera den mineralkortikoida effekten och maximera den antiinflammatoriska verkan (Feldman, 2004). De har olika kemiska egenskaper, vilket resulterar i att deras effekt varierar i såväl styrka som duration. De korttidsverkande glukokortikoiderna inkluderar bland annat hydrokortison och kortison. Prednison, prednisolon och metylprednisolon har alla en medellång duration medan dexametason tillhör de långtidsverkande substanserna. För att relatera de olika syntetiska glukokortikoidernas gluko- och mineralkortikoida effekt brukar de jämföras med hydrokortisonet, se tabell 1 (Feldman, 2004; Viviano, 2013; Rang *et al.*, 2016). Vidare kan man genom att modifiera de olika syntetiska glukokortikoidernas kemiska form påverka till exempel hur länge de har effekt samt vilka administrationsätt som är möjliga. Ett exempel på sådan modifikation är förestring. Lättlösliga estrar, såsom natriumsuccinatestrarna, kan användas intravenöst och intramuskulärt. Vid injektion intramuskulärt med en lättlöslig ester är absorptionstiden minuter till timmar vilket gör att förändringen i effektduration är relativt liten i förhållande till den hos motsvarande fria glukokortikoid. De svårlösliga estrarna, såsom acetatestrarna, kan administreras subkutant eller intramuskulärt men inte användas intravenöst. Beror på hur svårlöslig estern är kan absorptionen och frisättningen förlängas med dagar upp till månader jämfört med motsvarande glukokortikoids fria form (Behrend & Kemppainen, 1997; Feldman, 2004). I Storbritannien är dexametason och prednisolon de vanligaste förskrivna systemiska glukokortikoiderna och hela 90 % av all per oral glukokortikoidbehandling skedde med prednisolon i en studie av Elkholly *et al.*, (2019). Någon liknande studie verkar inte vara utförd i Sverige och det går därför inte att säga exakt hur vanlig förskrivning av prednisolon är här.

Tabell 1. Jämförelse mellan utvalda glukokortikoiders duration, gluko- och mineralkortikoideffekt efter injektion på hund (Sammanställd utifrån information i Behrend & Kemppainen, 1997; Feldman, 2004; Viviano, 2013)

| Substans | Duration (h) | Glukokortikoideffekt | Mineralkortikoideffekt |
|------------------|--------------|----------------------|------------------------|
| Hydrokortison | 8–12 | 1 | 1 |
| Kortison* | 8–12 | 0,8 | 0,8 |
| Prednison** | 12–36 | 4 | 0,3 |
| Prednisolon | 12–36 | 4-5 | 0,3 |
| Metylprednisolon | 12–36 | 5 | 0-0,3 |
| Dexametason | >48 | 25-40 | 0 |

*Pro-drug till hydrokortison

**Pro-drug till prednisolon

Glukokortikoiders effekt på hematologin

Glukokortikoiders exakta verkningsmekanism på blodceller är komplex (Rang *et al.*, 2016). De har bland annat en påverkan på leukocyternas distribution, kroppens cytokinprofil samt olika adherensmolekyler vilket ger förändringar i leukocytantalet (Behrend & Kemppainen, 1997; Cohn, 1997). Klassiska förändringar efter glukokortikoidbehandling brukar anses vara en neutrofilin utan vänsterförskjutning, lymfopeni, eosinopeni och monocytos (Zinkl, 1981; Behrend & Kemppainen, 1997; Cohn, 1997). De fyra förändringarna brukar även omnämnas som ett ”stress-leukogram” och kan ses vid stegring av glukokortikoider, oavsett om det rör sig om endogena eller exogena sådana (Behrend & Kemppainen, 1997; Feldman, 2004). Glukokortikoider anges ha mycket liten effekt på erytropoesen och hemoglobinkoncentrationen (Cohn, 1997), den ökning av erythrocyter som ibland kan ses hos hundar med hyperadrenokorticism tros vara sekundär till förändringar i androgen-nivåerna (Feldman, 2004). Neutrofilin vid glukokortikoidbehandling uppkommer genom att frisättningen av mogna neutrofiler från benmärgen ökar samt att färre migrerar ut från kärlen in i vävnaden genom en påverkan på neutrofilernas adhesionsmolekyler (Moore *et al.*, 1992; Cohn, 1997; Feldman, 2004). Lymfopenin orsakas av en redistribution från det vaskulära utrymmet till det extravaskulära utrymmet såsom mjälten och lymfknutor (Behrend & Kemppainen, 1997; Cohn, 1997). Bakgrunden till sänkningen i antalet eosinofiler tros även den vara orsakad av förändringar i distributionen då glukokortikoider ökar utträdet av eosinofiler från cirkulationen (Feldman, 2004). Monocytosen kan bero på att migrationen ut ur kärl och in i vävnaden påverkas (Moore *et al.*, 1992; Behrend & Kemppainen, 1997).

En studie som studerat bland annat prednisolons effekter på hematologin är Jasper & Janis (1965). Efter prednisolongiva (20mg (1,3–2,2mg/kg beroende på individens vikt) PO som engångsdos) studerades hematologiska förändringar hos tre hundar via blodprov varannan timme under de första 10 timmarna samt ett sista blodprov 24 timmar efter givan. Totalantalet vita och neutrofiler ökade påtagligt efter ungefär 2 timmar för att nå ett högsta värde vid 4–8 timmar och sedan sjunka tillbaka mot normalvärde. En eosinopeni kunde ses som tydligast vid 4–8 timmar medan lymfopenin, som inte var lika tydlig som eosinopenin, varierade mellan individerna och nådde lägsta nivåerna efter 2 timmar hos en av hundarna och efter 6 timmar hos

övriga två. Monocyterna var förhöjda redan vid 2–4 timmar och steg succesivt sedan till sin högsta nivå vid 6–8 timmar. Dessutom undersökte man hematologiska förändringarna även vid upprepade givor av prednisolon (10mg x2 i 7 dagar) genom dagliga morgonblodprov i 14 dagar. Under sådan behandling sågs neutrofil med varierande intensitet, under hela behandlingsperioden. Efter behandlingens slut tenderade neutrofilerna tillfälligt att sjunka under normala värden. Eosinofilreduktion med 90–100 % sågs inom 24 timmar och dessa låg sedan lågt fram tills behandlingens avslut och steg sedan gradvis till nästan normala värden dag 14. Lymfocyterna sjönk även de inom 24 timmar för att sedan vid utsättandet av prednisolonet snabbt stiga till normala värden. Monocytos, av varierande intensitet kunde ses hos alla hundarna. Ingen förändring av hematokriten kunde påvisas (Jasper & Jain, 1965).

En annan studie som använt sig av prednisolon, men i form av intravenös giva av prednisolon-natriumsuccinat, är Adolfsson (2019). Där deltog tio hundar som fick en engångsgiva (1mg/kg) intravenöst och blodprov togs innan behandling samt 20 min, 40 min, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 28, 32, 48 och 60 timmar efter givan. Hundarna var sin egen kontroll och tiden mellan att de deltog i behandlingsgruppen och kontrollgruppen var 30 dagar. Resultaten inkluderar en statistisk signifikant neutrofil 1–12 timmar efter giva, med en maximal koncentration vid sex timmar. Vid nio timmar började neutrofilerna sjunka tydligt mot sitt normalvärde och efter 24 timmar var de tillbaka på baslinjen. Det sågs även en signifikant sänkning av lymfocyterna 2–9 timmar efter givan, med en lägsta koncentration efter sex timmar, och värdena var tillbaka på baslinjen vid 12–24 timmar. Någon statistisk signifikant förändring i eosinofilkoncentration kunde inte ses.

I Dillon *et al.* (1980) kunde man efter behandling med prednisolonacetat (1mg/kg x2 IM i 3,7,14 eller 28 dagar) enbart se en signifikant sänkning av eosinofilerna medan förändringar på de övriga parametrarna hemoglobin, PCV, leukocytantal, neutrofiler, lymfocyter och monocyter saknade statistisk signifikans. Studien inkluderade totalt 24 hundar, varav 8 agerade kontroll, vilka delades upp i 4 grupper om sex hundar. Flera av hundarna hade onormala leukocytvärden vid studiens start, vilket kan ha påverkat resultatet. Provtagning skedde dag 0 och veckovis samt på respektive grupps sista behandlingsdag, då de avlivades.

Det finns även flera andra studier där man studerat glukokortikoiders effekt på hematologin med olika doser av olika syntetiska glukokortikoider samt med varierande behandlingstid. Masters *et al.* (2018) kunde efter prednison-giva (1mg/kg x1 PO i 14 dagar, därefter 0,5mg/kg x1 PO i 3 dagar och sedan 0,5mg/kg varannan dag i tre doser) påvisa ett signifikant ökat antal neutrofiler, samt ett sänkt antal eosinofiler. I studien deltog 11 hundar med allergisk dermatit och 11 matchade friska kontrollhundar. Blodprover togs dag 0, 7, 14 och 35. Vid mätningar dag 7 och 14 var neutrofilerna signifikant högre. Eosinofilerna var signifikant lägre dag 7 och normaliserade dag 35. Nämnvärt är att trots signifikant ökning av neutrofilerna var det enbart två individer som hamnade över övre referensvärdet. De kunde inte påvisa någon signifikant förändring avseende hematokriten, hemoglobin- eller trombocytvärdena.

I en annan studie där prednison i liknande dagsdos användes (0,55mg/kg x2 PO), men under längre tid (35 dagar), kunde man inte påvisa någon signifikant förändring avseende varken neutrofiler eller monocyter (Moore *et al.*, 1992). Däremot kunde man se signifikant sänkta nivåer lymfocyter och eosinofiler vid provtagningen två och fyra veckor efter påbörjad behandling.

Två veckor efter avslutad behandling hade eosinofilantalet normaliserats medan lymfocyterna hos de behandlade individerna fortsatt var signifikant lägre än kontrollhundarnas fram till mätningen sju veckor efter behandlingen. Trombocytnivåerna var signifikant högre i behandlingsgruppen under och efter behandlingen. I studien deltog totalt 18 hundar, varav 6 kontrollhundar och blodproverna (fasteprover) togs innan första behandling, efter 2 och 4 veckors pågående behandling samt 2, 4 och 7 veckor efter avslutad behandling (Moore *et al.*, 1992).

I en studie med 24 hundar, varav 6 kontrollhundar, togs morgonprov innan fodergiva dag 0, 1, 2, 5, 8, 15, 22, 29 och 36 efter engångsgiva av 4mg/kg metylprednisolonacetat intramuskulärt (Braun *et al.*, 1981). Deras resultat visade en signifikant leukocyt- och neutrofilstegring dag 1 vilken sedan började sjunka fram till dag 15. De såg även att monocytförändringarna var av liknande trend men dessa saknade statistisk signifikans. Dag 1 kunde även en kraftig sänkning av eosinofilerna ses, och hos 11 av 14 hundar kunde inga eosinofiler påvisas alls. Dessa steg sedan sakta, men nådde inte referensvärdet innan sista blodprovstagning. Fram till dag 15 kunde även en mild lymfopeni ses (Braun *et al.*, 1981).

I en studie med 23 hundar där ett "leave-in" balsam innehållande 1 % hydrokortison användes två gånger i veckan i sex veckor kunde inga signifikanta förändringar på neutrofiler, lymfocyter, monocytter eller eosinofiler ses. Blodproverna togs dag 0, 14, 28 och 42 (Thomas *et al.*, 2000).

MATERIAL OCH METODER

Studiedesign

I studien, vilken var en cross-over studie deltog totalt 10 beaglar (fyra tikar och sex hanhundar) uppdelade i två grupper där varje hund var sin egen kontroll. Hundarna var undervisnings- och försökshundar vid SLU, Sveriges lantbruksuniversitet som är vana vid blodprovstagning. Studien pågick i två omgångar med fem veckor emellan. I första omgången fick ena gruppen ca 1mg/kg (0,97–1,07mg/kg, se tabell 2), prednisolon (Prednisolon Pfizer, tablett) i fodret på morgonen en gång dagligen i 10 dagar (dag 0–9), medan andra gruppen var kontrollhundar och vice versa under andra omgången. Provtagning skedde mellan klockan 7 och 8 (förutom dag 10 då morgonprovet togs klockan 6) innan morgonfodringen dag 0, 1, 3, 6, 9, 10, 12, 16 och 20 samt 1, 2, 4, 7, 10, 22, 26 och 30 timmar efter sista behandlingstillfälle dag 9. Provet som togs 22 timmar efter sista givan är samma som morgonprovet dag 10.

Tabell 2. Aktuell dosering på varje enskild hund

| Hund | Ålder (år) | Vikt (kg) | Prednisolondos (mg) | Prednisolondos (mg/kg) |
|---------|------------|-----------|---------------------|------------------------|
| Hund 1 | 12 | 14,5 | 15 | 1,03 |
| Hund 2 | 7 | 14,2 | 15 | 1,06 |
| Hund 3 | 10 | 15,1 | 15 | 0,99 |
| Hund 4 | 5 | 15,1 | 15 | 0,99 |
| Hund 5 | 7 | 14 | 15 | 1,07 |
| Hund 6 | 8 | 14,5 | 15 | 1,03 |
| Hund 7 | 5 | 15 | 15 | 1,00 |
| Hund 8 | 5 | 16,8 | 17,5 | 1,04 |
| Hund 9 | 2 | 15,4 | 15 | 0,97 |
| Hund 10 | 8 | 14,2 | 15 | 1,06 |

Hundarna i kontrollgruppen provtogs enligt samma schema med ett undantag, detta då en ny hund (benämnd hund 10 i resultat) fick rekryteras i början på studien då en annan hund exkluderats på grund av sjukdom. Dennes provtagningsintervall i kontrollgruppen avviker således något från de andra nio hundarna och är som följande: kl. 8 dag 0, 1, 3, 6, 8, 10, 14 och 16. För att kunna inkludera den sent inkomna hunden i studien matchades dess kontrollprov taget dag 8 med behandlingsprovet taget dag 9, kontrollprovet dag 10 klockan 8 med behandlingsprov taget dag 10 kl. 6 och kontrollprovet dag 14 med behandlingsprovet dag 12. Ett kontrollprov för dag 20 saknas för denna hund. Kontrollprover för proverna 1, 2, 4, 7, 10, 26 och 30 timmar efter sista behandling saknas också. Därför är denna hund exkluderad ur den del av studien där vi kollat på hur blodcellerna förändrades under dag 9–10. En annan hund (hund 1) bedömdes, efter att ha granskat hematologiinstrumentets cytogram, ha inkorrekt eosinofilantal orsakat av dålig separation mellan neutrofiler och eosinofiler. Därför togs beslut att inte inkludera hundens felaktiga eosinofilresultat i studien.

I studien användes 3 ml EDTA-rör (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA). Blodprov togs i framben med butterfly-kanyl (Safety-Lok TM, 0.8x19x178 mm, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) med undantag för morgonprovet dag 9 samt proverna 1, 2, 4, 7 och 10 timmar efter sista behandling vilka togs ur en permanentkanyl (Venflon, 1.0x32mm, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) som anlades på morgonen dag 9 inför dessa provtagningar. Innan varje provtagning aspirerades 0,5ml blod ur permanentkanylen och efter provtagningen spolades kanylen med fysiologisk natriumklorid (NaCl, 9 mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige). Analys av blodproverna gjordes med hematologiinstrumentet Advia 2120 inom 2 timmar. Vid instrumentlarm som indikerade eventuellt problem med de aktuella analyserna kördes provet om.

Blodprovsanalys

Analys av EDTA-blodet utfördes av personal från Kliniska Kemiska Laboratoriet vid Universitetsdjursjukhuset, SLU, Uppsala med det automatiserade hematologiinstrumentet Advia 2120 utvecklas av Siemens Medical Solution Diagnostics (Eschborn, Tyskland). Parametrar som inkluderats i studien är erythrocytantal (EPK), hemoglobinkoncentration (Hb), mean corpuscular volume (MCV), samt antal retikulocyter, trombocyter, neutrofiler, eosinofiler, lymfocyter, monocyter och totalantalet leukocyter. Advia 2120 är utvecklat för analys av blod från människor men har program anpassade för blod från olika djurslag. För att mäta hemoglobinkoncentrationen används en spektrofotometrisk metod där erythrocyterna lyseras för att frisätta hemoglobinet och detta mäts sedan vid en specifik våglängd på 546 nm. Övriga analyser sker med hjälp av flödescytometri i kombination med en laser. Erythrocyter och trombocyter identifieras utifrån hur de sprider ljuset från lasern. Flera histo- och cytogram används för att bestämma och visa olika erythrocytparametrar. Hematokrit och MCHC beräknas utifrån EPK, MCV och Hb (Moritz & Becker, 2010). Tekniken som används för att utföra differentialräkningen av leukocyter är laserbaserad flödescytometri och genom att undersöka hur cellerna bryter ljus kan deras storlek kvantifieras. Dessutom färgas leukocyterna med ett reagens som färgar in intracellulärt peroxid. Differentialräkningen sker i peroxidaskanalen i Advia 2120 och baserar sig på leukocyternas peroxidasinnehåll och storlek. Stora celler sprider mycket ljus medan mindre celler sprider mindre ljus och peroxidaspositiva celler blir mer infärgade än de med mindre peroxidaktivitet. Dess resultat presenteras sedan av instrumentet i ett cytogram där peroxidaktiviteten, alltså infärgningens intensitet, syns på X-axeln och cellernas ljusspridning, alltså cellernas storlek, syns på Y-axeln. Celltyperna som presenteras med hjälp av den här tekniken är neutrofiler, eosinofiler, lymfocyter, monocyter och LUC (large unstained cells) (Siemens, 2006). Analys av hund-basofiler är inte möjligt på Advia 2120 (Lilliehöök & Tvedten, 2011). Alla cytogram granskades för att säkerställa att det var godtagbar indelning av blodcellerna.

Statistisk analys

Resultaten från Advia 2120 överfördes till Excel (Microsoft Office 2016, Microsoft Corporation, Redmond, WA USA) och bearbetades där till deskriptiva data och grafer för att synliggöra hur analyserade parametrar varierar över tid i behandlad respektive obehandlad grupp. Huruvida det fanns signifikant skillnad mellan de behandlade och de obehandlade hundarna vid varje tidpunkt undersöktes med en generell linjär modell med hjälp av statistikprogrammet

JMP-pro (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Eftersom samma hund undersöktes vid flera tillfällen justerades modellen för upprepad provtagning genom att specificera en autokorrelationsstruktur för residualerna (spatial power). Parvisa jämförelser gjordes för att jämföra behandlade och obehandlade hundar vid olika tidpunkter och Tukey-metod användes för att justera för multipla tester. Plottar på residualerna granskades för varje variabel. Skillnad med $p < 0,05$ bedömdes signifikant. Residualerna för retikulocyter, neutrofiler, eosinofiler, lymfocyter och monocyter var ej normalfördelade och dessa celltal log-transformerades därför innan statistisk analys. Däremot bedömdes distributionen av resultaten inom varje tidpunkt vara normalfördelade i de allra flesta fallen utifrån granskning av diagram över de olika blodvariablerna så i tabellerna redovisas medelvärde och standardavvikelse. Endast analyserade variabler är presenterade.

RESULTAT

Leukocyter

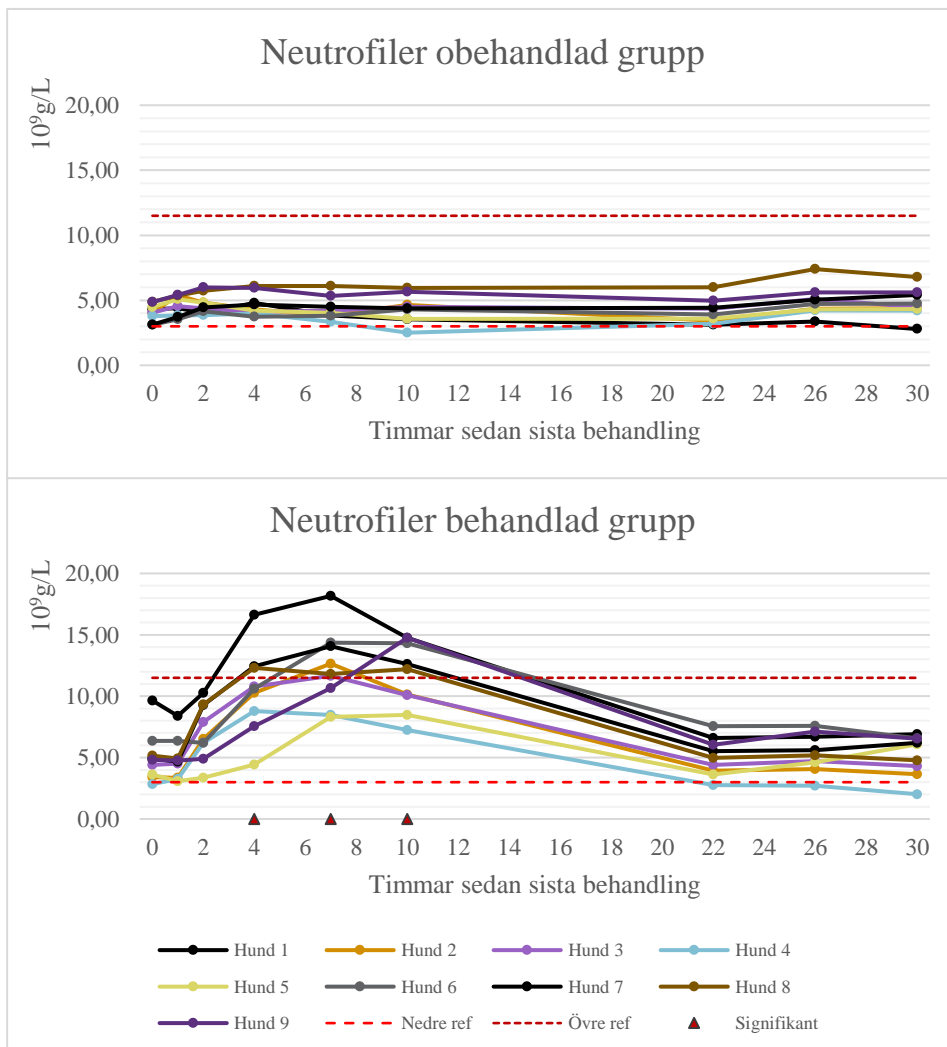
Statistiskt signifikanta skillnader mellan den behandlade gruppen jämfört med den obehandlade kontrollgruppen för leukocyterna sågs endast när blodprover togs under dagen efter sista läkemedelsivan dag 9 (figur 1–4 och tabell 3).

Tabell 3. Medelvärde och standardavvikelse för antalet neutrofiler, eosinofiler, lymfocyter och monocyter vid morgonprovtagningarna dag 0, 1, 3, 6, 9, 10, 12, 16 och 20 samt 1, 2, 4, 7, 10, 22, 26 och 30 timmar efter sista dosen dag 9 med peroral behandling med 1mg/kg prednisolon i behandlad och obehandlad (kontroll) grupp. Alla morgonprov är baserade på 10 hundar (svart text). Resultat i blå text är beräknade på nio hundar eftersom hund 10 exkluderats på grund av avsaknad av kontrollprover under övriga provtagningar dag 9 och 10. För eosinofilerna exkluderades hund 1 på grund av felaktiga eosinofilresultat vid analysering. Resultat i röd färg är de där signifikant förändring mellan behandlad och obehandlad grupp kunde ses

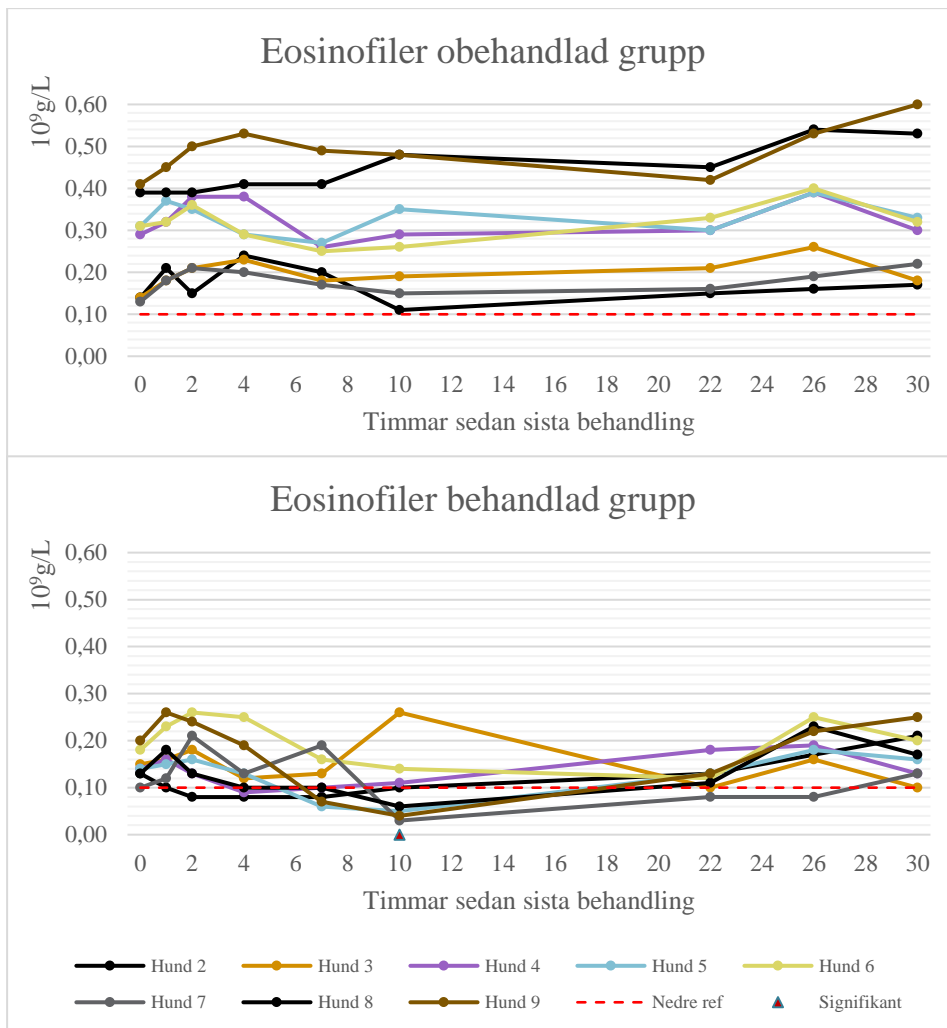
| Dag | Tim | Neutrofilantal (x10 ⁹ /L) | | Eosinofilantal (x10 ⁹ /L) | | Lymfocytantal (x10 ⁹ /L) | | Monocytantal (x10 ⁹ /L) | |
|-----|-----|--------------------------------------|--------------|--------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|
| | | Kontroll | Behandlad | Kontroll | Behandlad | Kontroll | Behandlad | Kontroll | Behandlad |
| 0 | | 4,50 ± 1,57 | 4,74 ± 1,46 | 0,31 ± 0,11 | 0,29 ± 0,08 | 1,86 ± 0,54 | 1,86 ± 0,49 | 0,29 ± 0,11 | 0,29 ± 0,10 |
| 1 | | 4,24 ± 1,26 | 5,79 ± 1,73 | 0,34 ± 0,13 | 0,21 ± 0,06 | 1,89 ± 0,70 | 2,14 ± 0,59 | 0,27 ± 0,11 | 0,40 ± 0,11 |
| 3 | | 4,18 ± 1,23 | 5,40 ± 1,40 | 0,32 ± 0,13 | 0,19 ± 0,07 | 1,79 ± 0,51 | 2,14 ± 0,71 | 0,27 ± 0,09 | 0,33 ± 0,06 |
| 6 | | 4,20 ± 1,08 | 5,42 ± 1,51 | 0,29 ± 0,10 | 0,16 ± 0,07 | 1,85 ± 0,50 | 2,06 ± 0,63 | 0,27 ± 0,08 | 0,38 ± 0,09 |
| 9 | 0 | 4,06 ± 0,61 | 4,90 ± 1,95 | 0,29 ± 0,12 | 0,15 ± 0,03 | 1,78 ± 0,51 | 1,79 ± 0,53 | 0,26 ± 0,07 | 0,39 ± 0,10 |
| | 1 | 4,59 ± 0,76 | 4,81 ± 1,69 | 0,30 ± 0,10 | 0,17 ± 0,05 | 1,72 ± 0,56 | 1,81 ± 0,69 | 0,30 ± 0,10 | 0,47 ± 0,12 |
| | 2 | 4,69 ± 0,74 | 7,11 ± 2,27 | 0,32 ± 0,12 | 0,17 ± 0,06 | 1,78 ± 0,63 | 1,74 ± 0,78 | 0,33 ± 0,11 | 0,66 ± 0,20 |
| | 4 | 4,65 ± 0,85 | 10,42 ± 3,41 | 0,32 ± 0,11 | 0,14 ± 0,06 | 1,81 ± 0,68 | 1,28 ± 0,46 | 0,32 ± 0,08 | 0,90 ± 0,23 |
| | 7 | 4,33 ± 0,87 | 12,24 ± 3,08 | 0,28 ± 0,11 | 0,11 ± 0,05 | 1,88 ± 0,64 | 0,90 ± 0,23 | 0,29 ± 0,09 | 0,91 ± 0,21 |
| | 10 | 4,34 ± 1,06 | 11,62 ± 2,78 | 0,29 ± 0,14 | 0,10 ± 0,08 | 1,94 ± 0,80 | 1,03 ± 0,22 | 0,33 ± 0,09 | 0,70 ± 0,44 |
| 10 | 22 | 4,12 ± 0,89 | 5,00 ± 1,45 | 0,31 ± 0,12 | 0,13 ± 0,04 | 1,97 ± 0,54 | 1,94 ± 0,52 | 0,29 ± 0,07 | 0,39 ± 0,07 |
| | 26 | 4,90 ± 1,14 | 5,36 ± 1,57 | 0,36 ± 0,14 | 0,19 ± 0,05 | 2,06 ± 0,70 | 2,04 ± 0,84 | 0,34 ± 0,09 | 0,54 ± 0,15 |
| | 30 | 4,75 ± 1,11 | 5,23 ± 1,65 | 0,33 ± 0,16 | 0,17 ± 0,05 | 2,17 ± 0,70 | 1,95 ± 0,90 | 0,32 ± 0,08 | 0,61 ± 0,24 |
| 12 | | 4,35 ± 0,90 | 4,14 ± 1,21 | 0,28 ± 0,09 | 0,18 ± 0,08 | 1,68 ± 0,47 | 1,30 ± 0,38 | 0,27 ± 0,08 | 0,42 ± 0,21 |
| 16 | | 4,72 ± 1,46 | 5,41 ± 1,20 | 0,31 ± 0,10 | 0,24 ± 0,08 | 1,93 ± 0,53 | 1,64 ± 0,54 | 0,31 ± 0,10 | 0,37 ± 0,11 |
| 20 | | 4,47 ± 1,48 | 5,04 ± 0,97 | 0,26 ± 0,12 | 0,25 ± 0,09 | 1,77 ± 0,57 | 1,65 ± 0,47 | 0,30 ± 0,11 | 0,27 ± 0,12 |

I figur 1–4 visas neutrofil-, eosinofil-, lymfocyt- och monocytresultaten från varje hund för provtagningen före behandling med sista läkemedelsivan dag 9 (timme 0) till och med 30 timmar efter sista tablettgivan. En signifikant höjning av neutrofilerna kunde ses hos de behandlade hundarna mellan fyra och tio timmar efter sista läkemedelsgiva. Sju av de nio hundars neutrofiler steg vid ett eller flera tillfällen över det övre referensvärdet på 11,5 x 10⁹ g/L (figur 1) men det var enbart en hund vars värde passerade över 15 x 10⁹ g/L. Lymfocyterna var signifikant lägre mellan sju och tio timmar efter sista läkemedelsgiva. Lymfocyterna var signifikant lägre mellan sju och tio timmar efter sista läkemedelsgiva (figur 3). Alla hundarna hade lymfocytantal under det nedre referensvärdet på 1,4 x 10⁹ g/L vid ett eller flera tillfällen. Det ska dock

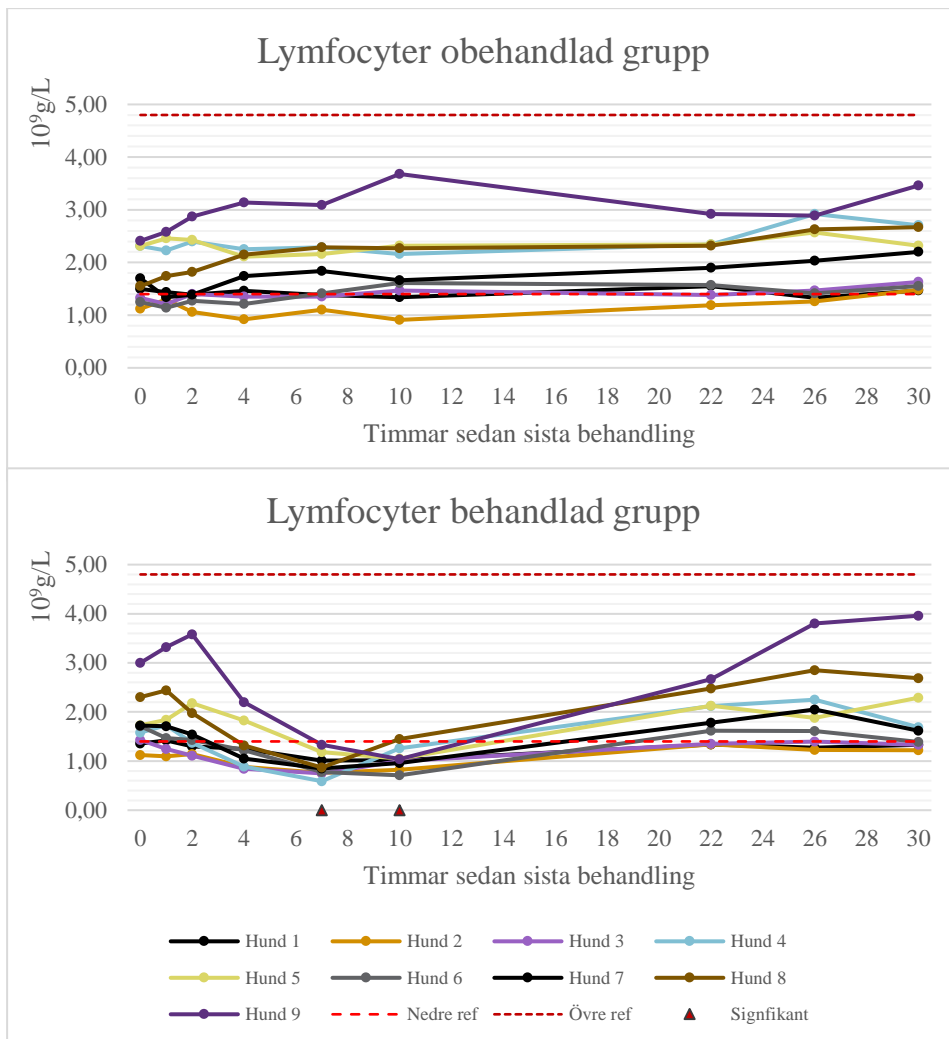
påpekas att två av hundarna (hund 2 och hund 3) vid vissa tidpunkter låg under det nedre referensvärdet som obehandlade och att det var flera hundar i obehandlad grupp som låg i det nedre referensvärdesområdet. Monocyterna var statistiskt signifikant högre endast mellan två och tio timmar efter sista läkemedelsgiva. De behandlade hundarna hade dock högre monocytvärden än kontrollgruppen även vid vissa morgonprov (dag 1, 6 och 10), men de uppnådde inte signifikant skillnad. Endast en av de nio hundarnas monocyter steg vid ett tillfälle över det övre referensvärdet på $1,4 \times 10^9$ g/L (figur 4). Eosinofilerna var statistiskt signifikant lägre endast vid provtagningen tio timmar efter sista behandling, men eosinofilalet var lägre vid de flesta provtagningarna under behandlingen, än var de var vid studiens start och när de var kontrollhundar. Sju av nio hundars eosinofiler sjönk vid ett eller flera tillfällena nedanför det nedre referensvärdet på $0,1 \times 10^9$ g/L (figur 2). Alla referensvärden är hämtade från analyserande laboratorium.



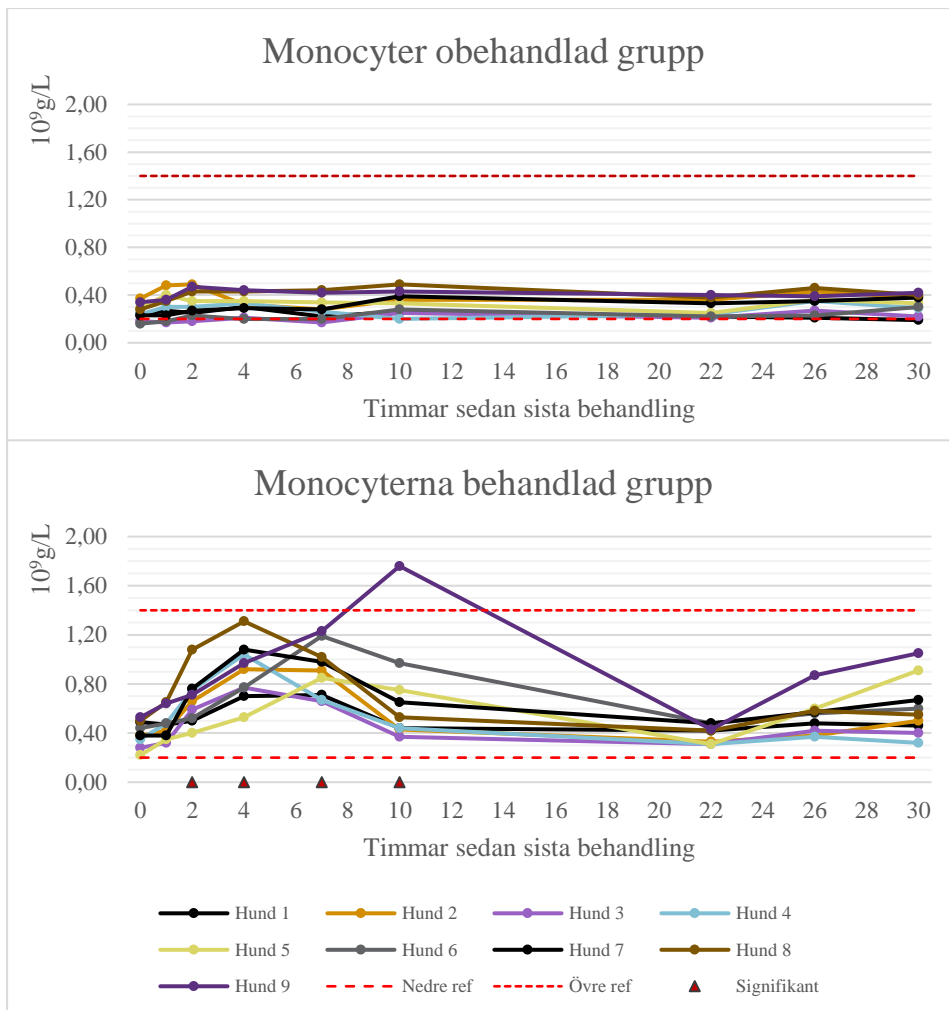
Figur 1. Observerad neutrofilkoncentration över tid från provtagningen före sista behandlingstillfället dag 9 i kontrollgrupp (överst) och behandlingsgrupp (nederst). Referensvärdena $3,0-11,5 \times 10^9$ g/L är markerade med streckade röda linjer. Tidpunkter där statistiskt signifikanta skillnader kunde påvisas är märkta med ▲.



Figur 2. Observerad eosinofilkoncentration över tid från provtagningen före sista behandlingstillfället dag 9 i kontrollgrupp (överst) och behandlingsgrupp (nederst). Nedre referensvärde $0,1 \times 10^9$ g/L är markerade med streckad röd linje. Tidpunkter där statistiskt signifikanta skillnader kunde påvisas är märkta med \blacktriangle . Hund 1 är exkluderad på grund av felaktiga eosinofilresultat vid analysering.



Figur 3. Observerad lymfocytkoncentration över tid från provtagningen före sista behandlingstillfället dag 9 i kontrollgrupp (överst) och behandlingsgrupp (nederst). Referensvärden $1,4-4,8 \times 10^9$ g/L är markerade med streckade röda linjer. Tidpunkter där statistiskt signifikanta skillnader kunde påvisas är märkta med ▲.



Figur 4. Observerad monocytkoncentration över tid från provtagningen före sista behandlingstillfället dag 9 i kontrollgrupp (överst) och behandlingsgrupp (nederst). Referensvärden $0,2-1,4 \times 10^9$ g/L är markerade med streckade röda linjer. Tidpunkter där statistiskt signifikanta skillnader kunde påvisas är märkta med ▲.

Erytrocyter och trombocyter

Ingen signifikant skillnad sågs vid något tillfälle mellan behandlad och obehandlad grupp avseende erytrocyt- och trombocytvärden. Medelvärden och standardavvikelser på dessa parametrar i behandlad och obehandlad grupp för alla mätpunkter återfinns i tabell 4.

Tabell 4. Medelvärde och standardavvikelse för erytrocytantal, hemoglobinkoncentration, MCV, reticulocytantal och trombocytantal vid morgonprovtagningarna dag 0, 1, 3, 6, 9, 10, 12, 16 och 20 samt 1, 2, 4, 7, 10, 22, 26 och 30 timmar efter peroral behandling med 1mg/kg prednisolon i behandlad och obehandlad (kontroll) grupp. Alla morgonprover är baserade på 10 hundar (svart text). Resultat i blå text är beräknade på 9 hundar eftersom hund 10 exkluderats på grund av avsaknad av kontrollprover under övriga provtagningar under dag 9 och 10. Ingen signifikant förändring kunde ses mellan behandlad och obehandlad grupp

| Dag | Tim | EPK (x 10 ¹² /L) | | Hb-konc. (g/L) | | MCV (fl) | | Reticulocyter (x10 ⁹ /L) | | Trombocyter (x 10 ⁹ /L) | |
|-----------|-----|--------------------------------|-------------|-------------------|----------|-------------|------------|--|-------------|---------------------------------------|----------|
| | | Kontroll | Beh | Kontroll | Beh | Kontroll | Beh | Kontroll | Beh | Kontroll | Beh |
| 0 | | 7,48 ± 0,75 | 7,33 ± 0,67 | 165 ± 16 | 162 ± 18 | 65,4 ± 1,9 | 65,2 ± 2,0 | 42,0 ± 25,6 | 27,9 ± 8,2 | 286 ± 54 | 258 ± 44 |
| 1 | | 7,43 ± 0,67 | 7,23 ± 0,44 | 163 ± 16 | 159 ± 14 | 65,4 ± 2,0 | 65,3 ± 1,9 | 32,3 ± 19,4 | 24,2 ± 8,8 | 266 ± 78 | 271 ± 47 |
| 3 | | 7,44 ± 0,63 | 7,15 ± 0,49 | 165 ± 16 | 160 ± 14 | 65,7 ± 2,0 | 64,8 ± 1,6 | 36,3 ± 26,0 | 25,6 ± 10,6 | 279 ± 56 | 276 ± 46 |
| 6 | | 7,56 ± 0,65 | 7,25 ± 0,49 | 168 ± 16 | 161 ± 14 | 66,0 ± 1,6 | 65,1 ± 1,7 | 48,2 ± 30,1 | 29,5 ± 8,7 | 273 ± 54 | 274 ± 66 |
| 9 | 0 | 7,16 ± 0,76 | 6,99 ± 0,41 | 160 ± 17 | 156 ± 13 | 65,3 ± 2,0 | 65,3 ± 1,8 | 31,3 ± 20,0 | 18,8 ± 8,0 | 272 ± 53 | 275 ± 64 |
| | 1 | 6,92 ± 0,31 | 6,71 ± 0,47 | 153 ± 11 | 149 ± 13 | 65,2 ± 2,3 | 65,2 ± 2,0 | 23,5 ± 14,0 | 17,4 ± 8,8 | 273 ± 50 | 273 ± 62 |
| | 2 | 6,69 ± 0,41 | 6,60 ± 0,40 | 148 ± 12 | 148 ± 11 | 65,2 ± 2,1 | 65,4 ± 1,9 | 20,6 ± 14,7 | 16,0 ± 8,5 | 281 ± 54, | 274 ± 57 |
| | 4 | 6,39 ± 0,52 | 6,42 ± 0,38 | 143 ± 12 | 145 ± 11 | 64,9 ± 2,1 | 65,1 ± 2,0 | 21,9 ± 16,2 | 14,3 ± 7,4 | 241 ± 75 | 257 ± 82 |
| | 7 | 6,41 ± 0,38 | 6,62 ± 0,42 | 142 ± 9 | 148 ± 12 | 65,3 ± 2,1 | 65,1 ± 2,0 | 21,0 ± 14,9 | 17,1 ± 10,1 | 234 ± 74 | 261 ± 83 |
| 10 | 10 | 6,36 ± 0,52 | 6,44 ± 0,37 | 143 ± 14 | 144 ± 9 | 65,4 ± 2,3 | 65,1 ± 2,1 | 20,5 ± 15,1 | 14,3 ± 7,6 | 281 ± 74 | 259 ± 88 |
| | 22 | 7,33 ± 0,71 | 6,95 ± 0,57 | 163 ± 18 | 155 ± 14 | 65,2 ± 1,7 | 65,0 ± 1,7 | 36,9 ± 21,8 | 21,4 ± 13,4 | 272 ± 55 | 284 ± 77 |
| | 26 | 7,13 ± 0,44 | 7,07 ± 0,74 | 160 ± 12 | 160 ± 19 | 65,0 ± 2,0 | 65,5 ± 1,8 | 27,3 ± 15,0 | 18,2 ± 5,5 | 267 ± 54 | 284 ± 66 |
| 12 | 30 | 6,93 ± 0,46 | 7,01 ± 0,77 | 153 ± 12 | 157 ± 20 | 65,4 ± 1,9 | 65,2 ± 2,0 | 27,7 ± 13,3 | 20,5 ± 7,5 | 268 ± 58 | 267 ± 66 |
| | | 7,15 ± 0,57 | 6,95 ± 0,61 | 159 ± 13 | 154 ± 16 | 65,6 ± 1,9 | 64,7 ± 1,8 | 38,2 ± 21,7 | 21,3 ± 6,9 | 267 ± 51 | 274 ± 92 |
| 16 | | 7,22 ± 0,60 | 6,96 ± 0,60 | 161 ± 14 | 155 ± 17 | 66,0 ± 1,9 | 65,6 ± 1,9 | 35,7 ± 11,6 | 34,9 ± 12,8 | 289 ± 56 | 306 ± 97 |
| 20 | | 7,10 ± 0,61 | 6,82 ± 0,46 | 158 ± 13 | 152 ± 13 | 66,0 ± 1,9 | 65,8 ± 1,8 | 46,1 ± 21,0 | 50,0 ± 15,3 | 297 ± 59 | 325 ± 79 |

DISKUSSION

I denna crossover-studie med peroral prednisolonbehandling (1mg/kg) till tio hundar sågs att provtagningstidpunkten i förhållande till behandlingstiden var avgörande för antalet neutrofiler, och lymfocyter. Vid provtagning 22 timmar efter medicingiva kunde inga signifikanta skillnader mellan behandlade hundar och kontrollgruppen ses, medan prednisolon 1mg/kg gav upphov till en signifikant höjning av neutrofiler hos behandlade hundar fyra till tio timmar efter behandling och signifikant lägre lymfocyter sju till tio timmar efter behandling. Monocytantalet var statistiskt signifikant högre två till tio timmar efter läkemedelsgeva, medan eosinofilalet var bara signifikant lägre vid provtagning tio timmar efter sista behandling. Dock sågs en trend till ökat antal monocyter och minskat antal eosinofiler vid flera provtagningstillfällen under perioden med prednisolonbehandling, men dessa förändringar uppnådde inte signifikans på grund av korrigering för multipla provtagningar.

Resultatet stämmer relativt bra överens med en studie på tre blandrashundar som visade snarlika tidsmönster för leukocytförändringarna när de studerade de hematologiska förändringar efter en peroral engångsgeva av 20mg (1,3-2,2mg/kg) prednisolon (Jasper & Jain, 1965). Den studien innehöll ingen statistisk bearbetning utan deras resultat verkar bygga på tolkning av grafer över hur leukocyterna förändrats procentuellt över tid efter behandling jämfört med innan behandling. Neutrofilantalet steg med 200–300 % vid maxnivå, monocytorna steg inte riktigt lika mycket, eosinofilerna sjönk med 60–100 %, medan lymfocyt-sänkningen var mindre framträdande. Hos hundarna i den aktuella studien var de procentuella förändringarna mellan provet innan prednisolonbehandlingen startade och provet med maximal förändring ganska jämförbara med resultaten från Jasper & Jain (1965).

Adolfsson (2019) har använt samma dos och hundar som aktuell studie men i form av en engångsgeva av intravenöst prednisolon-natriumsuccinat. Leukocytförändringarna startade tidigare samt kvarstod lite längre när prednisolonet gavs intravenöst och det är även fler (fyra) av hundarna i Adolfsson (2018) som når en neutrofilkoncentration på över 15×10^9 g/L jämfört med i aktuell studie där enbart en hund gör det. Förändringarna i eosinofilalet i den intravenösa studien var inte signifikanta och monocytorna rapporterades inte. Att förändringarna i neutrofil- och lymfocytantal kommer tidigare och når högre nivåer i Adolfsson (2018) kan troligen i alla fall delvis förklaras med att administrations sättet skiljer sig åt. Vid peroral geva ska absorption ske i magtarmkanalen vilket gör att prednisolonet når blodet senare och i något lägre koncentration än vid intravenös geva.

Masters et al (2018), gav 1mg/kg prednisolon, peroralt en gång dagligen i 14 dagar till 11 hundar med allergisk dermatit och 11 kontrollhundar för att sedan trappa ut dosen succesivt (0,5mg/kg x1) PO i 3 dagar och sedan 0,5mg/kg varannan dag i tre doser. Blodprover togs dag 0, 7, 14, 35. I studien sågs signifikant ökning av neutrofilerna dag 7 och 14 samt signifikant sänkning av eosinofilerna dag 7 men inga signifikanta förändringar uppnåddes för varken monocytorna eller lymfocytorna. I artikeln angavs att medicineringen skedde kvällstid av ägare och att ägarna var instruerade att ge frukost hemma mellan kl. 06 och 08 på morgonen den dagen hundarna togs till kliniken. Av denna anledning är det troligt att tiden mellan medicinering och provtagning kan antas vara 12 timmar eller mer. Eftersom hundarna i denna studie hade allergisk dermatit kan hematologiska förändringar, såsom neutrofilökningen, delvis vara

orsakad av sjukdomen. Detta är även något som författarna till studien själva tar upp och diskuterar kort.

Moore *et al.* (1992) gav 12 friska hundar prednison, istället för prednisolon i liknande dagsdos som aktuell studie, men uppdelat på två givor dagligen (0,55mg/kg/tillfälle) i 35 dagar och tog blodprover varannan vecka under och efter behandling. De såg ingen signifikant förändring av neutrofil- eller monocytantal utan bara signifikant lägre antal lymfocyter och eosinofiler. Det framgår dock inte när i förhållande till medicinering som blodproverna i Moore *et al.* (1992) är tagna utan bara att det är prov tagna efter 12h fasta. Detta gör att deras prover troligen är tagna kring 12 timmar efter medicineringen, då den brukar ges i samband med mat. Eventuellt kan detta, i kombination med dosering (0,55mg/kg) två gånger dagligen, kanske förklara att neutrofil och monocytantalet hunnit normaliseras, medan effekterna på lymfocyter och eosinofiler fortfarande kvarstod. Det kan även ha påverkat att Moore *et al.* använt sig av prednison, medan aktuell studie bygger på prednisolon. Eftersom prednison är en pro-drug till prednisolon har det antagits ha ungefär samma verkan som prednisolon vid jämförelse mellan de bägge studiernas resultat.

Dillon *et al.* (1980) gav 1mg/kg x2 prednisolonacetat i 3, 7, 14 eller 28 dagar intramuskulärt till fyra grupper med sex hundar i varje grupp. Deras enda signifikanta resultat var en sänkning av eosinofilerna. Hundarna i denna studie hade avvikande leukocytantal innan studiens start vilket försvårar tolkning av deras resultat. Att det är prednisolonacetat som använts skulle även det kunna ha en påverkan då det ger en förlängd absorption och frisättning.

I aktuell studie hamnade lymfocytantalet nedanför det nedre referensvärdet hos alla hundarna i behandlingsgruppen vid de två mätpunkterna som visade statistisk signifikant förändring efter behandling, vilket framgår av figur 2. Det ska dock, som tidigare nämnts, påpekas att hundarna generellt låg lågt i antalet lymfocyter och att det även i obehandlad grupp återfinns hundar med mätvärden under det nedre referensvärdet. Flera hundars neutrofilvärden låg kvar inom referensvärde (figur 1) vid mätpunkter där statistisk signifikant förändring förelåg och detsamma gäller eosinofiler (figur 3) och monocytter (figur 4). Detta är kliniskt viktigt att tänka på för att tolka blodprovssvar korrekt hos en hund som fått behandling med prednisolon inom det närmsta dygnet. Blodprov tas ofta dagtid, och med en morgonmedicinering medför detta att blodprov mycket troligt kommer tas inom det tidsspänn (1–10 timmar) efter medicingiva där leukocytförändringar kunde ses i vår studie. Vid en kvällsbehandling och provtagning dagtid skulle tiden mellan medicinering och provtagning troligen hamna mellan 10 och 22 timmar, ett tidsspänn där inga prover tagits i aktuell studie. Nämnvärt är även att både neutrofilerna och monocytterna verkar ha haft sitt högsta värde och börjat vända nedåt mot sitt normalvärde vid provtagningen tio timmar efter behandling och således kan det tänkas att dessa inte kommer vara förändrade om medicinen getts på kvällen innan provtagning. Vidare är det även av klinisk relevans att veta att neutrofilerna inte verkar stiga särskilt kraftigt då enbart en av de nio hundarna fick ett värde över 15×10^9 g/L. Det är också nämnvärt ur en klinisk aspekt att källor (Willard & Tvedten, 2012) beskriver att antalet eosinofiler hos friska hundar varierar kraftigt. Eftersom man inte alltid finner några eosinofiler hos friska hundar anses eosinopeni generellt ha väldigt lite klinisk betydelse.

Erhållna resultatet att erytrocyt- och trombocytvärden ej förändras signifikant stämmer väl överens med tidigare studier utförda på glukokortikoiders hematologiska påverkan (Jasper & Jain, 1965; Dillon *et al.*, 1980; Masters *et al.*, 2018). Det faktum att Moore *et al.* (1992) erhållit ett resultat som tyder på att glukokortikoider har påverkan på trombocyter förklarar de själva helt eller delvis kan bero på att kontrollgruppen haft låga nivåer trombocyter av okänd anledning jämfört med individerna i behandlingsgruppen.

Jämfört med tidigare studier inom området bygger aktuell studie på ett antal hundar (10) som får anses vara ett acceptabelt antal och det relativt täta provtagningsintervallet är en av studiens främsta styrkor. Det faktum att provtagna hundar varit sina egna kontroller får även det anses vara en styrka och att det är försökshundar som är vana vid provtagning minskar påverkan av stress i samband med provtagning. Att hundarna var lite äldre individer kan anses positivt då det troligen bättre speglar åldern på klinikers patienter jämfört med om bara unga individer använts. Förbättringar av studien skulle kunna vara att inkludera fler raser och mätpunkter mellan 10 och 22 timmar. Det vore även intressant att se om en medicinering med 0,5mg/kg två gånger dagligen ger samma förändringar. Svagheter i studien inkluderar att en hund (hund 10) behövde rekryteras senare och därför avvek något gällande provtagningsintervall samt att hund 1 var tvungen att exkluderas ur resultaten för eosinofiler på grund av felaktiga eosinofilantal. I studien har ett automatiserat hematologiinstrument används eftersom detta har bättre precision än en manuell differentialräkning. Detta gäller speciellt för leukocyttyper med få celler såsom eosinofiler. Det finns dock alltid en risk för att instrumentet missbedömer en celltyp som någon annan, vilket var det som hände med eosinofilerna hos en hund.

KONKLUSION

Av resultatet framgår att det är när, i förhållande till medicingiva, som påverkar vilka förändringar i hematologin som är att förvänta. Det är därför av största vikt att vid bedömning av provsvar ha med sig denna information för att undvika feltolkningar och aktuell studie visar att blodprov taget inom en timme eller efter mer än 24 timmar oftast uppvisar inga eller små hematologiska förändringar vid peroral behandling med 1mg/kg prednisolon till hund. Av resultatet framgår även att förändringarna inte alltid är så kraftiga att de resulterar i ett värde som ligger utanför referensvärde.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Inledning och litteraturöversikt

Kroppens binjurar producerar flera livsviktiga hormoner som bland annat bidrar till att upprätthålla vatten- och saltbalansen samt påverkar kolhydrat- och proteinämnesomsättningen. Ett exempel på sådant livsviktigt ämne är kortisol, vilket är en av kroppens egna producerade glukokortikoider. Glukokortikoider kan även framställas på konstgjord väg och det finns flera exempel på syntetiska glukokortikoider som ofta används som läkemedel till djur. De har anti-inflammatoriska egenskaper och dämpar immunförsvaret och kan användas som behandling vid bland annat allergier, tumörsjukdomar och vid immunmedierade sjukdomar där kroppens immunförsvaret angriper den egna kroppen. Det kan även användas när kroppen inte klarar av att producera tillräcklig mängd kroppsegna glukokortikoider, vilket är fallet vid binjurebarksinsufficiens. Exempel på syntetiska glukokortikoider som används inom veterinärmedicin är hydrokortison, kortison, prednisolon, prednison och dexametason. Eftersom de har lite olika kemisk uppbyggnad har de lite olika egenskaper i form av hur länge de verkar och hur kraftiga de är i sin verkan. Prednisolon, vilket är det läkemedel som använts i den här studien, har en medellång verkan i kroppen och är ett av de vanligaste utskrivna läkemedlen till hund.

En av de vanligaste undersökningarna vid veterinärbesök är blodprovsanalys. I blodet finns flera olika typer av celler och ämnen som kan analyseras. En av de vanligaste analyserna som görs är att undersöka blodbildningen (hematologin). Då studeras de röda blodkropparna, de vita blodkropparna och blodplättarna. De vita blodcellerna är en del av kroppens immunförsvaret och det finns flera olika sorter bland annat neutrofiler, lymfocyter, monocyter och eosinofiler. Vid undersökning av blodbildningen studeras dels det totala antalet vita blodkroppar dels antalet av de olika typerna.

Behandling med glukokortikoider har flera biverkningar såsom ökad törst, ökad hunger, ökad urineringsfrekvens, muskelfattighet, förlängd sårhelning och viktökning. Det anses även allmänt känt att en stegring av glukokortikoider i blodet (syntetiska eller kroppsegna) påverkar blodbildningen i form av att antalet neutrofiler och monocyter ökar medan antalet eosinofiler och lymfocyter sjunker. Tidigare studier som gjorts på hur glukokortikoider förändrar blodbildningen är få och de som finns har många gånger använt sig av andra glukokortikoider än prednisolon i tablettform och/eller av långa tider mellan blodproverna i studien. Vi ville därför se hur prednisolon (en av de mest förskrivna glukokortikoiderna) förändrade blodbildningen när det gavs till hundar i en kliniskt relevant dos på 1mg/kg.

Material och metoder

I studien ingick 10 hundar av rasen beagle. Hundarna var undervisnings- och försökshundar vid SLU, Sverige lantbruksuniversitet. Hundarna delades in i två grupper och studien delades upp i två omgångar med fem veckor emellan. I första omgången behandlades ena gruppen med prednisolon (1mg/kg), vilket gavs som tablett i fodret på morgonen, en gång dagligen i 10 dagar medan andra gruppen inte fick någon behandling, utan agerade kontrollgrupp. I andra omgången bytte grupperna plats och de som först ingått i kontrollgruppen fick behandling medan gruppen som fått behandling i första omgången agerade kontroll. Det togs blodprov innan morgonfodringen dag 0, 1, 3, 6, 9, 10, 12, 16 och 20 samt 1, 2, 4, 7, 10, 22, 26 och 30 timmar

efter sista behandlingstillfälle på alla hundar, inklusive de som agerade kontroll. Provet som togs 22 timmar efter sista givan är samma som morgonprovet dag 10. Eftersom en hund blev sjuk var man tvungen att byta ut denna mot en annan. Detta medför att en av hundarnas provtagningsintervall inte stämmer med övrigas och det saknades några prover för den sent inkomna hunden. Blodproven analyserades inom två timmar och resultatet från när hundarna fått behandling jämfördes med när de agerat kontroll och inte fått någon behandling. En statistisk analys utfördes vid detta jämförande för att undvika att skillnaderna mellan behandlad och obehandlad grupp skulle bero på slumpen.

Resultat och Diskussion

Efter behandling med 1mg/kg prednisolon sågs de tydligaste förändringarna i antalet vita blodkroppar vid provtagning mellan 2 och 10 timmar från tablettgiva. De statistiskt signifikanta förändringarna som sågs mellan resultatet från behandlad grupp jämfört med resultatet från obehandlad kontrollgrupp var följande: förhöjda neutrofiler fyra-tio timmar efter behandling, förhöjda monocyter två-tio timmar efter behandling, låga lymfocyter sju-tio timmar efter behandling och låga eosinofiler vid provtagningen tio timmar efter behandling. Någon förändring avseende de röda blodkropparna eller blodplättarna kunde inte ses.

Några av tidigare studier inom området har fått liknande resultat medan andra skiljer sig åt. Det som verkar viktigast att tänka på är att det är när blodprovet tas i förhållande till medicingivan som avgör vilka blodbildsförändringar som är förväntade. Hos de vita blodkropparna kom de kraftigaste förändringar mellan två till tio timmar efter tablettgiva, men dessa är inte alltid så kraftiga att de leder till värden utanför det som anses normalt. Det är därför av stor vikt för den som tolkar provsvaren att fundera över när blodprovet tagits i förhållande till medicingivan för att kunna göra en korrekt tolkning. Veterinären bör även ha i åtanke att även om förändringar sker, är det inte alla som kommer att vara utanför referensintervallen.

REFERENSER

- Adolfsson, S. (2019). *Prednisolon i klinisk dosering intravenöst till hund*. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet (Examensarbete, Avancerad nivå A2E) . Tillgänglig: <https://stud.epsilon.slu.se/14896/> [2019-11-14]
- Behrend, E.N. & Kempainen, R.J. (1997). Glucocorticoid therapy: pharmacology, indications, and complications. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 27(2):187–213.
- Braun, J.P., Guelfi, J.F., Thouvenot, J.P. & Rico, A.G. (1981). Haematological and biochemical effects of a single intramuscular dose of 6 α -methylprednisolone acetate in the dog. *Research in Veterinary Science*, 31(2):236–238.
- Cohn, L.A. (1997). Glucocorticosteroids as immunosuppressive agents. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, 12(3):150–156.
- Dillon, A.R., Spano, J.S. & Powers, R.D. (1980). Prednisolone induced hematologic, biochemical, and histologic changes in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 16(6):831–837.
- Elkholly, D.A., O'Neill, D., Wright, A.K., Mwacalimba, K., Nolan, L.S., Pavlock, A., Pelligand, L., Church, D. & Brodbelt, D.C. (2019). Systemic glucocorticoid usage in dogs under primary veterinary care in the UK: prevalence and risk factors. *Veterinary Record*, 185(4):108–108.
- Feldman, E.C. (2004). Glucocorticoid therapy. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders. 464-482.
- Gjerstad, J.K., Lightman, S.L. & Spiga, F. (2018). Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress*, 21(5):403–416.
- 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):844–850.
- Kalenyak, K. & Heilmann, R.M. (2018). [Canine hypoadrenocorticism - an update on pathogenesis, diagnosis and treatment]. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 46(3):163–175.
- 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):219–226.
- Latimer, K.S. & Rakich, P.M. (1989). Clinical interpretation of leukocyte responses. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 19(4):637–668.
- Lilliehöök, 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):450–458.
- Masters, A.K., Berger, D.J., Ware, W.A., Langenfeld, N.R., Coetzee, J.F., Mochel, J.P.M. & Ward, J.L. (2018). Effects of short-term anti-inflammatory glucocorticoid treatment on clinicopathologic, echocardiographic, and hemodynamic variables in systemically healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 79(4):411–423.
- 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):1033–1037.
- Moritz, A., Becker, M. (2010). Automated Hematology System. I: Douglas J. Weiss & K. Jane Wardrop (red). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Ames, IA: Wiley Blackwell, 1054-1066.
- O'Neill, D., Hendricks, A., Summers, J. & Brodbelt, D. (2012). Primary care veterinary usage of systemic glucocorticoids in cats and dogs in three UK practices. *The Journal of Small Animal Practice*, 53(4):217–222.

- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. & Henderson, G. (2016). *Rang and Dale's Pharmacology*. 8th ed. London: Churchill Livingstone, 402-417.
- Siemens. (2006). *Operatörshandbok, ADVIA 2120 Hematology System*, REF 067D0147-01, V. 2.00.00, 2006-12. Eschborn, Tyskland: Siemens Medical Solution Diagnostics Kap 30
- Thomas, R.C., Logas, D., Radosta, L. & Harrison, J. (2000). Effects of a 1% hydrocortisone conditioner on hematologic and biochemical parameters, adrenal function testing, and cutaneous reactivity to histamine in normal and pruritic dogs. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, 1(1):25–34.
- Viviano, K.R. (2013). Update on immunosuppressive therapies for dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(5):1149–1170.
- Willard, M.D. & Tvedten, H. (2012). *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-59996-5>
- Xing, Y., Lerario, A.M., Rainey, W. & Hammer, G.D. (2015). Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 44(2):243–274.
- Zinkl, J.G. (1981). The leukocytes. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 11(2):237–263.